

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-025488-00000-0000

Fecha: 2013-02-07 16:10:58

Tra. 11 PATENTE/II

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Eve: 378 FASENACIONALI

Folios: 259

Industr

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

13-25488

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

METODO PARA PRODUCIR EL FACTOR VON WILLEBRAND (vWF)

DE ALTO PESO MOLECULAR RECOMBINANTE EN CULTIVO CELULAR

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

BAXTER INTERNATIONAL INC. y
BAXTER HEALTHCARE S.A.

DOMICILIO

DEERFIELD, ILLINOIS, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
y CAMDEN PARK (OPFIRKON), SUIZA, RESPECTIVAMENTE

74. APODERADO

LUZ CLEMENCIA D E PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 13-025488- -00000-0000 Fecha: 2013-02-07 16:10:58 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 259
---	---

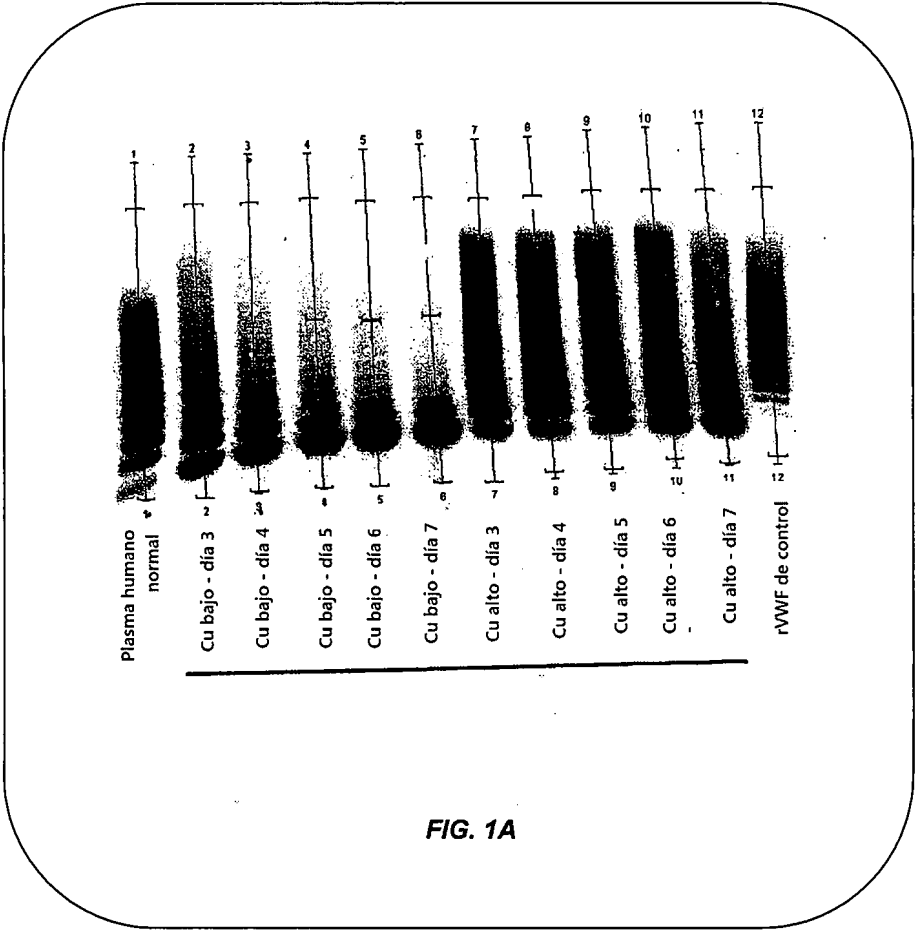
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/US2011/043455	Fecha 2011/07/08
Publicación Internacional No.		WO 2012/006591 A1	Fecha 2012/01/12
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN		
MÉTODO PARA PRODUCIR EL FACTOR VON WILLEBRAND (vWF) DE ALTO PESO MOLECULAR RECOMBINANTE EN CULTIVO CELULAR			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)		
A61K 038/036, C07K 014/755, C12N 005/000, C12N 005/010			
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN TIPO
1. BAXTER INTERNATIONAL INC.			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN CIUDAD		One Baxter Parkway, Deerfield 60015	No. TELÉFONO 3 47 36 11
DEPARTAMENTO/ESTADO		Illinois	CORREO ELECTRÓNICO clientes@cavelier.com
PAÍS DE RESIDENCIA		Estados Unidos de América	NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN
7	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS		Nombres	NACIONALIDAD
1. GRILLBERGER		Leopold	Austriaco
2. REITER		Manfred	Austriaco
3. MUNDT		Wolfgang	Austriaco
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
1. Austria		Vienna A-1220	Finsterergasse 1a,
2. Austria		Vienna A-1150	Gebrueder-Lang-Gasse 11/17,
3. Austria		Vienna A-1800	Florianigasse 57/1/26,
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☒ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.			

9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO				
APELLIDOS De Páez		NOMBRES Luz Clemencia		IDENTIFICACIÓN C.C . 35.456.344 T.P . 23.555	
DIRECCIÓN Carrera 4ª No. 72-35		No. TELÉFONO 3 47 36 11		CORREO ELECTRÓNICO cavelier@cavelier.com	
CIUDAD BOGOTA		No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL			
PAÍS COLOMBIA					
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO				
(33) PAÍS DE ORIGEN U.S.A.		CÓDIGO PAÍS US		(31) NÚMERO 61/362,635	(32) FECHA (AAAA/MM/DD) 2010/07/08
11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS				
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i>					
☐ SI ☐ NO					
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.					
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES				
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i>					
☐ SI ☐ NO					
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.					
13	REDUCCIÓN DE TASAS				
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i>					
☐ SI ☐ NO					
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.					
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐					
Universidades públicas o privadas ☐					
Entidades sin ánimo de lucro ☐					
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos					
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☐ NO				
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.					
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO		No. 13-006535		Fecha: 2013/01/22
16	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL				
<i>Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)</i>					
Nombre del Firmante LUZ CLEMENCIA DE PAEZ			Firma <i>Luz Clemencia De Páez</i>		
C.C 35.456.344 de Usaquen			Tarjeta Profesional 23.555		

17	ANEXOS
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano 1. ☒ Descripción N° de folios: 203 2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 45 3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: 13 4. ☒ Resumen. 5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso. 6. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso. 7. ☒ Arte final 12 x 12. 8. ☐ Anexo formato digital.	Documentación Jurídica 9. ☒ Poderes de BAXTER INTERNATIONAL INC. y BAXTER HEALTHCARE S.A. 10. ☒ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante. (Declaraciones de acuerdo con la Regla 4.17 del PCT) 11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso. 12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso. 13. Reducción de tasas Micro, pequeñas o medianas empresas ☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea. ☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004. Universidades públicas o privadas ☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación Entidades sin ánimo de lucro ☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio. ☐ Hoja de información complementaria. ☐ Otros, especificar 14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$500.000. 15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad. 16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación. 17. ☐ Comprobante de pago por reivindicaciones adicionales a 10.

FIGURA CARACTERISTICA



HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA PCT

1	(12) TIPO DE SOLICITUD		NUMERO DE RADICACIÓN	
☒ Patente de invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad			FECHA DE PRESENTACIÓN	
4	(71) SOLICITANTE (S)			
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN	TIPO
2. BAXTER HEALTHCARE S.A.				
5	DATOS DEL SOLICITANTE			
PAÍS DE RESIDENCIA		DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
2. Suiza			Glattpark (Opfikon) CH-8152	Thurgauerstrasse 130,
TELÉFONO		FAX	E-MAIL	NACIONALIDAD
6	(72) INVENTOR (ES)			
APELLIDOS		NOMBRE	NACIONALIDAD	
7	DATOS INVENTOR (ES)			
DIRECCIÓN		CIUDAD	DEPARTAMENTO/ESTADO	PAÍS RESIDENCIA
9	(30) DECLARACIONES DE PRIORIDAD			
PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	NÚMERO	FECHA (AAAA/MM/DD)

- (51) International Patent Classification:
C07K 14/755 (2006.01) A61K 38/36 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
- (74) Agent: TALUKDER, Gargi; Morgan, Lewis Bockius
LLP, One Market, Spear Street Tower, San Francisco, CA
94105 (US).
- (21) International Application Number:
PCT/US2011/043455
- (22) International Filing Date:
8 July 2011 (08.07.2011)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
61/362,635 8 July 2010 (08.07.2010) US
- (71) Applicants (for all designated States except US): BAX-
TER INTERNATIONAL INC. [US/US]; One Baxter
Parkway, Deerfield, IL 60015 (US). BAXTER
HEALTHCARE S.A [CH/CH]; Thurgauerstrasse 130,
CH-8152 Glattpark (Opfikon) (CH).
- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,
LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): GRILLBERGER,
Leopold [AT/AT]; Finsterergasse 1a, A-1220 Vienna
(AT). REITER, Manfred [AT/AT]; Gebrueder-Lang-
Gasse 11/17, A-1150 Vienna (AT). MUNDT, Wolfgang
[AT/AT]; Florianigasse 57/1/26, A-1800 Vienna (AT).
- Declarations under Rule 4.17:

[Continued on next page]

(54) Title: METHOD OF PRODUCING RECOMBINANT HIGH MOLECULAR WEIGHT vWF IN CELL CULTURE

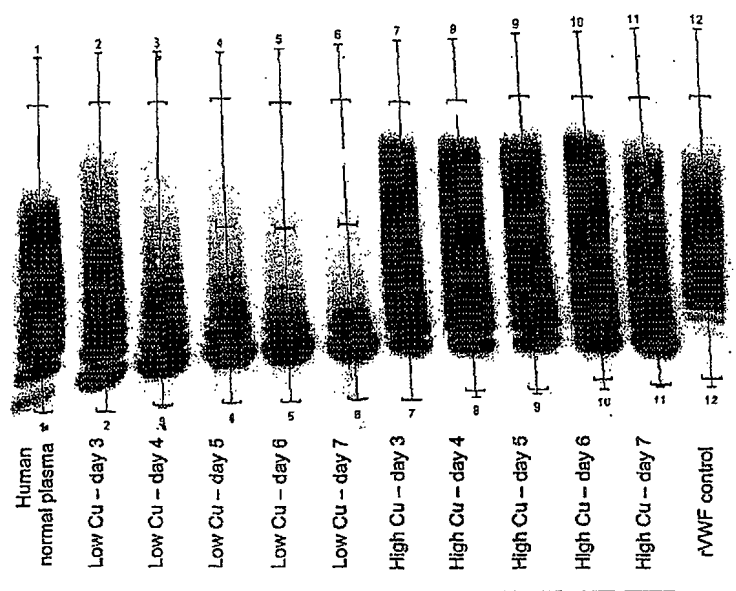


FIG. 1A

(57) Abstract: Among other aspects, the present invention relates to cell culture conditions for producing high molecular weight vWF, in particular, highly multi-mericWF with a high specific activity and ADAMTS13 with a high specific activity. The cell culture conditions of the present invention can include, for example, a cell culture medium with an increased copper concentration and/or cell culture supernatant with a low ammonium (NH₄⁺) concentration. The present invention also provides methods for cultivating cells in the cell culture conditions to express high molecular weight vWF and rA13 having high specific activities.

WO 2012/006591 A1



- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))

Published:

- with international search report (Art. 21(3))

**MÉTODO PARA PRODUCIR EL FACTOR VON WILLEBRAND (vWF) DE ALTO
PESO MOLECULAR RECOMBINANTE EN CULTIVO CELULAR**

REFERENCIA CRUZADA A LAS SOLICITUDES RELACIONADAS

5 Esta solicitud reivindica la prioridad de la
Solicitud de Patente Provisional Estadounidense Serie No.
61/362,635, presentada el 8 de Julio de 2008, la descripción
de la cual está de este modo incorporada en la presente por
referencia en su totalidad para todos los propósitos.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La expresión recombinante de proteínas terapéuticas
en cultivo celular (particularmente cultivos de células a
gran escala), que incluyen cultivo de células eucarióticas, y
15 más específicamente cultivo de células de mamífero, requiere
el uso de medios de cultivo especial que proporcionan
sustancias nutrientes para el crecimiento eficiente de
células. Las formulaciones de medio de cultivo celular son a
menudo suplementadas con un rango de aditivos, que incluyen
20 suero de bovino fetal (FCS), proteínas derivadas de animales
y/o hidrolizados de proteína de origen bovino, así como
también hidrolizados de proteínas derivadas de plantas o
levadura. Un reto con tales cultivos es que la cantidad de
proteína y la actividad específica y total de la proteína
25 producida son a menudo variables a través de diferentes

cultivos de células, aún cuando la formulación para el medio de cultivo celular no se cambia. Esta variabilidad es especialmente aparente en el caso de procesos de manufacturación a gran escala utilizando volúmenes de cultivo celular de 10 litros o más de 20,000 litros. Los medios de cultivo celular que contienen hidrolizados son particularmente propensos a variabilidad de un cultivo al siguiente, conduciendo a producción disminuida de proteína total así como también actividad específica y total disminuida.

Una razón potencial para la variabilidad vista a través de diferentes cultivos celulares es que contaminantes en aditivos tales como hidrolizados varían de un lote al siguiente. En general, el suero o sustancias derivadas del suero, tales como, por ejemplo, albúmina, transferrina o insulina, pueden comprender agentes indeseados que contaminan los cultivos celulares y los productos biológicos obtenidos de los mismos. Además, aditivos derivados de suero humano han sido probados para todos los virus conocidos, que incluyen virus de la hepatitis y HIV los cuales pueden ser transmitidos vía suero. Sin embargo, suero bovino y productos derivados de los mismos llevan el riesgo de contaminación por BSE. Además, todos los productos derivados del suero pueden ser contaminados por sustancias desconocidas. Cuando se usa suero o aditivos de proteína derivados de fuentes humanas y

animales en cultivo celular, existen numerosos problemas (por ejemplo, la calidad variante en composición de diferentes lotes y el riesgo de contaminación con micoplasma, virus o BSE), particularmente si las células son usadas en la
5 manufactura de fármacos o vacunas para administración humana. Por lo tanto, se han hecho muchos intentos para proporcionar sistemas hospederos y condiciones de cultivo eficientes, las cuales no requieren suero u otros compuestos de proteína animal.

10 Tal medio libre de suero ha sido desarrollado con base en extractos de proteína derivados de plantas o levadura. Por ejemplo, se conocen hidrolizados de soya por ser útiles para procesos de fermentación y pueden mejorar el crecimiento de muchos organismos, levaduras y hongos
15 fastidiosos. El documento WO 96/26266 describe que digestiones papaicas de harina de soya son una fuente de carbohidratos y nitrógeno y muchos de los componentes pueden ser usados en cultivo de tejidos. Franek et al. (Biotechnology Progress (2000) 16, 688-692) describe efectos
20 de promover la productividad y crecimiento de fracciones peptídicas de hidrolizado de trigo y soya.

El documento WO 96/15231 describe un medio libre de suero compuesto de un medio esencial mínimo sintético y un extracto de levadura para la propagación de células de
25 vertebrados y un proceso de producción de virus. Una

formulación de medio compuesta de un medio de cultivo de células basales que comprende un péptido de arroz y/o un extracto de levadura y una digestión enzimática del mismo, y/o un lípido de planta para crecimiento de células animales se describe en el documento WO 98/15614. Un medio que comprende hidrolizado de soya purificado para el cultivo de células recombinantes se describe en el documento WO 01/23527. El documento WO 00/03000 describe un medio que comprende un hidrolizado de soya y un extracto de levadura, pero también requiere la presencia de formas recombinantes de proteínas animales, tales como factores de crecimiento.

El documento EP-A-0 481 791 describe un medio de cultivo bioquímicamente definido para cultivar células CHO diseñadas por ingeniería, las cuales están libres de proteína, lípidos y carbohidratos aislados de una fuente además, que comprenden además una insulina recombinante o análogo de insulina, 1% a 0.025% en p/v de putrescina y peptona de soya digerida por papaína. El documento WO 98/08934 describe un cultivo de células eucarióticas libre de suero que comprende péptidos de soya hidrolizados (1-1000 mg/L), 0.01 a 1 mg/L de putrescina y una variedad de componentes derivados de animal, que incluyen albúmina, fetuina, varias hormonas y otras proteínas. En este contexto, se debe notar que la putrescina también es conocida por estar comprendida en medio estándar como DMEM/F12 de Ham en una

concentración de 0.08 mg/L.

Los hidrolizados de plantas y/o levadura, sin embargo, son mezclas indefinidas de oligopéptidos y otros componentes y contaminantes desconocidos. Sin embargo, la
5 calidad de lotes de hidrolizados comercialmente disponibles varía extremadamente. Como un resultado, existen grandes variaciones en la producción de proteínas recombinantes o productos virales (una variación de hasta un factor de tres) como una función de los lotes de hidrolizados usados
10 ("variación lote a lote"). Esta desventaja afecta la proliferación de las células así como también la expresión de proteína de cada célula. El documento US 2007/0212770 describe varios medios de cultivo químicamente definido, libre de proteína animal, y libres de oligopéptidos, que son
15 útiles para la producción a gran escala de biofarmacéuticos de proteínas recombinantes.

La hemostasis involucra la interacción de varias rutas de reacción hemostáticas que conducen finalmente a formación de trombo. Los trombos son depósitos de componentes
20 de la sangre en la superficie de la pared vascular que consisten principalmente de plaquetas sanguíneas agregadas y fibrina reticulada insoluble. La formación de fibrina es el resultado de proteólisis restringida de fibrinógeno por trombina, una enzima de coagulación. La trombina es el
25 producto final de la cascada de coagulación, un éxito de las

activaciones del zimógeno que se originan sobre las superficies de las plaquetas sanguíneas y leucocitos activados, y una variedad de células vasculares (para una inspección, cf. K. G. Mann et al., Blood, 1990, Vol. 76, pp. 1-16).

Una función importante en la cascada de coagulación reside en la activación del Factor X por el complejo del Factor IX activado (Factor IXa) y Factor VIII activado (Factor VIIIa). Una deficiencia o una disfunción de los componentes de este complejo está asociada con la enfermedad en la sangre conocida como hemofilia (J. E. Sadler & E. W. Davie: Hemophilia A, Hemophilia B, and von Willebrand's Disease, in G. Stamatoyannopoulos et al., (Eds.): The molecular basis of blood diseases. W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1987, pp. 576-602). La hemofilia A está relacionada con una deficiencia de la actividad del Factor VIII, mientras la Hemofilia B está relacionada con una deficiencia del Factor XI. El tratamiento actual consiste de una terapia de reemplazo usando preparaciones farmacéuticas comprendidas del factor de coagulación normal. De estas trombopatías, la Hemofilia A, ocurre más frecuentemente, afectando aproximadamente uno de 10,000 hombres. La terapia de reemplazo en pacientes con Hemofilia A involucra la administración repetida de preparaciones que contienen el Factor VIII normal por infusión intravenosa. El intervalo

entre las infusiones es una función de la degradación de la actividad del Factor VIII en la circulación de la sangre. La vida media de la actividad del Factor VIII después de una infusión difiere de un individuo a otro, variando de 10 a 30 horas. De este modo, una terapia profiláctica requiere una infusión cada dos a tres días. Esto constituye una carga pesada en la vida de pacientes hemofílicos, en particular, si el acceso venoso ha llegado a ser difícil debido a la cicatrización local después de punciones de aguja frecuentes por infusiones intravenosas.

Podría ser particularmente ventajoso si la frecuencia de las infusiones pudiera ser reducida usando el Factor VIII que tiene vidas medias extendidas. Es bien sabido en la técnica que la vida media del heterodímero del Factor VIII no activado depende fuertemente de la presencia del Factor de von Willebrand, el cual exhibe una fuerte afinidad al Factor VIII (aún no al Factor VIIIa) y sirve como una proteína portadora (J. E. Sadler and E. W. Davie: Hemophilia A, Hemophilia B and von Willebrand's disease, in G. Stamatoyannopoulos et al. (Eds.): The molecular basis of blood diseases. W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1987, pp. 576-602). Se sabe que pacientes que sufren de la enfermedad de von Willebrand tipo 3, quienes no tienen un Factor de von Willebrand detectable en su circulación de la sangre, también sufren de una deficiencia secundaria del Factor VIII. Además,

la vida media del Factor VIII intravenosamente administrado en estos pacientes es 2 a 4 horas, el cual es considerablemente más corto que las 10 a 30 horas observadas en pacientes con Hemofilia A. De estos hallazgos resulta que el Factor VIII tiende a una rápida separación de la circulación de la sangre y que este proceso es algo extendido inhibido por la complejación con su portador natural, von Willebrand Factor.

El factor Von Willebrand (vWF) es una glicoproteína de circulación en plasma ya que una serie de multímeros típicamente varían en tamaño desde aproximadamente 500 hasta 20,000 kD (ó 2 a 40 dímeros de vWF). Las formas diméricas y multiméricas de vWF están compuestas de subunidades de polipéptidos de 250 kD ligados en conjunto por enlaces disulfuro. El vWF media la adhesión inicial de plaquetas al sub-endotelio de la pared del recipiente dañado; solamente los multímeros más grandes también presentan actividad hemostática. El VWF multimerizado se une a la glicoproteína de la superficie de plaquetas Gplb α , a través de una interacción en el dominio A1 del VWF, para facilitar la adhesión de plaquetas. Se asume que las células endoteliales secretan grandes formas poliméricas de vWF y que aquellas formas de vWF las cuales tienen un bajo peso molecular (vWF de bajo peso molecular) se han originado de desdoblamiento proteolítico. Los multímeros que tienen grandes masas

moleculares son almacenados en los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales y liberados después de la estimulación.

La reducción de la actividad de enlace del FVIII, debido a ya sea niveles reducidos de proteína del vWF o afinidad de enlace disminuida del FVIII, resulta en uno de los tres tipos de enfermedad de von Willebrand. Además de, o alternativamente, ciertos tipos de enfermedad de von Willebrand están caracterizados por un incremento o decremento en el nivel de asociación de plaquetas mediadas por Gplb α , es decir en los Tipos 2A, 2B, y 2M (resumido en Castaman et al., Disorders of Hemostasis 88(1):94-108 (2003)). Como tal, la modulación de interacciones del vWF con tanto FVIII como Gplb α es una estrategia variable para el tratamiento de Hemofilia como enfermedad de von Willebrand.

Dada la importancia biológica del vWF, existe una necesidad constante en la técnica para mejorar formas para producir el vWF para aplicaciones terapéuticas. Es bien sabido que el vWF puede ser aislado de fuentes endógenas, tales como plasma sanguíneo humano. El vWF aislado es ventajoso en que tiene una alta actividad específica para llevar a cabo su función biológica y puede, por lo tanto, ser usado efectivamente como una proteína terapéutica para tratar enfermedades relacionadas, tales como la enfermedad de von Willebrand. Típicamente, el vWF de plasma tiene una actividad

de Ristocetina específica de aproximadamente 100 mU/ μ g, pero el aislamiento de plasma de sangre humana tiene desventajas debido a que, por ejemplo, el plasma puede contener una variedad de virus, tales como virus del HIV y/o hepatitis, los cuales pueden ser transferidos al paciente. Además, el plasma es un recurso limitado y, de este modo, la escasez del plasma puede ser problemática para proporcionar suficiente vWF para tratamiento. Como tal, los métodos recombinantes para producir vWF son ventajosos para atender algunos de los problemas asociados con la dependencia del plasma como una fuente para el vWF. Para producción recombinante, se clonó la longitud completa del ADNc del vWF; el propeptido corresponde a los residuos de aminoácido 23 a 764 del prepro-vWF de longitud completa (Eikenboom et al (1995) Haemophilia 1, 77-90).

Desafortunadamente, vWF es una molécula con modificaciones post-traduccionales complejas. También, la multimerización de los dímeros de vWF a multímeros grandes y ultragrandes en el aparato de Golgi es un desafío para la expresión en células de mamífero. Por ejemplo, el vWF de alto peso molecular expresado en cultivo celular de, por ejemplo, células endoteliales humanas (primarias) depende del almacenamiento específico de moléculas del vWF ultragrandes en cuerpos Weibel-Palade. Tales cultivos celulares no son adecuados para la producción de proteínas terapéuticas. Se

han reportado otros métodos de cultivo celular, y se sabe que las condiciones de cultivo celular pueden afectar la producción del vWF en una variedad de formas. Por ejemplo, altas concentraciones de amonio (NH_4^+) se han mostrado por
5 alterar las modificaciones post-traduccionales. Mayadas et al. (J. Biol. Chem., 264(23):13497-13503, 1989) demostró que niveles de 25 mM de amonio resultan en multimerización del vWF reducida en células endoteliales, las cuales también afectan negativamente la actividad específica de Ristocetina
10 del vWF recombinante. La reducción de multimerización está en general asociada con la reducción de la actividad, particularmente actividad específica de Ristocetina, del vWF recombinante.

Permanece aún difícil predecir cuales parámetros
15 pueden positivamente o negativamente afectar la producción de una proteína particular, especialmente complejos de glicoproteínas como el Factor VIII y vWF. Por ejemplo, ciertos compuestos de un medio de cultivo celular han sido mostrados por afectar la producción del Factor VIII. Como se
20 describe en la Patente Estadounidense No. 5,804,420, la adición de poliol, cobre y otros materiales indicadores puede afectar positivamente el rendimiento de producción del Factor VIII. Como también se describe en el documento WO 2009/086309, los procesos de cultivo celular que usan cobre
25 han sido mostrados por mejorar la producción del Factor VIII.

La expresión del vWF en células CHO recombinantes también se ha reportado por Mignot *et al.* (1989). Sin embargo, ninguno de estos ejemplos proporciona información con respecto a la actividad específica del vWF o su distribución multimérica.

5 Las proteínas ADAMTS (una desintegrina y metaloproteinasa con motivos de tromboespondina tipo I), son una familia de metaloproteinasas que contienen un número de dominios conservados, que incluyen un dominio catalítico dependiente de zinc, un dominio rico en cisteína, un dominio
10 similar a desintegrina, y al menos uno, y en muchos casos múltiples repeticiones de tromboespondina tipo I (para revisión, véase Nicholson *et al.*, BMC Evol Biol. 2005 Feb 4;5(1):11). Estas proteínas, las cuales están evolucionariamente relacionadas con las familias ADAM y MMP
15 de metaloproteinasas (Jones GC, Curr Pharm Biotechnol. 2006 Feb;7(1):25-31), son enzimas secretadas que se han ligado a un número de enfermedades y condiciones que incluyen trombocitopénica púrpura trombótica (TTP) (Moake JL, Semin Hematol. 2004 Jan;41(1):4-14), trastornos del tejido
20 conectivo, cánceres, inflamación (Nicholson *et al.*), y malaria severa por malaria por *plasmodium falciparum* (Larkin *et al.*, PLoS Pathog. 2009 Mar;5(3):e1000349). Debido a estas asociaciones, las enzimas ADAMTS han sido reconocidas como objetivos terapéuticos potenciales para un número de
25 patologías (Jones GC, Curr Pharm Biotechnol. 2006

Feb;7(1):25-31). Por consiguiente, son necesarios métodos para producir grandes rendimientos de proteínas ADAMTS que tienen altas actividades específicas, las cuales están libres de contaminantes tales como virus, BSE, y patógenos como bacterias de *Mycoplasma*.

Un miembro de la familia ADAMTS, ADAMTS13, desdobla el factor von Willebrand (vWF) entre los residuos Tyr 1605 y Met 1606, una función responsable para la degradación de grandes multímeros del vWF *in vivo*. La pérdida de la actividad de ADAMTS13 se ha ligado a un número de condiciones, tales como TTP (Moake JL, Semin Hematol. 2004 Jan;41(1):4-14), inflamación crónica y aguda (Chauhan *et al.*, J Exp Med. 2008 Sep 1;205(9):2065-74), y más recientemente, malaria severa por *plasmodium falciparum* (Larkin *et al.*, PLoS Pathog. 2009 Mar;5(3):e1000349).

La proteasa de ADAMTS13 es una proteína glicosilada de 190 kDa producida predominantemente por el hígado (Levy *et al.*, Nature. 2001; 413:488-494; Fujikawa *et al.*, Blood. 2001; 98:1662-1666; Zheng *et al.*, J Biol Chem. 2001; 276:41059-41063; Soejima *et al.*, J Biochem (Tokyo). 2001; 130:475-480; and Gerritsen *et al.*, Blood. 2001; 98:1654-1661). Al igual que los multímeros rVWF de orden superior, la expresión recombinante de grandes ADAMTS13 en cultivo de células de mamífero presenta muchos desafíos. Por lo tanto, existe una necesidad para proporcionar condiciones de cultivo celular,

21

particularmente condiciones de cultivo de manufacturación a gran escala, que proporcionan rendimiento de proteína total consistente y/o actividad total y específica consistente de las proteínas producidas entre diferentes cultivos celulares.

5 La consistencia entre cultivos en procesos de manufacturación a gran escala es de importancia en la manufactura de proteínas terapéuticas. Existe también una necesidad para condiciones de cultivo celular para producción a gran escala del rVWF con una actividad de Ristocetina específica y

10 distribución multimérica comparable o superior que el VWF como se presenta en plasma humano normal. De manera similar, como las proteínas ADAMTS han sido implicadas en un número de enfermedades y condiciones, existe una necesidad en la técnica para métodos de producción a gran escala de proteínas

15 ADAMTS recombinantes que tienen altas actividades específicas, las cuales son adecuadas para formulación y administración farmacéutica. La presente invención satisface estas y otras necesidades en la técnica para la producción del Factor von Willebrand recombinante y ADAMTS13

20 recombinante.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En ciertos aspectos, la presente invención se basa en el sorprendente hallazgo que la implementación de medio de

25 cultivo celular usado para expresar el Factor Von Willebrand

(rVWF) y ADAMTS13 recombinante (rA13) resulta en expresión de la proteína y actividad enzimática significativamente mejoradas.

En un primer aspecto, la presente invención
5 proporciona un método para producir una composición del Factor Von Willebrand recombinante (rVWF), el método comprende las etapas de: (a) proporcionar un medio de cultivo de células basales; (b) suplementar el medio de cultivo de células basales con cobre para proporcionar una concentración
10 de cobre final de al menos 2.4 µg/L; (c) proporcionar una o más células que comprenden un ácido nucleico que codifica una proteína del rVWF; (d) cultivar una o más células en el medio de cultivo de células suplementadas con cobre de manera que el rVWF se expresa y excreta de las células en un cultivo de
15 sobrenadante; y (e) recuperar al menos una porción del cultivo sobrenadante, en donde el sobrenadante recuperado tiene una actividad del cofactor de ristocetina específico del rVWF de al menos 30 mU/µg del rVWF.

En una modalidad de los métodos proporcionados
20 anteriormente, el método además comprende una etapa de suplementar el medio de cultivo de células basales con un hidrolizado previo a cultivar una o más células.

En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, el hidrolizado es un hidrolizado de planta. En
25 una modalidad específica, el hidrolizado es un hidrolizado de

soya.

En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, el medio de cultivo de células basales es un medio de cultivo libre de proteína animal.

5 En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, el medio de cultivo de células basales es un medio de cultivo libre de proteína.

En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, el medio de cultivo de células basales es un
10 medio de cultivo libre químicamente definido.

En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, la concentración final de cobre del medio de cultivo de células basales suplementado con cobre es al menos 4 µg/L de cobre.

15 En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, la concentración final de cobre del medio de cultivo de células basales suplementado con cobre es entre 2.4 µg/L y 20 µg/L de cobre.

En una modalidad de los métodos proporcionados
20 anteriormente, el medio de cultivo de células basales suplementado con cobre se proporciona como una sal de cobre, un quelato de cobre, o una combinación de los mismos.

En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, la sal de cobre se selecciona del grupo que
25 consiste de sulfato de cobre, acetato de cobre, carbonato de

cobre, cloruro de cobre, hidróxido de cobre, nitrato de cobre y óxido de cobre.

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

En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, cultivar una o más células comprende
cultivación por lotes de las células.

10 En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, cultivar una o más células comprende
cultivación continua de las células. En una modalidad específica, la cultivación continua de células se realiza en
modo quimiostático. En otra modalidad específica, la
15 cultivación continua de células se realiza en modo de perfusión.

En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, una o más células se cultivan en al menos 100
L del medio de cultivo suplementado a base de células
20 basales.

En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, la densidad celular se mantiene a menos de
 2.5×10^6 células por mL durante la etapa de cultivar una o más
células.

25 En una modalidad de los métodos proporcionados

25
anteriormente, la densidad celular se mantiene a menos de 2.0×10^6 células por mL durante la etapa de cultivar una o más células.

En una modalidad de los métodos proporcionados
5 anteriormente, la densidad celular se mantiene a menos de 1.5×10^6 células por mL durante la etapa de cultivar una o más células.

En una modalidad de los métodos proporcionados
anteriormente, la etapa de recuperar al menos una porción del
10 cultivo sobrenadante comprende filtración o centrifugación para remover las células de la porción del sobrenadante del cultivo.

En una modalidad de los métodos proporcionados
anteriormente, el sobrenadante recuperado tiene una actividad
15 del factor de ristocetina específica del rVWF de al menos 40 mU/ μ g del rVWF. En una modalidad específica, el sobrenadante recuperado tiene una actividad del factor de ristocetina específica del rVWF de al menos 50 mU/ μ g del rVWF. En una modalidad más específica, el sobrenadante recuperado tiene
20 una actividad del factor de ristocetina específica del rVWF de al menos 60 mU/ μ g del rVWF. En una modalidad más específica, el sobrenadante recuperado tiene una actividad del factor de ristocetina específica del rVWF de al menos 70 mU/ μ g del rVWF. En una modalidad todavía más específica, el
25 sobrenadante recuperado tiene una actividad del factor de

ristocetina específica del rVWF de al menos 80 mU/ μ g del rVWF.

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

En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, el sobrenadante contiene multímero del VWF de alto peso molecular de 14 a 22 dímeros.

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

En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, el contenido de NH_4^+ del sobrenadante de cultivo celular se mantiene a una concentración por debajo de

4 mM.

En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, el rVWF es co-expresado con el Factor VIII recombinante (rFVIII). En una modalidad específica, el método
5 además comprende una etapa de purificación del rVWF lejos de al menos 50% del rFVIII presente en el sobrenadante recuperado. En una modalidad, la relación del rVWF a rFVIII después de la etapa de purificación es al menos 10:1.

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

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una composición del Factor Von Willebrand recombinante (rVWF) preparada por un método proporcionado en
15 la presente.

En una modalidad de las composiciones proporcionadas anteriormente, la composición además comprende el Factor VIII recombinante (rFVIII). En una modalidad específica, la relación del rVWF a rFVIII es al menos 10:1.

En una modalidad de las composiciones proporcionadas anteriormente, la composición es formulada para administración farmacéutica. En una modalidad específica, la composición es formulada para administración intravenosa.

25 En un tercer aspecto, la presente invención

proporciona un sobrenadante de cultivo celular que comprende el Factor de Von Willebrand recombinante (rVWF), en donde el sobrenadante es preparado por un método proporcionado en la presente.

5 En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un sobrenadante de cultivo celular que comprende el Factor de Von Willebrand recombinante (rVWF), en donde al menos 10% del rVWF en el sobrenadante está presente en un multímero del VWF de alto peso molecular de más de 10
10 dímeros. En una modalidad específica, al menos 15% del rVWF en el sobrenadante está presente en un multímero del VWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros. En otra modalidad específica, al menos 20% del rVWF en el sobrenadante está presente en un multímero del VWF de alto peso molecular de
15 más de 10 dímeros. En otra modalidad específica, al menos 25% del rVWF en el sobrenadante está presente en un multímero del VWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros. En otra modalidad específica, al menos 30% del rVWF en el sobrenadante está presente en un multímero del VWF de alto
20 peso molecular de más de 10 dímeros. En todavía otra modalidad específica de los sobrenadantes proporcionados anteriormente, el sobrenadante se prepara de conformidad con un método proporcionado en la presente.

 En un quinto aspecto, la presente invención
25 proporciona un sobrenadante de cultivo celular que comprende

el Factor de Von Willebrand recombinante (rVWF), en donde el sobrenadante contiene al menos 0.4 IU de actividad del cofactor de ristocetina por mL. En una modalidad específica, el sobrenadante contiene al menos 0.5 IU de actividad del cofactor de ristocetina por mL. En otra modalidad específica, el sobrenadante contiene al menos 0.6 IU de actividad del cofactor de ristocetina por mL. En otra modalidad específica, el sobrenadante contiene al menos 0.7 IU de actividad del cofactor de ristocetina por mL. En todavía otra modalidad específica de los sobrenadantes proporcionados anteriormente, el sobrenadante se prepara de conformidad con un método proporcionado en la presente.

En un sexto aspecto, la presente invención proporciona un método para producir una composición de ADAMTS13 recombinante (rA13), el método comprende las etapas de: (a) proporcionar un medio de cultivo de células basales; (b) suplementar el medio de cultivo de células basales con cobre para proporcionar una concentración de cobre final de al menos 1.0 µg/L; (c) proporcionar una o más células que comprenden un ácido nucleico que codifica una proteína rA13; (d) cultivar una o más células en el medio de cultivo celular suplementado con cobre de manera que la rA13 se expresa y excreta de las células en un cultivo de sobrenadante; y (e) recuperar al menos una porción del cultivo sobrenadante, en donde al menos 1500 Unidades de actividad del FRETS-VWF73 por

litro de medio de cultivo de células basales suplementado por día están presentes en el sobrenadante de cultivo recuperado.

En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, el medio de cultivo de células basales es un
5 medio de cultivo libre de proteína animal.

En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, el medio de cultivo de células basales es un medio de cultivo libre de proteína.

En una modalidad de los métodos proporcionados
10 anteriormente, el medio de cultivo de células basales es un medio de cultivo libre químicamente definido.

En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, la concentración final de cobre del medio de cultivo suplementado a base de células basales es al menos 1
15 $\mu\text{g/L}$ de cobre.

En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, la concentración final de cobre del medio de cultivo suplementado a base de células basales es al menos 2 $\mu\text{g/L}$ de cobre.

En una modalidad de los métodos proporcionados
20 anteriormente, la concentración final de cobre del medio de cultivo suplementado a base de células basales es al menos 4 $\mu\text{g/L}$ de cobre.

En una modalidad de los métodos proporcionados
25 anteriormente, la concentración final de cobre del medio de

cultivo suplementado a base de células basales es entre 1 $\mu\text{g/L}$ y 6 $\mu\text{g/L}$ de cobre.

En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, la concentración final de cobre del medio de cultivo suplementado a base de células basales es entre 2 $\mu\text{g/L}$ y 4 $\mu\text{g/L}$ de cobre.

En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, suplementar con cobre el medio de cultivo de células basales se proporciona como una sal de cobre, un quelato de cobre, o una combinación de los mismos. En una modalidad específica, la sal de cobre se selecciona del grupo que consiste de sulfato de cobre, acetato de cobre, carbonato de cobre, cloruro de cobre, hidróxido de cobre, nitrato de cobre y óxido de cobre.

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

En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, cultivar una o más células comprende cultivación por lotes de las células.

En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, cultivar una o más células comprende cultivación continua de las células. En una modalidad específica, la cultivación continua de células se realiza en

modo quimiostático. En otra modalidad específica, la
cultivación continua de células se realiza en modo de
perfusión.

En una modalidad de los métodos proporcionados
5 anteriormente, una o más células se cultivan en al menos 100
L del medio de cultivo suplementado a base de células
basales.

En una modalidad de los métodos proporcionados
anteriormente, la densidad celular se mantiene a menos de
10 4.0×10^6 células por mL durante la etapa de cultivar una o más
células.

En una modalidad de los métodos proporcionados
anteriormente, la densidad celular se mantiene a menos de
15 3.5×10^6 células por mL durante la etapa de cultivar una o más
células.

En una modalidad de los métodos proporcionados
anteriormente, la densidad celular se mantiene a menos de
 3.0×10^6 células por mL durante la etapa de cultivar una o más
células.

20 En una modalidad de los métodos proporcionados
anteriormente, la densidad celular se mantiene a menos de
 2.5×10^6 células por mL durante la etapa de cultivar una o más
células.

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

2.0x10⁶ células por mL durante la etapa de cultivar una o más células.

En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, la densidad celular se mantiene a. menos de
5 1.5x10⁶ células por mL durante la etapa de cultivar una o más células.

En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, la etapa de recuperar al menos una porción del cultivo sobrenadante comprende filtración o centrifugación
10 para remover las células de la porción del sobrenadante del cultivo.

En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, al menos 2000 Unidades de actividad del FRETs-VWF73 por litro de medio de cultivo de células basales
15 suplementado por día están presentes en el sobrenadante de cultivo recuperado.

En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, al menos 2500 Unidades de actividad del FRETs-VWF73 por litro de medio de cultivo de células basales
20 suplementado por día están presentes en el sobrenadante de cultivo recuperado.

En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, el sobrenadante recuperado tiene una actividad del FRETs-VWF73 específica de la rA13 de al menos 800 mU/μg.

25 En una modalidad preferida de los métodos

proporcionados anteriormente, el sobrenadante recuperado tiene una actividad del FRET-S-VWF73 específica de la rA13 de al menos 1200 mU/ μ g.

5 En una modalidad más preferida de los métodos proporcionados anteriormente, el sobrenadante recuperado tiene una actividad del FRET-S-VWF73 específica de la rA13 de al menos 1600 mU/ μ g.

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

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

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

20 En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, el método además comprende una etapa de enriquecimiento de la rA13.

25 En un séptimo aspecto, la presente invención proporciona un sobrenadante de cultivo celular que comprende ADAMTS13 recombinantes (rA13), en donde el sobrenadante es

preparado por un método proporcionado en la presente.

En un octavo aspecto, la presente invención proporciona un sobrenadante de cultivo celular que comprende el Factor de Von Willebrand recombinante (rVWF), en donde el
5 sobrenadante contiene al menos 5 U de actividad del FRETs-VWF73 por mL. En una modalidad específica, el sobrenadante contiene al menos 6 U de actividad del FRETs-VWF73 por mL. En otra modalidad específica, el sobrenadante contiene al menos 7 U de actividad del FRETs-VWF73 por mL. En otra modalidad
10 específica, el sobrenadante contiene al menos 8 U de actividad del FRETs-VWF73 por mL. En otra modalidad específica, el sobrenadante contiene al menos 9 U de actividad del FRETs-VWF73 por mL. En otra modalidad específica, el sobrenadante contiene al menos 10 U de
15 actividad del FRETs-VWF73 por mL. En todavía otra modalidad específica de los sobrenadantes proporcionados anteriormente, el sobrenadante se prepara de conformidad con un método proporcionado en la presente.

En un noveno aspecto, la presente invención
20 proporciona un sobrenadante de cultivo celular que comprende el Factor de Von Willebrand recombinante (rVWF), en donde el sobrenadante contiene al menos 2 µg de rA13 por mL. En una modalidad específica, el sobrenadante contiene al menos 3 µg de rA13 por mL. En otra modalidad específica, el sobrenadante
25 contiene al menos 4 µg de rA13 por mL. En otra modalidad

específica, el sobrenadante contiene al menos 5 µg de rA13 por mL. En otra modalidad específica, el sobrenadante contiene al menos 6 µg de rA13 por mL. En todavía otra modalidad específica de los sobrenadantes proporcionados anteriormente, el sobrenadante se prepara de conformidad con un método proporcionado en la presente.

En un décimo aspecto, la presente invención proporciona una composición de ADAMTS13 recombinante (rA13) preparada por un método de conformidad con cualquiera de los métodos descritos anteriormente.

En una modalidad de las composiciones proporcionadas anteriormente, la composición es formulada para administración farmacéutica. En una modalidad específica, la composición es formulada para administración intravenosa.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. (1A) Electroforesis en gel de agarosa de baja resolución (1 %) de rVWF expresado en cultivo de células de mamífero en la presencia de concentración de cobre baja (1.0 µg/L) y alta (4.3 µg/L), como se describe en el Ejemplo 2. Se observa que el cultivo de Día 3 es equivalente al lote del día 1 de la Tabla 7 y Tabla 8. (1B) Las cantidades relativas de multímeros del VWF que tienen 1 a 10 dímeros (banda número 1) y más de 10 dímeros (banda número 2), como

se indica por las bandas definidas en la Figura 1A, se cuantificó por análisis densitométrico.

Figura 2. (2A) Trazo de intervalo de la actividad específica del rVWF promedio presente en sobrenadantes de cultivo celular del rVWF que crecen a densidades celulares alta y baja en la presencia de niveles altos o bajos de cobre. (2B) Trazo de intervalo de la concentración promedio de NH_4^+ encontrada en sobrenadantes de cultivo de células del rVWF que crecen a altas y bajas densidades en la presencia de niveles altos o bajos de cobre.

Figura 3. Sobrenadantes de cultivos celulares que expresan ADAMTS13 recombinantes en la presencia de niveles incrementados de cobre fueron investigados por análisis de SDS-PAGE. La rA13 se visualizó después de SDS-PAGE por (3A) teñido de plata y (3B) manchado western anti-A13.

Figura 4. Trazo de datos de productividad volumétrica (P Frets) contra la concentración de cobre que muestra una extrapolación (línea sólida) del efecto de concentración de cobre óptima en productividad de rA13.

Figure 5A-K. Gráfica de barras de cultivos celulares en suspensión continua (quimioestado) que expresan rA13 sobre un tiempo de cultivo de 8 semanas comparando los efectos de niveles basales de cobre (0.66 $\mu\text{g/L}$) con aquellos de cultivos suplementados a una concentración final de 2 $\mu\text{g/L}$ de cobre. Cada barra representa los datos medios de una

semana de cultivo quimiostático. Las leyendas se refieren a la semana particular representada en los datos.

Figura 6. (6A) Electroforesis de gel de agarosa de baja resolución (1 %) de rVWF expresado en cultivo de células de mamífero en la presencia de baja (1.0 µg/L) y alta (4.3 µg/L) concentración de cobre bajo alta y baja densidades celulares como se describe en el Ejemplo 3. Se observa que el cultivo del Día 8 y 17 ("CST8" y "CST17") es equivalente al Día 8 y Día 17 de la Tabla 10 a la Tabla 13. (6B) Las cantidades relativas de multímeros del VWF que tienen 1 a 10 dímeros y más de 10 dímeros, como se indica por las bandas definidas en la Figura 6A, fue cuantificada por análisis densitométricos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

I. Introducción

vWF recombinante (rVWF) y ADAMTS13 recombinante (rA13) pueden ser producidos por expresión en cultivos de células de mamífero a gran escala. Sin embargo, la actividad de estas proteínas cuando se producen usando condiciones estándares de cultivo celular a menudo varían a través de los cultivos celulares, aún cuando las formulaciones generales de los medios no se cambian, y las actividades específicas de las proteínas recombinantes son a menudo no iguales a aquellas del vWF y rA13 derivadas de plasma de sangre.

Además, el rVWF expresado en cultivos de células de mamífero tiende a producir composiciones de proteína con bajos porcentajes (debajo de 10%) de multímeros de orden superior (multímeros de orden superior incluyen moléculas que
5 contienen más de 10 dímeros del VWF). Estas desventajas en métodos de producción estándar del rVWF y rA13 son particularmente problemáticas cuando se desarrollan cultivos para producción a gran escala (es decir, desde 10 hasta más de 20,000 litros de cultivos).

10 Una fuente potencial de la variabilidad a menudo se observa en diferentes lotes de cultivo en la presencia de contaminantes en componentes del medio de cultivo celular. Estos contaminantes pueden estar presentes en diferentes cantidades en diferentes lotes, conduciendo a resultados
15 variables en la producción de rVWF y rA13. Después de investigar los diferentes contaminantes encontrados en varios aditivos del medio de cultivo celular, los presentes inventores encontraron que la presencia de hidrolizados conduce a variación en concentraciones de cobre en el medio
20 celular. Investigación adicional proporciona el resultado sorprendente de que concentraciones de cobre de suplementación en medio celular para producir una concentración total de cobre de al menos aproximadamente 1 µg/L hasta aproximadamente 20 µg/L incrementa
25 consistentemente la actividad total y específica de rVWF y

rA13 y/o podría también conducir al rendimiento de proteína total incrementada. De este modo, la presente invención proporciona métodos y composiciones para producción de alto rendimiento de proteínas rVWF y rA13 con alta actividad
5 específica.

En un aspecto, la presente invención proporciona métodos y composiciones de cultivo celular para producir grandes cantidades de rVWF y rA13 con alta actividad que es comparable a o superior que aquella vista con el vWF derivado
10 de plasma (pdVWF) o ADAMTS13 derivado de plasma (pdA13). En aspectos adicionales, las proteínas del rVWF y rA13 producidas de conformidad con la presente invención muestran actividad consistentemente superior que las proteínas producidas usando métodos de cultivo celular estándar en
15 medio que no ha sido suplementado con cobre u otros suplementos descritos en detalle adicional en la presente. Ventajosamente, en ciertas modalidades de los métodos y composiciones proporcionados en la presente, las proteínas del rVWF y rA13 producidas de conformidad con la presente
20 invención muestran actividad específica consistentemente superior (es decir, U/mg de proteína) que las proteínas producidas usando métodos de cultivo celular estándar en medio que no ha sido suplementado con cobre u otros suplementos descritos en detalle adicional en la presente.
25 Del mismo modo, los métodos proporcionados en la presente

41

para la producción de rVWF y rA13 proporcionan rendimientos superiores de actividad por volumen de cultivo (es decir, U/L/D), comparado con métodos de cultivo celular estándar utilizando medio que no ha sido suplementado con cobre u
5 otros suplementos descritos en detalle adicional en la presente.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona métodos de cultivo celular en los cuales un medio de cultivo de células basales es suplementado con cobre para
10 resultar en una concentración total de al menos aproximadamente 1 µg/L. En otras modalidades, el medio de cultivo de células basales es suplementado con cobre para resultar en una concentración total de al menos
15 aproximadamente 2 µg/L. En todavía otras modalidades, el medio de cultivo de células basales es suplementado con cobre para resultar en una concentración total de al menos aproximadamente 1 µg/L hasta aproximadamente 20 µg/L. En algunas modalidades, la concentración total de cobre es desde
aproximadamente 1.5 - 4.5 µg/L. En ciertas modalidades, el
20 medio de cultivo celular es suplementado para resultar en aproximadamente 1, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2.0, 2.2, 2.4, 2.6, 2.8, 3, 3.2, 3.4, 3.6, 3.8, 4, 4.2, 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 µg/L de cobre, o más. El medio de
25 cultivo de células basales en general tiene una concentración

indicadora de cobre por debajo de 1 µg/L.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona métodos de cultivo celular en los cuales un medio de cultivo de células basales es suplementado con desde
5 aproximadamente 1.0 hasta aproximadamente 20 µg/L de cobre para producción del rVWF. En modalidades adicionales, el medio de cultivo de células basales es suplementado con desde aproximadamente 1.5-15, 2.0-10, 2.5-8, 3.0-6, 4.0 -5.0 µg/L de cobre para producción del rVWF. En aún modalidades
10 adicionales, el medio de cultivo de células basales puede, además del cobre suplementado, también incluir uno o más hidrolizados.

En otras modalidades, la presente invención proporciona métodos de cultivo celular en los cuales un medio
15 de cultivo de células basales es suplementado con desde aproximadamente 1.5 hasta aproximadamente 4 µg/L de cobre para producción de rA13. En modalidades adicionales, el medio de cultivo de células basales es suplementado con desde aproximadamente 1.6 - 3.8, 1.7 - 3.6, 1.8 - 3.4, 1.9 - 3.2,
20 2.0 - 3.0, 2.1 - 2.8, 2.2 - 2.6, 2.3 - 2.4 µg/L de cobre para producción de rA13. En aún modalidades adicionales, el medio de cultivo de células basales puede, además del cobre suplementado, también incluir uno o más hidrolizados. En
todavía modalidades adicionales, el medio de cultivo de
25 células basales incluye, además del cobre y/o uno o más

hidrolizados, aproximadamente 1.0 hasta aproximadamente 30 μ M zinc. En aún modalidades adicionales, el medio de cultivo de células basales además incluye, además del cobre y/o uno o más hidrolizados y/o zinc, entre aproximadamente 0.5 hasta
5 aproximadamente 5.0 mM de calcio.

En un aspecto aún adicional y de conformidad con cualquiera de los anteriores, la presente invención proporciona métodos de cultivo celular en los cuales los niveles de amonio de la solución de cultivo celular son bajos
10 (por debajo de 10 mM). En ciertas modalidades, los métodos de cultivo celular de la presente invención utilizan medio de cultivo celular que tiene más de 1, 2, 3, 4, ó 5 μ g/L de cobre en combinación con bajos niveles de amonio.

Una de las ventajas de los métodos y composiciones
15 de la presente invención es que son susceptibles para producción de cultivo celular a gran escala. Estos cultivos de células a gran escala son al menos de 10 L, 50 L, 100 L, 150 L, 200 L, 250 L, 500 L, 750 L, 1,000 L, 1,500 L, 2,000 L, 5,000 L, 10,000 L, o 20,000 litros de cultivos.

20 En ciertos aspectos, los métodos de la invención no necesariamente resultan en una cantidad superior de proteína total recombinante, sino a la proteína recombinante (ya sea rVWF o rA13) que se produce mostrando actividad total y específica superior que la que se observa en proteínas
25 producidas usando cultivos de células estándares,

particularmente comparado con proteínas producidas en cultivos celulares en los cuales el medio de cultivo celular aún no ha sido suplementado con cobre adicional. En aspectos adicionales, las proteínas del rVWF y rA13 producidas en

5 cultivo de células en medio suplementado con cobre muestran actividad consistentemente incrementada por litro de cultivo celular comparada con células cultivadas en medio de cultivo de células basales que no se ha suplementado con cobre. En

10 todavía aspectos adicionales, el medio suplementado de cobre de la presente invención resulta en rendimiento incrementado de la proteína, número incrementado de células en el cultivo, y/o actividad total incrementada por litro de cultivo comparada con el medio que no ha sido suplementado con cobre.

Todavía ventajas adicionales de métodos y

15 composiciones de la invención es que resultan en una población de proteínas que contienen un alto porcentaje (más de 10%) del rVWF altamente multimerizado.

Aunque mucha de la discusión aquí con respecto a proteínas ADAMTS está en términos de ADAMTS13 (A13), se

20 apreciará que debido a que todas las proteínas ADAMTS portan una arquitectura de dominio de núcleo común y relaciones de estructura-función común, los métodos y composiciones descritos en la presente son aplicables para producción de cualquiera de las proteínas ADAMTS, no solamente rA13.

II. Definiciones

Como se usa en la presente, "vWF recombinante" incluye el vWF obtenido vía tecnología de ADN recombinante. En ciertas modalidades, las proteínas del vWF de la invención pueden comprender un constructo, por ejemplo, preparado como en el documento WO 1986/06096 publicado en Oct. 23 1986 y Solicitud de Patente Estadounidense Ser. No. 07/559,509, presentada en Jul. 23 1990, a nombre de Ginsburg *et al.*, el cual se incorpora en la presente por referencia con respecto a los métodos para producir vWF recombinante. El vWF en la presente invención puede incluir todas las formas potenciales, que incluyen las formas monoméricas y multiméricas. Se debe entender también que la presente invención abarca diferentes formas del vWF para ser usado en combinación. Por ejemplo, el vWF de la presente invención puede incluir diferentes multímeros, diferentes derivados y tanto derivados biológicamente activos como derivados no biológicamente activos.

El término "recombinante" cuando se usa con referencia, por ejemplo, a una célula, o ácido nucleico, proteína, o vector, indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector, ha sido modificada por la introducción de una proteína o ácido nucleico heterólogo o la alteración de una proteína o ácido nucleico nativo, o que la célula se deriva de una célula así modificada. De este modo, por

ejemplo, genes que expresan células recombinantes que no se encuentran dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresan genes nativos que son de otro modo anormalmente expresados, sobre expresados o no expresados en todos.

En el contexto de la presente invención, el vWF recombinante abarca cualquier miembro de la familia del vWF de, por ejemplo, un mamífero tal como un primate, humano, mono, conejo, cerdo, roedor, ratón, rata, hámster, jerbo, canino, felino y derivados de los mismos biológicamente activos. En una modalidad preferida, el VWF recombinante es VWF humano. Proteínas del vWF variantes y mutantes que tienen actividad también están abarcadas, como son fragmentos funcionales y proteínas de fusión de las proteínas del vWF. Además, el vWF de la invención puede comprender además etiquetas que facilitan la purificación, detección o ambos. El vWF descrito en la presente puede además ser modificado con una porción terapéutica o una porción adecuada de imagen *in vitro* o *in vivo*.

Los términos "vWF altamente multimérico," "vWF de alto peso molecular," y "VWF HMW" pueden ser usados intercambiablemente y se refieren a multímeros del vWF covalentemente unidos que contienen más de 10 dímeros del VWF. En ciertas modalidades, VWF HMW contiene al menos 11 dímeros del VWF, o al menos 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19,

20, 21, 22, o más dímeros del VWF.

Como se usa en la presente, una "proteína ADAMTS" se refiere a un polipéptido de la disintegrina y metaloproteinasa con porciones de tromboespondina tipo de la familia de metaloproteinasas. 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), ADAMTS12 (NM_030955), ADAMTS13 (NM_139025; NM_139026; NM_139027; NM_139028), ADAMTS14 (NM_139155; NM_080722), ADAMTS15 (NM_139055), ADAMTS16 (NM_139056), ADAMTS17 (NM_139057), ADAMTS18 (NM_199355; NM_139054), ADAMTS19 (NM_133638), y ADAMTS20 (NM_025003, NM_175851). Las proteínas ADAMTS incluyen tanto proteínas de longitud completa como polipéptidos parciales que exhiben al menos actividad biológica parcial, por ejemplo, al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o más de la actividad demostrada por la proteína de longitud completa, en particular la actividad de proteasa demostrada por la proteína de longitud completa. En ciertos casos, una proteína ADAMTS será post-traduccionalmente modificada ya sea *in vivo* o *in vitro*, por ejemplo, por medios enzimáticos o químicos. Se entiende que las proteínas ADAMTS de la presente invención incluyen

isoformas alternativamente empalmadas, proteínas conservativamente modificadas, proteínas sustancialmente idénticas, homólogos, y similares.

En el contexto de la presente invención, una
5 proteína ADAMTS abarca cualquier miembro de la familia ADAMTS de, por ejemplo, un mamífero tal como un primate, humano, mono, conejo, cerdo, roedor, ratón, rata, hámster, jerbo, canino, felino, y derivados de los mismos biológicamente activos. Proteínas ADAMTS variantes y mutantes que tienen
10 actividad también están abarcadas, como son fragmentos funcionales y proteínas de fusión de las proteínas ADAMTS. Además, las proteínas ADAMTS de la invención además pueden comprender etiquetas que facilitan la purificación, detección, o ambas. Las proteínas ADAMTS descritas en la
15 presente pueden ser además modificadas con una porción terapéutica o una porción adecuada de imagen *in vitro* o *in vivo*.

Como se usa en la presente, una "proteína ADAMTS13" se refiere a cualquier proteína o polipéptido con actividad
20 de ADAMTS13, particularmente la capacidad para desdoblar el enlace peptídico entre residuos Tyr-842 y Met-843 del VWF. En una modalidad ejemplar, una proteína ADAMTS13 se refiere a un polipéptidos que comprende una secuencia de aminoácido que es altamente similar a aquella de NP_620594 (ADAMTS13 isoforma
25 1, preproteína) o aminoácidos 75 a 1427 de NP_620594

(ADAMTS13 isoforma 1, polipéptido maduro). En otra modalidad, una proteína ADAMTS13 se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácido que es altamente similar a aquella de NP_620596 (ADAMTS13 isoforma 2, preproteína) o aminoácidos 75 a 1371 de NP_620594 (ADAMTS13 isoforma 2, polipéptido maduro). En todavía otra modalidad, las proteínas ADAMTS13 incluyen polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácido altamente similar a aquella de NP_620595 (ADAMTS13 isoforma 3, preproteína) o aminoácidos 75 a 1340 de NP_620595 (ADAMTS13 isoforma 1, polipéptido maduro). Como se usa en la presente, una proteína ADAMTS13 incluye variantes naturales con actividad de desdoblamiento del vWF y constructos artificiales con actividad de desdoblamiento del vWF. Como se usa en la presente invención, ADAMTS13 abarca cualquiera de las variantes naturales, secuencias alternativas, isoformas o proteínas mutantes que retienen alguna actividad basal. 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 (TTP). Las proteínas ADAMTS13

5 también incluyen polipéptidos que contienen modificaciones post-traduccionales. Por ejemplo, ADAMTS13 se ha mostrado por ser modificada por 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 pueden también ser modificados en esta forma.

ADAMTS13 recombinantes proteolíticamente activos pueden ser preparados por expresión en cultivos de células de mamífero, como se describe en Plaimauer *et al.*, (2002, Blood. 10 15;100(10):3626-32) y el documento US 2005/0266528, las descripciones de los cuales están en la presente incorporadas por referencia en sus totalidades para todos los propósitos, Los métodos para la expresión de ADAMTS13 recombinantes en cultivos celulares se describen en Plaimauer B, Scheifflinger 15 F. (Semin Hematol. 2004 Jan;41(1):24-33 y documento US 2011/0086413, las descripciones de los cuales están incorporados en la presente por referencia en sus totalidades para todos los propósitos.

Como se usa en la presente, el término "derivado 20 biológicamente activo", cuando se usa en el contexto de una proteína ADAMTS, también abarca polipéptidos obtenidos vía tecnología de ADN recombinante. Este puede incluir cualquier método conocido en la técnica para (i) la producción de ADN recombinante por ingeniería genética, *por ejemplo*, vía 25 transcripción inversa de RNA y/o amplificación de DNA, (ii)

introducir ADN recombinante en células procarióticas o eucarióticas por transfección, es decir, vía electroporación o microinyección, (iii) cultivar tales células transformadas, *por ejemplo*, en una manera continua o por lotes, (iv) 5 expresar una proteína ADAMTS, *por ejemplo*, constitutivamente o después de la inducción, y (v) aislar tal proteína ADAMTS, *por ejemplo*, del medio de cultivo o cosechando las células transformadas, con el fin de (vi) obtener proteína ADAMTS recombinante sustancialmente purificada, *por ejemplo*, vía 10 cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión de tamaño, cromatografía de afinidad, cromatografía de interacción hidrofóbica, y similares. El término "derivado biológicamente activo" incluye también moléculas quiméricas tales como *por ejemplo* una proteína ADAMTS, o fragmento 15 funcional de la misma, en combinación con un segundo polipéptido, *por ejemplo*, un dominio Fc de inmunoglobulina o un dominio de albúmina, con el fin de mejorar las propiedades biológicas/farmacológicas tales como *por ejemplo*, vida media de la proteína ADAMTS en el sistema de circulación de un 20 mamífero, particularmente un humano.

Los términos "aislado", "purificado", o "biológicamente puro", se refieren a un material que es sustancialmente o esencialmente libre de componentes que normalmente lo acompañan como se encuentra en su estado 25 nativo. Pureza y homogeneidad son típicamente determinados

usando técnicas de química analítica tales como electroforesis de gel de poliacrilamida o cromatografía líquida de alta resolución. En una modalidad, el rVWF es la especie predominante presente en una preparación, es
5 sustancialmente purificada. En otra modalidad, rA13 es la especie predominante presente en una preparación, es sustancialmente purificada. El término "purificado" en algunas modalidades denota que un ácido nucleico o proteína da origen a esencialmente una banda en un gel
10 electroforético. En otras modalidades, significa que el ácido nucleico o proteína es al menos 50% puro, más preferiblemente al menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más puro. "Purifica" o "purificación" en otras modalidades significa remover al menos un contaminante de la
15 composición a ser purificada. En este sentido, la purificación no requiere que los compuestos purificados sean homogéneos, *por ejemplo*, 100% puros.

La actividad biológica del vWF puede ser medida por ensayos *in vitro* conocidos. Por ejemplo, el ensayo del
20 Cofactor de Ristocetina se basa en la aglutinación de plaquetas fijadas con formalinas o frescas inducidas por el antibiótico de ristocetina en la presencia de vWF. El grado de aglutinación de plaquetas depende de la concentración del vWF y puede ser medido por el método turbidimétrico, por
25 ejemplo por el uso de un agregómetro (Weiss et al., J. Clin.

Invest. 52: 2708-2716, 1973; Macfarlane et al., Thromb. Diath. Haemorrh. 34: 306-308, 1975). Como se proporciona en la presente, la actividad del Cofactor de Ristocetina específica del vWF de la presente invención se describe en términos de mU/ug de vWF, como se mide usando ensayos *in vitro*.

Como se usa en la presente, "una unidad de actividad ADAMTS" se define como la cantidad de actividad en 1 mL de plasma humano normal combinado, con respecto al ensayo a ser usado. Por ejemplo, cuando la proteína ADAMTS es ADAMTS13, una unidad de actividad de ADAMTS13 FRETs-VWF73 es la cantidad de actividad necesaria para desdoblar la misma cantidad de sustrato de FRETs-VWF73 (Kokame et al., Br J Haematol. 2005 Apr; 129(1):93-100) como se desdobla por un mL de plasma humano normal combinado. Convenientemente, la actividad de ADAMTS13 puede ser determinada por ensayos funcionales, tales como ensayos funcionales que emplean péptidos del factor von Willebrand modificados como sustrato para ADAMTS13 (Tripodi et al. J Thromb Haemost. 2008 Sep;6(9): 1534-41). Un método preferido para determinar la actividad de ADAMTS13 humana recombinante se describe en Gerritsen et al. (Assay of von Willebrand factor (vWF)-cleaving protease based on decreased collagen binding affinity of degraded vWF: a tool for the diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). Thromb Haemost

1999; 82: 1386- 1389). En una modalidad, para ser considerado como una proteína ADAMTS13 como se define anteriormente, un polipéptido o proteína debe tener al menos 1% de la actividad de desdoblamiento del vWF de ADAMTS13 nativa. En otras modalidades, una proteína ADAMTS13 contendrá al menos 10% de la actividad de ADAMTS13 nativa. En todavía otras modalidades, una proteína ADAMTS13 contendrá al menos 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 100% de la actividad de ADAMTS13 nativa. La cantidad de una proteína ADAMTS13 también puede ser determinada por medición de un antígeno de ADAMTS13, por ejemplo usando el método ELISA descrito en Rieger et al., (2006, *Thromb Haemost.* 2006 95(2):212- 20). Una convención bien establecida en la técnica es que 1 mL de plasma humano normal combinado contiene 1 µg de ADAMTS13. De este modo, la convención en la técnica es que 1 µg de ADAMTS13 derivado de plasma tiene una unidad de actividad ADAMTS13.

Los términos "solución de cultivo celular," "medios o medio de cultivo celular," y "sobrenadante de cultivo celular" se refieren a aspectos de procesos de cultivo celular en general bien conocidos en la técnica. En el contexto de la presente invención, una solución de cultivo celular puede incluir medios de cultivo celular y sobrenadante de cultivo celular. Los medios de cultivo celular son externamente agregados a la solución de cultivo

celular, opcionalmente junto con suplementos, para proporcionar nutrientes y otros componentes para cultivar células que expresan el rVWF o rA13. El sobrenadante de cultivo celular se refiere a una solución de cultivo celular que comprende los nutrientes y otros componentes del medio de cultivo celular así como también productos liberados, metabolizados y/o excretados de las células durante el cultivo, pero no las células mismas. De este modo en un contexto, un sobrenadante de cultivo celular puede referirse a la fase líquida de una solución de cultivo celular (es decir, la solución de cultivo celular excluyendo las células). Por ejemplo, la concentración de amonio de un sobrenadante de cultivo en general se refiere a la concentración de amonio presente en la solución de cultivo celular. En otros contextos, un sobrenadante de cultivo celular se refiere a una solución de cultivo celular de la cual las células se han removido (es decir, un sobrenadante de cultivo celular recuperado).

Como se usa en la presente, los términos "vitamina B3," "nicotinamida," "niacinamida," "niacina," y "ácido nicotínico" pueden ser usados intercambiablemente para referirse a cualquier miembro de la familia B3 de vitaminas. De conformidad, cualquier miembro de esta familia puede ser usado para suplementar el medio usado en los métodos de la presente invención.

Como se usa en la presente, el término "medio químicamente definido" o "medios químicamente definidos" se refiere a un medio de crecimiento sintético en el cual se conoce la identidad y concentración de todos los componentes.

5 Medios químicamente definidos no contienen extractos bacterianos, levadura, animal o vegetal, aunque pueden o no pueden incluir componentes derivados de plantas o animales (por ejemplo, proteínas, polipéptidos, etc.). Ejemplos no limitantes de medios químicamente definidos comercialmente

10 disponibles incluyen varios medios Eagle Modificados de Dulbecco (DME) (Sigma-Aldrich Co; SAFC Biosciences, Inc), Mezcla de Nutriente de Ham (Sigma-Aldrich Co; SAFC Biosciences, Inc), combinaciones de los mismos, y similares. Los métodos de preparación de medios de cultivo químicamente

15 definidos se conocen en la técnica, por ejemplo en las Patentes Estadounidenses Números 6,171,825 y 6,936,441, WO 2007/077217, y Publicaciones de Solicitud de Patente Estadounidense Números 2008/0009040 y 2007/0212770, las descripciones de las cuales se incorporan en la presente por

20 referencia en sus totalidades para todos los propósitos.

Como se usa en la presente, el término "medio de cultivo libre de oligopéptido" o "medios de cultivo libres de oligopéptido" se refiere a un medio libre de proteína que no comprende oligopéptidos, tales como, por ejemplo,

25 oligopéptidos derivados de un hidrolizado de proteína. En una

modalidad, el medio no comprende oligopéptidos que tienen veinte o más aminoácidos. En una modalidad de la presente invención, el medio no comprende oligopéptidos que tienen quince o más aminoácidos. En otra modalidad de la invención, 5 el medio no comprende oligopéptidos que tienen diez o más aminoácidos. En una modalidad el medio no comprende oligopéptidos que tienen siete o más aminoácidos. En otra modalidad el medio no comprende oligopéptidos que tienen cinco o más aminoácidos. En aún otra modalidad el medio no 10 comprende oligopéptidos que tienen tres o más aminoácidos. De conformidad con una modalidad adicional de la presente invención, el medio no comprende oligopéptidos que tienen dos o más aminoácidos. Los métodos para preparar medio de cultivo libre de oligopéptido se conocen en la técnica, por ejemplo 15 en las Patentes Estadounidenses Números 6,171,825 y 6,936,441, WO 2007/077217, y Publicación de Solicitud de Patentes Estadounidenses Números 2008/0009040 y 2007/0212770, las descripciones de las cuales se incorporan en la presente por referencia en sus totalidades para todos los propósitos.

20 Como se usa en la presente, el término "medio de cultivo libre de suero" o "medios de cultivo libres de suero" se refiere a un medio de cultivo que no es suplementado con un suero animal. Aunque algunas veces los medios libres de suero son medios químicamente definidos, los medios libres de 25 suero pueden ser suplementados con proteínas animales o

vegetales discretas o fracciones de proteína. Los métodos para preparar medios de cultivo libre de suero se conocen en la técnica, por ejemplo en las Patentes Estadounidenses Números 6,171,825 y 6,936,441, WO 2007/077217, y Publicación de Solicitud de Patentes Estadounidenses Números 2008/0009040 y 2007/0212770, las descripciones de las cuales se incorporan en la presente por referencia en sus totalidades para todos los propósitos.

Como se usa en la presente, el término "medio de cultivo libre de proteína animal" o "medios de cultivo libres de proteína animal" se refiere a un medio de cultivo que no es suplementado con un suero animal, proteína o fracción de proteína. Aunque a menudo medios de cultivo libre de proteína animal son medios químicamente definidos, medios de cultivo libre de proteína animal pueden contener hidrolizados de planta o levadura. Métodos para preparar medio de cultivo libre de proteína animal se conocen en la técnica, por ejemplo en las Patentes Estadounidenses Números 6,171,825 y 6,936,441, WO 2007/077217, y Publicación de Solicitud de Patentes Estadounidenses Números 2008/0009040 y 2007/0212770, las descripciones de las cuales se incorporan en la presente por referencia en sus totalidades para todos los propósitos.

Como se usa en la presente, el término "medio de cultivo de células basales" o "medios de cultivo de células basales" se refiere a un medio de cultivo químicamente

definido, un medio de cultivo libre de oligopéptido, u medio de cultivo libre de suero, o un medio de cultivo libre de proteína animal que no ha sido suplementado con un hidrolizado, *por ejemplo*, un hidrolizado de planta o levadura. Medios basales son bien conocidos en la técnica, *por ejemplo*, DMEM, F12 de Ham, DMEM/F12 de Ham, Medio 199, McCoy, o RPMI. El medio basal puede incluir un número de ingredientes, que incluyen aminoácidos, vitaminas, sales orgánicas e inorgánicas, y fuentes de carbohidratos. Cada ingrediente puede estar presente en una cantidad que soporta el cultivo de una célula, tales cantidades son en general conocidas por una persona experta en la técnica. El medio puede incluir sustancias auxiliares, tales como sustancias amortiguadoras, *por ejemplo*, bicarbonato de sodio, antioxidantes, estabilizadores para contrarrestar el estrés mecánico, o inhibidores de proteasa. Si es necesario, un tensoactivo no iónico tal como copolímeros y/o mezclas de polietilenglicoles y polipropilenglicoles pueden ser agregadas.

20

III. Medios de cultivo celular y Sobrenadante de cultivo celular

Un aspecto de la presente invención se refiere a medios de cultivo celular para producción del rVWF y/o rA13 que tienen actividad incrementada comparada con rVWF y rA13

25

producidos con medios de cultivo de células basales. En un aspecto, la presente invención se refiere a medios de cultivo celular para producción del rVWF y/o rA13 en el cual los medios de cultivo de células basales son suplementados con una o más sustancias adicionales. En modalidades específicas y como se discute en detalle adicional abajo, las condiciones de cultivo celular de la presente invención incluyen medios de cultivo de células basales suplementados para tener al menos 1.0 µg/L de cobre. En modalidades adicionales, medios de cultivo celular de uso y sobrenadantes derivados de los procesos en la presente invención también comprenden bajos niveles (debajo de 10 mM) de amonio. En una modalidad particular, las condiciones de cultivo celular usadas para expresar el rVWF y/o rA13 son controladas de manera que el sobrenadante de cultivo celular mantiene un bajo nivel de amonio, es decir, menos de 10 mM y preferiblemente menos de 5 mM.

Los medios de cultivo de la presente invención se pueden basar en un medio basal adecuado bien conocido en la técnica, por ejemplo, DMEM, F12 de Ham, DMEM/F12 de Ham, Medio 199, McCoy, o RPMI. El medio basal puede incluir un número de ingredientes, que incluyen aminoácidos, vitaminas, sales orgánicas e inorgánicas, y fuentes de carbohidratos. Cada ingrediente puede estar presente en una cantidad que soporta la cultivación de una célula, tales cantidades son en

general conocidas para una persona experta en la técnica. El medio puede incluir sustancias auxiliares, tales como sustancias amortiguadoras, por ejemplo, bicarbonato de sodio, antioxidantes, estabilizadores para contrarrestar el estrés mecánicos o inhibidores de proteasa. Si es necesario un tensoactivo no iónico tal como copolímeros y/o mezclas de polietilenglicoles y polipropilenglicoles pueden ser agregados.

En general, el medio basal contiene menos de 1 µg/L de cobre -- por ejemplo, DMEM/F12 de Ham tiene una concentración de cobre de aproximadamente 0.3 µg/L. Tales concentraciones de cobre no proporcionan suficientes iones de cobre para soportar la producción de proteínas del rVWF y rA13 de la presente invención, las cuales muestran alta actividad específica.

El cobre puede ser proporcionado a medios de cultivo celular de la presente invención a través de una variedad de formas, tales como a través de adición de un suplemento de medio. En algunas modalidades, el suplemento de medio puede contener hidrolizado, el cual puede ser proporcionado para incrementar la concentración de cobre en el medio. Los hidrolizados pueden incluir cualquier hidrolizado bien conocido en la técnica, tales como hidrolizados de plantas, hidrolizados de soya e hidrolizados de gluten de trigo. En ciertas modalidades, la adición del

hidrolizado puede contribuir a una concentración incrementada de cobre de aproximadamente 0.2 hasta aproximadamente 10 µg/L de Cu^{2+} . En algunas modalidades, la cantidad de cobre proporcionada por el hidrolizado puede depender de la cantidad de cobre en el hidrolizado así como también de la cantidad de hidrolizado agregado. El contenido de cobre de un hidrolizado puede ser determinado por análisis elemental, *por ejemplo*, espectroscopia de adsorción de átomo (GFAA: adsorción atómica de horno de grafito), o métodos de espectroscopia de masas (*por ejemplo*, ICP-MS).

En ciertas modalidades, se puede proporcionar cobre a los medios de cultivo solo o en adición al hidrolizado proporcionando un suplemento de medio que incluye una sal de cobre o quelato de cobre adecuado. Las sales de cobre adecuadas pueden incluir pero no se limitan a sulfato de cobre, acetato de cobre, carbonato de cobre, cloruro de cobre, hidróxido de cobre, nitrato de cobre y óxido de cobre. Queladores de cobre adecuados pueden incluir pero no se limitan a albúmina, ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), agentes quelantes de poliamina, etilendiamina, dietilentriamina, trietilentetramina, trietilendiamina, tetraetilenpentamina, aminoetiletanolamina, aminoetilpiperazina, pentaetilenhexamina, trietilentetramina-clorhidrato, tetraetilenpentamina-clorhidrato, pentaetilenhexamina-clorhidrato, tetraetilpentamina,

captopril, penicilamina, N,N'-bis(3-aminopropil)-1,3-propandiamina, N,N,Bis-(2-aminoetil)-1,3-propandiamina, 1,7-dioxa-4,10-diazaciclododecano, 1,4,8,11-tetraaza ciclotetradecan-5,7-diona, triclorhidrato de 1,4,7-triazaciclononana, 1-oxa-4,7,10-triazaciclododecane, 1,4,8,12-tetraaza ciclopentadecano, y 1,4,7,10-tetraaza ciclododecano.

En ciertas modalidades, medios de cultivo de células basales son suplementados con cobre para resultar en una concentración total de cobre de aproximadamente 1.0 hasta aproximadamente 20 µg/L. En una modalidad específica, los medios de células basales son suplementado con cobre a una concentración final de entre aproximadamente 1.0 hasta aproximadamente 10 µg/L. En modalidades adicionales, el medio de cultivo de células basales es suplementado para resultar en una concentración final de cobre de aproximadamente 1.0 - 5.0, 1.2 - 4.0, 1.3 - 3.0, 1.4 - 2.9, 1.5 - 2.8, 1.6 - 2.7, 1.7 - 2.6, 1.8 - 2.5, 1.9 - 2.4, 2.0 - 2.3, 2.1 - 2.2 µg/L de cobre. En modalidades adicionales, los medios de cultivo de células basales usados en los métodos de la presente invención son suplementados para resultar en aproximadamente 1.2 - 9.5, 1.4 - 9, 1.6 - 8.5, 1.8 - 8, 2.0 - 7.5, 2.2 - 7, 2.4 - 6.5, 2.6 - 6.0, 2.8 - 5.5, 3.0 - 5.0, 3.2 - 4.5, 3.4 - 4, y 2 - 4 µg/L de cobre. En todavía otras modalidades, los medios de cultivo de células basales usados en los métodos de

la presente invención son suplementados para resultar en aproximadamente 1-6, 2-5, 3-4 µg/L de cobre. En una modalidad, el medio de cultivo de células basales es suplementado con cobre para resultar en una concentración total de cobre de al menos 1 µg/L. En otra modalidad, el medio de cultivo de células basales es suplementado con cobre para resultar en una concentración total de cobre de al menos 2 µg/L. En todavía otra modalidad, el medio de cultivo de células basales es suplementado con cobre para resultar en una concentración total de cobre de al menos 4 µg/L. En ciertas modalidades, el medio de cultivo de células basales es suplementado con cobre para resultar en una concentración total de cobre de al menos 1 µg/L, o al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 µg/L de cobre, o más. En ciertas modalidades y como se discute en detalle adicional en la presente, cultivos para producir rA13 pueden contener desde aproximadamente 2 - 4 µg/L de cobre, mientras los cultivos para producción del rVWF pueden contener al menos 2 µg/L de cobre.

Las concentraciones indicadas anteriormente son las concentraciones respectivas de cobre puro, en forma cúprica (Cu^{2+}). Si un derivado de cobre, por ejemplo, una sal hidratada, o un compuesto que comprende cobre, por ejemplo, un quelador de cobre, se usan, la cantidad de derivado o quelador se agrega de manera que la concentración final del

cobre está en los rangos descritos anteriormente. Por ejemplo, 2 µg/L de CuSO₄·5H₂O son equivalentes a una concentración de cobre de aproximadamente 0.51 µg/L (sin sulfato y 5H₂O).

5 Ventajosamente, se ha encontrado que el uso del medio de cultivo celular en procesos de cultivo celular que resultan en bajas concentraciones de amonio (NH₄⁺) en la solución de cultivo celular (*es decir*, en el sobrenadante del cultivo) resultan en la expresión de VWF recombinante y/o

10 rA13 con actividades específicas superiores. Por consiguiente, en ciertas modalidades, la concentración de NH₄⁺ del sobrenadante no es superior de 10 mM. En una modalidad preferida, la concentración de NH₄⁺ del sobrenadante no es superior de 5 mM. En una modalidad preferida, la

15 concentración de NH₄⁺ del sobrenadante no es superior de 4 mM. En todavía otras modalidades, la concentración de NH₄⁺ del sobrenadante no es superior de 10 mM, 9 mM, 8 mM, 7 mM, 6 mM, 5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM, 1 mM, o menos.

 Por consiguiente, en ciertas modalidades, los

20 métodos y composiciones proporcionados en la presente dependen del uso de medios de cultivo de células basales suplementadas con cobre (*por ejemplo*, a una concentración final de al menos 2 µg/L) usadas en un proceso que resulta en una concentración de NH₄⁺ de no superior de 10 mM en el

25 sobrenadante. En todavía otras modalidades, el medio de

cultivo de células basales es suplementado para proporcionar una concentración final de cobre y amonio de conformidad con cualquiera de las variaciones 1 a 440, como se proporciona en la **Tabla 1**.

5

Tabla 1. Modalidades Ejemplares de concentraciones de cobre y amonio presentes en el medio de cultivo y sobrenadante útiles para la expresión de proteínas recombinantes como se proporciona en la presente.

10

15

20

25

		Concentración de amonio										
		N.D.	NMT 10mM	NMT 9mM	NMT 8mM	NMT 7mM	NMT 6mM	NMT 5mM	NMT 4mM	NMT 3mM	NMT 2mM	NMT 1mM
Concentración de cobre	AL 1 µg/L	Var. 1	Var. 41	Var. 81	Var. 121	Var. 161	Var. 201	Var. 241	Var. 281	Var. 321	Var. 361	Var. 401
	AL 2 µg/L	Var. 2	Var. 42	Var. 82	Var. 122	Var. 162	Var. 202	Var. 242	Var. 282	Var. 322	Var. 362	Var. 402
	AL 3 µg/L	Var. 3	Var. 43	Var. 83	Var. 123	Var. 163	Var. 203	Var. 243	Var. 283	Var. 323	Var. 363	Var. 403
	AL 4 µg/L	Var. 4	Var. 44	Var. 84	Var. 124	Var. 164	Var. 204	Var. 244	Var. 284	Var. 324	Var. 364	Var. 404
	AL 5 µg/L	Var. 5	Var. 45	Var. 85	Var. 125	Var. 165	Var. 205	Var. 245	Var. 285	Var. 325	Var. 365	Var. 405
	AL 6 µg/L	Var. 6	Var. 46	Var. 86	Var. 126	Var. 166	Var. 206	Var. 246	Var. 286	Var. 326	Var. 366	Var. 406
	AL 7 µg/L	Var. 7	Var. 47	Var. 87	Var. 127	Var. 167	Var. 207	Var. 247	Var. 287	Var. 327	Var. 367	Var. 407
	AL 8 µg/L	Var. 8	Var. 48	Var. 88	Var. 128	Var. 168	Var. 208	Var. 248	Var. 288	Var. 328	Var. 368	Var. 408
	AL 9 µg/L	Var. 9	Var. 49	Var. 89	Var. 129	Var. 169	Var. 209	Var. 249	Var. 289	Var. 329	Var. 369	Var. 409
	AL 10 µg/L	Var. 10	Var. 50	Var. 90	Var. 130	Var. 170	Var. 210	Var. 250	Var. 290	Var. 330	Var. 370	Var. 410
	Aproximadamente 1 µg/L	Var. 11	Var. 51	Var. 91	Var. 131	Var. 171	Var. 211	Var. 251	Var. 291	Var. 331	Var. 371	Var. 411
	Aproximadamente 1.5 µg/L	Var. 12	Var. 52	Var. 92	Var. 132	Var. 172	Var. 212	Var. 252	Var. 292	Var. 332	Var. 372	Var. 412

5

10

15

20

25

Aproximadamente 2 µg/L	Var. 13	Var. 53	Var. 93	Var. 133	Var. 173	Var. 213	Var. 253	Var. 293	Var. 333	Var. 373	Var. 413
Aproximadamente 2.5 µg/L	Var. 14	Var. 54	Var. 94	Var. 134	Var. 174	Var. 214	Var. 254	Var. 294	Var. 334	Var. 374	Var. 414
Aproximadamente 3 µg/L	Var. 15	Var. 55	Var. 95	Var. 135	Var. 175	Var. 215	Var. 255	Var. 295	Var. 335	Var. 375	Var. 415
Aproximadamente 3.5 µg/L	Var. 16	Var. 56	Var. 96	Var. 136	Var. 176	Var. 216	Var. 256	Var. 296	Var. 336	Var. 376	Var. 416
Aproximadamente 4 µg/L	Var. 17	Var. 57	Var. 97	Var. 137	Var. 177	Var. 217	Var. 257	Var. 297	Var. 337	Var. 377	Var. 417
Aproximadamente 4.5 µg/L	Var. 18	Var. 58	Var. 98	Var. 138	Var. 178	Var. 218	Var. 258	Var. 298	Var. 338	Var. 378	Var. 418
Aproximadamente 5 µg/L	Var. 19	Var. 59	Var. 99	Var. 139	Var. 179	Var. 219	Var. 259	Var. 299	Var. 339	Var. 379	Var. 419
Aproximadamente 5.5 µg/L	Var. 20	Var. 60	Var. 100	Var. 140	Var. 180	Var. 220	Var. 260	Var. 300	Var. 340	Var. 380	Var. 420
Aproximadamente 6 µg/L	Var. 21	Var. 61	Var. 101	Var. 141	Var. 181	Var. 221	Var. 261	Var. 301	Var. 341	Var. 381	Var. 421
Aproximadamente 7 µg/L	Var. 22	Var. 62	Var. 102	Var. 142	Var. 182	Var. 222	Var. 262	Var. 302	Var. 342	Var. 382	Var. 422
Aproximadamente 8 µg/L	Var. 23	Var. 63	Var. 103	Var. 143	Var. 183	Var. 223	Var. 263	Var. 303	Var. 343	Var. 383	Var. 423
Aproximadamente 9 µg/L	Var. 24	Var. 64	Var. 104	Var. 144	Var. 184	Var. 224	Var. 264	Var. 304	Var. 344	Var. 384	Var. 424
Aproximadamente 10 µg/L	Var. 25	Var. 65	Var. 105	Var. 145	Var. 185	Var. 225	Var. 265	Var. 305	Var. 345	Var. 385	Var. 425
1-20 µg/L	Var. 26	Var. 66	Var. 106	Var. 146	Var. 186	Var. 226	Var. 266	Var. 306	Var. 346	Var. 386	Var. 426
2-20 µg/L	Var. 27	Var. 67	Var. 107	Var. 147	Var. 187	Var. 227	Var. 267	Var. 307	Var. 347	Var. 387	Var. 427
1-10 µg/L	Var. 28	Var. 68	Var. 108	Var. 148	Var. 188	Var. 228	Var. 268	Var. 308	Var. 348	Var. 388	Var. 428
2-10 µg/L	Var. 29	Var. 69	Var. 109	Var. 149	Var. 189	Var. 229	Var. 269	Var. 309	Var. 349	Var. 389	Var. 429
1-6 µg/L	Var. 30	Var. 70	Var. 110	Var. 150	Var. 190	Var. 230	Var. 270	Var. 310	Var. 350	Var. 390	Var. 430
2-6 µg/L	Var. 31	Var. 71	Var. 111	Var. 151	Var. 191	Var. 231	Var. 271	Var. 311	Var. 351	Var. 391	Var. 431
3-6 µg/L	Var. 32	Var. 72	Var. 112	Var. 152	Var. 192	Var. 232	Var. 272	Var. 312	Var. 352	Var. 392	Var. 432

5

10

4-6 µg/L	Var. 33	Var. 73	Var. 113	Var. 153	Var. 193	Var. 233	Var. 273	Var. 313	Var. 353	Var. 393	Var. 433
1-5 µg/L	Var. 34	Var. 74	Var. 114	Var. 154	Var. 194	Var. 234	Var. 274	Var. 314	Var. 354	Var. 394	Var. 434
2-5 µg/L	Var. 35	Var. 75	Var. 115	Var. 155	Var. 195	Var. 235	Var. 275	Var. 315	Var. 355	Var. 395	Var. 435
3-5 µg/L	Var. 36	Var. 76	Var. 116	Var. 156	Var. 196	Var. 236	Var. 276	Var. 316	Var. 356	Var. 396	Var. 436
4-5 µg/L	Var. 37	Var. 77	Var. 117	Var. 157	Var. 197	Var. 237	Var. 277	Var. 317	Var. 357	Var. 397	Var. 437
1-4 µg/L	Var. 38	Var. 78	Var. 118	Var. 158	Var. 198	Var. 238	Var. 278	Var. 318	Var. 358	Var. 398	Var. 438
2-4 µg/L	Var. 39	Var. 79	Var. 119	Var. 159	Var. 199	Var. 239	Var. 279	Var. 319	Var. 359	Var. 399	Var. 439
3-4 µg/L	Var. 40	Var. 80	Var. 120	Var. 160	Var. 200	Var. 240	Var. 280	Var. 320	Var. 360	Var. 400	Var. 440

*ND = no definido

*NMT = no más de

*AL = al menos

15

20

25

En algunas modalidades, los medios suplementados de cobre de la presente invención son producidos suplementando medio basal que es libre de proteína animal y/o químicamente modificado. Métodos para preparar medios de cultivo libres de proteína animal y químicamente definidos se conocen en la técnica, por ejemplo en las Patentes Estadounidenses Números 6,171,825 y 6,936,441, WO 2007/077217, y Publicación de Solicitud de Patentes Estadounidenses Números 2008/0009040 y 2007/0212770, las descripciones de las cuales se incorporan en la presente por referencia en sus totalidades para todos los propósitos. En una modalidad, el medio de cultivo basal

usado en los métodos descritos en la presente es medio libre de oligopéptido o libre de proteína animal. En ciertas modalidades, el medio de cultivo puede ser químicamente modificado. En ciertas modalidades, los medios de cultivo
5 pueden contener al menos una poliamina a una concentración de aproximadamente 0.5 mg/L hasta aproximadamente 10 mg/L.

En modalidades adicionales y en adición a cualquiera de la descripción proporcionada anteriormente, se proporcionan medios de cultivo de la invención en los cuales
10 un medio basal es suplementado con cobre y al menos uno de calcio, zinc, y/o vitamina B3. En ciertas modalidades, el medio puede ser un medio libre de proteína animal, libre de oligopéptido o químicamente definido. En ciertas modalidades, el medio libre de proteína animal o libre de oligopéptido se
15 prepara como se muestra en las Patentes Estadounidenses Números 6,171,825 y 6,936,441, WO 2007/077217, y Publicación de Solicitud de Patentes Estadounidenses Números 2008/0009040 y 2007/0212770, las descripciones de las cuales se incorporan en la presente por referencia en sus totalidades para todos
20 los propósitos, ambas de las cuales se incorporan en la presente por referencia en sus totalidades para todos los propósitos, y suplementado con cobre adicional y opcionalmente uno o más de calcio, zinc, y vitamina B3. En una modalidad específica, el medio de cultivo químicamente
25 definido puede ser similar a una mezcla 1:1 de Medio de Eagel

Modificado de Dulbecco/F12 de Ham (DMEM/F12 de Ham), la cual ha sido suplementada con cobre adicional y opcionalmente calcio, zinc, y/o vitamina B3, con el fin de incrementar la actividad específica de rVWF o rA13 expresado en un cultivo celular en el medio. En todavía otras modalidades, el medio de cultivo está libre de componentes animales. En otra modalidad, el medio de cultivo contiene proteína, *por ejemplo*, proteína animal de suero tal como suero de bovino fetal. En otra modalidad, el cultivo tiene proteínas recombinantes exógenamente agregadas. En otra modalidad, las proteínas son de un animal libre de patógeno certificado.

En ciertas modalidades, los medios de cultivo contienen al menos una poliamina a una concentración de en o aproximadamente entre 0.5 mg/L y 30 mg/L. En otra modalidad, el medio de cultivo contiene al menos una poliamina en o aproximadamente entre 0.5 mg/L y 10 mg/L. En una modalidad, el medio de cultivo contiene al menos una poliamina en o aproximadamente entre 2 mg/L y 8 mg/L. En ciertas modalidades la poliamina es del grupo de ornitina, putrescina, espermina o espermidina, o similares. En una modalidad preferida, la poliamina es putrescina. En una modalidad específica, el medio de cultivo contiene en o aproximadamente entre 2 mg/L y 8 mg/L de putrescina.

En una modalidad, los medios de cultivo contienen al menos una poliamina a una concentración de en o

aproximadamente entre 0.5 mg/L y 30 mg/L y una combinación de cobre y amonio de conformidad con cualquiera de las variaciones 1 a 440, como se expone en la **Tabla 1**. En otra modalidad, el medio de cultivo contiene al menos una poliamina en o aproximadamente entre 0.5 mg/L y 10 mg/L y una combinación de cobre y amonio de conformidad con cualquiera de las variaciones 1 a 440, como se expone en la **Tabla 1**. En una modalidad, el medio de cultivo contiene al menos una poliamina en o aproximadamente entre 2 mg/L y 8 mg/L y una combinación de cobre y amonio de conformidad con cualquiera de las variaciones 1 a 440, como se expone en la **Tabla 1**. En ciertas modalidades la poliamina es del grupo de ornitina, putrescina, espermina o espermidina, o similares. En una modalidad preferida, la poliamina es putrescina. En una modalidad específica, el medio de cultivo contiene en o aproximadamente entre 2 mg/L y 8 mg/L de putrescina y una combinación de cobre y amonio de conformidad con cualquiera de las variaciones 1 a 440, como se expone en la **Tabla 1**.

En aspectos adicionales, además del cobre, los medios de cultivo celular de uso en la presente invención pueden incluir además uno o más de: calcio adicional, zinc, una o más vitaminas, y cualquier combinación de los mismos.

En general, cualquier sal de calcio se puede usar para suplementar el medio de la invención, ejemplos no limitantes de sales aceptables incluyen CaCl_2 , CaCl_2 ,

CaFPO₃·2H₂O, CaI₂, CaBr₂, (C₂H₃O₂)₂Ca, (CHO₂)₂Ca, (C₆H₇O₆)₂Ca, (C₆H₅O₇)₂Ca₃·2H₂O, y similares. En ciertas modalidades, una sal farmacéuticamente aceptable de calcio se usa para suplementar los medios de cultivo de la invención.

5 En general, cualquier sal de zinc se puede usar para suplementar el medio de la invención, ejemplos no limitantes de sales aceptables incluyen, ZnSO₄·7H₂O, ZnSO₃·2H₂O, (C₆H₅O₇)₂Zn₃·2H₂O, ZnBr₂, ZnBr₂·2H₂O, ZnCl₂, Zn (NO₃)₂·6H₂O, Zn (H₂PO₄)₂·H₂O, (C₂H₃O₂)₂Zn·2H₂O, y similares. En
10 ciertas modalidades, una sal farmacéuticamente aceptable de zinc se usa para suplementar los medios de cultivo de la invención. En otras modalidades, una preparación de péptido o proteína que contiene zinc, por ejemplo insulina, se puede usar con el suplemento del cultivo proporcionado en la
15 presente.

 En todavía aspectos adicionales, el medio de células basales suplementado con cobre y uno o más de los materiales adicionales discutidos anteriormente puede ser además usado en cultivos con bajos niveles de amonio en el
20 sobrenadante. En ciertas modalidades, medios de cultivo celular suplementados de uso en la presente invención resultan en niveles de amonio en la solución de cultivo celular por debajo de 10 mM. En modalidades adicionales, los medios de cultivo celular suplementados de la presente
25 invención se usan con niveles de amonio del cultivo celular

desde aproximadamente 0.5 - 9.5, 1.0 - 9.0, 1.5 - 8.5, 2.0 - 8.0, 2.5 - 7.5, 3.0 - 7.0, 3.5 - 6.5, 4.0 - 6.0, 4.5 - 5.5 mM.

En una modalidad, las concentraciones de cobre y amonio de un medio de cultivo celular y un sobrenadante de cultivo celular se mantienen por un periodo de tiempo prolongado durante el proceso de manufacturación. En una modalidad específica, las concentraciones de cobre y amonio de un cultivo celular se mantienen por la duración de un proceso de manufacturación, *es decir*, durante el tiempo en el cual rVWF o rA13 están siendo expresados y recuperados de un cultivo de células a gran escala. En ciertas modalidades, las concentraciones de cobre y amonio se mantienen en la solución del cultivo a un nivel de conformidad con cualquiera de las variaciones 1 a 440, como se expone en la **Tabla 1**. En una modalidad preferida las concentraciones de cobre y amonio se mantiene por el tiempo total de tal proceso de producción.

En algunas modalidades, el medio de cultivo proporcionado por la invención puede ser proporcionado en una forma líquida o una seca o polvo. El medio puede ser pre- alicuotado en una cantidad adecuada para uso único o proporcionado en una cantidad más grande que puede ser usada para más de un cultivo celular. En general, el medio de la invención se proporcionará en una forma estéril.

Detalles específicos de medios de cultivo celular

de uso para producción del rVWF o rA13 se discuten abajo. Aunque los siguientes son discutidos con respecto a sus rVWF o rA13, se apreciará que cualquiera de la discusión proporcionada abajo con respecto a rVWF es aplicable para
5 rA13, y vice versa.

A. Medios de Cultivo Celular del VWF Recombinante

Un aspecto de la presente invención se refiere a una solución de cultivo celular para producir vWF
10 recombinante, más específicamente, vWF de alto peso molecular que tiene una alta actividad específica, los cuales son además descritos en la presente. En una modalidad, la presente invención proporciona una solución de cultivo celular para producir vWF recombinante, de alto peso
15 molecular, que comprende un medio de cultivo celular que comprende una concentración de cobre de al menos aproximadamente 2.4 µg/L y una pluralidad de células que expresan vWF altamente multimérico que comprende aproximadamente 14 hasta aproximadamente 22 dímeros y una
20 actividad del factor de Ristocetina específica de al menos aproximadamente 30 mU/ug.

En una modalidad, la solución de cultivo celular comprende además una concentración de amonio de menos de 10 mM. En una modalidad preferida, el cultivo celular comprende
25 una concentración de amonio de no más de 5 mM. En todavía

otras modalidades, el cultivo celular comprende una
concentración de amonio de no más de 10 mM, o no más de 9 mM,
8 mM, 7 mM, 6 mM, 5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM, 1 mM, o menos. En
todavía otras modalidades, el cultivo celular tiene una
5 concentración de cobre y amonio de conformidad con cualquiera
de las variaciones 1 a 440, como se expone en la **Tabla 1**. En
ciertas modalidades, la concentración de amonio del cultivo
celular se mantiene por un periodo extendido a una
concentración como se proporciona anteriormente. Por ejemplo,
10 en una modalidad, la concentración de amonio se mantiene a
una concentración baja por al menos 3 días, o al menos 4, 5,
6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21,
28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, o más días. En una modalidad
específica, la concentración de amonio del cultivo celular se
15 mantiene a una concentración de amonio de no más de 5 mM por
al menos 7 días. En otra modalidad específica, la
concentración de amonio del cultivo celular se mantiene a una
concentración de amonio de no más de 4 mM por al menos 7
días. En una modalidad específica, la concentración de amonio
20 del cultivo celular se mantiene a una concentración de amonio
de no más de 5 mM por al menos 14 días. En otra modalidad
específica, la concentración de amonio del cultivo celular se
mantiene a una concentración de amonio de no más de 4 mM por
al menos 14 días. En todavía otra modalidad, la concentración
25 de amonio del cultivo celular se mantiene a un nivel bajo por

la duración del proceso (es decir, para el tiempo total que el cultivo está siendo usado para producir rVWF).

En una modalidad de la invención, los medios de cultivo celular pueden comprender una concentración de cobre de al menos aproximadamente 2.4 µg/L, en otra modalidad al menos aproximadamente 3 µg/L, en todavía otra modalidad al menos aproximadamente 4 µg/L, en todavía otra modalidad al menos aproximadamente 8 µg/L, en todavía otra modalidad al menos aproximadamente 10 µg/L, en todavía otra modalidad al menos aproximadamente 15 µg/L, y en una modalidad adicional al menos aproximadamente 20 µg/L.

En otras modalidades, la concentración de cobre en los medios de cultivo celular de la presente invención puede variar desde aproximadamente 2.4 µg/L hasta aproximadamente 20 µg/L, en otra modalidad desde aproximadamente 2.4 µg/L hasta aproximadamente 15 µg/L, en todavía otra modalidad desde aproximadamente 2.4 µg/L hasta aproximadamente 10 µg/L, en todavía otra modalidad desde aproximadamente 2.4 µg/L hasta aproximadamente 8 µg/L, en todavía otra modalidad desde aproximadamente 2.4 µg/L hasta aproximadamente 6 µg/L, en todavía otra modalidad desde aproximadamente 2.4 µg/L hasta aproximadamente 4 µg/L, en todavía otra modalidad desde aproximadamente 4 µg/L hasta aproximadamente 20 µg/L, en todavía otra modalidad desde aproximadamente 4 µg/L hasta aproximadamente 15 µg/L, en todavía otra modalidad desde

aproximadamente 4 µg/L hasta aproximadamente 10 µg/L, en todavía otra modalidad desde aproximadamente 4 µg/L hasta aproximadamente 8 µg/L, y en una modalidad adicional desde aproximadamente 4 µg/L hasta aproximadamente 6 µg/L.

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

10 **B. Medios de Cultivo Celular ADAMTS13 (A13)**

En un aspecto, la presente invención proporciona medios de cultivo que son útiles para la expresión de proteínas ADAMTS que tienen altas actividades específicas. Ventajosamente, se ha encontrado que suplementando un medio
15 de cultivo con cobre, que las actividades de enzimas ADAMTS recombinantes (*por ejemplo*, rADAMTS13) expresadas en células cultivadas en el medio suplementado son mayormente mejoradas, mientras las enzimas son expresadas a niveles tan altos, sino superiores, que las células cultivadas en medios no
20 suplementados.

En un aspecto, la presente invención proporciona medios de cultivo celular suplementados con cobre para la expresión de proteínas ADAMTS13 recombinantes con alta actividad específica. En una modalidad, los medios son
25 suplementados para resultar en una concentración total de

78

cobre de desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 4 $\mu\text{g/L}$. En modalidades adicionales, los medios son suplementados para resultar en una concentración total de cobre de desde aproximadamente 1 - 3, 2 - 3, 3 - 4 $\mu\text{g/L}$. En una modalidad, el medio contiene una concentración de cobre de al menos 1 $\mu\text{g/L}$. En otra modalidad, el medio contiene al menos 2 $\mu\text{g/L}$ de cobre. En otra modalidad, el medio contiene al menos 4 $\mu\text{g/L}$ de cobre. En otras modalidades, el medio contiene entre 2 $\mu\text{g/L}$ y 20 $\mu\text{g/L}$ de cobre. En otra modalidad, el medio contiene entre 1 $\mu\text{g/L}$ y 6 $\mu\text{g/L}$ de cobre. En otra modalidad, el medio contiene entre 2 $\mu\text{g/L}$ y 5 $\mu\text{g/L}$ de cobre. En otra modalidad, el medio contiene entre 3 $\mu\text{g/L}$ y 4 $\mu\text{g/L}$ de cobre. En todavía otras modalidades, el medio contiene al menos 1 $\mu\text{g/L}$ de cobre, o al menos 2 $\mu\text{g/L}$, 3 $\mu\text{g/L}$, 4 $\mu\text{g/L}$, 5 $\mu\text{g/L}$, 6 $\mu\text{g/L}$, 7 $\mu\text{g/L}$, 8 $\mu\text{g/L}$, 9 $\mu\text{g/L}$, 10 $\mu\text{g/L}$, 11 $\mu\text{g/L}$, 12 $\mu\text{g/L}$, 13 $\mu\text{g/L}$, 14 $\mu\text{g/L}$, 15 $\mu\text{g/L}$, 16 $\mu\text{g/L}$, 17 $\mu\text{g/L}$, 18 $\mu\text{g/L}$, 19 $\mu\text{g/L}$, 20 $\mu\text{g/L}$, o superior concentraciones de cobre.

En una modalidad, la solución de cultivo celular comprende además una concentración de amonio de menos de 10 mM. En una modalidad preferida, la solución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 5 mM. En todavía otras modalidades, la solución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 10 mM, o no más de 9 mM, 8 mM, 7 mM, 6 mM, 5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM, 1 mM, o menos. En todavía otras modalidades, la solución

de cultivo celular tiene una concentración de cobre y amonio de conformidad con cualquiera de las variaciones 1 a 440, como se expone en la **Tabla 1**. En ciertas modalidades, la concentración de amonio del cultivo celular se mantiene por un periodo extendido a una concentración como se proporciona anteriormente. Por ejemplo, en una modalidad, la concentración de amonio se mantiene a una concentración baja por al menos 3 días, o al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, o más días. En una modalidad específica, la concentración de amonio del cultivo celular se mantiene a una concentración de amonio de no más de 5 mM por al menos 7 días. En otra modalidad específica, la concentración de amonio del cultivo celular se mantiene a una concentración de amonio de no más de 4 mM por al menos 7 días. En una modalidad específica, la concentración de amonio del cultivo celular se mantiene a una concentración de amonio de no más de 5 mM por al menos 14 días. En otra modalidad específica, la concentración de amonio del cultivo celular se mantiene a una concentración de amonio de no más de 4 mM por al menos 14 días. En todavía otra modalidad, la concentración de amonio del cultivo celular se mantiene a un nivel bajo por la duración del proceso (es decir, para el tiempo total que el cultivo está siendo usado para producir rA13).

En una modalidad, se proporciona un medio de

cultivo para la expresión de una proteína ADAMTS recombinante (por ejemplo, rADAMTS13) que contiene al menos 1 µg/L de cobre y al menos 2 µM de zinc. En otras modalidades, el medio contiene al menos 2 µg/L de cobre o al menos 4 µg/L de cobre.

5 En otra modalidad en donde el medio es suplementado con cobre, el medio de cultivo también contiene al menos en o aproximadamente 5 µM de zinc. En una modalidad, el medio de cultivo también contiene en o aproximadamente entre 2 µM y 12 µM de zinc. En otra modalidad, el medio de cultivo también

10 contiene en o aproximadamente entre 5 µM y 12 µM de zinc. En todavía otras modalidades, el medio de cultivo también pueden contener al menos en o aproximadamente 2 µM, o al menos en 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

15 más zinc. En una modalidad, el medio de cultivo contiene una concentración de cobre y zinc de conformidad con cualquiera de las variaciones 441 a 880, como se expone en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Modalidades Ejemplares de concentraciones

20 de cobre y zinc presentes en medio de cultivo útil para la expresión de una proteína ADAMTS13 recombinante.

5

10

15

20

25

		Concentración de zinc										
		AL 2 µM	AL 3 µM	AL 4 µM	AL 5 µM	AL 6 µM	AL 7 µM	AL 8 µM	AL 9 µM	AL 10 µM	2-12 µM	5-12 µM
	AL	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
	1 µg/L	441	481	521	561	601	641	681	721	761	801	841
	AL	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
	2 µg/L	442	482	522	562	602	642	682	722	762	802	842
	AL	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
	3 µg/L	443	483	523	563	603	643	683	723	763	803	843
	AL	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
	4 µg/L	444	484	524	564	604	644	684	724	764	804	844
	AL	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
	5 µg/L	445	485	525	565	605	645	685	725	765	805	845
	AL	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
	6 µg/L	446	486	526	566	606	646	686	726	766	806	846
	AL	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
	7 µg/L	447	487	527	567	607	647	687	727	767	807	847
	AL	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
	8 µg/L	448	488	528	568	608	648	688	728	768	808	848
	AL	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
	9 µg/L	449	489	529	569	609	649	689	729	769	809	849
	AL	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
	10 µg/L	450	490	530	570	610	650	690	730	770	810	850
	Aproximadamente 1 µg/L	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
		451	491	531	571	611	651	691	731	771	811	851
	Aproximadamente 1.5 µg/L	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
		452	492	532	572	612	652	692	732	772	812	852
	Aproximadamente 2 µg/L	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
		453	493	533	573	613	653	693	733	773	813	853
	Aproximadamente 2.5 µg/L	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
		454	494	534	574	614	654	694	734	774	814	854
	Aproximadamente 3 µg/L	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
		455	495	535	575	615	655	695	735	775	815	855
	Aproximadamente 3.5 µg/L	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
		456	496	536	576	616	656	696	736	776	816	856
	Aproximadamente 4 µg/L	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
		457	497	537	577	617	657	697	737	777	817	857
	Aproximadamente 4.5 µg/L	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
		458	498	538	578	618	658	698	738	778	818	858

Concentración de cobre

5

10

15

20

25

Aproximadamente 5 µg/L	Var. 459	Var. 499	Var. 539	Var. 579	Var. 619	Var. 659	Var. 699	Var. 739	Var. 779	Var. 819	Var. 859
Aproximadamente 5.5 µg/L	Var. 460	Var. 500	Var. 540	Var. 580	Var. 620	Var. 660	Var. 700	Var. 740	Var. 780	Var. 820	Var. 860
Aproximadamente 6 µg/L	Var. 461	Var. 501	Var. 541	Var. 581	Var. 621	Var. 661	Var. 701	Var. 741	Var. 781	Var. 821	Var. 861
Aproximadamente 7 µg/L	Var. 462	Var. 502	Var. 542	Var. 582	Var. 622	Var. 662	Var. 702	Var. 742	Var. 782	Var. 822	Var. 862
Aproximadamente 8 µg/L	Var. 463	Var. 503	Var. 543	Var. 583	Var. 623	Var. 663	Var. 703	Var. 743	Var. 783	Var. 823	Var. 863
Aproximadamente 9 µg/L	Var. 464	Var. 504	Var. 544	Var. 584	Var. 624	Var. 664	Var. 704	Var. 744	Var. 784	Var. 824	Var. 864
Aproximadamente 10 µg/L	Var. 465	Var. 505	Var. 545	Var. 585	Var. 625	Var. 665	Var. 705	Var. 745	Var. 785	Var. 825	Var. 865
1-20 µg/L	Var. 466	Var. 506	Var. 546	Var. 586	Var. 626	Var. 666	Var. 706	Var. 746	Var. 786	Var. 826	Var. 866
2-20 µg/L	Var. 467	Var. 507	Var. 547	Var. 587	Var. 627	Var. 667	Var. 707	Var. 747	Var. 787	Var. 827	Var. 867
1-10 µg/L	Var. 468	Var. 508	Var. 548	Var. 588	Var. 628	Var. 668	Var. 708	Var. 748	Var. 788	Var. 828	Var. 868
2-10 µg/L	Var. 469	Var. 509	Var. 549	Var. 589	Var. 629	Var. 669	Var. 709	Var. 749	Var. 789	Var. 829	Var. 869
1-6 µg/L	Var. 470	Var. 510	Var. 550	Var. 590	Var. 630	Var. 670	Var. 710	Var. 750	Var. 790	Var. 830	Var. 870
2-6 µg/L	Var. 471	Var. 511	Var. 551	Var. 591	Var. 631	Var. 671	Var. 711	Var. 751	Var. 791	Var. 831	Var. 871
3-6 µg/L	Var. 472	Var. 512	Var. 552	Var. 592	Var. 632	Var. 672	Var. 712	Var. 752	Var. 792	Var. 832	Var. 872
4-6 µg/L	Var. 473	Var. 513	Var. 553	Var. 593	Var. 633	Var. 673	Var. 713	Var. 753	Var. 793	Var. 833	Var. 873
1-5 µg/L	Var. 474	Var. 514	Var. 554	Var. 594	Var. 634	Var. 674	Var. 714	Var. 754	Var. 794	Var. 834	Var. 874
2-5 µg/L	Var. 475	Var. 515	Var. 555	Var. 595	Var. 635	Var. 675	Var. 715	Var. 755	Var. 795	Var. 835	Var. 875
3-5 µg/L	Var. 476	Var. 516	Var. 556	Var. 596	Var. 636	Var. 676	Var. 716	Var. 756	Var. 796	Var. 836	Var. 876
4-5 µg/L	Var. 477	Var. 517	Var. 557	Var. 597	Var. 637	Var. 677	Var. 717	Var. 757	Var. 797	Var. 837	Var. 877
1-4 µg/L	Var. 478	Var. 518	Var. 558	Var. 598	Var. 638	Var. 678	Var. 718	Var. 758	Var. 798	Var. 838	Var. 878

	2-4 µg/L	Var. 479	Var. 519	Var. 559	Var. 599	Var. 639	Var. 679	Var. 719	Var. 759	Var. 799	Var. 839	Var. 879
	3-4 µg/L	Var. 480	Var. 520	Var. 560	Var. 600	Var. 640	Var. 680	Var. 720	Var. 760	Var. 800	Var. 840	Var. 880

*AL = al menos

5

10

15

20

25

En una modalidad, la solución de cultivo celular comprende además una baja concentración de amonio. En una modalidad, la solución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de menos de 10 mM y una concentración de cobre y zinc de conformidad con cualquiera de las variaciones 441 a 880, como se expone en la **Tabla 2**. En una modalidad específica, el amonio se mantiene a una concentración de no más de 10 mM por al menos 7 días. En una modalidad preferida, la solución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 6 mM y una concentración de cobre y zinc de conformidad con cualquiera de las variaciones 441 a 880, como se expone en la **Tabla 2**. En una modalidad específica, el amonio se mantiene a una concentración de no más de 6 mM por al menos 7 días. En otra modalidad preferida, la solución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 5 mM y una concentración de cobre y zinc de conformidad con cualquiera de las variaciones 441 a 880, como se expone en la **Tabla 2**. En una modalidad específica, el amonio se mantiene a una concentración de no más de 5 mM por al menos 7 días. En otra

modalidad preferida, la solución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 4 mM y una concentración de cobre y zinc de conformidad con cualquiera de las variaciones 441 a 880, como se expone en la **Tabla 2**.

5 En una modalidad específica, el amonio se mantiene a una concentración de no más de 4 mM por al menos 7 días. En todavía otras modalidades, la solución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 10 mM, o no más de 9 mM, 8 mM, 7 mM, 6 mM, 5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM, 1
10 mM, o menos y una concentración de cobre y zinc de conformidad con cualquiera de las variaciones 441 a 880, como se expone en la **Tabla 2**. En todavía otra modalidad específica, la concentración de amonio del cultivo celular se mantiene a un nivel bajo por la duración del proceso (es
15 decir, para el tiempo total que el cultivo está siendo usado para producir rA13).

En una modalidad, se proporciona un medio de cultivo para la expresión de una proteína ADAMTS recombinante (por ejemplo, rADAMTS13) que contiene al menos 1 µg/L de
20 cobre y al menos en o aproximadamente 0.5 mM de calcio. En otras modalidades, el medio contiene al menos 2 µg/L de cobre o al menos 4 µg/L de cobre. En otra modalidad en donde el medio es suplementado con cobre, el medio de cultivo también contiene al menos 1.5 mM de calcio. En una modalidad, el
25 medio de cultivo contiene en o aproximadamente entre 0.5 mM y

1.5 mM de calcio. En todavía otras modalidades, el medio de cultivo pueden contener al menos en o aproximadamente 0.5 mM, o al menos en 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 calcio. En una modalidad, el medio de cultivo contiene una concentración de cobre y calcio de conformidad con cualquiera de las variaciones 881 a 1320, como se expone en la **Tabla 3**.

10

Tabla 3. Modalidades Ejemplares de concentraciones de cobre y calcio presentes en medio de cultivo útil para la expresión de una proteína ADAMTS13 recombinante.

15

20

25

		Concentración de calcio										
		AL 0.5 mM	AL 0.75 mM	AL 1.0 mM	AL 1.25 mM	AL 1.5 mM	AL 2.0 mM	AL 2.5 mM	AL 3.0 mM	AL 4 mM	AL 5 mM	0.5- 1.5 mM
Concentración de cobre	AL	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
	1 µg/L	881	921	961	1001	1041	1081	1121	1161	1201	1241	1281
	AL	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
	2 µg/L	882	922	962	1002	1042	1082	1122	1162	1202	1242	1282
	AL	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
	3 µg/L	883	923	963	1003	1043	1083	1123	1163	1203	1243	1283
	AL	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
	4 µg/L	884	924	964	1004	1044	1084	1124	1164	1204	1244	1284
	AL	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
	5 µg/L	885	925	965	1005	1045	1085	1125	1165	1205	1245	1285
	AL	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
	6 µg/L	886	926	966	1006	1046	1086	1126	1166	1206	1246	1286
	AL	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.	Var.
	7 µg/L	887	927	967	1007	1047	1087	1127	1167	1207	1247	1287

5

10

15

20

25

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

5	1-10 µg/L	Var. 908	Var. 948	Var. 988	Var. 1028	Var. 1068	Var. 1108	Var. 1148	Var. 1188	Var. 1228	Var. 1268	Var. 1308
	2-10 µg/L	Var. 909	Var. 949	Var. 989	Var. 1029	Var. 1069	Var. 1109	Var. 1149	Var. 1189	Var. 1229	Var. 1269	Var. 1309
	1-6 µg/L	Var. 910	Var. 950	Var. 990	Var. 1030	Var. 1070	Var. 1110	Var. 1150	Var. 1190	Var. 1230	Var. 1270	Var. 1310
	2-6 µg/L	Var. 911	Var. 951	Var. 991	Var. 1031	Var. 1071	Var. 1111	Var. 1151	Var. 1191	Var. 1231	Var. 1271	Var. 1311
	3-6 µg/L	Var. 912	Var. 952	Var. 992	Var. 1032	Var. 1072	Var. 1112	Var. 1152	Var. 1192	Var. 1232	Var. 1272	Var. 1312
	4-6 µg/L	Var. 913	Var. 953	Var. 993	Var. 1033	Var. 1073	Var. 1113	Var. 1153	Var. 1193	Var. 1233	Var. 1273	Var. 1313
10	1-5 µg/L	Var. 914	Var. 954	Var. 994	Var. 1034	Var. 1074	Var. 1114	Var. 1154	Var. 1194	Var. 1234	Var. 1274	Var. 1314
	2-5 µg/L	Var. 915	Var. 955	Var. 995	Var. 1035	Var. 1075	Var. 1115	Var. 1155	Var. 1195	Var. 1235	Var. 1275	Var. 1315
	3-5 µg/L	Var. 916	Var. 956	Var. 996	Var. 1036	Var. 1076	Var. 1116	Var. 1156	Var. 1196	Var. 1236	Var. 1276	Var. 1316
	4-5 µg/L	Var. 917	Var. 957	Var. 997	Var. 1037	Var. 1077	Var. 1117	Var. 1157	Var. 1197	Var. 1237	Var. 1277	Var. 1317
15	1-4 µg/L	Var. 918	Var. 958	Var. 998	Var. 1038	Var. 1078	Var. 1118	Var. 1158	Var. 1198	Var. 1238	Var. 1278	Var. 1318
	2-4 µg/L	Var. 919	Var. 959	Var. 999	Var. 1039	Var. 1079	Var. 1119	Var. 1159	Var. 1199	Var. 1239	Var. 1279	Var. 1319
	3-4 µg/L	Var. 920	Var. 960	Var. 1000	Var. 1040	Var. 1080	Var. 1120	Var. 1160	Var. 1200	Var. 1240	Var. 1280	Var. 1320

*AL = al menos

En una modalidad, la solución de cultivo celular
comprende además una baja concentración de amonio. En una
modalidad, la solución de cultivo celular comprende una
concentración de amonio de menos de 10 mM y una concentración
de cobre y calcio de conformidad con cualquiera de las
variaciones 881 a 1320, como se expone en la **Tabla 3**. En una
modalidad específica, el amonio se mantiene a una

concentración de no más de 10 mM por al menos 7 días. En una modalidad preferida, el medio de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 6 mM y una concentración de cobre y calcio de conformidad con cualquiera de las variaciones 881 a 1320, como se expone en la **Tabla 3**. En una modalidad específica, el amonio se mantiene a una concentración de no más de 6 mM por al menos 7 días. En otra modalidad preferida, el medio de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 5 mM y una concentración de cobre y calcio de conformidad con cualquiera de las variaciones 881 a 1320, como se expone en la **Tabla 3**. En una modalidad específica, el amonio se mantiene a una concentración de no más de 5 mM por al menos 7 días. En otra modalidad preferida, el medio de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 4 mM y una concentración de cobre y calcio de conformidad con cualquiera de las variaciones 881 a 1320, como se expone en la **Tabla 3**. En una modalidad específica, el amonio se mantiene a una concentración de no más de 4 mM por al menos 7 días. En todavía otras modalidades, el medio de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 10 mM, o no más de 9 mM, 8 mM, 7 mM, 6 mM, 5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM, 1 mM, o menos y una concentración de cobre y calcio de conformidad con cualquiera de las variaciones 881 a 1320, como se expone en la **Tabla 3**. En todavía otra modalidad

específica, la concentración de amonio del cultivo celular se mantiene a un nivel bajo por la duración del proceso (es decir, para el tiempo total que el cultivo está siendo usado para producir rA13).

5 En una modalidad, el medio de cultivo celular es suplementado con cobre, zinc y calcio. En una modalidad específica, el medio de cultivo tiene una concentración de calcio de al menos 0.5 mM y una concentración de cobre y zinc de conformidad con cualquiera de las variaciones 441 a 880,
10 como se expone en la **Tabla 2**. En otra modalidad específica, el medio de cultivo tiene una concentración de calcio de al menos 1.5 mM y una concentración de cobre y zinc de conformidad con cualquiera de las variaciones 441 a 880, como se expone en la **Tabla 2**. En otra modalidad específica, el
15 medio de cultivo tiene una concentración de calcio entre 0.5 mM y 1.5 mM y una concentración de cobre y zinc de conformidad con cualquiera de las variaciones 441 a 880, como se expone en la **Tabla 2**. En todavía otras modalidades, el medio de cultivo tiene una concentración de calcio de al
20 menos 0.6 mM, 0.7 mM, 0.8 mM, 0.9 mM, 1.0 mM, 1.1 mM, 1.2 mM, 1.3 mM, 1.4 mM, 1.5 mM, 1.6 mM, 1.7 mM, 1.8 mM, 1.9 mM, 2.0 mM, 2.25 mM, 2.5 mM, 2.75 mM, 3.0 mM, 3.5 mM, 4.0 mM, 4.5 mM, 5.0 mM, o más, y una concentración de cobre y zinc de conformidad con cualquiera de las variaciones 441 a 880, como
25 se expone en la **Tabla 2**.

En una modalidad, se proporciona un medio de cultivo para la expresión de una proteína ADAMTS recombinante (por ejemplo, rADAMTS13) que contiene al menos 1 µg/L de cobre y al menos 2 mg/L de nicotinamida (vitamina B3). En otras modalidades, el medio contiene al menos 2 µg/L de cobre o al menos 4 µg/L de cobre. En otra modalidad en donde el medio es suplementado con cobre, el medio de cultivo también contiene al menos 7 mg/L de nicotinamida (vitamina B3). En una modalidad, el medio de cultivo contiene en o aproximadamente entre 2 mg/L y 10 mg/L de nicotinamida (vitamina B3). En todavía otras modalidades, el medio de cultivo pueden contener al menos en 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 superior concentraciones de nicotinamida (vitamina B3). En una modalidad, el medio de cultivo contiene una concentración de cobre y nicotinamida de conformidad con cualquiera de las variaciones 1321 a 1760, como se expone en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Modalidades Ejemplares de concentraciones de cobre y nicotinamida presentes en medio de cultivo útil para la expresión de una proteína ADAMTS13 recombinante.

5

10

15

20

25

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

5

10

15

20

25

Aproximadamen te 3.5 µg/L	Var. 1336	Var. 1376	Var. 1416	Var. 1456	Var. 1496	Var. 1536	Var. 1576	Var. 1616	Var. 1656	Var. 1696	Var. 1736
Aproximadamen te 4 µg/L	Var. 1337	Var. 1377	Var. 1417	Var. 1457	Var. 1497	Var. 1537	Var. 1577	Var. 1617	Var. 1657	Var. 1697	Var. 1737
Aproximadamen te 4.5 µg/L	Var. 1338	Var. 1378	Var. 1418	Var. 1458	Var. 1498	Var. 1538	Var. 1578	Var. 1618	Var. 1658	Var. 1698	Var. 1738
Aproximadamen te 5 µg/L	Var. 1339	Var. 1379	Var. 1419	Var. 1459	Var. 1499	Var. 1539	Var. 1579	Var. 1619	Var. 1659	Var. 1699	Var. 1739
Aproximadamen te 5.5 µg/L	Var. 1340	Var. 1380	Var. 1420	Var. 1460	Var. 1500	Var. 1540	Var. 1580	Var. 1620	Var. 1660	Var. 1700	Var. 1740
Aproximadamen te 6 µg/L	Var. 1341	Var. 1381	Var. 1421	Var. 1461	Var. 1501	Var. 1541	Var. 1581	Var. 1621	Var. 1661	Var. 1701	Var. 1741
Aproximadamen te 7 µg/L	Var. 1342	Var. 1382	Var. 1422	Var. 1462	Var. 1502	Var. 1542	Var. 1582	Var. 1622	Var. 1662	Var. 1702	Var. 1742
Aproximadamen te 8 µg/L	Var. 1343	Var. 1383	Var. 1423	Var. 1463	Var. 1503	Var. 1543	Var. 1583	Var. 1623	Var. 1663	Var. 1703	Var. 1743
Aproximadamen te 9 µg/L	Var. 1344	Var. 1384	Var. 1424	Var. 1464	Var. 1504	Var. 1544	Var. 1584	Var. 1624	Var. 1664	Var. 1704	Var. 1744
Aproximadamen te 10 µg/L	Var. 1345	Var. 1385	Var. 1425	Var. 1465	Var. 1505	Var. 1545	Var. 1585	Var. 1625	Var. 1665	Var. 1705	Var. 1745
1-20 µg/L	Var. 1346	Var. 1386	Var. 1426	Var. 1466	Var. 1506	Var. 1546	Var. 1586	Var. 1626	Var. 1666	Var. 1706	Var. 1746
2-20 µg/L	Var. 1347	Var. 1387	Var. 1427	Var. 1467	Var. 1507	Var. 1547	Var. 1587	Var. 1627	Var. 1667	Var. 1707	Var. 1747
1-10 µg/L	Var. 1348	Var. 1388	Var. 1428	Var. 1468	Var. 1508	Var. 1548	Var. 1588	Var. 1628	Var. 1668	Var. 1708	Var. 1748
2-10 µg/L	Var. 1349	Var. 1389	Var. 1429	Var. 1469	Var. 1509	Var. 1549	Var. 1589	Var. 1629	Var. 1669	Var. 1709	Var. 1749
1-6 µg/L	Var. 1350	Var. 1390	Var. 1430	Var. 1470	Var. 1510	Var. 1550	Var. 1590	Var. 1630	Var. 1670	Var. 1710	Var. 1750

5

10

	2-6 µg/L	Var. 1351	Var. 1391	Var. 1431	Var. 1471	Var. 1511	Var. 1551	Var. 1591	Var. 1631	Var. 1671	Var. 1711	Var. 1751
	3-6 µg/L	Var. 1352	Var. 1392	Var. 1432	Var. 1472	Var. 1512	Var. 1552	Var. 1592	Var. 1632	Var. 1672	Var. 1712	Var. 1752
	4-6 µg/L	Var. 1353	Var. 1393	Var. 1433	Var. 1473	Var. 1513	Var. 1553	Var. 1593	Var. 1633	Var. 1673	Var. 1713	Var. 1753
	1-5 µg/L	Var. 1354	Var. 1394	Var. 1434	Var. 1474	Var. 1514	Var. 1554	Var. 1594	Var. 1634	Var. 1674	Var. 1714	Var. 1754
	2-5 µg/L	Var. 1355	Var. 1395	Var. 1435	Var. 1475	Var. 1515	Var. 1555	Var. 1595	Var. 1635	Var. 1675	Var. 1715	Var. 1755
	3-5 µg/L	Var. 1356	Var. 1396	Var. 1436	Var. 1476	Var. 1516	Var. 1556	Var. 1596	Var. 1636	Var. 1676	Var. 1716	Var. 1756
	4-5 µg/L	Var. 1357	Var. 1397	Var. 1437	Var. 1477	Var. 1517	Var. 1557	Var. 1597	Var. 1637	Var. 1677	Var. 1717	Var. 1757
	1-4 µg/L	Var. 1358	Var. 1398	Var. 1438	Var. 1478	Var. 1518	Var. 1558	Var. 1598	Var. 1638	Var. 1678	Var. 1718	Var. 1758
	2-4 µg/L	Var. 1359	Var. 1399	Var. 1439	Var. 1479	Var. 1519	Var. 1559	Var. 1599	Var. 1639	Var. 1679	Var. 1719	Var. 1759
	3-4 µg/L	Var. 1360	Var. 1400	Var. 1440	Var. 1480	Var. 1520	Var. 1560	Var. 1600	Var. 1640	Var. 1680	Var. 1720	Var. 1760

*AL = al menos

15

20

25

En una modalidad, la solución de cultivo celular comprende además una baja concentración de amonio. En una modalidad, el medio de cultivo comprende una concentración de amonio de menos de 10 mM y una concentración de cobre y nicotinamida de conformidad con cualquiera de las variaciones 1321 a 1760, como se expone en la **Tabla 4**. En una modalidad específica, el amonio se mantiene a una concentración de no más de 10 mM por al menos 7 días. En una modalidad preferida, la solución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 6 mM y una concentración de cobre y nicotinamida de conformidad con cualquiera de las variaciones

1321 a 1760, como se expone en la **Tabla 4**. En una modalidad específica, el amonio se mantiene a una concentración de no más de 6 mM por al menos 7 días. En otra modalidad preferida, la solución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 5 mM y una concentración de cobre y nicotinamida de conformidad con cualquiera de las variaciones 1321 a 1760, como se expone en la **Tabla 4**. En una modalidad específica, el amonio se mantiene a una concentración de no más de 5 mM por al menos 7 días. En otra modalidad preferida, la solución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 4 mM y una concentración de cobre y nicotinamida de conformidad con cualquiera de las variaciones 1321 a 1760, como se expone en la **Tabla 4**. En una modalidad específica, el amonio se mantiene a una concentración de no más de 4 mM por al menos 7 días. En todavía otras modalidades, la solución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 10 mM, o no más de 9 mM, 8 mM, 7 mM, 6 mM, 5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM, 1 mM, o menos y una concentración de cobre y nicotinamida de conformidad con cualquiera de las variaciones 1321 a 1760, como se expone en la **Tabla 4**. En todavía otra modalidad específica, la concentración de amonio del cultivo celular se mantiene a un nivel bajo por la duración del proceso (es decir, para el tiempo total que el cultivo está siendo usado para producir rA13).

En una modalidad, el medio de cultivo celular es suplementado con cobre, zinc y nicotinamida. En una modalidad específica, el medio de cultivo tiene una concentración de nicotinamida de al menos 2 mg/mL y una concentración de cobre y zinc de conformidad con cualquiera de las variaciones 441 a 880, como se expone en la **Tabla 2**. En otra modalidad específica, el medio de cultivo tiene una concentración de nicotinamida de al menos 7 mg/mL mM y una concentración de cobre y zinc de conformidad con cualquiera de las variaciones 441 a 880, como se expone en la **Tabla 2**. En otra modalidad específica, el medio de cultivo tiene una concentración de nicotinamida entre 2 mg/mL y 10 mg/mL y una concentración de cobre y zinc de conformidad con cualquiera de las variaciones 441 a 880, como se expone en la **Tabla 2**. En todavía otras modalidades, el medio de cultivo tiene una concentración de nicotinamida de al menos 2 mg/mL, 3 mg/mL, 4 mg/mL, 5 mg/mL, 6 mg/mL, 7 mg/mL, 8 mg/mL, 9 mg/mL, 10 mg/mL, 11 mg/mL, 12 mg/mL, 13 mg/mL, 14 mg/mL, 15 mg/mL, o más, y una concentración de cobre y zinc de conformidad con cualquiera de las variaciones 441 a 880, como se expone en la **Tabla 2**.

En una modalidad, el medio de cultivo celular es suplementado con cobre, calcio y nicotinamida. En una modalidad específica, el medio de cultivo tiene una concentración de nicotinamida de al menos 2 mg/mL y una concentración de cobre y calcio de conformidad con cualquiera

de las variaciones 881 a 1320, como se expone en la **Tabla 3**.
En otra modalidad específica, el medio de cultivo tiene una
concentración de nicotinamida de al menos 7 mg/mL mM y una
concentración de cobre y calcio de conformidad con cualquiera
5 de las variaciones 881 a 1320, como se expone en la **Tabla 3**.
En otra modalidad específica, el medio de cultivo tiene una
concentración de nicotinamida entre 2 mg/mL y 10 mg/mL y una
concentración de cobre y calcio de conformidad con cualquiera
de las variaciones 881 a 1320, como se expone en la **Tabla 3**.
10 En todavía otras modalidades, el medio de cultivo tiene una
concentración de nicotinamida de al menos 2 mg/mL, 3 mg/mL, 4
mg/mL, 5 mg/mL, 6 mg/mL, 7 mg/mL, 8 mg/mL, 9 mg/mL, 10 mg/mL,
11 mg/mL, 12 mg/mL, 13 mg/mL, 14 mg/mL, 15 mg/mL, o más, y
una concentración de cobre y calcio de conformidad con
15 cualquiera de las variaciones 881 a 1320, como se expone en
la **Tabla 3**.

IV. Métodos para la Producción de Factores Sanguíneos que Tienen Alta Actividad Específica

20 A. Métodos de Cultivo Celular

La presente invención proporciona métodos para
producción a gran escala de proteínas recombinantes (tales
como rVWF y rA13). En ciertas modalidades, tales métodos de
producción a gran escala utilizan reactores de tanque
25 agitado/removido para la manufactura de estas proteínas

recombinantes terapéuticas.

En ciertas modalidades, los métodos de la presente invención pueden comprender el uso de un sistema de cultivo celular operado bajo un modo de operación por lotes o
5 continuo. Por ejemplo, cuando se utilizan cultivos celulares por lotes, pueden ser operados bajo modo de lote único, lote alimentado o lote repetido. Del mismo modo, los cultivos celulares continuos pueden ser operados bajo, por ejemplo, modo perfusión, turbidostático o quimiostático. El cultivo
10 celular por lotes y continuo puede ser realizado bajo ya sea condiciones de suspensión o adherencia. Cuando se opera bajo condiciones de suspensión, las células serán libremente suspendidas y mezcladas dentro del medio de cultivo. Alternativamente, bajo condiciones de adherencia, las células
15 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 de lotes es típicamente un cultivo
20 celular a gran escala en el cual un inóculo celular se cultiva a una densidad máxima en un tanque o fermentador, y se cosecha y procesa como un lote único. Un cultivo de lote alimentado es típicamente un cultivo de lotes el cual es suministrado con ya sea nutrientes frescos (por ejemplo,
25 sustratos que limitan el crecimiento) o aditivos (por

ejemplo, precursores a productos). La solución alimentada es usualmente altamente concentrada para evitar dilución del biorreactor. En un cultivo de lote repetido, las células son conocidas en un medio de cultivo y crecen a una densidad celular deseada. Para evitar el comienzo de un decline de fase y muerte celular, el cultivo es entonces diluido con medio de crecimiento completo antes que las células alcancen su máxima concentración. La cantidad y frecuencia de dilución varían ampliamente y dependen de las características de crecimiento de la línea celular y conveniencia del proceso de cultivo. El proceso puede ser repetido tantas veces como se requiera y, a menos que las células y medios se desechen en el sub-cultivo, el volumen del cultivo incrementará por etapas conforme se hace cada dilución. El incremento del volumen puede ser manejado teniendo un reactor de suficiente tamaño para permitir diluciones dentro del recipiente o dividir el cultivo diluido en varios recipientes. La razón de este tipo de cultivo es mantener las células en un estado exponencialmente de crecimiento. El subcultivo serial se caracteriza en que el volumen del cultivo es siempre en forma de etapas incrementadas, pueden existir múltiples recolectores, las células pueden continuar creciendo y el proceso puede continuar tan largo como se desee. En ciertas modalidades, una proteína ADAMTS recombinante (*por ejemplo*, rADAMTS13) puede ser recuperada después de recolectar el

sobrenadante de un cultivo de lotes. En otras modalidades, un VWF recombinante puede ser recuperado después de recolectar el sobrenadante de un cultivo de lotes.

Un cultivo continuo puede ser una suspensión de
5 cultivo que es continuamente aplicado con nutrientes por el flujo de entrada de medio fresco, en donde el volumen del cultivo se mantiene usualmente constante por la remoción concomitante de medio consumido. En métodos quimiostáticos y turbidostáticos, el medio extraído contiene células. De este
10 modo, las células que permanecen en el recipiente de cultivo celular deben crecer para mantener un estado listo. En el método quimiostático, la velocidad de crecimiento es típicamente controlada por el control de la velocidad de dilución, *es decir*, la velocidad en la cual se agrega el
15 medio fresco. La velocidad de crecimiento de las células en el cultivo puede ser controlada, por ejemplo, a una velocidad de crecimiento sub-máxima, por alteración de la velocidad de dilución. Por el contrario, en el método turbidostático, la velocidad de dilución se ajusta para permitir la máxima
20 velocidad de crecimiento que las células pueden lograr en las condiciones de operación dadas, tales como pH y temperatura. En ciertas modalidades, el rVWF o rA13 se recupera después de recolectar el sobrenadante de un cultivo continuo. Un método ejemplar para cultivo celular continuo se describe en el
25 documento WO/2011/012725 (Grillberger et al.), el contenido

del cual está de este modo incorporado por referencia en su totalidad para todos los propósitos.

En un cultivo de perfusión, el medio extraído es agotado de las células, las cuales se retienen en el recipiente de cultivo, por ejemplo, por filtración o por métodos centrífugos que conducen a la reintroducción de células en el cultivo. Sin embargo, típicamente membranas usadas para filtración no retienen 100% de las células y así una proporción es removida cuando el medio es extraído. No puede ser crucial operar cultivos de perfusión a velocidades de crecimiento muy altas, ya que la mayoría de las células son retenidas en el recipiente de cultivo. En ciertas modalidades, el rVWF o rA13 se recupera después de recolectar el sobrenadante de un cultivo de perfusión.

El sistema de reactor de tanque agitado puede ser usado para cultivos celulares de lotes y continuos operados bajo modos de suspensión o adherentes. En general, el sistema de reactor de tanque agitado puede ser operado como cualquier reactor de tanque agitado convencional con cualquier tipo de agitador tal como un Rushton, hidrodreslizador, hoja aguda o marino.

En ciertas modalidades, los métodos de cultivo celular de la invención pueden comprender el uso de un microportador. En algunas modalidades, los cultivos celulares de las modalidades pueden ser realizados en biorreactores

grandes bajo condiciones adecuadas para proporcionar áreas de superficie de cultivo de alto volumen específicos para lograr altas densidades celular y expresión de proteína. Un medio para proporcionar tales condiciones de crecimiento es usar microportadores para cultivo celular en biorreactores de tanque agitado. El concepto de crecimiento celular en microportadores fue primero descrito por van Wezel (van Wezel, A.L., Nature 216:64-5 (1967)) y permite la unión celular en la superficie de partículas sólidas pequeñas suspendidas en el medio de crecimiento. Estos métodos proporcionan altas relaciones de superficie a volumen y de este modo permiten la eficiente utilización de nutrientes. Además, para expresión de proteínas secretadas en líneas de células eucarióticas, la relación de superficie a volumen incrementada permite niveles superiores de secreción superior y de este modo rendimientos de proteína superiores en el sobrenadante del cultivo. Finalmente, estos métodos permiten la fácil escala de cultivos de expresión eucariótica.

Las células que expresan vWF y/o rA13 se pueden unir a un microportador esférico o poroso durante el crecimiento del cultivo celular. El microportador puede ser un microportador seleccionado del grupo de microportadores con base en dextrano, colágeno, plástico, gelatina y celulosa y otros como se describe en Butler (1988. In: Spier & Griffiths, Animal Cell Biotechnology 3:283-303). También es

posible hacer crecer las células en una biomasa en microportadores esféricos y subcultivar las células cuando han alcanzado biomasa de fermentador final y previo a la producción de la proteína expresada en un microportador poroso o vice versa. Microportadores esféricos adecuados pueden incluir microportadores de superficie lisa, tales como Cytodex™ 1, Cytodex™ 2, y Cytodex™ 3 (GE Healthcare) y microportadores macroporosos tales como Cytopore™ 1, Cytopore™ 2, Cytoline™ 1, y Cytoline™ 2 (GE Healthcare).

10 Como se describe anteriormente, la presente invención incluye medios de cultivo celular que tienen una concentración incrementada de cobre. Se entiende que todas las modalidades y concentraciones descritas en la sección "Medios de cultivo celular" anterior pueden ser aplicados a 15 los métodos de la presente invención descritos en la presente.

En ciertas modalidades, el cultivo puede ser mantenido por al menos aproximadamente 7 días, o al menos aproximadamente 14 días, 21 días, 28 días, o al menos 20 aproximadamente 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas, 9 semanas, o al menos aproximadamente 2 meses, o 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 meses o más. La densidad celular en la cual un cultivo celular se mantiene para producción de una proteína vWF recombinante o rA13 25 recombinante dependerá de las condiciones del cultivo y medio

usado para la expresión de la proteína. Un experto en la técnica será fácilmente capaz de determinar la densidad celular óptima para producción de un cultivo celular del rVWF o rA13. En una modalidad, el cultivo se mantiene a una densidad celular de entre aproximadamente 0.5×10^6 y 4×10^7 células/mL por un periodo extendido de tiempo. En otras modalidades, la densidad celular se mantiene a una concentración de entre aproximadamente 1.0×10^6 y aproximadamente 1.0×10^7 células/mL por un periodo extendido de tiempo. En otras modalidades, la densidad celular se mantiene a una concentración de entre aproximadamente 1.0×10^6 y aproximadamente 4.0×10^6 células/mL por un periodo extendido de tiempo. En otras modalidades, la densidad celular se mantiene a una concentración de entre aproximadamente 1.0×10^6 y aproximadamente 4.0×10^6 células/mL por un periodo extendido de tiempo. En todavía otras modalidades, la densidad celular puede ser mantenida a una concentración entre aproximadamente 2.0×10^6 y aproximadamente 4.0×10^6 células/mL, o entre aproximadamente 1.0×10^6 y aproximadamente 2.5×10^6 células/mL, o entre aproximadamente 1.5×10^6 y aproximadamente 3.5×10^6 células/mL, o cualquier otro rango similar, por un periodo extendido de tiempo.

En una modalidad, la densidad celular de un cultivo celular continuo proporcionado en la presente se mantiene a una concentración de no más de 4.0×10^6 células/mL por al

menos 7 días. En una modalidad específica, la densidad celular de un cultivo celular continuo proporcionado en la presente se mantiene a una concentración de no más de 4.0×10^6 células/mL por al menos 14 días. En una modalidad más específica, la densidad celular de un cultivo celular continuo proporcionado en la presente se mantiene a una concentración de no más de 4.0×10^6 células/mL por al menos 21 días. En una modalidad todavía más específica, la densidad celular de un cultivo celular continuo proporcionado en la presente se mantiene a una concentración de no más de 4.0×10^6 células/mL por al menos 28 días. En una modalidad todavía más específica, la densidad celular de un cultivo celular continuo proporcionado en la presente se mantiene a una concentración de no más de 4.0×10^6 células/mL por al menos 5 semanas. En una modalidad todavía más específica, la densidad celular de un cultivo celular continuo proporcionado en la presente se mantiene a una concentración de no más de 4.0×10^6 células/mL por al menos 6 semanas. En una modalidad todavía más específica, la densidad celular de un cultivo celular continuo proporcionado en la presente se mantiene a una concentración de no más de 4.0×10^6 células/mL por al menos 7 semanas. En una modalidad todavía más específica, la densidad celular de un cultivo celular continuo proporcionado en la presente se mantiene a una concentración de no más de 4.0×10^6 células/mL por al menos 8 semanas. En una modalidad todavía

más específica, la densidad celular de un cultivo celular continuo proporcionado en la presente se mantiene a una concentración de no más de 4.0×10^6 células/mL por al menos 9 semanas.

5 En una modalidad, la densidad celular de un cultivo celular continuo proporcionado en la presente se mantiene a una concentración de no más de 3.5×10^6 células/mL por al menos 7 días. En una modalidad específica, la densidad celular de un cultivo celular continuo proporcionado en la
10 presente se mantiene a una concentración de no más de 3.5×10^6 células/mL por al menos 14 días. En una modalidad más específica, la densidad celular de un cultivo celular continuo proporcionado en la presente se mantiene a una concentración de no más de 3.5×10^6 células/mL por al menos 21
15 días. En una modalidad todavía más específica, la densidad celular de un cultivo celular continuo proporcionado en la presente se mantiene a una concentración de no más de 3.5×10^6 células/mL por al menos 28 días. En una modalidad todavía más específica, la densidad celular de un cultivo celular
20 continuo proporcionado en la presente se mantiene a una concentración de no más de 3.5×10^6 células/mL por al menos 5 semanas. En una modalidad todavía más específica, la densidad celular de un cultivo celular continuo proporcionado en la presente se mantiene a una concentración de no más de 3.5×10^6
25 células/mL por al menos 6 semanas. En una modalidad todavía

más específica, la densidad celular de un cultivo celular continuo proporcionado en la presente se mantiene a una concentración de no más de 3.5×10^6 células/mL por al menos 7 semanas. En una modalidad todavía más específica, la densidad celular de un cultivo celular continuo proporcionado en la presente se mantiene a una concentración de no más de 3.5×10^6 células/mL por al menos 8 semanas. En una modalidad todavía más específica, la densidad celular de un cultivo celular continuo proporcionado en la presente se mantiene a una concentración de no más de 3.5×10^6 células/mL por al menos 9 semanas.

En una modalidad, la densidad celular de un cultivo celular continuo proporcionado en la presente se mantiene a una concentración de no más de 3.0×10^6 células/mL por al menos 7 días. En una modalidad específica, la densidad celular de un cultivo celular continuo proporcionado en la presente se mantiene a una concentración de no más de 3.0×10^6 células/mL por al menos 14 días. En una modalidad más específica, la densidad celular de un cultivo celular continuo proporcionado en la presente se mantiene a una concentración de no más de 3.0×10^6 células/mL por al menos 21 días. En una modalidad todavía más específica, la densidad celular de un cultivo celular continuo proporcionado en la presente se mantiene a una concentración de no más de 3.0×10^6 células/mL por al menos 28 días. En una modalidad todavía más

específica, la densidad celular de un cultivo celular continuo proporcionado en la presente se mantiene a una concentración de no más de 3.0×10^6 células/mL por al menos 5 semanas. En una modalidad todavía más específica, la densidad celular de un cultivo celular continuo proporcionado en la presente se mantiene a una concentración de no más de 3.0×10^6 células/mL por al menos 6 semanas. En una modalidad todavía más específica, la densidad celular de un cultivo celular continuo proporcionado en la presente se mantiene a una concentración de no más de 3.0×10^6 células/mL por al menos 7 semanas. En una modalidad todavía más específica, la densidad celular de un cultivo celular continuo proporcionado en la presente se mantiene a una concentración de no más de 3.0×10^6 células/mL por al menos 8 semanas. En una modalidad todavía más específica, la densidad celular de un cultivo celular continuo proporcionado en la presente se mantiene a una concentración de no más de 3.0×10^6 células/mL por al menos 9 semanas.

En una modalidad, la densidad celular de un cultivo celular continuo proporcionado en la presente se mantiene a una concentración de no más de 2.5×10^6 células/mL por al menos 7 días. En una modalidad específica, la densidad celular de un cultivo celular continuo proporcionado en la presente se mantiene a una concentración de no más de 2.5×10^6 células/mL por al menos 14 días. En una modalidad más

específica, la densidad celular de un cultivo celular continuo proporcionado en la presente se mantiene a una concentración de no más de 2.5×10^6 células/mL por al menos 21 días. En una modalidad todavía más específica, la densidad celular de un cultivo celular continuo proporcionado en la presente se mantiene a una concentración de no más de 2.5×10^6 células/mL por al menos 28 días. En una modalidad todavía más específica, la densidad celular de un cultivo celular continuo proporcionado en la presente se mantiene a una concentración de no más de 2.5×10^6 células/mL por al menos 5 semanas. En una modalidad todavía más específica, la densidad celular de un cultivo celular continuo proporcionado en la presente se mantiene a una concentración de no más de 2.5×10^6 células/mL por al menos 6 semanas. En una modalidad todavía más específica, la densidad celular de un cultivo celular continuo proporcionado en la presente se mantiene a una concentración de no más de 2.5×10^6 células/mL por al menos 7 semanas. En una modalidad todavía más específica, la densidad celular de un cultivo celular continuo proporcionado en la presente se mantiene a una concentración de no más de 2.5×10^6 células/mL por al menos 8 semanas. En una modalidad todavía más específica, la densidad celular de un cultivo celular continuo proporcionado en la presente se mantiene a una concentración de no más de 2.5×10^6 células/mL por al menos 9 semanas.

En otra modalidad, la densidad celular de un cultivo celular continuo proporcionado en la presente se mantiene a una concentración de no más de 2.0×10^6 células/mL por al menos 7 días. En una modalidad específica, la densidad celular de un cultivo celular continuo proporcionado en la presente se mantiene a una concentración de no más de 2.0×10^6 células/mL por al menos 14 días. En una modalidad más específica, la densidad celular de un cultivo celular continuo proporcionado en la presente se mantiene a una concentración de no más de 2.0×10^6 células/mL por al menos 21 días. En una modalidad todavía más específica, la densidad celular de un cultivo celular continuo proporcionado en la presente se mantiene a una concentración de no más de 2.0×10^6 células/mL por al menos 28 días. En una modalidad todavía más específica, la densidad celular de un cultivo celular continuo proporcionado en la presente se mantiene a una concentración de no más de 2.0×10^6 células/mL por al menos 5 semanas. En una modalidad todavía más específica, la densidad celular de un cultivo celular continuo proporcionado en la presente se mantiene a una concentración de no más de 2.0×10^6 células/mL por al menos 6 semanas. En una modalidad todavía más específica, la densidad celular de un cultivo celular continuo proporcionado en la presente se mantiene a una concentración de no más de 2.0×10^6 células/mL por al menos 7 semanas. En una modalidad todavía más específica, la densidad

celular de un cultivo celular continuo proporcionado en la presente se mantiene a una concentración de no más de 2.0×10^6 células/mL por al menos 8 semanas. En una modalidad todavía más específica, la densidad celular de un cultivo celular continuo proporcionado en la presente se mantiene a una concentración de no más de 2.0×10^6 células/mL por al menos 9 semanas.

En una modalidad, la densidad celular de un cultivo celular continuo proporcionado en la presente se mantiene a una concentración de no más de 1.5×10^6 células/mL por al menos 7 días. En una modalidad específica, la densidad celular de un cultivo celular continuo proporcionado en la presente se mantiene a una concentración de no más de 1.5×10^6 células/mL por al menos 14 días. En una modalidad más específica, la densidad celular de un cultivo celular continuo proporcionado en la presente se mantiene a una concentración de no más de 1.5×10^6 células/mL por al menos 21 días. En una modalidad todavía más específica, la densidad celular de un cultivo celular continuo proporcionado en la presente se mantiene a una concentración de no más de 1.5×10^6 células/mL por al menos 28 días. En una modalidad todavía más específica, la densidad celular de un cultivo celular continuo proporcionado en la presente se mantiene a una concentración de no más de 1.5×10^6 células/mL por al menos 5 semanas. En una modalidad todavía más específica, la densidad

celular de un cultivo celular continuo proporcionado en la presente se mantiene a una concentración de no más de 1.5×10^6 células/mL por al menos 6 semanas. En una modalidad todavía más específica, la densidad celular de un cultivo celular continuo proporcionado en la presente se mantiene a una concentración de no más de 1.5×10^6 células/mL por al menos 7 semanas. En una modalidad todavía más específica, la densidad celular de un cultivo celular continuo proporcionado en la presente se mantiene a una concentración de no más de 1.5×10^6 células/mL por al menos 8 semanas. En una modalidad todavía más específica, la densidad celular de un cultivo celular continuo proporcionado en la presente se mantiene a una concentración de no más de 1.5×10^6 células/mL por al menos 9 semanas.

Lo siguiente proporciona detalles específicos en métodos para la producción del rVWF y rA13. Como se apreciará, aunque las condiciones son presentadas específicamente para rVWF o rA13, las condiciones para rVWF pueden ser usadas para producir rA13 y vice versa.

20

B. Métodos para Producir vWF Recombinante de Alto Peso Molecular

En otro aspecto, la presente invención se refiere además a métodos para producir vWF bajo condiciones de cultivo que comprenden un medio de cultivo celular que tiene

una concentración incrementada de cobre. En ciertas modalidades, el cultivo también comprende una baja concentración de amonio. Como se usa en la presente, el término "cultivo celular" y "solución de cultivo celular" son
5 usados intercambiablemente.

En una modalidad, la presente invención proporciona un método para producir un vWF recombinante, de alto peso molecular, que comprende: a) proporcionar un cultivo de células; b) introducir una secuencia de ácido nucleico
10 codificante para vWF; c) seleccionar las células que llevan la secuencia de ácido nucleico; y, d) expresar el vWF en las células bajo condiciones de cultivo que comprenden un medio de cultivo celular que comprende una concentración de cobre de al menos aproximadamente 2.4 µg/L y un sobrenadante de
15 cultivo celular que comprende una concentración de amonio menos de aproximadamente 10 mM, en donde el vWF es vWF altamente multimérico que comprende aproximadamente 14 hasta aproximadamente 22 dímeros y una actividad específica de Ristocetina de al menos aproximadamente 30 mU/ug. En
20 modalidades adicionales, el rVWF multimérico producido usando métodos de la presente invención comprende aproximadamente 10-30, 12-28, 14-26, 16-24, 18-22, 20-21 dímeros. En aún modalidades adicionales, el rVWF producido de conformidad con la presente invención tiene una actividad específica de al
25 menos aproximadamente 20, 22.5, 25, 27.5, 30, 32.5, 35, 37.5,

40, 42.5, 45, 47.5, 50, 52.5, 55, 57.5, 60, 62.5, 65, 67.5, 70, 72.5, 75, 77.5, 80, o más mU/μg. En una modalidad específica, la densidad celular del cultivo celular continuo para producción del rVWF se mantiene a una concentración de no más de 2.5×10^6 células/mL por un periodo extendido. En otras modalidades específicas, la densidad celular se mantiene a no más de 2.0×10^6 células/mL, 1.5×10^6 células/mL, 1.0×10^6 células/mL, 0.5×10^6 células/mL, o menos. En una modalidad, la densidad celular se mantiene a entre 1.5×10^6 células/mL y 2.5×10^6 células/mL.

En una modalidad, la presente invención proporciona un método para producir una composición del Factor Von Willebrand recombinante (rVWF), el método comprende las etapas de: (a) proporcionar un medio de cultivo de células basales; (b) suplementar el medio de cultivo de células basales con cobre para proporcionar una concentración de cobre final de al menos 2.0 μg/L; (c) proporcionar una o más células que comprenden un ácido nucleico que codifica una proteína del rVWF; (d) cultivar una o más células en el medio de cultivo de células suplementadas con cobre de manera que el rVWF se expresa y excreta de las células en un cultivo de sobrenadante; y (e) recuperar al menos una porción del cultivo sobrenadante, en donde el sobrenadante recuperado tiene una actividad del cofactor de ristocetina específico del rVWF de al menos 30 mU/μg del rVWF. En una modalidad, la

solución de cultivo celular comprende además una
concentración de amonio de menos de 10 mM. En otra modalidad
específica, la concentración de amonio de la solución de
cultivo celular se mantiene a una concentración de amonio de
5 no más de 10 mM por al menos 7 días. En una modalidad
preferida, la solución de cultivo celular comprende una
concentración de amonio de no más de 5 mM. En otra modalidad
específica, la concentración de amonio de la solución de
cultivo celular se mantiene a una concentración de amonio de
10 no más de 5 mM por al menos 7 días. En una modalidad
preferida, la solución de cultivo celular comprende una
concentración de amonio de no más de 4 mM. En otra modalidad
específica, la concentración de amonio del cultivo celular se
mantiene a una concentración de amonio de no más de 4 mM por
15 al menos 7 días. En todavía otras modalidades, la solución de
cultivo celular comprende una concentración de amonio de no
más de 10 mM, o no más de 9 mM, 8 mM, 7 mM, 6 mM, 5 mM, 4 mM,
3 mM, 2 mM, 1 mM, o menos. En todavía otra modalidad, la
concentración de amonio del cultivo celular se mantiene a un
20 nivel bajo por la duración del proceso (*es decir*, para el
tiempo total que el cultivo está siendo usado para producir
rVWF). En una modalidad preferida, el sobrenadante recuperado
tiene una actividad del factor de ristocetina específica del
rVWF de al menos 50 mU/ μ g del rVWF. En una modalidad más
25 preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad del

factor de ristocetina específica del rVWF de al menos 70 mU/ μ g del rVWF.

En una modalidad del método descrito anteriormente, el medio de cultivo de células basales es suplementado con
5 cobre para proporcionar una concentración de cobre final de al menos 2.4 μ g/L. En una modalidad, la solución de cultivo celular comprende además una concentración de amonio de menos de 10 mM. En otra modalidad específica, la concentración de amonio de la solución de cultivo celular se mantiene a una
10 concentración de amonio de no más de 10 mM por al menos 7 días. En una modalidad preferida, la solución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 5 mM. En otra modalidad específica, la concentración de amonio de la solución de cultivo celular se mantiene a una
15 concentración de amonio de no más de 5 mM por al menos 7 días. En una modalidad preferida, la solución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 4 mM. En otra modalidad específica, la concentración de amonio de la solución de cultivo celular se mantiene a una
20 concentración de amonio de no más de 4 mM por al menos 7 días. En todavía otras modalidades, la solución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 10 mM, o no más de 9 mM, 8 mM, 7 mM, 6 mM, 5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM, 1 mM, o menos. En todavía otra modalidad, la
25 concentración de amonio de la solución de cultivo celular se

mantiene a un nivel bajo por la duración del proceso (es decir, para el tiempo total que el cultivo está siendo usado para producir rVWF). En una modalidad preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad del factor de ristocetina específica del rVWF de al menos 50 mU/ μ g del rVWF. En una modalidad más preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad del factor de ristocetina específica del rVWF de al menos 70 mU/ μ g del rVWF.

En una modalidad del método descrito anteriormente, el medio de cultivo de células basales es suplementado con cobre para proporcionar una concentración de cobre final de al menos 3 μ g/L. En una modalidad, la solución de cultivo celular comprende además una concentración de amonio de menos de 10 mM. En otra modalidad específica, la concentración de amonio de la solución de cultivo celular se mantiene a una concentración de amonio de no más de 10 mM por al menos 7 días. En una modalidad preferida, la solución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 5 mM. En otra modalidad específica, la concentración de amonio de la solución de cultivo celular se mantiene a una concentración de amonio de no más de 5 mM por al menos 7 días. En una modalidad preferida, la solución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 4 mM. En otra modalidad específica, la concentración de amonio de la solución de cultivo celular se mantiene a una

concentración de amonio de no más de 4 mM por al menos 7 días. En todavía otras modalidades, la solución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 10 mM, o no más de 9 mM, 8 mM, 7 mM, 6 mM, 5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM, 1 mM, o menos. En todavía otra modalidad, la concentración de amonio de la solución de cultivo celular se mantiene a un nivel bajo por la duración del proceso (es decir, para el tiempo total que el cultivo está siendo usado para producir rVWF). En una modalidad preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad del factor de ristocetina específica del rVWF de al menos 50 mU/ μ g del rVWF. En una modalidad más preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad del factor de ristocetina específica del rVWF de al menos 70 mU/ μ g del rVWF.

En una modalidad del método descrito anteriormente, el medio de cultivo de células basales es suplementado con cobre para proporcionar una concentración de cobre final de al menos 4 μ g/L. En una modalidad, la solución de cultivo celular comprende además una concentración de amonio de menos de 10 mM. En otra modalidad específica, la concentración de amonio de la solución de cultivo celular se mantiene a una concentración de amonio de no más de 10 mM por al menos 7 días. En una modalidad preferida, la solución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 5 mM. En otra modalidad específica, la concentración de amonio

de la solución de cultivo celular se mantiene a una concentración de amonio de no más de 5 mM por al menos 7 días. En una modalidad preferida, la solución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 4 mM. En otra modalidad específica, la concentración de amonio de la solución de cultivo celular se mantiene a una concentración de amonio de no más de 4 mM por al menos 7 días. En todavía otras modalidades, los medios de cultivo celular comprenden una concentración de amonio de no más de 10 mM, o no más de 9 mM, 8 mM, 7 mM, 6 mM, 5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM, 1 mM, o menos. En todavía otra modalidad, la concentración de amonio de la solución de cultivo celular se mantiene a un nivel bajo por la duración del proceso (es decir, para el tiempo total que el cultivo está siendo usado para producir rVWF). En una modalidad preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad del factor de ristocetina específica del rVWF de al menos 50 mU/ μ g del rVWF. En una modalidad más preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad del factor de ristocetina específica del rVWF de al menos 70 mU/ μ g del rVWF.

En una modalidad del método descrito anteriormente, el medio de cultivo de células basales es suplementado con cobre para proporcionar una concentración final de cobre de aproximadamente 4.3 μ g/L. En una modalidad, la solución de cultivo celular comprende además una concentración de amonio

de menos de 10 mM. En otra modalidad específica, la concentración de amonio de la solución de cultivo celular se mantiene a una concentración de amonio de no más de 10 mM por al menos 7 días. En una modalidad preferida, la solución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 5 mM. En otra modalidad específica, la concentración de amonio de la solución de cultivo celular se mantiene a una concentración de amonio de no más de 5 mM por al menos 7 días. En una modalidad preferida, la solución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 4 mM. En otra modalidad específica, la concentración de amonio de la solución de cultivo celular se mantiene a una concentración de amonio de no más de 4 mM por al menos 7 días. En todavía otras modalidades, la solución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 10 mM, o no más de 9 mM, 8 mM, 7 mM, 6 mM, 5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM, 1 mM, o menos. En todavía otra modalidad, la concentración de amonio de la solución de cultivo celular se mantiene a un nivel bajo por la duración del proceso (es decir, para el tiempo total que el cultivo está siendo usado para producir rVWF). En una modalidad preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad del factor de ristocetina específica del rVWF de al menos 50 mU/ μ g del rVWF. En una modalidad más preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad del factor de ristocetina

específica del rVWF de al menos 70 mU/µg del rVWF.

En una modalidad del método descrito anteriormente, el medio de cultivo de células basales es suplementado con cobre para proporcionar una concentración final de cobre de entre 2 µg/L y 20 µg/L. En una modalidad, la solución de cultivo celular comprende además una concentración de amonio de menos de 10 mM. En otra modalidad específica, la concentración de amonio de la solución de cultivo celular se mantiene a una concentración de amonio de no más de 10 mM por al menos 7 días. En una modalidad preferida, la solución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 5 mM. En otra modalidad específica, la concentración de amonio del cultivo celular se mantiene a una concentración de amonio de no más de 5 mM por al menos 7 días. En una modalidad preferida, la solución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 4 mM. En otra modalidad específica, la concentración de amonio del cultivo celular se mantiene a una concentración de amonio de no más de 4 mM por al menos 7 días. En todavía otras modalidades, la solución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 10 mM, o no más de 9 mM, 8 mM, 7 mM, 6 mM, 5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM, 1 mM, o menos. En todavía otra modalidad, la concentración de amonio del cultivo celular se mantiene a un nivel bajo por la duración del proceso (es decir, para el tiempo total que el cultivo está siendo usado

para producir rVWF). En una modalidad preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad del factor de ristocetina específica del rVWF de al menos 50 mU/ μ g del rVWF. En una modalidad más preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad del factor de ristocetina específica del rVWF de al menos 70 mU/ μ g del rVWF.

En una modalidad del método descrito anteriormente, el medio de cultivo de células basales es suplementado con cobre para proporcionar una concentración final de cobre de entre 3 μ g/L y 10 μ g/L. En una modalidad, la solución de cultivo celular comprende además una concentración de amonio de menos de 10 mM. En otra modalidad específica, la concentración de amonio del cultivo celular se mantiene a una concentración de amonio de no más de 10 mM por al menos 7 días. En una modalidad preferida, la solución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 5 mM. En otra modalidad específica, la concentración de amonio de la solución de cultivo celular se mantiene a una concentración de amonio de no más de 5 mM por al menos 7 días. En una modalidad preferida, la solución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 4 mM. En otra modalidad específica, la concentración de amonio del cultivo celular se mantiene a una concentración de amonio de no más de 4 mM por al menos 7 días. En todavía otras modalidades, la solución de cultivo celular comprende una

concentración de amonio de no más de 10 mM, o no más de 9 mM, 8 mM, 7 mM, 6 mM, 5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM, 1 mM, o menos. En todavía otra modalidad, la concentración de amonio de la solución de cultivo celular se mantiene a un nivel bajo por la duración del proceso (es decir, para el tiempo total que el cultivo está siendo usado para producir rVWF). En una modalidad preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad del factor de ristocetina específica del rVWF de al menos 50 mU/µg del rVWF. En una modalidad más preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad del factor de ristocetina específica del rVWF de al menos 70 mU/µg del rVWF.

En una modalidad del método descrito anteriormente, el medio de cultivo de células basales es suplementado con cobre para proporcionar una concentración final de cobre de entre 4 µg/L y 7.5 µg/L. En una modalidad, la solución de cultivo celular comprende además una concentración de amonio de menos de 10 mM. En otra modalidad específica, la concentración de amonio del cultivo celular se mantiene a una concentración de amonio de no más de 10 mM por al menos 7 días. En una modalidad preferida, la solución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 5 mM. En otra modalidad específica, la concentración de amonio del cultivo celular se mantiene a una concentración de amonio de no más de 5 mM por al menos 7 días. En una modalidad

preferida, la solución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 4 mM. En otra modalidad específica, la concentración de amonio del cultivo celular se mantiene a una concentración de amonio de no más de 4 mM por al menos 7 días. En todavía otras modalidades, la solución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 10 mM, o no más de 9 mM, 8 mM, 7 mM, 6 mM, 5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM, 1 mM, o menos. En todavía otra modalidad, la concentración de amonio del cultivo celular se mantiene a un nivel bajo por la duración del proceso (es decir, para el tiempo total que el cultivo está siendo usado para producir rVWF). En una modalidad preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad del factor de ristocetina específica del rVWF de al menos 50 mU/ μ g del rVWF. En una modalidad más preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad del factor de ristocetina específica del rVWF de al menos 70 mU/ μ g del rVWF.

En una modalidad, la presente invención proporciona un método para producir una composición del Factor Von Willebrand recombinante (rVWF), el método comprende las etapas de: (a) proporcionar un medio de cultivo de células basales; (b) suplementar el medio de cultivo de células basales con cobre; (c) proporcionar una o más células que comprenden un ácido nucleico que codifica una proteína del rVWF; (d) cultivar una o más células en el medio de cultivo

de células suplementadas con cobre de manera que el rVWF se expresa y excreta de las células en un cultivo de sobrenadante; y (e) recuperar al menos una porción del cultivo sobrenadante, en donde la concentración de NH_4^+ del sobrenadante se mantiene a un bajo nivel por al menos 7 días, y además en donde el sobrenadante recuperado tiene una actividad del cofactor de ristocetina específico del rVWF de al menos 30 mU/ μg del rVWF. En una modalidad específica, la concentración de cobre y concentración de NH_4^+ de la solución de cultivo celular se mantiene a una concentración de conformidad con cualquiera de las variaciones 1 a 440, como se expone en la **Tabla 1**. En una modalidad preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad del factor de ristocetina específica del rVWF de al menos 50 mU/ μg del rVWF. En una modalidad más preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad del factor de ristocetina específica del rVWF de al menos 70 mU/ μg del rVWF.

En una modalidad del método descrito anteriormente, la concentración de cobre y concentración de NH_4^+ del cultivo celular se mantiene a una concentración de conformidad con cualquiera de las variaciones 1 a 440, como se expone en la **Tabla 1** por al menos 14 días. En una modalidad preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad del factor de ristocetina específica del rVWF de al menos 50 mU/ μg del rVWF. En una modalidad más preferida, el sobrenadante

recuperado tiene una actividad del factor de ristocetina específica del rVWF de al menos 70 mU/μg del rVWF.

En una modalidad del método descrito anteriormente, la concentración de cobre y concentración de NH₄⁺ del cultivo celular se mantiene a una concentración de conformidad con cualquiera de las variaciones 1 a 440, como se expone en la **Tabla 1** por al menos 21 días. En una modalidad preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad del factor de ristocetina específica del rVWF de al menos 50 mU/μg del rVWF. En una modalidad más preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad del factor de ristocetina específica del rVWF de al menos 70 mU/μg del rVWF.

En una modalidad del método descrito anteriormente, la concentración de cobre y concentración de NH₄⁺ del cultivo celular se mantiene a una concentración de conformidad con cualquiera de las variaciones 1 a 440, como se expone en la **Tabla 1** por al menos 28 días. En una modalidad preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad del factor de ristocetina específica del rVWF de al menos 50 mU/μg del rVWF. En una modalidad más preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad del factor de ristocetina específica del rVWF de al menos 70 mU/μg del rVWF.

En una modalidad del método descrito anteriormente, la concentración de cobre y concentración de NH₄⁺ del cultivo celular se mantiene a una concentración de conformidad con

cualquiera de las variaciones 1 a 440, como se expone en la **Tabla 1** por al menos 5 semanas. En una modalidad preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad del factor de ristocetina específica del rVWF de al menos 50 mU/ μ g del rVWF. En una modalidad más preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad del factor de ristocetina específica del rVWF de al menos 70 mU/ μ g del rVWF.

En una modalidad del método descrito anteriormente, la concentración de cobre y concentración de NH_4^+ del cultivo celular se mantiene a una concentración de conformidad con cualquiera de las variaciones 1 a 440, como se expone en la **Tabla 1** por al menos 6 semanas. En una modalidad preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad del factor de ristocetina específica del rVWF de al menos 50 mU/ μ g del rVWF. En una modalidad más preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad del factor de ristocetina específica del rVWF de al menos 70 mU/ μ g del rVWF.

En una modalidad del método descrito anteriormente, la concentración de cobre y concentración de NH_4^+ del cultivo celular se mantiene a una concentración de conformidad con cualquiera de las variaciones 1 a 440, como se expone en la **Tabla 1** por al menos 7 semanas. En una modalidad preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad del factor de ristocetina específica del rVWF de al menos 50 mU/ μ g del rVWF. En una modalidad más preferida, el sobrenadante

recuperado tiene una actividad del factor de ristocetina específica del rVWF de al menos 70 mU/µg del rVWF.

En una modalidad del método descrito anteriormente, la concentración de cobre y concentración de NH₄⁺ del cultivo celular se mantiene a una concentración de conformidad con cualquiera de las variaciones 1 a 440, como se expone en la **Tabla 1** por al menos 8 semanas. En una modalidad preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad del factor de ristocetina específica del rVWF de al menos 50 mU/µg del rVWF. En una modalidad más preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad del factor de ristocetina específica del rVWF de al menos 70 mU/µg del rVWF.

En una modalidad del método descrito anteriormente, la concentración de cobre y concentración de NH₄⁺ del cultivo celular se mantiene a una concentración de conformidad con cualquiera de las variaciones 1 a 440, como se expone en la **Tabla 1** por al menos 9 semanas. En una modalidad preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad del factor de ristocetina específica del rVWF de al menos 50 mU/µg del rVWF. En una modalidad más preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad del factor de ristocetina específica del rVWF de al menos 70 mU/µg del rVWF.

En una modalidad, la presente invención proporciona un método para producir una composición del Factor Von Willebrand recombinante (rVWF), el método comprende las

etapas de: (a) proporcionar un medio de cultivo de células basales; (b) suplementar el medio de cultivo de células basales con cobre para proporcionar una concentración de cobre final de al menos 2.0 µg/L; (c) proporcionar una o más células que comprenden un ácido nucleico que codifica una proteína del rvWF; (d) cultivar una o más células en el medio de cultivo de células suplementadas con cobre de manera que el rvWF se expresa y excreta de las células en un cultivo de sobrenadante; (e) monitorear la concentración de amonio del sobrenadante del cultivo; y (f) recuperar al menos una porción del cultivo sobrenadante, en donde el sobrenadante del cultivo que comprende una concentración de amonio de más de 10 mM no se usa para producir la composición del rvWF, y además en donde el sobrenadante recuperado tiene una actividad del cofactor de ristocetina específico del rvWF de al menos 30 mU/µg del rvWF. En ciertas modalidades, la concentración final de cobre del medio de cultivo basal suplementado es al menos 2.4 µg/L, 3 µg/L, 4 µg/L, 5 µg/L, 6 µg/L, 7 µg/L, 8 µg/L, 9 µg/L, 10 µg/L, 15 µg/L, 20 µg/L, o superior. En otras modalidades, la concentración final de cobre del medio de cultivo basal suplementado es entre 2-20 µg/L, 2-10 µg/L, 3-8 µg/L, o 4-6 µg/L. En una modalidad preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad del factor de ristocetina específica del rvWF de al menos 50 mU/µg del rvWF. En una modalidad más preferida, el

sobrenadante recuperado tiene una actividad del factor de ristocetina específica del rVWF de al menos 70 mU/ μ g del rVWF.

En una modalidad del método descrito anteriormente,
5 el sobrenadante del cultivo que comprende una concentración de amonio de más de 6 mM no se usa para producir la composición del rVWF. En ciertas modalidades, la concentración final de cobre del medio de cultivo basal suplementado es al menos 2.4 μ g/L, 3 μ g/L, 4 μ g/L, 5 μ g/L, 6
10 μ g/L, 7 μ g/L, 8 μ g/L, 9 μ g/L, 10 μ g/L, 15 μ g/L, 20 μ g/L, o superior. En otras modalidades, la concentración final de cobre del medio de cultivo basal suplementado es entre 2-20 μ g/L, 2-10 μ g/L, 3-8 μ g/L, o 4-6 μ g/L. En una modalidad preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad del
15 factor de ristocetina específica del rVWF de al menos 50 mU/ μ g del rVWF. En una modalidad más preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad del factor de ristocetina específica del rVWF de al menos 70 mU/ μ g del rVWF.

20 En una modalidad del método descrito anteriormente, el sobrenadante del cultivo que comprende una concentración de amonio de más de 5 mM no se usa para producir la composición del rVWF. En ciertas modalidades, la concentración final de cobre del medio de cultivo basal
25 suplementado es al menos 2.4 μ g/L, 3 μ g/L, 4 μ g/L, 5 μ g/L, 6

µg/L, 7 µg/L, 8 µg/L, 9 µg/L, 10 µg/L, 15 µg/L, 20 µg/L, o superior. En otras modalidades, la concentración final de cobre del medio de cultivo basal suplementado es entre 2-20 µg/L, 2-10 µg/L, 3-8 µg/L, o 4-6 µg/L. En una modalidad preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad del factor de ristocetina específica del rVWF de al menos 50 mU/µg del rVWF. En una modalidad más preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad del factor de ristocetina específica del rVWF de al menos 70 mU/µg del rVWF.

En una modalidad del método descrito anteriormente, el sobrenadante del cultivo que comprende una concentración de amonio de más de 4 mM no se usa para producir la composición del rVWF. En ciertas modalidades, la concentración final de cobre del medio de cultivo basal suplementado es al menos 2.4 µg/L, 3 µg/L, 4 µg/L, 5 µg/L, 6 µg/L, 7 µg/L, 8 µg/L, 9 µg/L, 10 µg/L, 15 µg/L, 20 µg/L, o superior. En otras modalidades, la concentración final de cobre del medio de cultivo basal suplementado es entre 2-20 µg/L, 2-10 µg/L, 3-8 µg/L, o 4-6 µg/L. En una modalidad preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad del factor de ristocetina específica del rVWF de al menos 50 mU/µg del rVWF. En una modalidad más preferida, el sobrenadante recuperado tiene una actividad del factor de ristocetina específica del rVWF de al menos 70 mU/µg del

rVWF.

El vWF recombinante puede ser producido por expresión en un sistema hospedero eucariótico adecuado. Ejemplos de células eucarióticas 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 modalidad, el vWF puede ser expresado en células de levadura, células de insecto, células de ave, células de mamífero y similares. Por ejemplo, en una línea de células humanas, una línea de células de hámster, o una línea de células murinas. En una modalidad particular, la línea de células es una línea de células CHO, BHK, o HEK. Típicamente, células de mamífero, por ejemplo, células CHO de una línea de células continua, pueden ser usadas para expresar el vWF de la presente invención.

En ciertas modalidades, la secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia codificante para el vWF puede ser un vector. El vector puede ser suministrado por un virus o puede ser un plásmido. La secuencia de ácido nucleico codificante para la proteína puede ser un gen específico o una parte biológicamente funcional del mismo. En una modalidad, la proteína es al menos una parte biológicamente activa del vWF.

Una amplia variedad de vectores puede ser usada para la expresión del vWF y se puede seleccionar de vectores de expresión eucarióticos. Ejemplos de vectores para expresión eucariótica incluyen: (i) para expresión en levadura, vectores tales como pAO, pPIC, pYES, pMET, usando promotores tales como AOX1, GAP, GAL1, AUG1, etc; (ii) para expresión en células de insecto, vectores tales como pMT, pAc5, pIB, pMIB, pBAC, etc., usando promotores tales como PH, p10, MT, Ac5, OpIE2, gp64, polh, etc., y (iii) para expresión en células de mamífero, vectores tales como pSVL, pCMV, pRc/RSV, pcDNA3, pBPV, etc., y vectores derivados de sistemas virales tales como virus vaccinia, virus adeno asociados, virus del herpes, retrovirus, etc., usando promotores tales como CMV, SV40, EF-1, UbC, RSV, ADV, BPV, y β -actina. Un vector ejemplar para expresión del rVWF se describe por Kaufman et al. (Mol Cell Biol. 1989 Mar;9(3):1233-42), el contenido del cual está de este modo incorporado por referencia en su totalidad para todos los propósitos.

En algunas modalidades de la presente invención, la secuencia de ácido nucleico comprende además otras secuencias adecuadas para una expresión controlada de una proteína tales como secuencias promotoras, intensificadores, cuadros TATA, sitios de inicio de la transcripción, polienlazadores, sitios de restricción, poli-A-secuencias, secuencias de procesamiento de proteína, marcadores de selección, y

similares los cuales son en general conocidos para una persona de habilidad ordinaria en la técnica.

Además de los medios de cultivo celular que comprenden una concentración incrementada de cobre, las condiciones de cultivo celular de la presente invención pueden incluir una concentración de amonio de menos de aproximadamente 25 mM a través de un proceso corriente arriba completo en sistemas de cultivo. En una modalidad, las condiciones de cultivo celular incluyen una concentración de amonio de menos de aproximadamente 25 mM, en otra modalidad menos de aproximadamente 20 mM, en todavía otra modalidad menos de aproximadamente 15 mM, en todavía otra modalidad menos de aproximadamente 10 mM, y en una modalidad adicional menos de aproximadamente 5 mM.

En algunas modalidades, las concentraciones de amonio de la presente invención se mantienen constantes a través del proceso corriente arriba completo del sistema de cultivo celular. Las células usadas de conformidad con la presente invención pueden ser cultivadas, por ejemplo, por métodos que son modificados comparados con cultivos de lote y cultivos de lote alimentado convencionales, cada uno de los cuales son en general conocidos en el campo. Sin embargo, tales técnicas convencionales pueden producir altas concentraciones de amonio al final del cultivo. Los métodos de la presente invención superan este problema empleando

sistemas de producción que pueden proporcionar un suministro continuo del medio de cultivo a través de técnicas tales como, por ejemplo, cultivos de perfusión o quimiostáticos. Después del cultivo de las células hospederas, el vWF puede ser recuperado del medio agotado usando metodologías estándares, tales como ultrafiltración o centrifugación. Si se desea, el vWF puede ser purificado mediante, por ejemplo, intercambio iónico y/o cromatografía de exclusión de tamaño y similares.

Un cultivo continuo (por ejemplo, un cultivo de perfusión o quimiostático) puede ser un cultivo de suspensión que es continuamente aplicado con nutrientes por el flujo de entrada del medio fresco, en donde el volumen del cultivo es usualmente constante. De manera similar, la fermentación continua puede referirse a un proceso en el cual las células o micro-organismos se mantienen en cultivo en la fase de crecimiento exponencial por la adición continua de medio fresco que es exactamente balanceado por la remoción de la suspensión celular del biorreactor. Además, un sistema de reactor de tanque agitado puede ser usado para cultivos de suspensión, perfusión, quimiostático y/o microportador. En general, el sistema de reactor de tanque agitado puede ser operado como cualquier reactor de tanque agitado convencional con cualquier tipo de agitador tal como un Rushton, hidrodeshlizador, hoja aguda o marino.

**C. Métodos para Producir ADAMTS13 recombinantes
(A13)**

En otro aspecto, la presente invención se refiere además a métodos para producir rA13 bajo condiciones de cultivo que comprenden un medio de cultivo celular que tienen una concentración incrementada de cobre. En ciertas modalidades, el cultivo también comprende una baja concentración de amonio.

En una modalidad, la presente invención proporciona un método para producir una composición de ADAMTS13 recombinante (rA13), el método comprende las etapas de: (a) proporcionar un medio de cultivo de células basales; (b) suplementar el medio de cultivo de células basales con cobre para proporcionar una concentración de cobre final de al menos 1.0 µg/L; (c) proporcionar una o más células que comprenden un ácido nucleico que codifica una proteína rA13; (d) cultivar una o más células en el medio de cultivo celular suplementado con cobre de manera que la rA13 se expresa y excreta de las células en un cultivo de sobrenadante; y (e) recuperar al menos una porción del cultivo sobrenadante, en donde al menos 1500 Unidades de actividad del FRETS-VWF73 por litro de medio de cultivo de células basales suplementado por día (es decir, 1500 Unidades de actividad del FRETS-VWF73 por día por litro de cultivo celular; P FRETS) está presente en el sobrenadante del cultivo recuperado. En ciertas

modalidades, la concentración final de cobre del medio de cultivo basal suplementado es al menos 2 µg/L, 3 µg/L, 4 µg/L, 5 µg/L, 6 µg/L, o superior. En otras modalidades, la concentración final de cobre del medio de cultivo basal
5 suplementado es entre 1-6 µg/L, 2-5 µg/L, 2-4 µg/L, o 3-4 µg/L. En una modalidad preferida, al menos 2000 Unidades de actividad del FRETs-VWF73 por litro de medio de cultivo de células basales suplementado por día están presentes en el sobrenadante de cultivo recuperado. En una modalidad más
10 preferida, al menos 2500 Unidades de actividad del FRETs-VWF73 por litro de medio de cultivo de células basales suplementado por día están presentes en el sobrenadante de cultivo recuperado. En una modalidad muy preferida, al menos 3000 Unidades de actividad de FRETs-VWF73 por litro de medio
15 de cultivo de células basales suplementado por día están presentes en el sobrenadante de cultivo recuperado. En ciertas modalidades, los métodos proporcionan productividad de FRETs-VWF73 volumétrica sosteniblemente mejorada (P FRETs). Por ejemplo, en ciertas modalidades, al menos 1500
20 Unidades de actividad del FRETs-VWF73 por litro de medio de cultivo de células basales suplementado se recuperan diariamente por al menos 7 días, o al menos 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, o más días. En una modalidad preferida, al menos 2000 Unidades de actividad del FRETs-VWF73 por litro
25 de medio de cultivo de células basales suplementado se

recuperan diariamente por al menos 7 días, o al menos 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, o más días. En una modalidad más preferida, al menos 2500 Unidades de actividad del FRETs-VWF73 por litro de medio de cultivo de células basales suplementado se recuperan diariamente por al menos 7 días, o al menos 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, o más días. En una modalidad muy preferida, al menos 3000 Unidades de actividad de FRETs-VWF3 por litro de medio de cultivo de células basales suplementado se recuperan diariamente por al menos 7 días, o al menos 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, o más días. En una modalidad específica, la densidad celular del cultivo celular continuo para producción de rA13 se mantiene a una concentración de no más de 4.0×10^6 células/mL por un periodo extendido. En otras modalidades específicas, la densidad celular se mantiene a no más de 3.5×10^6 células/mL, 3.0×10^6 células/mL, 2.5×10^6 células/mL, 2.0×10^6 células/mL, 1.5×10^6 células/mL, 1.0×10^6 células/mL, o menos. En una modalidad, la densidad celular se mantiene a entre 3.0×10^6 células/mL y 4.0×10^6 células/mL.

En una modalidad de los métodos descritos anteriormente, el sobrenadante recuperado tiene al menos 4 Unidades de actividad de FRETs-VWF3 por mL de sobrenadante (FRETs). En una modalidad preferida, el sobrenadante recuperado tiene al menos 6 Unidades de actividad de FRETs-VWF3 por mL de sobrenadante. En una modalidad más preferida,

el sobrenadante recuperado tiene al menos 8 Unidades de actividad de FRETs-VWF3 por mL de sobrenadante. En una modalidad muy preferida, el sobrenadante recuperado tiene al menos 10 Unidades de actividad de FRETs-VWF3 por mL de sobrenadante. En ciertas modalidades, los métodos proporcionan producción de FRETs sustancialmente mejorada. Por ejemplo, en ciertas modalidades, sobrenadantes que tienen al menos 4 Unidades de actividad de FRETs-VWF3 por mL son recuperados diariamente por al menos 7 días, o al menos 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, o más días. En una modalidad preferida, sobrenadantes que tienen al menos 6 Unidades de actividad de FRETs-VWF3 por mL son recuperados diariamente por al menos 7 días, o al menos 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, o más días. En una modalidad más preferida, sobrenadantes que tienen al menos 8 Unidades de actividad de FRETs-VWF3 por mL son recuperados diariamente por al menos 7 días, o al menos 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, o más días. En una modalidad muy preferida, sobrenadantes que tienen al menos 10 Unidades de actividad de FRETs-VWF3 por mL son recuperados diariamente por al menos 7 días, o al menos 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, o más días.

En una modalidad de los métodos descritos anteriormente, el cultivo celular resulta en la producción de al menos 800 mU de actividad de FRETs-VWF73 por 10^6 células presentes en el cultivo por día (es decir, q FRETs). En una

modalidad preferida, el cultivo celular resulta en la producción de al menos 1 U de actividad de FRETs-VWF73 por 10^6 células presentes en el cultivo por día. En una modalidad más preferida, el cultivo celular resulta en la producción de al menos 1.2 U de actividad de FRETs-VWF73 por 10^6 células presentes en el cultivo por día. En una modalidad muy preferida, el cultivo celular resulta en la producción de al menos 1.4 U de actividad de FRETs-VWF73 por 10^6 células presentes en el cultivo por día. En ciertas modalidades, los métodos proporcionan productividad de FRETs-VWF73 específica de la célula sosteniblemente mejorada (q FRETs). Por ejemplo, en ciertas modalidades, el cultivo celular resulta en la producción de al menos 800 mU de actividad de FRETs-VWF73 por 10^6 células presentes en el cultivo diariamente por al menos 7 días, o al menos 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, o más días. En una modalidad preferida, el cultivo celular resulta en la producción de al menos 1 U de actividad de FRETs-VWF73 por 10^6 células presentes en el cultivo diariamente por al menos 7 días, o al menos 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, o más días. En una modalidad más preferida, el cultivo celular resulta en la producción de al menos 1.2 U de actividad de FRETs-VWF73 por 10^6 células presentes en el cultivo diariamente por al menos 7 días, o al menos 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, o más días. En una modalidad muy preferida, el cultivo celular resulta en la producción de al

menos 1.4 U de actividad de FRET5-VWF73 por 10^6 células presentes en el cultivo diariamente por al menos 7 días, o al menos 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, o más días.

En una modalidad de los métodos descritos anteriormente, el cultivo celular resulta en la producción de al menos 1 mg rA13, como se mide por ELISA, por litro de cultivo por día (P ELISA). En una modalidad preferida, el cultivo celular resulta en la producción de al menos 1.5 mg rA13, como se mide por ELISA, por litro de cultivo por día.

En una modalidad más preferida, el cultivo celular resulta en la producción de al menos 2 mg rA13, como se mide por ELISA, por litro de cultivo por día. En ciertas modalidades, los métodos proporcionan producción de rA13 sosteniblemente mejorada. Por ejemplo, en ciertas modalidades, el cultivo celular resulta en la producción de al menos 1 mg rA13, como se mide por ELISA, por litro de cultivo diariamente por al menos 7 días, o al menos 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, o más días. En una modalidad preferida, el cultivo celular resulta en la producción de al menos 1.5 mg rA13, como se mide por ELISA, por litro de cultivo diariamente por al menos 7 días, o al menos 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, o más días. En una modalidad más preferida, el cultivo celular resulta en la producción de al menos 2 mg rA13, como se mide por ELISA, por litro de cultivo diariamente por al menos 7 días, o al menos 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, o más

días.

En una modalidad de los métodos descritos anteriormente, el cultivo celular resulta en la producción de al menos 0.5 µg de rA13, como se mide por ELISA, por 10⁶ células presentes en el cultivo por día (es decir, q ELISA). En una modalidad preferida, el cultivo celular resulta en la producción de al menos 0.7 µg de rA13, como se mide por ELISA, por 10⁶ células presentes en el cultivo por día. En una modalidad más preferida, el cultivo celular resulta en la producción de al menos 0.9 µg de rA13, como se mide por ELISA, por 10⁶ células presentes en el cultivo por día. En ciertas modalidades, los métodos proporcionan producción de q ELISA sosteniblemente mejorada. Por ejemplo, en ciertas modalidades, el cultivo celular resulta en la producción de al menos 0.5 µg de rA13, como se mide por ELISA, por 10⁶ células presentes en el cultivo diariamente por al menos 7 días, o al menos 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, o más días. En una modalidad preferida, el cultivo celular resulta en la producción de al menos 0.7 µg de rA13, como se mide por ELISA, por 10⁶ células presentes en el cultivo diariamente por al menos 7 días, o al menos 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, o más días. En una modalidad más preferida, el cultivo celular resulta en la producción de al menos 0.9 µg de rA13, como se mide por ELISA, por 10⁶ células presentes en el cultivo diariamente por al menos 7 días, o al menos 14,

21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, o más días.

En una modalidad de los métodos descritos anteriormente, el sobrenadante recuperado tiene al menos 3 μg de rA13, como se mide por ELISA, por mL de sobrenadante. En una modalidad preferida, el sobrenadante recuperado tiene al menos 4 μg de rA13, como se mide por ELISA, por mL de sobrenadante. En una modalidad más preferida, el sobrenadante recuperado tiene al menos 5 μg de rA13, como se mide por ELISA, por mL de sobrenadante. En una modalidad muy preferida, el sobrenadante recuperado tiene al menos 6 μg de rA13, como se mide por ELISA, por mL de sobrenadante. En ciertas modalidades, los métodos proporcionan producción de rA13 sosteniblemente mejorada. Por ejemplo, en ciertas modalidades, sobrenadantes que tienen al menos 3 μg de rA13 por mL son recuperados diariamente por al menos 7 días, o al menos 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, o más días. En una modalidad preferida, sobrenadantes que tienen al menos 4 μg de rA13 por mL son recuperados diariamente por al menos 7 días, o al menos 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, o más días. En una modalidad más preferida, sobrenadantes que tienen al menos 5 μg de rA13 por mL son recuperados diariamente por al menos 7 días, o al menos 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, o más días. En una modalidad muy preferida, sobrenadantes que tienen al menos 6 μg de rA13 por mL son recuperados diariamente por al menos 7 días, o al

menos 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, o más días.

En una modalidad de los métodos descritos anteriormente, la solución de cultivo celular comprende además una concentración de amonio de menos de 10 mM. En otra
5 modalidad específica, la concentración de amonio del cultivo celular se mantiene a una concentración de amonio de no más de 10 mM por al menos 7 días. En una modalidad preferida, la solución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 5 mM. En otra modalidad específica, la
10 concentración de amonio del cultivo celular se mantiene a una concentración de amonio de no más de 5 mM por al menos 7 días. En una modalidad preferida, la solución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 4 mM. En otra modalidad específica, la concentración de amonio
15 del cultivo celular se mantiene a una concentración de amonio de no más de 4 mM por al menos 7 días. En todavía otras modalidades, la solución de cultivo celular comprende una concentración de amonio de no más de 10 mM, o no más de 9 mM, 8 mM, 7 mM, 6 mM, 5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM, 1 mM, o menos. En
20 todavía otra modalidad, la concentración de amonio del cultivo celular se mantiene a un nivel bajo por la duración del proceso (*es decir*, para el tiempo total que el cultivo está siendo usado para producir rA13). En una modalidad particular, la solución del cultivo tiene una concentración
25 de cobre y amonio de conformidad con cualquiera de las

variaciones 1 a 440, como se proporciona en la **Tabla 1**.

En una modalidad, la presente invención proporciona un método para producir una composición de ADAMTS13 recombinante (rA13), el método comprende las etapas de: (a) proporcionar un medio de cultivo de células basales; (b) suplementar el medio de cultivo de células basales con cobre y zinc; (c) proporcionar una o más células que comprenden un ácido nucleico que codifica una proteína rA13; (d) cultivar una o más células en el medio de cultivo celular suplementado con cobre de manera que la rA13 se expresa y excreta de las células en un cultivo de sobrenadante; y (e) recuperar al menos una porción del cultivo sobrenadante, en donde al menos 1500 Unidades de actividad del FRETs-VWF73 por litro de medio de cultivo de células basales suplementado por día están presentes en el sobrenadante de cultivo recuperado. En una modalidad, el medio de cultivo contiene al menos 1 µg/L de cobre y al menos 2 µM de zinc. En otras modalidades, el medio contiene al menos 2 µg/L de cobre o al menos 4 µg/L de cobre. En una modalidad en donde el medio es suplementado con cobre, el medio de cultivo también contiene al menos en o aproximadamente 5 µM de zinc. En una modalidad, el medio de cultivo también contiene en o aproximadamente entre 2 µM y 12 µM de zinc. En otra modalidad, el medio de cultivo también contiene en o aproximadamente entre 5 µM y 12 µM de zinc. En todavía otras modalidades, el medio de cultivo también pueden

contener al menos en o aproximadamente 2 μ M, o al menos en 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, 13 μ M, 14 μ M, 15 μ M, 20 μ M, 25 μ M, 30 μ M, o más zinc. En una modalidad, el medio de cultivo contiene una
5 concentración de cobre y zinc de conformidad con cualquiera de las variaciones 441 a 880, como se expone en la **Tabla 2**. En una modalidad preferida, al menos 2000 Unidades de actividad del FRETTS-VWF73 por litro de medio de cultivo de células basales suplementado por día están presentes en el
10 sobrenadante de cultivo recuperado. En una modalidad más preferida, al menos 2500 Unidades de actividad del FRETTS-VWF73 por litro de medio de cultivo de células basales suplementado por día están presentes en el sobrenadante de cultivo recuperado. En una modalidad muy preferida, al menos
15 3000 Unidades de actividad de FRETTS-VWF3 por litro de medio de cultivo de células basales suplementado por día están presentes en el sobrenadante de cultivo recuperado.

En una modalidad, la presente invención proporciona un método para producir una composición de ADAMTS13
20 recombinante (rA13), el método comprende las etapas de: (a) proporcionar un medio de cultivo de células basales; (b) suplementar el medio de cultivo de células basales con cobre y calcio; (c) proporcionar una o más células que comprenden un ácido nucleico que codifica una proteína rA13; (d)
25 cultivar una o más células en el medio de cultivo celular

suplementado con cobre de manera que la rA13 se expresa y excreta de las células en un cultivo de sobrenadante; y (e) recuperar al menos una porción del cultivo sobrenadante, en donde al menos 1500 Unidades de actividad del FRETS-VWF73 por litro de medio de cultivo de células basales suplementado por día están presentes en el sobrenadante de cultivo recuperado. En una modalidad, el medio de cultivo contiene al menos 1 µg/L de cobre y al menos 0.5 mM de calcio. En otras modalidades, el medio contiene al menos 2 µg/L de cobre o al menos 4 µg/L de cobre. En otra modalidad en donde el medio es suplementado con cobre, el medio de cultivo también contiene al menos 1.5 mM de calcio. En una modalidad, el medio de cultivo contiene en o aproximadamente entre 0.5 mM y 1.5 mM de calcio. En todavía otras modalidades, el medio de cultivo pueden contener al menos en o aproximadamente 0.5 mM, o al menos en 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 calcio. En una modalidad, el medio de cultivo contiene una concentración de cobre y calcio de conformidad con cualquiera de las variaciones 881 a 1320, como se expone en la **Tabla 3**. En una modalidad preferida, al menos 2000 Unidades de actividad del FRETS-VWF73 por litro de medio de cultivo de células basales suplementado por día están presentes en el sobrenadante de

cultivo recuperado. En una modalidad más preferida, al menos 2500 Unidades de actividad del FRETs-VWF73 por litro de medio de cultivo de células basales suplementado por día están presentes en el sobrenadante de cultivo recuperado. En una
5 modalidad muy preferida, al menos 3000 Unidades de actividad de FRETs-VWF3 por litro de medio de cultivo de células basales suplementado por día están presentes en el sobrenadante de cultivo recuperado.

En una modalidad, la presente invención proporciona
10 un método para producir una composición de ADAMTS13 recombinante (rA13), el método comprende las etapas de: (a) proporcionar un medio de cultivo de células basales; (b) suplementar el medio de cultivo de células basales con cobre, zinc, y calcio; (c) proporcionar una o más células que
15 comprenden un ácido nucleico que codifica una proteína rA13; (d) cultivar una o más células en el medio de cultivo celular suplementado con cobre de manera que la rA13 se expresa y excreta de las células en un cultivo de sobrenadante; y (e) recuperar al menos una porción del cultivo sobrenadante, en
20 donde al menos 1500 Unidades de actividad del FRETs-VWF73 por litro de medio de cultivo de células basales suplementado por día están presentes en el sobrenadante de cultivo recuperado. En una modalidad, el medio de cultivo tiene una concentración de calcio de al menos 0.5 mM y una concentración de cobre y
25 zinc de conformidad con cualquiera de las variaciones 441 a

880, como se expone en la **Tabla 2**. En otra modalidad específica, el medio de cultivo tiene una concentración de calcio de al menos 1.5 mM y una concentración de cobre y zinc de conformidad con cualquiera de las variaciones 441 a 880, como se expone en la **Tabla 2**. En otra modalidad específica, el medio de cultivo tiene una concentración de calcio entre 0.5 mM y 1.5 mM y una concentración de cobre y zinc de conformidad con cualquiera de las variaciones 441 a 880, como se expone en la **Tabla 2**. En todavía otras modalidades, el medio de cultivo tiene una concentración de calcio de al menos 0.6 mM, 0.7 mM, 0.8 mM, 0.9 mM, 1.0 mM, 1.1 mM, 1.2 mM, 1.3 mM, 1.4 mM, 1.5 mM, 1.6 mM, 1.7 mM, 1.8 mM, 1.9 mM, 2.0 mM, 2.25 mM, 2.5 mM, 2.75 mM, 3.0 mM, 3.5 mM, 4.0 mM, 4.5 mM, 5.0 mM, o más, y una concentración de cobre y zinc de conformidad con cualquiera de las variaciones 441 a 880, como se expone en la **Tabla 2**. En una modalidad preferida, al menos 2000 Unidades de actividad del FRETs-VWF73 por litro de medio de cultivo de células basales suplementado por día están presentes en el sobrenadante de cultivo recuperado. En una modalidad más preferida, al menos 2500 Unidades de actividad del FRETs-VWF73 por litro de medio de cultivo de células basales suplementado por día están presentes en el sobrenadante de cultivo recuperado. En una modalidad muy preferida, al menos 3000 Unidades de actividad de FRETs-VWF3 por litro de medio de cultivo de células basales suplementado

por día están presentes en el sobrenadante de cultivo recuperado.

En una modalidad, la presente invención proporciona un método para producir una composición de ADAMTS13 recombinate (rA13), el método comprende las etapas de: (a) proporcionar un medio de cultivo de células basales; (b) suplementar el medio de cultivo de células basales con cobre y nicotinamida; (c) proporcionar una o más células que comprenden un ácido nucleico que codifica una proteína rA13; (d) cultivar una o más células en el medio de cultivo celular suplementado con cobre de manera que la rA13 se expresa y excreta de las células en un cultivo de sobrenadante; y (e) recuperar al menos una porción del cultivo sobrenadante, en donde al menos 1500 Unidades de actividad del FRETS-VWF73 por litro de medio de cultivo de células basales suplementado por día están presentes en el sobrenadante de cultivo recuperado. En una modalidad, el medio de cultivo contiene al menos 1 µg/L de cobre y al menos 2 mg/L de nicotinamida (vitamina B3). En otras modalidades, el medio contiene al menos 2 µg/L de cobre o al menos 4 µg/L de cobre. En otra modalidad en donde el medio es suplementado con cobre, el medio de cultivo también contiene al menos 7 mg/L de nicotinamida (vitamina B3). En una modalidad, el medio de cultivo contiene en o aproximadamente entre 2 mg/L y 10 mg/L de nicotinamida (vitamina B3). En todavía otras modalidades, el medio de

cultivo pueden contener al menos en 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 superior concentraciones of nicotinamida (vitamina B3). En una modalidad, el medio de cultivo contiene una concentración de cobre y nicotinamida de conformidad con cualquiera de las variaciones 1321 a 1760, como se expone en la **Tabla 4**. En una modalidad preferida, al menos 2000 Unidades de actividad del FRETs-VWF73 por litro de medio de cultivo de células basales suplementado por día están presentes en el sobrenadante de cultivo recuperado. En una modalidad más preferida, al menos 2500 Unidades de actividad del FRETs-VWF73 por litro de medio de cultivo de células basales suplementado por día están presentes en el sobrenadante de cultivo recuperado. En una modalidad muy preferida, al menos 3000 Unidades de actividad de FRETs-VWF3 por litro de medio de cultivo de células basales suplementado por día están presentes en el sobrenadante de cultivo recuperado.

En una modalidad, la presente invención proporciona un método para producir una composición de ADAMTS13 recombinante (rA13), el método comprende las etapas de: (a) proporcionar un medio de cultivo de células basales; (b) suplementar el medio de cultivo de células basales con cobre, zinc, y nicotinamida; (c) proporcionar una o más células que comprenden un ácido nucleico que codifica una proteína rA13;

(d) cultivar una o más células en el medio de cultivo celular suplementado con cobre de manera que la rA13 se expresa y excreta de las células en un cultivo de sobrenadante; y (e) recuperar al menos una porción del cultivo sobrenadante, en donde al menos 1500 Unidades de actividad del FRETs-VWF73 por litro de medio de cultivo de células basales suplementado por día están presentes en el sobrenadante de cultivo recuperado. En una modalidad, el medio de cultivo celular tiene una concentración de nicotinamida de al menos 2 mg/mL y una concentración de cobre y zinc de conformidad con cualquiera de las variaciones 441 a 880, como se expone en la **Tabla 2**. En otra modalidad específica, el medio de cultivo tiene una concentración de nicotinamida de al menos 7 mg/mL mM y una concentración de cobre y zinc de conformidad con cualquiera de las variaciones 441 a 880, como se expone en la **Tabla 2**. En otra modalidad específica, el medio de cultivo tiene una concentración de nicotinamida entre 2 mg/mL y 10 mg/mL y una concentración de cobre y zinc de conformidad con cualquiera de las variaciones 441 a 880, como se expone en la **Tabla 2**. En todavía otras modalidades, el medio de cultivo tiene una concentración de nicotinamida de al menos 2 mg/mL, 3 mg/mL, 4 mg/mL, 5 mg/mL, 6 mg/mL, 7 mg/mL, 8 mg/mL, 9 mg/mL, 10 mg/mL, 11 mg/mL, 12 mg/mL, 13 mg/mL, 14 mg/mL, 15 mg/mL, o más, y una concentración de cobre y zinc de conformidad con cualquiera de las variaciones 441 a 880, como se expone en la

Tabla 2. En una modalidad preferida, al menos 2000 Unidades de actividad del FRETs-VWF73 por litro de medio de cultivo de células basales suplementado por día están presentes en el sobrenadante de cultivo recuperado. En una modalidad más preferida, al menos 2500 Unidades de actividad del FRETs-VWF73 por litro de medio de cultivo de células basales suplementado por día están presentes en el sobrenadante de cultivo recuperado. En una modalidad muy preferida, al menos 3000 Unidades de actividad de FRETs-VWF3 por litro de medio de cultivo de células basales suplementado por día están presentes en el sobrenadante de cultivo recuperado.

En una modalidad, la presente invención proporciona un método para producir una composición de ADAMTS13 recombinante (rA13), el método comprende las etapas de: (a) proporcionar un medio de cultivo de células basales; (b) suplementar el medio de cultivo de células basales con cobre, calcio, y nicotinamida; (c) proporcionar una o más células que comprenden un ácido nucleico que codifica una proteína rA13; (d) cultivar una o más células en el medio de cultivo celular suplementado con cobre de manera que la rA13 se expresa y excreta de las células en un cultivo de sobrenadante; y (e) recuperar al menos una porción del cultivo sobrenadante, en donde al menos 1500 Unidades de actividad del FRETs-VWF73 por litro de medio de cultivo de células basales suplementado por día están presentes en el

sobrenadante de cultivo recuperado. En una modalidad, el medio de cultivo celular tiene una concentración de nicotinamida de al menos 2 mg/mL y una concentración de cobre y calcio de conformidad con cualquiera de las variaciones 881 a 1320, como se expone en la **Tabla 3**. En otra modalidad específica, el medio de cultivo tiene una concentración de nicotinamida de al menos 7 mg/mL mM y una concentración de cobre y calcio de conformidad con cualquiera de las variaciones 881 a 1320, como se expone en la **Tabla 3**. En otra modalidad específica, el medio de cultivo tiene una concentración de nicotinamida entre 2 mg/mL y 10 mg/mL y una concentración de cobre y calcio de conformidad con cualquiera de las variaciones 881 a 1320, como se expone en la **Tabla 3**. En todavía otras modalidades, el medio de cultivo tiene una concentración de nicotinamida de al menos 2 mg/mL, 3 mg/mL, 4 mg/mL, 5 mg/mL, 6 mg/mL, 7 mg/mL, 8 mg/mL, 9 mg/mL, 10 mg/mL, 11 mg/mL, 12 mg/mL, 13 mg/mL, 14 mg/mL, 15 mg/mL, o más, y una concentración de cobre y calcio de conformidad con cualquiera de las variaciones 881 a 1320, como se expone en la **Tabla 3**. En una modalidad preferida, al menos 2000 Unidades de actividad del FRETs-VWF73 por litro de medio de cultivo de células basales suplementado por día están presentes en el sobrenadante de cultivo recuperado. En una modalidad más preferida, al menos 2500 Unidades de actividad del FRETs-VWF73 por litro de medio de cultivo de células

basales suplementado por día están presentes en el sobrenadante de cultivo recuperado. En una modalidad muy preferida, al menos 3000 Unidades de actividad de FRETTS-VWF3 por litro de medio de cultivo de células basales suplementado
5 por día están presentes en el sobrenadante de cultivo recuperado.

Proteínas ADAMTS recombinantes pueden ser producidas por expresión en cualquier sistema hospedero procariótico o eucariótico adecuado. Ejemplos de células
10 eucarióticas 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
15 modalidad, las proteínas ADAMTS pueden ser expresadas en células bacterianas, células de levadura, células de insecto, células de ave, células de mamífero, y similares. Por ejemplo, en una línea de células humanas, una línea de células de hámster, o una línea de células murinas. En una
20 modalidad particular, la línea de células es una línea de células CHO, BHK, o HEK. En una modalidad preferida, la línea de células es una línea de células CHO. En una modalidad específica, clones CHO capaces de expresar establemente rA13 son preparados co-transfectando una célula CHO con secuencias
25 codificantes para rA13 y una hidrofolato reductasa (por

ejemplo, a gen dhfr murino) y seleccionar para el crecimiento en la presencia de niveles incrementados de metotrexato.

En una modalidad, las células pueden ser cualquier célula de mamífero que puede ser cultivada, preferiblemente en un proceso de manufacturación (es decir, al menos 10 litros, preferiblemente al menos 100 litros), para producir una proteína ADAMTS deseada tal como ADAMTS13. Ejemplos incluyen la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embriónico humano (células 293 o 293 subclonadas para crecimiento en cultivo de suspensión, Graham et al., *J. Gen Virol.*, 36:59 (1977)); células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster Chino/-DHFR, tal como el subclon DUKX-B11 (CHO, Uriaub and Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980)); células Sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod*, 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde Africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HeLa, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al., *Annals N. Y. Acad. Sci.*, 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y la línea de hepatoma humano (Hep G2). Preferiblemente,

la línea de células es una línea de células de roedor, especialmente una línea de células de hámster tal como CHO o BHK.

Se puede usar una amplia variedad de vectores para la expresión de una proteína ADAMTS (*por ejemplo*, ADAMTS13) y puede ser seleccionada de vectores de expresión eucarióticos y procarióticos. En ciertas modalidades, se contempla un vector de plásmido para uso en la expresión de una proteína ADAMTS (*por ejemplo*, ADAMTS13). En general, vectores plásmidos que contienen secuencias de control y replicón los cuales se derivan de especies compatibles con la célula hospedera se usan en conjunto con estos hospederos. El vector puede llevar un sitio de replicación, así como también secuencias marcadoras las cuales son capaces de proporcionar selección fenotípica en células transformadas. El plásmido comprenderá una secuencia de nucleótido que codifica una proteína ADAMTS (*por ejemplo*, ADAMTS13) operablemente ligada a una o más secuencias de control, *por ejemplo*, un promotor.

Un método preferido para preparar clones de células CHO estables que expresan una proteína ADAMTS recombinante es como sigue. Una línea de células CHO deficientes en DHFR DUKX-B11 es transfectada con un vector de expresión DHFR para permitir la expresión de la proteína recombinante relevante. Un método ejemplar se describe por Plaimauer et al. (Blood. 2002 Nov 15;100(10):3626-32. Epub 2002 Jul 12), el contenido

del cual está de este modo incorporado por referencia en su totalidad para todos los propósitos. Se lleva a cabo selección por crecimiento en medio libre de Hipoxantina/Timidina (HT) y se logra amplificación de la
5 región relevante codificante para la expresión de la proteína ADAMTS recombinante y gen DHRR por propagación de las células en concentraciones incrementadas de metotrexato. Donde sea apropiado, las líneas de células CHO puede ser adaptada para crecimiento en medio libre de proteína y/o suero,
10 esencialmente como se describe en el documento US 6,100,061 (Reiter et al., Immuno Aktiengesellschaft).

En otra modalidad preferida, se preparan células HEK293 estables transfectando con un constructo que contienen un marcador seleccionable de higromicina y seleccionando
15 transformantes por resistencia al antibiótico.

La capacidad de ciertos virus para infectar células o ingresar células vía endocitosis mediada por el receptor, y para integrarla en el genoma de célula hospedera y expresar genes virales establemente y eficientemente las han hecho
20 candidatos atractivos para la transferencia de ácidos nucleicos extraños en células (por ejemplo, células de mamífero). Por consiguiente, en ciertas modalidades, se usa un vector viral para introducir una secuencia de nucleótido que codifica una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) en
25 una célula hospedera para expresión. El vector viral

comprenderá una secuencia de nucleótido que codifica una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) operablemente ligada a una o más secuencias de control, por ejemplo, un promotor. Alternativamente, el vector viral puede no contener una
5 secuencia de control y preferentemente dependerá de una secuencia de control dentro de la célula hospedera para accionar la expresión de la proteína ADAMTS. Ejemplos no limitantes de vectores de virus que pueden ser usados para suministrar un ácido nucleico incluyen vectores Adenovirales,
10 vectores AAV, y vectores Retrovirales.

En una modalidad, un vector de expresión de Adenovirus incluye aquellos constructos que contienen secuencias de adenovirus suficientes para soportar empaquetamiento del constructo y finalmente expresar un
15 constructo ADAMTS que ha sido clonado en este. Vectores adenovirales permiten la introducción de secuencias extrañas de hasta 7 kb (Grunhaus et al., Seminar in Virology, 200(2):535-546, 1992)).

En otra modalidad, un virus adeno-asociado (AAV)
20 puede ser usado para introducir una secuencia de nucleótido que codifica una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) en una célula hospedera para expresión. Sistemas AAV han sido descritos previamente y son en general bien conocidos en la técnica (Kelleher y Vos, *Biotechniques*, 17(6):1110-7, 1994;
25 Cotten et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 89(13):6094-6098,

1992; Curiel, *Nat Immun*, 13(2-3):141-64, 1994; Muzyczka, *Curr Top Microbiol Immunol*, 158:97-129, 1992). Detalles que se refieren a la generación y uso de vectores rAAV se describen, por ejemplo, en las Patentes Estadounidenses Nos. 5,139,941 y
5 4,797,368, cada una incorporada en la presente por referencia en sus totalidades para todos los propósitos.

En una modalidad, un vector de expresión retroviral puede ser usado para introducir una secuencia de nucleótido que codifica una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) en
10 una célula hospedera para expresión. Estos sistemas han sido descritos previamente y son en general bien conocidos en la técnica (Mann et al., *Cell*, 33:153-159, 1983; Nicolas and Rubinstein, In: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez y Denhardt, eds., Stoneham:
15 Butterworth, pp. 494-513, 1988; Temin, In: *Gene Transfer*, Kucherlapati (ed.), New York: Plenum Press, pp. 149-188, 1986). En una modalidad específica, el vector retroviral es un vector lentiviralor (véase, por ejemplo, Naldini et al., *Science*, 272(5259):263-267, 1996; Zufferey et al., *Nat*
20 *Biotechnol*, 15(9):871-875, 1997; Blomer et al., *J Virol.*, 71(9):6641-6649, 1997; Patentes Estadounidenses Nos. 6,013,516 y 5,994,136).

Ejemplos no limitantes de vectores para expresión procariótica incluyen plásmidos tales como pRSET, pET, pBAD,
25 etc., en donde los promotores usados en vectores de expresión

procariótica incluyen lac, trc, trp, recA, araBAD, etc. Ejemplos de vectores para expresión eucariótica incluyen: (i) para expresión en levadura, vectores tales como pAO, pPIC, pYES, pMET, usando promotores tales como AOX1, GAP, GAL1, AUG1, etc; (ii) para expresión en células de insecto, vectores tales como pMT, pAc5, pIB, pMIB, pBAC, etc., usando promotores tales como PH, p10, MT, Ac5, OpIE2, gp64, polh, etc., y (iii) para expresión en células de mamífero, vectores tales como pSVL, pCMV, pRc/RSV, pcDNA3, pBPV, etc., y vectores derivados de sistemas virales tales como virus vaccinia, virus adeno asociados, virus del herpes, retrovirus, etc., usando promotores tales como CMV, SV40, EF-1, UbC, RSV, ADV, BPV, y β -actina. Un vector ejemplar para expresar rA13 se describe por Plaimauer et al. (Blood. 2002 Nov 15;100(10):3626-32. Epub 2002 Jul 12), el contenido del cual está de este modo incorporado por referencia en su totalidad para todos los propósitos.

En ciertas modalidades, los métodos de cultivo celular de la invención pueden comprender el uso de un microportador. La presente invención proporciona, entre otros aspectos, métodos de expresión de proteína ADAMTS a gran escala. En algunas modalidades, los cultivos celulares de las modalidades pueden ser realizados en biorreactores grandes bajo condiciones adecuadas para proporcionar áreas de superficie de cultivo de alto volumen específicas para lograr

altas densidades y expresión de proteínas. Un medio para proporcionar tales condiciones de crecimiento es usar microportadores para cultivo celular en biorreactores de tanque agitado. En otra modalidad, estos requerimientos de crecimiento son cubiertos vía el uso de una suspensión de cultivo celular.

V. Modalidades específicas

A. Factor Von Willebrand Recombinante (rVWF)

El vWF recombinante puede ser expresado en células de mamífero, pero la actividad específica del vWF puede variar ampliamente dependiendo de las condiciones de cultivo celular y no se ha mostrado por ser comparable o igual a aquella del vWF aislado de plasma de sangre. La presente invención se basa en parte en el resultado sorprendente de que los medios de cultivo celular que tienen al menos 2.4 µg/L de cobre proporcionan un efecto ventajoso de promover la expresión del vWF de alto peso molecular que tiene una alta actividad específica. En particular, el vWF recombinante, de alto peso molecular de la presente invención puede incluir una forma altamente multimérica que comprende aproximadamente 14 hasta aproximadamente 22 dímeros y una actividad específica de Ristocetina de al menos aproximadamente 30 mU/µg. Los procesos de cultivo celular de conformidad con la presente invención también permiten mantener bajos niveles de

NH₄⁺ (por ejemplo, menos de 10 mM) durante el proceso corriente arriba en sistemas de cultivo celular, de este modo produciendo efectos deletéreos para modificaciones post-traduccionales. Se cree que la presente invención proporciona
5 por primera vez condiciones de cultivo celular que comprenden un medio que tiene una concentración adecuada de cobre en combinación con niveles apropiados de amonio en el sobrenadante para expresar un vWF altamente multimérico con una alta actividad específica.

10 En un aspecto, la presente invención se refiere a condiciones de cultivo celular para producir vWF recombinante, de alto peso molecular con una alta actividad específica. Las condiciones de cultivo celular de la presente invención pueden incluir, por ejemplo, un medio de cultivo
15 celular con una concentración incrementada de cobre y/o sobrenadante de cultivo celular con una baja concentración de amonio (NH₄⁺). La presente invención también proporciona métodos para cultivar células en condiciones de cultivo celular para expresar un vWF de alto peso molecular con una
20 alta actividad específica.

En un aspecto, la presente invención proporciona una solución de cultivo celular para producir proteína del vWF recombinante, de alto peso molecular, la solución de cultivo celular que comprende: un medio de cultivo celular
25 que comprende una concentración de cobre de al menos

aproximadamente 2.4 µg/L; un sobrenadante de cultivo celular que comprende una concentración de amonio de menos de 10 mM; y una pluralidad de células que expresan proteína del vWF altamente multimérico, en donde la proteína del vWF comprende una actividad específica de Ristocetina de al menos aproximadamente 30 mU/µg.

En una modalidad específica de los cultivos celulares descritos anteriormente, la solución de cultivo celular comprende un suplemento de medio que comprende cobre.

En una modalidad específica de los cultivos celulares descritos anteriormente, el suplemento de medio comprende un hidrolizado, opcionalmente un hidrolizado de soya.

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

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

En una modalidad específica de los cultivos celulares descritos anteriormente, la concentración de cobre es al menos aproximadamente 4 µg/L.

En una modalidad específica de los cultivos celulares descritos anteriormente, la concentración de cobre es desde aproximadamente 2.4 µg/L hasta aproximadamente 20 µg/L.

5 En una modalidad específica de los cultivos celulares descritos anteriormente, la proteína del vWF comprende aproximadamente 14 hasta aproximadamente 22 dímeros.

En un aspecto, la presente invención proporciona un
10 método para producir una proteína del vWF recombinante, de alto peso molecular, el método comprende las etapas de: a) proporcionar un cultivo de células que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína del vWF recombinante; b) expresar la proteína del vWF en las células bajo condiciones
15 de cultivo que comprenden un medio de cultivo celular que comprende una concentración de cobre de al menos aproximadamente 2.4 µg/L y un sobrenadante de cultivo celular que comprende una concentración de amonio menos de aproximadamente 10 mM, en donde la proteína del vWF es
20 proteína del vWF altamente multimérico y comprende una actividad específica de Ristocetina de al menos aproximadamente 30 mU/µg.

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

25 En una modalidad específica de los métodos

descritos anteriormente, las células son de una línea de células continuas.

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

5 En una modalidad específica de los métodos descritos anteriormente, la concentración de cobre es al menos aproximadamente 4 µg/L.

En una modalidad específica de los métodos descritos anteriormente, la concentración de cobre es desde 10 aproximadamente 2.4 µg/L hasta aproximadamente 20 µg/L.

En una modalidad específica de los métodos descritos anteriormente, la proteína del VWF recombinante tiene una actividad del cofactor de Ristocetina específica de al menos aproximadamente 50 mU/µg.

15 En una modalidad específica de los métodos descritos anteriormente, la proteína del VWF recombinante tiene una actividad del cofactor de Ristocetina específica desde aproximadamente 30 mU/µg hasta aproximadamente 100 mU/µg.

20 En una modalidad específica de los métodos descritos anteriormente, la proteína del VWF recombinante comprende aproximadamente 14 hasta aproximadamente 22 dímeros.

En un aspecto, la presente invención proporciona 25 una proteína vWF recombinante, de alto peso molecular

producida por un proceso, el proceso comprende las etapas de:
a) proporcionar un cultivo de células que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína del vWF recombinante; y b) expresar la proteína del vWF en las células bajo condiciones
5 de cultivo que comprenden un medio de cultivo celular que comprende una concentración de cobre de al menos 2.4 µg/L y un sobrenadante de cultivo celular que comprende una concentración de amonio menos de 10 mM, en donde la proteína del vWF es proteína del vWF altamente multimérico y comprende
10 una actividad específica de Ristocetina de al menos aproximadamente 30 mU/µg.

En una modalidad específica de la composición de los rVWF descritos anteriormente, la proteína del VWF recombinante tiene una actividad del cofactor de Ristocetina
15 específica de al menos aproximadamente 50 mU/µg.

En una modalidad específica de la composición de los rVWF descritos anteriormente, la proteína del VWF recombinante tiene una actividad del cofactor de Ristocetina específica desde aproximadamente 30 mU/µg hasta
20 aproximadamente 100 mU/µg.

En una modalidad específica de la composición de los rVWF descritos anteriormente, la proteína del VWF recombinante comprende aproximadamente 14 hasta aproximadamente 22 dímeros.

25 En un aspecto, la presente invención proporciona

una solución de cultivo celular para producir proteína del vWF recombinante, de alto peso molecular, la solución de cultivo celular que comprende: un medio de cultivo celular que comprende una concentración de cobre de al menos
5 aproximadamente 2.4 µg/L; un sobrenadante de cultivo celular que comprende una concentración de amonio de menos de 10 mM; y una pluralidad de células que expresan proteína del vWF altamente multimérico, en donde la proteína del vWF comprende aproximadamente 14 hasta aproximadamente 22 dímeros y una
10 actividad específica de Ristocetina de al menos aproximadamente 30 mU/µg.

En un aspecto, la presente invención se refiere a condiciones de cultivo celular para producir vWF recombinante de alto peso molecular que está en una forma altamente
15 multimérica con una alta actividad específica. Las condiciones de cultivo celular de la presente invención pueden incluir, por ejemplo, un medio de cultivo celular con una concentración incrementada de cobre y sobrenadante de cultivo celular con una baja concentración de amonio (NH₄⁺).
20 La presente invención también proporciona métodos para cultivar células en condiciones de cultivo celular para expresar un vWF de alto peso molecular con una alta actividad específica.

En un aspecto, la presente invención incluye una
25 solución de cultivo celular para producir vWF recombinante,

de alto peso molecular, que comprende un medio de cultivo celular que comprende una concentración de cobre de al menos aproximadamente 2.4 µg/L; un sobrenadante de cultivo celular que comprende una concentración de amonio de menos de 10 mM; y una pluralidad de células que expresan vWF altamente multimérico que comprende aproximadamente 14 hasta aproximadamente 22 dímeros y una actividad específica de Ristocetina de al menos aproximadamente 30 mU/µg. En una modalidad de las soluciones de cultivo celular descritas anteriormente, al menos 10% del rVWF está presente en un multímero del VWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros. En una modalidad específica, al menos 15% del rVWF está presente en un multímero del VWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros. En otra modalidad específica, al menos 20% del rVWF está presente en un multímero del VWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros. En otra modalidad específica, al menos 25% del rVWF está presente en un multímero del VWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros. En otra modalidad específica, al menos 30% del rVWF está presente en un multímero del VWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros. En ciertas modalidades, la concentración de cobre puede ser al menos aproximadamente 4 µg/L o la concentración de cobre puede variar desde aproximadamente 2.4 µg/L hasta aproximadamente 20 µg/L. En algunas modalidades, los medios de cultivo celular comprenden

un suplemento de medio que comprende cobre. En ciertas modalidades, el suplemento de medio puede comprender un hidrolizado o una sal de cobre, quelato de cobre, o una combinación de los mismos. En algunas modalidades, la sal de

5 cobre puede incluir sulfato de cobre, acetato de cobre, carbonato de cobre, cloruro de cobre, hidróxido de cobre, nitrato de cobre, u óxido de cobre. En ciertas modalidades, las células pueden ser de una línea de células continuas y pueden incluir células de mamífero, tales como células CHO.

10 En algunas modalidades, el VWF recombinante tiene una actividad del cofactor de Ristocetina específica de al menos aproximadamente 50 mU/ μ g, o la actividad del cofactor de Ristocetina específica puede variar desde aproximadamente 30 mU/ μ g hasta aproximadamente 100 mU/ μ g.

15 En otro aspecto, la presente invención incluye un método para producir un vWF recombinante, de alto peso molecular, que comprende a) proporcionar un cultivo de células; b) introducir una secuencia de ácido nucleico codificante para vWF; c) seleccionar las células que llevan

20 la secuencia de ácido nucleico; y, d) expresar el vWF en las células bajo condiciones de cultivo que comprenden un medio de cultivo celular que comprende una concentración de cobre de al menos aproximadamente 2.4 μ g/L y un sobrenadante de cultivo celular que comprende una concentración de amonio

25 menos de aproximadamente 10 mM, en donde el vWF es vWF

altamente multimérico que comprende aproximadamente 14 hasta aproximadamente 22 dímeros y una actividad específica de Ristocetina de al menos aproximadamente 30 mU/μg. En una modalidad del sobrenadante de cultivo celular descrito
5 anteriormente, al menos 10% del rVWF está presente en un multímero del VWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros. En una modalidad específica, al menos 15% del rVWF está presente en un multímero del VWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros. En otra modalidad específica, al menos
10 20% del rVWF está presente en un multímero del VWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros. En otra modalidad específica, al menos 25% del rVWF está presente en un multímero del VWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros. En otra modalidad específica, al menos 30% del rVWF
15 está presente en un multímero del VWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros. En algunas modalidades, las células pueden ser de una línea de células continuas y pueden incluir células de mamífero, tales como células CHO. En ciertas modalidades, la concentración de cobre puede ser al menos
20 aproximadamente 4 μg/L o la concentración de cobre puede variar desde aproximadamente 2.4 μg/L hasta aproximadamente 20 μg/L. En algunas modalidades, los medios de cultivo celular comprenden un suplemento de medio que comprende cobre. En ciertas modalidades, el suplemento de medio puede
25 comprender un hidrolizado o una sal de cobre, quelato de

cobre, o una combinación de los mismos. En algunas modalidades, la sal de cobre puede incluir sulfato de cobre, acetato de cobre, carbonato de cobre, cloruro de cobre, hidróxido de cobre, nitrato de cobre, u óxido de cobre. En algunas modalidades, el VWF recombinante tiene una actividad del cofactor de Ristocetina específica de al menos aproximadamente 50 mU/ μ g, o la actividad del cofactor de Ristocetina específica puede variar desde aproximadamente 30 mU/ μ g hasta aproximadamente 100 mU/ μ g.

En todavía otro aspecto, la presente invención incluye un vWF recombinante, de alto peso molecular producido por un proceso, que comprende las etapas de: a) proporcionar un cultivo de células; b) introducir una secuencia de ácido nucleico codificante para vWF; c) seleccionar las células que llevan la secuencia de ácido nucleico; y, d) expresar el vWF en las células bajo condiciones de cultivo que comprenden un medio de cultivo celular que comprende una concentración de cobre de al menos 2.4 μ g/L y un sobrenadante de cultivo celular que comprende una concentración de amonio menos de 10 mM, en donde el vWF es vWF altamente multimérico que comprende aproximadamente 14 hasta aproximadamente 22 dímeros y una actividad específica de Ristocetina de al menos aproximadamente 30 mU/ μ g. En una modalidad del sobrenadante de cultivo celular descrito anteriormente, al menos 10% del rVWF está presente en un multímero del VWF de alto peso

molecular de más de 10 dímeros. En una modalidad específica, al menos 15% del rVWF está presente en un multímero del VWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros. En otra modalidad específica, al menos 20% del rVWF está presente en un multímero del VWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros. En otra modalidad específica, al menos 25% del rVWF está presente en un multímero del VWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros. En otra modalidad específica, al menos 30% del rVWF está presente en un multímero del VWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros. En algunas modalidades, las células pueden ser de una línea de células continuas y pueden incluir células de mamífero, tales como células CHO. En ciertas modalidades, la concentración de cobre puede ser al menos aproximadamente 4 µg/L o la concentración de cobre puede variar desde aproximadamente 2.4 µg/L hasta aproximadamente 20 µg/L. En algunas modalidades, los medios de cultivo celular comprenden un suplemento de medio que comprende cobre. En ciertas modalidades, el suplemento de medio puede comprender un hidrolizado o una sal de cobre, quelato de cobre, o una combinación de los mismos. En algunas modalidades, la sal de cobre puede incluir sulfato de cobre, acetato de cobre, carbonato de cobre, cloruro de cobre, hidróxido de cobre, nitrato de cobre, u óxido de cobre. En algunas modalidades, el VWF recombinante tiene una actividad del cofactor de Ristocetina específica de al menos

aproximadamente 50 mU/ μ g, o la actividad del cofactor de Ristocetina específica puede variar desde aproximadamente 30 mU/ μ g hasta aproximadamente 100 mU/ μ g.

En un aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende el Factor Von Willebrand recombinante (rVWF) que tiene una actividad del cofactor de ristocetina específica de al menos 30 mU/ μ g. En una modalidad preferida, la composición tiene una actividad del cofactor de Ristocetina específica de al menos 40 mU/ μ g. En una modalidad más preferida, la composición tiene una actividad del cofactor de Ristocetina específica de al menos 50 mU/ μ g. En una modalidad más preferida, la composición tiene una actividad del cofactor de Ristocetina específica de al menos 60 mU/ μ g. En una modalidad más preferida, la composición tiene una actividad del cofactor de Ristocetina específica de al menos 70 mU/ μ g. En todavía una modalidad más preferida, la composición tiene una actividad del cofactor de Ristocetina específica de al menos 80 mU/ μ g.

En una modalidad de las composiciones descritas anteriormente, al menos 10% del rVWF de la composición está presente en un multímero del VWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros. En una modalidad específica, al menos 15% del rVWF está presente en un multímero del VWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros. En otra modalidad específica, al menos 20% del rVWF está presente en un multímero del VWF

de alto peso molecular de más de 10 dímeros. En otra modalidad específica, al menos 25% del rVWF está presente en un multímero del VWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros. En otra modalidad específica, al menos 30% del rVWF
5 está presente en un multímero del VWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros.

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

En una modalidad de las composiciones descritas anteriormente, el rVWF se expresa en un cultivo celular que
15 comprende al menos 2.4 µg/L de cobre. En una modalidad específica, el cultivo celular comprende al menos 4 µg/L de cobre. En una modalidad más específica, el cultivo comprende entre 2.4 µg/L y 20 µg/L de cobre. En una modalidad, el cobre se proporciona como una sal de cobre, un quelato de cobre, o
20 una combinación de los mismos. En una modalidad específica, la sal de cobre se selecciona del grupo que consiste de sulfato de cobre, acetato de cobre, carbonato de cobre, cloruro de cobre, hidróxido de cobre, nitrato de cobre y óxido de cobre.

25 En una modalidad de las composiciones descritas

anteriormente, el cultivo celular es un cultivo de lotes.

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

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

10 En una modalidad de las composiciones descritas anteriormente, la densidad celular del cultivo se mantiene a menos de 2.5×10^6 células por mL.

En una modalidad de las composiciones descritas anteriormente, la densidad celular del cultivo se mantiene a 15 menos de 2.0×10^6 células por mL.

En una modalidad de las composiciones descritas anteriormente, el cultivo se mantiene a menos de 1.5×10^6 células por mL.

En una modalidad de las composiciones descritas anteriormente, el rVWF es co-expresado con el Factor VIII recombinante (rFVIII). En una modalidad específica, la mayoría del rFVIII co-expresado se ha removido. En una modalidad más específica, la relación del rVWF a rFVIII en la composición es al menos 10:1.

25 En una modalidad de las composiciones descritas

anteriormente, la composición es formulada para administración farmacéutica. En una modalidad específica, la composición es formulada para administración intravenosa, subcutánea o intramuscular.

5 En una modalidad de las composiciones descritas anteriormente, la composición es liofilizada.

 En todavía otro aspecto, la presente invención incluye un vWF recombinante, de alto peso molecular producido por un proceso, que comprende las etapas de: a) proporcionar
10 un cultivo de células; b) introducir una secuencia de ácido nucleico codificante para vWF; c) seleccionar las células que llevan la secuencia de ácido nucleico; y, d) expresar el vWF en las células bajo condiciones de cultivo que comprenden un medio de cultivo celular que comprende una concentración de
15 cobre de al menos 2.4 µg/L y un sobrenadante de cultivo celular que comprende una concentración de amonio menos de 10 mM, en donde el vWF es vWF altamente multimérico que comprende aproximadamente 14 hasta aproximadamente 22 dímeros y una actividad específica de Ristocetina de al menos
20 aproximadamente 30 mU/ug. Se entiende que todas las modalidades y concentraciones descritas en las secciones anteriores "Medios de Cultivo Celular" y "Métodos para Producir vWF Recombinante" pueden aplicar aquí.

 El VWF recombinante de la presente invención puede
25 incluir una proteína del vWF recombinante de alto peso

molecular que tiene una alta actividad específica. En una modalidad, el vWF de la presente invención es una forma altamente multimérica del vWF. En algunas modalidades, la forma altamente multimérica del vWF incluye al menos hasta 5 aproximadamente 14 dímeros y en otras modalidades al menos hasta aproximadamente 22 dímeros. En todavía otras modalidades, la forma altamente multimérica del vWF puede variar desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 20 dímeros, o desde aproximadamente 15 hasta aproximadamente 25 10 dímeros, o desde aproximadamente 20 hasta aproximadamente 40 dímeros. En ciertas modalidades, el VWF recombinante es comparable con el vWF plasmático.

Como se describe en la presente, la presente invención proporciona el resultado sorprendente que la 15 concentración incrementada de cobre en medios de cultivo celular puede producir vWF de alto peso molecular con alta actividad específica. Medios de cultivo celular que comprenden una concentración de cobre, *por ejemplo*, mayor de aproximadamente 2.4 µg/L pueden incrementar el rendimiento 20 del vWF multimérico recombinante, comparado con media sin cobre. En ciertas modalidades, el porcentaje de vWF multimérico (es decir, rVWF que comprende al menos 2 dímeros) puede ser mayor de aproximadamente 50%, o mayor de aproximadamente 75%, o mayor de aproximadamente 90%. La 25 distribución multimérica del vWF puede ser analizada usando

técnicas estándares tales como, por ejemplo, en electroforesis de Agarosa bajo condiciones no reductoras.

Como se proporciona en la presente, el VWF recombinante producido por los métodos de la presente invención puede tener una alta actividad específica, por ejemplo, una alta actividad del cofactor de Ristocetina específica. En una modalidad, el VWF recombinante producido por los métodos de la presente invención puede incluir una actividad del cofactor de Ristocetina específica de al menos 30 mU/ug y en otra modalidad al menos 50 mU/ug. En otras modalidades, la actividad del cofactor de Ristocetina específica puede variar desde aproximadamente 30 mU/ug hasta aproximadamente 100 mU/ug o desde aproximadamente 50 mU/ug hasta aproximadamente 100 mU/ug.

15

B. ADAMTS13 recombinantes (rA13)

Las proteínas ADAMTS (es decir, ADAMTS-1 a ADAMTS-20) son una familia de metaloproteinasas de zinc secretadas que portan una organización de dominio modular común (para revisión, véase, Flannery C.R., *Front Biosci.* 2006 Jan 1;11:544-69). Todas las proteínas ADAMTS portan una arquitectura de dominio de núcleo común, que consiste de un péptido señal, seguido por una prodominio, un dominio catalítico de metaloproteinasa dependiente del zinc, un dominio similar a desintegrina, una repetición de

25

tromboespondina tipo I, un dominio rico en cisteína y un dominio espaciador (Apte S.S., J Biol Chem. 2009 Nov 13;284(46):31493-7). Adicionalmente, todos pero el ADAMTS-4 contienen al menos un dominio de repetición de
5 tromboespondina tipo I y muchas de las proteínas ADAMTS contienen uno o más dominios ancilares adicionalmente. Notablemente, se ha reportado que todas las proteínas ADAMTS parecen contener al menos un sitio de unión a calcio y un sitio de unión a zinc localizados dentro del dominio
10 catalítico de metaloproteinasas (Andreini et al., J. Proteome Res., 2005, 4 (3), pp 881-888).

Los papeles biológicos para proteínas ADAMTS se han reportado para varias enfermedades y condiciones, que incluyen, angiogénesis, fibrosis intersticial renal,
15 remodelación ósea, foliculogénesis de ovario, aterosclerosis, desarrollo urogenital, y crecimiento/remodelación del tumor (ADAMTS-1); síndrome Ehler-Danlos tipo 7C y dermatopraxis bovina (ADAMTS-2); artritis, aterosclerosis y tendinopatía (ADAMTS-4); artritis y glioblastoma (ADAMTS-5); artritis
20 (ADAMTS-7); angiogénesis, males cerebrales, artritis y aterosclerosis (ADAMTS-8); artritis (ADAMTS-9, -12); púrpura trombocitopénica trombótica (ADAMTS-13); y antitrombosis/apoplejía (para revisión, véase, Lin and Liu, Open Access Rheumatology Research and Reviews 2009:1 121-
25 131).

Las ADAMTS13 recombinantes (A13) han sido expresadas antes en células de mamífero, sin embargo la actividad específica varía ampliamente dependiendo de las condiciones de cultivo celular. Se ha encontrado que muchos
5 medios de cultivo comercialmente disponibles no son suficientes para expresión de rA13 con altas actividades específicas, expresadas como la relación de actividad, medida por el ensayo FRETTS-VWF73. Para contenido de antígeno, como se determina por ELISA. En un aspecto, los métodos
10 proporcionados en la presente se basan en varios hallazgos ventajosos que permiten la expresión del cultivo celular de rA13 que tiene niveles incrementados de actividad total y específica.

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

20 En un aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende ADAMTS13 recombinante (rA13) que tiene actividad de FRETTS-VWF específica de al menos 1600 mU/ μ g.

En una modalidad de las composiciones descritas
25 anteriormente, la rA13 tiene una actividad de FRETTS-VWF

específica de al menos 800 mU/ μ g.

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

En una modalidad de las composiciones descritas anteriormente, la rA13 es expresada en un cultivo celular que comprende al menos 1 μ g/L de cobre. En una modalidad específica, el cultivo celular comprende al menos 2 μ g/L de cobre. En una modalidad más específica, el cultivo comprende entre 2 μ g/L y 20 μ g/L de cobre.

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

En una modalidad de las composiciones descritas anteriormente, el cultivo celular es un cultivo de lotes.

En una modalidad de las composiciones descritas anteriormente, el cultivo celular es un cultivo continuo. En una modalidad específica, el cultivo continuo se realiza en

modo quimiostático. En otra modalidad específica, el cultivo continuo se realiza en modo de perfusión.

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

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

En una modalidad de las composiciones descritas anteriormente, la densidad celular del cultivo se mantiene a menos de 4.0×10^6 células por mL. En una modalidad específica, la densidad celular del cultivo se mantiene a menos de 3.0×10^6 células por mL. En una modalidad específica, la densidad celular del cultivo se mantiene a menos de 2.0×10^6 células por mL. En una modalidad más específica, la densidad celular del cultivo se mantiene a menos de 1.5×10^6 células por mL.

En una modalidad de las composiciones descritas anteriormente, la composición es formulada para administración farmacéutica. En una modalidad específica, la composición es formulada para administración intravenosa, subcutánea o intramuscular.

En una modalidad de las composiciones descritas anteriormente, la composición es liofilizada.

IV. Formulaciones

En un aspecto, las formulaciones que comprenden las proteínas terapéuticas recombinantes rVWF o rA13 de la presente invención son liofilizadas previo a la administración. La liofilización se lleva a cabo usando técnicas comunes en el arte y debe ser optimizada para la composición a ser desarrollada [Tang et al., Pharm Res. 21:191-200, (2004) y Chang et al., Pharm Res. 13:243-9 (1996)].

Los Métodos para preparar formulaciones farmacéuticas pueden incluir una o más de las siguientes etapas: agregar un agente estabilizante como se describe en la presente a tal mezcla previo a la liofilización, agregar al menos un agente seleccionado de un agente de volumen, un agente que regula la osmolaridad y un tensoactivo, cada uno de los cuales es como se describe en la presente, a tal mezcla previo a la liofilización. Una formulación liofilizada está, en un aspecto, al menos comprendida de uno o más de un amortiguador, un agente de volumen y un estabilizador. En este aspecto, la utilidad de un tensoactivo se evalúa y selecciona en casos donde la agregación durante la etapa de liofilización o durante la reconstitución llega a ser un problema. Un agente amortiguador apropiado se incluye para mantener la formulación dentro de zonas estables de pH durante la liofilización.

La práctica de reconstitución estándar para el material liofilizado se agrega nuevamente a un volumen de agua pura o agua estéril para inyección (WFI) (típicamente equivalente al volumen removido durante la liofilización), aunque las soluciones dilutas de agentes antibacterianos son algunas veces usadas en la producción de fármacos para administración parenteral [Chen, Drug Development and Industrial Pharmacy, 18:1311-1354 (1992)]. Por consiguiente, se proporcionan métodos para la preparación de composiciones del VWF recombinante reconstituidas que comprenden la etapa de agregar un diluyente a una composición del VWF recombinante liofilizada de la invención.

El material liofilizado puede ser reconstituido como una solución acuosa. Una variedad de portadores acuosos, por ejemplo, agua estéril para inyección, agua con preservativos para uso de dosis múltiples, o agua con cantidades apropiadas de tensoactivos (por ejemplo, una suspensión acuosa que contiene el compuesto activo en mezcla con excipientes adecuados para la manufactura de suspensiones acuosas). En varios aspectos, tales excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo y sin limitación, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma de acacia; agentes de dispersión o humectantes son un fosfátido que se

origina naturalmente, por ejemplo y sin limitación, lecitina, o productos de condensación de un óxido de alquileo con ácidos grasos, por ejemplo y sin limitación, estearato de polioxietileno, o productos de condensación óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo y sin limitación, heptadecaetil-eneoxicetanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tal como monooleato de polioxietilen sorbitol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo y sin limitación, monooleato de polietilen sorbitán. En varios aspectos, las suspensiones acuosas también contienen uno o más preservativos, por ejemplo y sin limitación, etilo, o n-propilo, p-hidroxibenzoato.

Para administrar composiciones a humanos o animales de prueba, en un aspecto, las composiciones comprenden uno o más portadores farmacéuticamente aceptables. Las frases "farmacéuticamente" o "farmacológicamente" aceptables se refieren a entidades y composiciones moleculares que son estables, inhiben la degradación de la proteína tal como productos de desdoblamiento y agregación, y demás no producen reacciones alérgicas u otras adversas cuando se administran usando rutas bien conocidas en la técnica, como se describe abajo. "Portadores farmacéuticamente aceptables" incluyen

cualquier y todos los solventes clínicamente útiles, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes que retardan la absorción e isotónicos y similares, que incluyen aquellos agentes descritos
5 anteriormente.

Las formulaciones farmacéuticas son administradas intravenosamente, oralmente, tópicamente, transdermalmente, parenteralmente, por atomización de inhalación, vaginalmente, rectalmente o por inyección intracraneal. El término
10 parenteral como se usa en la presente incluye inyecciones subcutáneas, intravenosas, intramusculares, inyección intracisternal, o técnicas de infusión. La administración por intravenosa, intradermal, intramuscular, intramamaria, intraperitoneal, intratecal, retrobulbar, inyección pulmonar
15 y/o implante quirúrgico en un sitio particular está contemplada también. En general, las composiciones están esencialmente libres de pirógenos, así como también de otras impurezas que podrían ser peligrosas al recipiente.

Las administraciones únicas o múltiples de las
20 composiciones se llevan a cabo a los niveles y patrones de dosis siendo seleccionados por el especialista que trata. Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada depende del tipo de enfermedad a ser tratada, la severidad y curso de la enfermedad, si el fármaco
25 es administrado para propósitos preventivos o terapéuticos,

terapia previa, el historial clínico del paciente y respuesta al fármaco, y la discreción del especialista que atiende.

En un aspecto, las formulaciones de la invención son administradas por un bolo inicial seguido por una
5 infusión continua para mantener los niveles de circulación terapéuticos del producto de fármaco. Como otro ejemplo, el compuesto inventivo se administra como una dosis de una vez. Aquellos de habilidad ordinaria en la técnica optimizarán fácilmente dosificaciones y regímenes de administración
10 efectivos como se determina por la buena práctica médica y la condición clínica del paciente individual. La frecuencia de dosificación depende de los parámetros de farmacocinética de los agentes y la ruta de administración. La formulación farmacéutica óptima se determina por un experto en la técnica
15 dependiendo de la ruta de administración y la dosificación deseada. Véase por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 18042) páginas 1435-1712, la descripción de la cual está de este modo incorporada por referencia. Tales formulaciones
20 influyen el estado físico, estabilidad, velocidad de liberación *in vivo* y velocidad de separación *in vivo* de los agentes administrados. Dependiendo de la ruta de administración, una dosis adecuada se calcula de conformidad con el peso corporal, área de superficie corporal o tamaño de
25 órgano. Las dosificaciones apropiadas pueden ser evaluadas a

través del uso de ensayos establecidos para determinar las dosificaciones del nivel de sangre en conjunto con los datos de respuesta de dosis apropiados. El régimen de dosificación final se determina por el especialista que atiende, considerando varios factores los cuales modifican la acción de los fármacos, por ejemplo, la actividad específica del fármaco, la severidad del daño y la capacidad de respuesta del paciente, la edad, la condición, peso corporal, sexo y dieta del paciente, la severidad de cualquier infección, tiempo de administración y otros factores clínicos. Por medio del ejemplo, una dosis típica de un vWF recombinante de la presente invención es aproximadamente 50 U/kg, igual a 500 µg/kg. Como se conducen los estudios, la información adicional emergerá con respecto a los niveles de dosificación apropiados y duración del tratamiento para varias enfermedades y condiciones.

VI. Métodos de tratamiento

La presente invención además contempla métodos para tratar un paciente en necesidad de rVWF o rA13 producidos de conformidad con los métodos descritos en la presente. Tales métodos de tratamiento pueden incluir administración de formulaciones farmacéuticas que comprenden la rA13 recombinante o el vWF recombinante, de alto peso molecular de la presente invención.

En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para tratamientos terapéuticos o profilácticos que comprenden la administración de una composición de rVWF o rA13 proporcionada en la presente. En general, para aplicaciones terapéuticas, las formulaciones son administradas a un sujeto con una enfermedad o condición asociada con disfunción de ADAMTS13 o VWF o de otro modo en necesidad de las mismas, en una "dosis terapéuticamente efectiva". Las formulaciones y cantidades efectivas para estos usos dependerán de la severidad de la enfermedad o condición y el estado general de la salud del paciente. Las administraciones únicas o múltiples de las formulaciones pueden ser administradas dependiendo de la dosificación y frecuencia como se requiera y tolere por el paciente.

En una modalidad, la presente invención proporciona métodos para tratar o prevenir una enfermedad o condición asociada con una disfunción de ADAMTS13 ó VWF. En una modalidad adicional, las formulaciones farmacéuticas que comprende vWF recombinante pueden ser administradas para tratar enfermedades relacionadas a vWF, tal como enfermedad de von Willebrand o hemofilia. En otra modalidad, la invención proporciona métodos de tratamiento o prevención de una enfermedad o condición asociada con la formación y/o presencia de uno o más trombos, que comprende la administración de una composición rA13 proporcionada en la

presente. En una modalidad adicional, la invención proporciona métodos para desintegrar uno o más trombos en un sujeto en necesidad del mismo. En aún otras modalidades, la invención proporciona métodos de tratamiento o prevención de un infarto en un sujeto en necesidad de los mismos. Generalmente, los métodos proporcionados por la invención comprenden administrar una composición rADAMTS13 proporcionada en la presente a un sujeto en necesidad de la misma.

Ejemplos no limitantes de trastornos asociados con la formación y/o la presencia de uno o más trombos son púrpura trombocitopénica trombótica hereditaria (TTP), TTP adquirida, trombosis arterial, infarto al miocardio agudo (AMI), apoplejía, sepsias y coagulación intravascular diseminada (DIC).

Ejemplos no limitantes de trastornos asociados con un infarto, incluyen sin limitación, infarto al miocardio (ataque al corazón), embolismo pulmonar, eventos cerebrovasculares tales como apoplejía, enfermedad oclusiva de la arteria periférica (tal como gangrena), síndrome antifosfolípido, sepsias, arteritis de la célula gigante (GCA), hernia y vólvulo.

VIII. Ejemplos

La presente invención ahora será ilustrada

adicionalmente en los siguientes ejemplos, sin ser limitada a esto.

Ejemplo 1

5 Se realizaron experimentos de cultivo celulares continuos usando cultivos de una línea de célula CHO recombinante que expresa vWF. El medio basal como DMEM/F12, el cual contiene aproximadamente 0.3 µg/L de Cu²⁺. El medio es suplementado con hidrolizado de soya y sulfato de cobre
10 (CuSO₄•5H₂O) para llevar la concentración de cobre final en el medio a más de al menos 2.4 µg/L.

Las células CHO recombinantes que expresan vWF son cultivados por cultivos celulares continuos de forma que los niveles de amonio (NH₄⁺) se mantienen a una concentración
15 menos de aproximadamente 10 mM. Se encontró que los sistemas de producción que proporcionan un suplemento de medio continuo (por ejemplo, cultivos de perfusión o quimiostato) son preferibles porque el lote convencional o técnicas alimentados por lote produce altas concentraciones de NH₄⁺ al
20 final del cultivo. Al final del cultivo, el vWF altamente multimérico se aisló y la actividad del Cofactor Ristocetina específico del vWF se midió.

Ejemplo 2

25 El Factor Recombinante VIII (rFVIII) y Factor de

Von Willebrand (rVWF) son co-expresados en cultivos por lotes de células GD8/6 para determinar el efecto de la composición del medio de cultivo en expresión y actividad de VWF. Brevemente, las células GD8/6 son cultivadas por lotes en medio BAV-SP compuesto de un polvo basal DMEM/F12 (Tabla 5) y suplementos adicionales también que contienen 4 g/L de hidrolizado de soya, véase Tabla 6, con y sin suplementación de cobre adicional. Para probar el efecto de bajas concentraciones de cobre en expresión y actividad de rVWF, se usó medio BAV-SP basal. El medio basal que contiene 0.3 µg/L de cobre y fue suplementado con hidrolizado de soya, lo cual contribuye con un 0.7 µg/L de cobre adicional, como se determinó experimentalmente, proporcionando una concentración de cobre final de 1.0 µg/L. Como una comparación, el medio BAV-SP usado para los cultivos por lotes fue suplementado adicionalmente con un 3.3 µg/L adicional de Cu²⁺, proporcionando una concentración de cobre final de 4.3 µg/L, para determinar el efecto de altas concentraciones de cobre en expresión y actividad de VWF.

20

Tabla 5. Comparación del Medio de Cultivo BAV-SP

Medio BAV-SP	
Componentes	mg/L
Amino Ácidos	
L-Alanina	4.45
HCl L-Arginina	147.50

25

5

10

15

20

25

L-Asparagina-H ₂ O	30.21
Ácido L-Aspártico	6.65
HCl-H ₂ O L-Cisteína	32.55
2HCl L-Cistina	57.35
Ácido L-Glutámico	7.35
Glicina	18.75
HCl L-Histidina-H ₂ O	31.48
Hidroxi-L-Prolina	
L-Isoleucina	54.47
L-Leucina	59.05
HCl L-Lisina	91.25
L-Metionina	17.24
L-Fenilalanina	35.48
L-Prolina	52.24
L-Serina	26.25
L-Treonina	53.45
L-Triptofano	29.01
2Na 2H ₂ O L-Tirosina	55.79
L-Valina	52.85
Vitaminas	
Ácido Ascórbico	3.499
Biotina	0.0035
Cloruro de colina	8.980
D-Ca-Pantotenato	2.240
Ácido Fólico	2.650
I-Inositol	12.600
Nicotinamida	2.020
HCl Piridoxina	2.031
Riboflavina	0.219
HCl Taiamina	2.170
Vitamina B12	0.680
Sales Anorgánicas	
Cloruro de Calcio (CaCl ₂)	116.600
Sulfato de Cobre (CuSO ₄ -5H ₂ O)	0.0013
Nitrato Férrico (Fe(NO ₃) ₃ -9H ₂ O)	0.050
Sulfato Ferroso (FeSO ₄ -7H ₂ O)	0.417

5

10

Cloruro de Magnesio (MgCl2)	28.640
Sulfato de Magnesio (MgSO4)	48.840
Cloruro de Potasio (KCl)	311.800
Cloruro de Sodio (NaCl)	6995.500
Fosfato de Sodio (Na2HPO4)	71.020
Fosfato de Sodio (NaH2PO4)	62.500
Sulfato de Zinc Heptahidratado (ZnSO4-7H2O)	0.432
Selenita de Sodio	0.0131
Otros	
D-Glucosa	3151
Ácido Linoléico	0.042
Ácido Lipoico	0.105
Putrescina 2HCl	0.081
Timidina	0.365
Hipoxantina Na	2.390
Piruvato de Sodio	55.000

Tabla 6. Composición de BAV-SP Suplementado

15

20

Componentes para formulación final	
L-Glutamina	600.00
Etanolamina	1.530
Sinperonico F68	250.000
Bicarbonato de Sodio (NaHCO3)	2000.000
Peptona de Soya	4000.00
Formulación Total	18596.8

Las células GD8/6 que expresan rVWF se hacen crecer en ya sea medio bajo en cobre (Tabla 7) o medio alto en cobre (Tabla 8) por 7 días. Después de 2 días, los cultivos se subcultivaron para realizar un cultivo por lote por un

periodo de 5 días. Las muestras del sobrenadante del cultivo se probaron diariamente para contenido de rVWF (ELISA vWF), total (Ristocetina) y específico (Actividad Específica) vía un ensayo del cofactor de ristocetina. Varios parámetros de cultivo, que incluyen conteo celular, viabilidad celular y concentración de amonio también son monitoreadas diariamente (excepto por lotes los días 3 y 4).

Inesperadamente, los cultivos se hacen crecer bajo altas concentraciones de cobre que producen sobrenadantes que contienen actividad rVWF específica y total significativamente alta (resultados comparados en la Tabla 7 y Tabla 8). Por ejemplo, en el lote del día 4, el cultivo celular se hace crecer bajo concentraciones altas en cobre que contienen actividad rVWF de 1.52 IU/mL, comparado a la actividad rVWF 0.2 IU/mL para el cultivo bajo en cobre. Esto es a pesar del hecho que el cultivo celular bajo en cobre que produce casi dos veces la cantidad de rVWF como el cultivo celular alto en cobre. Además, la actividad específica del sobrenadante obtenido del cultivo alto en cobre fue más de 13 veces mayor que del sobrenadante del cultivo bajo en cobre (831 mU/10 µg de rVWF contra 62 mU/10 µg de rVWF).

Como se observa en la Tabla 7 y Tabla 8, la actividad del cofactor de ristocetina total y específica del cultivo alto en cobre fue dos veces que la del cultivo bajo en cobre en el lote del día 1. Además, en contraste a los

subsecuentes incrementos en actividad observados en el cultivo alto en cobre, no se observa incremento en la cantidad de actividad del cofactor ristocetina después del lote del día 1 para el cultivo celular bajo en cobre.

5 Consistente con este resultado, el análisis de electroforesis en gel de agarosa del estado de multímero rVWF reveló que una baja concentración de rVWF de peso molecular bajo, en relación a la concentración de especies de rVWF de bajo peso molecular, está presente en el sobrenadante del cultivo

10 celular bajo en cobre en el lote del día 1, y que la concentración relativa además disminuye con el tiempo (Figura 1A y 1B). En contraste, la suplementación del medio de cultivo con Cu^{2+} resulta en la formación consistente del antígeno activo del cofactor ristocetina (RiCoF) a través del

15 cuarto día. Consistentemente, no hay pérdida en la cantidad de multímeros rVWF de alto peso molecular estables ocurrido a través del día 4 del cultivo por lote (Figura 1A y 1B). Los resultados densitométricos del electroforesis en gel de agarosa mostrados en la Figura 1B reveló que las condiciones

20 bajas en cobre del cultivo fue solamente capaz de producir una población de rVWF en el cual más del 10% (es decir, 16.3%) del rVWF está presente en moléculas que tienen más de 10 dímeros para un día del cultivo por lotes (es decir, muestra del "día 3" en Línea 2 del gel de agarosa de la

25 Figura 1A), y notablemente, esta población cayó solamente al

4% en el día 5 del cultivo por lotes (muestra del "día 7" en la Línea 6). En contraste bajo en condiciones altas en cobre, la cantidad relativa de multímeros vWF con más de 10 dímeros es consistentemente alrededor de 30% a través del día 4 del cultivo por lotes ("día 3" a "día 6" en Líneas 7-10; 28% a 31.4%).

Notablemente, iniciando en el lote del día 5 del cultivo por lotes alto en cobre, cuando los niveles de NH_4^+ exceden 100 mg/L (mayor que aproximadamente 5.0 mM), la expresión del antígeno adicional (18.3 a 35.4 $\mu\text{g/L}$; comparado al lote de los días 4 y 5 de la Tabla 8) no resulta en un incremento concomitante en la actividad de RiCoF presente en el sobrenadante. Consistente con este resultado, el nivel de multímeros rVWF de alto peso molecular en el lote del día 5 (día 7 del cultivo) disminuye en la relación a la concentración de multímeros rVWF de bajo peso molecular. También solamente en el lote del día 5 (muestra del "día 7" del cultivo en la Línea 11), la cantidad relativa del vWF con más de 10 dímeros es reducido a 21.4%.

Tomados juntos, los datos proporcionados anteriormente demuestran que la suplementación de concentraciones de cobre en cultivos celulares que expresan rVWF dramáticamente incrementa la actividad del cofactor de ristocetina rVWF total y específica, así como también la producción estable de multímeros rVWF de alto pero molecular.

Además, los datos muestran una correlación entre la presencia de concentraciones de NH_4^+ altas en los cultivos celulares y la pérdida de la actividad del cofactor ristocetina rVWF y producción del multímero rVWF de alto peso molecular.

5

Tabla 7. Expresión de rVWF en cultivo de células de mamífero realizados en forma de lote usando media BAV-SP con una concentración de cobre baja (1.0 $\mu\text{g/L}$).

10

Día del lote	Conteo celular [células 10E6/mL]	NH_4^+ [mg/l]	Viabilidad [%]	ELISA vWF [$\mu\text{g/ml}$]	Risto-cetina [IU/mL]	Actividad específica mU/10 μg
0	0.42	21	98.8	n.d.	n.d.	n.d.
1	0.78	43	n.d.	6.3	0.23	365
2	1.24	64	99.1	12.8	0.23	180
3	1.86	n.d.	n.d.	22.7	0.21	93
4	2.49	n.d.	n.d.	32.2	0.20	62
5	3.11	106	98.3	44.4	0.20	45

15

Tabla 8. Expresión de rVWF en cultivo celular de mamífero realizados en forma de lote usando media BAV-SP con una concentración de cobre baja (1.0 $\mu\text{g/L}$).

20

Día del lote	Conteo celular [células 10E6/mL]	NH_4^+ [mg/l]	Viabilidad [%]	ELISA vWF [$\mu\text{g/ml}$]	Risto-cetina [IU/mL]	Actividad específica mU/10 μg
0	0.40	21	99.3	n.d.	n.d.	n.d.

25

5

1	0.71	42	n.d.	4.8	0.40	833
2	1.23	63	99.5	8.7	0.62	713
3	1.85	n.d.	n.d.	15.0	1.07	713
4	2.54	n.d.	n.d.	18.3	1.52	831
5	3.32	109	98.9	35.4	1.55	438

Ejemplo 3

10

15

20

25

Se co-expresaron el Factor Recombinante VIII (rFVIII) y el Factor de Von Willebrand (rVWF) en cultivos continuos de células GD8/6 operadas bajo condiciones quimiostáticas para determinar el efecto de la composición del medio de cultivo en expresión y actividad VWF. Brevemente, las células GD8/6 se cultivaron en medio BAV-SP que contiene 4 g/L de hidrolizado de soya con y sin suplementación de cobre como se describe en el Ejemplo 2. Para probar el efecto de concentraciones de cobre bajas en expresión y actividad rVWF, se usó medio BAV-SP basal. El medio basal contiene 0.3 µg/L de cobre y se suplementó con hidrolizado de soya, lo cual contribuye a 0.7 µg/L de cobre adicional, proporcionando una concentración de cobre final de 1.0 µg/L. Como una comparación, el medio BAV-SP usado para los cultivos por lote fue suplementado adicionalmente con 3.3 µg/L de Cu²⁺ adicional, proporcionando una concentración de cobre final de 4.3 µg/L, para determinar el efecto de concentraciones de cobre altas en expresión y actividad VWF. Los cultivos se hicieron crecer en la presencia de

concentraciones de cobre altas y bajas se cultivaron bajo densidades celulares tanto altas (2.8×10^6 células/mL) como bajas (aproximadamente 1.4×10^6 células/mL).

Como anteriormente, las muestras del sobrenadante del cultivo se probaron para contenido de rVWF (ELISA vWF), actividad total (Ristocetina) y específica (Actividad Específica) vía ensayo del cofactor ristocetina. También se monitorearon varios parámetros del cultivo, que incluyen conteo celular, viabilidad celular y concentración de amonio. Los datos se generaron de la fase de estado estable de las semanas 2 y 3 de los cultivos quimiostático (Tabla 9 a Tabla 13).

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

Conteo Celular	Concen- tración de cobre	Conteo Celular [células 10E6/mL]	NH ₄ ⁺ [mM]	Viabi- lidad [%]	ELISA vWF [µg/ml]	Risto- cetina [IU/mL]	Actividad específica [mU/10µg]
Alto	Baja	2.88	3.88	97.74	44.56	0.10	21.62
Alto	Alta	2.79	4.04	98.25	38.38	0.19	53.11
Bajo	Baja	1.55	3.33	98.63	18.96	0.10	50.16
bajo	Alta	1.43	3.17	98.59	11.76	0.70	598.76

Tabla 10. Expresión rVWF en cultivo celular quimioestático durante el conteo celular alto, condiciones de cobre bajas durante las semanas 2 y 3.

5

10

15

Día	Conteo Celular [células 10E6/mL]	NH4+ [mM]	Viabilidad [%]	ELISA vWF [µg/ml]	Ristocetina [IU/mL]	Actividad específica [mU/10µg]
8	2.54	3.7	98.20	39.8	0.095	23.86934673
9	3.02	4.2	97.40			
10	2.97	3.9	97.90	41.3	0.095	23.00242131
11	2.78					
13	2.91	3.8	97.60	41.7	0.095	22.78177458
14	2.90	3.8	97.40			
15	3.05	3.9	97.70	44.7	0.095	21.25279642
16	2.99	3.8	98.30			
17	2.76	3.9	97.40	55.3	0.095	17.17902351
	2.88	3.88	97.74	44.56	0.10	21.62

Tabla 11. Expresión rVWF en cultivo celular quimioestático durante el conteo celular alto, condiciones de cobre altas durante las semanas 2 y 3.

20

25

Día	Conteo Celular [células 10E6/mL]	NH4+ [mM]	Viabilidad [%]	ELISA vWF [µg/ml]	Ristocetina [IU/mL]	Actividad específica [mU/10µg]
8	2.52	3.9	98.30	31.8	0.35	110.0628931
9	2.92	4.3	98.50			
10	2.80	4.2	98.60	37.4	0.32	85.56149733
11	2.57					

5

13	2.81	3.9	98.50	37.6	0.095	25.26595745
14	2.92	3.9	97.80			
15	2.77	3.9	97.80	43.0	0.095	22.09302326
16	2.72	4.0	98.30			
17	3.04	4.1	98.20	42.1	0.095	22.56532067
	2.79	4.04	98.25	38.38	0.19	53.11

Tabla 12. Expresión rVWF en cultivo celular quimioestático durante el conteo celular bajo, condiciones de cobre bajas durante las semanas 2 y 3.

10

15

20

Día	Conteo celular [células 10E6/mL]	NH ₄ ⁺ [mM]	Viabilidad [%]	ELISA vWF [µg/ml]	Ristocetina [IU/mL]	Actividad específica [mU/10µg]
8	1.61	3.3	99.10	19.3	0.095	49.22279793
9	1.65	3.3	98.00			
10	1.49	3.3	98.90	18.6	0.095	51.07526882
11	1.58					
13	1.58	3.4	98.10	18.1	0.095	52.48618785
14	1.56	3.3	99.30			
15	1.52	3.3	98.50	18.9	0.095	50.26455026
16	1.50	3.3	98.40			
17	1.50	3.4	98.70	19.9	0.095	47.73869347
	1.55	3.33	98.63	18.96	0.10	50.16

25

Tabla 13. Expresión rVWF en cultivo celular quimioestático durante el conteo celular bajo, condiciones de cobre altas durante las semanas 2 y 3.

5

10

15

Día	Conteo celular [células 10E6/mL]	NH ₄ ⁺ [mM]	Viabilidad [%]	ELISA vWF [µg/mL]	Ristocetina [IU/mL]	Actividad específica [mU/10µg]
8	1.46	3.2	98.80	11.6	0.73	629.3103448
9	1.45	3.2	98.20			
10	1.37	3.1	98.90	11.0	0.7	636.3636364
11	1.43					
13	1.33	3.2	98.10	11.1	0.68	612.6126126
14	1.39	3.2	97.20			
15	1.51	3.2	99.70	12.4	0.69	556.4516129
16	1.49	3.2	98.60			
17	1.43	3.2	99.20	12.7	0.71	559.0551181
	1.43	3.17	98.59	11.76	0.70	598.76

20

25

Como se muestra en la Figura 2A, el sobrenadante recolectado del cultivo celular rVWF continuo que crece a densidades celulares bajas y concentraciones de cobre altas que contienen actividad específica alta (promedio de 600 mU/10 µg), mientras los sobrenadantes recolectados de los cultivos celulares rVWF que crecen a densidades celulares bajas en la presencia de concentraciones de cobre bajas que contienen actividades específicas bajas (menos de 100 mU/10 µg). Consistente con los resultados observados para cultivos por lotes, la Figura 2B muestra cultivos celulares de

mamífero continuos que expresan rVWF con actividades específicas altas que tienen concentraciones de NH_4^+ más bajas que los cultivos que produce rVWF con actividades específicas bajas. Estos datos además refuerzan la correlación entre la
5 concentración de NH_4^+ en el cultivo celular y la actividad específica de rVWF producido por el cultivo. Notablemente, la combinación de concentraciones de cobre altas y concentraciones de amino bajas en el cultivo celular permitidas para la producción de actividad rVWF
10 significativamente mejorada.

Consistente con este resultado, el análisis de electroforesis en gel de agarosa del estado de multímero rVWF de cultivos quimioestado (Figura 6) reveló que solamente los sobrenadantes de los cultivos operados a densidades de cobre
15 altas y celulares bajas y así el amonio bajo resultó en un vWF multimérico de expresión alta consistente (aproximadamente 23% a 27% en CST a los días 8, 17 y 24 en Líneas 4, 8 y 12, respectivamente). Todas las otras condiciones no alcanzan cantidades consistentemente altas de
20 más del 10% de vWF con más de 10 dímeros durante un periodo de cultivo prolongado.

Ejemplo 4

Para determinar el efecto de la concentración de
25 cobre en el medio de cultivo en la expresión y actividad

específica de rA13, se hicieron crecer cultivos celulares de mamífero que expresan rA13 por 4 semanas bajo condiciones de cultivo continuo quimiostático en medio ADAMTS13 que comprende BESP845del medio basal DMEM/F12 y suplementos adicionales (Tabla 14) que contiene concentraciones de cobre que varía de 0.66 µg/L (sin suplementación de cobre adicional) y con suplementación de cobre adicional a 4 µg/L. Como se muestra en la Tabla 5, incrementando la concentración de cobre en el medio de cultivo celular resulta en un incremento significativo en productividad volumétrica (P) y específica (q) expresada como la actividad de rA13 total producida por litro de cultivo y día, y la actividad de rA13 total producida por célula y día, respectivamente.

15 **Tabla 14.** Composición del medio ADAMTS13.

	BESP845 de DMEM/F12	
	Aminoácidos	mg/L
	L-Alanina	13.3500
	HCl L-Arginina	147.5000
20	L-Asparagina-H ₂ O	45.1600
	Ácido L-Aspártico	19.9500
	HCl-H ₂ O L-Cisteína	32.5500
	2HCl L-Cistina	102.3500
25	Ácido L-Glutámico	22.0500

5

10

15

20

25

Glicina	26.2500
HCl L-Histidina-H ₂ O	51.4800
L-Isoleucina	74.4700
L-Leucina	119.0500
HCl L-Lisina	146.2500
L-Metionina	100.0000
L-Fenilalanina	60.4800
L-Prolina	63.7400
L-Serina	36.7500
L-Treonina	53.4500
L-Triptofano	29.0100
2Na 2H ₂ O L-Tirosina	75.7900
L-Valina	82.8500
Sales	mg/L
Cloruro de Calcio (CaCl ₂)	116.6000
Sulfato de Cobre (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	0.0026
Nitrato Férrico (Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O)	0.0500
Sulfato Ferroso (FeSO ₄ ·7H ₂ O)	1.0170
Cloruro de Magnesio (MgCl ₂)	28.6400
Sulfato de Magnesio (MgSO ₄)	48.8400
Cloruro de Potasio (KCl)	311.8000
Cloruro de Sodio (NaCl)	5495.5000
Na ₂ HPO ₄ Anhidro	213.0200
NaH ₂ PO ₄ Anhidro	54.3500

20x

5

10

15

20

25

Sulfato de Zinc Heptahidratado (ZnSO4-27H2O)	0.4320
Selenita de Sodio anhidro	0.0087
Vitaminas	mg/L
Ácido Ascórbico	3.4990
Biotina	0.2035
Cloruro de Colina	26.9800
D-Ca-Pantotenato	6.2400
Ácido Fólico	6.6500
I-Inositol	36.6000
Nicotinamida	7.0200
HCl Piridoxina	6.0310
Riboflavina	0.6590
HCl Tiamina	6.5100
Vitamina B12	2.6800
Miscelánea	mg/L
D-Glucosa	5000.0000
Ácido Linoleico	0.0420
Ácido Lipoico	1.0050
2HCl Putrescina	3.6810
Timidina	0.3650
Na Hipoxantina	2.3900
Piruvato de Sodio	55.0000

5

DMEM/F12 BESP845: Total	12738.3
Suplementos del medio ADAMTS-13	mg/L
L-Glutamina	1300.0000
F68Plurónico	1000.0000
Etanolamina	1.5300
ZnSo4*7 H2O	1.0000
Na-Hidrogencarbonato	1500.0000
Suplementos Totales	3802.5
Cantidad Total de Ingredientes	16540.8

10

15

20

Para determinar si las concentraciones de cobre incrementadas afectan la integridad del rA13 expresado, se examinó el sobrenadante recolectado de cultivos celulares rA13 que crecen en medio que contiene 0.66 µg/L, 1 µg/L y 4 µg/L de cobre por análisis SDS-PAGE. Como se observa en la Figura 3A (tinte de plata) y Figura 3B (manchado western anti-A13), no se observaron cambios obvios en la calidad del producto por electroforesis en gel. Específicamente, no hay incremento en el nivel de 170 kD truncado u otras variantes rA13 MW bajos y no hay otras bandas HCP adicionales o incrementadas resultado de la expresión rA13 en la presencia de concentraciones de cobre incrementadas.

25

Para estimar una concentración óptima de cobre en la actividad de rA13, una extrapolación de datos de la Tabla 15 de P Frest contra concentración de cobre (Figura 4)

muestra que el efecto óptimo es igualmente alcanzado a aproximadamente 2 µg/L, con una estimación conservadora de un efecto negativo por arriba de aproximadamente 4 µg/L.

5 **Tabla 15.** Expresión de rA13 en cultivo celular de mamífero realizado en modo de cultivo continuo quimostático usando medio que contiene concentraciones de cobre variables.

10

Media del Experimento R&D a Escala 10L de 4 semanas CST	ZZ - NC	P Frets	q Frets	Actividad Especifica
	[células 10E6/mL]	[U/ (L*d)]	[U/ (células 10E9*d)]	U/mg
0.66 µg/L Cu ²⁺	1.35	1322	1028	1759
1 µg/L Cu ²⁺	1.64	1962	1247	1690
4 µg/L Cu ²⁺	2.26	2960	1338	1768

15

20

25

En base a los resultados obtenidos anteriormente, se realiza un experimento adicional, el cual compara la expresión de rA13 en medio de cultivo celular que contiene 0.66 µg/L de cobre con 2.0 µg/L de cobre. Como se muestra en la Tabla 16, la suplementación del medio celular basal con cobre, para una concentración final de 2.0 µg/L de cobre, resultando en un incremento significativo en productividad volumétrica (P) y específica (q) expresada como la actividad de rA13 total producida por litro de cultivo y día, y la actividad de rA13 total producida por célula y día, respectivamente, durante un periodo de 8 semanas. Los datos

específicos para cada semana de producción de rA13 en los dos cultivos se muestran en la Figura 5. A partir de estos datos, es claro que la suplementación con cobre tiene un efecto benéfico medible en metabolismo celular, velocidad de crecimiento específico y productividad de rA13.

Tabla 16. Expresión de rA13 en cultivo celular de mamífero realizado en modo de cultivo continuo quimostático usando medio que contiene concentraciones de cobre variables.

Media a Escala 10L de semanas CST	ZZ - NC	P Frets	q Frets	Actividad específica
	[células 10E6mL]	[U/ (L*d)]	[U/ (células 10E9*d)]	U/mg
0.66 µg/L Cu ²⁺	1.29	1049	821	1862
2 µg/L Cu ²⁺	2.17	2470	1146	1749

Se entenderá que los ejemplos y modalidades descritas en la presente son para propósitos ilustrativos solamente y que se pueden sugerir varios cambios o modificaciones en vista de la misma a personas expertas en la técnica y deben ser incluidos dentro del espíritu y competencia de esta solicitud y alcance de las reivindicaciones adjuntas. Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patentes citadas en la presente son por este medio incorporadas para referencia en su totalidad para todos los propósitos.

REIVINDICACIONES

Habiéndose descrito la invención como antecede, se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes.

5 1. Un método para producir una composición del Factor Von Willebrand recombinante (rVWF), caracterizado porque el método comprende las etapas de:

 (a) proporcionar un medio de cultivo de células basales;

10 (b) suplementar el medio de cultivo de células basales con cobre para proporcionar una concentración de cobre final de al menos 2.4 µg/L;

 (c) proporcionar una o más células que comprenden un ácido nucleico que codifica una proteína del rvWF;

15 (d) cultivar una o más células en el medio de cultivo de células suplementadas con cobre de manera que el rVWF se expresa y excreta de las células en un cultivo de sobrenadante; and

 (e) recuperar al menos una porción del cultivo
20 sobrenadante,

 en donde el sobrenadante recuperado tiene una actividad del cofactor de ristocetina específico del rVWF de al menos 30 mU/µg del rVWF.

 2. El método de conformidad con la reivindicación
25 1, caracterizado porque además comprende la etapa de

suplementar el medio de cultivo de células basales con un hidrolizado previo a cultivar una o más células.

3. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque el hidrolizado es un hidrolizado de
5 planta.

4. El método de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado porque el hidrolizado es un hidrolizado de soya.

5. El método de conformidad con cualquiera de las
10 reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el medio de cultivo de células basales es un medio de cultivo libre de proteína animal.

6. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el medio de
15 cultivo de células basales es un medio de cultivo libre de proteína.

7. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque el medio de cultivo de células basales es un medio de cultivo libre
20 químicamente definido.

8. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque la concentración final de cobre del medio de cultivo de células basales suplementado con cobre es al menos 4 µg/L de cobre.

25 9. El método de conformidad con cualquiera de las

reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque la concentración final de cobre del medio de cultivo de células basales suplementado con cobre es entre 2.4 µg/L y 20 µg/L de cobre.

5 10. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque el medio de cultivo de células basales suplementado con cobre se proporciona como una sal de cobre, un quelato de cobre, o una combinación de los mismos.

10 11. El método de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque la sal de cobre se selecciona del grupo que consiste de sulfato de cobre, acetato de cobre, carbonato de cobre, cloruro de cobre, hidróxido de cobre, nitrato de cobre y óxido de cobre.

15 12. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque una o más células son células de mamífero.

13. El método de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque las células de mamífero son células CHO.

20 14. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado porque cultivar una o más células comprende cultivación por lotes de las células.

25 15. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado porque cultivar una o más células comprende cultivación continua de las células.

16. El método de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque la cultivación continua de células se realiza en modo quimiostático.

5 17. El método de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque la cultivación continua de células se realiza en modo de perfusión.

18. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, caracterizado porque una o más células se cultivan en al menos 100 L del medio de cultivo
10 suplementado a base de células basales.

19. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, caracterizado porque la densidad celular se mantiene a menos de 2.5×10^6 células por mL durante la etapa de cultivar una o más células.

15 20. El método de conformidad con la reivindicación 19, caracterizado porque la densidad celular se mantiene a menos de 2.0×10^6 células por mL durante la etapa de cultivar una o más células.

20 21. El método de conformidad con la reivindicación 19, caracterizado porque la densidad celular se mantiene a menos de 1.5×10^6 células por mL durante la etapa de cultivar una o más células.

22. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, caracterizado porque la etapa de
25 recuperar al menos una porción del cultivo sobrenadante

comprende filtración o centrifugación para remover las células de la porción del sobrenadante del cultivo.

23. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, caracterizado porque el sobrenadante recuperado tiene una actividad del cofactor de ristocetina específico del rVWF de al menos 40 mU/ μ g del rVWF.

24. El método de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado porque el sobrenadante recuperado tiene una actividad del cofactor de ristocetina específico del rVWF de al menos 50 mU/ μ g del rVWF.

25. El método de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado porque el sobrenadante recuperado tiene una actividad del cofactor de ristocetina específico del rVWF de al menos 60 mU/ μ g del rVWF.

26. El método de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado porque el sobrenadante recuperado tiene una actividad del cofactor de ristocetina específico del rVWF de al menos 70 mU/ μ g del rVWF.

27. El método de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado porque el sobrenadante recuperado tiene una actividad del cofactor de ristocetina específico del rVWF de al menos 80 mU/ μ g del rVWF.

28. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27, caracterizado porque al menos 10% del rVWF en el sobrenadante está presente en un multímero del

VWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros.

29. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27, caracterizado porque al menos 20% del rVWF en el sobrenadante está presente en un multímero del VWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros.

30. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27, caracterizado porque al menos 30% del rVWF en el sobrenadante está presente en un multímero del VWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros.

31. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, caracterizado porque el sobrenadante contiene multímero del VWF de alto peso molecular de 14 a 22 dímeros.

32. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31, caracterizado porque el contenido de NH₄⁺ of el sobrenadante de cultivo celular se mantiene a una concentración por debajo de 10 mM.

33. El método de conformidad con la reivindicación 32, caracterizado porque el contenido de NH₄⁺ of el sobrenadante de cultivo celular se mantiene a una concentración por debajo de 4 mM.

34. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 33, caracterizado porque el rVWF es co-expresado con el Factor VIII recombinante (rFVIII).

35. El método de conformidad con la reivindicación

34, caracterizado porque además comprende una etapa de purificación del rVWF lejos de al menos 50% del rFVIII presente en el sobrenadante recuperado.

36. El método de conformidad con la reivindicación 5 35, caracterizado porque la relación del rVWF a rFVIII después de la etapa de purificación es al menos 10:1.

37. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, caracterizado porque el método además comprende una etapa de enriquecimiento del rVWF.

10 38. Un sobrenadante de cultivo celular que comprende el Factor Von Willebrand recombinante (rVWF), caracterizado porque el sobrenadante se prepara por un método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

15 39. Un sobrenadante de cultivo celular que comprende el Factor Von Willebrand recombinante (rVWF), caracterizado porque al menos 20% del rVWF en el sobrenadante está presente en un multímero del VWF de alto peso molecular de más de 10 dímeros.

20 40. Un sobrenadante de cultivo celular que comprende el Factor Von Willebrand recombinante (rVWF), caracterizado porque el sobrenadante contiene al menos 0.5 IU de actividad del cofactor de ristocetina por mL.

25 41. Una composición del Factor Von Willebrand recombinante (rVWF) caracterizada porque se prepara por un

método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 37.

42. La composición de conformidad con la reivindicación 41, caracterizada porque la composición además
5 comprende el Factor VIII recombinante (rFVIII).

43. La composición de conformidad con la reivindicación 42, caracterizada porque la relación del rVWF a rFVIII es al menos 10:1.

44. La composición de conformidad con la
10 reivindicación 42 o 43, caracterizada porque la composición es formulada para administración farmacéutica.

45. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 42 a 44, caracterizada porque la composición es formulada para administración intravenosa.

15

20

25

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere entre otros
aspectos, a condiciones de cultivo celular para producir vWF
5 de alto peso molecular, en particular, WF altamente
multimérico con una alta actividad específica y ADAMTS13 con
una alta actividad específica. Las condiciones de cultivo
celular de la presente invención pueden incluir, por ejemplo,
un medio de cultivo celular con una concentración
10 incrementada de cobre y/o sobrenadante de cultivo celular con
una baja concentración de amonio (NH_4^+). La presente
invención también proporciona métodos para cultivar células
in las condiciones de cultivo celular para expresar vWF de
15 alto peso molecular y rA13 que tiene altas actividades
específicas.

20

25

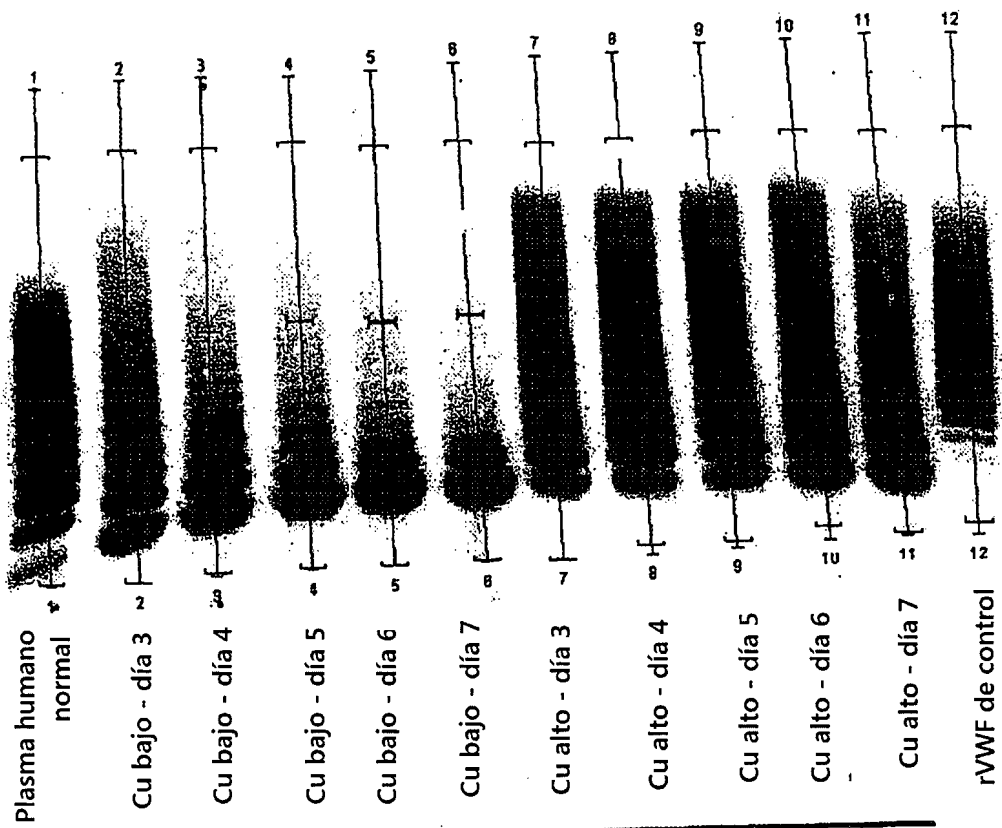


FIG. 1A

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

FIG. 1B

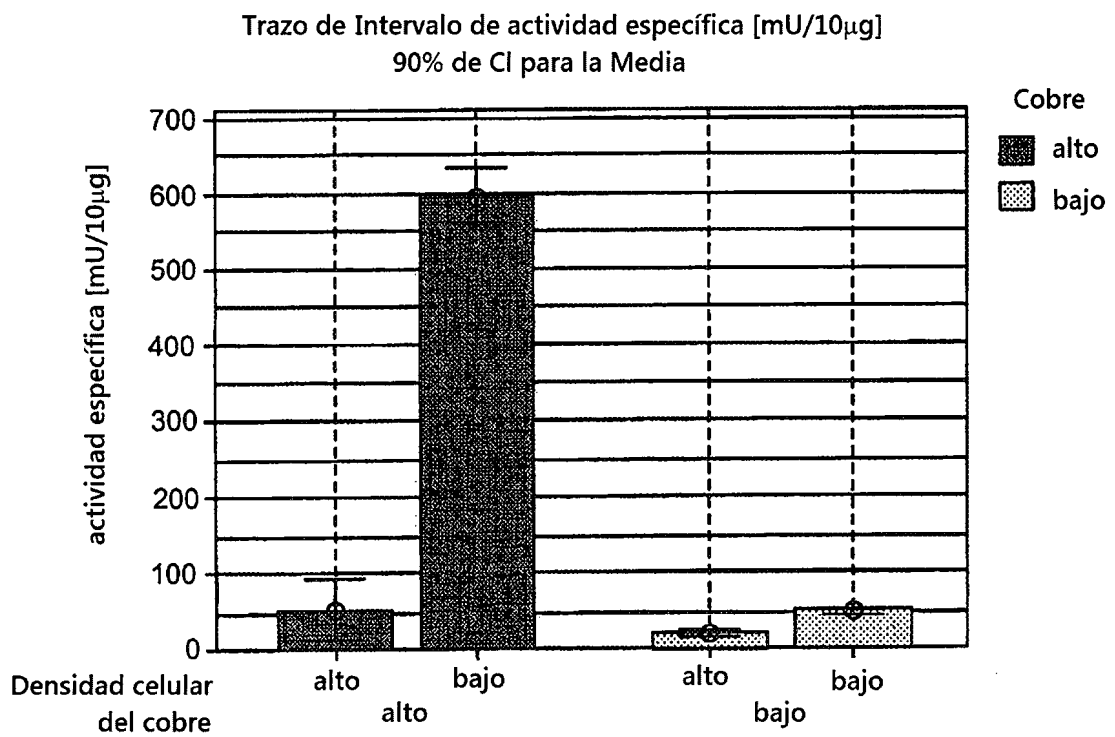


FIG. 2A

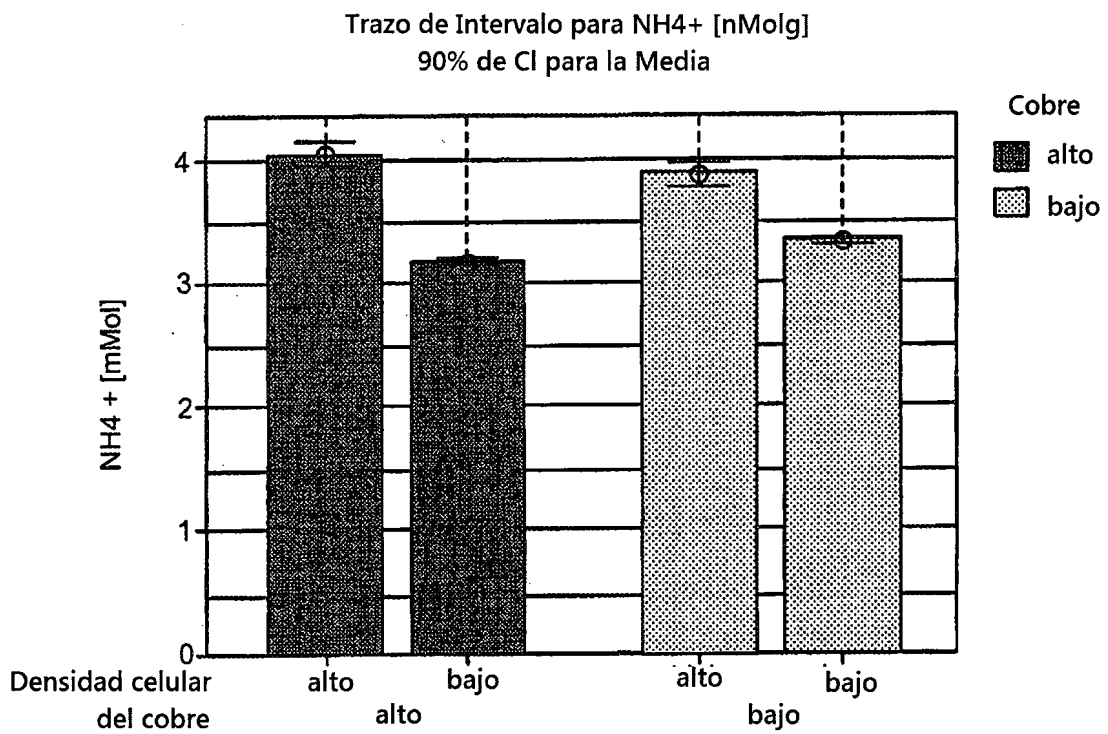


FIG. 2B

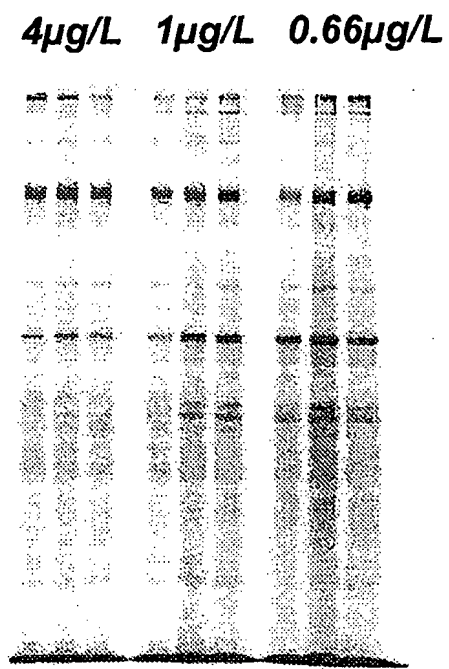
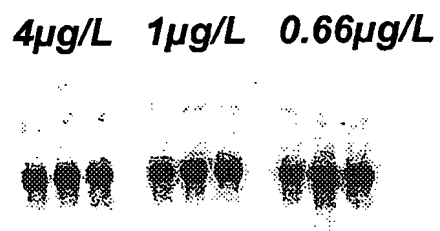


FIG. 3A



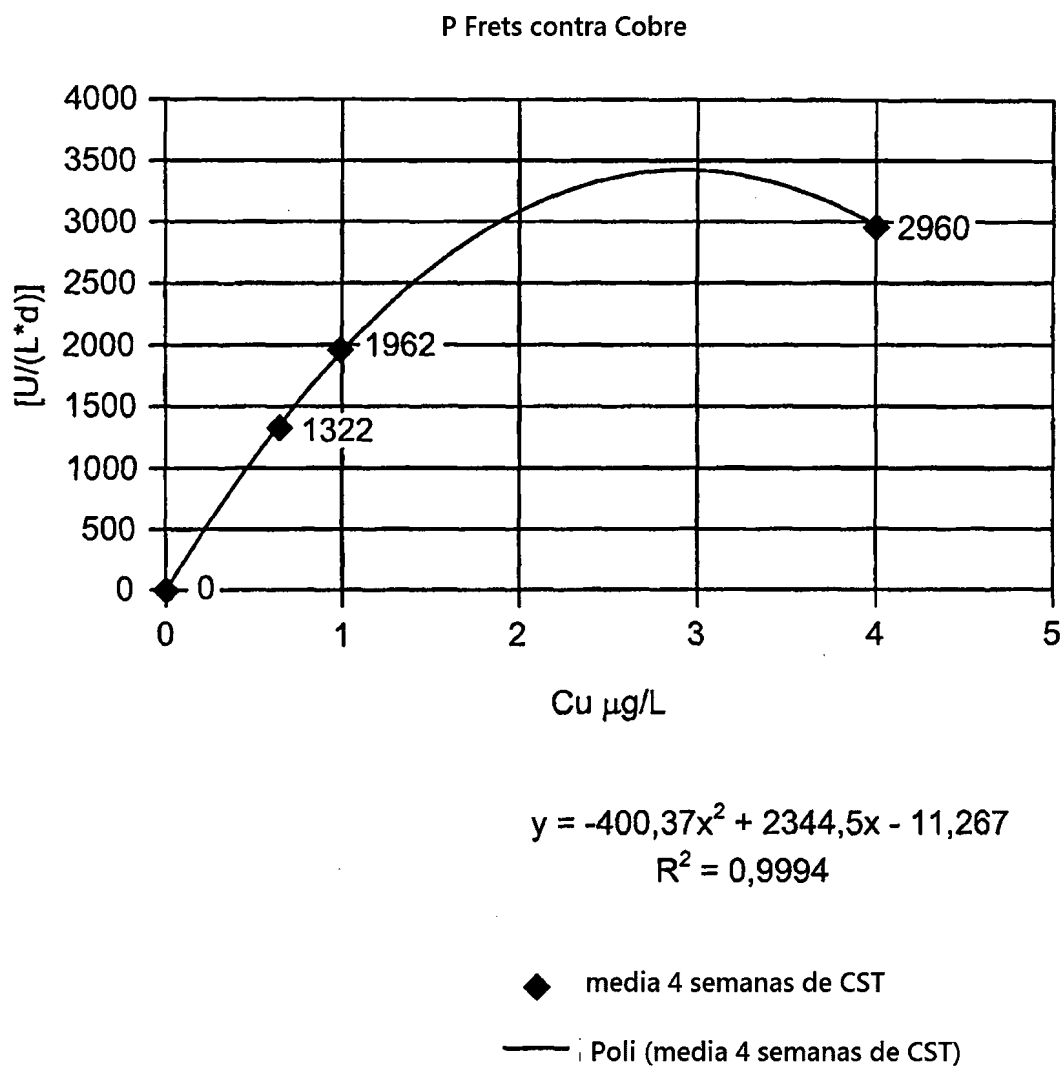


FIG. 4

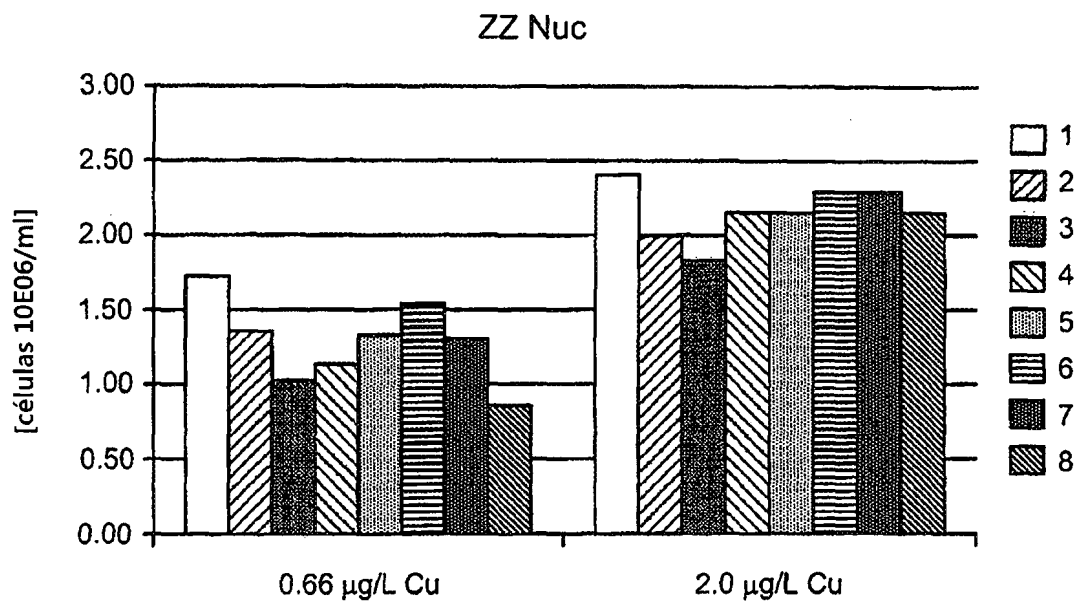


FIG. 5A

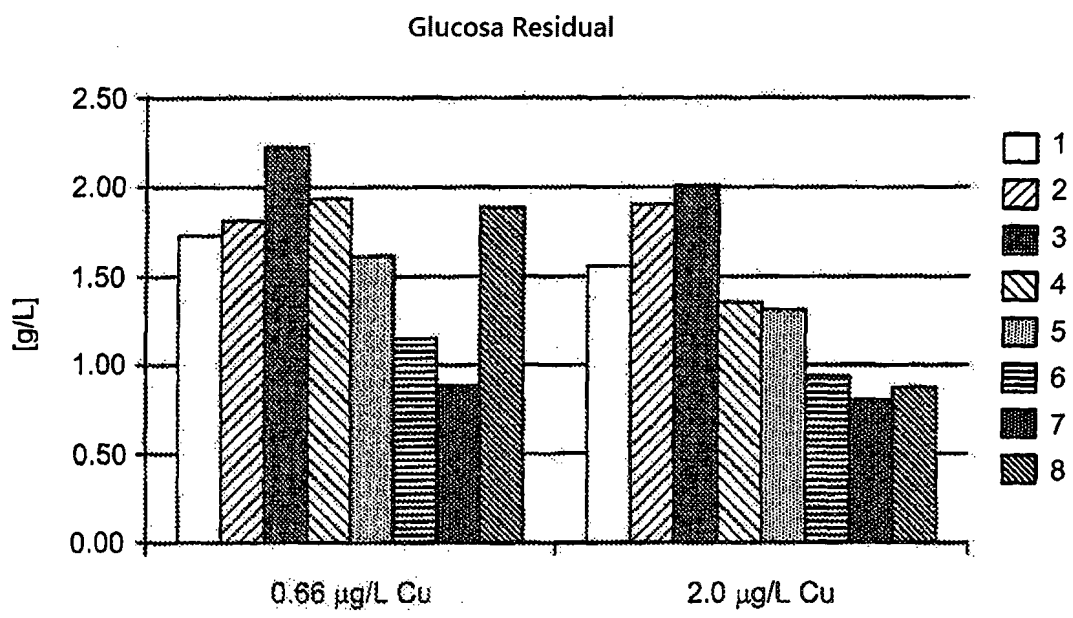


FIG. 5B

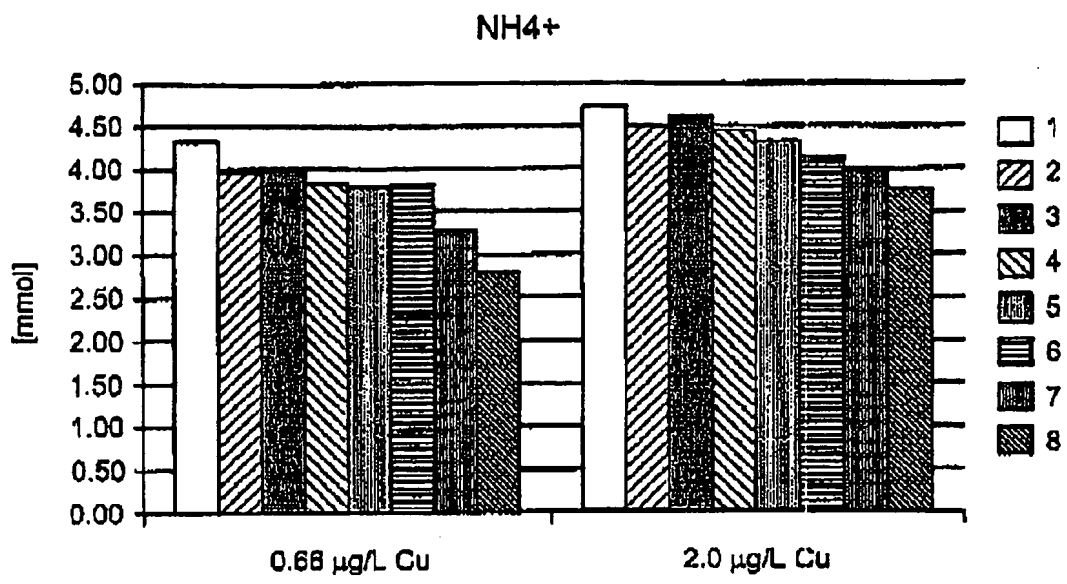


FIG. 5C

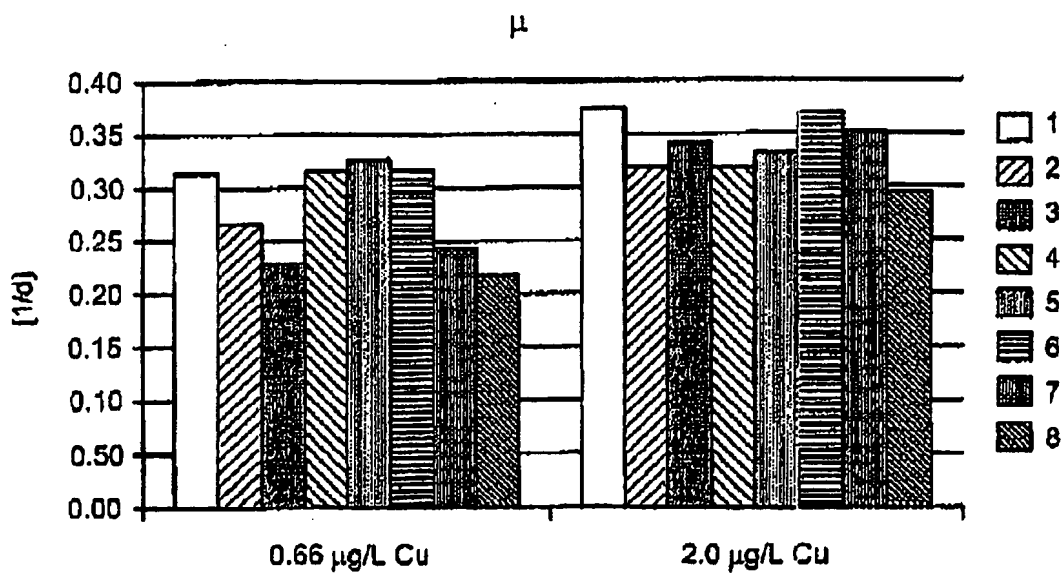


FIG. 5D

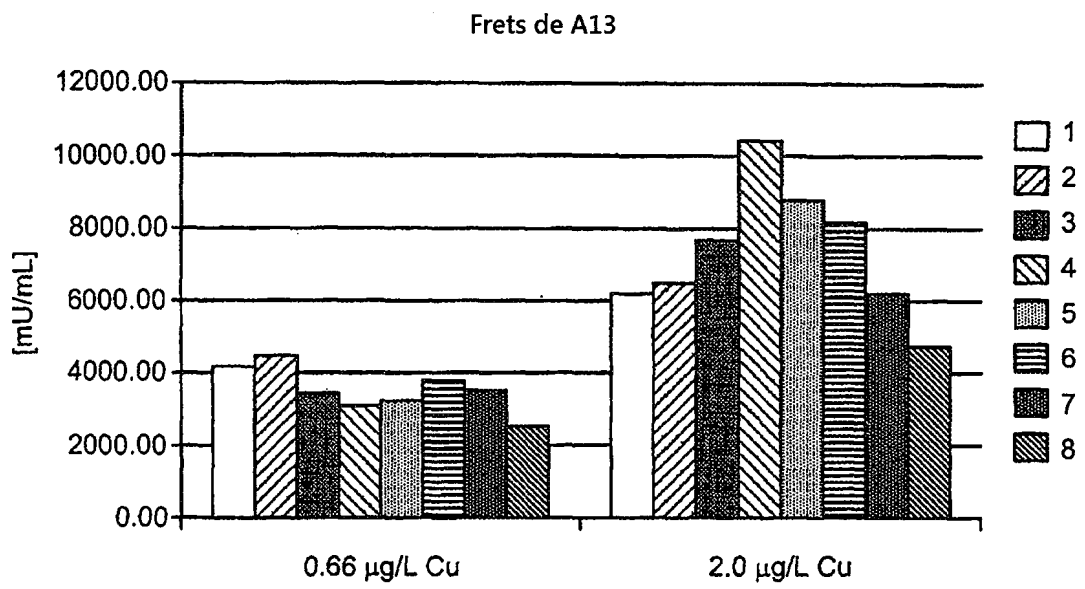


FIG. 5E

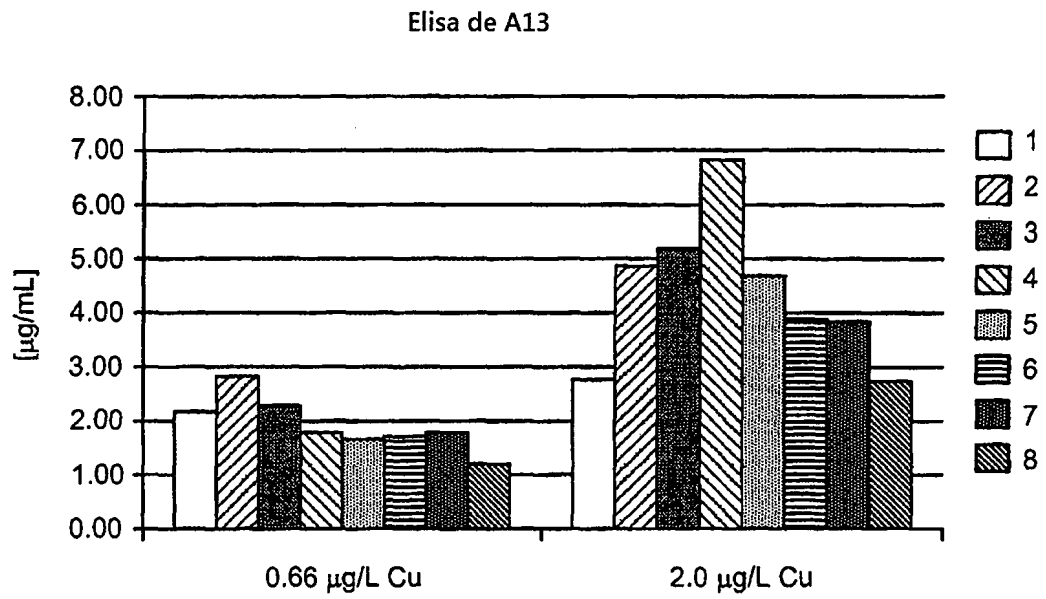


FIG. 5F

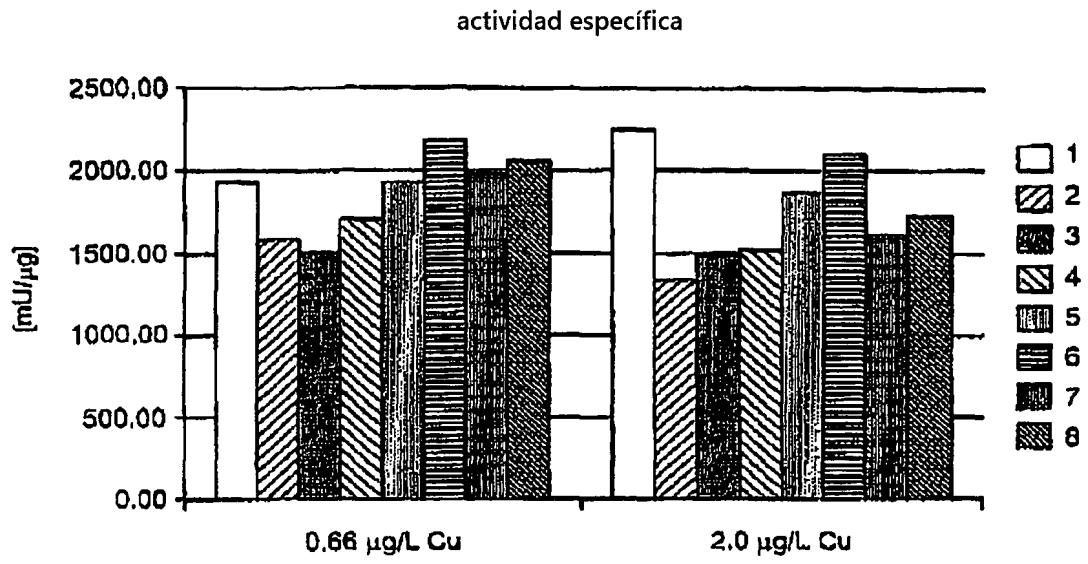


FIG. 5G

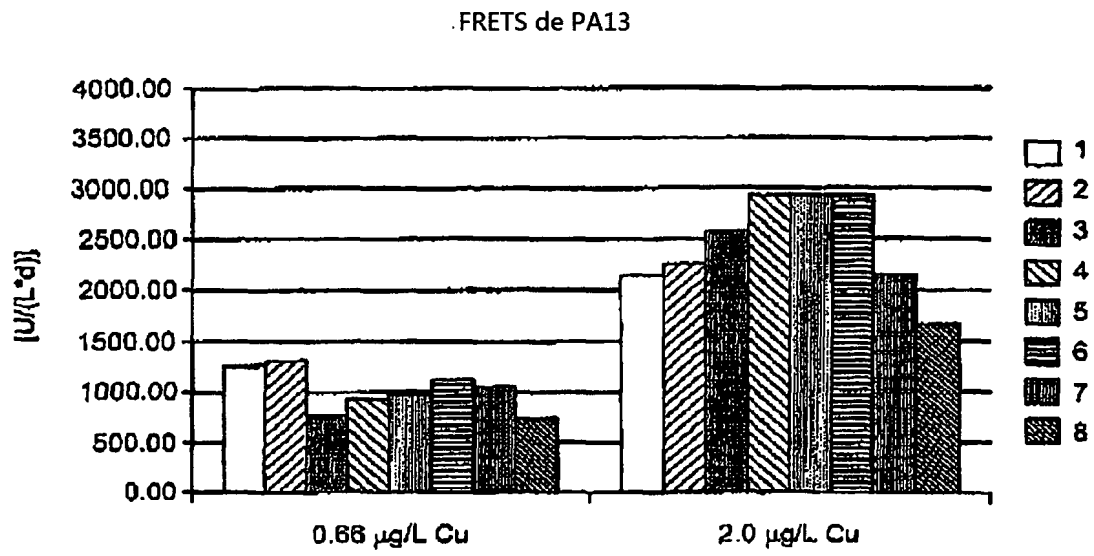


FIG. 5H

10/13
ELISA de P A13

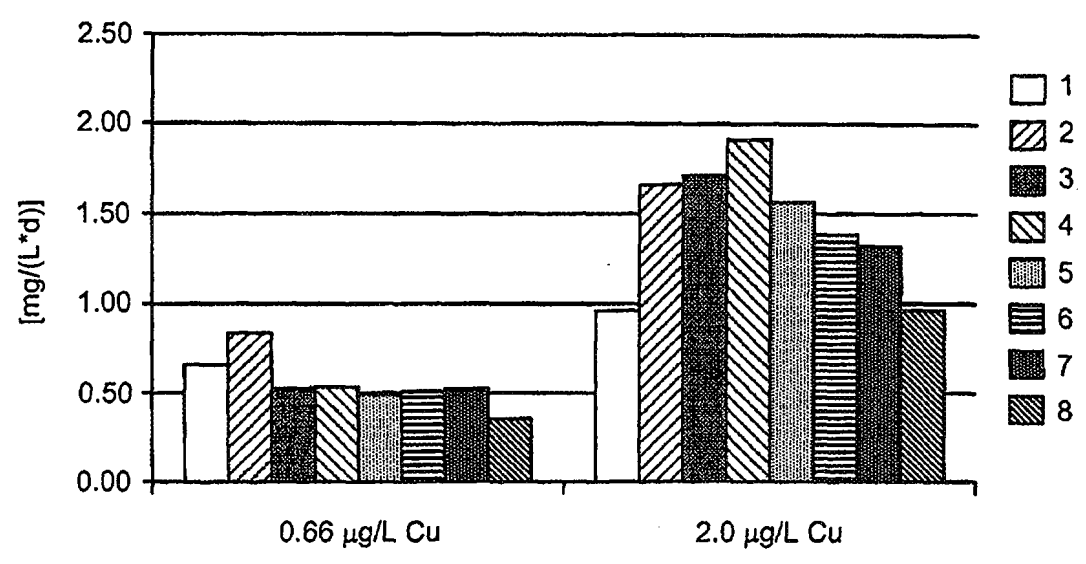


FIG. 5I

FRETS de q A13

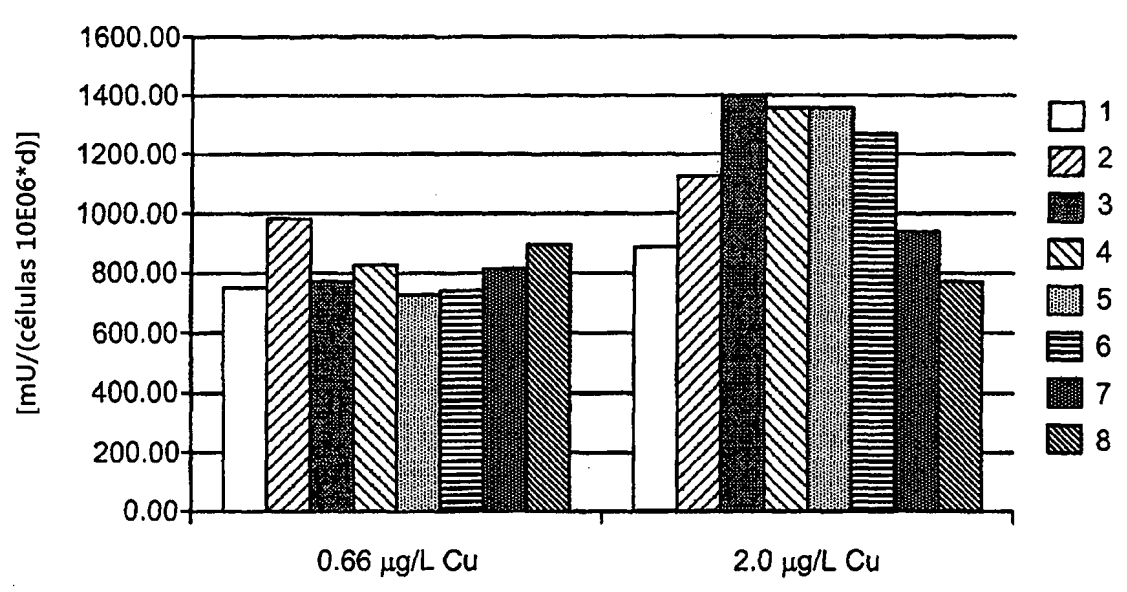


FIG. 5J

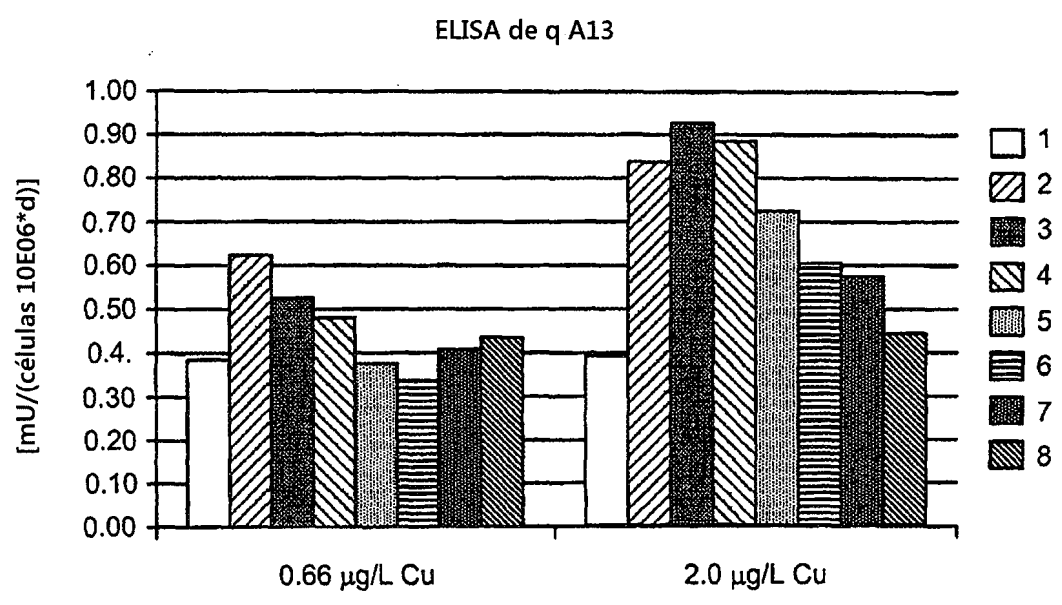


FIG. 5K

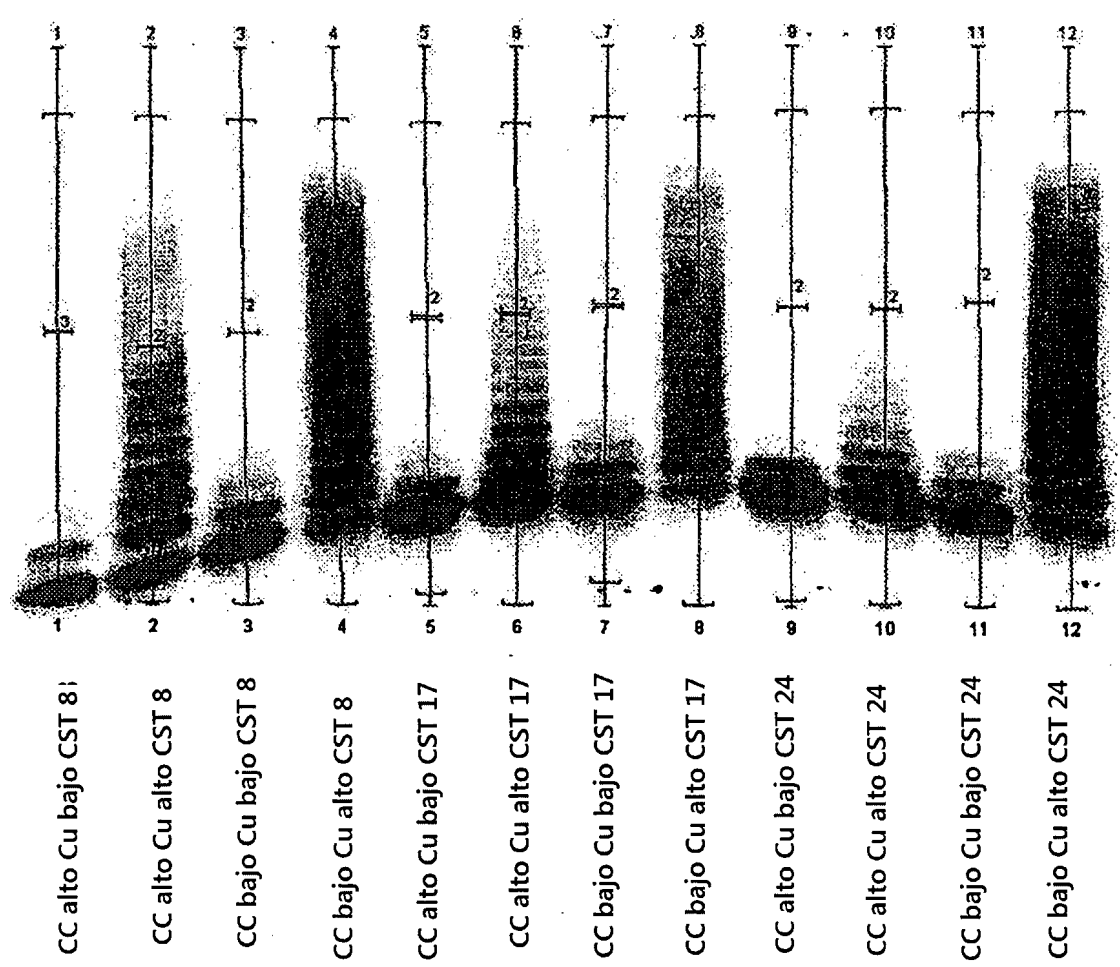


FIG. 6A

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

FIG. 6B

Notaría
Sexta



DEL CÍRCULO DE BOGOTÁ D.C.

COPIA NUMERO 13

DE LA ESCRITURA NUMERO: 1149
FECHA: 04/Marzo/2010

ACTO O CONTRATO:
PODER ESPECIAL
OTORGANTES:
CAVELIER ABOGADOS
LUZ CLEMENCIA DE PAEZ



CERTIFICADO SC 3960-1
PRESTACION DEL
SERVICIO PUBLICO
NOTARIAL
ISO 9001:2000
NTC-ISO 9001:2000



AMPARO QUINTERO ARTURO

NOTARIA SEXTA

CARRERA 9 No. 69-31 - PBX: 317 01 00 - FAX: 314 56 41

Correo Electrónico: notaria6debgta@etb.net.co

7 700004 347349



ESCRITURA PUBLICA NUMERO: -- 1149 --
-- MIL CIENTO CUARENTA Y NUEVE --
FECHA: MARZO CUATRO (4) --
DEL AÑO DOS MIL DIEZ (2010) --
NOTARIA SEXTA (6ª) DE BOGOTA D.C.-----

CLASE DE ACTO: PODER ESPECIAL

RAZON SOCIAL : CAVELIER ABOGADOS NIT : 860.041.367-3

En la ciudad de Bogotá, Distrito Capital, ante mí. AMPARO QUINTERO ARTURO
Notario Sexto (6º) de éste

Círculo Notarial, se otorgó la escritura pública que se consigna en los
siguientes términos: -----

CONSTANCIA SOBRE COMPARECENCIA Y DECLARACIONES ANTE EL
NOTARIO : -----

COMPARECIO : Con minuta (correo electrónico) compareció el señor
CARLOS ALBERTO GALLÓN GIRALDO, mayor de edad, vecino de esta
ciudad, casado, identificado con la cédula de ciudadanía No. 19.066.425 de
Bogotá, y dijo: -----

ESTIPULACIONES:

PRIMERA. Que obra en su calidad de representante legal de la sociedad
denominada CAVELIER ABOGADOS, NIT : 860.041.367-3 domiciliada en
la Carrera 4 No. 72-35, Bogotá, Colombia. -----

SEGUNDA: Que BAXTER INTERNATIONAL INC., sociedad constituida y
existente bajo las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de
América, domiciliada en One Baxter Parkway, Deerfield, Illinois, Estados
Unidos de América, designó a CAVELIER ABOGADOS como su
representante para la Propiedad Industrial en Colombia con facultades de
nombrar apoderados tal como consta en la copia auténtica del documento
de representación que se protocoliza. -----

TERCERA.- Que en su carácter de representante legal de CAVELIER
ABOGADOS, y en desarrollo de la facultad otorgada por BAXTER
INTERNATIONAL INC., confiere poder a los abogados LUZ CLEMENCIA
DE PAEZ, T.P.A. No. 23.555, identificada con cédula de ciudadanía número
35.456.344 de Usaquen, NIDIA OSORIO LOPEZ, T.P.A. No.73.366,



identificada con cédula de ciudadanía número 39.787.682 de Bogotá, **OSCAR FERNANDO CORREA BARBOSA**, T.P.A. No. 71.027 identificado con cédula de ciudadanía número 79.524.634 de Bogotá, **EDNA DARMELY SARMIENTO CHARRY**, T.P.A. 65.794 identificada con cédula de ciudadanía número 52.006.265 de Bogotá y **JORGE CHAVARRO ARIZTIZABAL**, T.P.A. No. 40.119, identificado con cédula de ciudadanía número 16.209.380 de Cartago (Valle), mayores de edad, vecinos de Bogotá, para que representen a la sociedad a cuyo nombre actúa, ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, incluyendo las del orden administrativo, contencioso administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, diseños industriales, trazado de circuitos integrados, secretos industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales, denominaciones de origen e indicaciones de procedencia, su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones, cancelación administrativa o judicial, nulidad, medidas cautelares, acción por infracción, concesión de licencias, la protección de secretos industriales y de nombres de dominio junto con su administración y pago; acciones populares, de tutela y de cumplimiento; y en general los procesos civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos, de conciliación, arbitramento, tutela relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. **CUARTA.-**

Que los apoderados designados están facultados en todos los asuntos arriba determinados para sustituir este mandato, transigir, conciliar, arbitrar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y ratificar los actos de agentes oficiosos. **QUINTA.-** Que protocoliza con la presente escritura, un certificado expedido por la Cámara de Comercio de Bogotá, que acredita la constitución y personería de la sociedad **CAVELIER ABOGADOS**, igualmente protocoliza copia autenticada del



5873

SPRINGFIELD, ILLINOIS

APOSTILLE
APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America
This public document
2. has been signed by MARCIA L. HARDING
3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC, MCHENRY COUNTY
4. bears the seal/stamp of STATE OF ILLINOIS

Certified

5. Chicago, Illinois
6. DECEMBER 14, 2009
7. by the Secretary of State, State of Illinois
8. No. C09SPR26267
9. Seal/Stamp:

10. Signature:

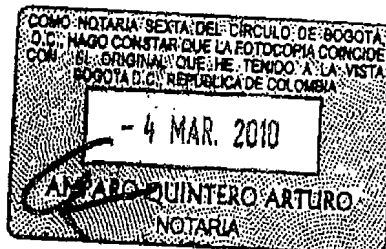


Jesse White

JESSE WHITE
SECRETARY OF STATE
STATE OF ILLINOIS



Printed on recycled paper. Printed by authority of the State of Illinois. August 2009 — 55M — 1 168.2



CAVELIER

ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTÁ, 8 - COLOMBIA

REPRESENTACION

REPRESENTATION

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

BAXTER INTERNATIONAL INC.

domiciliado (s) en/of One Baxter Parkway, Deerfield, Illinois, USA

Por el presente nombramos, a CAVELIER ABOGADOS, sociedad colectiva constituida de conformidad con las leyes de la República de Colombia, mediante Escritura Pública No. 6233 del 10 de septiembre de 1974, otorgada en la Notaría Sexta del Circuito de Bogotá, domiciliada en Bogotá D.C., con matrícula mercantil No. 00820237 y NIT 860041367-3, domiciliada en la Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, como nuestra representante en todos los asuntos de Propiedad Industrial, con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales.

CAVELIER ABOGADOS también podrá representarnos, con las mismas facultades arriba indicadas, ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, autoridades administrativas o jurisdiccionales, tribunales de arbitramento, en asuntos de naturaleza civil, comercial, penal, constitucional, competencia, competencia desleal, administrativa, contencioso administrativa, protección del consumidor, variedades vegetales, nombres de dominio, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, acciones de tutela, la protección de secretos industriales, derecho regulatorio y en general para que nos represente en cualesquiera acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan.

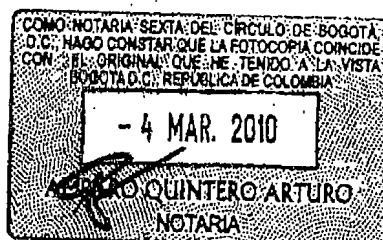
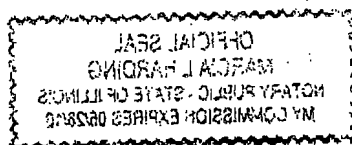
La representante podrá, en nuestro nombre, designar apoderados para actuar ante autoridades administrativas y judiciales, por vía extrajudicial y también procesalmente en nuestro nombre, como demandantes, como demandados, como litisconsortes, como agentes oficiosos, como terceros, por llamamiento en garantía o como intervinientes ad excludendum. Dentro de esta autorización, la representante podrá facultar a los apoderados que ella designe para transigir, conciliar,

© CAVELIER ABOGADOS

Do hereby appoint CAVELIER ABOGADOS, a general partnership organized under the laws of the Republic of Colombia by means of Public Deed No. 6233 of September 10, 1974, granted at Notary Sixth of the Bogota Circuit, domiciled in Bogota D.C., with Mercantile Registration No. 00820237 and Taxpayer Identification Number 860041367-3, domiciled at Carrera 4a N° 72-35, Bogota, Colombia, as our representative for all Industrial Property matters with faculty to receive notifications and appoint attorneys in and out of Court.

CAVELIER ABOGADOS may also represent us, with the same faculties stated above, before any entities or persons, with or without jurisdiction, administrative or jurisdictional authorities, courts of arbitration, in civil, commercial, criminal, constitutional, competition, unfair competition, administrative, administrative contentious, consumer protection, plant varieties, domain names, opposition or observation matters, administrative and Court cancellation, nullity, precautionary measures, licensing, action for writ mandamus, protection of trade secrets, regulatory law and in general represent us in any actions and suits instituted by us or against us.

The representative may, in our name, designate attorneys to act before administrative and judicial authorities, through out-of-court channels, and also procedurally in our name as plaintiff, defendant, joint litigant, representative without power of attorney, third party, when summoned to appear in court or as intervener ad excludendum. Under this authorization, the representative may empower the attorneys appointed thereby to compromise, conciliate, admit the facts of the



admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y sustituir el poder que se le otorgue. Así mismo, la representante tendrá la facultad para revocar el poder así otorgado en el momento que considere pertinente. La representante en todo caso podrá ratificar los actos de agentes oficiosos.

case, desist, cancel, receive, resign and substitute the power of attorney granted thereto. Likewise, the representative shall have the faculty of revoking the power of attorney thus granted at any time it may deem convenient. The representative may in any case ratify the acts of representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this 11th day of November 2009

En/in Deerfield, Illinois, USA

Por/by James Smith

Firma/Signature.

James Smith

Nota:

PARA SOCIEDADES

El documento de Representación deberá ser firmado por el representante legal de la compañía. Deberá ser presentado ante Notario Público para que certifique que la persona que firma es quien dice ser. La firma del señor Notario deberá ser legalizada*.

Adicionalmente deberá anexarse copia legalizada* del documento que pruebe la existencia y representación legal de la sociedad.

*La legalización podrá ser por Apostilla si el país del otorgante hace parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961 o ante el Cónsul de Colombia en caso contrario. Una sola legalización que incluya ambos documentos sería suficiente.

PARA PERSONAS NATURALES

El documento de Representación deberá ser firmado por el otorgante. El Notario Público deberá certificar que la persona que firma es quien dice ser.

Posteriormente el documento de Representación deberá ser legalizado por Apostilla si el país del otorgante hace parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961 o ante el Cónsul de Colombia en caso contrario.

Note:

FOR CORPORATIONS

The Representation document should be signed by the Legal Representative of the company. It should be produced before a Notary Public, who should certify that the person signing the same is in fact who he/she purports to be. The Notary's signature should then be legalized*.

In addition a legalized copy* of the document proving the existence and legal representation of the company should also be attached.

*Legalization may be made by Apostille if the issuing country is a member of the The Hague Convention of October 5, 1961, or before the Colombian Consulate if otherwise. A single legalization that would include both documents would be sufficient.

FOR INDIVIDUALS

The Representation should be signed by the grantor. The Notary Public should certify that the person signing is who he/she purports to be.

Subsequently, the Representation document should be legalized by Apostille if the issuing country is a member of the The Hague Convention of October 5, 1961 or before the Colombian Consulate if otherwise.

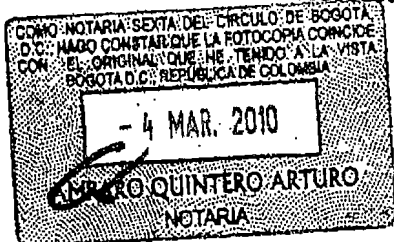
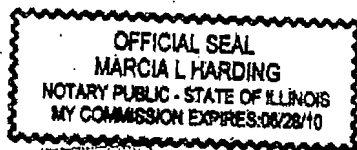
Subscribed and sworn before me, this 11th
day of November, 2009, a Notary Public
in and for Deer County,
State of Illinois

Marcia L. Harding
(Signature)

NOTARY PUBLIC

My Commission expires June 28, 2010

© CAVELIER ABOGADOS



CERTIFICACION NOTARIAL (SOCIEDAD)

El infrascrito Notario Certifica: Que la firma que aparece a continuación del señor

es auténtica; que el signatario desempeña actualmente el cargo de

de la compañía

sociedad que actualmente existe y está organizada de acuerdo a las leyes de

que la dirección de dicha compañía es

y que el signatario tiene facultad para otorgar este documento. Todos los hechos anteriores le constan por haber examinado los documentos respectivos y de todo ello da fe.

Dado y firmado en

El

NOTARIAL CERTIFICATION (COMPANY)

The undersigned Notary certifies: That the following signature of Mr. James Smith

is authentic; that the signatory currently acts in the position of Associate General Counsel & Chief IP Counsel

of the company BAXTER INTERNATIONAL INC.

a company currently existing and organized under the laws of Delaware

that the address is One Baxter Parkway, Deerfield, Illinois, United States of America, and that the signatory has the power to grant this document

The Notary Public is aware and attests to the above facts upon examination of the corresponding documents.

Given and signed in Deerfield, IL USA

On February 8, 2010



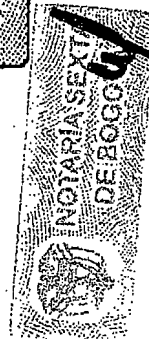
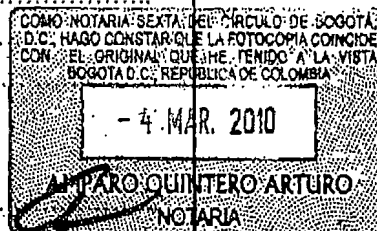
APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

- Country:
This public document
- has been signed by
- acting in the capacity of
- bears the seal/stamp of

Certified

- at
- by
- No.
- Seal/stamp
- the
- Signature



Subscribed and sworn before me, this 8 day of February 2010, a Notary Public in and for McHenry County, State of Illinois

Marcia L. Harding
(Signature)

NOTARY PUBLIC

My Commission expires June 28, 2010

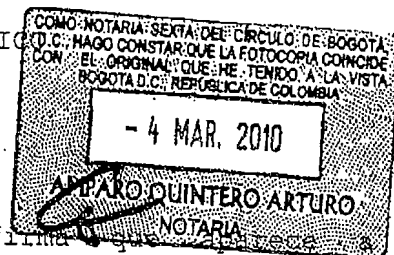
TRADUCCIÓN OFICIAL 061/2010 DE UN DOCUMENTO EN IDIOMA INGLÉS
 REALIZADA POR EDUARDO CALADO NOGUERA, TRADUCTOR OFICIAL
 APROBADO POR RESOLUCION 541 DEL 27 DE FEBRERO DE 1976
 EXPEDIDA POR EL MINISTERIO DE JUSTICIA DE COLOMBIA Y
 DEBIDAMENTE REGISTRADO ANTE EL MINISTERIO DE RELACIONES
 EXTERIORES DE COLOMBIA, POR EL CUAL BAXTER INTERNATIONAL INC.
 DOMICILIADA EN ONE BAXTER PARKWAY, DEERFIELD, ILLINOIS,
 ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA, OTORGA REPRESENTACIÓN EN ASUNTOS
 RELACIONADOS CON PROPIEDAD INDUSTRIAL A CAVELIER ABOGADOS.
 DADO Y FIRMADO HOY 11 DE NOVIEMBRE DE 2009 EN DEERFIELD,
 ILLIONIS, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA, POR JAMES SMITH. FIRMADO
 ILEGIBLE.

FIRMADO Y JURAMENTADO ANTE MI, HOY 11 DE NOVIEMBRE DE 2009,
 NOTARIO PÚBLICO PARA EL CONDADO DE LAKE, ESTADO DE ILLINOIS.

FIRMADO MARCIA L. HARDING, NOTARIO PÚBLICO
 MI CARGO VENCE EL 28 DE JUNIO DE 2010.

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD).

El infrascrito certifica que la firma que acompaña a la
 continuación del señor J SMITH es auténtica; que el
 signatario desempeña actualmente el cargo de abogado general
 asociado y abogado principal de propiedad industrial de la
 compañía BAXTER INTERNATIONAL INC., una compañía que
 actualmente existe y está organizada de acuerdo con las leyes
 de Delaware. Que la dirección de dicha compañía es ONE BAXTER
 PARKWAY, DEERFIELD, ILLINOIS, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA y que
 el signatario tiene facultad para otorgar este documento.



Eduardo Calado N.
 Eduardo Calado Noguera
 TRADUCTOR OFICIAL
 (aprobado por el Ministerio de Justicia)
 Resolución 541 del 27 de febrero de 1976

Todos los hechos anteriores le constan por haber examinado los documentos respectivos y de todo ello da fe.

Dado y firmado en Deerfield, IL, Estados Unidos de América, el 9 de febrero de 2010. SELLO: SELLO OFICIAL, MARCIA L HARDING, NOTARIO PÚBLICO, ESTADO DE ILLINOIS, MI CARGO VENCE EL 28 DE JUNIO DE 2010.

ESTADO DE ILLINOIS SECRETARIA DE ESTADO
SPRINGFIELD, ILLINOIS

APOSTILLA

(CONVENCION DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961)

1. PAIS: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. Este documento público ha sido firmado por MARCIA L. HARDING
3. quien actúa en su calidad de NOTARIO PÚBLICO, CONDADO DE MCHENRY
4. lleva el sello/estampilla del ESTADO DE ILLINOIS.

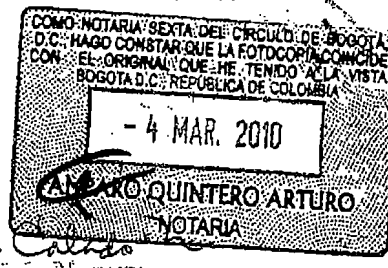
CERTIFICADO

5. En Chicago, Illinois
6. el 14 de diciembre de 2009
7. Por la secretaria de estado del estado de Illinois
8. No. C09SPR26267
9. Sello/estampilla, SELLO REALZADO EN FORMA DE ESTRELLA DE COLOR DORADO CON LA LEYENDA: SELLO DEL ESTADO DE ILLINOIS, 26 DE AGOSTO DE 1818.
10. Firma: JESSE WHITE

JESSE WHITE, SECRETARIO DE ESTADO, ESTADO DE ILLINOIS
COLO-13936-841-029-2

ECN\ECN\ID-166803\WPCL002G
Bogotá, 1 de marzo de 2010.

Edmundo Calzado
Bogotá, 1 de marzo de 2010
TALLERES OFICIALES
BOGOTÁ - COLOMBIA
- 1976





01



90233408

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

24 DE FEBRERO DE 2010

HORA 15:29:39

R027619924

PAGINA: 1 de 3

* EN JUNIO DE ESTE AÑO SE ELEGIRAN JUNTA DIRECTIVA Y REVISOR FISCAL *
* DE LA CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA. LAS INSCRIPCIONES DE *
* CANDIDATOS DEBEN HACERSE EN LA PRIMERA QUINCENA DE MAYO. *
* PARA INFORMACION DETALLADA DIRIGIRSE A LA SEDE PRINCIPAL, QUINTO *
* PISO, O COMUNICARSE AL SIGUIENTE TELEFONO: 5941000 EXTENSION 2899.*

CERTIFICADO DE EXISTENCIA Y REPRESENTACION LEGAL O INSCRIPCION DE DOCUMENTOS

CERTIFICA:

NOMBRE : CAVELIER ABOGADOS

N.I.T. : 860041367-3

DOMICILIO : BOGOTA D.C.

CERTIFICA:

NO: 00820237

CERTIFICA:

CONSTITUCION : QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. SEXTA DE BOGOTA D.C. DEL 10 DE SEPTIEMBRE DE 26 DE SEPTIEMBRE DE 1974 BAJO EL NUMERO 00021234 CONSTITUYO LA SOCIEDAD CIVIL DENOMINADA: CAVELIER PERDOMO Y CAVELIER.

CERTIFICA :

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0001000 DE NOTARIA D.C. DEL 10 DE MARZO DE 1983, INSCRITA EL 5 DE ABRIL DE 1983 BAJO EL NUMERO 00130769 DEL LIBRO IX, LA SOCIEDAD CAMBIO SU NOMBRE DE : CAVELIER PERDOMO Y CAVELIER. POR EL DE : CAVELIER ABOGADOS

CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NUMERO 1.000 OTORGADA EN LA NOTARIA 6A. DE BOGOTA EL 10 DE MARZO DE 1.983, INSCRITA EN ESTA CAMARA DE COMERCIO EL 5 DE ABRIL DE 1.983 BAJO EL NUMERO 130769 DEL LIBRO IX, LA SOCIEDAD CAMBIO SU NOMBRE DE: CAVELIER PERDOMO Y CAVELIER, POR EL DE: CAVELIER ABOGADOS, E INTRODUJO OTRAS REFORMAS.

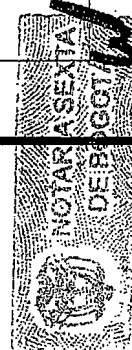
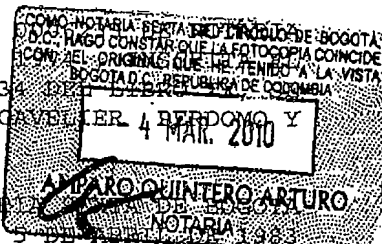
CERTIFICA:

CERTIFICA

QUE POR E.P.NO. 2.034 DE LA NOTARIA 6 DE SANTA FE DE BOGOTA DEL 18 DE ABRIL DE 1.995, INSCRITA EL 27 DE ABRIL DE 1.995 BAJO EL NO. 5.937 DEL LIBRO XIII, LA SOCIEDAD TRASLADO SU DOMICILIO DE LA CIUDAD DE SANTA FE DE BOGOTA D.C. AL MUNICIPIO DE TABIO (CUNDINAMARCA).--.

CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 7710 DE LA NOTARIA SEXTA DE BOGOTA DEL 10 DE OCTUBRE DE 1984, INSCRITA EL 15 DE NOVIEMBRE DE 1984 BAJO EL NO. 1559 DEL LIBRO XIII, LA SOCIEDAD CAMBIO SU



NATURALEZA JURIDICA DE SOCIEDAD COMERCIAL A SOCIEDAD CIVIL

CERTIFICA:

REFORMAS:

ESCRITURAS NO.	FECHA	NOTARIA	INSCRIPCION
842	10-V-1.977	18. BTA.	27-V-1.977-NO. 46.204
3.430	1-VII-1.980	6A. BTA.	3-IX-1.980-NO. 89.582
4.844	10-IX-1.980	6A. BTA.	8-X-1.980-NO. 91.261
432	10-II-1.983	6A. BTA.	1-III-1.983-NO. 129.337
7.710	10-X-1.984	6A. BTA.	15-XI-1.984-NO. 1.559
7.305	21-X-1.985	6A. BTA.	18-XI-1.985-NO. 1.906
2.567	29-IV-1.987	6A. BTA.	7-V- 1.987-NO. 2.386
4.278	3-VII-1.987	6A. BTA.	23-VII-1987 NO. 215.652
2.657	25- IV-1.988	6A. BTA.	19- V -1988-NO. 2,740
9.033	21-XII-1.990	6A. BTA.	10- I - 1991-NO. 3.786
25	3- I -1.991	6A. BTA.	10- I - 1991-NO. 3.787
1.608	8-III-1.991	6A. BTA.	14-III- 1991-NO. 3.841
2.155	2-IV- 1.991	6A. BTA.	8-IV - 1991-NO. 3.862
797	7-II -1.991	6A. BTA.	7- V -1991-NO. 3.882
1.739	14-III-1.991	6A. BTA.	7- V -1991-NO. 3.881
5.886	21-VIII-1.991	6A. BTA.	27-VIII-1991 NO. 4.019
8.596	4-XII -1.991	6A. BTA.	16-III -1992 NO. 4.430
1.494	10-III -1.992	6A. BTA.	19-III -1992 NO. 4.436
4.205	8 -VII -1.992	6A. BTA.	15-VII -1992 NO. 4.554
8.829	16-XII -1.992	6A. BTA.	24-XII -1992 NO. 4.819
12	5-I -1.993	6 STAFE BTA	13-I -1993 NO. 4.850
4.877	29-VI -1.993	6 STAFE BTA	7-VII -1993 NO. 5.065
5.216	12-VII -1.993	6 STAFE BTA	16-VII -1993 NO. 5.077
ACTA NO. 71	2-IX- 1.993	JUNTA DE SOCIOS	29-IX- 1993 NO. 5.174
2.034	18-IV- 1.995	6 STAFE BTA	27- IV -1995 NO. 5.937
2.227	25-IV-1.995	6 STAFE BTA	18-VIII-1.995 NO. 6.092
7.594	12-XII-1.995	6 STAFE BTA	19- XII-1.995 NO. 6.294
676	11- II-1.997	6 STAFE BTA	14- II -1.997 NO. 6.873

CERTIFICA:

REFORMAS:

E.P. NO.	FECHA	NOTARIA	CIUDAD	FECHA	NO. INSC.
0004506	1997/07/28	0006	BOGOTA D.C.	1997/09/02	00007115
0002103	1998/04/08	0006	BOGOTA D.C.	1998/04/21	00007426
0005326	1998/08/06	0006	BOGOTA D.C.	1998/08/13	00007544
0005538	1998/08/14	0006	BOGOTA D.C.	1998/08/27	00007564
0007760	1998/11/10	0006	BOGOTA D.C.	1998/11/12	00007644
0006709	1997/11/04	0006	BOGOTA D.C.	2000/12/04	00008481
0003034	2003/05/30	0006	BOGOTA D.C.	2003/06/04	00882729
0003786	2004/07/16	0006	BOGOTA D.C.	2004/07/28	00009703
0001432	2005/03/18	0006	BOGOTA D.C.	2005/04/07	00009917
			BOGOTA D.C.	2005/08/26	00010008
			BOGOTA D.C.	2007/07/24	00010841
			BOGOTA D.C.	2009/10/21	00012243

CERTIFICA:

AGENCIA: QUE LA SOCIEDAD NO SE HALLA DISUELTA. DURACION HASTA EL

4 MAR 2010

CERTIFICA:

LA SOCIEDAD TENDRA POR OBJETO : EL EJERCICIO DE LA ACTIVIDAD PROFESIONAL DE ABOGADOS. EN DESARROLLO DE ESTE OBJETO LA SOCIEDAD PODRA ADQUIRIR, CONTRAER OBLIGACIONES Y CELEBRAR TODA CLASE DE CONTRATOS DIRECTAMENTE RELACIONADOS Y SUBORDINADOS AL MISMO, INCLUSIVE LOS DE ARRENDAMIENTO, HIPOTECA, MUTUO CON O SIN



01



* 9 0 2 3 3 4 0 9 *

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

24 DE FEBRERO DE 2010

HORA 15:29:39

R027619924

PAGINA: 2 de 3

INTERES, MANDATO CIVIL Y COMERCIAL, Y SOCIEDAD, ASI COMO PARTICIPAR EN ASOCIACIONES CIENTIFICAS, GREMIALES O PROFESIONALES SIN ANIMO DE LUCRO.

CERTIFICA:

CAPITAL Y SOCIOS: \$10,000.00 DIVIDIDO EN 10,000.00 CUOTAS CON VALOR NOMINAL DE \$1.00 CADA UNA, DISTRIBUIDO ASI :

- SOCIO CAPITALISTA (S)

ASOCIACION CAVELIER DEL DERECHO

N.I.T. 000008001722568

NO. CUOTAS: 8,800.00

VALOR: \$8,800.00

GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE

C.E. 000000000131100

NO. CUOTAS: 1,200.00

VALOR: \$1,200.00

- SOCIO INDUSTRIAL (S)

CHAVARRO JORGE

C.C. 000000016209380

NO. CUOTAS: 0.00

VALOR: \$0.00

SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA

C.C. 000000035456344

NO. CUOTAS: 0.00

VALOR: \$0.00

PEÑA VALENZUELA DANIEL

C.C. 000000079518915

NO. CUOTAS: 0.00

VALOR: \$0.00

MARIN RUALES GERMAN HUMBERTO

C.C. 000000079155665

NO. CUOTAS: 0.00

VALOR: \$0.00

TOTALES

NO. CUOTAS: 10,000.00

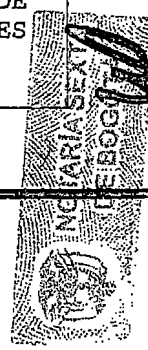
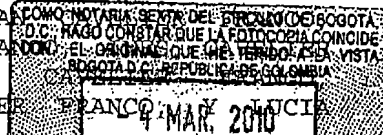
VALOR: \$10,000.00

CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURAS PUBLICAS NO. 001431 Y 001432 DEL 18 DE MARZO DE 2005 DE LA NOTARIA 06 DE BOGOTA D.C., INSCRITA EL 07 DE ABRIL DE 2005 BAJO EL NO. 0009918 Y 0009917, RESPECTIVAMENTE DEL LIBRO XIII, DE LAS MIL DOSCIENTAS (1200) PARTES DE INTERES SOCIAL RADICADAS EN CABEZA DE AGNES GAUDEBERT DE CAVELIER, SEISCIENTAS (600) PARTES ESTAN GRAVADAS O AFECTADAS EN PROPIEDAD FIDUCIARIA A FAVOR DE LAS SIGUIENTES PERSONAS : GERMAN CAVALIER FRANCO, ERNESTO CAVELIER FRANCO, JORGE CAVELIER FRANCO, GUILLERMO CAVELIER FRANCO, ELENA ALEJANDRO CAVELIER FRANCO, BEATRIZ CAVELIER FRANCO Y LUCIA CAVELIER FRANCO.

CERTIFICA:

REPRESENTACION LEGAL: EL REPRESENTANTE LEGAL FUNDADOR GERMAN CAVELIER GAVIRIA TENDRA DIRECTOR VITALICIO, PARTICIPARA POR DERECHO PROPIO EN EL CONSEJO SUPERIOR Y EN EL CONSEJO DIRECTIVO Y LLEVARA LA REPRESENTACION LEGAL DE LA SOCIEDAD CUANDO LO ESTIME PERTINENTE SIN LIMITACION ALGUNA. IGUAL PARTICIPACION Y ATRIBUCIONES TENDRA SU SUPLENTE AGNES GAUDEBERT DE CAVELIER CUANDO OCUPE EL CARGO, EN CASO DE FALTA ABSOLUTA DE GERMAN CAVELIER GAVIRIA. LOS SOCIOS COLECTIVOS ESTAN AUTORIZADOS PARA EJERCER LA REPRESENTACION DE LA SOCIEDAD EN CUALQUIER TIEMPO, SIN PERJUICIO DE LAS DELEGACIONES CONFERIDAS A LOS ORGANOS CREADOS POR LOS PRESENTES



ESTATUTOS

CERTIFICA:

** NOMBRAMIENTOS **

QUE POR NO. 12 DE JUNTA DE SOCIOS DEL 14 DE AGOSTO DE 2009, INSCRITA EL 24 DE SEPTIEMBRE DE 2009 BAJO EL NUMERO 00012200 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):

NOMBRE	IDENTIFICACION
DIRECTOR (REPRESENTANTE LEGAL DE LA ASOCIACIÓN CAVELIER DEL DERECHO)	
GALLON GIRALDO CARLOS	C.C. 0000000019066425
QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0004818 DE NOTARIA 6 DE BOGOTA D.C. DEL 22 DE AGOSTO DE 2005, INSCRITA EL 26 DE AGOSTO DE 2005 BAJO EL NUMERO 00010008 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):	

NOMBRE	IDENTIFICACION
PRESIDENTE DIRECTOR VITALICIO	
CAVELIER GAVIRIA GERMAN	C.C. 0000000002877924
SUPLENTE DEL PRESIDENTE DIRECTOR VITALICIO	
GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE	C.E. 0000000000131100

CERTIFICA:

FACULTADES DEL REPRESENTANTE LEGAL: APARTE DE LAS FACULTADES Y DEBERES QUE DE TIEMPO EN TIEMPO SE LE ASIGNEN POR EL CONSEJO SUPERIOR, EL DIRECTOR TENDRA LAS SIGUIENTES FUNCIONES : A) LA DE REPRESENTAR LEGALMENTE A LA SOCIEDAD ANTE LAS AUTORIDADES DE CUALQUIER ORDEN O NATURALEZA Y ANTE OTRAS PERSONAS NATURALES O JURIDICAS, CON FACULTADES PARA NOVAR, TRANSIGIR, COMPROMETER Y DESISTIR Y PARA COMPARECER EN JUICIOS INCLUSIVE EN AQUELLOS EN DONDE SE DISPUTE LA PROPIEDAD DE BIENES INMUEBLES; B) CUMPLIR Y HACER CUMPLIR LOS ESTATUTOS Y REGLAMENTOS DE LA SOCIEDAD; Y C) CREAR O SUPRIMIR TODOS LOS EMPLEOS QUE SEAN NECESARIOS DE ACUERDO CON EL CONSEJO SUPERIOR PARA EL BUEN FUNCIONAMIENTO DE LA SOCIEDAD, ASIGNARLES FUNCIONES, FIJAR SUS SALARIOS Y NOMBRAR LAS PERSONAS QUE DEBAN DESEMPEÑARLOS, ASI COMO RETIRARLOS Y REEMPLAZARLOS CUANDO HAYA LUGAR. CUANDO CUALQUIERA DE LOS ACTOS INDICADOS EN LA CLAUSULA ANTERIOR SE REFIERA A OPERACIONES CUYO MONTO EXCEDA DE LA SUMA EQUIVALENTE A CIENTO OCHENTA (180) SALARIOS MINIMOS MENSUALES, SU CELEBRACION REQUERIRA LA APROBACION PREVIA DEL CONSEJO SUPERIOR.

CERTIFICA:

** REVISOR FISCAL **
QUE POR ACTA NO. 0000071 DEL 2 DE SEPTIEMBRE DE 1993, INSCRITA EL 29 DE SEPTIEMBRE DE 1993 BAJO EL NUMERO 00005175 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):

REVISOR	IDENTIFICACION
RINCON	C.C. 0000000002877024

CERTIFICA:

DE RESPONSABILIDAD CON LO ESTABLECIDO POR LA LEY 962 DE 2005, LOS ACTOS DE REGISTRO QUE SEAN ASIGNADOS QUEDAN EN FIRME CINCO (5) DIAS HABLES DESPUES DE LA FIRMA DEL REGISTRANTE, SIEMPRE QUE NO SEAN OBJETO DE RECURSO DE REPOSICION.

* * * EL PRESENTE CERTIFICADO NO CONSTITUYE PERMISO DE * * *
* * * FUNCIONAMIENTO EN NINGUN CASO * * *

SEÑOR EMPRESARIO, SI SU EMPRESA TIENE ACTIVOS INFERIORES A 30.000 SMLMV Y UNA PLANTA DE PERSONAL DE MENOS DE 200 TRABAJADORES, USTED TIENE DERECHO A RECIBIR UN DESCUENTO EN EL PAGO DE LOS PARAFISCALES DE



01



* 9 0 2 3 3 4 1 0 *

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

24 DE FEBRERO DE 2010

HORA 15:29:39

R027619924

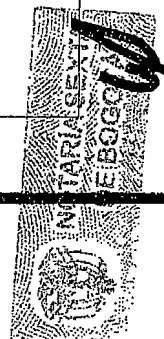
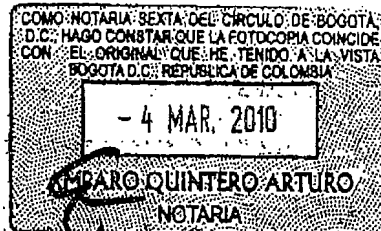
PAGINA: 3 de 3

75% EN EL PRIMER AÑO DE CONSTITUCION DE SU EMPRESA, DE 50% EN EL SEGUNDO AÑO Y DE 25% EN EL TERCER AÑO. LEY 590 DE 2000 Y DECRETO 525 DE 2009.

EL SECRETARIO DE LA CAMARA DE COMERCIO,
VALOR : \$ 3,600

DE CONFORMIDAD CON EL DECRETO 2150 DE 1995 Y LA AUTORIZACION IMPARTIDA POR LA SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO, MEDIANTE EL OFICIO DEL 18 DE NOVIEMBRE DE 1996, LA FIRMA MECANICA QUE APARECE A CONTINUACION TIENE PLENA VALIDEZ PARA TODOS LOS EFECTOS LEGALES

Esteban Q



7 700004 347332



documento de representación otorgado el día once
(11) de noviembre de 2009
por J. SMITH Abogado General de la Compañía
BAXTER INTERNATIONAL INC
documento que está debidamente legalizado por

Apostille.
Presente el señor **CARLOS ALBERTO GALLÓN GIRALDO**, domiciliado en Bogotá, identificado como aparece al pie de su firma y manifestó que está conforme con el contenido de esta escritura pública.

HASTA AQUI LA MINUTA

OTORGAMIENTO Y AUTORIZACION : Leída la presente escritura pública por el Compareciente y habiéndosele hecho las advertencias sobre los trámites y formalidades de rigor le impartió su aprobación y en constancia la firma por ante mí el Notario que AUTORIZA.

DERECHOS NOTARIALES : RESOLUCION 10301 del 17 de diciembre año 2009, \$ 42.860,00 IVA \$ 16.497,00

PAPEL NOTARIAL : Esta escritura se extendió en las hojas de papel sellado números : 7-700004-347349 7-700004-347332

EN BLANCO... EN BLANCO

CARLOS ALBERTO GALLÓN GIRALDO
CC.No. 19.066.425
Representante legal **CAVELIER ABOGADOS**



AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIO SEXTO (6°) DE BOGOTÁ D.C.



Notaría
Sexta

6

DEL CIRCULO DE BOGOTA, D.C.

COPIA NUMERO 7

DE LA ESCRITURA NUMERO:
FECHA: 18/Enero/2010

140

ACTO O CONTRATO:
PODER ESPECIAL
OTORGANTES:
CAVELIER ABOGADOS
ROSA MARGARITA SANTA CRUZ



CERTIFICADO SC 3380-1
PRESTACION DEL
SERVICIO PUBLICO
NOTARIAL
ISO 9001:2000
NTC-ISO 9001:2000



AMPARO QUINTERO ARTURO

NOTARIA SEXTA

CARRERA 9 No. 69-31 - PBX: 317 01 00 - FAX: 314 56 41
Correo Electrónico: notaria6debgta@etb.net.co



ESCRITURA PÚBLICA NÚMERO: 140 - - - - -
 CIENTO CUARENTA - - - - -
 DE FECHA: ENERO DIECIOCHO (18) - - - - -
 DEL AÑO DOS MIL DIEZ (2.010). - - - - -
 OTORGADA EN LA NOTARÍA SEXTA (6ª.)

DEL CÍRCULO NOTARIAL DE BOGOTÁ, D.C. - - - - -

ACTO: PODER ESPECIAL. - - - - -

ACTO SIN CUANTÍA: \$ - 0 - - - - -

En la ciudad de Bogotá, Distrito Capital, Departamento de Cundinamarca, República de Colombia, ante mí - - - - AMPARO QUINTERO - -
 ARUTO - - - - - Notaria Sexta (6ª.) - - - - -

de este Círculo Notarial, se otorgó la escritura pública que se consigna en los siguientes términos: - - - - -

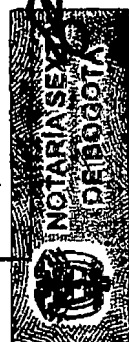
COMPARECENCIA: Con minuta enviada por correo electrónico, compareció el señor **CARLOS ALBERTO GALLÓN GIRALDO**, mayor de edad, vecino de esta ciudad, casado, identificado con la cédula de ciudadanía número 19.066.425 de Bogotá, y dijo: - - - - -

ESTIPULACIONES: - - - - -

PRIMERA.- Que obra en su calidad de Representante Legal de la sociedad denominada **CAVELIER ABOGADOS** domiciliada en la Carrera 4 No. 72-35, Bogotá, Colombia. - - - - -

SEGUNDA: Que **BAXTER HEALTHCARE S.A.**, sociedad constituida y existente bajo las leyes de Suiza, domiciliada en Thurgauerstrasse 130 8152, Glattpark (Opfikon), Suiza, designó a **CAVELIER ABOGADOS**, como su representante para la Propiedad Industrial en Colombia con facultades de nombrar apoderados tal como consta en la copia auténtica del documento de representación que se protocoliza. - - - - -

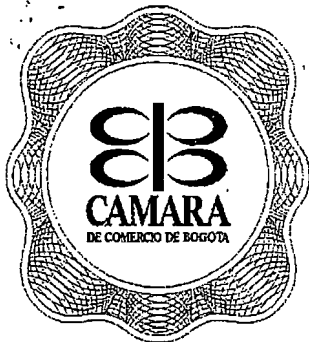
TERCERA.- Que en su carácter de Representante Legal de **CAVELIER ABOGADOS**, y en desarrollo de la facultad otorgada por **BAXTER HEALTHCARE S.A.**, confiere poder a los abogados **OSCAR FERNANDO CORREA BARBOSA**, T.P.A. No. 71.027, identificado con cédula de



ciudadanía, número 79.524.634 de Bogotá, **ROSA MARGARITA SANTACRUZ**, T.P.A. No. 49.434, identificada con cédula de ciudadanía número 35.501.911 de Suba (Bogotá, D.E.), , **LUZ CLEMENCIA DE PAEZ**, T.P.A. No. 23.555, identificada con cédula de ciudadanía número 35.456.344 de Usaquen y **GERMAN HUMBERTO MARIN RUALES**, T.P.A. No. 64.239, identificado con cédula de ciudadanía número 79.155.665 de Bogotá, mayores de edad, vecinos de Bogotá, para que representen a la sociedad a cuyo nombre actúa, ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, incluyendo las del orden administrativo, contencioso administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, diseños industriales, trazado de circuitos integrados, secretos industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales, denominaciones de origen e indicaciones de procedencia, su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones, cancelación administrativa o judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales y de nombres de dominio junto con su administración y pago; y en general los procesos civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos, de conciliación, arbitramento, tutela relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan.-----

CUARTO.- Que los apoderados designados están facultados en todos los asuntos arriba determinados para sustituir este mandato, transigir, conciliar, arbitrar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y ratificar los actos de agentes oficiosos.-----

QUINTO.- Que protocoliza con la presente escritura, un certificado expedido por la Cámara de Comercio de Bogotá, que acredita la constitución y personería de la sociedad **CAVELIER ABOGADOS**, igualmente protocoliza copia autenticada del documento de representación otorgado el día once (11) de Noviembre de dos mil nueve (2.009), por **BAXTER HEALTHCARE S.A.**,



01



* 8 8 2 2 6 8 5 *

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

17 DE DICIEMBRE DE 2009 HORA 11:11:00

R027136832

PAGINA: 1 de 3

CERTIFICADO DE EXISTENCIA Y REPRESENTACION LEGAL O INSCRIPCION DE DOCUMENTOS

CERTIFICA:

NOMBRE : CAVELIER ABOGADOS
N.I.T. : 860041367-3
DOMICILIO : BOGOTA D.C.

CERTIFICA:

NO: 00820237

CERTIFICA:

CONSTITUCION : QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0006233 DE NOTARIA SEXTA DE BOGOTA D.C. DEL 10 DE SEPTIEMBRE DE 1974 , INSCRITA EL 26 DE SEPTIEMBRE DE 1974 BAJO EL NUMERO 00021234 DEL LIBRO IX, SE CONSTITUYO LA SOCIEDAD CIVIL DENOMINADA: CAVELIER PERDOMO Y CAVELIER.

CERTIFICA :

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0001000 DE NOTARIA SEXTA DE BOGOTA D.C. DEL 10 DE MARZO DE 1983 , INSCRITA EL 5 DE ABRIL DE 1983 BAJO EL NUMERO 00130769 DEL LIBRO IX, LA SOCIEDAD CAMBIO SU NOMBRE DE : CAVELIER PERDOMO Y CAVELIER. POR EL DE : CAVELIER ABOGADOS

CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NUMERO 1.000 OTORGADA EN LA NOTARIA 6A. DE BOGOTA EL 10 DE MARZO DE 1.983, INSCRITA EN ESTA CAMARA DE COMERCIO EL 5 DE ABRIL DE 1.983 BAJO EL NUMERO 130769 DEL LIBRO IX, LA SOCIEDAD CAMBIO SU NOMBRE DE: CAVELIER PERDOMO Y CAVELIER, POR EL DE: CAVELIER ABOGADOS, E INTRODUJO OTRAS REFORMAS.

CERTIFICA:

CERTIFICA

QUE POR E.P.NO. 2.034 DE LA NOTARIA 6 DE SANTAFE DE BOGOTA DEL 18 DE ABRIL DE 1.995, INSCRITA EL 27 DE ABRIL DE 1.995 BAJO EL NO. 5.937 DEL LIBRO XIII, LA SOCIEDAD TRASLADO SU DOMICILIO DE LA CIUDAD DE SANTAFE DE BOGOTA D.C. AL MUNICIPIO DE TABIO (CUNDINAMARCA)..

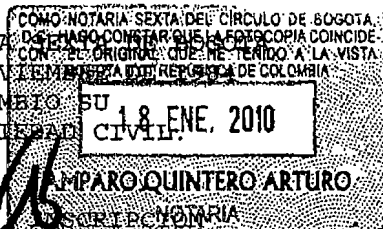
CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 7710 DE LA NOTARIA 6 DE BOGOTA DEL 10 DE OCTUBRE DE 1984, INSCRITA EL 15 DE NOVIEMBRE DE 1984 BAJO EL NO. 1559 DEL LIBRO XIII, LA SOCIEDAD CAMBIO SU NATURALEZA JURIDICA DE SOCIEDAD COMERCIAL A SOCIEDAD CIVIL.

CERTIFICA:

REFORMAS:

ESCRITURAS NO.	FECHA	NOTARIA	
842	10-V-1.977	18. BTA.	27-V-1.977-NO. 46.204
3.430	1-VII-1.980	6A. BTA.	3-IX-1.980-NO. 89.582
4.844	10-IX-1.980	6A. BTA.	8-X-1.980-NO. 91.261
432	10-II-1.983	6A. BTA.	1-III-1.983-NO.129.337



7.710	10-X-1.984	6A. BTA.	15-XI-1.984-NO.	1.559
7.305	21-X-1.985	6A. BTA.	18-XI-1.985-NO.	1.906
2.567	29-IV-1.987	6A. BTA.	7-V- 1.987-NO.	2.386
4.278	3-VII-1.987	6A. BTA.	23-VII-1987 NO.	215.652
2.657	25- IV-1.988	6A. BTA.	19- V -1988-NO.	2,740
9.033	21-XII-1.990	6A. BTA.	10- I - 1991-NO.	3.786
25	3- I -1.991	6A. BTA.	10- I - 1991-NO.	3.787
1.608	8-III-1.991	6A. BTA.	14-III- 1991-NO.	3.841
2.155	2-IV- 1.991	6A. BTA.	8-IV - 1991-NO.	3.862
797	7-II -1.991	6A. BTA.	7- V -1991-NO.	3.882
1.739	14-III-1.991	6A. BTA.	7- V -1991-NO.	3.881
5.886	21-VIII-1.991	6A. BTA.	27-VIII-1991 NO.	4.019
8.596	4-XII -1.991	6A. BTA.	16-III -1992 NO.	4.430
1.494	10-III -1.992	6A. BTA.	19-III -1992 NO.	4.436
4.205	8 -VII -1.992	6A. BTA.	15-VII -1992 NO.	4.554
8.829	16-XII -1.992	6A. BTA.	24-XII -1992 NO.	4.819
12	5-I -1.993	6 STAFE BTA	13-I -1993 NO.	4.850
4.877	29-VI -1.993	6 STAFE BTA	7-VII -1993 NO.	5.065
5.216	12-VII -1.993	6 STAFE BTA	16-VII -1993 NO.	5.077
ACTA NO.71	2-IX- 1.993	JUNTA DE SOCIOS	29-IX- 1993 NO.	5.174
2.034	18-IV- 1.995	6 STAFE BTA	27- IV -1995 NO.	5.937
2.227	25-IV-1.995	6 STAFE BTA	18-VIII-1.995 NO.	6.092
7.594	12-XII-1.995	6 STAFE BTA	19- XII-1.995 NO.	6.294
676	11- II-1.997	6 STAFE BTA	14- II -1.997 NO.	6.873

CERTIFICA:

REFORMAS:

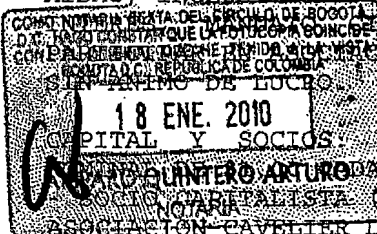
E.P. NO.	FECHA	NOTARIA	CIUDAD	FECHA	NO. INSC.
0004506	1997/07/28	0006	BOGOTA D.C.	1997/09/02	00007115
0002103	1998/04/08	0006	BOGOTA D.C.	1998/04/21	00007426
0005326	1998/08/06	0006	BOGOTA D.C.	1998/08/13	00007544
0005538	1998/08/14	0006	BOGOTA D.C.	1998/08/27	00007564
0007760	1998/11/10	0006	BOGOTA D.C.	1998/11/12	00007644
0006709	1997/11/04	0006	BOGOTA D.C.	2000/12/04	00008481
0003034	2003/05/30	0006	BOGOTA D.C.	2003/06/04	00882729
0003786	2004/07/16	0006	BOGOTA D.C.	2004/07/28	00009703
0001432	2005/03/18	0006	BOGOTA D.C.	2005/04/07	00009917
0004818	2005/08/22	0006	BOGOTA D.C.	2005/08/26	00010008
0005506	2007/07/17	0006	BOGOTA D.C.	2007/07/24	00010841
5453	2009/10/19	0006	BOGOTA D.C.	2009/10/21	00012243

CERTIFICA:

VIGENCIA: QUE LA SOCIEDAD NO SE HALLA DISUELTA. DURACION HASTA EL 10 DE SEPTIEMBRE DE 2024 .

CERTIFICA:

OBJETO SOCIAL: LA SOCIEDAD TENDRA POR OBJETO : EL EJERCICIO DE LA ACTIVIDAD PROFESIONAL DE ABOGADOS. EN DESARROLLO DE ESTE OBJETO LA SOCIEDAD PODRA ADQUIRIR, CONTRAER OBLIGACIONES Y CELEBRAR TODA CLASE DE CONTRATOS DIRECTAMENTE RELACIONADOS Y SUBORDINADOS AL MISMO, INCLUSIVE LOS DE ARRENDAMIENTO, HIPOTECA, MUTUO CON O SIN VIL Y COMERCIAL, Y SOCIEDAD, ASI COMO ASOCIACIONES CIENTIFICAS, GREMIALES O PROFESIONALES



CERTIFICA:

CAPITAL Y SOCIOS \$10,000.00 DIVIDIDO EN 10,000.00 CUOTAS CON VALOR UNA, DISTRIBUIDO ASI :
 NOTARIO
 ASOCIACION CAVALIER DEL DERECHO N.I.T. 000008001722568



01



* 8 8 2 2 6 8 8 6 *

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

17 DE DICIEMBRE DE 2009

HORA 11:11:00

R027136832

PAGINA: 2 de 3

* * * * *

NO. CUOTAS: 8,800.00	VALOR: \$8,800.00
GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE	C.E. 000000000131100
NO. CUOTAS: 1,200.00	VALOR: \$1,200.00
- SOCIO INDUSTRIAL (S)	
CHAVARRO JORGE	C.C. 000000016209380
NO. CUOTAS: 0.00	VALOR: \$0.00
SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA	C.C. 000000035456344
NO. CUOTAS: 0.00	VALOR: \$0.00
PEÑA VALENZUELA DANIEL	C.C. 000000079518915
NO. CUOTAS: 0.00	VALOR: \$0.00
MARIN RUALES GERMAN HUMBERTO	C.C. 000000079155665
NO. CUOTAS: 0.00	VALOR: \$0.00
TOTALES	
NO. CUOTAS: 10,000.00	VALOR: \$10,000.00

CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURAS PUBLICAS NO. 001431 Y 001432 DEL 18 DE MARZO DE 2005 DE LA NOTARIA 06 DE BOGOTA D.C., INSCRITA EL 07 DE ABRIL DE 2005 BAJO EL NO. 0009918 Y 0009917, RESPECTIVAMENTE DEL LIBRO XIII, DE LAS MIL DOSCIENTAS (1200) PARTES DE INTERES SOCIAL RADICADAS EN CABEZA DE AGNES GAUDEBERT DE CAVELIER, SEISCIENTAS (600) PARTES ESTAN GRAVADAS O AFECTADAS EN PROPIEDAD FIDUCIARIA A FAVOR DE LAS SIGUIENTES PERSONAS : GERMAN CAVELIER FRANCO, ERNESTO CAVELIER FRANCO, JORGE CAVELIER FRANCO, INES CAVELIER FRANCO, GUILLERMO CAVELIER FRANCO, ELENA CAVELIER FRANCO, ALEJANDRO CAVELIER FRANCO, BEATRIZ CAVELIER FRANCO, Y LUCIA CAVELIER FRANCO.

CERTIFICA:

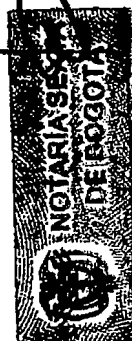
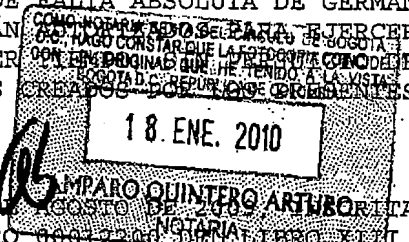
REPRESENTACION LEGAL: EL REPRESENTANTE LEGAL ES EL DIRECTOR. EL SOCIO FUNDADOR GERMAN CAVELIER GAVIRIA TENDRA EL CARACTER DE PRESIDENTE DIRECTOR VITALICIO, PARTICIPARA POR DERECHO PROPIO EN EL CONSEJO SUPERIOR Y EN EL CONSEJO DIRECTIVO Y LLEVARA LA REPRESENTACION LEGAL DE LA SOCIEDAD CUANDO LO ESTIME PERTINENTE SIN LIMITACION ALGUNA. IGUAL PARTICIPACION Y ATRIBUCIONES TENDRA SU SUPLENTE AGNES GAUDEBERT DE CAVELIER CUANDO OCUPE EL CARGO, EN CASO DE FALTA ABSOLUTA DE GERMAN CAVELIER GAVIRIA. LOS SOCIOS COLECTIVOS ESTAN CON FACULTAD PARA EJERCER LA REPRESENTACION DE LA SOCIEDAD EN CUALQUIER MOMENTO Y EN CUALQUIER LUGAR, LAS DELEGACIONES CONFERIDAS A LOS ORGANOS CREADOS POR LOS ORDENANTES ESTATUTOS.

CERTIFICA:

** NOMBRAMIENTOS **

QUE POR NO. 12 DE JUNTA DE SOCIOS DEL 14 DE AGOSTO DE 2009 BAJO EL NUMERO 00012200 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):

NOMBRE	IDENTIFICACION
DIRECTOR (REPRESENTANTE LEGAL DE LA ASOCIACION CAVELIER DEL DERECHO)	



C.C. 0000000019066425

NOMBRE

IDENTIFICACION

CAVELIER GAVRIA GERMAN

C.C. 000000002877924

GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE

C.E. 000000000131100

CERTIFICA:

FACULTADES DEL REPRESENTANTE LEGAL: APARTE DE LAS FACULTADES Y DEBERES QUE DE TIEMPO EN TIEMPO SE LE ASIGNEN POR EL CONSEJO SUPERIOR, EL DIRECTOR TENDRA LAS SIGUIENTES FUNCIONES : A) LA DE REPRESENTAR LEGALMENTE A LA SOCIEDAD ANTE LAS AUTORIDADES DE CUALQUIER ORDEN O NATURALEZA Y ANTE OTRAS PERSONAS NATURALES O JURIDICAS, CON FACULTADES PARA NOVAR, TRANSIGIR, COMPROMETER Y DESISTIR Y PARA COMPARECER EN JUICIOS INCLUSIVE EN AQUELLOS EN DONDE SE DISPUTE LA PROPIEDAD DE BIENES INMUEBLES; B) CUMPLIR Y HACER CUMPLIR LOS ESTATUTOS Y REGLAMENTOS DE LA SOCIEDAD; Y C) CREAR O SUPRIMIR TODOS LOS EMPLEOS QUE SEAN NECESARIOS DE ACUERDO CON EL CONSEJO SUPERIOR PARA EL BUEN FUNCIONAMIENTO DE LA SOCIEDAD, ASIGNARLES FUNCIONES, FIJAR SUS SALARIOS Y NOMBRAR LAS PERSONAS QUE DEBAN DESEMPEÑARLOS, ASI COMO RETIRARLOS Y REEMPLAZARLOS CUANDO HAYA LUGAR. CUANDO CUALQUIERA DE LOS ACTOS INDICADOS EN LA CLAUSULA ANTERIOR SE REFIERA A OPERACIONES CUYO MONTO EXCEDA DE LA SUMA EQUIVALENTE A CIENTO OCHENTA (180) SALARIOS MINIMOS MENSUALES, SU CELEBRACION REQUERIRA LA APROBACION PREVIA DEL CONSEJO SUPERIOR.

CERTIFICA:

** REVISOR FISCAL **

QUE POR ACTA NO. 0000071 DEL 2 DE SEPTIEMBRE DE 1993, INSCRITA EL 29 DE SEPTIEMBRE DE 1993 BAJO EL NUMERO 00005175 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):

NOMBRE

IDENTIFICACION

REVISOR FISCAL

RINCON FANDIÑO MIGUEL ALFONSO

C.C. 000000002877024

CERTIFICA:

DE CONFORMIDAD CON LO ESTABLECIDO POR LA LEY 962 DE 2005, LOS ACTOS DE REGISTRO AQUI CERTIFICADOS QUEDAN EN FIRME CINCO (5) DIAS HABILES DESDE LA FECHA DE INSCRIPCION, SIEMPRE QUE NO SEAN OBJETO DE RECURSOS QUE SEAN OBJETO DE EJECUCION FORZOSA.

COMO MATERIAL DE CIRCULO DE BOGOTA
D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE
CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA

*18 EL PRES
*18 ENE. 2010

*18. ENE. 2010 EL PRESENTE CERTIFICADO NO CONSTITUYE PERMISO DE
*18. ENE. 2010 FUNCIONAMIENTO EN NINGUN CASO

✱ ✱ ✱
✱ ✱ ✱

IMPARO QUINTERO ARTURO
EL SEÑALADO DE LA
NOTARIA

MARA DE COMERCIO.

NOTARIA



01



* 8 8 2 2 6 8 8 7 *

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

17 DE DICIEMBRE DE 2009

HORA 11:11:00

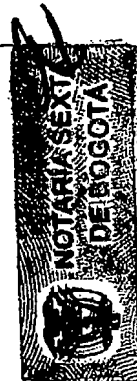
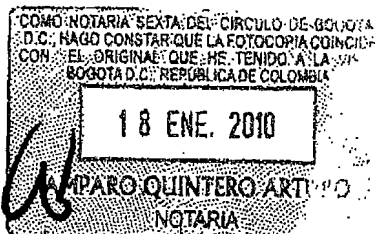
R027136832

PAGINA: 3 de 3

VALOR : \$ 3,500

DE CONFORMIDAD CON EL DECRETO 2150 DE 1995 Y LA AUTORIZACION IMPARTIDA POR LA SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO, MEDIANTE EL OFICIO DEL 18 DE NOVIEMBRE DE 1996, LA FIRMA MECANICA QUE APARECE A CONTINUACION TIENE PLENA VALIDEZ PARA TODOS LOS EFECTOS LEGALES

Esteban Q





SPRINGFIELD, ILLINOIS
APOSTILLE

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America
This public document
2. has been signed by AIDA BLEKHMEN
3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC, COOK COUNTY
4. bears the seal/stamp of STATE OF ILLINOIS

Certified

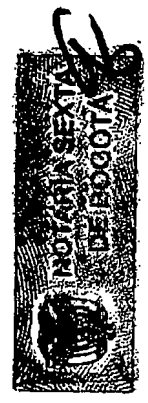
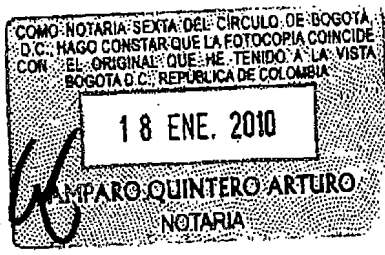
5. Chicago, Illinois
6. NOVEMBER 16, 2009
- 7.
8. by the Secretary of State, State of Illinois
9. No. C09TJ20887
10. Seal/Stamp:

10. Signature:
Jesse White



JESSE WHITE
SECRETARY OF STATE
STATE OF ILLINOIS

 Printed on recycled paper. Printed by authority of the State of Illinois. August 2009 — 55M — 1 168.2



CAVELIER
ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTÁ, 8 - COLOMBIA

REPRESENTACION

REPRESENTATION

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

BAXTER HEALTHCARE S.A.

domiciliado (s)
en/of

Thurgauerstrasse 130 8152, Glattpark (Opfikon), Switzerland

Por el presente nombramos a CAVELIER ABOGADOS, sociedad colectiva constituida de conformidad con las leyes de la República de Colombia, mediante Escritura Pública No. 6233 del 10 de septiembre de 1974, otorgada en la Notaría Sexta del Círculo de Bogotá, domiciliada en Bogotá D.C., con matrícula mercantil No. 00820237 y NIT 860041367-3, domiciliada en la Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, como nuestra representante en todos los asuntos de Propiedad Industrial, con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales.

CAVELIER ABOGADOS también podrá representarnos, con las mismas facultades arriba indicadas, ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, autoridades administrativas o jurisdiccionales, tribunales de arbitramento, en asuntos de naturaleza civil, comercial, penal, constitucional, competencia, competencia desleal, administrativa, contencioso administrativa, protección del consumidor, variedades vegetales, nombres de dominio, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, acciones de tutela, la protección de secretos industriales, derecho regulatorio y en general para que nos represente en cualesquiera acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan.

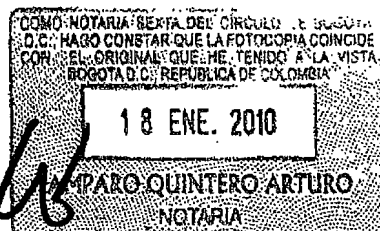
La representante podrá, en nuestro nombre, designar apoderados para actuar ante autoridades administrativas y judiciales, por vía extrajudicial y también procesalmente en nuestro nombre, como demandantes, como demandados, como litisconsortes, como agentes oficiosos, como terceros, por llamamiento en garantía o como intervinientes ad excludendum. Dentro de esta autorización, la representante podrá facultar a los apoderados que ella designe para transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir,

© CAVELIER ABOGADOS

Do hereby appoint CAVELIER ABOGADOS, a general partnership organized under the laws of the Republic of Colombia by means of Public Deed No. 6233 of September 10, 1974, granted at Notary Sixth of the Bogota Circuit, domiciled in Bogota D.C., with Mercantile Registration No. 00820237 and Taxpayer Identification Number 860041367-3, domiciled at Carrera 4a N° 72-35, Bogota, Colombia, as our representative for all Industrial Property matters with faculty to receive notifications and appoint attorneys in and out of Court.

CAVELIER ABOGADOS may also represent us, with the same faculties stated above, before any entities or persons, with or without jurisdiction, administrative or jurisdictional authorities, courts of arbitration, in civil, commercial, criminal, constitutional, competition, unfair competition, administrative, administrative contentious, consumer protection, plant varieties, domain names, opposition or observation matters, administrative and Court cancellation, nullity, precautionary measures, licensing, action for writ mandamus, protection of trade secrets, regulatory law and in general represent us in any actions and suits instituted by us or against us.

The representative may, in our name, designate attorneys to act before administrative and judicial authorities, through out-of-court channels, and also procedurally in our name as plaintiff, defendant, joint litigant, representative without power of attorney, third party, when summoned to appear in court or as intervener ad excludendum. Under this authorization, the representative may empower the attorneys appointed thereby to compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign and substitute the



renunciar y sustituir el poder que se le otorgue. Así mismo, la representante tendrá la facultad para revocar el poder así otorgado en el momento que considere pertinente. La representante en todo caso podrá ratificar los actos de agentes oficiosos.

power of attorney granted thereto. Likewise, the representative shall have the faculty of revoking the power of attorney thus granted at any time it may deem convenient. The representative may in any case ratify the acts of representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this _____

En/in Deerfield, Illinois

Por/by John W. Cornell

Firma/Signature

John W. Cornell

Nota:

PARA SOCIEDADES

El documento de Representación deberá ser firmado por el representante legal de la compañía, autenticado ante Notario Público y legalizado*.

El Notario deberá certificar: i) que la compañía existe; ii) que ejerce su objeto social; y iii) que la persona que firma está autorizada para otorgar este documento.

*La legalización podrá ser por Apostilla si el país del otorgante hace parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961 o ante el Cónsul de Colombia en caso contrario.

PARA PERSONAS NATURALES

El documento de Representación deberá ser firmado por el otorgante. El Notario Público deberá certificar que la persona que firma es quien dice ser.

Posteriormente el documento de Representación deberá ser legalizado por Apostilla si el país del otorgante hace parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961 o ante el Cónsul de Colombia en caso contrario.

Note:

FOR CORPORATIONS

The Representation document ought to be signed by the legal representative of the company, notarized and legalized*.

The Notary Public must certify: i) that the company legally exists; ii) that it is in exercise of its corporate purposes; and iii) that the person who signs the Representation document is authorized to do so.

* Legalization may be made by Apostille if the issuing country is a member of the The Hague Convention of October 5, 1961, or before the Colombian Consulate if otherwise.

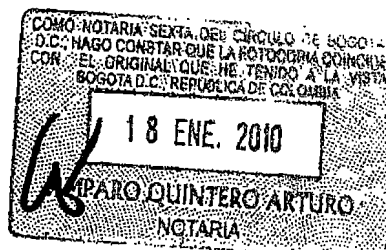
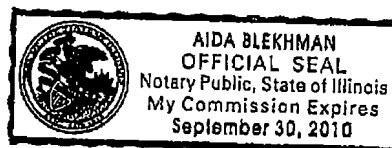
FOR INDIVIDUALS

The Representation should be signed by the grantor. The Notary Public should certify that the person signing is who he/she purports to be.

Subsequently, the Representation document should be legalized by Apostille if the issuing country is a member of the The Hague Convention of October 5, 1961 or before the Colombian Consulate if otherwise.

Signed to before me on this 11th day of November, 2009.

Aida Blekman Notary Public



250
Baxter

Opfikon, December 3, 2009

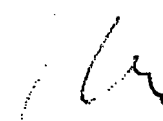
To Whom It May Concern,

John W. Cornell is Assistant General Counsel - Intellectual Property for Baxter Healthcare Corporation and as such a portion of his responsibilities are to represent all Baxter entities worldwide regarding IP matters.

It is in this capacity that John W. Cornell was given authority, via Power of Attorney, to sign any and all pertinent documents for the business.

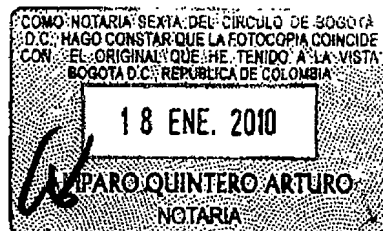
Thank you.

Sincerely,


Ignacio Martínez de Lecea
Sr. Counsel


Mwanajuma P. Lugogo
Corporate Counsel

Baxter Healthcare SA
P.O. Box / 8010 Zurich / Switzerland
T +41 44 878 60 00 F +41 44 878 63 50
www.baxter.com



Official Certification

Seen for authentication of reverse side signatures of

Mr. Ignacio MARTINEZ DE LECEA NOAIN, Nationality: Spain, in Zurich,
personally known to us,

Ms. Mwanajuma Pietrina LUGOGO, Nationality: Great Britain, in Seuzach,
identified by passport,

who are entered in the Register of Commerce of the Canton of Zurich as person with the right to
sign jointly by two (Ignacio Martinez de Lecea Noain) resp. as person with the right to sign jointly
by two (Mwanajuma Pietrina Lugogo) for the

Baxter Healthcare SA, corporation with registered head office in Opfikon.

The signature was acknowledged before us by an authorized third party.

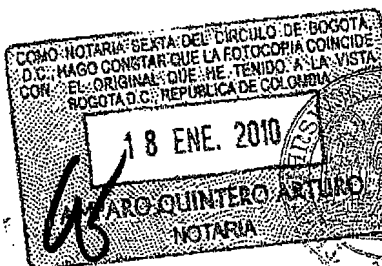
The inspection of the commercial register has taken place directly before the official certification by
internet inquiry.

Wallisellen, 15th December 2009
BK no. 20792, 20793
Fee CHF 60.00



NOTARIAT WALLISELLEN

Roland Furrer, Deputy Notary Public



APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Pais: Confederación Suiza, Cantón de Zurich
Confederação Suíça, Cantão de Zurique
El presente documento público / Este documento público

2. Ha sido firmado por Roland Furrer
foi assinado por

3. Actuando en calidad de Deputy Notary Public
na sua qualidade de

4. Se halla sellado/timbrado con/está previsto do selo/carimbo do (da)
Notariat wallisellen

Certificado

5. En/em 8090 Zurich/Zurique 6. El/no día 18. Dez. 2009

7. Por la Cancillería de Estado del Cantón de Zurich
pela Chancelaria do Estado do Cantão de Zurique

Con el número/s do No. 222757008

Por/Aim do do (da) 10. Firma/Assinatura

CHF 60.- D. Brennwald

TRADUCCIÓN OFICIAL 010/2010 DE UN DOCUMENTO EN IDIOMA INGLÉS
REALIZADA POR EDUARDO CALADO NOGUERA, TRADUCTOR OFICIAL
APROBADO POR RESOLUCION 541 DEL 27 DE FEBRERO DE 1976
EXPEDIDA POR EL MINISTERIO DE JUSTICIA DE COLOMBIA Y
DEBIDAMENTE REGISTRADO ANTE EL MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES DE COLOMBIA, POR EL CUAL **BAXTER HEALTHCARE S.A.**
DOMICILIADA EN THURGAUERSTRASSE 130 8152, GLATTPARK
(OPFIKON), SUIZA, OTORGA REPRESENTACIÓN EN ASUNTOS
RELACIONADOS CON PROPIEDAD INDUSTRIAL A **CAVELIER ABOGADOS.**
DADO Y FIRMADO EN DEERFIELD, ILLINOIS, POR JOHN W. CORNELL.
FIRMADO ANTE MÍ HOY 11 DE NOVIEMBRE DE 2009.

AIDA BLEKHMEN, notario público

SELLO: AIDA BLEKHMEN, sello oficial, notario público, estado
de Illinois. Mi cargo vence el 30 de septiembre de

ESTADO DE ILLINOIS
SECRETARIA DE ESTADO
SPRINGFIELD, ILLINOIS

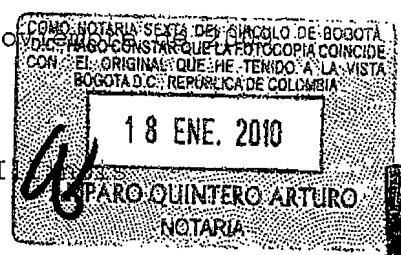
APOSTILLA

(CONVENCION DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961)

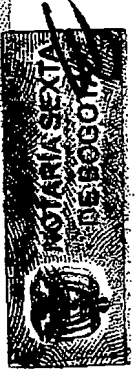
- 1. PAIS: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
- 2. Este documento público ha sido firmado por AIDA BLEKHMEN
- 3. quien actúa en su calidad de NOTARIO PÚBLICO, CONFECCIONADO
- 4. lleva el sello/estampilla del estado de ILLINOIS

CERTIFICADO

- 5. Chicago, Illinois
- 6. el 16 de noviembre de 2009
- 7.
- 8. por el secretario de estado, estado de Illinois
- 9. No. C09TJ20887



Eduardo Calado
Eduardo Calado Noguera
Traductor Oficial
Resolución 541 del 27 de febrero de 1976
Ministerio de Justicia
Registrado



10. SELLO DEL ESTADO DE ILLINOIS, 26 DE AGOSTO DE 1818

10. FIRMA: JESSE WHITE, SECRETARIO DE ESTADO, ESTADO DE ILLINOIS.

MEMBRETE: BAXTER

BAXTER HEALTHCARE SA

P.O. BOX/8010 ZURICH, SUIZA

www.baxter.com

Opfikon, 3 de diciembre de 2009

A quien corresponda:

John W. Cornell es el abogado asistente general para propiedad intelectual para BAXTER HEALTHCARE CORPORATION y en su calidad de tal, parte de sus responsabilidades consisten en representar todas las entidades de BAXER en todo el mundo en asuntos relacionados con propiedad intelectual.

En esta calidad a JOHN W. CORNELL se le ha conferido autoridad, mediante un poder, para firmar todos los documentos relacionados con este negocio.

Gracias

Atentamente,

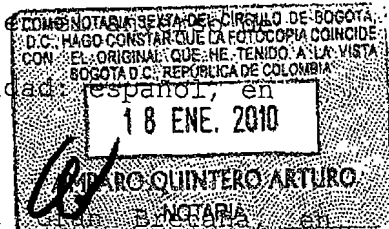
FIRMADO: IGNACIO MARTINEZ DE LECEA

ABOGADO PRINCIPAL

FIRMADO: MWANAJUMA P. LUGOGO, ABOGADO EMPRESARIAL

CERTIFICACIÓN OFICIAL

Vista para la autenticación de las firmas
 IGNACIO MARTINEZ DE LECEA NOAIN, nacionalidad: español, en
 Zurich, conocido mío personalmente
 MWANAJUMA PIETRINA LUGOGO, nacionalidad:
 Seuzach, identificado con su pasaporte



Eduardo Calado

Quienes aparecen en el registro de comercio del cantón de Zurich como las persona que tienen derecho a firmar conjuntamente (dos) IGNACIO MARTINEZ DE LECEA NOAIN, como la persona con el derecho a firmar conjuntamente MWANAJUMA PIETRINA LUGOGO a nombre de

BAXTER HEALTHCARE SA, sociedad cuyo domicilio registrado está en OPFIKON

La firma fue reconocida ante nosotros por un tercero autorizado.

La inspección del registro comercial ha sido realizada directamente ante la certificación oficial mediante una consulta por internet.

Wallisellen, 15 de diciembre de 2009

BK no. 20792, 20793

Honorarios. 60 francos suizos.

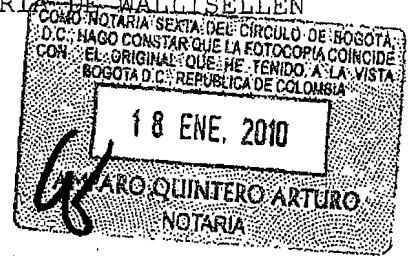
NOTARIA DE WALLISELLEN

FIRMADO: ROLAND FURRER, NOTARIO PÚBLICO SUPLENTE

APOSTILLA

(CONVENCION DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961)

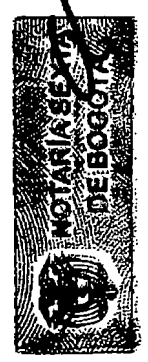
- 1. PAIS: CONFEDERACIÓN SUIZA, CANTÓN DE ZURICH
- 2. Este documento público ha sido firmado por ROLAND FURRER
- 3. quien actúa en su calidad de NOTARIO PÚBLICO SUPLENTE
- 4. lleva el sello/estampilla de LA NOTARIA DE WALLISELLEN



CERTIFICADO

- 5. En 8090, ZURICH.
- 6. el 16 de diciembre de 2009
- 7. Por la Cancillería de Estado del Cantón de Zurich

Eduardo Caballero Noguera
TRADUCCION OFICIAL



AA 42874276



documento que está debidamente legalizado por el Notario Público del Estado de Illinois.-----

Presente el señor **CARLOS ALBERTO GALLÓN GIRALDO**, domiciliado en Bogotá, identificado como aparece al pie de su firma y manifestó que está conforme con el contenido de esta escritura

pública.-----

- HASTA AQUI LAS DECLARACIONES DEL INTERESADO -

"Se advirtió al otorgante de esta escritura de leer la totalidad de su texto, a fin de verificar la exactitud de todos los datos en ella consignados, con el fin de aclarar, modificar o corregir lo pertinente antes de firmarla, la firma de la misma demuestra su aprobación total; en consecuencia, la notaria no asume ninguna responsabilidad por errores o inexactitudes establecidas con posterioridad a la firma del otorgante y de la Notaria. En tal caso, estos deben ser corregidos mediante el otorgamiento de una nueva escritura, suscrita por todos los que intervinieron en la inicial o por el actual titular del derecho y sufragados los gastos por los mismos (ARTICULO 35, DECRETO LEY 960 DE 1.970)".-----

LEIDO, el presente instrumento público por el otorgante y advertido de su Registro dentro del término legal, dio su asentimiento y en prueba de ello lo firma junto con la suscrita Notaria quien en esta forma lo autoriza.-----

DERECHOS \$ 42.860.00 -----

IVA 16% \$ 20.133.00 -----

El presente instrumento público se extendió y firmó en las hojas de papel notarial números: **AA / 42874273 - 42874276** -----

ENMENDADO: "140" SI VALE.



ES FIEL Y SEPTIMA COPIA (FOTOCOPIA) TOMADA DE LA ESCRITURA PUBLICA NUMERIO 140 DE FECHA 18 DE ENERO DE 2010.

COPIA QUE EXPIDO EN 11 HOJAS RUBRICADAS EN SUS MARGENES , LA CUAL CARECE DE NOTAS DE REVOCATORIA, MODIFICACION O SUSTITUCION, POR TANTO SE PRESUME VIGENTE EL PODER EN ELLA CONTENIDO.

BOGOTA, D.C. 10 DE FEBRERO DE 2010

RESOLUCION 01 DE 2008

POR LA NOTARIA SEXTA DE BOGOTA D.C.



255

CAVELIER

ABOGADOS

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTÁ 8, COLOMBIA

Teléfono: (57-1) 347 3611
Telefax: (57-1) 211 8650
(57-1) 700 4814
Fax in U.S.A.: (1-305) 381 9660

Señora Directora

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Superintendencia de Industria y Comercio

E. S. D.

Solicitante : **BAXTER HEALTHCARE S.A.**

Poder conferido el : 18/01/2010

Yo, OSCAR CORREA, obrando en mi calidad de apoderado principal del solicitante arriba mencionado, atentamente manifiesto a Usted y sustituyo el poder que me ha sido conferido en la persona de la doctora LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ, Abogada con Tarjeta Profesional N° 23.555, para continuar con el trámite de la patente del asunto de la referencia.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil.

Señora Directora,

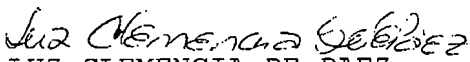


OSCAR CORREA

T.P.A. No. 71.027

C.C. No.79.524.634 de Bogotá

Acepto:


LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

T.P.A. N. 23.555

C.C. No. 35.456.344 de Usaquén

Colo 13936-843-001-9
DVF/vgc

NIT 860.041.367-3

Box No. VIII (ii) DECLARATION: ENTITLEMENT TO APPLY FOR AND BE GRANTED A PATENT <i>The declaration must conform to the standardized wording provided for in Section 212; see Notes to Boxes Nos. VIII, VIII (i) to (v) (in general) and the specific Notes to Box No. VIII (ii). If this Box is not used, this sheet should not be included in the request.</i> Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51 bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate: in relation to this international application, BAXTER INTERNATIONAL INC. and BAXTER HEALTHCARE S.A., are entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following: an assignment from GRILLBERGER, Leopold to BAXTER INTERNATIONAL INC. and BAXTER HEALTHCARE S.A., dated 14 June 2011 (14.06.2011); an assignment from REITER, Manfred to BAXTER INTERNATIONAL INC. and BAXTER HEALTHCARE S.A., dated 6 June 2011 (06.06.2011); and an assignment from MUNDT, Wolfgang to BAXTER INTERNATIONAL INC. and BAXTER HEALTHCARE S.A., dated 06 June 2011 (06.06.2011).
☐ This declaration is continued on the following sheet, "Continuation of Box No. VIII (ii)".

Box No. VIII (iii) DECLARATION: ENTITLEMENT TO CLAIM PRIORITY <i>The declaration must conform to the standardized wording provided for in Section 213; see Notes to Boxes Nos. VIII, VIII (i) to (v) (in general) and the specific Notes to Box No. VIII (iii). If this Box is not used, this sheet should not be included in the request.</i> Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application specified below, where the applicant is not the applicant who filed the earlier application or where the applicant's name has changed since the filing of the earlier application (Rules 4.17(iii) and 51bis.1(a)(iii)): in relation to this international application, BAXTER INTERNATIONAL INC. and BAXTER HEALTHCARE S.A., are entitled to claim priority of earlier application No. 61/362,635 by virtue of the following: an assignment from GRILLBERGER, Leopold to BAXTER INTERNATIONAL INC. and BAXTER HEALTHCARE S.A., dated 14 June 2011 (14.06.2011); an assignment from REITER, Manfred to BAXTER INTERNATIONAL INC. and BAXTER HEALTHCARE S.A., dated 6 June 2011 (06.06.2011); and an assignment from MUNDT, Wolfgang to BAXTER INTERNATIONAL INC. and BAXTER HEALTHCARE S.A., dated 06 June 2011 (06.06.2011).
☐ This declaration is continued on the following sheet, "Continuation of Box No. VIII (iii)".

258

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
-/-

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 006535
		Bogotá D.C., Enero 22 de 2013 - 16:27:53

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS					NI 860.041.367
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	495399866	22/01/2013	25.446.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	
			Vr. UNIDITARIO Vr. CONCEPTO
			500.000.00 500.000.00
			\$500.000.00

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-025488- -00000-0000
Fecha: 2013-02-07 16:10:58 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 259

COLO: 13936-841-051-6

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD FASE NACIONAL PCT	
(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud: (30) Prioridad (31) Prioridad (32) Fecha (33) País 61/362,635 2010/07/08 US		(51) Int Cl: C07K 014/755 (71) Solicitante(s) BAXTER INTERNATIONAL INC. y BAXTER HEALTHCARE S.A. (72) Inventor(es) LEOPOLD GRILLBERGER Y OTROS (74) Apoderado: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 2013/02/08 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 2011/07/08 No. de solicitud PCT/US2011/043455		(87) Publicación internacional Fecha: 2012/01/12 N° publicación: WO 2012/006591 A1	
(54) Titulo: MÉTODO PARA PRODUCIR EL FACTOR VON WILLEBRAND (vWF) DE ALTO PESO MOLECULAR RECOMBINANTE EN CULTIVO CELULAR			

Resumen:

La presente invención se refiere entre otros aspectos, a condiciones de cultivo celular para producir vWF de alto peso molecular, en particular, WF altamente multimérico con una alta actividad específica y ADAMTS13 con una alta actividad específica. Las condiciones de cultivo celular de la presente invención pueden incluir, por ejemplo, un medio de cultivo celular con una concentración incrementada de cobre y/o sobrenadante de cultivo celular con una baja concentración de amonio (NH4+). La presente invención también proporciona métodos para cultivar células in las condiciones de cultivo celular para expresar vWF de alto peso molecular y rA13 que tiene altas actividades específicas.

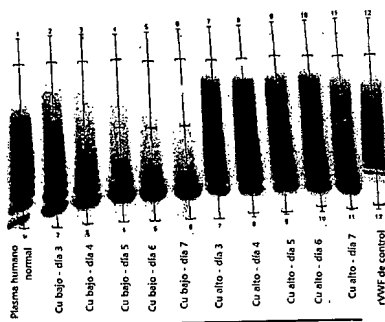


FIG. 1A

PATENTE DE INVENCION ☐ MODELO DE UTILIDAD ☐ Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copía de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño Industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño.
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

P102-FDA (2008-11-1A)

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-025488- -00000-0000

Fecha: 2013-02-07 16:10:58 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 259