



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

**(12) ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ**(21)(22) Заявка: **2012133474/10**, **18.01.2011**

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

**18.01.2010 EP 10150980.0****21.01.2010 US 61/297,011**(43) Дата публикации заявки: **27.02.2014** Бюл. № **6**(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
национальной фазе: **20.08.2012**

(86) Заявка РСТ:

**EP 2011/050594 (18.01.2011)**

(87) Публикация заявки РСТ:

**WO 2011/086197 (21.07.2011)**

Адрес для переписки:

**191186, Санкт-Петербург, а/я 230, "АРС-  
ПАТЕНТ", И.И. Липатовой**

(71) Заявитель(и):

**НОВО НОРДИСК ХЕЛС КЕА АГ (CH)**

(72) Автор(ы):

**БЬЕЛКЕ Яис Розе (DK)****(54) ОЧИСТКА ФАКТОРОВ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ****(57) Формула изобретения**

1. Способ очистки композиции белка/полипептида с различным содержанием гамма-карбоксиглутаминовой кислоты до желаемого содержания гамма-карбоксиглутаминовой кислоты из образца, содержащего смесь видов указанного белка/полипептида с различным содержанием гамма-карбоксиглутаминовой кислоты, при этом указанный способ включает следующие этапы:

(а) загрузку указанного образца белка/полипептида на иммуноаффинный хроматографический материал, содержащий связывающую группировку для гамма-карбоксиглутаминовой кислоты;

(б) элюирование указанного белка/полипептида; и

(в) выбор фракции, полученной из указанного элюата, где белок/полипептид во фракции имеет требуемое содержание гамма-карбоксиглутаминовых кислот; и характеризуется тем, что общая концентрация белка/полипептида в указанном образце превышает связывающую способность иммуноаффинного хроматографического материала.

2. Способ по п.1, где белок/полипептид представляет собой фактор IX.

3. Способ по п.1, где связывающая способность иммуноаффинного хроматографического материала превышена более чем на какое-либо значение из 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 140, 150, 200, 250, 500, 750 или 1000%, в частности более чем

на 120%, или более чем на 150%, или более чем на 250%.

4. Способ по п.3, в котором связывающая способность иммуноаффинного хроматографического материала превышена на значение между 100-400%, например на 100-200%, в частности на 100-150%.

5. Способ по п.1, где указанный способ включает выбор фракции, полученной из указанного элюата, и имеющий повышенную долю форм фактора IX №1-11-Gla и/или №1-12-Gla по сравнению с долей форм фактора IX №1-11-Gla и/или №1-12-Gla в образце, который должен быть очищен.

6. Способ по п.5, который включает выбор фракции, полученной из указанного элюата, и имеющий повышенную долю форм фактора IX №1-10-Gla по сравнению с долей форм фактора IX №1-10-Gla в образце, который должен быть очищен.

7. Способ по п.1, где указанный элюирующий буфер и/или уравнивающий буфер имеет pH между 5,0 и 8,5, например 7,5.

8. Способ по п.1, где хлорид натрия присутствует в элюирующем буфере в концентрации между 10 mM и 100 mM, такой как 50 mM.

9. Способ по п.1, где связывающая группировка для Gla включает Gla-направленное антитело.

10. Способ по п.9, где указанное антитело является чувствительным к сворачиванию домена Gla в присутствии кальция, магния или других двухвалентных катионов, и/или антитело распознает эпитоп, содержащий конкретные остатки Gla.

11. Способ по п.9, в котором Gla-направленное антитело содержит 3F14A3B6 (SEQ ID №№1 и 2).

12. Способ по п.1, где иммуноаффинный материал содержит сефарозные бусины, такие как предварительно активированные сефарозные бусины, в частности CNBr-Sepharose 4 FF.

13. Способ по п.1, где уравнивающий буфер и промывочный буфер также содержат ионы кальция, такие как хлорид кальция.

14. Способ по п.13, где указанные ионы кальция присутствуют в концентрации более 0,5 mM (например, более 0,5, 1,0, 1,5 или 2,0 mM хлорида кальция, такой как 3,0, 5,0, 8,0 или 10,0 mM хлорида кальция, в частности, 2 или 5 mM хлорида кальция), либо концентрация ионов кальция находится в пределах 0,5-10 mM, 1-8 mM, 1-5 mM и 2-5 mM.

15. Способ по п.1, где способ перегрузки на основе иммуноаффинности может быть объединен со вторым этапом, на котором Gla-виды также разделяют/очищают с использованием метода, основанного на анионной хроматографии.

---

#### HE9A Изменение адреса для переписки с заявителем

Адрес для переписки:

197101, Санкт-Петербург, а/я 128, "АРС-ПАТЕНТ", И.И. Липатовой

Дата публикации: 27.02.2014      Бюл. № 06/2014

---