



(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2010/07/30
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2011/02/03
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2012/02/22
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 2010/051629
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2011/012831
(30) Priorité/Priority: 2009/07/31 (FR0955413)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *C12N 15/115* (2010.01),
C07K 14/745 (2006.01)
(71) Demandeur/Applicant:
LFB BIOTECHNOLOGIES, FR
(72) Inventeurs/Inventors:
PERRET, GERALD, FR;
BIHOREAU, NICOLAS, FR;
SIRET, LAURENT, FR
(74) Agent: GOWLING LAFLEUR HENDERSON LLP

(54) Titre : PROCEDE POUR LA PURIFICATION DE PROTEINES DE LA COAGULATION A DOMAINE GLA ACTIVES
(54) Title: METHOD FOR PURIFYING ACTIVE GLA-DOMAIN COAGULATION PROTEINS

(57) **Abrégé/Abstract:**

L'invention concerne un procédé pour la purification de protéines de la coagulation à domaine GLA biologiquement actives, comprenant les étapes suivantes : a) mettre en contact un échantillon contenant une ou plusieurs protéines de la coagulation à domaine GLA, ledit échantillon étant susceptible de contenir des molécules biologiquement inactives de protéine(s) à domaine GLA, avec un support d'affinité sur lequel sont immobilisés des aptamères nucléiques se liant spécifiquement à au moins une protéine de la coagulation à domaine GLA biologiquement active, afin de former des complexes entre (i) lesdits aptamères nucléiques et (ii) ladite ou lesdites protéine(s) de la coagulation à domaine GLA, b) libérer la ou les protéine(s) de la coagulation à domaine GLA à partir des complexes formés à l'étape a), et c) récupérer ladite ou lesdites protéine(s) de la coagulation à domaine GLA biologiquement active(s) sous une forme purifiée.



(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
3 février 2011 (03.02.2011)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2011/012831 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C12N 15/115 (2010.01) C07K 14/745 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2010/051629

(22) Date de dépôt international :
30 juillet 2010 (30.07.2010)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0955413 31 juillet 2009 (31.07.2009) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : **LFB BIOTECHNOLOGIES** [FR/FR]; ZA de Courtaboeuf, 3 Avenue des Tropiques, F-91940 Les Ulis (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **PERRET, Gérard** [FR/FR]; 4 allée Ange Gabriel, F-94600 Choisy Le Roi (FR). **BIHOREAU, Nicolas** [FR/FR]; 36 Avenue Parrat, F-91400 Orsay (FR). **SIRET, Laurent** [FR/FR]; 33 Rue Albert Fouilleret, F-91700 Villiers Sur Orge (FR).

(74) Mandataires : **CATHERINE, Alain** et al.; Cabinet HARLE et PHELIP, 7 rue de Madrid, F-75008 Paris (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : 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) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (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, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv))

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues (règle 48.2.h))

— avec la partie de la description réservée au listage des séquences (règle 5.2.a))

(54) Title : METHOD FOR PURIFYING ACTIVE GLA-DOMAIN COAGULATION PROTEINS

(54) Titre : PROCEDE POUR LA PURIFICATION DE PROTEINES DE LA COAGULATION A DOMAINE GLA ACTIVES

(57) Abstract : The invention relates to a method for purifying biologically active GLA-domain coagulation proteins, comprising the following steps: a) bringing a sample that contains one or more GLA-domain coagulation proteins and may contain biologically inactive molecules of GLA-domain protein(s), into contact with an affinity substrate on which nucleic aptamers that bind specifically to at least one biologically active GLA-domain coagulation protein are immobilized, in order to form complexes between (i) said nucleic aptamers and (ii) said GLA-domain coagulation protein(s), b) releasing the GLA-domain coagulation protein(s) from the complexes formed in step a), and c) recovering said biologically active GLA-domain coagulation protein(s) in a purified form.

(57) Abrégé : L'invention concerne un procédé pour la purification de protéines de la coagulation à domaine GLA biologiquement actives, comprenant les étapes suivantes : a) mettre en contact un échantillon contenant une ou plusieurs protéines de la coagulation à domaine GLA, ledit échantillon étant susceptible de contenir des molécules biologiquement inactives de protéine(s) à domaine GLA, avec un support d'affinité sur lequel sont immobilisés des aptamères nucléiques se liant spécifiquement à au moins une protéine de la coagulation à domaine GLA biologiquement active, afin de former des complexes entre (i) lesdits aptamères nucléiques et (ii) ladite ou lesdites protéine(s) de la coagulation à domaine GLA, b) libérer la ou les protéine(s) de la coagulation à domaine GLA à partir des complexes formés à l'étape a), et c) récupérer ladite ou lesdites protéine(s) de la coagulation à domaine GLA biologiquement active(s) sous une forme purifiée.



WO 2011/012831 A1

Procédé pour la purification de protéines de la coagulation à domaine GLA actives**TITRE DE L'INVENTION**

Procédé pour la purification de protéines de la coagulation à domaine GLA actives

DOMAINE DE L'INVENTION

La présente invention se rapporte au domaine de la purification des protéines, et en particulier au domaine de la purification des protéines de la coagulation à domaine GLA, et encore plus spécifiquement des protéines de la coagulation à domaine GLA actives.

ETAT DE LA TECHNIQUE

De manière générale, les protéines à domaine GLA forment une famille de protéines possédant une structure commune, le domaine GLA, qui consiste en une région localisée vers l'extrémité N-terminale de ces protéines et qui comprend une pluralité de résidus glutamine qui sont normalement carboxylés en résidus d'acide carboxy-glutamique ou « GLA ». Les protéines à domaine GLA comprennent en général une partie N-terminale appelée propeptide qui est reconnue par une carboxylase dépendante de la vitamine K. Après carboxylation des résidus glutamine du domaine GLA, le propeptide est clivé par protéolyse et la protéine à domaine GLA mature et active est libérée. Selon les protéines considérées, le domaine GLA est constitué d'environ 45 acides aminés comprenant de 9 à 12 résidus glutamine qui sont normalement carboxylés en Gla.

Les protéines à domaine GLA consistent en des protéines dites « vitamine K-dépendantes ». Les protéines à domaine GLA englobent des facteurs de la coagulation, des protéines du tissu osseux et des conopeptides. Les facteurs de la coagulation à domaine GLA englobent la prothrombine (Facteur II), le Facteur VII, le Facteur IX, le Facteur X, la Protéine C et la Protéine S. Les protéines du tissu osseux à domaine GLA englobent l'Ostéocalcine et la Protéine Gla matricielle. Les conopeptides à domaine GLA englobent la Conantokine G et la Conantokine T. Les protéines à domaine GLA englobent aussi d'autres protéines, telles que la Protéine Z, Gas6, PRGP1 et PRGP2. Les protéines à domaine GLA sont présentées notamment dans l'article de Furie et al. (1999, Blood, Vol. 93 : 1798-1808).

Les protéines de la coagulation vitamine K-dépendantes à domaine GLA consistent en des protéines d'intérêt thérapeutique. Parmi celles-ci, le Facteur II, le Facteur VII, le Facteur IX et le Facteur X, représentent des protéines d'un très grand intérêt thérapeutique qui sont administrés pour la prévention et le traitement de nombreux troubles de l'hémostase. Les protéines humaines de la coagulation à domaine GLA peuvent être purifiées à partir des fluides humains naturels, en général à partir de plasma sanguin humain. Par ailleurs, de nombreux travaux ont été entrepris afin de mettre au point des procédés de production et de purification de protéines humaines recombinantes de la coagulation à domaine GLA. On peut citer par exemple le Facteur VII humain recombinant, qui est dores et déjà commercialisé en tant que médicament.

On comprend que l'obtention de préparations purifiées dans lesquelles le ou les facteur(s) de la coagulation d'intérêt se présentent sous une forme biologiquement active revêt une très grande importance, s'agissant de substances qui sont utilisées comme principes actifs de médicaments.

On peut citer en particulier l'obtention de préparations purifiées des facteurs de la coagulation à domaine GLA produits sous forme de protéines recombinantes, *in vitro* par des cellules génétiquement transformées ou *in vivo* par des animaux transgéniques, pour lesquelles il est essentiel de sélectionner les formes biologiquement actives de ces facteurs recombinants qui sont produits dans des systèmes artificiels ou dans des systèmes hétérologues à l'homme.

Pour l'obtention de protéines à domaine GLA purifiées à partir de fluides biologiques dans lesquels ces protéines sont produites naturellement ou bien sous forme de protéines recombinantes, des procédés de purification adaptés sont déjà connus dans l'état de la technique. Ces procédés comprennent en général une succession d'étapes de séparation sélective basées sur des étapes de précipitation des protéines, de passage sur des supports de chromatographie suivi d'étapes d'élution séquentielle, d'étapes de filtration en profondeur, d'ultrafiltration, ou encore d'étapes de concentration. Les procédés de purification de protéines de la coagulation à domaine GLA qui sont utilisés aujourd'hui pour produire des médicaments ne comprennent pas d'étape de chromatographie d'affinité. Une raison d'un tel choix technique réside dans les inconvénients engendrés par le détachement d'une partie des molécules ligand greffées sur le support d'affinité, qui sont retrouvées associées à la protéine thérapeutique purifiée dans le volume de l'éluat de chromatographie. A titre illustratif, on peut citer le produit Mononine®, qui est une composition pharmaceutique à base de Facteur IX humain purifié, qui est obtenu par un procédé utilisant un support d'immuno-affinité sur lequel sont immobilisés des anticorps monoclonaux anti-FIX de souris. Toutefois, la monographie du produit Mononine® spécifie la présence de traces d'anticorps monoclonaux murins anti-FIX humain dans le produit final, ce qui est de nature à entraîner des problèmes d'immunogénicité chez les patients traités car ils s'immunisent contre les « relargables » (anticorps et fragments d'anticorps murins). La monographie du produit Mononine® spécifie des contre-indications pour les patients allergiques aux protéines murines.

On sait dans l'état de la technique que l'intégrité partielle ou totale du domaine GLA des protéines de la coagulation à domaine GLA, y compris la prothrombine, le Facteur VII, le Facteur IX, le Facteur X, la protéine C et la protéine S, est importante pour le maintien de leur activité biologique.

Il existe donc un besoin dans l'état de la technique pour des procédés améliorés ou alternatifs de purification de protéines de la coagulation à domaine GLA actives. Cela englobe un besoin pour des procédés alternatifs ou améliorés pour l'obtention de compositions comprenant une seule protéine active purifiée, comme par exemple le Facteur VII ou le Facteur IX, ainsi que les procédés alternatifs ou améliorés pour l'obtention de compositions comprenant une combinaison de protéines à domaine GLA actives, par exemple des compositions comprenant une combinaison de Facteur II, de Facteur VII, de Facteur IX et de Facteur X actifs.

Cela englobe un besoin pour des procédés alternatifs ou améliorés pour la purification de protéines à domaine GLA actives non recombinantes et de protéines à domaine GLA actives recombinantes.

5 **RESUME DE L'INVENTION**

La présente invention est relative à un procédé pour la purification de protéines de la coagulation à domaine GLA biologiquement actives, comprenant les étapes suivantes :

- a) mettre en contact un échantillon contenant une ou plusieurs protéines de la coagulation à domaine GLA, ledit échantillon étant susceptible de contenir des molécules biologiquement inactives de protéine(s) à domaine GLA, avec un support d'affinité sur lequel sont immobilisés des aptamères nucléiques se liant spécifiquement à au moins une protéine de la coagulation à domaine GLA biologiquement active, afin de former des complexes entre (i) lesdits aptamères nucléiques et (ii) ladite ou lesdites protéine(s) de la coagulation à domaine GLA active,
- 10 b) libérer la ou les protéine(s) de la coagulation à domaine GLA active(s) à partir des complexes formés à l'étape a), et
- c) récupérer ladite ou lesdites protéine(s) de la coagulation à domaine GLA biologiquement active(s) sous une forme purifiée.

Dans les procédés ci-dessus, lesdits aptamères sont préférentiellement des aptamères désoxyribonucléiques.

Dans les procédés ci-dessus, ladite protéine de la coagulation à domaine GLA peut être un facteur de la coagulation vitamine K dépendant, par exemple choisis parmi le facteur II, le facteur VII, le facteur IX, le facteur X, la protéine C et la protéine S.

Dans certains modes de réalisation de ces procédés, lesdits aptamères nucléiques consistent en des aptamères de séquence SEQ ID N° 4.

DESCRIPTION DES FIGURES

La **Figure 1** illustre les courbes de liaison (i) du Facteur IX présent dans différentes compositions à (ii) un aptamère spécifique des protéines à domaine GLA immobilisé sur un support, dans un essai selon la technique de résonance plasmonique de surface. En abscisse : le temps, exprimé en secondes ; en ordonnées, le signal de résonance, exprimé en Unités de résonance arbitraires. Courbe n°1 : FIX recombinant commercialisé sous la dénomination Benefix® par la Société Wyeth ; Courbe n° 2 : préparation semi-purifiée de Facteur IX recombinant produit par des porcs transgéniques (FIXtg) ce FIX est mal gamma carboxylé (mesure de la carboxylation < 7 gamma carboxylations sur les 12 présentes); Courbe n° 3 : Témoin négatif (tampon seul)

La **Figure 2** est le cliché d'un gel d'électrophorèse SDS-PAGE de protéines contenues dans une fraction purifiée de facteur IX humain plasmatique ou du lait de cochon transgénique pour le Facteur IX ayant subi un traitement préalable par clarification puis chromatographie sur un support MEP HyperCel®, puis chromatographie sur un support d'affinité sur lequel sont

greffés des aptamères nucléiques spécifiques de protéines à domaine GLA. Le gel SDS-PAGE a été traité par le Bleu de Coomassie. De la gauche vers la droite : ligne 1 : Composition de départ : lait de cochon transgénique pour le Facteur IX humain ayant subi un traitement préalable par clarification puis chromatographie sur un support MEP HyperCel® ; ligne 2 : protéines contenues dans la fraction non retenue sur le support d'affinité ; ligne 3 : protéines contenues dans la fraction d'élution ; ligne 4 : protéines contenues en sortie du support d'affinité, dans le tampon de régénération ; ligne 5 : fraction purifiée de facteur IX humain plasmatique ; ligne 6 : protéines de référence de poids moléculaire connu. Les poids moléculaires apparents de certaines bandes protéiques des protéines de référence sont indiqués.

La **Figure 3** est le cliché d'un gel d'électrophorèse SDS-PAGE de protéines contenues dans une fraction purifiée de facteur IX humain plasmatique ou dans du lait de cochon transgénique pour le Facteur IX humain ayant subi un traitement préalable par clarification puis chromatographie sur un support MEP HyperCel®, puis purification sur un support d'affinité sur lequel sont greffés des aptamères nucléiques spécifiques de protéines à domaine GLA. Le gel SDS-PAGE a été traité avec le nitrate d'argent. La Figure 4A représente la totalité du gel SDS-PAGE après coloration. La Figure 4B est un détail du gel de la Figure 4A. Lignes « St » et « S » : protéines de référence de poids moléculaire connu ; lignes 1, 2 et 4 : protéines contenues dans la fraction d'élution après chromatographie sur un support MEP HyperCel® puis purification sur un support d'affinité sur lequel sont greffés des aptamères nucléiques spécifiques de protéines à domaine GLA à la suite d'essais distincts ; ligne 3 : fraction purifiée de facteur IX humain plasmatique (25 ng de facteur IX déposés sur le gel SDS-PAGE) ; ligne 3' : fraction purifiée de facteur IX humain plasmatique (550 ng de facteur IX déposés sur le gel SDS-PAGE). Les poids moléculaires apparents de certaines bandes protéiques sont indiqués sur les figures 4A et 4B.

La **Figure 4** illustre les courbes de liaison (i) du Facteur IX présent dans différentes compositions à (ii) un aptamère spécifique des protéines à domaine GLA immobilisé sur un support, dans un essai selon la technique de résonance plasmonique de surface. En abscisse : le temps, exprimé en secondes ; en ordonnées, le signal de résonance, exprimé en Unités de résonance arbitraires. Courbe n° 1 : préparation de Facteur IX humain plasmatique ; Courbe n° 2 : préparation de Facteur IX recombinant produit par un porc transgénique purifiée sur chromatographie sur un support MEP HyperCel® puis sur un support d'affinité comprenant des aptamères anti-GLA ; Courbe n° 3 : préparation de Facteur IX recombinant produit par un porc transgénique avant passage sur un support d'affinité comprenant des aptamères anti-GLA (après MEP HyperCel®) ; Courbes n° 4 : préparation de témoin négatif (tampon seul).

La **Figure 5** illustre les courbes de liaison (i) respectivement du Facteur VII, du Facteur IX ou du Facteur X, présent dans différentes compositions à (ii) un aptamère spécifique des protéines à domaine GLA immobilisé sur un support, dans un essai selon la technique de résonance plasmonique de surface. En abscisse : le temps, exprimé en secondes ; en ordonnées, le signal de résonance, exprimé en Unités de résonance arbitraires. Courbe n° 1 :

préparation de Facteur IX humain recombinant (BeneFIX®) ; Courbe n° 2 : préparation de Facteur VII humain plasmatique ; Courbe n° 3 : préparation de Facteur X humain plasmatique ; Courbe n° 4 : préparation de témoin négatif.

La **Figure 6** illustre les courbes de liaison d'une diversité d'acides nucléiques de l'invention au Facteur IX humain recombinant immobilisé sur un support, dans un essai selon la technique de résonance plasmonique de surface. En abscisse : le temps, exprimé en secondes; en ordonnées, signal de résonance, exprimé en Unités de résonance arbitraires. Courbes « 1 » : acides nucléiques de faible affinité ; Courbes « 2 » : acides nucléiques d'affinité intermédiaire ; Courbes « 3 » : acides nucléiques d'affinité forte ; Courbes « 4 » : acide nucléique de très forte affinité.

La **Figure 7** illustre les courbes de liaison des acides nucléiques aptamères « Mapt-1.2-CS » et Mapt-1.2.-CSO » au Facteur IX humain recombinant immobilisé sur un support, dans un essai selon la technique de résonance plasmonique de surface. En abscisse : le temps, exprimé en secondes; en ordonnées, signal de résonance, exprimé en Unités de résonance arbitraires. La courbe n°1 est la courbe de liaison obtenue avec l'aptamère Mapt-1.2.-CS. La courbe n° 2 est la courbe de liaison obtenue avec l'aptamère Mapt-1.2.-CSO.

La **figure 8** illustre un profil de chromatographie obtenu lors de la mise en œuvre du procédé de purification d'un Facteur IX humain plasmatique produit avec le support d'affinité sur lequel sont immobilisés des aptamères nucléiques anti-GLA. En abscisse : le temps ; en ordonnées : la valeur d'absorbance (D.O.) à 254 nanomètres. (1) : moment de l'injection du concentré de FIX humain plasmatique ; (2) : pic d'élimination de la fraction non retenue ; (3) : pic d'élution du FIX purifié ; (4) : pics générés pendant l'étape de régénération du support chromatographique.

La **Figure 9** est le cliché d'un gel d'électrophorèse SDS-PAGE, avec gradient de 4 à 12% de Bis-Acrylamide sans réducteur, de protéines contenues dans une fraction purifiée de facteur IX humain plasmatique ayant subi une chromatographie sur un support d'affinité sur lequel sont greffés des aptamères nucléiques spécifiques de protéines à domaine GLA. Le gel SDS-PAGE a été traité par le Bleu de Coomassie. De la gauche vers la droite : ligne 1 (« MD ») : Composition de départ, Concentré de Facteur IX humain plasmatique ; ligne 2 (« NR ») : protéines contenues dans la fraction non retenue sur le support d'affinité ; ligne 3 (« E1 ») : protéines contenues dans la fraction d'élution E1 ; ligne 4 (« E2 ») : protéines contenues en sortie du support d'affinité, dans le tampon de régénération ; ligne 5 (« E3 ») : protéines contenues en sortie du support d'affinité, dans le tampon de régénération ; ligne 6 (« T FIX ») : fraction purifiée de facteur IX humain plasmatique

La **figure 10** illustre un profil de chromatographie obtenu lors de la mise en œuvre du procédé de purification d'un Facteur IX humain plasmatique produit avec le support d'affinité dans lequel sont immobilisés des aptamères nucléiques anti-GLA. En abscisse ; le temps ; en ordonnées : la valeur d'absorbance (D.O.) à 254 nanomètres. (1) : fraction non retenue ; (2) : pic d'élution du FIX humain purifié ; (3) : pic de régénération du support chromatographique.

La **Figure 11** est le cliché d'un gel d'électrophorèse SDS-PAGE, avec gradient de 4 à 12% de Bis-Acrylamide sans réducteur, de protéines contenues dans une fraction purifiée de facteur IX humain plasmatique ayant subi une chromatographie sur un support d'affinité sur lequel sont greffés des aptamères nucléiques spécifiques de protéines à domaine GLA. Le gel SDS-PAGE a été traité par le Bleu de Coomassie. De la gauche vers la droite : ligne 1 (« Départ ») : Composition de départ, Concentré de Facteur IX humain plasmatique ; ligne 2 (« Non Retenu ») : protéines contenues dans la fraction non retenue sur le support d'affinité ; ligne 3 (« Eluat ») : protéines contenues dans la fraction d'élution.

La **figure 12** illustre un profil de chromatographie obtenu lors de la mise en œuvre du procédé de purification d'un Facteur IX humain transgénique produit dans le lait d'une truie transgénique avec le support d'affinité sur lequel sont immobilisés des aptamères nucléiques anti-GLA. En abscisse : le temps ; en ordonnées : la valeur d'absorbance (D.O.) à 254 nanomètres. (1) : Moment d'injection du FIX transgénique, (2) : Fraction non retenue ; (3) : fraction d'élution.

La **Figure 13** est le cliché d'un gel d'électrophorèse SDS-PAGE de protéines contenues dans une fraction pré-purifiée de facteur IX humain recombinant produit dans le lait d'une truie transgénique, ayant subi une chromatographie sur un support d'affinité sur lequel sont greffés des aptamères nucléiques spécifiques de protéines à domaine GLA. Le gel SDS-PAGE a été traité par le Bleu de Coomassie. De la gauche vers la droite : ligne 1 (« E5 », « Départ ») : Composition de départ, Facteur IX humain transgénique pré-purifié sur MEP HyperCel ; ligne 2 (« E6 », « Non Retenu ») : protéines contenues dans la fraction non retenue sur le support d'affinité ; ligne 3 (« E7 », « Elution ») : protéines contenues dans la fraction d'élution ; ligne 4 (« E8 », « Régénération ») : protéines contenues dans la fraction de régénération ; ligne 5 (« T FIX », « Témoin FIX pure ») : Témoins FIX purifié. Flèche : position de migration du FIX.

La **Figure 14** illustre les courbes de liaison d'une diversité d'acides nucléiques de l'invention au Facteur IX humain recombinant immobilisé sur un support, dans un essai selon la technique de résonance plasmonique de surface. En abscisse : le temps, exprimé en secondes ; en ordonnées, signal de résonance, exprimé en Unités de résonance arbitraires. Courbes « 1 » : acides nucléiques de faible affinité ; Courbes « 2 » : acides nucléiques d'affinité intermédiaire ; Courbes « 3 » : acides nucléiques d'affinité forte ; Courbes « 4 » : acide nucléique de très forte affinité.

La **figure 15** illustre un profil de chromatographie obtenu lors de la mise en œuvre du procédé de purification d'un Facteur VII humain transgénique produit avec le support d'affinité dans lequel sont immobilisés des aptamères nucléiques anti-GLA. En abscisse : le temps ; en ordonnées : la valeur d'absorbance (D.O.) à 254 nanomètres. (1) : moment de l'injection ; (2) : fraction non retenue ; (3) : moment d'injection du tampon d'élution ; (4) : fraction d'élution.

La **Figure 16** est le cliché d'un gel d'électrophorèse SDS-PAGE de protéines contenues dans une fraction pré-purifiée de facteur VII humain plasmatique, ayant subi une chromatographie sur un support d'affinité sur lequel sont greffés des aptamères nucléiques spécifiques de protéines à domaine GLA. Le gel SDS-PAGE a été traité par le Bleu de

Coomassie. De la gauche vers la droite : (1) : ligne 1 (« Départ ») : Composition de départ, Facteur VII humain plasmatique; (2) : ligne 2 (« Eluat ») : protéines contenues dans la fraction d'élution ; (3) : FVII Des-Gla : formes de FVII mal glycosylées ; (4) : autres formes mal identifiées de FVII..

5 La **figure 17** illustre un profil de chromatographie obtenu lors de la mise en œuvre du procédé de purification d'un Facteur VII humain transgénique produit avec le support d'affinité dans lequel sont immobilisés des aptamères nucléiques anti-GLA. En abscisse ; le temps ; en ordonnées : la valeur d'absorbance (D.O.) à 254 nanomètres. (1) : fraction non retenue ; (2) fraction d'élution ; (3) : fraction de régénération.

10 La **Figure 18** est le cliché d'un gel d'électrophorèse SDS-PAGE de protéines contenues dans une fraction pré-purifiée de facteur VII humain plasmatique, ayant subi une chromatographie sur un support d'affinité sur lequel sont greffés des aptamères nucléiques spécifiques de protéines à domaine GLA. Le gel SDS-PAGE a été traité par le Bleu de Coomassie. De la gauche vers la droite : (1) : ligne 1 « Départ ») : Composition de départ, (2) :
15 Facteur VII humain plasmatique; ligne 2 (« NR ») : Fraction des protéines non retenues ; (3) : ligne 3 : (« Eluat ») : protéines contenues dans la fraction d'élution ; (4) : FVII Des-Gla, formes mal glycosylées de FVII..

La **Figure 19** illustre les courbes de liaison de l'aptamère Mapt-2 immobilisé sur un support au Facteur VII humain plasmatique, dans un essai selon la technique de résonance
20 plasmonique de surface. Les courbes correspondent à la cinétique de fixation du FVII plasmatique lors de l'utilisation de différents tampons de course, respectivement, du bas vers le haut de la figure 16 : T3 : Tampon 3, T2 : Tampon 2, T1 : Tampon 1, T4 : Tampon 4 et T5 : Tampon 5. En abscisse : le temps, exprimé en secondes; en ordonnées : signal de résonance, exprimé en Unités de résonance arbitraires. Du bas vers le haut de la figure : courbes illustrant
25 des interactions d'affinité croissante..

La **Figure 20** illustre les courbes de liaison de l'aptamère Mapt-2 immobilisé sur un support au Facteur VII humain plasmatique, dans un essai selon la technique de résonance plasmonique de surface. La courbe permet de déterminer les paramètres de la cinétique de fixation du FVII plasmatique lors de l'utilisation du tampon 1 (Tris 50 mM, NaCl 50 mM, CaCl₂
30 10 mM, MgCl₂ 4 mM, pH 7,5). En abscisse : le temps, exprimé en secondes; en ordonnées, signal de résonance, exprimé en Unités de résonance arbitraires.

La **Figure 21** illustre les courbes de liaison de l'aptamère Mapt-2 immobilisé sur un support au Facteur VII humain plasmatique, dans un essai selon la technique de résonance plasmonique de surface. La courbe correspond à la cinétique de fixation du FVII plasmatique
35 lors de l'utilisation du tampon 5 (Tris 50 mM, CaCl₂ 10 mM, pH 7,5). En abscisse : le temps, exprimé en secondes; en ordonnées, signal de résonance, exprimé en Unités de résonance arbitraires.

La **Figure 22** illustre les courbes de liaison de l'aptamère Mapt-2 immobilisé sur un support au Facteur VII humain plasmatique, dans un essai selon la technique de résonance
40 plasmonique de surface. Les courbes correspondent à la résistance de la liaison du FVII

plasmatique à Mapt-2 lors de l'utilisation de différents tampons de lavage : (1) : injection de FVII ; (2) : tampon Tris 50 mM, NaCl 1 M, CaCl_2 10 mM, MgCl_2 4 mM, pH 7,5 , (3) : tampon Tris 50 mM, NaCl 2 M, CaCl_2 10 mM, MgCl_2 4 mM, pH 7,5, (4) : tampon Tris 50 mM, NaCl 3 M, CaCl_2 10 mM, MgCl_2 4 mM, pH 7,5 et (5) : tampon Tris 50 mM, EDTA 10 mM. En abscisse : le temps, exprimé en secondes; en ordonnées : signal de résonance, exprimé en Unités de résonance arbitraires.

La **Figure 23** illustre les courbes de liaison de l'aptamère Mapt-2 immobilisé sur un support au Facteur VII humain plasmatique, dans un essai selon la technique de résonance plasmonique de surface. Les courbes correspondent à la résistance de la liaison du FVII plasmatique à Mapt-2 lors de l'utilisation de différents tampons de lavage : (1) : injection de FVII ; (2) : tampon Tris 50 mM, CaCl_2 10 mM, MgCl_2 4 mM, pH 7,5 , (3) : tampon Tris 50 mM, CaCl_2 10 mM, MgCl_2 4 mM, NaCl 1M, pH 7,5 , (4) : tampon Tris 50 mM, CaCl_2 10 mM, MgCl_2 4 mM, NaCl 2M, pH 7,5 ; (5) : tampon Tris 50 mM, CaCl_2 10 mM, MgCl_2 4 mM, NaCl 3M, pH 7,5 et (6) : tampon Tris 50 mM, EDTA 10 mM. En abscisse : le temps, exprimé en secondes; en ordonnées, signal de résonance, exprimé en Unités de résonance arbitraires.

La **Figure 24** illustre les courbes de liaison de l'aptamère Mapt-2 immobilisé sur un support au Facteur VII humain plasmatique, dans un essai selon la technique de résonance plasmonique de surface. Les courbes correspondent à la résistance de la liaison du du FVII plasmatique à Mapt-2 lors de l'utilisation de différents tampons de lavage : (1) : injection de FVII ; (2) : tampon éthanol à 10%, (3) tampon Tris 50 mM, CaCl_2 10 mM, MgCl_2 4 mM, NaCl 1M, pH 7,5 , (4) : tampon Tris 50 mM, CaCl_2 10 mM, MgCl_2 4 mM, NaCl 2M, pH 7,5 ; (5) : tampon Tris 50 mM, CaCl_2 10 mM, MgCl_2 4 mM, NaCl 3M, pH 7,5 ; et (6) tampon Tris 50 mM, EDTA 10 mM. En abscisse : le temps, exprimé en secondes; en ordonnées, signal de résonance, exprimé en Unités de résonance arbitraires.

La **Figure 25** illustre les courbes de liaison de l'aptamère Mapt-1 immobilisé sur un support au Facteur VII humain recombinant, dans un essai selon la technique de résonance plasmonique de surface. Les courbes correspondent à la résistance de la liaison du FIX recombinant à Mapt-1 lors de l'utilisation de différents tampons de lavage : (1) : injection de FVII recombinant ; (2) : tampon Tris 50 mM, CaCl_2 10 mM, MgCl_2 4 mM, NaCl 1M, pH 7,5 , (3) tampon Tris 50 mM, CaCl_2 10 mM, MgCl_2 4 mM, NaCl 2M, pH 7,5 ; (4) tampon Tris 50 mM, CaCl_2 10 mM, MgCl_2 4 mM, NaCl 3M, pH 7,5 et (5) tampon Tris 50 mM, EDTA 10 mM.. En abscisse : le temps, exprimé en secondes; en ordonnées, signal de résonance, exprimé en Unités de résonance arbitraires.

La **Figure 26** illustre les courbes de liaison de l'aptamère Mapt-2 immobilisé sur un support au Facteur IX humain recombinant, dans un essai selon la technique de résonance plasmonique de surface. Les courbes correspondent à la résistance de la liaison du FIX recombinat à Mapt-1 lors de l'utilisation du tampon de lavage : Tris 50 mM, CaCl_2 10 mM, propylène glycol à 50%, à pH 7,5. En abscisse : le temps, exprimé en secondes; en ordonnées, signal de résonance, exprimé en Unités de résonance arbitraires. (1) : injection de propylène glycol à 50% dans le Tampon 5.

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

Le demandeur s'est attaché à concevoir de nouveaux procédés pour purifier des protéines de la coagulation à domaine GLA actives, c'est-à-dire de nouveaux procédés adaptés pour l'obtention de protéine(s) de la coagulation à domaine GLA purifiées et actives, à partir
5 d'un échantillon de départ comprenant une protéine de la coagulation à domaine GLA ou une pluralité de protéines de la coagulation à domaine GLA. En d'autres termes, le demandeur a cherché à mettre au point des procédés d'enrichissement ou de purification qui soient sélectifs (i) pour une protéine de la coagulation à domaine GLA active donnée, ou (ii) pour une pluralité de protéines de la coagulation à domaine GLA actives.

10 Afin de mettre au point ces procédés de purification, le demandeur a isolé et caractérisé de nouveaux ligands qui possèdent l'aptitude à se lier spécifiquement à une protéine à domaine GLA active ou à une pluralité de protéines de la coagulation à domaine GLA actives.

Ces nouveaux ligands ne se lient pas de manière détectable à une protéine de la coagulation à domaine GLA non active.

15 De plus, ces nouveaux ligands peuvent être immobilisés sur la surface d'un support solide afin de préparer des supports de purification par affinité de protéines de la coagulation à domaine GLA, lesdits supports de purification par affinité présentant un risque réduit, voire un risque nul, de relargage des ligands et donc de contamination du produit final purifié avec lesdits ligands, ou avec des fragments ou des produits résultant de la dégradation desdits
20 ligands.

Ces nouveaux ligands, dont les caractéristiques sont détaillées plus loin dans la présente description, consistent en des acides nucléiques, aussi appelés « aptamères nucléiques », qui se lient aux protéines de la coagulation à domaine GLA actives. Dans certains modes de réalisation, lesdits aptamères sont spécifiques d'une protéine de la coagulation à
25 domaine GLA active déterminée. Dans d'autres modes de réalisation, lesdits aptamères ne sont pas spécifiques d'une protéine de la coagulation à domaine GLA active particulière et peuvent se lier à une pluralité de protéines de la coagulation à domaine GLA actives.

La présente invention fournit des procédés de purification de protéines de la coagulation à domaine GLA actives, dans lesquels il est tiré bénéfice des propriétés de liaison de ces
30 nouveaux ligands du type acide nucléique.

Le demandeur s'est aussi attaché à mettre au point des procédés permettant l'obtention d'aptamères nucléiques se liant spécifiquement aux protéines à domaine GLA actives, dans l'objectif d'utiliser lesdits aptamères nucléiques dans des procédés de purification desdites protéines actives.

35 Selon l'invention, on a obtenu des aptamères nucléiques se liant spécifiquement aux protéines de la coagulation à domaine GLA actives. Plus précisément, le demandeur a obtenu et caractérisé des aptamères nucléiques qui se lient exclusivement à une seule ou à une pluralité de protéines de la coagulation à domaine GLA actives, c'est à dire à des protéines possédant un domaine GLA dont les résidus glutamine caractéristiques du domaine GLA ont

été au moins partiellement gamma-carboxylés et dont la gamma-carboxylation partielle du domaine GLA suffit pour que lesdites protéines de la coagulation à domaine GLA soient actives.

Dans certains modes de réalisation, un aptamère nucléique de l'invention, qui est spécifique d'une protéine de la coagulation à domaine GLA déterminée, est apte à se lier
5 sélectivement à une forme active de ladite protéine de la coagulation à domaine GLA, et ne se lie pas à une forme inactive de ladite protéine à domaine GLA.

Dans d'autres modes de réalisation, un aptamère nucléique de l'invention, qui est spécifique des protéines à domaine GLA actives, est capable de se lier indifféremment à une variété de protéines présentant une caractéristique commune conservée qui est le domaine
10 GLA dont le niveau de gamma-carboxylation permet à ces protéines d'être actives, et ne se lie pas aux formes inactives desdites protéines de la coagulation à domaine GLA.

On a notamment montré dans les exemples qu'un aptamère spécifique des protéines de la coagulation à domaine GLA est capable de se lier à une pluralité de protéines actives comme le Facteur IX, le Facteur VII et le Facteur X.

Les résultats présentés dans les exemples montrent que les aptamère anti-GLA de l'invention, comme par exemple l'aptamère Mapt-2-CS de séquence SEQ ID N° 37 ou encore l'aptamère Mapt-2.2.-CS de séquence SEQ ID N° 38, se lient exclusivement aux formes actives des protéines de la coagulation à domaine GLA, en particulier se lient exclusivement aux formes actives du Facteur VII humain. Par exemple, ces aptamères anti-GLA ne se lient pas
15 aux formes Des-Gla du Facteur VII humain, qui consistent en des formes non fonctionnelles comportant des altérations ou une absence du domaine GLA.

On connaît déjà dans l'état de la technique des aptamères nucléiques qui reconnaissent spécifiquement et individuellement des protéines à domaine GLA tels que le Facteur II, le Facteur VII, le Facteur IX ou le Facteur X, y compris des aptamères liant la thrombine (Zhao et al., 2008, Anal Chem, Vol. 80(19) : 7586-7593), des aptamères liant le Facteur IX/IXa (Subash et al., 2006, Thromb Haemost, Vol. 95 : 767-771; Howard et al., 2007, Atheroscl Thromb Vasc Biol, Vol. 27 : 722-727; Demande PCT n° WO 2002/096926; Brevet aux Etats-Unis n° US 7,312,325), des aptamères liant le Facteur X/Xa (Demande PCT n° WO 2002/096926; Brevet aux Etats-Unis n° US 7,312,325) ou encore des aptamères liant au facteur VII/VIIa humain
25 (Rusconi et al., 2000, Thromb Haemost, Vol. 84(5) : 841-848; Layzer et al., 2007, Spring, Vol. 17 : 1-11).

On précise qu'aucun des aptamères ci-dessus n'est décrit pour son utilisation pour purifier la protéine cible sur laquelle il se lie. De plus, les aptamères ci-dessus se lient exclusivement à une seule protéine à domaine GLA, sans réaction croisée avec une autre protéine à domaine GLA, ce qui permet de penser que les aptamères connus ne se lient pas
35 au domaine GLA des protéines de la coagulation à domaine GLA, et ne sont en conséquence pas aptes à se lier sélectivement au domaine GLA d'une protéine à domaine GLA active.

Un tel type d'aptamère, spécifique d'une protéine à domaine GLA donnée, et qui ne présente pas la capacité de se lier à une autre protéine, y compris à une autre protéine à
40 domaine GLA, est par exemple décrit par Layzer et al. (2007, Oligonucleotides, Vol. 17 : 1-11).

Toutefois, à la connaissance du demandeur, un aptamère nucléique dont la spécificité de liaison est le domaine GLA des protéines, et qui possède la capacité à se lier sélectivement à une ou plusieurs protéines de la coagulation à domaine GLA actives, n'a jamais été décrit dans l'état de la technique.

5 De plus, à la connaissance du demandeur, un aptamère nucléique dont la spécificité de liaison est le domaine GLA des protéines, et qui possède la capacité à se lier à une pluralité de protéines de la coagulation à domaine GLA actives distinctes, n'a pas non plus été décrit dans l'état de la technique.

10 La disponibilité d'aptamères nucléiques se liant spécifiquement aux protéines de la coagulation à domaine GLA actives a permis la mise au point de procédés de purification de ces protéines, notamment dans l'objectif d'obtenir un produit final purifié utilisable en tant que principe actif d'un médicament. Selon le type de spécificité de l'aptamère nucléique qui est utilisé, lesdits procédés de purification permettent (i) soit la purification sélective d'une protéine de la coagulation à domaine GLA active déterminée, (ii) soit la purification sélectivement des
15 formes actives d'une pluralité de protéines de la coagulation à domaine GLA.

La présente invention est relative à un procédé pour la purification d'au moins une protéine de la coagulation à domaine GLA biologiquement active comprenant les étapes suivantes :

- 20 a) mettre en contact un échantillon contenant une ou plusieurs protéines de la coagulation à domaine GLA avec un support d'affinité sur lequel sont immobilisés des aptamères nucléiques se liant spécifiquement aux protéines de la coagulation à domaine GLA biologiquement actives, afin de former des complexes entre (i) lesdits aptamères nucléiques et (ii) ladite ou lesdites protéine(s) de la coagulation à domaine GLA actives,
- 25 b) libérer la ou les protéine(s) de la coagulation à domaine GLA biologiquement actives à partir des complexes formés à l'étape a), et
- c) récupérer ladite ou lesdites protéine(s) de la coagulation à domaine GLA biologiquement active(s) sous une forme purifiée.

La présente invention est aussi relative à un procédé pour la purification de protéines de la coagulation à domaine GLA biologiquement active comprenant les étapes suivantes :

- 30 a) mettre en contact un échantillon contenant une ou plusieurs protéines de la coagulation à domaine GLA avec un support d'affinité sur lequel sont immobilisés des aptamères nucléiques se liant spécifiquement à une pluralité de protéines de la coagulation à domaine GLA biologiquement actives, afin de former des complexes entre (i) lesdits aptamères nucléiques et (ii) ladite ou lesdites protéine(s) de la coagulation à domaine GLA,
- 35 b) libérer la ou les protéine(s) de la coagulation à domaine GLA biologiquement actives à partir des complexes formés à l'étape a), et
- c) récupérer ladite ou lesdites protéine(s) de la coagulation à domaine GLA biologiquement active(s) sous une forme purifiée.

40 Le terme « protéine de la coagulation à domaine GLA » englobe toute protéine de la coagulation comprenant une région, désignée domaine GLA, comprenant une pluralité de

résidus glutamine qui sont gamma-carboxylés au cours de la synthèse protéique. Les protéines de la coagulation à domaine GLA englobent les protéines de la coagulation possédant un domaine GLA vers l'extrémité N-terminale, ledit domaine GLA étant localisé généralement en aval, c'est-à-dire du côté C-terminal, d'un propeptide qui est naturellement hydrolysé au cours de la synthèse. Les protéines de la coagulation à domaine GLA englobent les protéines de la coagulation dans lesquelles le domaine GLA consiste en une région d'environ 45 acides aminés comprenant de 9 à 12 résidus glutamine dont au moins une partie d'entre eux sont normalement carboxylés en résidus GLA lors du processus de synthèse protéique dans les cellules. Les facteurs de la coagulation à domaine GLA, qui consistent en des protéines vitamine K-dépendantes, englobent la prothrombine (Facteur II), le Facteur VII, le Facteur IX, le Facteur X, la Protéine C et la Protéine S. Les protéines de la coagulation à domaine GLA englobent les protéines non recombinantes provenant de sources naturelles, comme le plasma sanguin, ainsi que les protéines recombinantes qui peuvent être produites *in vitro* par des cellules transfectées ou transformées avec un ADN codant ladite protéine de la coagulation ou qui peuvent être produites *in vivo* par des animaux dans lequel on a introduit un transgène codant ladite protéine de la coagulation. Les protéines de la coagulation à domaine GLA produites par des animaux transgéniques peuvent aussi être appelées « protéines transgéniques » dans la présente description.

Des méthodes de détermination de l'activité des protéines de la coagulation à domaine GLA sont décrites en détail plus loin dans la présente description.

Une protéine de la coagulation à domaine GLA « active » ou « biologiquement active » englobe les protéines de la coagulation à domaine GLA possédant un niveau d'activité anti-coagulante ou amydolytique d'au moins 0,5 fois le niveau d'activité anti-coagulante ou amydolytique qui est déterminé pour une protéine correspondante de référence dont respectivement l'activité anti-coagulante ou l'activité amydolytique est jugée optimale. Une protéine de la coagulation à domaine GLA active englobe les protéines de la coagulation à domaine GLA possédant un niveau d'activité anti-coagulante ou amydolytique d'au moins 0,5, 0,55, 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9, 0,95, 0,96, 0,97, 0,98, 0,99 ou 1 fois le niveau d'activité anti-coagulante ou amydolytique qui est déterminé pour une protéine correspondante de référence dont respectivement l'activité anti-coagulante ou l'activité amydolytique est jugée optimale. Une protéine à domaine GLA active englobe aussi les protéines à domaine GLA, que l'on peut aussi désigner protéines GLA « super-actives », qui possèdent un niveau d'activité anti-coagulante ou amydolytique supérieure à la protéine ou à la composition de référence, c'est-à-dire ayant un niveau d'activité anti-coagulante ou amydolytique supérieure à 1.

Un Facteur II (prothrombine) actif englobe les facteurs II possédant un niveau d'activité anti-coagulante ou amydolytique d'au moins 0,5 fois le niveau d'activité anti-coagulante ou amydolytique qui est déterminé pour le Facteur II correspondant de référence dont respectivement l'activité anti-coagulante ou l'activité amydolytique est jugée optimale.

Un Facteur VII actif englobe les facteurs VII possédant un niveau d'activité anti-coagulante ou amydolytique d'au moins 0,5 fois le niveau d'activité anti-coagulante ou

amydolytique qui est déterminé pour le Facteur VII correspondant de référence dont respectivement l'activité anti-coagulante ou l'activité amydolytique est jugée optimale.

Un Facteur IX actif englobe les facteurs IX possédant un niveau d'activité anti-coagulante ou amydolytique d'au moins 0,5 fois le niveau d'activité anti-coagulante ou amydolytique qui est déterminé pour le Facteur IX correspondant de référence dont respectivement l'activité anti-coagulante ou l'activité amydolytique est jugée optimale.

Un Facteur X actif englobe les facteurs X possédant un niveau d'activité anti-coagulante ou amydolytique d'au moins 0,5 fois le niveau d'activité anti-coagulante ou amydolytique qui est déterminé pour le Facteur X correspondant de référence dont respectivement l'activité anti-coagulante ou l'activité amydolytique est jugée optimale.

Une protéine C active englobe les protéines C possédant un niveau d'activité anti-coagulante ou amydolytique d'au moins 0,5 fois le niveau d'activité anti-coagulante ou amydolytique qui est déterminé pour la protéine C correspondante de référence dont respectivement l'activité anti-coagulante ou l'activité amydolytique est jugée optimale.

Une protéine S active englobe les protéines S possédant un niveau d'activité anti-coagulante ou amydolytique d'au moins 0,5 fois le niveau d'activité anti-coagulante ou amydolytique qui est déterminé pour la protéine S correspondante de référence dont respectivement l'activité anti-coagulante ou l'activité amydolytique est jugée optimale.

Au vu de ce qui précède, l'homme du métier comprend qu'une protéine de la coagulation à domaine GLA « active » ou « biologiquement active » ne doit pas être confondue avec les protéines de la coagulation à domaine GLA qui sont « activées ». Les protéines de la coagulation à domaines GLA sont « activées » à l'issue d'une réaction de protéolyse qui clive un peptide, la protéine résultante exerçant alors son activité biologique propre. Les facteurs de la coagulation « activés » sont en général désignés avec un « a » additionnel. A titre illustratif, le couple Facteur VII / Facteur VII « activé » peut être désigné comme le couple FVII/FVIIa. Toutefois, au sens de l'invention, il existe à la fois des formes « biologiquement actives » et des formes « biologiquement non actives » d'un facteur de la coagulation « activé », du fait qu'il existe des formes d'un facteur « activé » de la coagulation à domaine GLA qui sont « biologiquement non actives », par exemple du fait d'une gamma-carboxylation incorrecte de leur domaine GLA.

Ainsi, au sens de l'invention, une protéine de la coagulation à domaine GLA « biologiquement active » englobe à la fois (i) la forme « activée » de ladite protéine de la coagulation à domaine GLA et qui exerce directement son activité biologique propre et (ii) la forme non activée de ladite protéine, laquelle forme non activée de ladite protéine résulte, après activation, en une forme de ladite protéine qui exerce son activité biologique propre.

Par « protéine correspondante » ou « facteur correspondant », on entend préférentiellement la protéine ou le facteur du même mammifère, par exemple humain.

Les protéines de la coagulation à domaine GLA actives, également appelées protéines de la coagulation à domaine GLA biologiquement actives, englobent les protéines de ce type dans lesquelles la totalité des résidus glutamine du domaine GLA sont gamma-carboxylés.

Dans certains cas, les protéines de la coagulation à domaine GLA actives englobent les protéines de ce type dans lesquelles au moins un résidu glutamine du domaine GLA n'est pas gamma-carboxylé, mais qui est néanmoins biologiquement active au sens de l'invention.

5 Par « aptamère nucléique », on entend selon l'invention un acide nucléique simple brin se liant spécifiquement à une ou plusieurs protéines de la coagulation à domaine GLA active(s), qui peut être aussi désigné dans la présente description par le terme « aptamère anti-GLA ». Les aptamères de l'invention englobent donc ceux pour lesquels on peut détecter des complexes avec une seule protéine de la coagulation à domaine GLA active ou avec une variété de protéines de la coagulation à domaine GLA actives données, après une étape
10 préalable de mise en contact des partenaires respectivement nucléique et protéique. Préférentiellement, un « aptamère nucléique » selon l'invention a la capacité à se lier à une pluralité de protéines à domaine GLA actives.

La détection de complexes formés entre un aptamère anti-GLA selon l'invention et une protéine de la coagulation à domaine GLA active peut être aisément réalisée par l'homme du
15 métier, par exemple en mettant en œuvre une technique de détection par résonance plasmonique de surface, y compris la technique Biacore®, comme cela est illustré dans les exemples. L'homme du métier peut aussi aisément détecter la formation de complexes entre un aptamère anti-GLA selon l'invention et une protéine de la coagulation à domaine GLA active par des techniques classiques du type ELISA, comme cela est connu par l'homme du métier.

20 On a montré dans les exemples qu'un aptamère anti-GLA selon l'invention est capable de se lier sélectivement aux formes actives des protéines de la coagulation à domaine GLA, comme le Facteur IX. On a aussi montré selon l'invention qu'un aptamère anti-GLA est capable de se lier respectivement à une pluralité de protéines de la coagulation à domaine GLA actives distinctes, et en particulier à une pluralité de protéines humaines de la coagulation à domaine
25 GLA actives. On a montré notamment qu'un aptamère anti-GLA donné selon l'invention est capable de se lier respectivement au Facteur VII, au Facteur IX et au Facteur X actifs.

Dans certains modes de réalisation, le procédé de purification ci-dessus est caractérisé en ce que ladite protéine de la coagulation à domaine GLA est un facteur de la coagulation vitamine K dépendant.

30 Dans certains modes de réalisation, le procédé de purification ci-dessus est caractérisé en ce que ladite protéine de la coagulation à domaine GLA est choisie parmi le facteur II, le facteur VII, le facteur IX, le facteur X, la protéine C et la protéine S.

Dans certains modes de réalisation, le procédé de purification ci-dessus est adapté pour purifier sélectivement une seule protéine de la coagulation à domaine GLA active choisie parmi
35 le facteur II, le facteur VII, le facteur IX, le facteur X, la protéine C et la protéine S.

Dans certains modes de réalisation, le procédé de purification ci-dessus est adapté pour purifier simultanément au moins deux protéines de la coagulation à domaine GLA actives choisies parmi le facteur II, le facteur VII, le facteur IX, le facteur X, la protéine C et la protéine S.

Dans certains modes de réalisation, le procédé de purification ci-dessus est adapté pour purifier simultanément au moins trois protéines de la coagulation à domaine GLA actives choisies parmi le facteur II, le facteur VII, le facteur IX, le facteur X, la protéine C et la protéine S.

5 Dans certains modes de réalisation, le procédé de purification ci-dessus est adapté pour purifier simultanément le facteur II, le facteur VII, le facteur IX et le facteur X actifs.

Dans certains modes de réalisation, le procédé de purification ci-dessus est adapté pour purifier le facteur IX actif.

10 On a ainsi montré dans les exemples qu'un aptamère anti-GLA selon l'invention est capable de discriminer des protéines de la coagulation à domaine GLA actives des protéines de la coagulation à domaine GLA non actives. En particulier, on a montré dans les exemples qu'un aptamère anti-GLA selon l'invention est capable de discriminer les protéines de la coagulation à domaine GLA dont le domaine GLA est correctement gamma-carboxylé des protéines de la coagulation à domaine GLA dont le domaine GLA est incorrectement gamma-carboxylé.

15 Selon l'invention, un domaine GLA correctement gamma-carboxylé englobe un domaine GLA dont la totalité des résidus glutamine caractéristiques sont gamma-carboxylés ainsi qu'un domaine GLA dont seulement une partie des résidus glutamine caractéristiques sont gamma-carboxylés, mais dont la gamma-carboxylation partielle n'entraîne pas que la protéine de la coagulation à domaine GLA considérée ne soit pas biologiquement active, au sens de
20 l'invention.

A titre illustratif, pour une protéine de la coagulation à domaine GLA comme le Facteur IX, la protéine est biologiquement active lorsque la totalité des résidus glutamine caractéristiques de son domaine GLA sont gamma-carboxylés, et aussi lorsqu'au moins 7 résidus glutamine du domaine GLA sont gamma-carboxylés, parmi les 12 résidus glutamine
25 caractéristiques contenus dans son domaine GLA. Ainsi, pour le Facteur IX, les protéines actives englobent les facteurs IX possédant 7, 8, 9, 10, 11 et 12 résidus glutamine du domaine GLA qui ont été gamma-carboxylés.

En ce qui concerne le Facteur IX, un aptamère nucléique anti-GLA selon l'invention englobe les aptamères qui se lient aux facteurs IX possédant 7, 8, 9, 10, 11 et 12 résidus
30 glutamine du domaine GLA qui ont été gamma-carboxylés et ne se lient pas aux facteurs IX possédant moins de 7 résidus glutamine du domaine GAL qui ont été gamma-carboxylés. Comme exemple d'un tel aptamère, on peut citer l'aptamère de séquence SEQ ID N° 4.

Ces propriétés d'un aptamère anti-GLA de l'invention de discriminer entre les protéines de la coagulation à domaine GLA actives et les protéines de la coagulation à domaine GLA non actives peuvent être utilisées dans des procédés de purification de protéines de la
35 coagulation à domaine GLA actives, afin d'obtenir un produit final fortement enrichi en forme(s) active(s) de la ou des protéine(s) de la coagulation à domaine GLA d'intérêt. Des exemples de mise en œuvre de procédés de purification de formes actives de protéines de la coagulation à domaine GLA actives, en particulier de formes actives de facteur IX, sont illustrés dans les
40 exemples. Ces propriétés avantageuses de discrimination des aptamères anti-GLA de

l'invention permettent par exemple l'obtention de préparations purifiées de Facteur IX humain recombinant actif, à partir du lait d'un mammifère transgénique pour le facteur IX humain, lorsque ledit lait comprend à la fois des formes actives et des formes non actives de Facteur IX humain recombinant, en particulier des formes de Facteur IX humain recombinant dont le
5 domaine GLA est correctement gamma-carboxylé et des formes de facteur IX humain recombinant dont le domaine GLA est incorrectement gamma-carboxylé.

La présente invention est aussi relative à un procédé pour la purification de protéines de la coagulation à domaine GLA biologiquement actives, comprenant les étapes suivantes :

- a) mettre en contact un échantillon contenant une ou plusieurs protéines de la coagulation à
10 domaine GLA, ledit échantillon étant susceptible de contenir des molécules biologiquement non actives de protéine(s) de la coagulation à domaine GLA, avec un support d'affinité sur lequel sont immobilisés des aptamères nucléiques se liant spécifiquement à une protéine de la coagulation à domaine GLA biologiquement active ou à une pluralité de protéines de la coagulation à domaine GLA biologiquement actives, afin de former des complexes entre (i)
15 lesdits aptamères nucléiques et (ii) ladite ou lesdites protéine(s) de la coagulation à domaine GLA, actives
- b) libérer la ou les protéine(s) de la coagulation à domaine GLA actives à partir des complexes formés à l'étape a), et
- c) récupérer ladite ou lesdites protéine(s) de la coagulation à domaine GLA biologiquement
20 actives sous une forme purifiée.

Dans certains modes de réalisation du procédé ci-dessus, lesdits aptamères nucléiques consistent en des aptamères désoxyribonucléiques.

Dans certains modes de réalisation, le procédé de purification ci-dessus est caractérisé en ce que ladite protéine de la coagulation à domaine GLA est un facteur de la coagulation
25 vitamine K dépendant.

Dans certains modes de réalisation, le procédé de purification ci-dessus est caractérisé en ce que ladite protéine de la coagulation à domaine GLA est choisie parmi le facteur II, le facteur VII, le facteur IX, le facteur X, la protéine C et la protéine S.

Dans certains modes de réalisation, le procédé de purification ci-dessus est adapté pour
30 purifier sélectivement une seule protéine de la coagulation à domaine GLA active choisie parmi le facteur II, le facteur VII, le facteur IX, le facteur X, la protéine C et la protéine S.

Dans certains modes de réalisation, le procédé de purification ci-dessus est adapté pour purifier simultanément au moins deux protéines de la coagulation à domaine GLA actives choisies parmi le facteur II, le facteur VII, le facteur IX, le facteur X, la protéine C et la protéine
35 S.

Dans certains modes de réalisation, le procédé de purification ci-dessus est adapté pour purifier simultanément au moins trois protéines de la coagulation à domaine GLA actives choisies parmi le facteur II, le facteur VII, le facteur IX, le facteur X, la protéine C et la protéine S.

Dans certains modes de réalisation, le procédé de purification ci-dessus est adapté pour purifier simultanément le facteur II, le facteur VII, le facteur IX et le facteur X actifs.

Dans certains modes de réalisation, le procédé de purification ci-dessus est adapté pour purifier le facteur IX actif.

5 Comme cela a déjà été mentionné précédemment, une forme « active » d'une protéine de la coagulation à domaine GLA consiste en une forme pour laquelle le domaine GLA est correctement gamma-carboxylé, c'est-à-dire à une forme de la protéine de la coagulation à domaine GLA qui est reconnue par un aptamère anti-GLA selon l'invention..

10 Un aptamère anti-GLA peut être obtenu par des procédés qui ont été spécialement mis au point pour les besoins de l'invention, et qui sont détaillés plus loin dans la présente description.

La purification simultanée de plus d'une protéine de la coagulation à domaine GLA dépend notamment du type d'échantillon de départ qui est utilisé pour la mise en oeuvre du procédé de purification. En particulier, le nombre et l'identité des protéines de la coagulation à
15 domaine GLA qui sont obtenues sous forme purifiée à l'issue du procédé sont logiquement limités par le nombre et l'identité des protéines de la coagulation à domaine GLA qui sont présentes initialement dans l'échantillon de départ.

Au sens de l'invention, la « purification » d'une protéine de la coagulation à domaine GLA active signifie un enrichissement en la ou les forme(s) active(s) de ladite protéine de la
20 coagulation à domaine GLA, c'est à dire en l'obtention d'une composition « purifiée » ayant une concentration en la protéine à domaine GLA active détectablement supérieure à la concentration initiale de ladite protéine de la coagulation à domaine GLA active dans l'échantillon de départ qui est soumis à l'étape de purification. Une protéine de la coagulation à domaine GLA active « sous forme purifiée » englobe les compositions comprenant une protéine
25 de la coagulation à domaine GLA active dont la concentration est détectablement supérieure à sa concentration dans la composition de départ avant la mise en oeuvre de l'étape de purification. Ainsi, une protéine de la coagulation à domaine GLA active de l'invention englobe une composition dans laquelle ladite protéine de la coagulation à domaine GLA active est purifiée à homogénéité, mais n'est aucunement restreinte à cette forme purifiée particulière. En
30 particulier, lorsque l'échantillon avant purification comprend plus d'une protéine de la coagulation à domaine GLA, les protéines actives purifiées ne peuvent par définition être purifiées à homogénéité, du simple fait qu'au moins deux protéines de la coagulation à domaine GLA actives coexistent dans la composition après purification.

De manière générale, les aptamères anti-GLA peuvent consister en des molécules
35 d'ADN (acide désoxyribonucléique) ou d'ARN (acide ribonucléique) et ont la capacité à se lier à une protéine à domaine GLA active, supérieure à la capacité à se lier à une protéine de la coagulation à domaine GLA non active.

Un aptamère anti-GLA peut être obtenu par des procédés qui ont été spécialement mis au point pour les besoins de l'invention, et qui sont détaillés plus loin dans la présente
40 description.

Dans certains modes de réalisation, les aptamères anti-GLA selon l'invention possèdent diverses caractéristiques structurales communes, y inclus une séquence comprenant, de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', successivement (i) une séquence nucléotidique spécifique invariable d'environ 20 nucléotides de longueur (par exemple 18 nucléotides de longueur), suivie de (ii) une séquence nucléotidique variable d'environ 40 à 50 nucléotides de longueur (par exemple 44 nucléotides de longueur), suivie de (iii) une séquence nucléotidique spécifique invariable d'environ 20 nucléotides de longueur (par exemple 18 nucléotides de longueur). On précise que les séquences nucléotidiques variables (ii) peuvent posséder entre elles une très forte identité de séquence en nucléotides.

Certains des procédés de sélection d'aptamères anti-GLA qui sont spécifiés dans la présente description sont du type permettant l'obtention d'une famille d'aptamères anti-GLA, aptes à reconnaître sélectivement une protéine de la coagulation à domaine GLA active déterminée, en particulier une protéine humaine de la coagulation à domaine GLA active déterminée.

Certains autres des procédés de sélection d'aptamères anti-GLA qui sont spécifiés dans la présente description sont du type permettant l'obtention d'une famille d'aptamères anti-GLA, aptes à reconnaître sélectivement une pluralité de protéines de la coagulation à domaine GLA actives, en particulier une pluralité de protéines humaines de la coagulation à domaine GLA actives.

D'un point de vue structurel, la famille d'acides nucléiques, ou aptamères nucléiques, se liant spécifiquement aux protéines de la coagulation à domaine GLA actives de l'invention comprend au moins 15 nucléotides consécutifs d'un polynucléotide ayant au moins 40% d'identité en nucléotides avec l'acide nucléique de formule (I) suivante :



dans laquelle :

- « SEQ ID N° X » consiste en un acide nucléique de séquence SEQ ID N°3,
- « x » est un entier égal à 0 ou 1, et
- « y » est un entier égal à 0 ou 1.

Dans certains modes de réalisation, l'acide de séquence SEQ ID N°X a une longueur de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, ou 50 nucléotides.

Dans d'autres modes de réalisation, l'acide nucléique de séquence SEQ ID N°X a une longueur de 43, 44, 45, 46, 47, 48 ou 49 nucléotides de longueur.

Dans certains autres modes de réalisation préférés, l'acide nucléique de séquence SEQ ID N°X a une longueur de 43, 44 ou 45 nucléotides de longueur.

Comme déjà mentionné précédemment, l'acide nucléique de formule (I) a au moins 15 nucléotides de longueur.

Dans certains modes de réalisation, l'acide nucléique de formule (I) a au moins 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66,

67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80 ou 81 nucléotides de longueur, ce qui englobe les acides nucléiques possédant exactement chacune des longueurs spécifiées.

Lorsque l'entier « x » est égal à 0 et l'entier « y » est égal à 1, les aptamères nucléiques de l'invention, englobent les acides nucléiques comprenant au moins 15 nucléotides consécutifs d'un polynucléotide ayant au moins 40% d'identité en nucléotides avec l'acide nucléique de formule (I-1) suivante



Lorsque l'entier « x » est égal à 1 et l'entier « y » est égal à 0, les aptamères nucléiques de l'invention, englobent les acides nucléiques comprenant au moins 15 nucléotides consécutifs d'un polynucléotide ayant au moins 40% d'identité en nucléotides avec l'acide nucléique de formule (I-2) suivante



Lorsque l'entier « x » est égal à 0 et l'entier « y » est égal à 0, les aptamères nucléiques de l'invention, englobent les acides nucléiques comprenant au moins 15 nucléotides consécutifs d'un polynucléotide ayant au moins 40% d'identité en nucléotides avec l'acide nucléique de formule (I-3) suivante :



Les aptamères nucléiques ci-dessus englobent donc les acides nucléiques comprenant au moins 15 nucléotides consécutifs d'un polynucléotide ayant au moins 40% d'identité en nucléotides avec un acide nucléique de séquence SEQ ID N°3.

De manière générale, un premier polynucléotide ayant au moins 40% d'identité en nucléotides avec un second polynucléotide ou acide nucléique possède au moins 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 100% d'identité en nucléotides avec ledit second polynucléotide ou acide nucléique.

Dans certains modes de réalisation d'un acide nucléique de l'invention comprenant la séquence SEQ ID N° X, ladite séquence SEQ ID N° X est choisie dans le groupe constitué des acides nucléiques ayant au moins 15 nucléotides consécutifs d'une séquence possédant au moins 40% d'identité en nucléotides avec une séquence choisie parmi les séquences SEQ ID N° 3, 6 à 35, 37 et 38.

Dans certains modes de réalisation d'un acide nucléique de l'invention comprenant la séquence SEQ ID N° X, ladite séquence SEQ ID N° X est choisie dans le groupe constitué des acides nucléiques possédant au moins 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 100% d'identité en nucléotides une séquence choisie parmi les séquences SEQ ID N° 3, 6 à 35, 37 et 38.

Dans certains modes de réalisation d'un aptamère nucléique de l'invention, ledit aptamère est choisi parmi les acides nucléiques comprenant une séquence d'au moins 15 nucléotides consécutifs d'une séquence possédant au moins 40% d'identité en nucléotides avec une séquence choisie parmi les séquences SEQ ID N° 3, 4, 6 à 39.

5 Dans certains modes de réalisation d'un aptamère nucléique de l'invention, ledit aptamère est choisi parmi les acides nucléiques comprenant une séquence d'au moins 15 nucléotides consécutifs d'une séquence choisie parmi les séquences SEQ ID N° 3, 4, 6 à 39.

Dans certains modes de réalisation d'un aptamère nucléique de l'invention, ledit aptamère est choisi parmi les acides nucléiques comprenant une séquence possédant au
10 moins 40% d'identité en nucléotides avec une séquence choisie parmi les séquences SEQ ID N° 3, 4, 6 à 39.

Dans certains modes de réalisation d'un aptamère nucléique de l'invention, ledit aptamère est choisi parmi les acides nucléiques comprenant une séquence choisie parmi les séquences SEQ ID N° 3, 4, 6 à 39.

15 Dans certains modes de réalisation d'un aptamère nucléique de l'invention, ledit aptamère est choisi parmi les acides nucléiques consistant en une séquence choisie parmi les séquences SEQ ID N° 3, 4, 6 à 39.

Il résulte de ce qui précède que la présente invention englobe une famille d'acides nucléiques monobrin ayant au moins 15 nucléotides consécutifs de l'enchaînement de formule
20 (I) défini ci-dessus.

Le « pourcentage d'identité » entre deux séquences d'acides nucléiques, au sens de la présente invention, est déterminé en comparant les deux séquences alignées de manière optimale, à travers une fenêtre de comparaison.

La partie de la séquence nucléotidique dans la fenêtre de comparaison peut ainsi
25 comprendre des additions ou des délétions (par exemple des « gaps ») par rapport à la séquence de référence (qui ne comprend pas ces additions ou ces délétions) de manière à obtenir un alignement optimal entre les deux séquences.

Le pourcentage d'identité est calculé en déterminant le nombre de positions auxquelles une base nucléique identique est observé pour les deux séquences comparées, puis en
30 divisant le nombre de positions auxquelles il y a identité entre les deux bases nucléiques par le nombre total de positions dans la fenêtre de comparaison, puis en multipliant le résultat par cent afin d'obtenir le pourcentage d'identité en nucléotides des deux séquences entre elles.

L'alignement optimal des séquences pour la comparaison peut être réalisé de manière informatique à l'aide d'algorithmes connus.

35 De manière tout à fait préférée, le pourcentage d'identité de séquence est déterminé à l'aide du logiciel CLUSTAL W (version 1.82) les paramètres étant fixés comme suit : (1) CPU MODE = ClustalW mp ; (2) ALIGNMENT = « full » ; (3) OUTPUT FORMAT = « aln w/numbers » ; (4) OUTPUT ORDER = « aligned » ; (5) COLOR ALIGNMENT = « no » ; (6) KTUP (word size) = « default » ; (7) WINDOW LENGTH = « default » ; (8) SCORE TYPE = « percent » ; (9)
40 TOPDIAG = « default » ; (10) PAIRGAP = « default » ; (11) PHYLOGENETIC TREE/TREE

TYPE = « none » ; (12) MATRIX = « default » ; (13) GAP OPEN = « default » ; (14) END GAPS = « default » ; (15) GAP EXTENSION = « default » ; (16) GAP DISTANCES = « default » ; (17) TREE TYPE = « cladogram » et (18) TREE GRAP DISTANCES = « hide ».

Dans certains modes de réalisation préférés d'un aptamère nucléique anti-GLA de l'invention, ledit aptamère nucléique comprend au moins 15 nucléotides consécutifs d'un polynucléotide ayant au moins 80% d'identité en nucléotides avec l'acide nucléique de formule (I), ce qui englobe les aptamères comprenant 15 nucléotides consécutifs d'un polynucléotide ayant au moins 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 100% d'identité en nucléotides avec ledit acide nucléique de formule (I).

Les aptamères nucléiques selon l'invention englobent l'aptamère nucléique de séquence SEQ ID N° 4. On rappelle que l'aptamère de séquence SEQ ID N°4 consiste en un aptamère de formule (I) dans laquelle la séquence SEQ ID N° X consiste en la séquence SEQ ID N° 3. On rappelle aussi qu'un aptamère de séquence SEQ ID N°3 consiste en un aptamère de formule (I-3) dans lequel les séquences SEQ ID N°1 et SEQ ID N°2 sont absentes.

Le demandeur a montré que l'aptamère de séquence SEQ ID N° 3 possède une capacité à se lier sélectivement aux protéines de la coagulation à domaine GLA actives sensiblement identique à celle de l'aptamère de séquence SEQ ID N° 4. Ces résultats montrent le caractère essentiel de la présence de l'acide nucléique de séquence SEQ ID N°3 dans les propriétés de liaison spécifique de l'aptamère de séquence SEQ ID N° 4. De manière générale, ces résultats montrent le caractère essentiel de l'acide nucléique de séquence SEQ ID N° X dans un aptamère de formule (I), l'acide nucléique de séquence SEQ ID N° X conférant à l'aptamère de formule (I) l'aptitude à se lier sélectivement aux protéines de la coagulation à domaine GLA actives.

Les aptamères nucléiques de l'invention englobent donc aussi l'aptamère de séquence SEQ ID N° 3.

On a aussi montré dans les exemples qu'une grande variété d'aptamères, incluant les aptamères de séquences SEQ ID N° 6 à 35 possèdent une capacité à se lier sélectivement aux protéines de la coagulation à domaine GLA actives, le cas échéant avec des niveaux d'affinité distincts. A titre illustratif, parmi les aptamères de séquences SEQ ID N° 6 à 35, l'aptamère ayant la plus grande capacité à se lier au Facteur IX humain est l'aptamère de séquence SEQ ID N° 35, qui peut être aussi désigné « Mapt-1.2.-CS ».

On a aussi identifié dans les exemples des aptamères ayant une capacité à se lier aux protéines de la coagulation à domaine GLA actives encore supérieure à l'aptamère Mapt-1.2.-CS ci-dessus. Un exemple d'un tel aptamère est l'aptamère de séquence SEQ ID N° 36, qui peut être aussi désigné « Mapt-1.2.-CSO ».

L'aptamère Mapt-1.2.-CSO de séquence SEQ ID N° 36 est un aptamère comprenant au moins 15 nucléotides consécutifs d'un polynucléotide ayant au moins 40% d'identité en nucléotides avec l'acide nucléique de 62 nucléotides de longueur de formule (I), suivante :

5'-[SEQ ID N°1]-[SEQ ID N°35]-3', et

consistant en l'acide nucléique allant du nucléotide en position 10 jusqu'au nucléotide en position 49 dudit acide nucléique de formule (I).

On a aussi montré dans les exemples que chacun des acides nucléiques de séquences SEQ ID N° 37 à 39 possédait la capacité à se lier aux protéines de la coagulation à domaine GLA actives. L'aptamère de séquence SEQ ID N° 39 peut être aussi désigné « Mapt-2 ». L'aptamère de séquence SEQ ID N° 37 peut être aussi désigné « Mapt-2-CS ». L'aptamère de séquence SEQ ID N° 38 peut être aussi désigné « Mapt-2.2.-CS ». On précise que la séquence de l'aptamère Mapt-2CS est incluse dans la séquence de l'aptamère Mapt-2 : il s'agit de la « core sequence » SEQ ID N° X de l'aptamère Mapt-2.

On a montré dans les exemples que les aptamères anti-GLA de l'invention peuvent être utilisés avec succès pour la fabrication de supports de chromatographie d'affinité, utiles pour séparer les protéines de la coagulation à domaine GLA actives des protéines de la coagulation à domaine GLA non actives.

Pour la réalisation de supports de chromatographie d'affinité notamment, les aptamères nucléiques anti-GLA de l'invention sont préférentiellement inclus dans une structure chimique, aussi appelée « composé » dans la présente description, qui comprend notamment un moyen espaceur et, le cas échéant, un moyen d'immobilisation sur un support solide.-

Dans certains modes de réalisation, l'aptamère nucléique est inclus dans la structure d'un composé de formule (II) suivante :

[IMM]_x-[SPAC]_y- [APT] (II), dans laquelle :

- [IMM] signifie un composé d'immobilisation sur un support,
- [SPAC] signifie une chaîne espaceur,
- [APT] signifie un aptamère anti-GLA tel que défini dans la présente description,
- x est un entier égal à 0 ou 1, et
- y est un entier égal à 0 ou 1.

Dans certains modes de réalisation du composé de formule (II), [APT] consiste en un acide désoxyribonucléique dont la séquence est choisie parmi les séquences SEQ ID N° 3, 4, 6 à 39..

La « chaîne espaceur » désignée [SPAC] dans le composé de formule (II) peut être de tout type connu. Ladite chaîne espaceur a pour fonction d'éloigner physiquement l'acide nucléique de la surface du support solide sur lequel ledit composé peut être immobilisé et de permettre une mobilité relative de l'acide nucléique par rapport à la surface du support solide sur lequel il peut être immobilisé. La chaîne espaceur limite ou évite que des encombrements stériques, dus à une trop grande proximité du support solide et de l'acide nucléique, gênent les événements de liaison entre ledit acide nucléique et des molécules de protéine de la coagulation susceptibles d'être mises en contact avec celui-ci.

Dans le composé de formule (II), la chaîne espaceur est liée préférentiellement à l'extrémité 5' ou à l'extrémité 3' de l'acide nucléique aptamère.

Avantageusement la chaîne espaceur est liée à la fois à une extrémité de l'aptamère et au support solide. Cette construction avec espaceur a pour avantage de ne pas immobiliser

directement l'aptamère sur le support solide. De préférence la chaîne espaceur est un oligonucléotide non spécifique ou du Polyéthylène Glycol (PEG) ou autre chaîne hydrocarbonée hydrophile. Lorsque la chaîne espaceur consiste en un oligonucléotide non spécifique, ledit oligonucléotide comprend avantageusement au moins 5 nucléotides de longueur, de préférence
5 entre 5 et 15 nucléotides de longueur.

Dans les modes de réalisation d'un composé de formule (II) dans lesquels la chaîne espaceur consiste en un Polyéthylène Glycol, ladite chaîne espaceur englobe un polyéthylène glycol de type PEG(C18), commercialisé par exemple par la Société Sigma Aldrich.

Comme cela est illustré dans les exemples, la purification de protéines de la coagulation à domaine GLA actives est réalisée à la fois avec des composés de formule (II) comprenant une chaîne espaceur [SPAC] et avec des composés de formule (II) ne possédant pas de chaîne espaceur [SPAC].
10

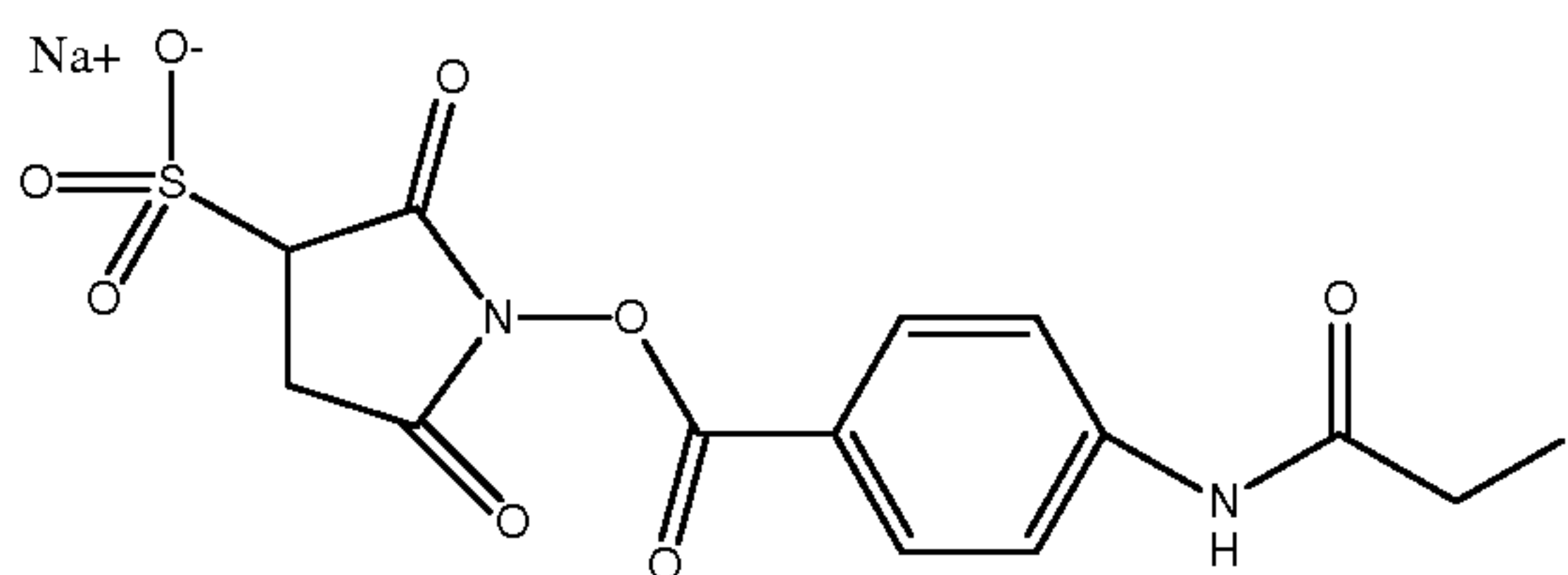
Pour immobiliser l'aptamère sur la chaîne espaceur, l'acide nucléique peut être modifié chimiquement avec différents groupements chimiques tels que des groupements permettant d'immobiliser ledit acide nucléique de façon covalente, tels que des thiols, des amines ou tout autre groupement capable de réagir avec des groupements chimiques présents sur le support solide.
15

Dans le composé de formule (II) le composé [IMM] consiste en un composé choisi parmi (i) un composé capable de former une ou plusieurs liaisons covalente(s) avec le matériau de support solide et (ii) un composé capable de se lier spécifiquement sur le support solide par l'intermédiaire de liaisons faibles non covalentes, y compris des liaisons hydrogènes, des forces électrostatiques ou des forces de Van der Waals.
20

Dans certains cas, le composé [IMM], du fait qu'il est constitué d'une chaîne d'atomes liés entre eux par des liaisons covalentes, peut se comporter comme une chaîne espaceur. Toutefois, par définition, un composé [IMM] ne peut jamais signifier une chaîne [SPAC] dans un composé de formule (II) selon l'invention. En d'autres termes, dans un composé de formule (II), la chaîne [SPAC], lorsqu'elle est présente, ne peut être liée directement au support de chromatographie, que se soit par des liaisons covalents ou des liaisons faibles non covalentes.
25

Le premier type de composé [IMM] englobe les agents de couplage bifonctionnels, comme le glutaraldéhyde, le SIAB ou encore le SMCC.
30

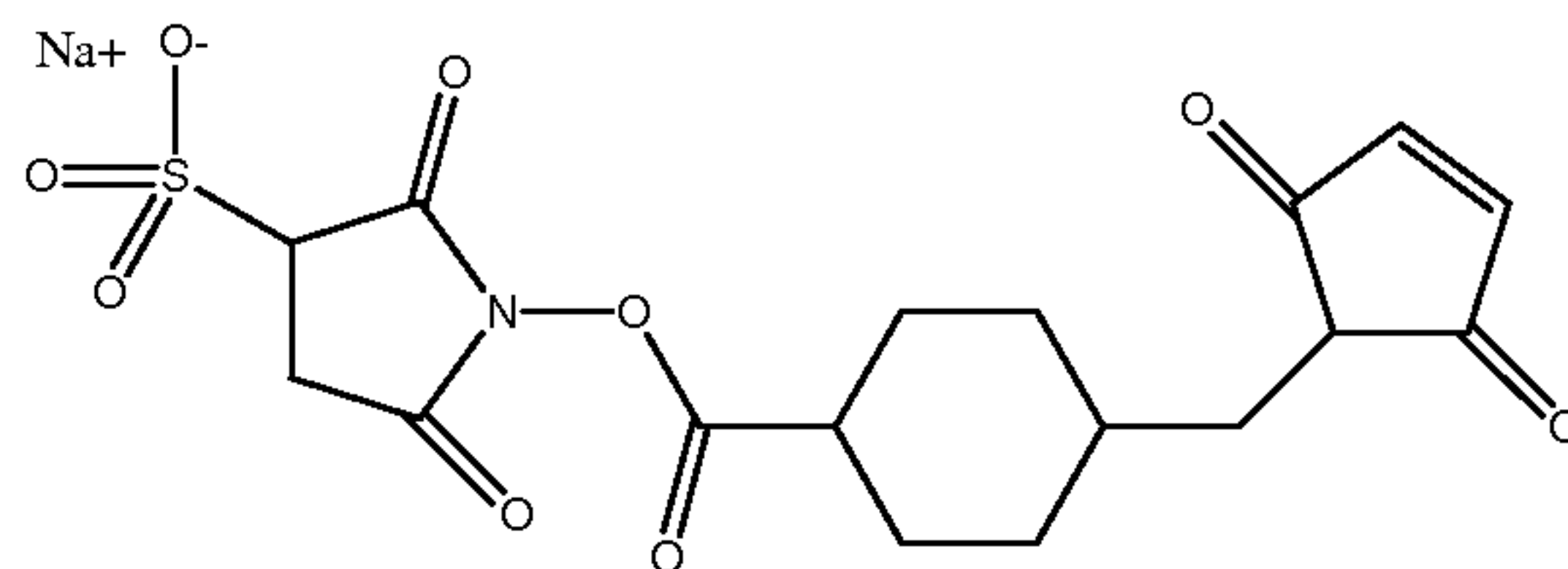
Le composé SIAB, décrit par Hermanson G.T. (1996, Bioconjugate techniques, San Diego : Academic Press, pp 239-242), est le composé de formule (A) suivante :



(A)

Le composé SIAB comprend deux groupes réactifs, respectivement un groupe iodoacétate et un groupe ester Sulfo-NHS, ces groupes réagissant respectivement sur des groupes amino et sulfhydryl.

5 Le composé SMCC, qui est décrit par Samoszuk M.K. et al. (1989, Antibody, Immunoconjugates Radiopharm., 2(1) : 37-46), est le composé de formule (B) suivante :



(B)

10 Le composé SMCC comprend deux groupes réactifs, respectivement un groupe ester Sulfo-NHS et un groupe maléimide, qui réagissent respectivement avec un groupe amino et un groupe sulfhydryl.

Le second type de composé [IMM] englobe la biotine, qui est capable de se lier de manière spécifique non covalente à des molécules d'avidine ou de streptavidine présentes sur le support solide.

15 Une fois immobilisé sur le support solide via l'espaceur, l'aptamère anti-GLA est avantageusement modifié à son extrémité libre (extrémité non liée à l'espaceur) grâce à, et sans s'y limiter, un nucléotide chimiquement modifié (tel que 2'omethyl ou 2'fluoropyrimidine, 2' ribopurine, phosphoramidite), un nucléotide inversé ou un groupement chimique (PEG, polycations, cholestérol). Ces modifications permettent de protéger l'aptamère anti-GLA des dégradations enzymatiques.

20 Le support solide peut être une colonne de chromatographie d'affinité composée d'un gel dérivé de l'agarose, de la cellulose ou d'un gel synthétique tel qu'un dérivé acrylamide, méthacrylate ou polystyrène, une puce telle qu'une puce adaptée à la résonance plasmonique de surface, une membrane telle qu'une membrane polyamide, polyacrylonitrile ou polyester, une bille magnétique ou paramagnétique.

La présente invention est également relative à un complexe entre :

- (i) un aptamère nucléique choisi parmi un acide nucléique de formule (I), et un composé de formule (II), et
- 30 (ii) une protéine de la coagulation à domaine GLA active, y compris une protéine de la coagulation dont le domaine GLA est correctement gamma-carboxylé.

La présente invention a aussi pour objet un support pour l'immobilisation d'une protéine de la coagulation à domaine GLA active, y compris d'une protéine de la coagulation à domaine GLA correctement gamma-carboxylé, caractérisé en ce qu'il comprend un matériau support solide sur lequel sont greffées une pluralité de molécules consistant chacune en, ou

comprenant chacune, un aptamère nucléique, lesdites molécules étant choisies parmi (a) un acide nucléique de formule (I), et (b) un composé de formule (II).

Le support ci-dessus peut être utilisé pratiquement dans toutes les applications pour lesquelles on cherche à immobiliser une protéine de la coagulation à domaine GLA active, y compris une protéine de la coagulation à domaine GLA active humaine, ce qui englobe les applications à des fins de purification de ladite protéine de la coagulation à domaine GLA active et les applications à des fins de détection de ladite protéine de la coagulation à domaine GLA active.

La réalisation de supports sur lesquels sont immobilisés des aptamères nucléiques de l'invention se liant spécifiquement à une protéine de la coagulation à domaine GLA active sont largement illustrés dans les exemples, dans lesquels les aptamères de l'invention sont utilisés notamment comme agents de capture, utilisables pour la purification ou pour la détection d'une protéine de la coagulation à domaine GLA active, y compris une protéine humaine de la coagulation à domaine GLA active, dans des échantillons.

La présente invention concerne donc aussi un procédé pour l'immobilisation d'une protéine de la coagulation à domaine GLA active sur un support, comprenant une étape au cours de laquelle on met en contact un échantillon comprenant au moins une protéine à domaine GLA avec un support solide sur lequel a été préalablement immobilisée une substance choisie parmi un acide nucléique de formule (I), et un composé de formule (II). Ledit procédé peut comprendre, selon les objectifs techniques poursuivis, une étape additionnelle de récupération des molécules de protéine(s) de la coagulation à domaine GLA actives immobilisées, complexées avec les molécules d'acides nucléiques de formule (I). L'étape additionnelle de récupération de la protéine de la coagulation à domaine GLA active, ou des protéines de la coagulation à domaine GLA actives, consiste préférentiellement en une étape de mise en contact des complexes de protéine(s) de la coagulation à domaine GLA actives avec les acides nucléiques de formule (I) avec un agent chélateur des cations métalliques, tel que l'EDTA.

Pour la réalisation de procédés de purification de protéine par chromatographie d'affinité en utilisant des supports solides sur lesquels sont immobilisés les aptamères d'intérêt, l'homme du métier peut se référer aux travaux décrits par Romig et al. (1999, J Chromatogr B Biomed Sci Apl, Vol. 731(2) : 275-284).

De plus, la fabrication d'un support d'affinité comprenant un aptamère nucléique de l'invention et la réalisation d'un procédé de purification du Facteur IX humain actif avec ledit support d'affinité est illustré dans les exemples.

De manière générale, les supports solides sur lesquels peuvent être immobilisés les aptamères de l'invention englobe tout type de support ayant la structure et la composition retrouvée communément pour les supports de filtre, de support de silicium pour des puces, des membranes, etc. Les supports solides englobent notamment les résines, les résines pour colonne de chromatographie d'affinité, les billes de polymères, les billes magnétiques, etc. Les supports solides englobent aussi notamment les matériaux à base de verre ou de métal, tels

que l'acier, l'or, l'argent, l'aluminium, le cuivre, le silicium, le verre, la céramique. Les supports solides englobent aussi notamment des matériaux polymères, tels qu'un polyéthylène, un polypropylène, un polyamide, un fluorure de polyvinylidène, et des combinaisons de ceux-ci.

Le support solide peut être revêtu avec un matériau facilitant l'attachement, la fixation, la formation de complexes, l'immobilisation ou l'interaction avec les aptamères.

Dans certains modes de réalisation, le support solide est une lame de verre dont la surface est revêtue d'une couche d'or, d'une couche ayant subi un traitement par carboxyméthylation, d'une couche de dextran, de collagène, d'avidine, de streptavidine, etc.

De cette manière, les aptamères selon l'invention peuvent être immobilisés sur le support solide par l'intermédiaire d'un revêtement d'attachement, comme par exemple décrit ci-dessus, soit par réaction chimique avec création de liaisons covalentes, soit par association par des liaisons non covalentes telles que des liaisons hydrogène, des forces électrostatiques, des forces de Van der Waals, etc.

Les exemples décrivent des modes de réalisation de supports solides sur lesquels sont immobilisés, par des liaisons non covalentes, les aptamères de l'invention.

Dans les exemples, on décrit notamment des supports solides consistant en une lame de verre revêtue d'une couche de molécules de streptavidine, et des aptamères de l'invention conjugués à une molécule de biotine qui sont immobilisés sur le support par association non covalente biotine/streptavidine.

Dans les exemples, on décrit aussi des supports solides consistant en un matériau de polystyrène revêtu d'une couche de molécules de streptavidine, et des aptamères de l'invention conjugués à une molécule de biotine qui sont immobilisés sur le support par association non covalente biotine/streptavidine.

Dans certains modes de réalisation, les aptamères de l'invention peuvent être immobilisés sur un support solide adapté pour la chromatographie d'affinité, l'électrochromatographie et l'électrophorèse capillaire, comme décrit par exemple par Ravelet et al. (2006, J Chromatogr A, Vol. 117(1) : 1-10), Connor et al. (2006, J Chromatogr A, Vol. 111(2) : 115-119), Cho et al. (2004, Electrophoresis, Vol. 25 (21-22) : 3730-3739) ou encore Zhao et al. (2008, Anal Chem, Vol.80(10) : 3915-3920).

Un aptamère de formule (I) ayant au moins 15 nucléotides de longueur et se liant spécifiquement aux protéines à domaine GLA, ou *un composé de formule (II)*, peut être aussi avantageusement utilisé comme agent de capture de protéine(s) à domaine GLA active(s), dans des procédés et dispositifs de détection ou de diagnostic.

Selon encore un autre aspect, la présente invention concerne aussi un procédé pour détecter la présence d'une ou plusieurs protéine(s) de la coagulation à domaine GLA active(s) dans un échantillon comprenant les étapes suivantes :

a) mettre en contact (i) un acide nucléique de formule (I), ou un composé de formule (II) ou un support solide sur lequel sont immobilisés une pluralité de molécules dudit acide nucléique ou dudit composé, avec (ii) ledit échantillon; et

b) détecter la formation de complexes entre (i) ledit acide nucléique de formule (I), ou ledit composé de formule (II) ou ledit support et (ii) la ou les protéine(s) de la coagulation à domaine GLA actives.

Les exemples de la présente demande de brevet fournissent divers modes de réalisation de procédés de détection du FIX/FIXa humain actif avec des aptamères de l'invention préalablement immobilisés sur un support solide.

Pour la réalisation d'un procédé de détection selon l'invention, le support solide utilisé peut être un support solide choisi parmi les supports solides décrits précédemment en relation avec le procédé de purification de protéines de la coagulation à domaine GLA actives.

Pour la réalisation d'un procédé ou d'un dispositif de détection de protéines de la coagulation à domaine GLA actives, l'homme du métier peut se référer notamment aux techniques décrites dans la demande de brevet européen n° EP 1 972 693, la demande PCT n° WO 2008/038696, la demande PCT n° WO 2008/025830, ou encore la demande PCT n° WO 2007/0322359.

Dans certains modes de réalisation, l'étape b) de détection de la formation de complexes entre (i) ledit acide nucléique ou ledit support solide et (ii) la ou les protéine(s) de la coagulation à domaine GLA actives peut être réalisé par mesure du signal de résonance plasmonique de surface, comme cela est décrit dans les exemples.

Dans certains autres modes de réalisation, l'étape b) de détection de la formation de complexes entre (i) ledit acide nucléique ou ledit support solide et (ii) la ou les protéine(s) de la coagulation à domaine GLA actives peut être réalisée par la mise en contact desdits complexes éventuellement formés avec un ligand spécifique d'une protéine de la coagulation à domaine GLA, ledit ligand étant détectable. Dans les exemples, on décrit ces modes de réalisation dans lesquels on utilise, comme ligand détectable d'une protéine de la coagulation à domaine GLA, des anticorps monoclonaux ou polyclonaux anti-protéine de la coagulation à domaine GLA, marqués avec une enzyme, en l'occurrence la peroxydase de raifort, comme cela est conventionnellement utilisé dans les tests de type ELISA. Comme anticorps spécifiques de protéines de la coagulation à domaine GLA, on peut utiliser, selon les objectifs qui sont poursuivis, (i) soit des anticorps dirigés spécifiquement contre une protéine de la coagulation à domaine GLA déterminée, par exemple des anticorps anti-FII humain, anti-FVII humain, anti-FIX humain, anti-FX humain, anti-protéine C humaine ou anti-protéine S humaine, (ii) soit des anticorps dirigés contre un domaine GLA, capables de reconnaître une pluralité de protéines à domaine GLA, comme décrits par exemple dans le brevet américain N° US 7,439,025.

De manière surprenante, il est montré selon l'invention que l'on peut fabriquer un support d'affinité tel que défini dans la présente description en utilisant, comme aptamères nucléiques anti-GLA, des aptamères ADN, pourtant considérés dans l'état de la technique comme des acides nucléiques ligands dont la mise en œuvre est malaisée, et dont la spécificité pour la protéine cible est moindre que la spécificité de la molécule d'ARN de séquence correspondante. Notamment, il est admis dans l'état de la technique que le ADN ligands ont une flexibilité moindre que l'ARN correspondant et qu'en conséquence sont moins

aptes que les ARN ligands à subir des changements de conformation. On rappelle que lorsqu'un aptamère nucléique se lie à la protéine cible, il se produit un changement de conformation. Il a aussi été décrit que plus le changement de conformation de l'aptamère nucléique est rapide et plus l'affinité dudit aptamère nucléique pour la protéine cible est élevée (Michaud et al., 2003, Anal Chem, Vol. 76 : 1015-1020 ; Brumbt et al., 2005, Anal Chem, Vol. 77 : 1993-1998).

Ainsi, dans certains modes de réalisation d'un support d'affinité selon l'invention, les aptamères anti-GLA consistent en des aptamères ADN.

En conséquence, dans certains modes de réalisation d'un support d'affinité selon l'invention, lesdits acides nucléiques immobilisés, le cas échéant inclus dans la structure d'un composé de formule (I), consistent en des acides désoxyribonucléiques.

Dans certains autres modes de réalisation d'un support d'affinité selon l'invention, lesdits acides nucléiques consistent, pour une première partie d'entre eux, en des acides désoxyribonucléiques, et pour la partie restante en des acides ribonucléiques.

Un autre avantage des aptamères nucléiques concerne leur facilité de fabrication, comparée aux difficultés de synthèse des aptamères ARN, ainsi que leur prix de revient qui est significativement plus réduit que le prix de revient d'un aptamère ARN.

Ces modes de réalisation spécifiques sont illustrés dans les exemples.

La présente invention a également pour objet un dispositif de chromatographie d'affinité pour la purification d'une protéine de la coagulation à domaine GLA active, ou pour la purification d'une pluralité de protéines de la coagulation à domaine GLA actives, comprenant un conteneur dans lequel est disposé une quantité adaptée d'un support d'affinité tel que défini dans la présente description.

Des formes variées de conteneurs pour supports de chromatographie sont connus dans l'état de la technique et sont englobés par la signification du terme « conteneur » ci-dessus. Les caractéristiques importantes d'un tel conteneur englobent la présence d'un moyen d'alimentation du dispositif de chromatographie d'affinité en échantillon de départ et d'un moyen de sortie du liquide après sa mise en contact avec le support d'affinité.

La présente invention a aussi pour objet un procédé pour immobiliser une protéine de la coagulation à domaine GLA active sur un support, comprenant une étape au cours de laquelle on met en contact un échantillon contenant ladite protéine de la coagulation avec un support d'affinité tel que défini ci-dessus.

Les échantillons de départ à partir desquels sont purifiées une ou plusieurs protéines de la coagulation à domaine GLA actives avec un support d'affinité selon l'invention, englobent tout type de solution liquide dans laquelle ladite ou lesdites protéines de la coagulation à domaine GLA active(s) est (sont) en suspension ou est (sont) solubilisée(s). Des modes de réalisation spécifiques de tels échantillons, en particulier en relation avec le procédé de purification décrit ci-après, seront définis ultérieurement dans la présente description.

Dans certains modes de réalisation préférés, ledit échantillon contient une protéine de la coagulation à domaine GLA active humaine. Avantageusement, dans ces modes de

réalisation, l'échantillon contenant une protéine de la coagulation à domaine GLA active d'intérêt consiste en un échantillon liquide qui contient ladite protéine d'intérêt, y compris un échantillon liquide comprenant ladite protéine de la coagulation à domaine GLA active et qui est susceptible de contenir aussi (i) des molécules de ladite protéine de la coagulation à
5 domaine GLA non actives et/ou (ii) des molécules de la protéine de la coagulation à domaine GLA homologue d'un mammifère non humain. Dans certains modes de réalisation du procédé de purification ci-dessus, ledit échantillon consiste en une solution biologique, tels qu'un fluide corporel, une cellule, un broyat cellulaire, un tissu, un broyat tissulaire, un organe ou un organisme entier.

10 On a montré dans les exemples qu'un aptamère anti-GLA selon l'invention permet la purification d'un facteur IX recombinant humain produit dans le lait d'un porc transgénique pour ledit Facteur IX humain, du fait que ledit aptamère anti-GLA se lie sélectivement au Facteur IX humain actif et (i) ne se lie pas au Facteur IX humain non actif et (ii) ne se lie pas au Facteur IX de porc, que ledit Facteur IX de porc soit actif ou que ledit Facteur IX de porc soit non actif.

15 Dans certains modes de réalisation du procédé de purification ci-dessus, ledit échantillon consiste en une solution biologique liquide provenant d'un animal tel que du sang, un dérivé du sang (dérivé sanguin), du lait de mammifère ou un dérivé du lait de mammifère. Ledit échantillon peut consister en du plasma, du cryoprécipité du plasma, du lait clarifié ou leurs dérivés.

20 Dans des modes de réalisation particulièrement préférés du procédé de purification ci-dessus, ledit échantillon provient d'un animal transgénique pour la protéine de la coagulation à domaine GLA d'intérêt humaine. Avantageusement, la solution est du lait de mammifère ou un dérivé du lait de mammifère transgénique pour ladite protéine d'intérêt humaine. Au sens de l'invention, les animaux transgéniques englobent (i) les mammifères non humains tels que les
25 vaches, les chèvres, les lapins, les porcs, les singes, les rats ou les souris, (ii) les oiseaux ou encore (iii) les insectes tels que les moustiques, les mouches ou les vers à soie. Dans certains modes de réalisation préférés, l'animal transgénique pour la protéine d'intérêt humaine est un mammifère transgénique non humain, de manière tout à fait préférée une lapine transgénique pour ladite protéine d'intérêt humaine. Avantageusement, le mammifère transgénique produit
30 ladite protéine d'intérêt humaine recombinante dans ses glandes mammaires, du fait de l'insertion dans son génome d'une cassette d'expression comprenant acide nucléique codant ladite protéine d'intérêt qui est placé sous le contrôle d'un promoteur spécifique permettant l'expression de la protéine transgénique dans le lait dudit mammifère transgénique.

Une méthode de production de ladite protéine à domaine GLA humaine dans le lait d'un
35 animal transgénique peut comprendre les étapes suivantes : une molécule d'ADN comprenant un gène codant la protéine d'intérêt, ledit gène étant sous le contrôle d'un promoteur d'une protéine sécrétée naturellement dans le lait (tels que le promoteur de la caséine, de la bêta-caséine, de la lactalbumine, de la bêta-lactoglobuline ou le promoteur WAP) est intégrée dans un embryon d'un mammifère non humain. L'embryon est ensuite placé dans une femelle de
40 mammifère de la même espèce. Une fois que le mammifère issu de l'embryon s'est

suffisamment développé, la lactation du mammifère est induite, puis le lait collecté. Le lait contient alors la protéine humaine recombinante d'intérêt.

Un exemple de procédé de préparation de protéine dans le lait d'une femelle de mammifère autre que l'être humain est donné dans le document EP 0 527 063, dont l'enseignement peut être repris pour la production de la protéine de l'invention. Un plasmide contenant le promoteur WAP (Whey Acidic Protein) est fabriqué par introduction d'une séquence comportant le promoteur du gène WAP, ce plasmide étant réalisé de manière à pouvoir recevoir un gène étranger placé sous la dépendance du promoteur WAP. Le plasmide contenant le promoteur et le gène codant pour la protéine de l'invention sont utilisés pour obtenir des lapines transgéniques, par micro-injection dans le pronucléus mâle d'embryons de lapines. Les embryons sont ensuite transférés dans l'oviducte de femelles hormonalement préparées. La présence des transgènes est révélée par la technique de Southern à partir de l'ADN extrait des lapereaux transgéniques obtenus. Les concentrations dans le lait des animaux sont évaluées à l'aide de tests radio-immunologiques spécifiques.

D'autres documents décrivent des procédés de préparation de protéines dans le lait d'une femelle de mammifère autre que l'homme. On peut citer, sans s'y limiter les documents US 7,045,676 (souris transgénique) et EP 1 739 170. (production de facteur von Willebrand dans un mammifère transgénique).

Le procédé de purification de l'invention est également parfaitement adapté à l'obtention d'une protéine de la coagulation à domaine GLA active purifiée à partir d'un échantillon de plasma sanguin humain, ou d'une fraction de plasma sanguin humain, par exemple la fraction cryoprécipitée de plasma sanguin humain.

Dans certains modes de réalisation du procédé de purification ci-dessus, la protéine de la coagulation à domaine GLA active cible est humaine.

Dans certains modes de réalisation du procédé de purification ci-dessus, l'échantillon comprend au moins une protéine de la coagulation à domaine GLA active non-humaine.

Dans certains modes de réalisation du procédé de purification ci-dessus, ladite protéine de la coagulation à domaine GLA active humaine est homologue à ladite protéine à domaine GLA non-humaine.

Dans certains modes de réalisation du procédé de purification ci-dessus, ladite protéine de la coagulation à domaine GLA active humaine est l'homologue de ladite protéine à domaine GLA non-humaine

Dans certains modes de réalisation du procédé de purification ci-dessus, l'échantillon de départ peut consister en le matériel brut, soit l'échantillon de plasma sanguin humain, ou une fraction de celui-ci, soit le fluide corporel d'un mammifère non humain transgénique pour la protéine à domaine GLA d'intérêt, et qui contient ladite protéine à domaine GLA d'intérêt à purifier. Les fluides corporels d'un mammifère non humain transgénique englobent le lait ou une fraction du lait, par exemple une fraction délipidée du lait ou bien encore une fraction appauvrie en micelles de caséine.

Toutefois, le mode de réalisation ci-dessus n'est pas le mode de réalisation privilégié du procédé de purification de l'invention, notamment en raison du risque de colmatage du support d'affinité par les nombreuses protéines présentes dans l'échantillon brut de départ.

5 Dans des modes de réalisation préférés, ledit échantillon de départ consiste en une solution liquide contenant la protéine de la coagulation à domaine GLA active d'intérêt en suspension dans ladite solution, ladite solution liquide consistant en un produit intermédiaire généré au cours d'un procédé de purification multi-étapes d'une protéine de la coagulation à domaine GLA active.

10 A titre illustratif, pour un procédé de purification d'une protéine de la coagulation à domaine GLA active à partir d'un fluide corporel d'un mammifère non humain transgénique pour ladite protéine, l'échantillon de départ peut consister en un éluat d'une étape de chromatographie d'interaction hydrophobe, telle qu'une étape de chromatographie dans laquelle on utilise un support chromatographique du type MEP HyperCel®. Ce mode particulier de réalisation d'un procédé de purification selon l'invention est illustré dans les exemples.

15 De la même manière, pour un procédé de purification de la protéine de la coagulation à domaine GLA active d'intérêt à partir de plasma humain, l'échantillon de départ peut consister en un filtrat d'une étape de filtration en profondeur pratiquée sur la fraction cryoprécipitée d'un échantillon de plasma humain.

20 De manière générale, les conditions d'utilisation du support d'affinité pour réaliser le procédé de purification de l'invention sont très similaires aux conditions d'utilisation conventionnelles d'un support de chromatographie classique, par exemple du type support d'immuno-affinité sur lequel sont immobilisés des anticorps ligands. L'homme du métier peut par exemple se référer à l'ouvrage de Bailon et al. (Pascal Bailon, George K. Ehrlich, Wen-Jian Fung and Wolfgang Berthold, An Overview of Affinity Chromatography, Humana Press, 2000).

25 Toutefois, comme cela sera détaillé dans la suite de la description, les conditions de l'étape c) d'élution du procédé de l'invention sont très avantageuses, pour la purification d'une protéine de la coagulation à domaine GLA active.

30 A l'étape a), un volume approprié de l'échantillon à purifier est mis en contact avec le support d'affinité. Des complexes sont formés entre (i) les aptamères anti-GLA immobilisés sur ledit support d'affinité et (ii) la protéine de la coagulation à domaine GLA active d'intérêt contenue dans l'échantillon à purifier.

On a montré dans les exemples que les conditions de liaison des aptamères anti-GLA aux protéines de la coagulation à domaine GLA actives sont favorisées en présence de calcium, par exemple sous la forme de chlorure de calcium.

35 Ainsi, dans certains modes de réalisation de l'étape a), on utilise une solution tampon comprenant une concentration finale en CaCl_2 d'au moins 1 mM, ce qui englobe au moins 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM et 15 mM. A l'étape a) on utilise avantageusement une solution tampon comprenant une concentration finale en CaCl_2 d'au plus 50 mM.

On a aussi montré dans les exemples que les conditions de liaison des aptamères anti-GLA aux protéines de la coagulation à domaine GLA actives sont favorisées en l'absence de chlorure de magnésium.

5 Ainsi, dans certains modes de réalisation de l'étape a), on utilise une solution tampon qui ne comprend pas de chlorure de magnésium.

A titre illustratif, on a montré dans les exemples qu'un support de chromatographie sur lequel est immobilisé un aptamère anti-GLA selon l'invention, l'affinité dudit support pour une protéine de la coagulation à domaine GLA est accrue pratiquement d'un facteur dix lorsqu'on utilise à l'étape a) une solution tampon dépourvue de chlorure de magnésium, en l'occurrence 10 une solution tampon de Tris-HCl 50mM et CaCl_2 à pH 7,5, par comparaison avec une solution tampon identique mais comprenant du chlorure de magnésium.

Dans des modes de réalisation préférés du procédé, on procède, à la fin de l'étape a), et préalablement à l'étape b) décrite en détail plus loin, à une ou plusieurs étapes de lavage du support d'affinité de manière à éliminer les substances qui ne sont pas retenues de manière 15 spécifique, par exemple les substances simplement adsorbées sur ledit support. On peut utiliser un tampon de lavage conventionnel, bien connu de l'homme du métier.

Toutefois, dans certains modes de réalisation de la ou des étape(s) de lavage, on peut utiliser un tampon de lavage comprenant du NaCl, et/ou de l'éthylène glycol, et/ou du propylène glycol, et/ou de l'éthanol.

20 On a montré dans les exemples que l'utilisation d'une solution de lavage comprenant du NaCl n'entraîne pas d'altération dans la liaison spécifique des protéines de la coagulation à domaine GLA aux aptamères anti-GLA immobilisés. On a montré en particulier qu'une concentration finale de NaCl de 3M ne perturbe pas ladite liaison spécifique.

Ainsi, dans certains modes de réalisation de la ou des étapes de lavage préalables à 25 l'étape b), on utilise une solution de lavage ayant une concentration finale en NaCl d'au moins 0,5 M, ce qui inclut au moins 1 M, 1,5 M, 2 M, 2,5 M et 3 M. La concentration finale de NaCl est avantageusement d'au plus 4M.

Les résultats des exemples montrent ainsi que la capacité des aptamères anti-GLA de l'invention à se lier aux protéines de la coagulation à domaine GLA n'est pas altérée lorsqu'on 30 soumet les complexes formés entre les aptamères immobilisés et la ou les protéines à domaine GLA à un environnement de haute force ionique, ce qui est un résultat tout à fait inattendu. On rappelle en effet que l'on a recours couramment à un tampon de haute force ionique comme tampon pour l'élution de substances préalablement complexées à des ligands immobilisés d'un support d'affinité, y compris un support d'affinité comprenant des aptamères immobilisés.

35 Les résultats des exemples montrent ainsi que les aptamères anti-GLA selon l'invention ont des caractéristiques spécifiques et inattendues, concernant l'absence d'effet d'une haute force ionique sur leur capacité à se lier à une protéine de la coagulation à domaine GLA active.

Sans vouloir être lié par une quelconque théorie, le demandeur pense que ces propriétés inattendues des aptamères anti-GLA de l'invention résultent de la capacité desdits 40 aptamères anti-GLA à se lier spécifiquement au domaine GLA qui est commun aux protéines

de la coagulation à domaine GLA actives. En particulier, le demandeur pense que les aptamères anti-GLA de l'invention se lient aux protéines cibles par l'intermédiaire de ponts non-covalents divalents qui ne peuvent être générés qu'au niveau du domaine GLA, et que la création desdits ponts divalents prévient la fixation subséquente des ions provenant du NaCl sur le domaine GLA.

On a aussi montré dans les exemples que l'utilisation d'une solution de lavage comprenant de l'éthylène glycol n'entraîne pas d'altération dans la liaison spécifique des protéines de la coagulation à domaine GLA actives aux aptamère anti-GLA immobilisés. On a montré en particulier qu'une concentration finale d'éthylène glycol de 1,5 M ne perturbe pas ladite liaison spécifique.

Ainsi, dans certains modes de réalisation de la ou des étapes de lavage préalables à l'étape b), on utilise une solution de lavage ayant une concentration finale en éthylène glycol d'au moins 0,5 M, ce qui inclut au moins 1 M, et 1,5 M.

On a aussi montré dans les exemples que l'utilisation d'une solution de lavage comprenant du propylène glycol n'entraîne pas d'altération dans la liaison spécifique des protéines de la coagulation à domaine GLA aux aptamère anti-GLA immobilisés. On a montré en particulier qu'une concentration finale de propylène glycol à 50% (v/v) ne perturbe pas ladite liaison spécifique.

Ainsi, dans certains modes de réalisation de la ou des étapes de lavage préalables à l'étape b), on utilise une solution de lavage ayant une concentration finale en propylène glycol d'au moins 10% (v/v), ce qui inclut au moins 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% et 50%.

On a aussi montré dans les exemples que l'utilisation d'une solution de lavage comprenant de l'éthanol n'entraîne pas d'altération dans la liaison spécifique des protéines de la coagulation à domaine GLA actives aux aptamère anti-GLA immobilisés. On a montré en particulier qu'une concentration finale d'éthanol à 10% (v/v) ne perturbe pas ladite liaison spécifique.

Ainsi, dans certains modes de réalisation de la ou des étapes de lavage préalables à l'étape b), on utilise une solution de lavage ayant une concentration finale en éthanol d'au moins 1% (v/v), ce qui inclut au moins 1,5%, 2,0%, 2,5%, 3,0%, 3,5%, 4,0%, 4,5%, 5,0%, 5,5%, 6,0%, 6,5%, 7,0%, 7,5%, 8,0%, 9,0%, 9,5% et 10,0%.

On a montré qu'un tel tampon de lavage entraîne des conditions drastiques d'élimination des substances qui ne sont pas retenues de manière spécifique sur les aptamères, tout en préservant la liaison spécifique des molécules de la ou des protéines de la coagulation à domaine GLA active(s) aux aptamères immobilisés sur le support d'affinité. On rappelle qu'un tel avantage technique lié à l'élimination exclusive ou quasi-exclusive des substances non liées spécifiquement aux ligands immobilisés sur le support d'affinité ne peut être aisément réalisé avec un support d'affinité sur lequel sont immobilisés des anticorps.

L'étape b) consiste en une étape d'élution des molécules de la protéine de la coagulation à domaine GLA active d'intérêt ayant formé des complexes avec les aptamères nucléiques anti-GLA au cours de l'étape a).

Comme cela est illustré dans les exemples, un avantage spécifique du procédé de purification ci-dessus est la possibilité de réaliser l'étape d'élution par mise en contact des complexes formés entre (i) les aptamères nucléiques anti-GLA immobilisés sur ledit support d'affinité et (ii) ladite protéine de la coagulation à domaine GLA active, avec un agent chélateur des ions divalents, comme l'EDTA.

Cet avantage technique, qui est rendu possible, grâce aux caractéristiques du support d'affinité de l'invention, permet l'élution de la protéine de la coagulation à domaine GLA active sans nécessiter un quelconque recours à l'utilisation de conditions drastiques d'élution, susceptibles de dénaturer, au moins partiellement, la protéine de la coagulation à domaine GLA active d'intérêt. Lesdites conditions drastiques qui sont évitées englobent l'utilisation d'un pH acide pour l'étape d'élution, ce qui est couramment pratiqué pour les procédés de purification de protéines sur les supports d'affinité connus, et tout particulièrement sur les supports d'affinité comprenant des anticorps immobilisés.

Ainsi, dans certains modes de réalisation du procédé de purification ci-dessus, l'étape b) est réalisée par mise en contact du support d'affinité avec un tampon d'élution contenant un agent chélateur des ions divalents, de préférence l'EDTA.

A titre illustratif, le tampon d'élution peut contenir une concentration finale d'EDTA d'au moins 1 mM et d'au plus 100 mM.

L'expression « au moins 1 mM » englobe au moins 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 mM.

L'expression « au plus 100 mM » englobe au plus 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12 ou 11 mM.

A l'étape c), on récupère la protéine à domaine GLA active d'intérêt est purifiée en collectant le liquide d'éluat obtenu à la fin de l'étape b).

A la fin de l'étape c), on obtient une composition liquide purifiée de la protéine de la coagulation d'intérêt. Ladite composition liquide purifiée peut ensuite être traitée de manière appropriée, selon toute technique connue de conditionnement et de conservation des protéines, y compris par flaconnage direct ou après dilution avec une solution adaptée, ou encore par lyophilisation, préférentiellement dans des conditions stériles et apyrogènes, puis conservation dans des conditions appropriées, à température ambiante, à -4 °C ou bien à basse température, selon le type de conditionnement choisi.

Comme cela a déjà été mentionné précédemment dans la présente description, le support d'affinité de l'invention peut, avec les cycles successifs d'utilisation pour la purification d'une protéine de la coagulation à domaine GLA active d'intérêt, subir une réduction de sa capacité d'absorption, par exemple du fait que l'étape c) d'élution ne permet pas systématiquement de libérer la totalité des molécules de protéine de la coagulation, ce qui réduit le nombre de sites aptamères libres pour les cycles ultérieurs de purification.

Comme pour la totalité des supports de chromatographie connus, il est donc nécessaire, à des moments appropriés, de réaliser une étape de régénération du support d'affinité, afin de libérer la totalité des molécules de protéine de la coagulation à domaine GLA active dudit

support, et d'éliminer toute substance pouvant être liée au matériau solide du support d'affinité, en général par fixation non spécifique.

Ainsi, dans certains modes de réalisation, le procédé de purification de l'invention comprend une étape additionnelle d) de régénération du support d'affinité, par mise en contact
5 dudit support d'affinité avec une solution de régénération.

Des tampons variés pour la régénération de support de chromatographie, en particulier de supports de chromatographie d'affinité sont bien connus par l'homme du métier, qui peuvent être utilisés à l'étape d) du procédé. L'homme du métier peut se référer par exemple à l'ouvrage de Mohr et al. (Affinity Chromatography: Practical and Theoretical Aspects, Peter Mohr, Klaus
10 Pommerening, Edition: illustrated, CRC Press, 1985).

A titre illustratif, l'étape d) de régénération du support d'affinité peut être réalisée par mise en contact dudit support avec une solution tampon de Tris 20 mM, Polyéthylène Glycol 5%, NaCl 1M, par exemple à pH 7,5, comme cela est illustré dans les exemples.

Le procédé de purification ci-dessus permet l'obtention d'une protéine de la coagulation
15 à domaine GLA active à un très haut degré de pureté, éventuellement à un degré de pureté supérieur à 99,95% en poids, par rapport au poids total des protéines contenues dans le produit final purifié.

Un autre avantage du procédé de purification ci-dessus, en particulier dans les modes de réalisation dans lesquels l'échantillon de départ consiste en un échantillon comprenant la
20 protéine humaine de la coagulation à domaine GLA active d'intérêt sous forme recombinante en mélange avec des protéines produites naturellement par le mammifère transgénique non humain, est que la composition finale comprenant la protéine humaine recombinante d'intérêt à haut degré de pureté est sensiblement exempte de protéines provenant dudit mammifère transgénique, et en particulier sensiblement exempte de protéines dudit mammifère,
25 homologues de ladite protéine humaine de la coagulation à domaine GLA active recombinante.

La présente invention est également relative à un aptamère nucléique se liant spécifiquement aux protéines à domaine GLA biologiquement actives, dont la capacité à se lier à une protéine cible à domaine GLA n'est pas altérée par un environnement de haute force ionique.

L'invention concerne notamment un aptamère nucléique se liant spécifiquement aux
30 protéines à domaine GLA biologiquement actives, dont la capacité à se lier à une protéine cible à domaine GLA biologiquement actives n'est pas altérée par un environnement de haute force ionique possédant une concentration finale en NaCl d'au moins 0,5M.

Les protéines à domaine GLA biologiquement actives englobent les protéines de la
35 coagulation à domaine GLA biologiquement actives.

Ledit « environnement » à haute force ionique englobe une solution tampon à haute force ionique.

Un environnement de haute force ionique inclut un environnement possédant une concentration finale en NaCl d'au moins 1 M, 1,5 M, 2 M, 2,5 M et 3 M. La concentration finale
40 de NaCl est avantageusement d'au plus 4 M.

L'expression « n'est pas altéré » signifie que la liaison entre la protéine cible à domaine GLA et l'aptamère nucléique se liant spécifiquement aux protéines à domaine GLA biologiquement actives résiste à un environnement de haute force ionique. Par exemple, au moins 80% des protéines cibles à domaine GLA biologiquement actives restent liées à l'aptamère nucléique se liant spécifiquement aux protéines à domaine GLA biologiquement actives dans un environnement à haute force ionique, de préférence 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%. En particulier, cela signifie qu'une étape de lavage dans un environnement de haute force ionique ne conduit pas à l'élution de plus de 20% des protéines à domaine GLA biologiquement actives liées à l'aptamère nucléique se liant spécifiquement aux protéines à domaine GLA biologiquement actives, de préférence de plus de 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%.

Dans un mode de réalisation particulier, l'aptamère nucléique selon l'invention a également la capacité à se lier à une protéine cible à domaine GLA biologiquement actives sans être altéré par un environnement hydrophobe tel qu'une solution 10% éthanol ou 50% propylèneglycol.

Ces propriétés peuvent avantageusement être utilisées pour laver très efficacement un support d'affinité sur lequel est immobilisé un aptamère nucléique selon l'invention, ce qui permet d'obtenir une meilleure élimination des contaminants liés à la colonne de façon non spécifique. L'amélioration de l'efficacité du lavage permet d'augmenter la pureté des protéines à domaine GLA biologiquement actives que l'on cherche à purifier.

Comme cela a été décrit précédemment dans la présente description et est aussi illustré dans les exemples, on peut dissocier les complexes formés entre les aptamères nucléiques de l'invention et les protéines cibles à domaine GLA biologiquement actives par mise en contact desdits complexes avec une solution comprenant un chélateur d'ions divalents, par exemple de l'EDTA. Ainsi, selon une autre de leurs caractéristiques, les aptamères nucléiques de l'invention consistent en des aptamères nucléiques permettant la formation de complexes avec des protéines cibles à domaine GLA, lesdits complexes pouvant être dissociés, avec libération des protéines cibles à domaine GLA biologiquement actives, par mise en contact desdits complexes avec un milieu comprenant un chélateur d'ion divalent, par exemple de l'EDTA.

Comme déjà précisé précédemment, un complexe entre un aptamère nucléique de l'invention et une protéine cible à domaine GLA biologiquement actives peut être dissocié en mettant en contact ledit complexe avec un milieu, y compris une solution tampon, comprenant une concentration finale d'EDTA d'au moins 1 mM et d'au plus 100 mM.

Comme cela est illustré dans les exemples, on tire parti de l'aptitude de certains modes de réalisation des aptamères anti-GLA de l'invention à se lier à une diversité de protéines de la coagulation à domaine GLA actives, par exemple à une diversité de protéines humaines de la coagulation à domaine GLA actives, pour purifier simultanément une pluralité de protéines de la coagulation à domaine GLA actives susceptibles d'être contenues dans l'échantillon de départ, en utilisant un unique support de chromatographie d'affinité. Par exemple, on peut utiliser le procédé de purification d'une protéine à domaine GLA ci-dessus pour la purification simultanée

de plusieurs facteurs de la coagulation à domaine GLA contenus dans l'échantillon de départ, par exemple pour la purification simultanée des facteurs VII, IX et X contenus dans une fraction de cryoprécipité de plasma sanguin humain.

La présente invention a aussi pour objet une composition purifiée d'une protéine de la coagulation à domaine GLA active humaine recombinante comprenant au moins 99,9% en poids de ladite protéine à domaine GLA active humaine recombinante et qui est sensiblement exempte de protéines non humaines.

La présente invention est aussi relative à une composition purifiée d'une protéine de la coagulation à domaine GLA active humaine recombinante comprenant au moins 99,9% en poids de ladite protéine à domaine GLA humaine recombinante et au plus 0,1 % en poids de protéines non humaines, les pourcentages en poids étant exprimés par rapport au poids total en protéines de ladite composition purifiée.

Dans la composition purifiée ci-dessus, « au moins 99,9% » englobe au moins 99,91%, 99,92%, 99,93%, 99,94%, 99,95%, 99,96%, 99,97%, 99,98% et 99,99%.

Dans la composition purifiée ci-dessus, « au plus 0,1% » englobe au plus 0,09%, 0,08%, 0,07%, 0,06%, 0,05%, 0,04%, 0,03%, 0,02% et 0,01%.

La présente invention est aussi relative à une composition purifiée telle que définie ci-dessus, utilisable comme médicament.

L'invention concerne encore une composition pharmaceutique comprenant une composition purifiée d'une protéine de la coagulation à domaine GLA active humaine recombinante telle que définie ci-dessus, en combinaison avec un ou plusieurs excipients pharmaceutiquement acceptables.

L'invention a aussi trait à une composition purifiée telle que définie ci-dessus pour le traitement des troubles de la coagulation.

L'invention est également relative à l'utilisation d'une composition purifiée telle que définie ci-dessus pour la fabrication d'un médicament pour le traitement des troubles de la coagulation.

Procédés d'obtention d'aptamères anti-GLA

De manière générale, un aptamère anti-GLA selon l'invention peut être obtenu selon un procédé basé sur les principes généraux de la technique appelée SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment), qui a été initialement décrite notamment dans la demande PCT N° WO 1991/019813. Le procédé SELEX de sélection des aptamères consiste à mettre en présence une protéine avec une librairie combinatoire d'acides nucléiques, ADN ou ARN (en général 10^{15} molécules), les acides nucléiques ne se liant pas à la cible sont éliminés, les acides nucléiques se liant à la cible sont isolés et amplifiés par PCR. Le procédé est répété jusqu'à ce que la solution soit suffisamment enrichie avec les acides nucléiques ayant une bonne affinité pour la protéine d'intérêt (Tuerk et Gold, « Systematic evolution of ligands by exponential enrichment : RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase » (1990) Science, 249(4968) :505-10 et Ellington et Szostak, « In vitro selection of RNA molecules that bind

specific ligands », (1990) Nature Aug 30;346(6287):818-22). D'autres exemples de procédé SELEX sont donnés dans les documents EP 0 786 469, EP 668 931, EP 1 695 978, EP 1 493 825 dont les enseignements peuvent être repris dans la réalisation du procédé de sélection d'un aptamère nucléique utilisé selon l'invention. Certaines variantes du procédé SELEX
5 comprennent des étapes de contre-sélection d'aptamères précédemment sélectionnés par liaison à la protéine cible d'intérêt. La ou les étapes de contre-sélection peuvent consister en une étape dans laquelle une collection d'aptamères, qui a été précédemment sélectionnée avec la protéine cible d'intérêt, est mise en contact avec des molécules non-cibles, de manière à éliminer de la collection d'aptamères de départ ceux qui se lient aux molécules non-cibles. La
10 mise en oeuvre d'une telle étape de contre-sélection, dans un procédé d'obtention d'aptamères nucléiques, est susceptible d'accroître la spécificité ou l'affinité des aptamères sélectionnés à la fin du procédé.

Un premier procédé pour l'obtention d'un aptamère anti-GLA peut consister en un procédé comprenant les étapes suivantes :

- 15 a) fournir un mélange d'acides nucléiques, aussi appelé « collection » d'acides nucléiques de séquences distinctes,
- b) mettre en contact le mélange d'acides nucléiques fourni à l'étape a), ou le mélange d'acides nucléiques obtenu à la fin de l'étape d) lorsque l'étape b) est répétée, avec une première protéine cible de la coagulation à domaine GLA active, dans des conditions
20 permettant la formation de complexes entre des acides nucléiques dudit mélange avec ladite première protéine cible de la coagulation à domaine GLA,
- c) réaliser une séparation entre (i) le ou les acides nucléiques ayant formé des complexes avec ladite première protéine cible de la coagulation à domaine GLA active et (ii) les acides nucléiques n'ayant pas formé de complexes avec ladite première protéine cible de la
25 coagulation à domaine GLA active,
- d) amplifier les acides nucléiques ayant formé des complexes avec ladite première protéine cible de la coagulation à domaine GLA active, de manière à obtenir un mélange ou une collection d'acides nucléiques se liant à ladite première protéine cible de la coagulation à domaine GLA active,
- 30 e) réitérer les étapes b) à d) un nombre de fois suffisant pour l'obtention d'une collection d'acides nucléiques ayant la capacité de liaison désirée à ladite première protéine cible de la coagulation à domaine GLA active,
- f) mettre en contact le mélange d'acides nucléiques fourni à l'étape e), ou le mélange d'acides nucléiques obtenu à la fin de l'étape h) lorsque l'étape f) est répétée, avec une
35 seconde protéine cible de la coagulation à domaine GLA active, dans des conditions permettant la formation de complexes entre des acides nucléiques dudit mélange avec ladite seconde protéine cible de la coagulation à domaine GLA active,
- g) réaliser une séparation entre (i) le ou les acides nucléiques ayant formé des complexes avec ladite seconde protéine cible de la coagulation à domaine GLA active et (ii) les acides

nucléiques n'ayant pas formé de complexes avec ladite seconde protéine cible de la coagulation à domaine GLA active,

h) amplifier les acides nucléiques ayant formé des complexes avec ladite seconde protéine cible de la coagulation à domaine GLA active, de manière à obtenir un mélange ou une collection d'acides nucléiques se liant à ladite seconde protéine cible de la coagulation à domaine GLA active,

i) réitérer les étapes f) à h) un nombre de fois suffisant pour l'obtention d'une collection d'acides nucléiques ayant la capacité de liaison désirée à ladite seconde protéine cible de la coagulation à domaine GLA active, lesdits acides nucléiques ayant la capacité à se lier à la fois à ladite première protéine cible de la coagulation à domaine GLA active et à la seconde protéine cible de la coagulation à domaine GLA active,

j) facultativement, réitérer les étapes f) à i) avec une ou plusieurs autres protéines cibles de la coagulation à domaine GLA actives distinctes, de manière à obtenir, à la fin du procédé, un mélange ou une collection d'acides nucléiques dits « aptamères anti-GLA » ayant la capacité à se lier aux protéines de la coagulation à domaine GLA actives.

Les aptamères nucléiques qui sont obtenus à la fin de l'étape j) du procédé ci-dessus sont aptes à se lier sélectivement à des protéines de la coagulation à domaine GLA actives et ne se lient pas aux autres protéines, et en particulier ne se lient pas aux protéines de la coagulation à domaine GLA non actives.

De manière générale, les protocoles détaillés de mise en œuvre des étapes du procédé ci-dessus peuvent être retrouvés par l'homme du métier dans les nombreuses publications relatives à la technique SELEX, y compris dans les références citées précédemment dans la présente description.

Dans certains modes de réalisation du procédé d'obtention d'aptamères anti-GLA ci-dessus, on utilise successivement de 2 à 6 protéines cibles de la coagulation à domaine GLA actives pour sélectionner des aptamères anti-GLA, c'est-à-dire d'aptamères nucléiques spécifiques des protéines de la coagulation à domaine GLA actives, mais non-spécifiques d'une protéine de la coagulation à domaine GLA active donnée. Dans la pratique, on a montré que l'utilisation, dans le procédé ci-dessus, successivement de 2 protéines cibles de la coagulation à domaine GLA actives distinctes permettait l'obtention d'aptamères anti-GLA.

Pour la mise en œuvre du procédé d'obtention d'aptamères anti-GLA ci-dessus, les protéines cibles de la coagulation à domaine GLA actives peuvent être choisies dans le groupe constitué du Facteur II, du Facteur VII, du Facteur IX, du Facteur X, de la protéine C et de la protéine S. L'ordre d'utilisation des protéines cibles n'est pas une caractéristique essentielle du procédé ci-dessus.

Selon une alternative, les aptamères nucléiques anti-GLA peuvent être obtenus selon un second procédé comprenant les étapes suivantes :

a) fournir un mélange d'acides nucléiques, aussi appelé « collection » d'acides nucléiques de séquences distinctes,

b) mettre en contact le mélange d'acides nucléiques fourni à l'étape a), ou le mélange d'acides nucléiques obtenu à la fin de l'étape d) lorsque l'étape b) est répétée, avec le domaine GLA d'une première protéine cible de la coagulation à domaine GLA active, dans des conditions permettant la formation de complexes entre des acides nucléiques dudit mélange avec le domaine GLA de ladite première protéine cible de la coagulation à domaine GLA active,

c) réaliser une séparation entre (i) le ou les acides nucléiques ayant formé des complexes avec le domaine GLA de ladite première protéine cible de la coagulation à domaine GLA active et (ii) les acides nucléiques n'ayant pas formé de complexes avec le domaine GLA de ladite première protéine cible de la coagulation à domaine GLA active,

d) amplifier les acides nucléiques ayant formé des complexes avec le domaine GLA de ladite première protéine cible de la coagulation à domaine GLA active, de manière à obtenir un mélange ou une collection d'acides nucléiques se liant au domaine GLA de ladite première protéine cible de la coagulation à domaine GLA active,

e) réitérer les étapes b) à d) un nombre de fois suffisant pour l'obtention d'une collection d'acides nucléiques ayant la capacité de liaison désirée au domaine GLA de ladite première protéine cible de la coagulation à domaine GLA active,

f) mettre en contact le mélange d'acides nucléiques fourni à l'étape e), ou le mélange d'acides nucléiques obtenu à la fin de l'étape h) lorsque l'étape f) est répétée, avec le domaine GLA d'une seconde protéine cible de la coagulation à domaine GLA active, dans des conditions permettant la formation de complexes entre des acides nucléiques dudit mélange avec le domaine GLA de ladite seconde protéine cible de la coagulation à domaine GLA active,

g) réaliser une séparation entre (i) le ou les acides nucléiques ayant formé des complexes avec le domaine GLA de ladite seconde protéine cible de la coagulation à domaine GLA active et (ii) les acides nucléiques n'ayant pas formé de complexes avec le domaine GLA de ladite seconde protéine cible de la coagulation à domaine GLA active,

h) amplifier les acides nucléiques ayant formé des complexes avec le domaine GLA de ladite seconde protéine cible de la coagulation à domaine GLA active, de manière à obtenir un mélange ou une collection d'acides nucléiques se liant au domaine GLA de ladite seconde protéine cible de la coagulation à domaine GLA active,

i) réitérer les étapes f) à h) un nombre de fois suffisant pour l'obtention d'une collection d'acides nucléiques ayant la capacité de liaison désirée au domaine GLA de ladite seconde protéine cible de la coagulation à domaine GLA active, lesdits acides nucléiques ayant la capacité à se lier à la fois au domaine GLA de ladite première protéine cible de la coagulation à domaine GLA active et au domaine GLA de la seconde protéine cible de la coagulation à domaine GLA active,

j) facultativement, réitérer les étapes f) à i) avec le domaine GLA d'une ou plusieurs autres protéines cibles à domaine GLA distinctes, de manière à obtenir, à la fin du procédé, une

mélange ou une collection d'acides nucléiques dits « aptamères anti-GLA » ayant la capacité à se lier aux protéines de la coagulation à domaine GLA actives.

Les aptamères nucléiques qui sont obtenus à la fin de l'étape j) du procédé ci-dessus sont aptes à se lier sélectivement à des protéines de la coagulation à domaine GLA actives et ne se lient pas aux autres protéines, et en particulier ne se lient pas aux protéines de la coagulation à domaine GLA non actives.

Dans certains modes de réalisation du second procédé d'obtention d'aptamères anti-GLA ci-dessus, on utilise successivement les domaines GLA provenant de 2 à 6 protéines cibles de la coagulation à domaine GLA actives pour sélectionner des aptamères anti-GLA..

Pour la mise en œuvre du second procédé d'obtention d'aptamères anti-GLA ci-dessus, les protéines cibles de la coagulation à domaine GLA actives dont proviennent les domaines GLA utilisés peuvent être choisies dans le groupe constitué du Facteur II, du Facteur VII, du Facteur IX, du Facteur X, de la protéine C et de la protéine S. L'ordre d'utilisation des domaines GLA cibles n'est pas une caractéristique essentielle du procédé ci-dessus.

La différence essentielle entre le second procédé d'obtention d'aptamères anti-GLA ci-dessus et le premier procédé d'obtention d'aptamères anti-GLA précédemment décrit réside dans la cible, laquelle consiste en une succession de protéines cibles de la coagulation à domaine GLA actives dans le premier procédé et consiste en une succession de domaines GLA de protéines de la coagulation à domaine GLA actives dans le second procédé.

Selon l'invention, des aptamères anti-GLA, qui se lient à une pluralité de protéines de la coagulation à domaine GLA actives, peuvent être obtenus selon un troisième procédé, dont les principes sont identiques au premier et au second procédés décrits ci-dessus, mais dans lequel les substances cibles sont alternativement des protéines de la coagulation à domaine GLA actives et des domaines GLA de protéines de la coagulation à domaine GLA actives. L'ordre d'utilisation des protéines de la coagulation à domaine GLA actives et des domaines GLA de protéines de la coagulation à domaine GLA actives est aisément déterminé par l'homme du métier, selon en particulier les substances cibles auxquelles cet homme du métier a accès.

Les domaines GLA cibles qui sont utilisés dans chacun des second et troisième procédés ci-dessus peuvent être aisément obtenus par l'homme du métier, en particulier dans les situations dans lesquelles la séquence en acides aminés de la protéine de la coagulation à domaine GLA parente, et donc aussi la séquence en acides aminés du domaine GLA considéré, sont connues.

Selon certains modes de réalisation, un domaine GLA est obtenu à partir de la protéine de la coagulation à domaine GLA parente, par protéolyse de ladite protéine à domaine GLA, en utilisant une ou plusieurs enzymes protéolytiques adaptées, de spécificité de coupure connue.

Selon d'autres modes de réalisation, un domaine GLA est obtenu par des techniques de synthèse peptidique connues en elles-mêmes, sur la base de leur séquence connue en acides aminés, puis par gamma-carboxylation des résidus de glutamine du domaine GLA, à l'aide d'une carboxylase, selon des techniques bien connues de l'homme du métier. A titre illustratif, un peptide comprenant le domaine GLA d'une protéine de la coagulation à domaine GLA peut

être synthétisé avec un appareil synthétiseur de peptides du type Milligen® 9050 Plus (Perkin Elmer, Stockholm, Suède, par exemple en utilisant des acides aminés DPfp Fmoc commercialisés par la Société PerSeptive Biosystems® (Framingham, Massachusetts, Etats-Unis). Pour l'étape de gamma-carboxylation enzymatique du domaine GLA néo-synthétisé, on
5 peut par exemple utiliser une carboxylase semi-purifiée comme décrit par Soute et al. (1987, Thromb Haemostasis, Vol. 57 : 77-81), selon la technique décrite par Wu et al. (1990, J Biol Chem, Vol. 265(22) : 13124-13129).

D'autres aptamères anti-GLA de l'invention, qui se lient sélectivement à une seule protéine de la coagulation à domaine GLA active peuvent aussi être obtenus selon d'autres
10 procédés qui sont décrits ci-dessous, qui consistent aussi en des procédés basés, sur leur principe, sur la mise en œuvre de protocoles utilisés pour la technique SELEX.

Selon l'invention, on a mis au point un quatrième procédé pour l'obtention d'aptamères anti-GLA qui se lient sélectivement à une seule protéine de la coagulation à domaine GLA active, qui comprend (i) une ou plusieurs étapes de sélection d'acides nucléiques se liant à une
15 protéine de la coagulation à domaine GLA active, et (ii) une ou plusieurs étapes de contre-sélection afin d'éliminer (ii-a) les acides nucléiques qui se lient à la forme non active de ladite protéine de la coagulation à domaine GLA, et/ou (ii-b) les acides nucléiques qui se lient à d'autres protéines de la coagulation à domaine GLA. On précise que le quatrième procédé ci-dessous comprend une ou plusieurs étapes de contre-sélection d'acides nucléiques
20 précédemment sélectionnés pour se lier à la protéine de la coagulation à domaine GLA active d'intérêt. Toutefois, la ou les étapes de contre-sélection, ou bien une ou des étapes additionnelles de contre-sélection peuvent être prévues préalablement à l'étape a) du procédé ci-dessous.

Ainsi, un quatrième procédé pour l'obtention d'aptamères anti-GLA consiste en un
25 procédé comprenant les étapes suivantes :

- a) fournir un mélange d'acides nucléiques, aussi appelé « collection » d'acides nucléiques de séquences distinctes, ladite collection d'acides nucléiques ayant facultativement été obtenue à l'issue d'une ou plusieurs étapes de contre-sélection tel que décrit ci-dessus,
- b) mettre en contact le mélange d'acides nucléiques fourni à l'étape a), ou le mélange
30 d'acides nucléiques obtenu à la fin de l'étape d) lorsque l'étape b) est répétée, avec une première protéine cible de la coagulation à domaine GLA active, dans des conditions permettant la formation de complexes entre des acides nucléiques dudit mélange avec le domaine GLA de ladite première protéine cible de la coagulation à domaine GLA active,
- c) réaliser une séparation entre (i) le ou les acides nucléiques ayant formé des complexes
35 avec ladite première protéine cible de la coagulation à domaine GLA active et (ii) les acides nucléiques n'ayant pas formé de complexes avec ladite première protéine cible de la coagulation à domaine GLA active,
- d) amplifier les acides nucléiques ayant formé des complexes avec ladite première protéine cible de la coagulation à domaine GLA active, de manière à obtenir un mélange ou une

collection d'acides nucléiques se liant à ladite première protéine cible de la coagulation à domaine GLA active,

e) réitérer les étapes b) à d) un nombre de fois suffisant pour l'obtention d'une collection d'acides nucléiques ayant la capacité de liaison désirée à ladite première protéine cible de la coagulation à domaine GLA active,

f) mettre en contact le mélange d'acides nucléiques obtenus à la fin de l'étape d), ou à la fin de l'étape e) lorsque les étapes b) à d) sont réitérées, avec une forme non active de ladite première protéine cible de la coagulation à domaine GLA, dans des conditions permettant la formation de complexes entre des acides nucléiques dudit mélange avec ladite première protéine cible de la coagulation à domaine GLA non active,

g) réaliser une séparation entre (i) le ou les acides nucléiques ayant formé des complexes avec ladite forme non active de ladite protéine cible de la coagulation à domaine GLA et (ii) les acides nucléiques n'ayant pas formé de complexes avec ladite forme non active de ladite protéine cible de la coagulation à domaine GLA,

h) amplifier les acides nucléiques n'ayant pas formé de complexes avec ladite forme non active de ladite protéine cible de la coagulation à domaine GLA de manière à obtenir un mélange ou une collection d'acides nucléiques se liant à ladite forme active de ladite première protéine de la coagulation à domaine GLA et ne se liant pas à ladite forme non active de ladite protéine de la coagulation à domaine GLA,

i) réitérer les étapes f) à h) un nombre de fois suffisant pour l'obtention d'une collection d'acides nucléiques ayant la capacité de liaison désirée à ladite protéines cible de la coagulation à domaine GLA active,

Dans le quatrième procédé d'obtention d'aptamères anti-GLA ci-dessus, les étapes b) à e) consistent en des étapes de sélection d'acides nucléiques se liant à la protéine de la coagulation à domaine GLA active d'intérêt. Dans ledit quatrième procédé, les étapes f) à i) consistent en des étapes de contre-sélection, au cours desquelles on élimine, à partir de la collection d'acides nucléiques sélectionnés aux étapes b) à e) pour leur aptitude à se lier à la protéine de la coagulation à domaine GLA active d'intérêt, ceux des acides nucléiques qui se lient aussi aux formes inactives de la protéine de la coagulation à domaine GLA active d'intérêt.

Pour la mise en œuvre d'un procédé de type SELEX comprenant une ou plusieurs étapes de contre-sélection contre une protéine non-cible, l'homme du métier peut se référer notamment à l'enseignement général ainsi qu'aux protocoles techniques décrits dans le brevet US 5,580,737.

Dans certains modes de réalisation du quatrième procédé d'obtention d'aptamères anti-GLA ci-dessus, on peut réaliser les étapes f) à i) de contre-sélection avec diverses formes non actives d'une unique protéine de la coagulation à domaine GLA d'intérêt, comme par exemple une protéine comprenant un domaine GLA dont successivement un résidu GLA puis plus d'un résidu GLA n'est pas gamma-carboxylé et est donc présent dans le domaine GLA en tant que résidu glutamine. A titre illustratif, on peut utiliser, pour la mise en œuvre d'étapes successives de contre-sélection, successivement des formes de la protéine d'intérêt comprenant un

domaine GLA dans lequel, successivement, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ou 12 résidus GLA sont présents en tant que résidus glutamine, le nombre de GLA présents en tant que GLU étant bien entendu limité par le nombre maximal de résidus GLA susceptibles d'être présents dans le domaine GLA considéré lorsqu'il est totalement gamma-carboxylé

5 Pour la mise en œuvre du quatrième procédé d'obtention d'aptamères anti-GLA ci-dessus, les protéines de la coagulation à domaine GLA peuvent être choisies dans le groupe constitué du Facteur II, du Facteur VII, du Facteur IX, du Facteur X, de la protéine c et de la protéine S.

10 D'autres alternatives d'un procédé de sélection d'aptamères se liant spécifiquement aux protéines de la coagulation à domaine GLA actives peuvent être aisément mis au point par l'homme du métier, y compris des procédés de sélection incluant une ou plusieurs étape(s) initiale(s) de contre-sélection en utilisant des protéines de la coagulation à domaine GLA non active(s), suivie(s) d'une ou plusieurs étape(s) de sélection dans lesquelles on utilise des protéines de la coagulation à domaine GLA active(s).

15 Selon encore d'autres modes de réalisation, un procédé d'obtention d'un aptamère anti-GLA peut être du type de l'un quelconque des procédés décrits ci-dessus, auquel peut être ajoutée une étape de sélection de ceux des aptamères dont la capacité à se lier à la protéine cible n'est pas altérée par un environnement de haute force ionique, par exemple une solution tampon comprenant du NaCl à une concentration finale d'au moins 0,5 M, ce qui inclut au
20 moins 1 M, 1,5 M, 2 M, 2,5 M et 3 M.

Selon encore d'autres modes de réalisation, un procédé d'obtention d'un aptamère anti-GLA peut être du type de l'un quelconque des procédés décrits ci-dessus, auquel peut être ajoutée une étape de sélection de ceux des aptamères permettant la formation de complexes avec des protéines cibles à domaine GLA, lesdits complexes pouvant être dissociés, avec
25 libération des protéines cibles à domaine GLA, par mise en contact desdits complexes avec un milieu comprenant un chélateur d'ions divalents, par exemple de l'EDTA. L'étape de sélection de ces aptamères peut être réalisée avec un milieu, y compris une solution tampon, comprenant une concentration finale d'EDTA d'au moins 1 mM et d'au plus 100 mM.

Selon encore d'autres modes de réalisation, un procédé d'obtention d'un aptamère anti-
30 GLA peut être du type de l'un quelconque des procédés décrits ci-dessus, auquel peut être ajoutée une étape de sélection de ceux des aptamères dont la capacité à se lier à la protéine cible n'est pas altérée par la présence d'un alkylène glycol ou d'un polyalkylène glycol.

Selon encore d'autres modes de réalisation, un procédé d'obtention d'un aptamère anti-GLA peut être du type de l'un quelconque des procédés décrits ci-dessus, auquel peut être
35 ajoutée une étape de sélection de ceux des aptamères dont la capacité à se lier à la protéine cible n'est pas altérée par la présence d'éthylène glycol. L'étape de sélection de ces aptamères peut être réalisée avec un milieu, y compris une solution tampon, comprenant une concentration finale d'éthylène glycol d'au moins 0,5 M, ce qui inclut au moins 1 M, et 1,5 M.

Selon encore d'autres modes de réalisation, un procédé d'obtention d'un aptamère anti-
40 GLA peut être du type de l'un quelconque des procédés décrits ci-dessus, auquel peut être

ajoutée une étape de sélection de ceux des aptamères dont la capacité à se lier à la protéine cible n'est pas altérée par la présence de propylène glycol. L'étape de sélection de ces aptamères peut être réalisée avec un milieu, y compris une solution tampon, comprenant une concentration finale de propylène glycol d'au moins 10% (v/v), ce qui inclut au moins 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% et 50%..

Selon encore d'autres modes de réalisation, un procédé d'obtention d'un aptamère anti-GLA peut être du type de l'un quelconque des procédés décrits ci-dessus, auquel peut être ajoutée une étape de sélection de ceux des aptamères dont la capacité à se lier à la protéine cible n'est pas altérée par la présence d'éthanol. L'étape de sélection de ces aptamères peut être réalisée avec un milieu, y compris une solution tampon, comprenant une concentration finale en éthanol d'au moins 1% (v/v), ce qui inclut au moins 1,5%, 2,0%, 2,5%, 3,0%, 3,5%, 4,0%, 4,5%, 5,0%, 5,5%, 6,0%, 6,5%, 7,0%, 7,5%, 8,0%, 9,0%, 9,5% et 10,0%.

Méthodes de détermination de l'activité biologique des protéines de la coagulation à domaine GLA

De manière générale, la détermination de l'activité biologique des protéines de la coagulation à domaine GLA est couramment réalisée de manière connue de l'homme du métier selon l'un ou l'autre de deux types tests, respectivement (i) un test de détermination de l'activité anti-coagulante qui tire parti de la mesure de la propriété de la protéine de la coagulation considérée à restaurer l'activité coagulante d'un plasma initialement dépourvu de ladite protéine de la coagulation et (ii) un test de détermination de l'activité enzymatique propre de la protéine de la coagulation considérée, par mesure de la transformation d'un substrat chromogène. Les principes généraux de ces deux types de détermination de l'activité biologique d'une protéine de la coagulation à domaine GLA sont décrits ci-dessous, ainsi que leur application spécifique à la détermination biologique des protéines de la coagulation à domaine GLA d'intérêt.

On précise que les résultats des mesures de détermination de l'activité biologique d'une protéine de la coagulation à domaine GLA sont comparables pour une protéine à tester donnée, quel que soit le test utilisé, dans la mesure où les résultats sont exprimés comme un rapport entre (i) l'activité biologique de la protéine testée et (ii) l'activité biologique d'une protéine de référence active.

Selon l'invention, la composition de référence peut consister en un concentré plasmatique, préférentiellement un concentré plasmatique humain, ou bien encore une composition comprenant une protéine de la coagulation à domaine GLA recombinante.

Détermination de l'activité biologique d'une protéine de la coagulation à domaine GLA par mesure de l'activité coagulante

Cette première méthode consiste à introduire le Facteur de coagulation à tester dans un plasma initialement dépourvu de ce facteur, puis de mesurer le pourcentage restauration de l'activité anti-coagulante par rapport à un plasma normal. Des plasmas apauvris spécifiquement

pour chacun des facteurs de la coagulation sont disponibles dans le commerce, par exemple au travers de sociétés telles que Stago, American Diagnostica ou Hyphen Biomed.

L'activité d'un plasma est caractérisée par une durée de coagulation, c'est-à-dire par une durée qui est nécessaire pour former des molécules de fibrine qui polymérisent entre elles et solidifient le plasma. On peut mesurer simplement cette modification des propriétés mécaniques du plasma à l'aide d'appareils coagulomètres. Les appareils coagulomètres disposent d'un petit barreau aimanté dont le mouvement est arrêté au moment de la coagulation.

Si le facteur de la coagulation à tester est un facteur pro-coagulant, l'ajout de ce facteur dans un plasma initialement appauvri en ce facteur se provoquera une diminution de la durée de coagulation, laquelle durée sera proche de celle d'un plasma normal. Ce type de méthode permet de vérifier la plupart des fonctionnalités des Facteurs de la coagulation, telles que : activité enzymatique, reconnaissance de la cible et du cofacteur, à l'exception des capacités à interagir avec les éléments figurés du sang et les cellules endothéliales des parois vasculaires. Ce type de méthode donne une vision globale et moyennée des activités des facteurs de la coagulation à domaine GLA à tester.

De manière générale, la première méthode de détermination de l'activité biologique d'une protéine de la coagulation à domaine GLA consiste en une méthode qui comprend les étapes suivantes :

a) fournir

(i) une composition à tester comprenant une protéine de la coagulation à domaine GLA,

(ii) une pluralité d'échantillons préparés à partir d'une composition de référence comprenant une quantité connue de ladite protéine à domaine GLA biologiquement active, chaque échantillon comprenant une quantité connue de ladite protéine à domaine GLA biologiquement active, distincte de la quantité de ladite protéine contenue dans chacun des autres échantillons,

(iii) une composition de plasma appauvri en ladite protéine à domaine GLA ou une composition de plasma exempte de ladite protéine à domaine GLA et, si nécessaire,

(iv) un ou plusieurs co-facteur(s) purifié(s) de ladite protéine à domaine GLA,

b) débiter l'essai en réalisant les étapes b1) et b2) suivantes :

b1) mettre en contact (i) la composition à tester comprenant une protéine de la coagulation à domaine GLA avec (ii) la composition de plasma appauvri en ladite protéine à domaine GLA ou la composition de plasma exempte de ladite protéine à domaine GLA et, si nécessaire, également avec (iii) un ou plusieurs co-facteur(s) purifié(s) de ladite protéine à domaine GLA,

b2) mettre en contact (i) chaque échantillon de la composition de référence comprenant une quantité connue de ladite protéine à domaine GLA biologiquement active avec (ii) la composition de plasma appauvri en ladite protéine à domaine GLA ou la composition de plasma exempte de ladite protéine à domaine GLA et, si nécessaire, également avec (iii) un ou plusieurs co-facteur(s) purifié(s) de ladite protéine à domaine GLA,

c) déterminer :

c1) pour la composition à tester, la durée s'écoulant entre le début de l'étape b1) et l'instant auquel le mélange réalisé à l'étape b1) avec la composition à tester est coagulé, et

c2) pour chaque échantillon de la composition de référence, la durée s'écoulant entre le début de l'étape b2) et l'instant auquel le mélange réalisé à l'étape b2) avec la composition de référence est coagulé,

d) réaliser une courbe d'étalonnage, aussi appelée courbe de référence, avec les mesures de durée déterminées à l'étape c2) en fonction de la quantité connue de ladite protéine de la coagulation à domaine GLA dans chaque échantillon

e) déterminer la quantité de ladite protéine de la coagulation à domaine GLA contenue dans la composition à tester, par détermination, sur la courbe d'étalonnage réalisée à l'étape d), et à partir de la durée déterminée à l'étape c1), de la quantité déduite de ladite protéine de la coagulation à domaine GLA dans la composition à tester.

Détermination de l'activité biologique du Facteur II (prothrombine)

A l'étape a)-(i), on fournit la composition à tester qui comprend du Facteur II,

A l'étape a)-(ii), on fournit une pluralité d'échantillons de la composition de Facteur II de référence, par exemple sous la forme d'échantillons de dilutions successives d'une composition de référence de base. On peut par exemple utiliser un premier échantillon de la composition de référence (100%), puis des dilutions successives à 50%, 25%, 12,5%, et 6,2% de la composition de référence.

A l'étape a)-(iii), on fournit une composition plasmatique appauvrie en Facteur II, par exemple la composition commercialisée par la Société American diagnostica Inc. (Stanford, USA) sous la référence N° 202.

Pour la réalisation de la méthode, l'homme du métier peut se référer au test commercialisé par la Société Hyphen Biomed sous la Référence n° DP010K ou test commercialisé par la Société Hyphen Biomed sous la Référence n° DP010A.

Pour la réalisation de la méthode, l'homme du métier peut se référer aux articles suivants : Soulier et al. (1952, Sang, Vol. 23 : 549-559), Favre-Gilly et al. (1967, Cah Med Lyonnais, Vol. 43(28) : 2611-2668), Gjonaess et al. (Acta Obste Gynecol Scand, Vol. 54 : 363-367) ou Andrew et al., 1987, Blood, Vol. 70 : 165-172).

Détermination de l'activité biologique du Facteur VII

A l'étape a)-(i), on fournit la composition à tester qui comprend du Facteur VII,

A l'étape a)-(ii), on fournit une pluralité d'échantillons de la composition de Facteur VII de référence, par exemple sous la forme d'échantillons de dilutions successives d'une composition de référence de base. On peut par exemple utiliser un premier échantillon de la composition de référence (100%), puis des dilutions successives à 50%, 25%, 12,5%, et 6,2% de la composition de référence. Comme composition de référence, on peut utiliser un concentré

plasmatique commercialisé par le National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC-Royaume-Uni) sous la référence n° 97/592.

A l'étape a)-(iii), on fournit une composition plasmatique appauvrie en Facteur VII, par exemple la composition commercialisée par la Société American diagnostica Inc. (Stanford, USA) sous la référence N° 267.

Pour la réalisation de la méthode, l'homme du métier peut se référer au test commercialisé par la Société Hyphen Biomed sous la Référence n° DP030K ou test commercialisé par la Société Hyphen Biomed sous la Référence n° DP030A.

Pour la réalisation de la méthode, l'homme du métier peut se référer aux articles suivants : Soulier et al. (1952, Sang, Vol. 23 : 549-559) ou Gjonaess et al. (Acta Obste Gynecol Scand, Vol. 54 : 363-367).

Détermination de l'activité biologique du Facteur IX

A l'étape a)-(i), on fournit la composition à tester qui comprend du Facteur IX,

A l'étape a)-(ii), on fournit une pluralité d'échantillons de la composition de Facteur IX de référence, par exemple sous la forme d'échantillons de dilutions successives d'une composition de référence de base. On peut par exemple utiliser un premier échantillon de la composition de référence (100%), puis des dilutions successives à 50%, 25%, 12,5%, et 6,2% de la composition de référence. Comme composition de référence, on peut utiliser un concentré plasmatique commercialisé par le National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC-Royaume-Uni) sous la référence n° 07/182.

A l'étape a)-(iii), on fournit une composition plasmatique appauvrie en Facteur IX, par exemple la composition commercialisée par la Société American diagnostica Inc. (Stanford, USA) sous la référence N° 269.

Pour la réalisation de la méthode, l'homme du métier peut se référer au test commercialisé par la Société Hyphen Biomed sous la Référence n° DP050K ou test commercialisé par la Société Hyphen Biomed sous la Référence n° DP050A.

Pour la réalisation de la méthode, l'homme du métier peut se référer aux articles suivants : Van Hylckama et al. (2000, Blood, Vol. 95(12) : 3678-3682), Taran et al. (1997, Biochemistry (Mosc.), Vol. 62(7) : 685-693), Orstavik et al. (1979, Br J Haematol, Vol. 42(2) : 293-301), ainsi qu'à la documentation disponible à l'adresse internet suivante : « www.ncbi.nlm.nih.gov » (OMIM, Haemophilia B, FIX deficiency, +306900, +134540, +134510, +134520).

Détermination de l'activité biologique du Facteur X

A l'étape a)-(i), on fournit la composition à tester qui comprend du Facteur X,

A l'étape a)-(ii), on fournit une pluralité d'échantillons de la composition de Facteur X de référence, par exemple sous la forme d'échantillons de dilutions successives d'une composition de référence de base. On peut par exemple utiliser un premier échantillon de la composition de référence (100%), puis des dilutions successives à 50%, 25%, 12,5%, et 6,2% de la

composition de référence. Comme composition de référence, on peut utiliser un concentré plasmatique tel que décrit dans les références Hyphen Biomed n° DP060K et DP060A.

A l'étape a)-(iii), on fournit une composition plasmatique appauvrie en Facteur X, par exemple la composition commercialisée par la Société American diagnostica Inc. (Stanford, USA).

Pour la réalisation de la méthode, l'homme du métier peut se référer au test commercialisé par la Société Hyphen Biomed sous la Référence n° DP060K ou test commercialisé par la Société Hyphen Biomed sous la Référence n° DP060A.

Pour la réalisation de la méthode, l'homme du métier peut se référer aux articles suivants : Favre-Gilly et al. (1967, Cah Med Lyonnais, Vol. 43(28) : 2611-2668) ou Gjonaess et al. (Acta Obste Gynecol Scand, Vol. 54 : 363-367).

Détermination de l'activité biologique de la Protéine C et de la Protéine S

La même méthode est appliquée pour la détermination de l'activité biologique de la Protéine C et de la Protéine S.

Détermination de l'activité biologique d'une protéine de la coagulation à domaine GLA par mesure de l'activité enzymatique en utilisant un substrat détectable, par exemple chromogène ou fluorogène.

Le principe de base de cette seconde méthode est identique pour l'ensemble des facteurs de la coagulation à domaine GLA. Cette seconde méthode consiste à mettre en présence le facteur à caractériser avec un peptide substrat chromogène ou fluorogène, mimant la séquence peptidique naturellement reconnue par ledit facteur considéré et qui est lysée par ledit facteur sur sa ou ses protéine(s) cible(s) naturelle(s).

La libération du chromophore ou du fluorophore est mesurée à l'aide d'un spectromètre adapté. Cette méthode peut requérir l'ajout d'un cofacteur et, si nécessaire, la mise en oeuvre d'une étape d'activation du facteur à tester. Cette seconde méthode permet de mesurer les fonctionnalités enzymatiques de la protéine de la coagulation à domaine GLA testée avec les cofacteurs. C'est une méthode moins globale que la méthode de mesure de l'activité coagulante décrite précédemment. Toutefois, cette seconde méthode présente l'avantage de mesurer l'activité enzymatique de la protéine de la coagulation à domaine GLA d'intérêt. Du fait d'une possibilité de réaction(s) croisé(s) avec d'autres enzymes à activité « trypsine-like », cette seconde méthode est utilisée principalement pour mesurer l'activité biologique des facteurs pré purifiés, concentrés ou présent dans un matrice ne contenant pas d'autres enzymes en quantité significative, par rapport à la quantité du facteur de la coagulation d'intérêt.

A l'étape a)-(iii), on fournit une composition plasmatique appauvrie en Protéine C, par exemple la composition commercialisée par la Société American diagnostica Inc. (Stanford, USA) sous le n° 249.

A l'étape a)-(iii), on fournit une composition plasmatique appauvrie en Protéine C, par exemple la composition commercialisée par la Société American diagnostica Inc. (Stanford, USA) sous le n° 253.

De manière générale, la seconde méthode de détermination de l'activité biologique d'une protéine de la coagulation à domaine GLA consiste en une méthode qui comprend les étapes suivantes :

a) fournir

(i) une composition à tester comprenant une protéine de la coagulation à domaine GLA,

(ii) une pluralité d'échantillons préparés à partir d'une composition de référence comprenant une quantité connue de ladite protéine à domaine GLA biologiquement active, chaque échantillon comprenant une quantité connue de ladite protéine à domaine GLA biologiquement active, distincte de la quantité de ladite protéine contenue dans chacun des autres échantillons, et

(iii) un substrat détectable de ladite protéine à domaine GLA, ou un substrat détectable d'une protéine de la coagulation qui est activée, directement ou indirectement, par ladite protéine à domaine GLA,

b) débiter l'essai en réalisant les étapes b1) et b2) suivantes :

b1) mettre en contact (i) la composition à tester comprenant une protéine de la coagulation à domaine GLA avec (ii) un substrat détectable de ladite protéine à domaine GLA ou avec (iii) un substrat détectable d'une protéine de la coagulation qui est activée, directement ou indirectement, par ladite protéine à domaine GLA, auquel cas on ajoute aussi une composition comprenant une ou plusieurs protéine(s) de la coagulation qui sont activées, directement ou indirectement, par ladite protéine à domaine GLA, et dont la protéine de la coagulation qui est la dernière à être activée consiste en la protéine de la coagulation apte à transformer ledit substrat détectable,

b2) mettre en contact (i) chaque échantillon de la composition de référence comprenant une quantité connue de ladite protéine à domaine GLA biologiquement active avec (ii) un substrat détectable de ladite protéine à domaine GLA ou (iii) avec un substrat détectable d'une protéine de la coagulation qui est activée, directement ou indirectement, par ladite protéine à domaine GLA, auquel cas on ajoute aussi une composition comprenant une ou plusieurs protéine(s) de la coagulation qui sont activées, directement ou indirectement, par ladite protéine à domaine GLA, et dont la protéine de la coagulation qui est la dernière à être activée consiste en la protéine de la coagulation apte à transformer ledit substrat détectable,

c) laisser se réaliser la transformation enzymatique dudit substrat détectable pendant une durée déterminée à partir respectivement du début de l'étape b1) et du début de l'étape b2), puis stopper la réaction enzymatique à la fin de ladite durée déterminée,

d) mesurer la quantité dudit substrat détectable qui a été transformé enzymatiquement :

d1) pour chaque échantillon de la composition de référence, et

d2) pour la composition à tester,

e) réaliser une courbe d'étalonnage, aussi appelée courbe de référence, avec les mesures de quantité dudit substrat détectable qui a été transformé enzymatiquement déterminées à l'étape d1) en fonction de la quantité connue de ladite protéine de la coagulation à domaine GLA dans chaque échantillon de la composition de référence,

f) déterminer la quantité de ladite protéine de la coagulation à domaine GLA contenue dans la composition à tester, par détermination, sur la courbe d'étalonnage réalisée à l'étape e), et à partir de la quantité dudit substrat détectable qui a été transformé enzymatiquement déterminée à l'étape d2), de la quantité déduite de ladite protéine de la coagulation à domaine GLA dans la composition à tester.

Par substrat « détectable », on entend un substrat qui est transformé, du fait de la réaction enzymatique considérée, en un produit transformé qui est détectable. En général, on utilise un substrat chromogène ou fluorigène.

Détermination de l'activité biologique du Facteur II (Prothrombine)

Pour la réalisation de cette méthode, l'homme du métier peut utiliser le test colorimétrique commercialisé par la Société Hyphen Biomed sous la Référence n° 221605.

La courbe étalon peut être réalisée en utilisant la composition de référence non diluée (200% de prothrombine) et une série d'échantillons dilués de la composition de référence, par exemple des échantillons dilués respectivement à 160%, 100% et 10% de prothrombine, ainsi qu'un échantillon exempt de prothrombine.

Pour la réalisation de cette méthode, l'homme du métier peut se référer aux articles suivants : Gomez et al. (2002, Clin Neurol Neurosurg, Vol. 104 (4) : 285-288), Delahousse et al. (2002, Blood Coagulation & Fibrinolysis, Vol. 13(5) : 465-470), Neville et al. (2001, Haemostasis, Vol. 31 : 211-217), Lane et al. (1996, Thromb Haemost, Vol. 76(5) : 651-662), Poort et al., Blood, Vol. 88 : 3698-3703), Rosen et al. (1999, ISTH, Abstract 269) ou Stocker et al. (1996, Toxicon, Vol. 24(1) : 81-89 ou encore à la documentation accessible à l'adresse internet suivante : www.ncbi.nlm.nih.gov (OMIM, Coagulation Factor II, +176930).

Détermination de l'activité biologique du Facteur VII

Pour la réalisation de cette méthode, l'homme du métier peut utiliser le test colorimétrique commercialisé par la Société Hyphen Biomed sous la Référence n° 221304.

La courbe étalon peut être réalisée en utilisant la composition de référence non diluée (200% de prothrombine) et une série d'échantillons dilués de la composition de référence, par exemple des échantillons dilués respectivement à 100%, 10% et 1% de Facteur VII.

Pour la réalisation de cette méthode, l'homme du métier peut se référer aux articles suivants : Seligsohn et al. (1978, Blood, Vol. 52(5) : 978-988), Avvisati et al. (1980, Br J Haematol, Vol. 45(2) : 343-352), Poller et al. (1981, Br J Haematol, Vol. 49(1) : 69-75), Van Dieijen et al. (1982, Haemostasis, Vol. 12(3) : 241-255), Clarke et al. (1992, FEBS Lett, Vol. 298(2-3) : 206-210), Ledwozyw et al. (1993, Arch Vet Pol, Vol. 33(1-2) : 123-127), Van Wersch et al. (1993, Int J Clin Lab Res, Vol. 23(4) : 221-224), Devies et al. (1997, Vol. 76(5) : 405-408),

Topper et al. (1998, Am J Vet Res, Vol. 59(5) : 538-541) ou Chang et al. (1999, Biochemistry, Vol. 28(34) : 10940-10948).

Détermination de l'activité biologique du Facteur IX

5 Pour la réalisation de cette méthode, l'homme du métier peut utiliser le test colorimétrique commercialisé par la Société Hyphen Biomed sous la Référence n° 221812.

La courbe étalon peut être réalisée en utilisant une série d'échantillons dilués de la composition de référence, par exemple des échantillons comprenant respectivement une concentration finale de Facteur Ixa de 1,4, 3,4, 6,8 et 13,5 mU/ml de Facteur Ixa.

10 Pour la réalisation de cette méthode, l'homme du métier peut se référer aux articles suivants : Taran et al. (1997, Biochemistry (Mosc.), Vol. 62(7) : 685-693), Wagenwoord et al. (1990, Haemostasis, Vol. 20(5) : 276-288) ou la documentation disponible à l'adresse internet suivante : « www.ncbi.nlm.nih.gov » (OMIM, Haemophilia B, FIX deficiency, +306900, +134540, +134510, +134520).

15 Pour la réalisation de cette méthode, l'homme du métier peut utiliser le test colorimétrique commercialisé par la Société Hyphen Biomed sous la Référence n° 221802. 221605.

La courbe étalon peut être réalisée en utilisant la composition de référence non diluée (200% de Facteur IXa) et une série d'échantillons dilués de la composition de référence, par
20 exemple des échantillons dilués respectivement à 100%, 50% et 20% de Facteur IXa.

Pour la réalisation de cette méthode, l'homme du métier peut se référer aux articles suivants : Van Hylckama et al. (2000, Blood, Vol. 95(12) : 3678-3682), Taran et al. (1997, Biochemistry (Mosc.), Vol. 62(7) : 685-693), Wagenwoord et al. (1990, Haemostasis, Vol. 20(5) : 276-288), Parekh et al. (1978, Br J Haematol, Vol. 40(4) : 643-655), Orstavik et al.
25 (1979, Br J Haematol, Vol. 42(2) : 293-301) ou la documentation disponible à l'adresse internet suivante : « www.ncbi.nlm.nih.gov » (OMIM, Haemophilia B, FIX deficiency, +306900, +134540, +134510, +134520).

Détermination de l'activité biologique du Facteur X

30 Pour la réalisation de cette méthode, l'homme du métier peut utiliser le test commercialisé American Diagnostica Inc. désigné Actichrome®FX, sous le référence n° 880.

La courbe étalon peut être réalisée en utilisant la composition de référence non diluée (100% de Facteur Xa) et une série d'échantillons dilués de la composition de référence, par exemple des échantillons dilués respectivement à 75%, 50%, 25%, 10% et 5% de Facteur
35 Ixa, ainsi qu'un échantillon exempt de Facteur X.

Pour la réalisation de cette méthode, l'homme du métier peut se référer aux articles suivants : Kisiel et al. (1976, Biochemistry, Vol. 15 : 4901-4906), Aurell et al. (1977, Thrombosis Research, Vol. 11 : 595-605), Lindhout et al. (1978, Biochem Biophys Acta, Vol. 533 : 327-341) ou Bergstrom et al. (1978, Thrombosis Research, Vol. 12 : 531-547).

Détermination de l'activité biologique de la Protéine C

Pour la réalisation de cette méthode, l'homme du métier peut utiliser le test commercialisé American Diagnostica Inc. désigné Actichrome®Protein C, sous le référence n° 836.

- 5 La courbe étalon peut être réalisée en utilisant la composition de référence non diluée (100% de Protéine C) et une série d'échantillons dilués de la composition de référence, par exemple des échantillons dilués respectivement à 75%, 50%, 25%, 10% et 5% de Protéine C, ainsi qu'un échantillon exempt de Protéine C.

- 10 Pour la réalisation de cette méthode, l'homme du métier peut se référer à l'article suivant : Francis et al. (1987, American journal of Clinical Pathology, Vol. 85(5) : 619-625).

Tableau des séquences

SEQ ID N°	Type	Désignation
1	Acide nucléique	Région 5' d'aptamère
2		Région 3' d'aptamère
3		Core sequence de Mapt-1
4		Aptamère Mapt-1
5		Aptamère non apparenté à Mapt-1
6 à 34		Aptamères (« Core sequences »)
35		Aptamère Mapt-1.2.-CS
36		Aptamère Mapt-1.2.-CSO
37		Aptamère Mapt-2-CS
38		Aptamère Mapt-2.2.-CS
39		Aptamère Mapt-2

- 15 La présente invention est en outre illustrée par les exemples suivants.

EXEMPLES**Exemple 1 : préparation d'un support d'affinité**

- 20 Le support d'affinité a été réalisé à partir d'un matériau de support solide consistant en une matrice sur laquelle on a greffé de la streptavidine (streptavidin-agarose – Novagen®).

On a introduit un volume de 1 ml de gel dans un conteneur consistant en une colonne (i.d. 11mm). On a lavé le gel avec de l'eau purifiée, pour éliminer le solvant de stockage

Les caractéristiques du gel sont :

- 25 - *Capacité d'adsorption de biotine* : ≥ 85 nanomole / ml de gel
 - *Test fonctionnel* : Capture $>99\%$ de thrombine biotinylée en 30 minutes à TA
 - *Autres tests* : Protease-free , endo/exonucléase-free, RNase-free.
 - *Conservateur* : 100 mM sodium phosphate pH7,5 + NaN₃ 0,02

La sortie de la colonne conditionnée (« packée ») (Hauteur de lit de gel = 1cm) est connectée à un détecteur d'absorbance UV à 254 nm et d'un enregistreur.

Les aptamères nucléiques anti-GLA biotinylés de séquence SEQ ID N° 4, aussi appelés aptamères « Mapt-1 » dans la présente description, sont solubilisés dans de l'eau purifiée à la concentration finale de 0,5 mg/0,187 ml, soit une concentration molaire finale de 0,1 mM. La solution d'aptamères nucléiques a été activée à 95°C selon le cycle standard, pour l'immobilisation des aptamères sur le matériau support solide.

La solution d'aptamères nucléiques a été préalablement diluée par 4,8 ml d'eau purifiée puis 1,5 ml de tampon concentré de façon à obtenir la formulation suivante : 50mM Tris, 50mM NaCl, MgCl₂ 4mM, CaCl₂ 10mM pH= 7,5

Le détecteur d'absorbance est ajusté à 1 AUFS (Absorbance Unit Full Scale) et on enregistre la DO à 254 nm de cette solution à 0,575 UA₂₅₄.

La solution d'aptamères nucléiques biotinylés est injectée sur le gel streptavidin-agarose pré-conditionnée (« prépackée ») et mise en recirculation avec une pompe péristaltique à un débit de 2,5 ml/minute, soit un temps de contact sur le gel de 24 secondes (entrée/sortie E/S). Dans ces conditions, la DO à 254 nm se stabilise rapidement à 0,05 UA₂₅₄, soit une valeur de 91% de couplage théorique, c'est-à-dire 0,455 mg d'aptamères nucléiques par millilitre de gel.

Un lavage avec un tampon NaCl 2M est réalisé, afin d'éliminer les aptamères nucléiques qui ne sont pas fixés spécifiquement aux molécules de streptavidine greffées sur le matériau de support solide.

Exemple 2 : Purification d'une protéine à domaine GLA recombinante (Facteur IX humain transgénique)

On a utilisé un support d'affinité du type décrit à l'exemple 1 pour purifier du Facteur IX humain recombinant produit dans le lait de porcs transgéniques pour le Facteur IX humain.

A. Protocole de purification par chromatographie d'affinité

Les caractéristiques de mise en œuvre de l'étape de chromatographie d'affinité de l'échantillon de départ sur un support d'affinité sur lequel sont immobilisés les aptamères anti-GLA Mapt-1 sont décrites dans les tableaux ci-dessous.

Etape 1 : Clarification

Clarification au citrate pour d'obtenir du lait clarifié à pH 7,5 à 0,25M final de tampon citrate

Etape 2 : MEP hypercel

MD : lait clarifié (IBF 25 – 10ml de gel)

Chargement en FIX : 243 UI/ml de gel

Tampon équilibration : 0,25M Citrate pH7,5

Tampon élution : eau

Etape 3 : Dialyse

MD : Eluat MEP

- 5 Tampon de dialyse : 50 mM Tris – 50 mM NaCl pH 7,5

Etape 4 : MAPT-1 (3 run)

MD : Eluat MEPdialysé (IBF1,1 – 1ml de gel)

Chargement en FIX : 230 UI/ml de gel

- 10 Tampon équilibration : 50 mM tris – 50 mM NaCl – 4 mM MgCl₂ – 10 mM CaCl₂ pH 7,5

Tampon élution : 20 mM Tris – 10 mM EDTA pH 7,5

Tampon régénération : 20 mM tris – 1 M NaCl – 5% PG pH 7,5

B. Caractéristique de la matière première (MP)

- 15 La matière première mise en œuvre consiste en un lait brut de cochon transgénique pour le Facteur IX humain.

C. Suivi du process

C.1. Etape 1 : Clarification

- 20 C.1.1. - Suivi de la clarification

- Décongélation de E0 à 37 °C

- Mélange d'un aspect très laiteux : 45g (2/3) Lait de porc + 25g (1/3) de tampon citrate concentré à 0,75M

- Agitation douce de 30 min à température ambiante

- 25 - Centrifugation 30 min, 15 °C, 5 000g

__ Culot : petit et blanc contenant les poils de porc et les impuretés

__ Surnageant : deux phases, la phase supérieure solide crémeuse et blanche constituant les corps gras

et la phase jaunâtre qui représente le lait clarifié(E1).

- 30 - Récupération à la pompe du lait clarifié

- Filtration profondeur du lait clarifié avec un filtre Cuno BioCap 25 Filter

- Congélation à -80 °C du lait filtré clarifié (E2)

C.1.2 - Bilan en protéines totales, en FIX :C, FIX :Ag et FIX :Am

- 35 Les résultats sont présentés dans les tableaux 1 et 2 ci-dessous.

Tableau 1

Etape	Code	Poids (g)	Coagulation			Protéines totales			Purification		
			[FIX :C] (UI / ml)	Q FIX :C (UI)	R FIX:C (%)	[Prot] (g / l)	Q Prot. les (g)	R Prot. (%)	AS (UI/mg)	Pureté	Gain de pureté
Lait brut	E0	45,0	57,2	2574	100,0	103,2	644	100,0	0,6	0,2	/
Lait clarifié avant filtration	E1	65,3	36,0	2350	91,3	37,5	2451	52,8	1,0	0,4	1,7
Lait clarifié	E2	63,8	38,2	2438	94,7	34,7	2214	47,7	1,1	0,5	2,0

5

Tableau 2

Code	Amidolytique			Antigénique			Ratio		
	[FIX :Am] (UI / ml)	Q FIX :Am (UI)	R FIX:Am (%)	[FIX :Ag] (UI / ml)	Q FIX :Ag (UI)	R FIX:Ag (%)	[C]/[Ag]	[Am]/[Ag]	
E0	40	1 798	100	147	6 615,0	100,0	0,4	0,3	
E1	23	1 510	84	114 7	443,1	112,5	0,3	0,2	
E2	22	1 426	79	95	6 062,0	91,6	0,4	0,2	

C.2. Etape 2 : MEP hypercel

10 C.2.1. - Caractéristiques du support de chromatographie

- Colonne : IBF 25, 2,5 cm de hauteur
- Gel : MEP 10ml de gel, lot 200920/G206-04
- Nb d'utilisation : 2ème utilisation
- Régénération du gel avant l'utilisation : 1VC NaOH 1M ; 2VC NaCl 2M ; 4VC eau

15

C.3.2 - Préparation de la matière de départ (MD)

- Décongélation de E2 à 37 °C
- Référence : 1UI de FIX = 4µg/ml
- Volume injecté (g) : 63,81
- 20 - Chargement FIX en UI par ml de gel (UI/ml gel) : 243 UI/ml de gel
- Chargement FIX en µg par ml de gel (µg/ml gel) : 972 µg/ml de gel

C.2.3 - Caractéristiques des tampons de chromatographie

- Tampon d'équilibration : 0,25M Citrate, pH 7,5, 612 mOsmol/kg, 31,9 mS/cm

Tampon d'élution MEP : eau

C.2.4 - Suivi des étapes de chromatographie

5

Tableau 3

Code	Etape	Débit ml/min	Poids g	Pic AU	pH	Osmolarité mosmol/Kg	Conducti. mS/cm	Observations
E2	MD	0,85	63,81	NA	7,43	231	31,9	NA
E3	NR	0,85	139,61	2	7,45	719	32	Saturation
E4	E MEP	1	51,68	2	7,81	121	7,11	Saturation

Régénération du gel avant l'utilisation : 10VC NaOH 1M ; 4VC NaCl 2M ; 10VC eau ; 10VC éthanol 20%.

10

C.2.5. Bilan en protéines totales

Tableau 4

Etapas	Code	Poids (g)	Coagulation			Protéines totales			Purification		
			[FIX :C] (UI/ml)	Q FIX :C (%)	R FIX :C (%)	[Prot] (g / l)	Q Prot. (g)	R Prot. (%)	AS (UI/mg)	Pureté	Gain de pureté
Lait clarifié	E2	63,8	38,2	2 438	100,0	34,7	2 214,2	100,0	1,1	0,5	/
Non adsorbé	E3	139,6	3,1	433	17,8	8,4	1 175,4	53,1	0,4	0,2	0,3
Elution MEP	E4	51,7	20,3	1 049	43,0	3,6	186,6	8,4	5,6	2,5	5,1
Eluat MEP dialysé	E5	51,1	14,5	741	30,4	3,3	169,1	7,6	4,4	1,9	4,0

15

Tableau 5

Code	Amidolytique			Antigénique			Ratio		
	[FIX :Am] (UI / ml)	Q FIX :Am (UI)	R FIX:Am (%)	[FIX :Ag] (UI / ml)	Q FIX :Ag (UI)	R FIX:Ag (%)	[C]/[Ag]	[Am]/[Ag]	
E2	22	1 426	100	95	6 062,0	100,0	0,4	0,2	
E3	1	148	10	ND	ND	ND	ND	ND	
E4	9	484	34	47	2 429,0	40,1	0,4	0,2	
E5	9	455	32	45	2 298,6	37,9	0,3	0,2	

C.3. Etape 3 : Dialyse

Dialyse d'E4 (50 g) dans 2 bains de 1 L, toute la nuit sous agitation à 4 °C

Tableau 6

5

Echantillons	Fractions	Poids g	pH	Osmolarité mosmol/Kg	Conductivité mS/cm
E4	Avant dialyse	49,18	7,81	121	7,11
E5	Après dialyse	51,08	7,81	149	7,18
Tampon dialyse 50 mM Tris – 50 mM NaCl			7,50	157	7,52

C.4. : Chromatographie sur support d'affinité avec aptamères anti-GLA (Mapt-1)

Trois essais indépendants de purification de Facteur IX humain transgénique pré-purifié comme décrit ci-dessus ont été réalisés. Les conditions opératoires et les résultats de chacun des
10 essais sont détaillés ci-après.

C.4.1 - Caractéristiques du support de chromatographie

- Colonne : IBF 1,1, 0,9 cm de hauteur
- Gel : MAPT-1, 1ml de gel
- 15 - Nb d'utilisation 2ème utilisation

C.4.2 - Préparation de la matière de départ (MD)

- Ajustement en pH et ajout de 4mM MgCl₂ et 10mM CaCl₂ final dans E5
- Répartition de E5 (48,17g) répartie en 3*16g dont deux sont mis à -80 °C pour les essais
20 suivants
- Référence : 1UI de FIX = 4µg/ml
- Volume injecté (g) : 16,14
- Chargement FIX en UI par ml de gel (UI/ml gel) : 234 UI/ml de gel
- Chargement FIX en µg par ml de gel (µg/ml gel) : 936 µg/ml de gel

25

C.4.3. Caractéristiques des tampons de chromatographie

- Tampon d'équilibration : 50mM Tris, 50mM NaCl, 10mM CaCl₂, 4mM MgCl₂, pH 7,51, 218
mOsmol/kg, 10,77 mS/cm
- Tampon d'élution 1 : 20mM Tris, 10mMEDTA, pH 7,53, 56 mOsmol/kg, 2,64 mS/Cm
- 30 - Tampon d'élution 2 (tampon de régénération) : 20mM Tris, 1M NaCl, 50% Propylène glycol,
pH 7,52, 18,27 mS/cm.

C.4.4. Suivi des étapes de chromatographieEssai 1

- Colonne équilibrée à pH 7,34 et 211mOsm/Kg

5 - Chargement en FIX 234 UI/ml de gel,

Tableau 7

Echantillons	Fractions	Débit ml/min	Poids g	Pic AU	pH	Osmolarité mosmol/Kg	Conducti. mS/cm	Observations
E5	MD	0,6	16,14	na	7,51	181	8,18	na
E6	NR	0,6	29,56	0,5	7,44	193	9,03	Saturation
E7	E1 MAPT-1	0,6	6,68	0,02	6,40	99	na	Diminution de pH
E8	E2 MAPT-1	0,6	6,66	0,1	7,41	na	na	na

Essai 2

- Colonne équilibrée à pH 7,39 et 220mOsm/Kg, 3ème utilisation du gel

- Chargement en FIX 236 UI/ml de gel

Tableau 8

Fractions 315 256	Débit ml/min	Poids g	Pic AU	pH	Osmolarité mosmol/Kg	Observations
MD	0,1	13,50	na	7,42	179	Na
NR	0,1	20,29	0,5	7,36	197	Saturation
E1 MAPT-1	0,1	2,84	0,02	7,06	187	Diminution de pH
E2 MAPT-1	0,1	3,77	0,1	6,39	na	Diminution de pH

Essai 3

- Colonne équilibré à pH 7,45 et 219mOsm/Kg, 5ème utilisation du gel

- Chargement en FIX 210 UI/ml de gel

Tableau 9

Fractions 315 258	Débit ml/min	Poids g	Pic AU	pH	Osmolarité mosmol/Kg	Observations
MD	0,6	12,71	na	7,47	180	na
NR	0,6	23,79	0,5	7,46	206	Saturation
E1 MAPT-1	0,6	2,67	0,02	6,94	168	Diminution de pH
E2 MAPT-1	0,6	4,20	0,1	7,36	na	na

C.4.5. Bilan en protéines totales, en FIX :C, FIX :Ag et FIX :Am

Les dosages des protéines totales ont été réalisés par le laboratoire Tébu Bio. Les
5 déterminations du taux de FIX :C ont été réalisées par le LBA et ceux de FIX :Ag et FIX :Am par
le LIB.

C.4.5.1 Résultats chromatographie d'affinité de l'Essai 1

Tableau 10

Etape	Code	Poids (g)	Coag			Protéine			Purification		
			[FIX :C] (UI / ml)	Q FIX :C	R FIX:C (%)	[Prot. Totales]	Q Prot.totales	R Prot. totales (%)	AS (UI/mg)	Pureté	Gain de pureté
Injection	E5	16,1	14,5	234	100,0	3,310	53,4	100,0	4,4	1,9	/
Non adsorbé	E6	29,6	8,9	263	112,4	1,360	40,2	75,3	6,5	2,9	1,5
Elution 1	E7	6,7	0,50	3,3	1,4	0,015	0,1	0,2	33,3	14,7	7,6

Tableau 11

Code	Am			Ag			Ratio		
	[FIX :Am] (UI / ml)	Q FIX :Am (UI)	R FIX:Am (%)	[FIX :Ag] (UI / ml)	Q FIX :Ag (UI)	R FIX:Ag (%)	[C]/[Ag]	[Am]/[Ag]	
E5	9	143,6	100,0	45	726,3	100,0	0,3	0,2	
E6	2,7	78,6	54,7	26	768,6	105,8	0,3	0,1	
E7	0,2	1,1	0,7	0,238	1,6	0,2	2,1	0,7	

C.4.5.2. Résultats chromatographie d'affinité de l'Essai 2

Tableau 12

Etape	Code	Poids (g)	Coag			Protéine			Purification		
			[FIX :C] (UI / ml)	Q FIX :C	R FIX:C (%)	[Prot. Totales]	Q Prot.totales	R Prot. totales (%)	AS (UI/mg)	Pureté	Gain de pureté
Injection	MD	13,5	17,5	236	100,0	3,110	42,0	100,0	5,6	2,5	/
Non adsorbé	NR	20,3	8,7	177	74,7	1,940	39,4	93,8	4,5	2,0	0,8
Elution 1	E1	2,8	0,32	0,91	0,4	0,007	0,0	0,0	45,7	20,1	8,1

Tableau 13

	Am			Ag			Ratio		
Code	[FIX :Am] (UI / ml)	Q FIX :Am (UI)	R FIX:Am (%)	[FIX :Ag] (UI / ml)	Q FIX :Ag (UI)	R FIX:Ag (%)	[C]/[Ag]	[Am]/[Ag]	
MD	9,4	127,4	100,0	45,0	607,5	100,0	0,4	0,2	
NR	5	100,4	78,8	25,0	507,3	83,5	0,3	0,2	
E1	0,1	0,4	0,3	0,2	0,6	0,1	1,6	0,7	

5 C.4.5.3. Résultats chromatographie d'affinité de l'Essai 3

Tableau 14

			Coag			Protéine			Purification		
Etape	Code	Poids (g)	[FIX :C] (UI / ml)	Q FIX :C	R FIX:C (%)	[Prot. Totales]	Q Prot.totales	R Prot. totales (%)	AS (UI/mg)	Pureté	Gain de pureté
Injection	MD	12,7	16,5	210	100,0	4,430	56,3	100,0	3,7	1,6	/
Non adsorbé	NR	23,8	8,0	190	90,8	2,130	50,7	90,0	3,8	1,7	1,0
Elution 1	E1	2,7	1,8	4,8	2,3	0,011	0,0	0,1	163,6	72,1	43,9

10

Tableau 15

	Am			Ag			Ratio		
Code	[FIX :Am] (UI / ml)	Q FIX :Am (UI)	R FIX:Am (%)	[FIX :Ag] (UI / ml)	Q FIX :Ag (UI)	R FIX:Ag (%)	[C]/[Ag]	[Am]/[Ag]	[C]/[Am]
MD	9,4	119,1	100,0	47	597,4	100,0	0,4	0,2	1,8
NR	4,4	105,6	88,7	23	547,2	91,6	0,3	0,2	1,8
E1	0,5	1,4	1,2	0,80	2,1	0,4	2,3	0,7	3,3
E2	22	1 426	79	95	6 062,0	91,6	0,4	0,2	1,7

Exemple 3 : Purification d'une protéine à domaine GLA possédant un domaine GLA correctement gamma-carboxylé

Dans l'exemple 3, on a procédé notamment à des essais de purification d'une protéine GLA possédant un domaine GLA correctement gamma-carboxylé, à partir d'un échantillon de

départ comprenant un mélange de différentes formes d'une même protéine à domaine GLA, respectivement des formes dont le domaine GLA est correctement gamma-carboxylé et des formes dont le domaine GLA est incorrectement gamma-carboxylé.

Plus précisément, on a réalisé des essais de purification de Facteur IX recombinant produit dans le lait de porcs transgéniques pour le Facteur IX humain. Le lait des porcs transgéniques comprend un mélange de (i) Facteur IX humain recombinant transgénique actif possédant un domaine GLA correctement gamma-carboxylé et de (ii) Facteur IX humain recombinant transgénique non actif possédant un domaine GLA incorrectement gamma-carboxylé.

Les résultats de ces essais sont présentés ci-dessous.

4.1. Liaison sélective de Mapt-1 aux protéines GLA ayant un domaine GLA correctement gamma-carboxylé.

4.1.1. Conditions expérimentales

a) Mesure de Binding :Appareil Biacore T100

- Puce : l'aptamère Mapt-1 biotynylé a été immobilisé sur surface streptavidine (Chip SA, GE) à 4326 RU sur la flow cell active n°3 (FC3). Un aptamère nucléique contrôle est immobilisé à 4069 RU sur la flow cell n°1(FC1). L'échantillon injecté passe sur la FC3 et FC1 afin de soustraire rigoureusement le bruit de fond dû à des interactions non spécifiques

- Tampon de course et de dilution des échantillons : Tris 50mM / NaCl 50mM / CaCl₂ 10mM / MgCl₂ 4mM / pH = 7,4

- Flux : 30µl/min injection pendant 60 sc, dissociation pendant 120 sc

- Signal : Signal sur Fc3 avec soustraction du signal de la Flow cell n° 1

- Régénération : EDTA 10mM dans eau PPI

Plus précisément, on a fabriqué un premier support solide (FC3) sur lequel ont été immobilisées des molécules de l'aptamère nucléique de l'invention de séquence SEQ ID N° 4, aussi désigné ici « Mapt-1 ». Préalablement à sa fixation sur le support solide, l'extrémité 5' de l'aptamère Mapt-1 a été chimiquement couplée à une chaîne espaceur constituée de 1 molécule de PEG(C18). Puis, l'extrémité libre de la chaîne espaceur, opposée à l'extrémité couplée à l'aptamère, a été couplée à une molécule de biotine.

On a aussi fabriqué un second support solide (FC1) sur lequel ont été immobilisés des molécules d'un aptamère non apparenté à Mapt-1, de séquence SEQ ID N° 5, qui ne se lie pas aux protéines à domaine GLA

On dispose d'un support solide contenant des molécules de streptavidine immobilisées (Serie S sensor Chip SA, GE)

Puis, on a mis en contact le support solide ci-dessus avec les composés aptamères ci-dessus afin d'immobiliser les acides nucléiques de séquence SEQ ID N° 4 et SEQ ID N° 5, par association non covalente entre les molécules de streptavidine du support et les molécules de biotine des composés aptamères.

L'aptamère Mapt-1 est ainsi immobilisé avec un taux d'immobilisation de 4326 RU (1 RU correspond approximativement à 1 pg de produit immobilisé par mm²).

Du FIX humain recombinant transgénique produit chez le porc et pré-purifié par chromatographie sur support MEP HyperCel® a été dilué dans du tampon de course (Tris 50 mM, NaCl 50 mM, CaCl₂ 10 mM, MgCl₂ 4 mM, pH 7,4).

L'échantillon a été injecté séquentiellement sur (i) la puce FC1 contenant l'aptamère non apparenté immobilisé par une interaction biotine-streptavidine et (ii) la puce FC3 (support solide) contenant l'aptamère Mapt-1 immobilisé par une interaction biotine-streptavidine. Des contrôles sont obtenus en injectant des blancs ne contenant que du tampon de course. Toutes les injections ont été réalisées avec un débit 30µl/min pendant 60 sec. Après l'injection, du tampon de course a été injecté sur la puce à un débit identique pendant 120 sec. Du tampon d'élution (EDTA, 10mM dans de l'eau PPI) a ensuite été injecté pendant 30 sec avec un débit de 30µl/min pour décrocher les substances liées de l'aptamère. La puce permet d'étudier en temps réel la formation et la rupture des interactions entre le FIXtg, et l'aptamère immobilisé grâce à la résonance plasmonique de surface (RPS). Une liaison sur l'aptamère immobilisé se traduit par une augmentation du signal en unité de résonance (RU) enregistré par l'appareil (Figure 3). Ces analyses sont effectuées avec l'appareil de RPS Biacore T100 (GE). La modélisation des interactions enregistrées sont effectuée à l'aide du Logiciel Biaevaluation (GE).

On a soustrait le signal obtenu avec la puce FC1 du signal obtenu avec la puce FC3, afin d'éliminer le bruit de fond dû à des interactions non-spécifiques.

b) Mesure de l'activité spécifique : rapport de l'activité amidolytique sur le taux d'antigène

- L'activité amidolytique est mesurée à l'aide du kit Biophen FIX selon les recommandations fournisseur
- Le taux d'antigène est mesuré à l'aide du kit Stago Asserachrom® VII:Ag selon les recommandations fournisseur

c) Echantillons :

- FIX recombinant Benefix® (Nonacog alpha, Laboratoire Wyeth) possédant 12 γ-carboxylation selon les données du laboratoires fabricant.
- FIX-TG purifié à partir de lait de cochon transgénique (Lait K97, fournis par GTC) par différentes étapes chromatographiques (essai 315138) afin d'obtenir une pureté supérieure à 95%. La γ-carboxylation de la chaîne légère a été analysée en LC-MS après activation et digestion à la PNGase F. Les spectres MS ont montré différents degrés de γ-carboxylation sur la chaîne légère allant de 1 à 7. Le taux normal de γ-carboxylation étant de 12.

4.1.2. Résultats

Les résultats sont présentés sur la Figure 1.

Les mesures de binding en biacore montrent que l'aptamère Mapt-1 ne se lie pas à l'échantillon de FIX-Tg purifié caractérisé par un taux de γ -carboxylation incomplet et une activité spécifique de 0,2. Ces résultats suggèrent une sélectivité de Mapt-1 vis-à-vis des formes correctement γ -carboxylées.

5

4.2. Capacité d'un support d'affinité selon l'invention à retenir sélectivement le Facteur IX humain dont le domaine GLA est correctement gamma-carboxylé.

Du lait de porc transgénique pour le Facteur IX humain a été soumis à un procédé similaire à celui décrit à l'exemple 2, comprenant les étapes suivantes :

- 10 a) clarification au citrate,
- b) passage du lait clarifié sur un support de chromatographie MEP Hypercel®,
- c) élution de la fraction retenue et dialyse de l'éluat contre un tampon Tris 50 mM, NaCl 50 mM à pH 7,5, puis ajustement avec du CaCl_2 10 mM et MgCl_2 4 mM,
- 15 d) passage de l'éluat obtenu à la fin de l'étape c) sur un support d'affinité sur lequel sont immobilisés des aptamères anti-GLA, ici l'aptamère Mapt-1.

Séparément, comme essai contrôle, on a réalisé un passage de facteur IX plasmatique sur un support d'affinité sur lequel sont immobilisés des aptamères anti-GLA, ici l'aptamère Mapt-1.

20 4.2.1. Conditions expérimentales

4.2.1.1. Conditions de la chromatographie

a) Etape 1 : Clarification

Clarification au citrate pour d'obtenir du lait clarifié à pH 7,5 à 0,25M final de tampon citrate

25 b) Etape 2 : passage sur MEP hypercel®

- MD : lait clarifié (IBF 25 – 10ml de gel)
- Chargement en FIX : 243 UI/ml de gel
- Tampon équilibration : 0,25M Citrate pH7,5
- Tampon élution : eau

30

c) Etape 3 : Dialyse

- MD : Eluat MEP
- Tampon de dialyse : 50 mM Tris – 50 mM NaCl pH 7,5

35 d) Etape 4 : MAPT-1 (3 run)

- MD : Eluat MEPdialysé (IBF1,1 – 1ml de gel) ajusté en MgCl_2 et CaCl_2 pour obtenir les concentrations respectives : 10mM et 4mM
- Chargement en FIX : 230 UI/ml de gel
- Tampon équilibration : 50 mM tris – 50 mM NaCl – 4 mM MgCl_2 – 10 mM CaCl_2 pH 7,5
- 40 - Tampon élution : 20 mM Tris – 10 mM EDTA pH 7,5

- Tampon régénération : 20 mM tris – 1 M NaCl – 5% PG pH 7,5

4.2.1.2. Mesure de l'activité spécifique : rapport de l'activité amidolytique sur le taux d'antigènes ou de l'activité coagulante sur le taux d'antigènes

5 - L'activité amidolytique est mesurée à l'aide du kit Biophen FIX selon les recommandations fournisseur

- L'activité coagulante est mesurée par une méthode chronométrique qui consiste à mesurer le temps de coagulation en présence de Céphaline et de Kaolin, d'un système où tous les facteurs sont présents en excès à l'exception du facteur IX (plasma déficient en FIX, Stago). Le FIX
10 apporté par la dilution du standard ou de l'échantillon. Les analyses sont effectuées sur un Auto-analyseur : type BCT et les données sont traitées par le logiciel « hémostase » pour le calcul de l'activité et de l'intervalle de confiance

- Le taux d'antigène est mesuré à l'aide du kit Stago Asserachrom® VII:Ag selon les recommandations fournisseur

15

4.2.1.3. Mesure de Binding :Appareil Biacore T100

- Chip : Mapt-1 immobilisé sur surface streptavidine (Chip SA, GE) à 5073 RU sur la flow cell active n°2 (FC2). Un aptamère non relevant est immobilisé à 4959 RU sur la flow cell n°1. L'échantillon injecté passe sur la FC2 et FC1 afin de soustraire rigoureusement le bruit de fond
20 dû à des interactions non spécifiques.

- Tampon de course et de dilution des échantillons : Tris 50mM /CaCl₂ 10mM/ pH = 7,4

- Flux : 30µl/min injection pendant 100 sc, dissociation pendant 200 sc

- Signal : Signal sur Fc2 avec soustraction du signal de la Flow cell n° 1

- Régénération : EDTA 10mM dans tampon PBS pH= 7,4

25

4.2.2. Résultats

4.2.2.1.Chromatographie

On a réalisé un chromatogramme ainsi qu'une électrophorèse en gel SDS-PAGE avec coloration au Bleu de coomassie. Les résultats sont illustrés dans la figure 2.

30 L'analyse du chromatogramme de l'étape Mapt-1 montre d'une part que la grande majorité de l'échantillon injecté est non retenu et d'autre part un très faible pic d'élution pouvant correspondre à des espèces minoritaires de FIX-TG.

Comme le montre le cliché de la Figure 3, l'analyse en gel SDS-PAGE des éluats ne permet pas de visualiser le FIX éventuellement purifié ce qui est en cohérence avec la
35 quantité reliée à la hauteur de pic observé.

En revanche, lorsqu'on réalise un gel d'électrophorèse SDS-PAGE qui est ensuite coloré avec le nitrate d'argent, on visualise clairement dans l'éluat de la fraction retenue sur le support d'affinité Mapt-1 des bandes protéiques de FX humain recombinant transgénique purifié, dont on a montré qu'il possède une très forte activité biologique (voir le cliché de gel
40 SDS-PAGE illustré aux figures 3A et 3B).

4.2.2.2. *Activité spécifique du Facteur IX retrouvé dans les différentes fractions*

Le Tableau 19 ci-dessous présente les résultats d'activité biologique du Facteur IX dans le produit de départ et dans les différentes fractions obtenues au cours de la chromatographie d'affinité sur le support d'affinité Mapt-1.

Tableau 16

Echant.	Essai 1		Essai 2		Essai 3		Témoins	
	Essai n° 09315255		Essai n° 09315256		Essai n° 09315258		plasmatique Essai n° 09315257	
Analyse	[C]/[Ag]	[Am]/[Ag]	[C]/[Ag]	[Am]/[Ag]	[C]/[Ag]	[Am]/[Ag]	[C]/[Ag]	[Am]/[Ag]
Départ	0,3	0,2	0,4	0,2	0,4	0,2	1,1	1,3
Non Absorbé	0,3	0,1	0,3	0,2	0,3	0,2	1,0	0,7
Eluat Mapt	2,1	0,7	1,6	0,7	2,1	0,7	1,2	1,7

4.2.2.3 *Essai de binding sur Biacore® de différentes formes de Facteur IX humain*

Les résultats sont illustrés sur le graphe de la Figure 4.

Les résultats des mesures de binding représentés sur la Figure 5 montrent que les FIX-TG obtenus dans le faible pic d'élution sont bien caractérisés par une affinité significative à Mapt-1, contrairement à la majorité des autres formes de FIX-TG représentées par l'échantillon issu du procédé de purification.

Dans l'exemple 3, on montre que le support d'affinité Mapt-1 possède une sélectivité de fixation pour les espèces de protéines à domaine GLA possédant la meilleure activité biologique, en l'occurrence les espèces les plus actives de facteur IX humain recombinant transgénique.

Ainsi, en plus de permettre un enrichissement sélectif en Facteur IX à partir de l'échantillon de départ, le support d'affinité mapt-1 permet d'accroître le ratio Activité biologique/quantité de Facteur IX.

Exemple 4 : Purification de diverses protéines à domaine GLA avec un support d'affinité sur lequel sont immobilisés des aptamères anti-GLA

Dans l'exemple 4, on a montré qu'un support d'affinité sur lequel sont immobilisés des aptamères anti-GLA est utilisé avec succès pour la purification d'une variété de protéines à domaine GLA.

Plus précisément on montre dans l'exemple 4 qu'un support d'affinité sur lequel sont immobilisés des aptamères anti-GLA Mapt-1 retient sélectivement le Facteur VII, le Facteur IX et le Facteur X.

5 5.1.1. Conditions expérimentales

Mesure de Binding :Appareil Biacore T100

- Puce : Mapt-1 immobilisé sur surface streptavidine (Chip SA, GE) à 3596 RU sur la flow cell active n°2 (FC2). Tampon de course et de dilution des échantillons : Tris 50mM / NaCl 50mM /CaCl₂ 10mM/ MgCl₂ 4mM/ pH = 7,4
- 10 - Flux : 30µl/min injection pendant 60sc, dissociation pendant 120 sc
- Signal : Signal sur Fc2 avec soustraction du signal de la Flow cell n° 1 restée vierge
- Régénération : EDTA 10mM dans Tris 50mM pH= 7,4

5.1.2. Résultats

15 Les résultats sont représentés sur la Figure 5 .

La Figure 6 montre que le support d'affinité Mapt-1 retient sélectivement une variété de protéines à domaine GLA, en l'occurrence une variété de protéines humaines de la coagulation à domaine GLA comme le Facteur VII, le Facteur IX et le Facteur X.

20

Exemple 5 : Capture d'acides nucléiques aptamères selon l'invention par du Facteur IX humain immobilisé sur un support.

On a fabriqué un support solide sur lequel ont été immobilisées des molécules de Facteur IX humain recombinant purifié. On a utilisé une préparation purifiée de facteur IX
25 humain recombinant commercialisée sous le nom Benefix® par la société Wyeth.

On réalise une immobilisation du Facteur IX humain sur dextran carboxyméthyl activé par NHS-EDC et se liant aux amines libres présentes sur le FIX.

Le Facteur IX recombinant humain est ainsi immobilisé avec un taux d'immobilisation de 3153 RU (1 RU correspond approximativement à 1 pg de produit immobilisé par mm²).

30 Des aptamères nucléiques de l'invention (pureté : 99%), respectivement les aptamères de séquences SEQ ID N° 3 et 6 à 35, ont été dilués dans du tampon de course (Tris 50 mM, CaCl₂ 10 mM, MgCl₂ 4 mM, pH 7,5) de manière à obtenir autant d'échantillons d'aptamères que d'aptamères distincts à tester.

Chaque échantillon a été injecté de façon séquentielle sur une même puce (support
35 solide) contenant le FIX recombinant humain immobilisé. Des contrôles sont obtenus en injectant des blancs ne contenant que du tampon de course. Toutes les injections ont été réalisées avec un débit 30 µl/min pendant 60 sec, après l'injection, du tampon de course a été injecté sur la puce à un débit identique pendant 120 sec.

40 Du tampon d'élution (EDTA, 10 mM) a ensuite été injecté pendant 60 sec avec un débit de 30 µl/min pour décrocher l'aptamère du FIX humain immobilisé.

La puce permet d'étudier en temps réel la formation et la rupture des interactions entre le FIX recombinant humain immobilisé et chacun des aptamères de séquences SEQ ID N° 3 et 6 à 35 testés, grâce à la résonance plasmonique de surface (RPS). Une liaison sur le FIX recombinant humain immobilisé se traduit par une augmentation du signal en unité de résonance (RU) enregistré par l'appareil (Figure 6). Ces analyses sont effectuées avec l'appareil de RPS Biacore T100 (GE). La modélisation des interactions enregistrées sont effectuées à l'aide du Logiciel Biaevaluation (GE).

Les résultats obtenus montrent que tous les aptamères nucléiques testés se lient avec une affinité significative au Facteur IX recombinant humain plasmatique.

Les résultats de la Figure 6 montrent aussi que les 30 aptamères testés peuvent être classés dans quatre groupes principaux, selon leur niveau d'affinité pour le Facteur IX humain.

On peut noter en particulier la très forte affinité pour le Facteur IX humain de l'aptamères classés dans le Groupe 4 représenté sur la Figure 6. Parmi les 30 aptamères testés, l'aptamère ayant la plus forte affinité pour le Facteur IX humain, qui est désigné Mapt-1.2, consiste en l'aptamère de séquence SEQ ID N° 35 [Mapt-1.2-CS].

Exemple 6 : Capture d'acides nucléiques aptamères selon l'invention par du Facteur IX humain immobilisé sur un support.

On a fabriqué un support solide sur lequel ont été immobilisées des molécules de Facteur IX humain recombinant purifié. On a utilisé une préparation purifiée de facteur IX humain recombinant commercialisée sous le nom Benefix® par la société Wyeth.

On réalise une immobilisation du Facteur IX humain sur dextran carboxyméthyl activé par NHS-EDC et se liant aux amines libres présentes sur le FIX.

Le Facteur IX recombinant humain est ainsi immobilisé avec un taux d'immobilisation de 3153 RU (1 RU correspond approximativement à 1 pg de produit immobilisé par mm²).

Des aptamères nucléiques de l'invention (pureté : 99%), respectivement les aptamères de séquences SEQ ID N° 35 [Mapt-1.2-CS] et SEQ ID N° 36 [Mapt-1.2-CSO], ont été dilués dans du tampon de course (Tris 50 mM, CaCl₂ 10 mM, MgCl₂ 4 mM, pH 7,5) de manière à obtenir autant d'échantillons d'aptamères que d'aptamères distincts à tester.

L'aptamère Mapt-1.2.-CSO de séquence SED ID N° 36 est dérivé de l'acide nucléique possédant la structure : 5'-SEQ ID N°1-SEQ ID N°35-SEQ ID N°2 ayant 80 nucléotides de longueur. Plus précisément, l'aptamère Mapt-1.2.-CSO de séquence SED ID N° 36 consiste en l'acide nucléique allant du nucléotide en position 10 et se terminant au nucléotide en position 49 de l'acide nucléique possédant la structure : 5'-SEQ ID N°1-SEQ ID N°35-SEQ ID N°2.

Chaque échantillon a été injecté de façon séquentielle sur une même puce (support solide) contenant le FIX recombinant humain immobilisé. Des contrôles sont obtenus en injectant des blancs ne contenant que du tampon de course. Toutes les injections ont été réalisées avec un débit 30 µl/min pendant 60 sec, après l'injection, du tampon de course a été injecté sur la puce à un débit identique pendant 120 sec.

Du tampon d'élution (EDTA, 10 mM) a ensuite été injecté pendant 60 sec avec un débit de 30µl/min pour décrocher l'aptamère du FIX humain immobilisé.

La puce permet d'étudier en temps réel la formation et la rupture des interactions entre le FIX recombinant humain immobilisé et chacun des aptamères de séquences SEQ ID N° SEQ ID N° 35 [Mapt-1.2-CS] et SEQ ID N° 36 [Mapt-1.2-CSO] testés, grâce à la résonance plasmonique de surface (RPS). Une liaison sur le FIX recombinant humain immobilisé se traduit par une augmentation du signal en unité de résonance (RU) enregistré par l'appareil (Figure 7). Ces analyses sont effectuées avec l'appareil de RPS Biacore T100 (GE). La modélisation des interactions enregistrées sont effectuées à l'aide du Logiciel Biaevaluation (GE).

Les résultats obtenus montrent que les deux aptamères nucléiques testés se lient avec une affinité significative au Facteur IX recombinant humain plasmatique.

Les résultats de la Figure 7 montrent aussi que, parmi les deux aptamères testés, le Mapt-1.2.-CSO (SEQ ID N° 36) présente un niveau d'affinité pour le Facteur IX humain significativement meilleur que le niveau d'affinité de l'aptamère Mapt-1.2.CS (SEQ ID N° 35).

Les résultats de la figure 7 montrent aussi l'excellente stabilité de la liaison de l'aptamère Mapt-1.2.-CSO (SEQ ID N° 36) sur le Facteur IX.

On rappelle que l'aptamère Mapt-1.2.-CS (SEQ ID N° 35) était l'aptamère présentant le plus haut niveau d'affinité parmi les 30 aptamères testés dans l'exemple 5

Exemple 7 : Préparation d'un support d'affinité

Le support d'affinité a été réalisé à partir d'un matériau de support solide consistant en une matrice sur laquelle on a greffé de la streptavidine (streptavidin-agarose – Novagen®).

On a introduit un volume de 1 ml de gel dans un conteneur consistant en une colonne (i.d. 11mm). On a lavé le gel avec de l'eau purifiée, pour éliminer le solvant de stockage

Les caractéristique du gel sont :

- *Capacité d'adsorption de biotine* : ≥ 85 nanomole / ml de gel
- *Test fonctionnel* : Capture $>99\%$ de thrombine biotinylée en 30 minutes à TA
- *Autres tests* : Protease-free , endo/exonucléase-free, RNase-free.
- *Conservateur* : 100 mM sodium phosphate pH7,5 + NaN₃ 0,02

La sortie de la colonne conditionnée (« packée ») (Hauteur de lit de gel = 1cm) est connectée à un détecteur d'absorbance équipé d'un filtre UV à 254 nm et d'un enregistreur.

Les aptamères nucléiques anti-FIX humain biotinylés comprenant l'acide nucléique de séquence SEQ ID N° 4 [Mapt-1-WS] sont solubilisés dans de l'eau purifiée à la concentration finale de 0,5 mg/0,187 ml, soit une concentration molaire finale de 0,1 mM. La solution d'aptamères nucléiques a été activée à 95°C selon le cycle standard, pour l'immobilisation des aptamères sur le matériau support solide..

La solution d'aptamères nucléiques a été préalablement diluée par 4,8 ml d'eau purifiée puis 1,5 ml de tampon Mg^{++} (5 x concentré).

Le détecteur d'absorbance est ajusté à 1 AUFS (Absorbance Unit Full Scale) et on enregistre la DO à 254 nm de cette solution à 0,575 UA_{254} .

5 La solution d'aptamères nucléiques biotinylés est injectée sur le gel streptavidin-agarose pré-conditionnée (« prépackée ») et mise en recirculation avec une pompe péristaltique à un débit de 2,5 ml/minute, soit un temps de contact sur le gel de 24 secondes (entrée/sortie E/S). Dans ces conditions, la DO à 254 nm se stabilise rapidement à 0,05 UA_{254} , soit une valeur de 91% de couplage théorique, c'est-à-dire 0,455 mg d'aptamères nucléiques par millilitre de gel.

10 Un lavage avec un tampon 10 mM $CaCl_2$ + 4 mM $MgCl_2$ puis en NaCl 2M est réalisé, afin d'éliminer les aptamères nucléiques qui ne sont pas fixées spécifiquement aux molécules de streptavidine greffées sur le matériau de support solide.

15 **Exemple 8 : Procédé de purification du Facteur IX recombinant humain**

A. Utilisation d'un support d'affinité comprenant l'aptamère Mapt-1WS immobilisé

Les supports d'affinité aptamères ont été testés à partir d'une préparation purifiée en FIX humain plasmatique. On précise que la préparation purifiée de FIX humain plasmatique
20 consiste en un concentré de FIX à 60% de pureté commercialisé sous le nom Betafact® par le Laboratoire Français du Fractionnement et des Biotechnologies (LFB).

Le support d'affinité a été préparé conformément au protocole décrit à l'Exemple 7. Les aptamères consistent en des aptamères anti-GLA biotinylés qui ne comprennent pas de chaîne espaceur et désignés Mapt-1, qui comprennent l'acide nucléique de séquence SEQ ID N° 4.

25 Le support d'affinité utilisé pour réaliser l'exemple 8 possède une densité de ligand théorique de 0,46 mg/ml. On a utilisé un volume de gel de 1 ml.

Le support d'affinité est équilibré avec un tampon de 0,05 M Tris-HCl, 0,01 M $CaCl_2$ à pH de 7,5.

Une charge de FIX humain plasmatique purifié dans une quantité de 200 UI (soit 800
30 μg) par millilitre de support d'affinité (gel) est utilisée pour l'étape de purification du FIX humain.

La solution de FIX humain plasmatique purifié, préalablement ajustée à tris 50 mM + NaCl 50mM + 4 mM $MgCl_2$ + 10 mM $CaCl_2$ à pH 7,5, est injectée sur le gel Aptamère-agarose (support d'affinité) avec une pompe péristaltique à un débit de 0,1 ml/minute soit un temps de contact avec le support d'affinité de 10 minutes (E/S).

35 Après injection, le gel est lavé en tampon tris 50 mM + NaCl 50mM + 4 mM $MgCl_2$ + 10 mM $CaCl_2$ à pH 7,5.

Un volume de 10 ml de solution non adsorbé est collecté.

Le FIX est élué par un tampon Tris-HCl 20mM + EDTA 10 mM à pH 7,5. La collecte du pic d'élution est réalisée suivant le profil de DO.

Pour régénérer le support d'affinité, on utilise un tampon de régénération de Tris-HCl 20 mM, NaCl 1M, propylène glycol 50%, à pH 7,5.

La figure 8 illustre un profil de chromatographie du FIX humain plasmatique, avec un suivi en continu des valeurs d'absorbance (D.O.) à 254 nanomètres.

5 Sur la Figure 8, l'injection (1) du concentré de FIX humain plasmatique est rapidement suivie du pic d'élimination (2) de la fraction non retenue sur le support d'affinité. Le support d'affinité continue de se saturer avec la protéine de la coagulation d'intérêt : des complexes entre (i) les aptamères nucléiques anti-GLA du support d'affinité et (ii) les molécules de FIX humain plasmatique initialement contenues dans la composition à purifier ont été formés. Après
10 passage de la composition à purifier, on procède à une étape de lavage de la colonne avec le tampon de lavage spécifié précédemment. Puis on réalise l'étape d'élution, par injection de la solution tampon d'élution comprenant une concentration finale de 10 mM en EDTA.

Le pic d'absorption (3) sur la **Figure 8** illustre la libération du FIX humain plasmatique à partir des complexes Aptamères nucléiques/FIX recombinant, lors de l'étape d'élution.

15 On note que les molécules de FIX humain plasmatique sont libérées rapidement et donc dans un faible volume. En conséquence, grâce au support d'affinité de l'invention, on obtient une solution d'élution de forte concentration en protéine FIX humain plasmatique.

Après élution, on a réalisé une étape de régénération du support d'affinité, avec un tampon Tris-HCl 20 mM, NaCl 1M, propylène glycol 50%, à pH 7,5.

20 On a réalisé un chromatogramme ainsi qu'une électrophorèse en gel SDS-PAGE avec gradient de Bis Acrylamide 4-12% sans réducteur, avec coloration au Bleu de Coomassie. Les résultats sont illustrés dans la figure 9.

L'analyse du chromatogramme de la figure 9 montre que l'éluat présente une bonne pureté chromatographique et des analyses d'activité biologique est caractérisé par un maintien
25 de la fonctionnalité du Facteur IX.

Ces analyses ont aussi montré que la valeur du rapport « activité de FIX »/ « quantité de Facteur IX » retrouvée dans la fraction d'éluat est presque identique à la valeur du rapport « activité de FIX »/ « quantité de Facteur IX » retrouvée dans le produit de départ : cette valeur est de 1,2. Ces résultats montrent que le FIX n'a pas subi d'altération pendant le procédé de
30 purification par chromatographie d'affinité.

Les résultats de l'Exemple 8-A montrent la capacité de l'aptamère Mapt-1WS qui a été immobilisé sur le support d'affinité en l'absence d'une chaîne espaceur, par exemple en l'absence d'une chaîne espaceur de polyéthylène glycol, à purifier le Facteur IX humain à partir d'un milieu complexe de départ contenant de nombreuses impuretés dérivées du plasma.

35

B. Utilisation d'un support d'affinité comprenant l'aptamère Mapt-1.2.-CSO immobilisé

On a utilisé un support d'affinité sur lequel ont été immobilisées des molécules de l'aptamère Mapt-1.2.-CSO biotinylé comprenant une chaîne espaceur de PEG(C18).

L'aptamère Mapt-1.2.-CSO comprend l'acide nucléique de séquence SEQ ID N° 36.

Avec ce support d'affinité, on a réalisé une purification de facteur IX humain plasmatique.

Le support d'affinité a été préparé conformément au protocole décrit à l'Exemple 7.

Le support d'affinité utilisé pour réaliser l'exemple X4 possède une densité de ligand
5 théorique de 0,25 mg/ml. On a utilisé un volume de gel de 1 ml.

Le support d'affinité est équilibré avec un tampon de 0,05 M Tris-HCl, 0,01 M CaCl_2 à pH de 7,5.

Une charge de FIX humain plasmatique purifié à 50% dans une quantité de 207 μg par millilitre de support d'affinité (gel) est utilisée pour l'étape de purification du FIX humain.

10 La solution de FIX humain plasmatique purifié, *préalablement ajustée à 10 mM CaCl_2 et pH 7,5*, est injectée sur le gel Aptamère-agarose (support d'affinité) avec une pompe péristaltique à un débit de 0,05 ml/minute soit un temps de contact avec le support d'affinité de 20 minutes (E/S).

15 Après injection, le gel est lavé en tampon *tris 50 mM + NaCl 50mM + 4 mM MgCl_2 + 10 mM CaCl_2 à pH 7,5*.

Un volume de 10 ml de solution non adsorbé est collecté.

Le FIX est élué par un tampon Tris-HCl 50mM + EDTA 10 mM à pH 7,5. La collecte du pic d'élution est réalisée suivant le profil de DO.

20 Pour régénérer le support d'affinité, on utilise un tampon de régénération de NaCl 1M, propylène glycol 50%, à pH 7,5.

Le profil chromatographique est illustré dans la Figure 10. Sur la Figure 10, l'injection du concentré de FIX humain plasmatique est suivi du pic d'élimination (1) de la fraction non retenue sur le support d'affinité. Le support d'affinité continue de se saturer avec la protéine de la coagulation d'intérêt : des complexes entre (i) les aptamères nucléiques anti-GLA du support d'affinité et (ii) les molécules de FIX humain plasmatique initialement contenues dans la
25 composition à purifier ont été formés. Après passage de la composition à purifier, on procède à une étape de lavage de la colonne avec le tampon de lavage spécifié précédemment. Puis on réalise l'étape d'élution, par injection de la solution tampon d'élution comprenant une concentration finale de 10 mM en EDTA.

30 On précise que la fraction non retenue contient 57% en poids des protéines contenues dans l'échantillon de départ, la fraction d'éluat représente 40% en poids des protéines contenues dans l'échantillon de départ et la fraction de régénération représente 3% en poids des protéines contenues dans l'échantillon de départ.

35 Le pic d'absorption (3) sur la Figure 10 illustre la libération du FIX humain plasmatique à partir des complexes Aptamères nucléiques/FIX recombinant, lors de l'étape d'élution.

Par ailleurs, la Figure 11 illustre l'excellente capacité du support d'affinité sur lequel sont immobilisées des molécules de l'aptamère Mapt-1.2.-CSO à purifier le Facteur IX humain.

Les résultats de la Figure 11 montrent que la fraction d'éluat présente une bonne pureté électrophorétique.

Les résultats de l'Exemple 8-B montrent la capacité de l'aptamère Mapt-1.2.-CSO qui a été immobilisé sur le support d'affinité à purifier le Facteur IX humain à partir d'un milieu complexe de départ contenant de nombreuses impuretés dérivées du plasma.

Ces résultats sont particulièrement inattendus car l'aptamère Mapt-1.2.-CSO comprend
5 seulement une partie de la « core sequence » de l'aptamère Mapt-1.2-CS et comprend une région 5' consistant en la partie 3' d'une région destinée à être reconnue par des amorces consensus. Plus précisément, l'aptamère Mapt-1.2.-CSO comprend la région de 40 nucléotides nt10-nt 49 de l'acide nucléique de séquence 5'-SEQ ID N°1-SEQ ID N°3-SEQ ID N°2-3' de 80 nucléotides de longueur.

10

Exemple 9 : Procédé de purification du Facteur VII recombinant humain.

On a réalisé des essais de purification de Facteur IX recombinant produit dans le lait de
15 porcs transgéniques pour le Facteur IX humain. Le lait des porcs transgéniques comprend un mélange de (i) Facteur IX humain recombinant transgénique actif possédant un domaine GLA correctement gamma-carboxylé et de (ii) Facteur IX humain recombinant transgénique non actif possédant un domaine GLA incorrectement gamma-carboxylé.

Du FIX humain recombinant transgénique produit chez le porc et pré-purifié par
20 chromatographie sur support MEP HyperCel® a été dialysé contre le tampons utilisé pour l'équilibrage du support de chromatographie afin d'éliminer le citrate de sodium. L'étape de pré-purification sur MEP HyperCel a résulté en une composition contenant du Facteur IX humain à 1,8% de pureté.

Le support d'affinité a été préparé conformément au protocole décrit à l'Exemple 7.

25 Le support d'affinité Mapt-1WS sans chaîne espaceur utilisé pour réaliser l'exemple 9 possède une densité de ligand théorique de 0,46 mg/ml. On a utilisé un volume de gel de 1 ml. L'aptamère Mapt-1WS comprend l'acide nucléique de séquence SEQ ID N°4.

Le support d'affinité est équilibré avec un tampon de 0,05 M Tris-HCl, 0,01 M CaCl_2 à pH de 7,5.

30 Une charge de 302 UI (soit 1200 μg) de FIX recombinant humain pré-purifié dérivé de lait de truie transgénique par millilitre de support d'affinité (gel) est utilisée pour l'étape de purification du FIX humain.

La solution de FIX humain plasmatique purifié, *préalablement ajustée à 10 mM CaCl_2 et pH 7,5*, est injectée sur le gel Aptamère-agarose (support d'affinité) avec une pompe
35 péristaltique à un débit de 0,1 ml/minute soit un temps de contact avec le support d'affinité de 10 minutes (E/S).

Il n'y a pas eu de modification apparente du produit de départ lors de l'addition de chlorure de calcium.

Après injection, le gel est lavé en tampon *tris 50 mM + NaCl 50mM + 4 mM MgCl_2 +*
40 *10mM CaCl_2 à pH 7,5.*

Un volume de 10 ml de solution non adsorbé est collecté.

Le FIX est élué par un tampon Tris-HCl 20 mM + EDTA 10 mM à pH 7,5. La collecte du pic d'éluion est réalisée suivant le profil de DO.

Pour régénérer le support d'affinité, on utilise un tampon de régénération de Tris-HCl
5 20mM, NaCl 1M, propylène glycol 50%, à pH 7,5.

La figure 12 illustre un profil de chromatographie du FIX humain plasmatique, avec un suivi en continu des valeurs d'absorbance (D.O.) à 254 nanomètres.

Sur la Figure 12, l'injection (1) du concentré de FIX humain plasmatique est rapidement suivi du pic d'élimination (2) de la fraction non retenue sur le support d'affinité. Le support
10 d'affinité continue de se saturer avec la protéine de la coagulation d'intérêt : des complexes entre (i) les aptamères nucléiques anti-GLA du support d'affinité et (ii) les molécules de FIX humain transgénique initialement contenues dans la composition à purifier ont été formés. Après passage de la composition à purifier, on procède à une étape de lavage de la colonne avec le tampon de lavage spécifié précédemment. Puis on réalise l'étape d'éluion, par injection
15 de la solution tampon d'éluion comprenant une concentration finale de 10 mM en EDTA.

Le pic d'absorption (3) sur la Figure 12 illustre la libération du FIX humain transgénique à partir des complexes Aptamères nucléiques/FIX recombinant, lors de l'étape d'éluion.

On note que les molécules de FIX humain transgénique sont libérées rapidement et donc dans un faible volume. En conséquence, grâce au support d'affinité de l'invention, on
20 obtient une solution d'éluion de forte concentration en protéine FIX humain transgénique.

Après éluion, on a réalisé une étape de régénération du support d'affinité, avec un tampon Tris-HCl à 20 mM, EDTA 10 mM à pH 7,5.

On a réalisé un chromatogramme ainsi qu'une électrophorèse en gel SDS-PAGE avec coloration au Bleu de coomassie. Les résultats sont illustrés dans la figure 12.

L'analyse du chromatogramme de la figure 12 montre que l'éluat présente une bonne
25 pureté chromatographique et est caractérisé par un maintien de la fonctionnalité du Facteur IX avec une sélection des protéine à domaine GLA intègre et donc active

Les résultats de l'Exemple 9 montrent la capacité de l'aptamère Mapt-1WS sans chaîne espaceur qui a été immobilisé sur le support d'affinité en l'absence d'une chaîne espaceur, par
30 exemple en l'absence d'une chaîne espaceur de polyéthylène glycol, à purifier le Facteur IX humain à partir d'un milieu complexe de départ contenant de nombreuses impuretés dérivées du plasma.

Les résultats de l'étape de purification par chromatographie sont également présentés
35 dans le Tableau T1 ci-dessous.

Tableau T1

	Activité Spécifique (UI/mg)	Pureté (%)	Gain de pureté
Produit de départ	4,0	1,8	1,0
Fraction non retenue	3,8	1,7	0,9
Fraction d'élution	104,5	> 46,1	> 26,0
Fraction de régénération	1,4	0,6	0,3

Les résultats présentés dans le Tableau T1 montrent que le support d'affinité préparé à l'exemple 9 possède une excellente capacité de purification du Facteur IX humain, et plus précisément du Facteur IX humain recombinant produit dans le lait d'une truie transgénique pour le facteur IX humain. En particulier, les résultats du tableau T1 montrent que l'on obtient un gain de pureté d'au moins 26 fois.

Exemple 10 : Capture d'acides nucléiques aptamères selon l'invention par du Facteur VII humain immobilisé sur un support.

On a fabriqué un support solide sur lequel ont été immobilisées des molécules de Facteur VII humain recombinant purifié. On a utilisé une préparation purifiée de facteur VII humain recombinant commercialisée sous le nom Novoseven® par la société Laboratoires Français du Fractionnement et des Biotechnologies (LFB).

On réalise une immobilisation du Facteur VII humain sur dextran carboxyméthyl activé par NHS-EDC et se liant aux amines libres présentes sur le FIX.

Le Facteur VII recombinant humain est ainsi immobilisé avec un taux d'immobilisation de 2525 RU (1 RU correspond approximativement à 1 pg de produit immobilisé par mm²).

Des aptamères nucléiques de l'invention (pureté : 99%) ont été dilués dans du tampon de course (Tris 50 mM, CaCl₂ 10 mM, MgCl₂ 4 mM, pH 7,5) de manière à obtenir autant d'échantillons d'aptamères que d'aptamères distincts à tester.

Chaque échantillon a été injecté de façon séquentielle sur une même puce (support solide) contenant le FVII recombinant humain immobilisé. Des contrôles sont obtenus en injectant des blancs ne contenant que du tampon de course. Toutes les injections ont été réalisées avec un débit 30 µl/min pendant 60 sec, après l'injection, du tampon de course a été injecté sur la puce à un débit identique pendant 120 sec.

Du tampon d'élution (EDTA, 5 mM) a ensuite été injecté pendant 60 sec avec un débit de 30 µl/min pour décrocher l'aptamère du FVII humain immobilisé.

La puce permet d'étudier en temps réel la formation et la rupture des interactions entre le FVII recombinant humain immobilisé et chacun des aptamères testés, grâce à la résonance plasmonique de surface (RPS). Une liaison sur le FVII recombinant humain immobilisé se

traduit par une augmentation du signal en unité de résonance (RU) enregistré par l'appareil (Figure 14). Ces analyses sont effectuées avec l'appareil de RPS Biacore T100 (GE). La modélisation des interactions enregistrées sont effectuées à l'aide du Logiciel Biaevaluation (GE).

5 Les résultats obtenus montrent que tous les aptamères nucléiques testés se lient avec une affinité significative au Facteur IX recombinant humain plasmatique.

Les résultats de la Figure 14 montrent aussi que les 27 aptamères testés peuvent être classés dans quatre groupes principaux, selon leur niveau d'affinité pour le Facteur VII humain.

On peut noter en particulier la très forte affinité pour le Facteur VII humain des
10 aptamères classés dans le Groupe 4 représenté sur la Figure 14. Parmi les 27 aptamères testés, l'aptamère ayant la plus forte affinité pour le Facteur IX humain, qui est désigné Mapt-2.2, consiste en l'aptamère de séquence SEQ ID N° 38 Mapt-2.2-CS.

15 **Exemple 11 : Procédé de purification du Facteur VII humain plasmatique**

A. Utilisation d'un support d'affinité comprenant l'aptamère Mapt-2CS immobilisé

Les supports d'affinité aptamères ont été testés à partir d'une préparation purifiée en FVII humain plasmatique. On précise que la préparation purifiée de FVII humain plasmatique
20 consiste en un concentré de FVII à 98% de pureté commercialisé sous le nom ACSET® par le Laboratoire Français du Fractionnement et des Biotechnologies (LFB).

Le support d'affinité a été préparé conformément au protocole décrit à l'Exemple 7. Le support d'affinité de l'exemple 11-A comprend l'aptamère Mapt-2-CS comprenant l'acide nucléique de séquence SEQ ID N° 37 qui est immobilisé.

25 Le support d'affinité utilisé pour réaliser l'exemple 11-A possède une densité de ligand théorique de 0,40 mg/ml. On a utilisé un volume de gel de 1 ml.

Le support d'affinité est équilibré avec un tampon de 0,05 M Tris-HCl, 0,01 M CaCl₂, 0,05 mM MgCl₂ à pH de 7,5.

Une charge de FVII humain plasmatique purifié est utilisée pour l'étape de purification
30 du FVII humain.

La solution de FVII humain plasmatique purifié, préalablement ajustée à 4 mM MgCl₂ et 10 mM CaCl₂ et pH 7,5, est injectée sur le gel Aptamère-agarose (support d'affinité) avec une pompe péristaltique à un débit de 0,1 ml/minute soit un temps de contact avec le support d'affinité de 10 minutes (E/S).

35 Après injection, le gel est lavé en tampon tris 50 mM + NaCl 50mM + 4 mM MgCl₂ + 10 mM CaCl₂ à pH 7,5.

Un volume de 10 ml de solution non adsorbé est collecté.

Le FVII est élué par un tampon Tris-HCl 20mM + EDTA 10 mM à pH 7,5. La collecte du pic d'élution est réalisée suivant le profil de DO.

Pour régénérer le support d'affinité, on utilise un tampon de régénération de Tris-HCl 20 mM, NaCl 1M, propylène glycol 50%, à pH 7,5.

La figure 15 illustre un profil de chromatographie du FVII humain plasmatique, avec un suivi en continu des valeurs d'absorbance (D.O.) à 254 nanomètres.

5 Sur la Figure 15, l'injection (1) du concentré de FIX humain plasmatique est rapidement suivi du pic d'élimination (2) de la fraction non retenue sur le support d'affinité. Le support d'affinité continue de se saturer avec la protéine de la coagulation d'intérêt : des complexes entre (i) les aptamères nucléiques anti-GLA du support d'affinité et (ii) les molécules de FVII humain plasmatique initialement contenues dans la composition à purifier ont été formés. Après
10 passage de la composition à purifier, on procède à une étape de lavage de la colonne avec le tampon de lavage spécifié précédemment. Puis on réalise l'étape d'élution, par injection de la solution tampon d'élution comprenant une concentration finale de 10 mM en EDTA.

Le pic d'absorption (3) sur la Figure 15 illustre la libération du FIX humain plasmatique à partir des complexes Aptamères nucléiques/FIX recombinant, lors de l'étape d'élution.

15 On note que les molécules de FIX humain plasmatique sont libérées rapidement et donc dans un faible volume. En conséquence, grâce au support d'affinité de l'invention, on obtient une solution d'élution de forte concentration en protéine FIX humain plasmatique.

Après élution, on a réalisé une étape de régénération du support d'affinité, avec un tampon Tris à 20 mM.

20 On a réalisé un chromatogramme ainsi qu'une électrophorèse en gel SDS-PAGE avec coloration au Bleu de Coomassie. Les résultats sont illustrés dans la figure 16.

L'analyse du chromatogramme de la figure 16 montre que l'éluat présente une bonne pureté chromatographique et est caractérisé par un maintien de la fonctionnalité du Facteur VII.

L'analyse du chromatogramme de la figure 16 montre que seules les formes actives du
25 FVII humain plasmatique purifié de départ ont été retenues sur le support d'affinité. Les formes inactives présentent dans la composition purifiée de départ, y compris les formes de FVII mal glycosylées et les formes de FVII Des-Gla, n'ont pas été retenues sur le support d'affinité.

Les résultats de l'Exemple 11-A montrent la capacité de l'aptamère Mapt-2CS qui a été immobilisé sur le support d'affinité en l'absence d'une chaîne espaceur, par exemple en
30 l'absence d'une chaîne espaceur de polyéthylène glycol, à purifier le Facteur VII humain à partir d'un milieu complexe de départ contenant de nombreuses impuretés dérivées du plasma.

B. Utilisation d'un support d'affinité comprenant l'aptamère Mapt-2.2CS immobilisé

On a utilisé un support d'affinité sur lequel ont été immobilisées des molécules de
35 l'aptamère Mapt-2.2.-CS biotinylé comprenant une chaîne espaceur de PEG(C18).

Avec ce support d'affinité, on a réalisé une purification de facteur VII humain plasmatique à 98% de pureté (ACSET®).

Le support d'affinité a été préparé conformément au protocole décrit à l'Exemple 7. Le support d'affinité de l'exemple 11-B comprend des aptamères Mapt-2.2.-CS comprenant l'acide nucléique de séquence SEQ ID N° 37 qui sont immobilisés.

Le support d'affinité utilisé pour réaliser l'exemple 11-B possède une densité de ligand
5 théorique de 0,50 mg/ml. On a utilisé un volume de gel de 1 ml.

Le support d'affinité est équilibré avec un tampon de 0,05 M Tris-HCl, 0,05 M NaCl, 0,01 M CaCl_2 , 0,004 M MgCl_2 à pH de 7,5.

Une charge de FVII humain plasmatique purifié à 98% dans une quantité de 115 μg par millilitre de support d'affinité (gel) est utilisée pour l'étape de purification du FVII humain.

10 La solution de FVII humain plasmatique purifié, préalablement ajustée à 4 mM MgCl_2 et 10 mM CaCl_2 et pH 7,5, est injectée sur le gel Aptamère-agarose (support d'affinité) avec une pompe péristaltique à un débit de 0,05 ml/minute soit un temps de contact avec le support d'affinité de 20 minutes (E/S).

Après injection, le gel est lavé en tampon tris 50 mM + NaCl 50mM + 4 mM MgCl_2 + 10
15 mM CaCl_2 à pH 7,5.

Un volume de 10 ml de solution non adsorbé est collecté.

Le FVII est élué par un tampon Tris-HCl 50mM + EDTA 10 mM à pH 7,5. La collecte du pic d'élution est réalisée suivant le profil de DO.

Pour régénérer le support d'affinité, on utilise un tampon de régénération de NaCl 1M,
20 50% propylène glycol à pH 7,5.

Le profil chromatographique est illustré dans la Figure 17. Sur la Figure 17, l'injection du concentré de FVII humain plasmatique est suivi du pic d'élimination (1) de la fraction non retenue sur le support d'affinité. Le support d'affinité continue de se saturer avec la protéine de la coagulation d'intérêt : des complexes entre (i) les aptamères nucléiques anti-GLA du support
25 d'affinité et (ii) les molécules de FIX humain plasmatique initialement contenues dans la composition à purifier ont été formés. Après passage de la composition à purifier, on procède à une étape de lavage de la colonne avec le tampon de lavage spécifié précédemment. Puis on réalise l'étape d'élution, par injection de la solution tampon d'élution comprenant une concentration finale de 10 mM en EDTA.

30 Le pic d'absorption (2) sur la Figure 17 illustre la libération du FVII humain plasmatique à partir des complexes Aptamères nucléiques/FVII recombinant, lors de l'étape d'élution.

On précise que la fraction non retenue représente 9% en poids des protéines contenues dans l'échantillon de départ, la fraction d'élution représente 78% en poids des protéines contenues dans l'échantillon de départ et la fraction de régénération représente 13% en poids
35 des protéines contenues dans l'échantillon de départ.

Par ailleurs, la Figure 18 illustre l'excellente capacité du support d'affinité sur lequel sont immobilisées des molécules de l'aptamère Mapt-2.2.-CS à purifier le Facteur VII humain.

Les résultats de la Figure 18 montrent que la fraction d'éluat présente une bonne pureté électrophorétique.

L'analyse du chromatogramme de la figure 18 montre que seules les formes actives du FVII humain plasmatique purifié de départ ont été retenues sur le support d'affinité. Les formes inactives présentent dans la composition purifiée de départ, y compris les formes de FVII mal glycosylées et les formes de FVII Des-Gla, n'ont pas été retenues sur le support d'affinité.

Les résultats de l'Exemple 11-B montrent la capacité de l'aptamère Mapt-2.2.-CS qui a été immobilisé sur le support d'affinité à purifier le Facteur IX humain à partir d'un milieu complexe de départ contenant de nombreuses impuretés dérivées du plasma.

Exemple 12 : Optimisation des conditions de capture des aptamères sur le support d'affinité.

On a fabriqué un support solide sur lequel ont été immobilisées des molécules de l'aptamère nucléique de l'invention de séquence SEQ ID N° 39 de 80 nucléotides, aussi désigné ici « Mapt2 ». Préalablement à sa fixation sur le support solide, l'extrémité 5' de l'aptamère Mapt2 a été chimiquement couplée à une chaîne espaceur constituée de 5 molécules de PEG(C18). Puis, l'extrémité libre de la chaîne espaceur, opposée à l'extrémité couplée à l'aptamère, a été couplée à une molécule de biotine.

On dispose d'un support solide contenant des molécules de streptavidine immobilisées (Serie S sensor Chip SA, GE)

Puis, on a mis en contact le support solide ci-dessus avec les composés aptamères ci-dessus afin d'immobiliser les acides nucléiques de séquence SEQ ID N° 39, par association non covalente entre les molécules de streptavidine du support et les molécules de biotine des composés aptamères.

L'aptamère Mapt2 est ainsi immobilisé avec un taux d'immobilisation de 4900 RU (*1 RU correspond approximativement à 1 pg de produit immobilisé par mm²*).

Du FVII humain purifié à partir du plasma (FVII HP, pureté : 99%) a été dilué dans divers tampons de course, respectivement :

- Tampon 1 : Tris 50 mM, NaCl 50 mM, CaCl₂ 10 mM, MgCl₂ 4 mM, pH 7,5 ;
- Tampon 2 : Tris 50 mM, NaCl 50 mM, CaCl₂ 10 mM, MgCl₂ 10 mM, pH 7,5 ;
- Tampon 3 : Tris 50 mM, NaCl 50 mM, MgCl₂ 20 mM, pH 7,5 ;
- Tampon 4 : Tris 50 mM, CaCl₂ 10 mM, MgCl₂ 4 mM, pH 7,5 ; et
- Tampon 5 : Tris 50 mM, CaCl₂ 10 mM, pH 7,5 ;

Chaque échantillon a été injecté de façon séquentielle sur une même puce (support solide) contenant l'aptamère Mapt2 immobilisé par une interaction biotine-streptavidine. Des contrôles sont obtenus en injectant des blancs ne contenant que du tampon de course. Toutes les injections ont été réalisées avec un débit 30µl/min pendant 60 sec, après l'injection, du tampon de course a été injecté sur la puce à un débit identique pendant 120 sec.

Du tampon d'élution (EDTA, 5mM) a ensuite été injecté pendant 30 sec avec un débit de 30µl/min pour décrocher le FVII HP de l'aptamère..

La puce permet d'étudier en temps réel la formation et la rupture des interactions entre le FVII HP et l'aptamère immobilisé grâce à la résonance plasmonique de surface (RPS). Une liaison sur l'aptamère immobilisé se traduit par une augmentation du signal en unité de résonance (RU) enregistré par l'appareil. Ces analyses sont effectuées avec l'appareil de RPS Biacore T100 (GE). La modélisation des interactions enregistrées sont effectuées à l'aide du Logiciel Biaevaluation (GE).

Les résultats sont présentés sur la figure 19.

Les résultats de la figure 19 montrent que les conditions de capture optimales sont obtenues avec le Tampon 5, qui ne comprend pas de NaCl ni de $MgCl_2$.

Les résultats de la figure 19 montrent que la présence de $MgCl_2$ n'est pas nécessaire pour la capture optimale du FVII par les molécules d'aptamères immobilisées. Les résultats montrent que la présence de $MgCl_2$ est même défavorable à la fixation optimale du FVII.

De plus, les résultats de la figure 19 montrent que la présence de NaCl dans le tampon de course est défavorable à une fixation optimale du FVII aux molécules d'aptamères immobilisées sur le support d'affinité.

Les figures 20 et 21 illustrent l'analyse cinétique de la fixation du FVII humain plasmatique aux aptamères Mapt-2 immobilisés sur le support d'affinité, respectivement avec le Tampon 1 (figure 20) et avec le tampon 5 (figure 21).

Les résultats de la figure 20 montrent qu'avec le tampon 1, l'aptamère présente une affinité pour le FVII humain de 148 nM (valeur de K_d), une valeur de k_a de $3,3 \cdot 10^3 M^{-1}s^{-1}$, et une valeur de k_d de $4,8 \cdot 10^{-4} s^{-1}$.

Les résultats de la figure 21 montrent qu'avec le tampon 5, l'aptamère présente une affinité pour le FVII humain de 13 nM (valeur de K_d), une valeur de k_a de $4,7 \cdot 10^4 M^{-1}s^{-1}$, et une valeur de k_d de $6 \cdot 10^{-4} s^{-1}$.

Exemple 13 : Optimisation des conditions de lavage des aptamères sur le support d'affinité.

On a utilisé le support d'affinité décrit pour l'exemple X8 ci-dessus.

La figure 22 présente des résultats relatifs aux éventuels effets de différentes conditions de lavage sur le maintien de la fixation du FVII humain sur les aptamères Mapt-2 immobilisés sur le support d'affinité. On a testé des tampons de lavage suivants : (1) tampon Tris 50 mM, NaCl 1 M, $CaCl_2$ 10 mM, $MgCl_2$ 4 mM, pH 7,5 , (2) tampon Tris 50 mM, NaCl 2 M, $CaCl_2$ 10 mM, $MgCl_2$ 4 mM, pH 7,5, (3) tampon Tris 50 mM, NaCl 3 M, $CaCl_2$ 10 mM, $MgCl_2$ 4 mM, pH 7,5 et (4) tampon Tris 50 mM, EDTA 10 mM.

Les résultats montrent que l'utilisation de concentrations croissantes en NaCl ne provoque pas d'altération de la liaison du FVII humain aux aptamères Mapt-2.

Les résultats de la figure 22 montrent que le FVII reste fixé à l'aptamère Mapt-2, même lorsqu'on réalise une étape de lavage du support d'affinité avec un tampon de force ionique élevée.

Les résultats de la figure 22 montrent aussi que le FVII est élué avec l'EDTA.

La figure 23 présente des résultats relatifs aux éventuels effets de différentes conditions de lavage sur le maintien de la fixation du FVII humain sur les aptamères Mapt-2 immobilisés sur le support d'affinité. On a testé des tampons de lavage suivants : (1) tampon Tris 50 mM, CaCl₂ 10 mM, MgCl₂ 4 mM, pH 7,5 , (2) tampon Tris 50 mM, CaCl₂ 10 mM, MgCl₂ 4 mM, NaCl 1M, pH 7,5 , (3) tampon Tris 50 mM, CaCl₂ 10 mM, MgCl₂ 4 mM, NaCl 2M, pH 7,5 (4) tampon Tris 50 mM, CaCl₂ 10 mM, MgCl₂ 4 mM, NaCl 3M, pH 7,5 et (5) tampon Tris 50 mM, EDTA 10 mM.

Les résultats montrent que l'utilisation de concentrations croissantes en NaCl ne provoque pas d'altération de la liaison du FVII humain aux aptamères Mapt-2.

Les résultats de la figure 23 montrent que le FVII reste fixé à l'aptamère Mapt-2, même lorsqu'on réalise une étape de lavage du support d'affinité avec un tampon de force ionique élevée.

Les résultats de la figure 23 montrent aussi que le FVII est élué avec l'EDTA.

La figure 24 présente des résultats relatifs aux éventuels effets de différentes conditions de lavage sur le maintien de la fixation du FVII humain sur les aptamères Mapt-2 immobilisés sur le support d'affinité. On a testé des tampons de lavage suivants : (1) tampon éthanol à 10%, (3) tampon Tris 50 mM, CaCl₂ 10 mM, MgCl₂ 4 mM, NaCl 1M, pH 7,5 , (3) tampon Tris 50 mM, CaCl₂ 10 mM, MgCl₂ 4 mM, NaCl 2M, pH 7,5 (4) tampon Tris 50 mM, CaCl₂ 10 mM, MgCl₂ 4 mM, NaCl 3M, pH 7,5 et (5) tampon Tris 50 mM, EDTA 10 mM.

Les résultats de la figure 24 montrent que l'utilisation d'éthanol à l'étape de lavage ne provoque pas d'altération de la liaison du FVII humain aux aptamères Mapt-2.

Les résultats montrent que l'utilisation de concentrations croissantes en NaCl à l'étape de lavage ne provoque pas d'altération de la liaison du FVII humain aux aptamères Mapt-2.

Les résultats de la figure 24 montrent que le FVII reste fixé à l'aptamère Mapt-2, même lorsqu'on réalise une étape de lavage du support d'affinité avec un tampon de force ionique élevée.

Les résultats de la figure 24 montrent aussi que le FVII est élué avec l'EDTA.

Exemple 14 : Optimisation des conditions de lavage des aptamères sur le support d'affinité.

On a fabriqué un support solide sur lequel ont été immobilisées des molécules de l'aptamère nucléique Mapt-1 de l'invention de séquence SEQ ID N° 4, aussi désigné ici « Mapt1 ». Préalablement à sa fixation sur le support solide, l'extrémité 5' de l'aptamère Mapt2 a été chimiquement couplée à une chaîne espaceur constituée de 5 molécules de PEG(C18). Puis, l'extrémité libre de la chaîne espaceur, opposée à l'extrémité couplée à l'aptamère, a été couplée à une molécule de biotine.

On dispose d'un support solide contenant des molécules de streptavidine immobilisées (Serie S sensor Chip SA, GE)

Puis, on a mis en contact le support solide ci-dessus avec les composés aptamères ci-dessus afin d'immobiliser les acides nucléiques de séquence SEQ ID N° 4, par association non covalente entre les molécules de streptavidine du support et les molécules de biotine des composés aptamères.

5 L'aptamère Mapt1 est ainsi immobilisé avec un taux d'immobilisation de 4900 RU (1 RU correspond approximativement à 1 pg de produit immobilisé par mm²) .

Chaque échantillon a été injecté de façon séquentielle sur une même puce (support solide) contenant l'aptamère Mapt1 immobilisé par une interaction biotine-streptavidine. Des contrôles sont obtenus en injectant des blancs ne contenant que du tampon de course. Toutes
10 les injections ont été réalisées avec un débit 30µl/min pendant 60 sec, après l'injection, du tampon de course a été injecté sur la puce à un débit identique pendant 120 sec.

Du tampon d'élution (EDTA, 5mM) a ensuite été injecté pendant 30 sec avec un débit de 30µl/min pour décrocher le FVII HP de l'aptamère..

La puce permet d'étudier en temps réel la formation et la rupture des interactions entre
15 le FIX et l'aptamère immobilisé grâce à la résonance plasmonique de surface (RPS). Une liaison sur l'aptamère immobilisé se traduit par une augmentation du signal en unité de résonance (RU) enregistré par l'appareil. Ces analyses sont effectuées avec l'appareil de RPS Biacore T100 (GE). La modélisation des interactions enregistrées sont effectuées à l'aide du Logiciel Biaevaluation (GE).

20 La figure 25 présente des résultats relatifs aux éventuels effets de différentes conditions de lavage sur le maintien de la fixation du FIX humain sur les aptamères Mapt-1 immobilisés sur le support d'affinité. On a testé des tampons de lavage suivants : (1) tampon Tris 50 mM, CaCl₂ 10 mM, MgCl₂ 4 mM, NaCl 1M, pH 7,5 , (2) tampon Tris 50 mM, CaCl₂ 10 mM, MgCl₂ 4 mM, NaCl 2M, pH 7,5 (3) tampon Tris 50 mM, CaCl₂ 10 mM, MgCl₂ 4 mM, NaCl 3M, pH 7,5 et
25 (5) tampon Tris 50 mM, EDTA 10 mM.

Les résultats montrent que l'utilisation de concentrations croissantes en NaCl à l'étape de lavage ne provoque pas d'altération de la liaison du FIX humain aux aptamères Mapt-1.

Les résultats de la figure 25 montrent que le FIX reste fixé à l'aptamère Mapt-1, même lorsqu'on réalise une étape de lavage du support d'affinité avec un tampon de force ionique
30 élevée.

Les résultats de la figure 25 montrent aussi que le FIX est élué avec l'EDTA.

La figure 26 présente des résultats relatifs aux éventuels effets du propylène glycol (à 50%) sur le maintien de la fixation du FIX humain sur les aptamères Mapt-1 immobilisés sur le support d'affinité. On a testé un tampon de lavage Tris 50 mM, CaCl₂ 10 mM, propylène glycol à
35 50%, à pH 7,5 .

Les résultats de la figure 26 montrent que l'utilisation de propylène glycol à l'étape de lavage ne provoque pas d'altération de la liaison du FIX humain aux aptamères Mapt-1.

REVENDICATIONS

1. Procédé pour la purification de protéines à domaine GLA comprenant les étapes suivantes :
- 5 a) mettre en contact un échantillon contenant une ou plusieurs protéines de la coagulation à domaine GLA, ledit échantillon étant susceptible de contenir des molécules biologiquement inactives de protéine(s) à domaine GLA, avec un support d'affinité sur lequel sont immobilisés des aptamères nucléiques se liant spécifiquement à au moins une protéine de la coagulation à domaine GLA biologiquement active, afin de former des complexes entre (i) lesdits aptamères nucléiques et (ii) ladite ou lesdites protéine(s) de la coagulation à domaine
- 10 GLA,
- b) libérer la ou les protéine(s) de la coagulation à domaine GLA à partir des complexes formés à l'étape a), et
- c) récupérer ladite ou lesdites protéine(s) de la coagulation à domaine GLA biologiquement active(s) sous une forme purifiée.
- 15
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que lesdits aptamères nucléiques consistent en des aptamères désoxyribonucléiques.
3. Procédé selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que lesdits aptamères
- 20 nucléiques sont inclus dans la structure d'un composé de formule (I) suivante :
- [IMM]_x-[SPAC]_y- [APT] (I), dans laquelle :
- [IMM] signifie un composé d'immobilisation sur un support,
 - [SPAC] signifie une chaîne espaceur,
 - [APT] signifie un acide nucléique se liant spécifiquement à une protéine à domaine GLA,
 - 25 - x est un entier égal à 0 ou 1, et
 - y est un entier égal à 0 ou 1.
4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que ladite protéine de la coagulation à domaine GLA est un facteur de la coagulation vitamine K dépendant.
- 30
5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que ladite protéine de la coagulation à domaine GLA est choisie parmi le facteur II, le facteur VII, le facteur IX, le facteur X, la protéine C et la protéine S.
- 35
6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, pour purifier simultanément au moins deux protéines à domaine GLA actives choisies parmi le facteur II, le facteur VII, le facteur IX, le facteur X, la protéine C et la protéine S.

7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, pour purifier simultanément au moins trois protéines à domaine GLA actives choisies parmi le facteur II, le facteur VII, le facteur IX, le facteur X, la protéine C et la protéine S.

5 8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, pour purifier simultanément le facteur II, le facteur VII, le facteur IX et le facteur X.

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que lesdits aptamères nucléiques consistent en des aptamères de séquence choisie parmi les séquences
10 SEQ ID N° 3, 4 et 6 à 39.

10. Aptamère nucléique se liant spécifiquement à une ou plusieurs protéines de la coagulation à domaine GLA biologiquement active(s), dont la capacité à se lier à une protéine cible à domaine GLA biologiquement active n'est pas altérée par un environnement de haute force
15 ionique.

11. Aptamère selon la revendication 10, caractérisé en ce que sa capacité à se lier à une protéine cible à domaine GLA biologiquement active n'est pas altérée par un environnement de haute force ionique possédant une concentration finale en NaCl d'au moins 0,5M.

20 12. Aptamère nucléique se liant spécifiquement aux protéines à domaine GLA biologiquement active(s), comprenant un acide nucléique choisi parmi les acides nucléiques de séquences SEQ ID N° 3,4 et 6 à 39.

25 13. Aptamère nucléique selon l'une des revendications 10 à 12, caractérisé en ce qu'il consiste en un aptamère désoxyribonucléique.

14. Support d'affinité sur lequel est immobilisé un aptamère nucléique selon l'une des revendications 10 à 13.

30

1/26

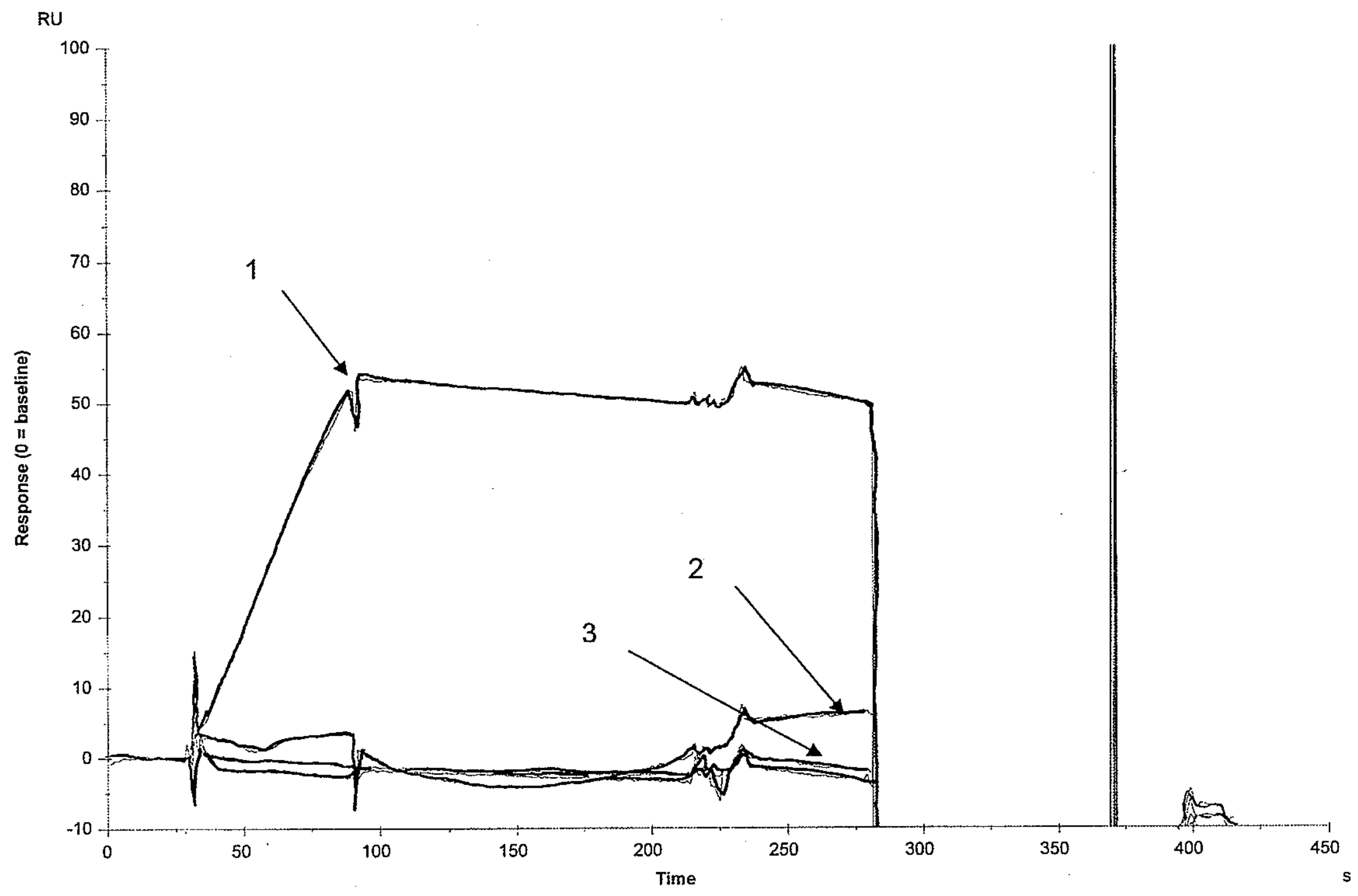


Figure 1

2/26

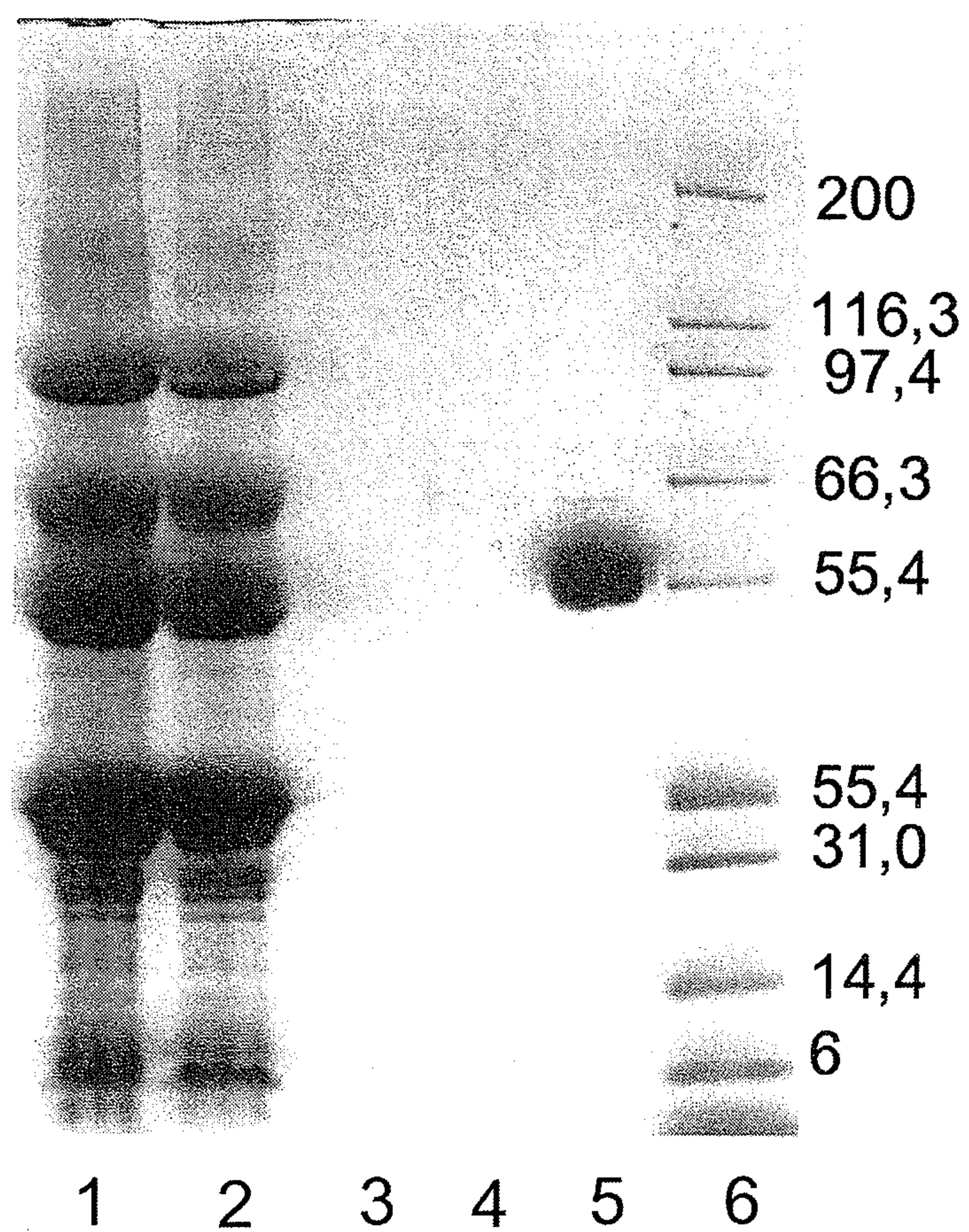
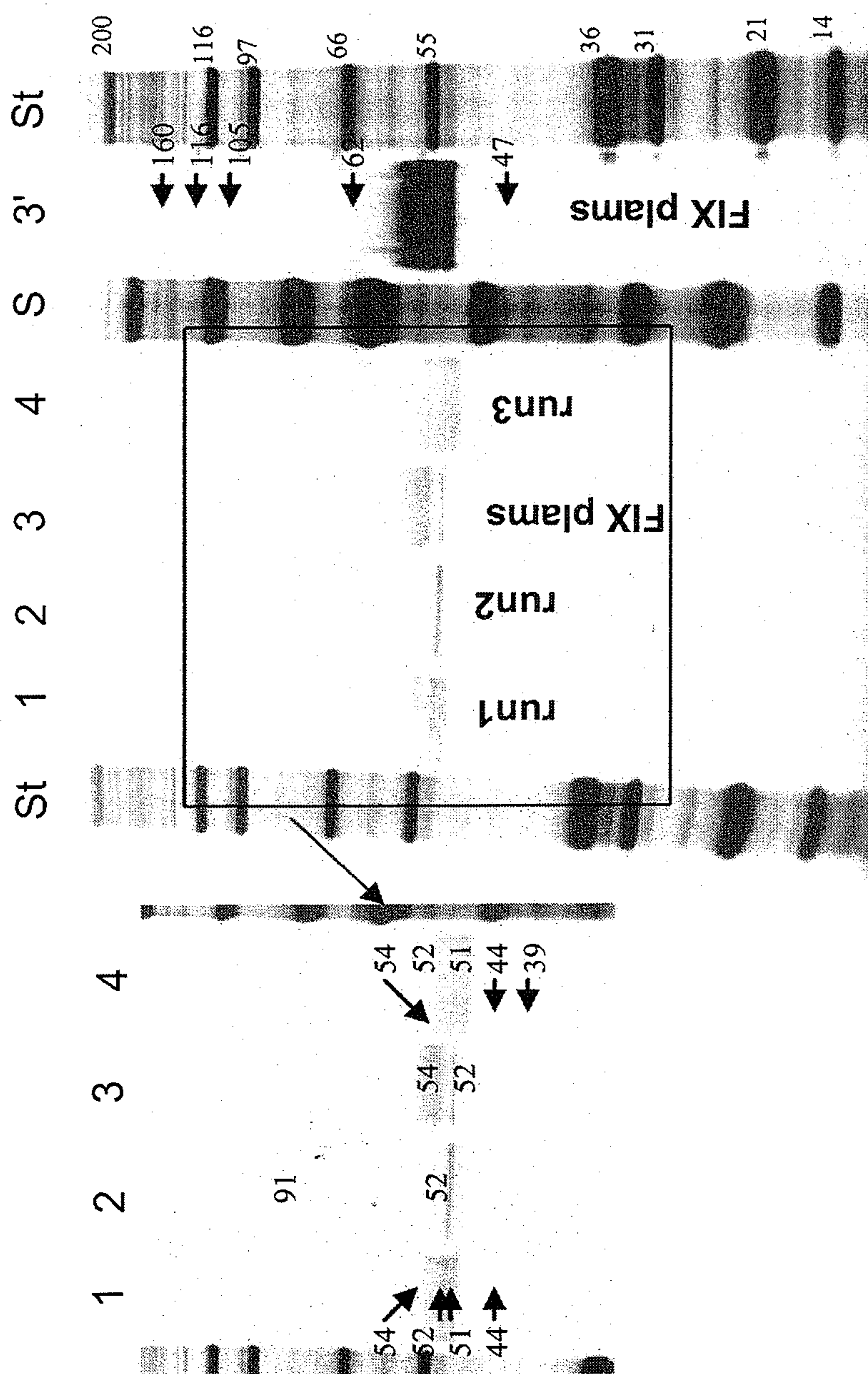


Figure 2

3/26



3A

3B

Figure 3

4/26

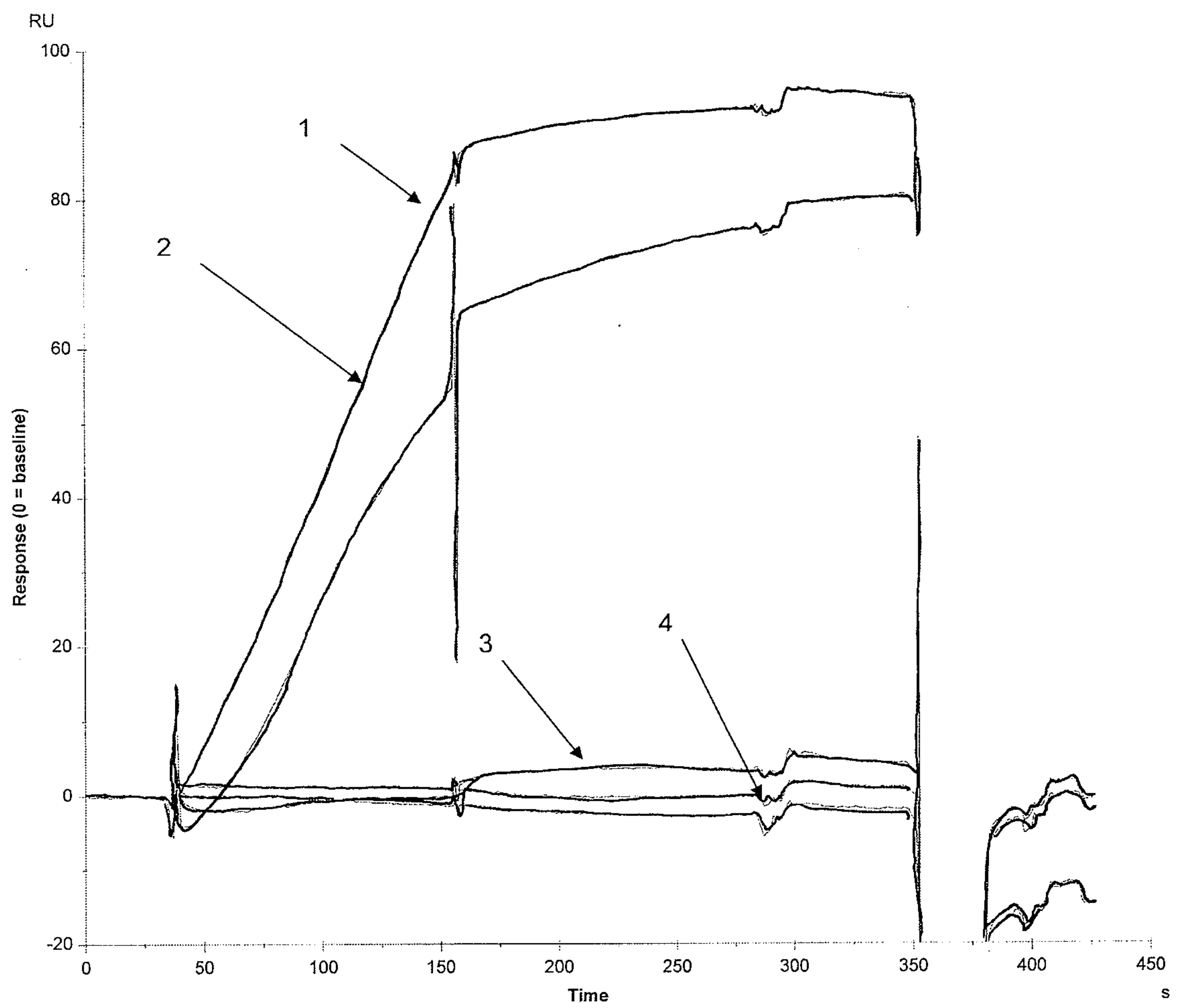


Figure 4

5/26

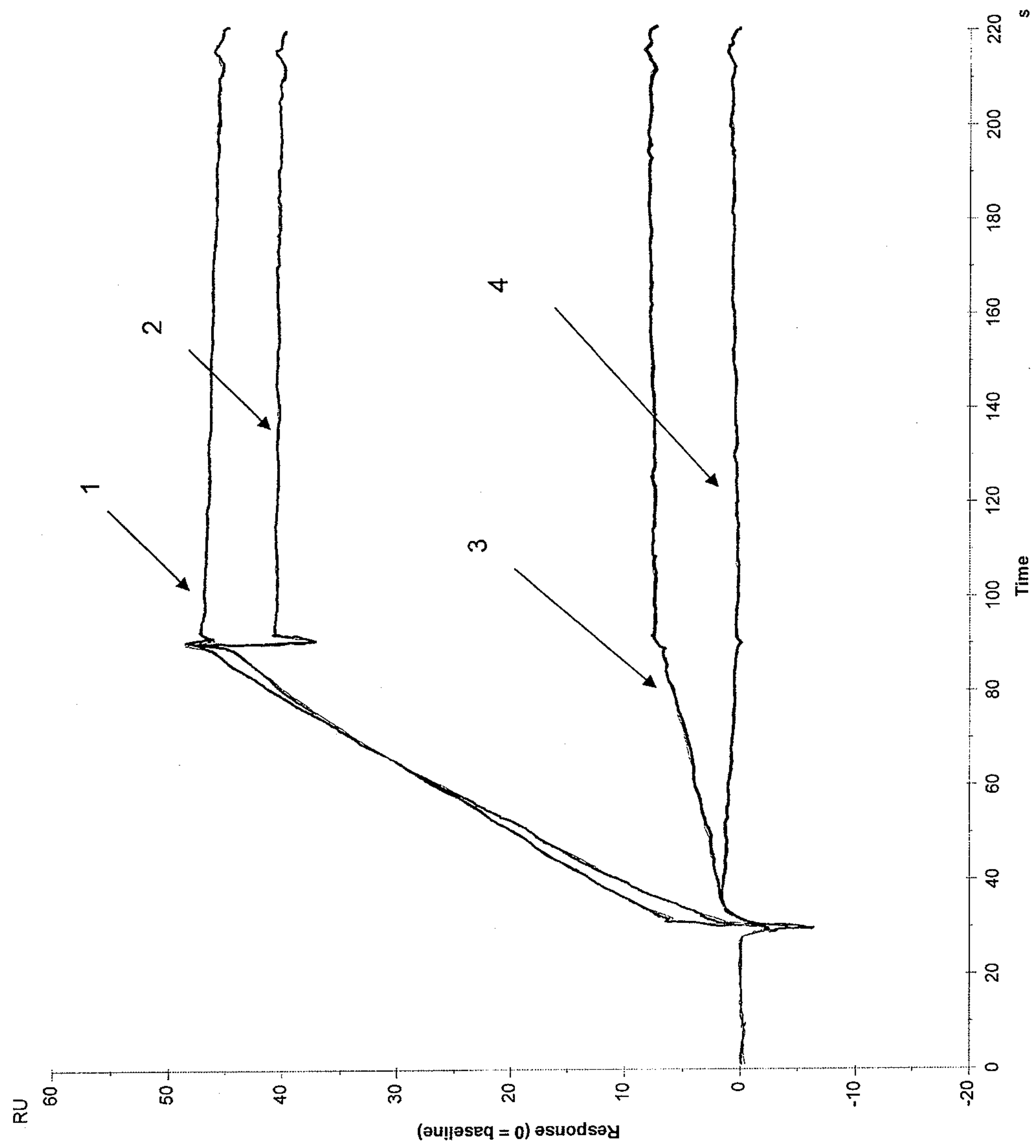


Figure 5

6/26

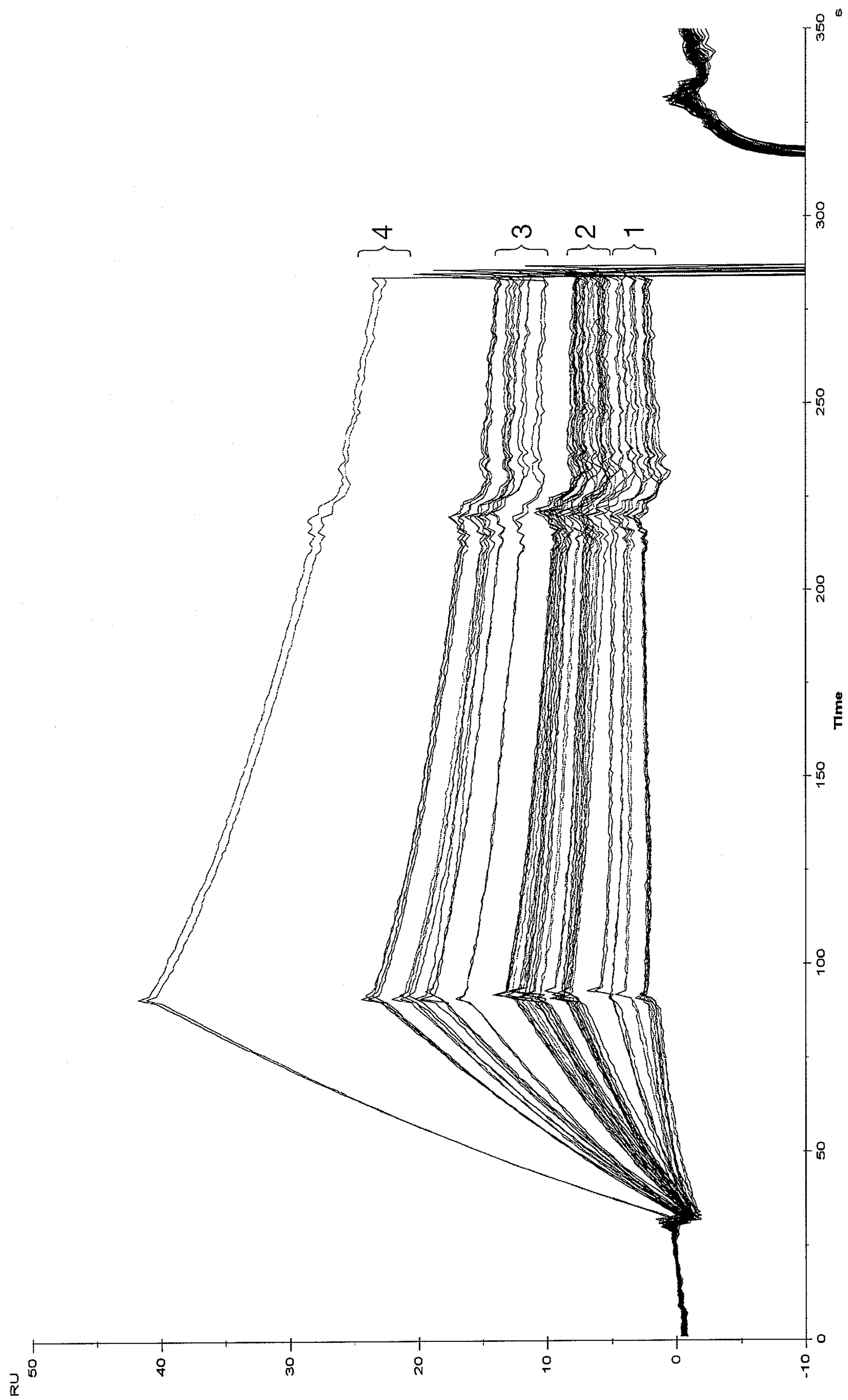


FIG. 6

7/26

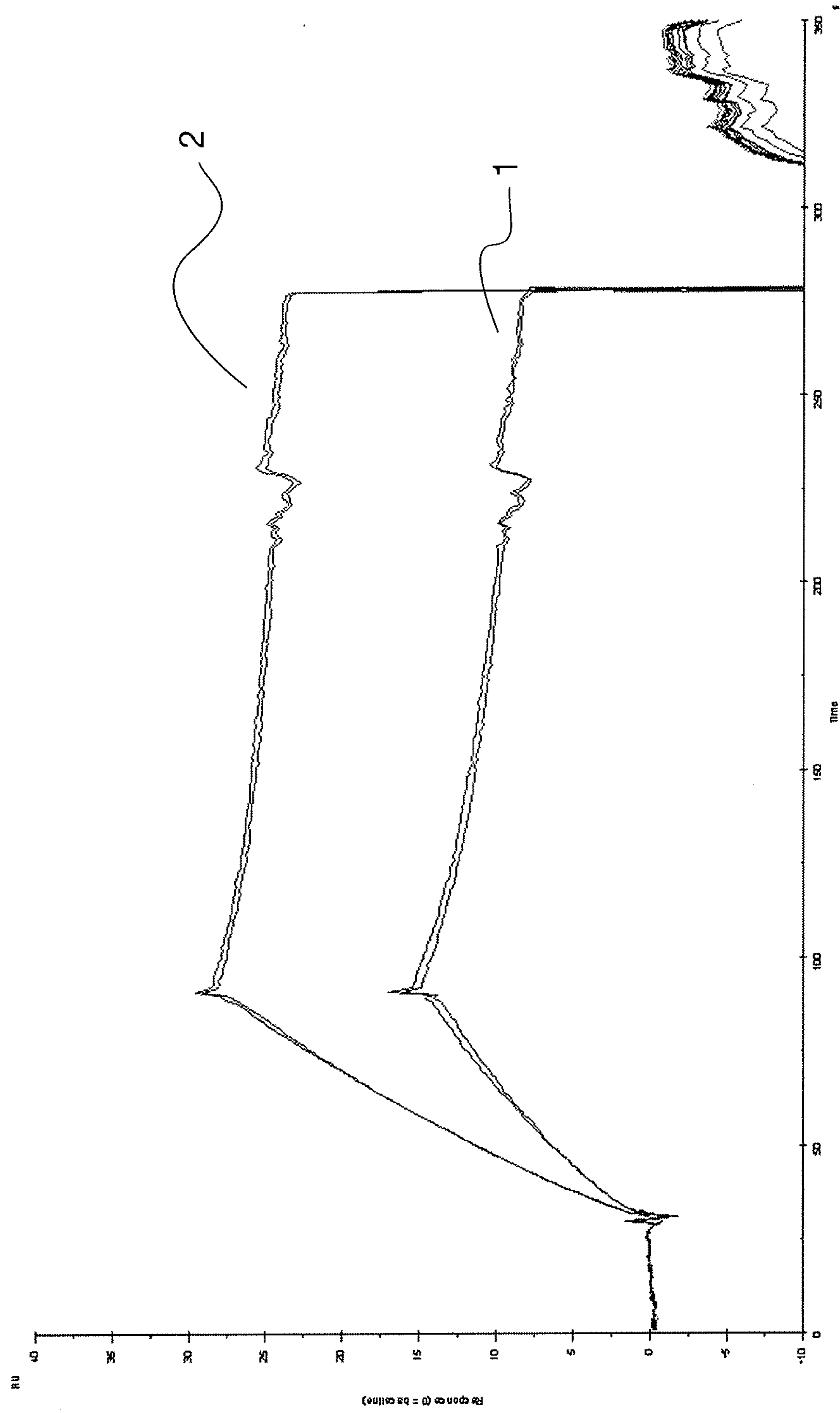


FIG. 7

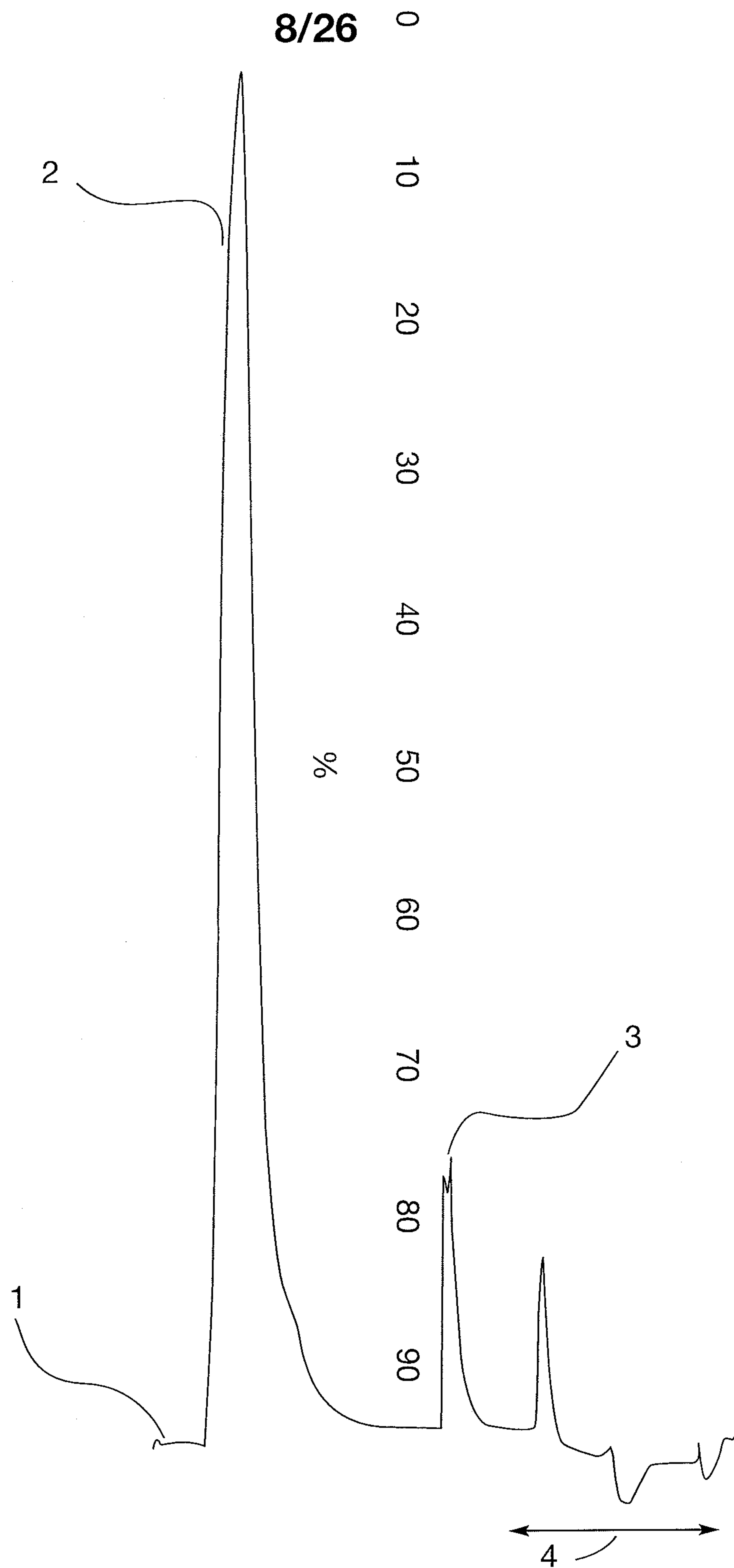


FIG. 8

9/26

MD NR E1 E2 E3 T FIX

MD NR E1 E2 E3 T FIX

MD NR E1 E2 E3 T FIX

MD NR E1 E2 E3 T FIX

MD NR E1 E2 E3 T FIX

MD NR E1 E2 E3 T FIX

FIG. 9

10/26

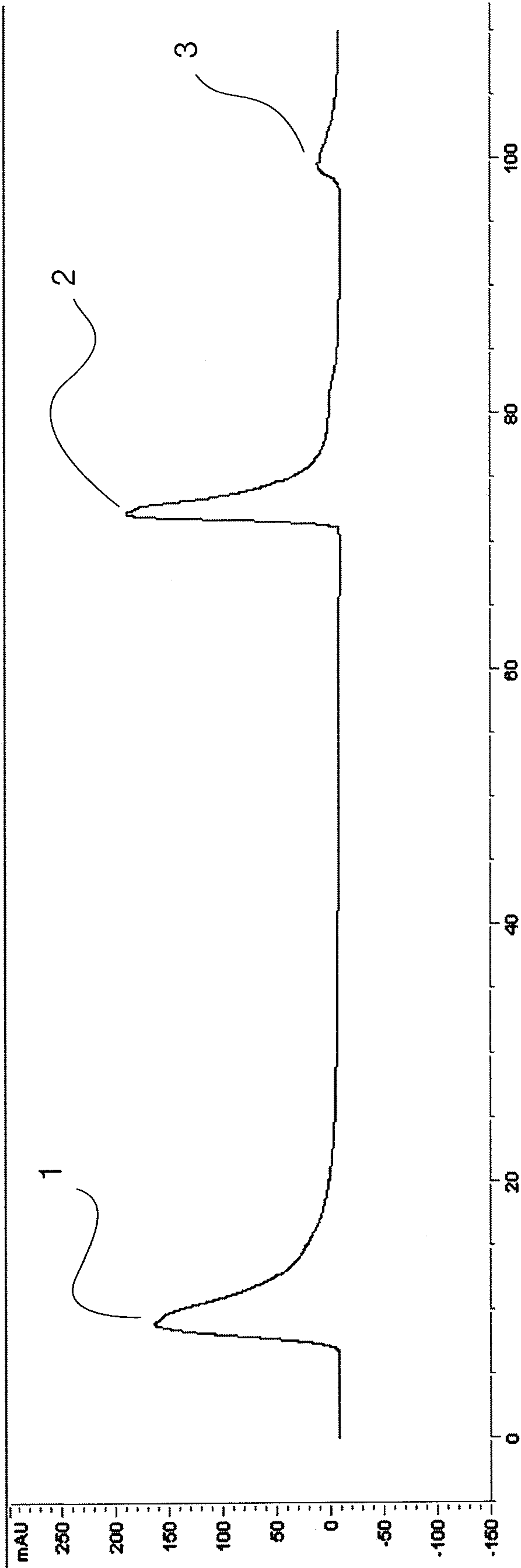


FIG. 10

11/26

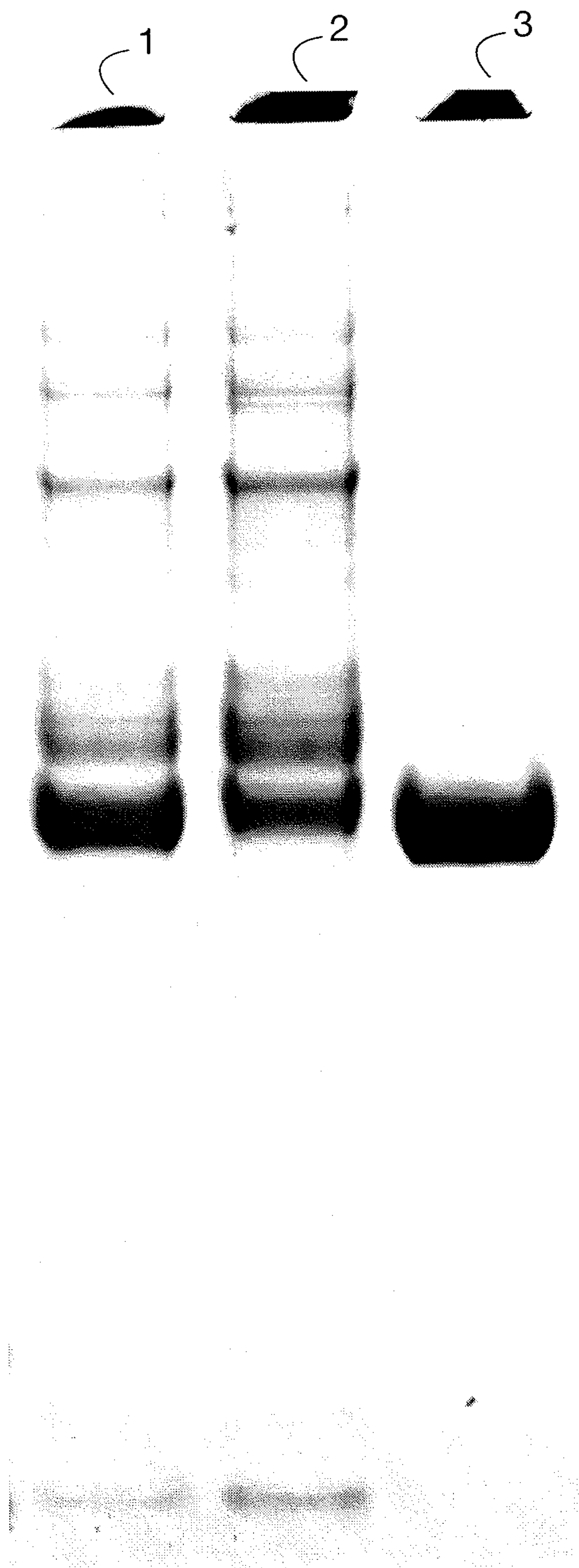


FIG. 11

12/26

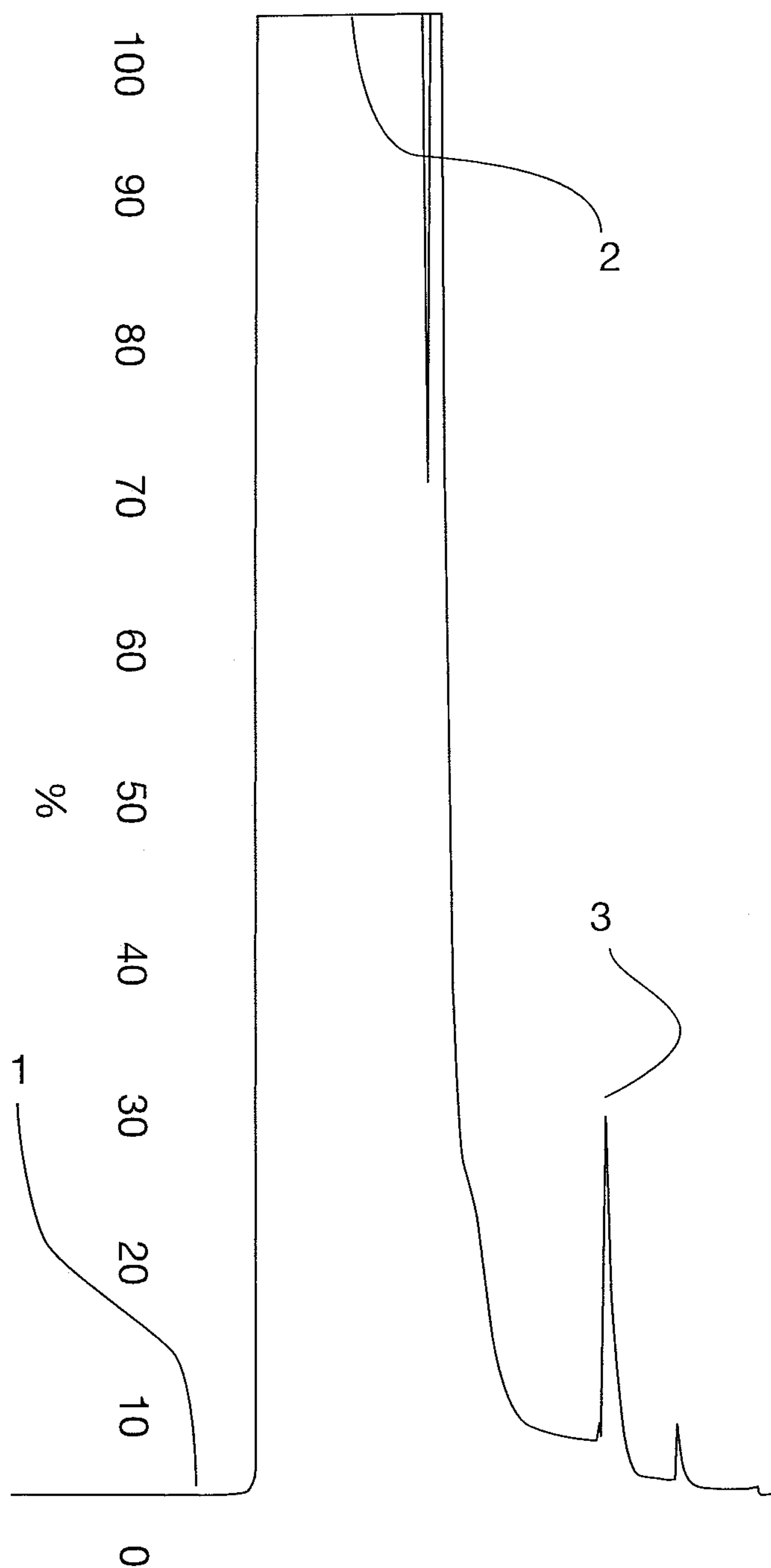


FIG. 12

13/26

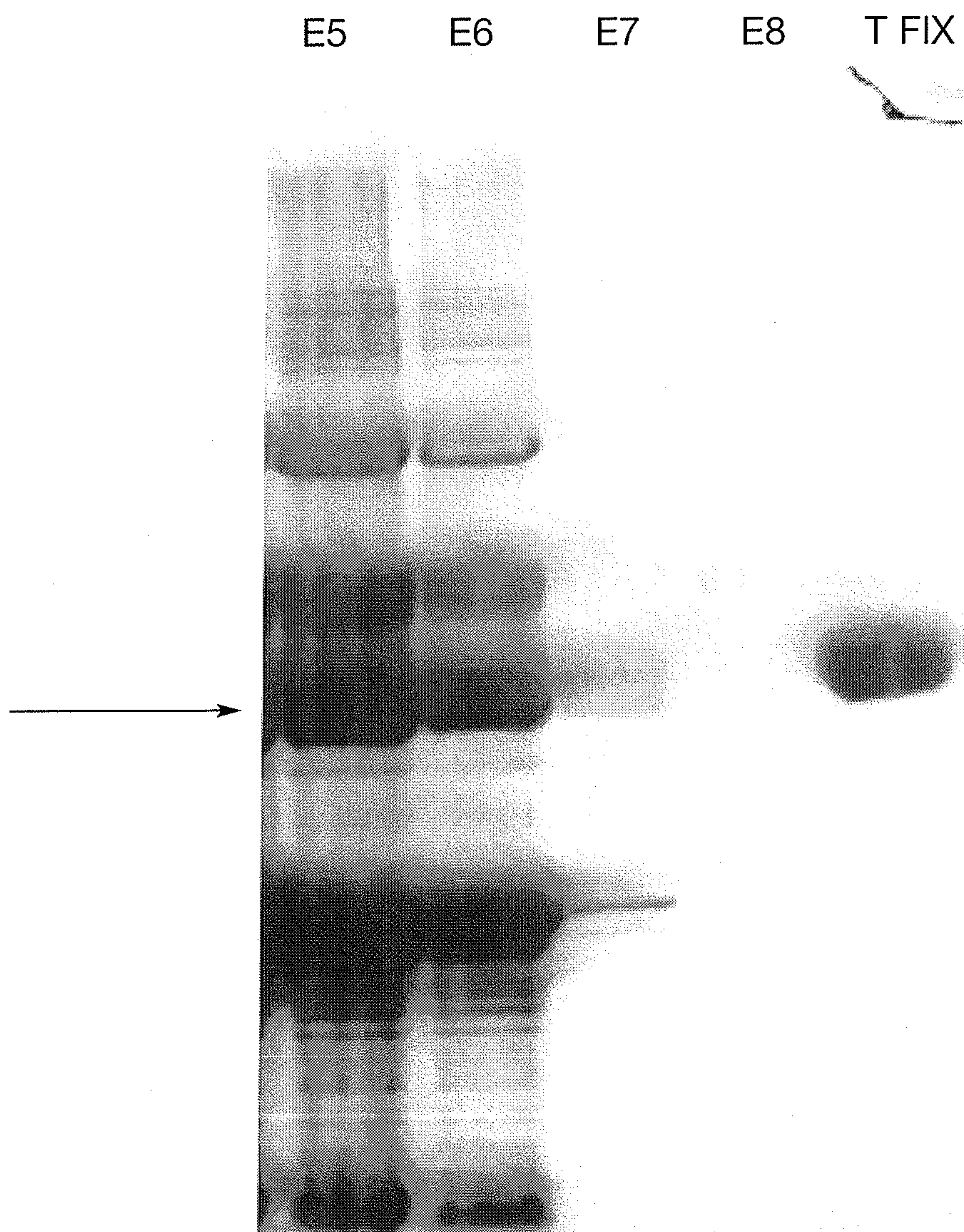


FIG. 13

14/26

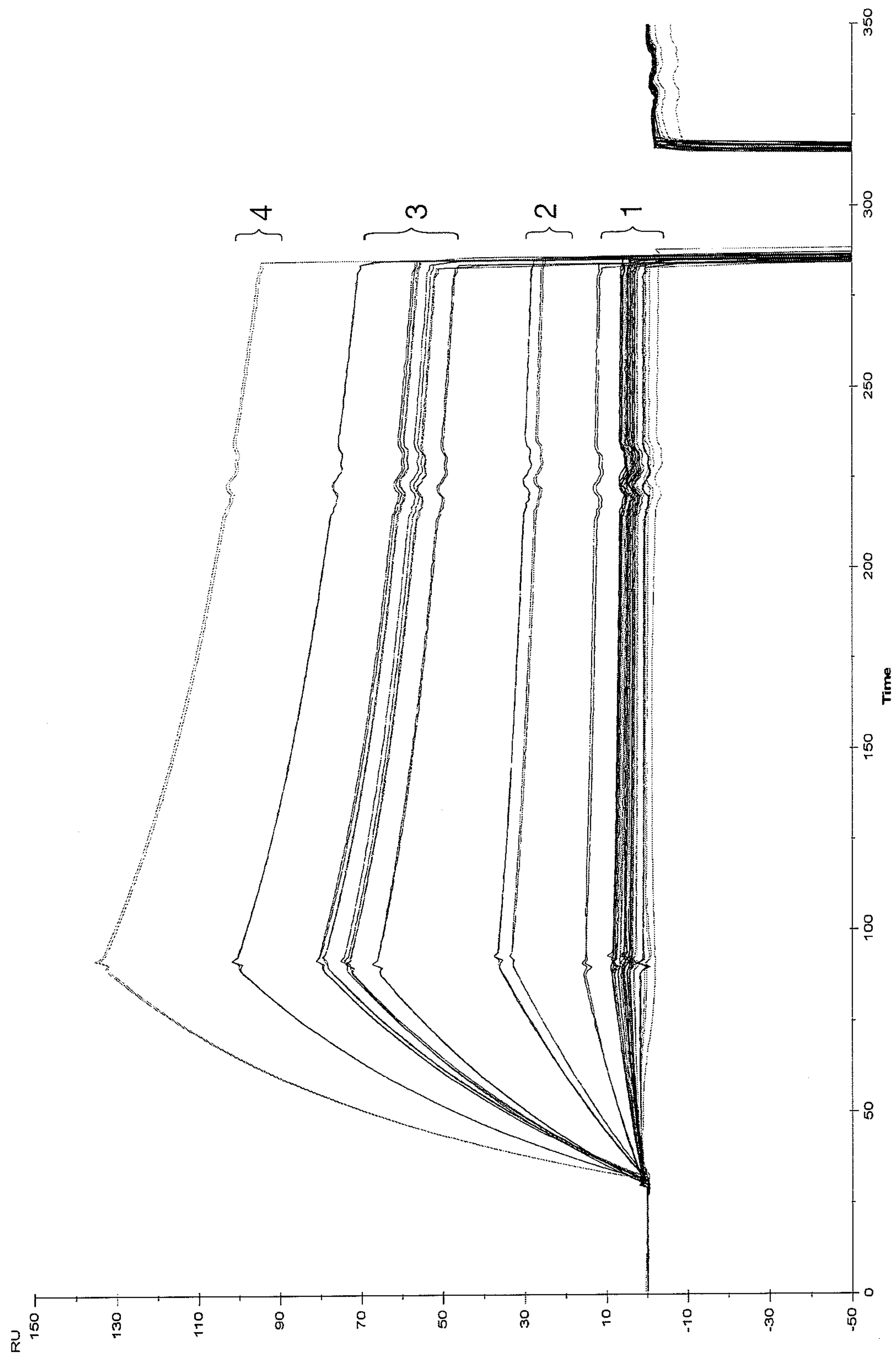


FIG. 14

15/26

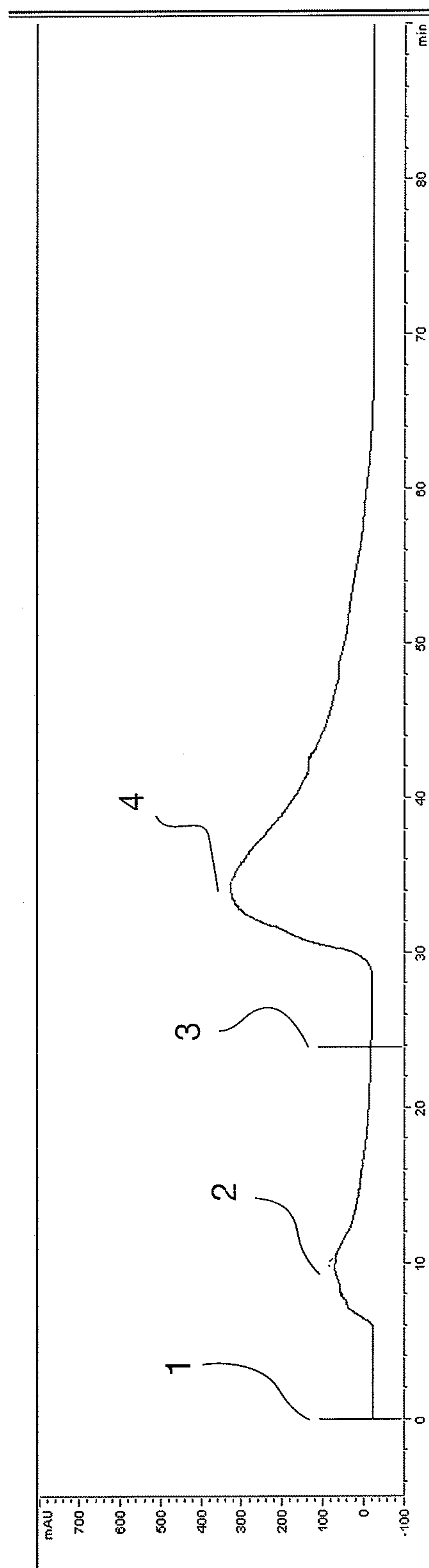


FIG. 15

16/26



FIG. 16

17/26

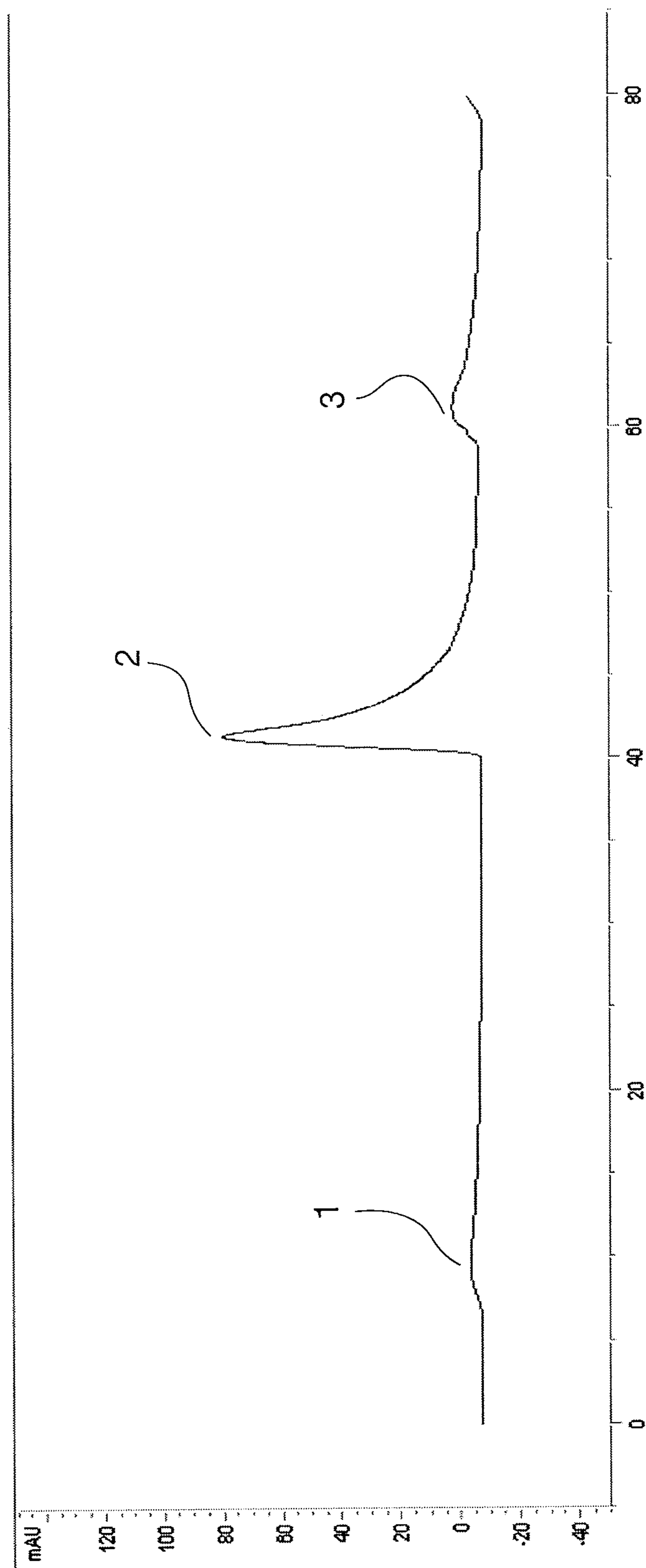


FIG. 17

18/26

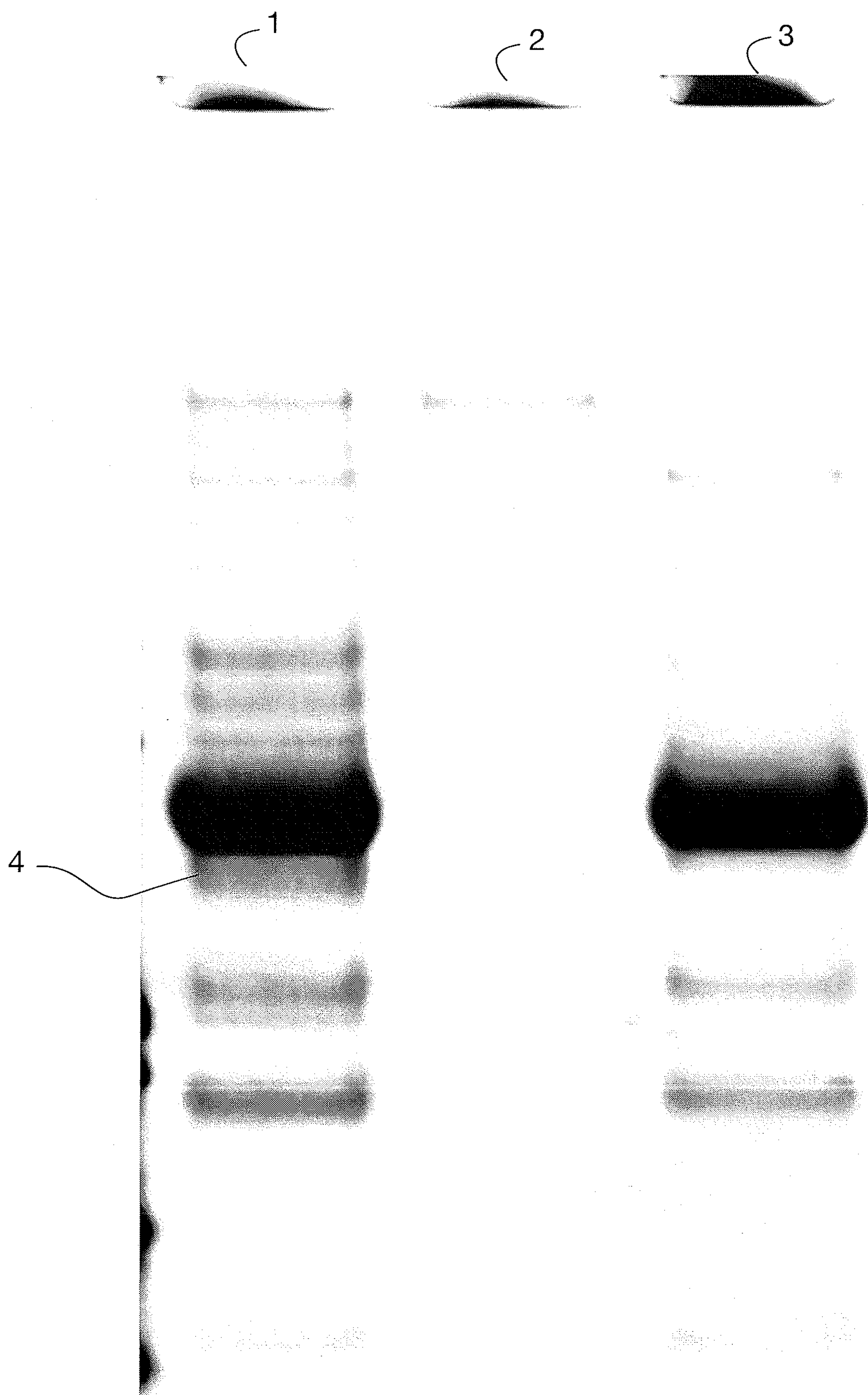
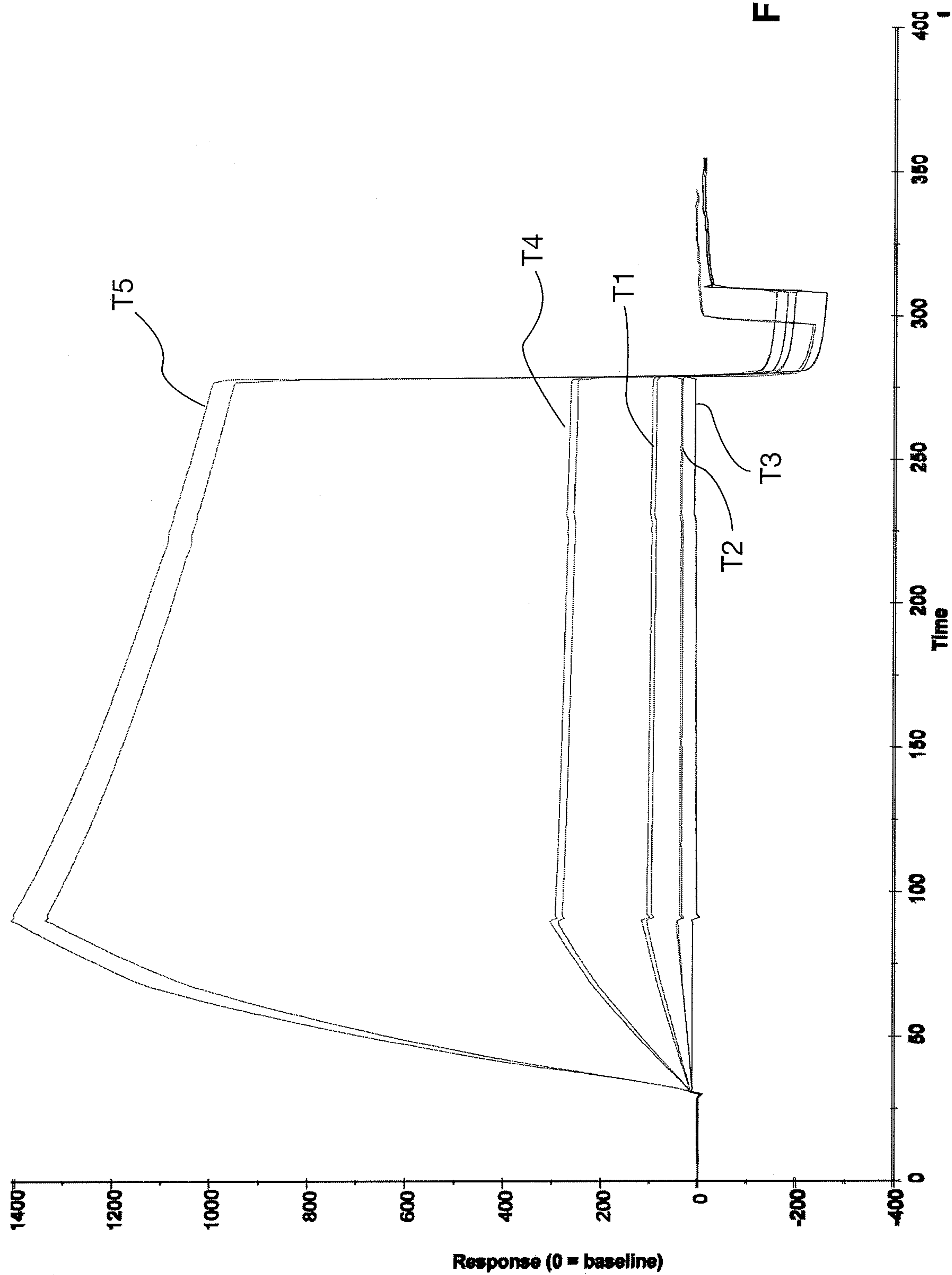


FIG. 18

19/26

FIG. 19



20/26

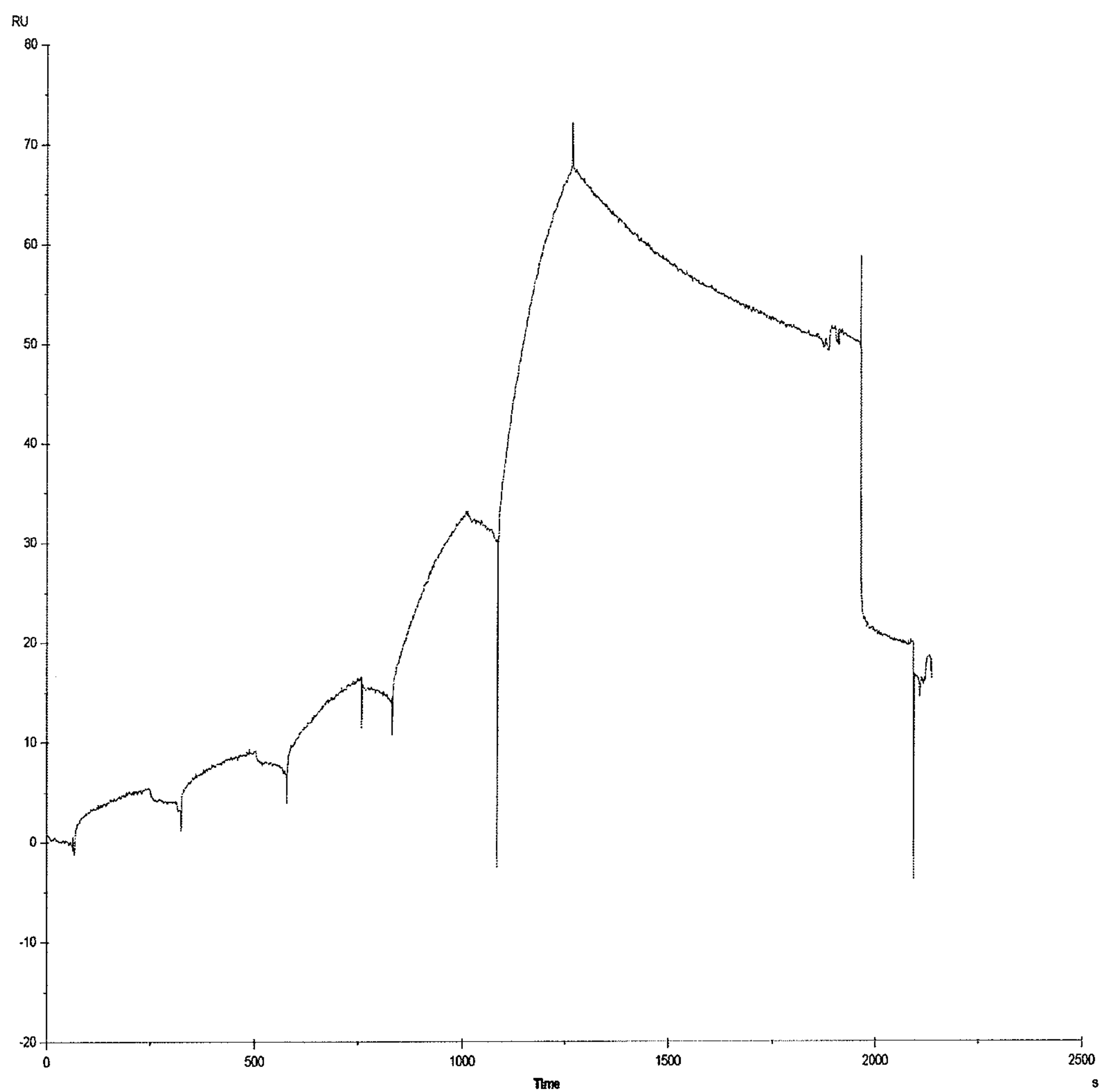
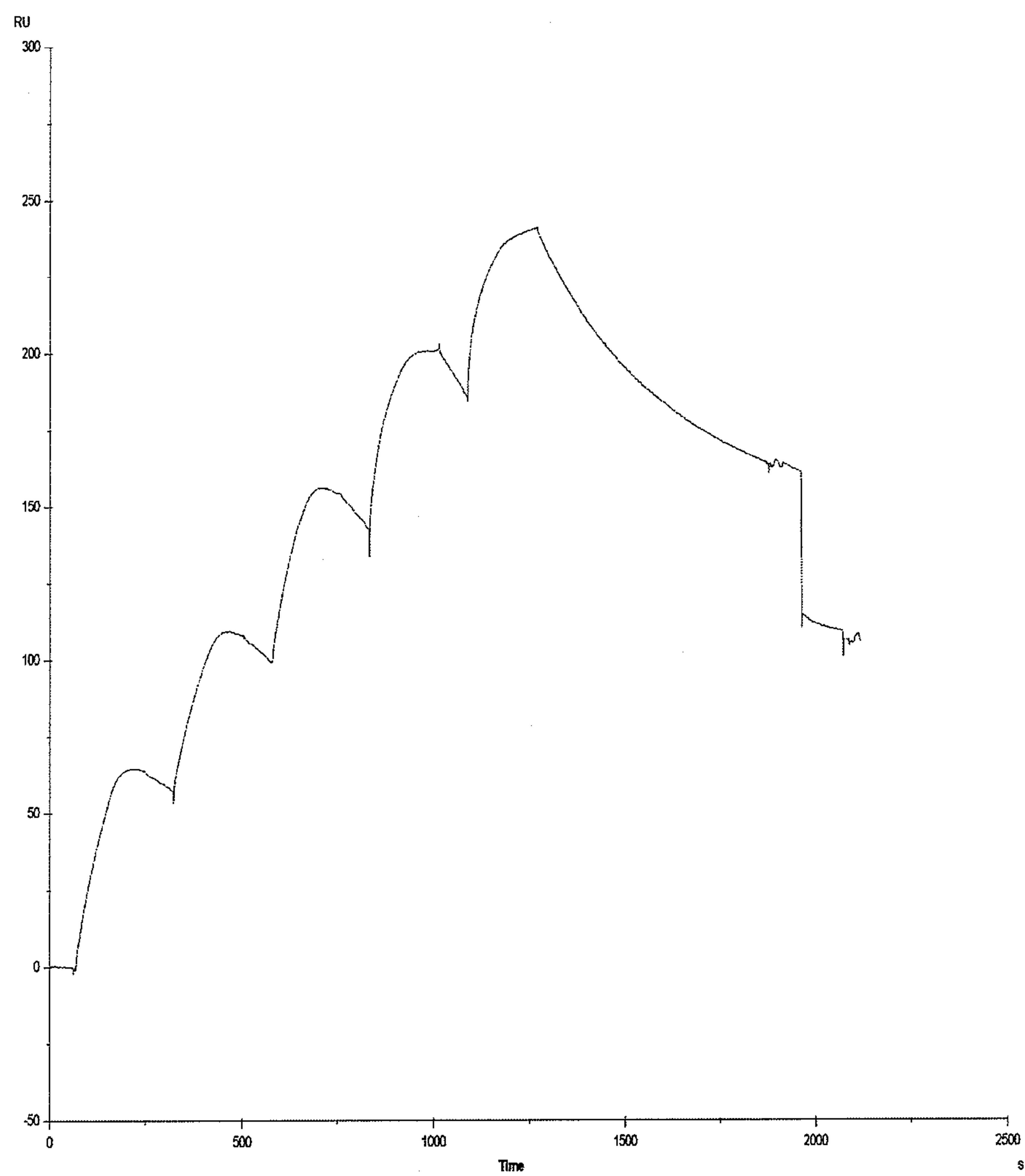
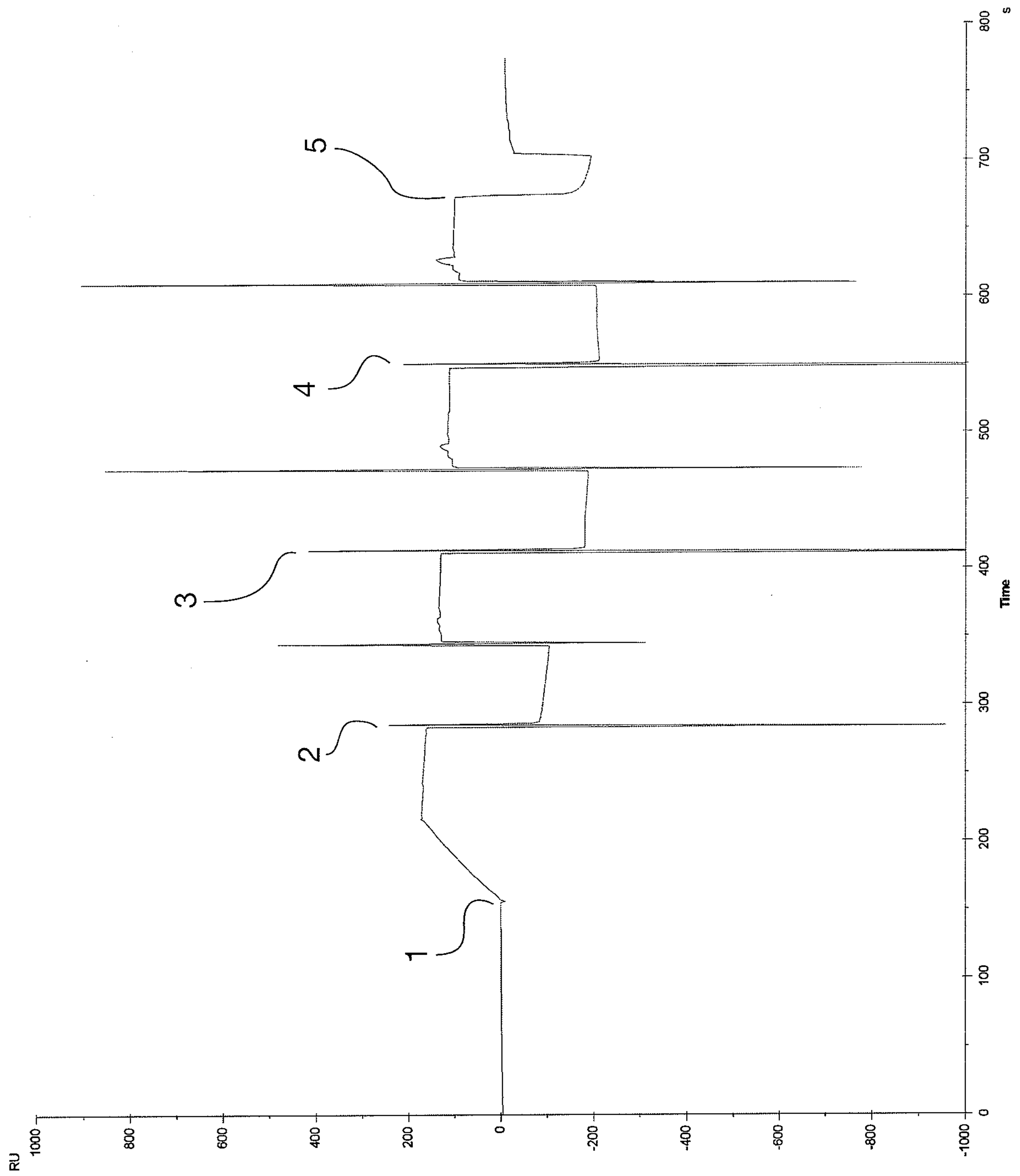


FIG. 20

21/26**FIG. 21**

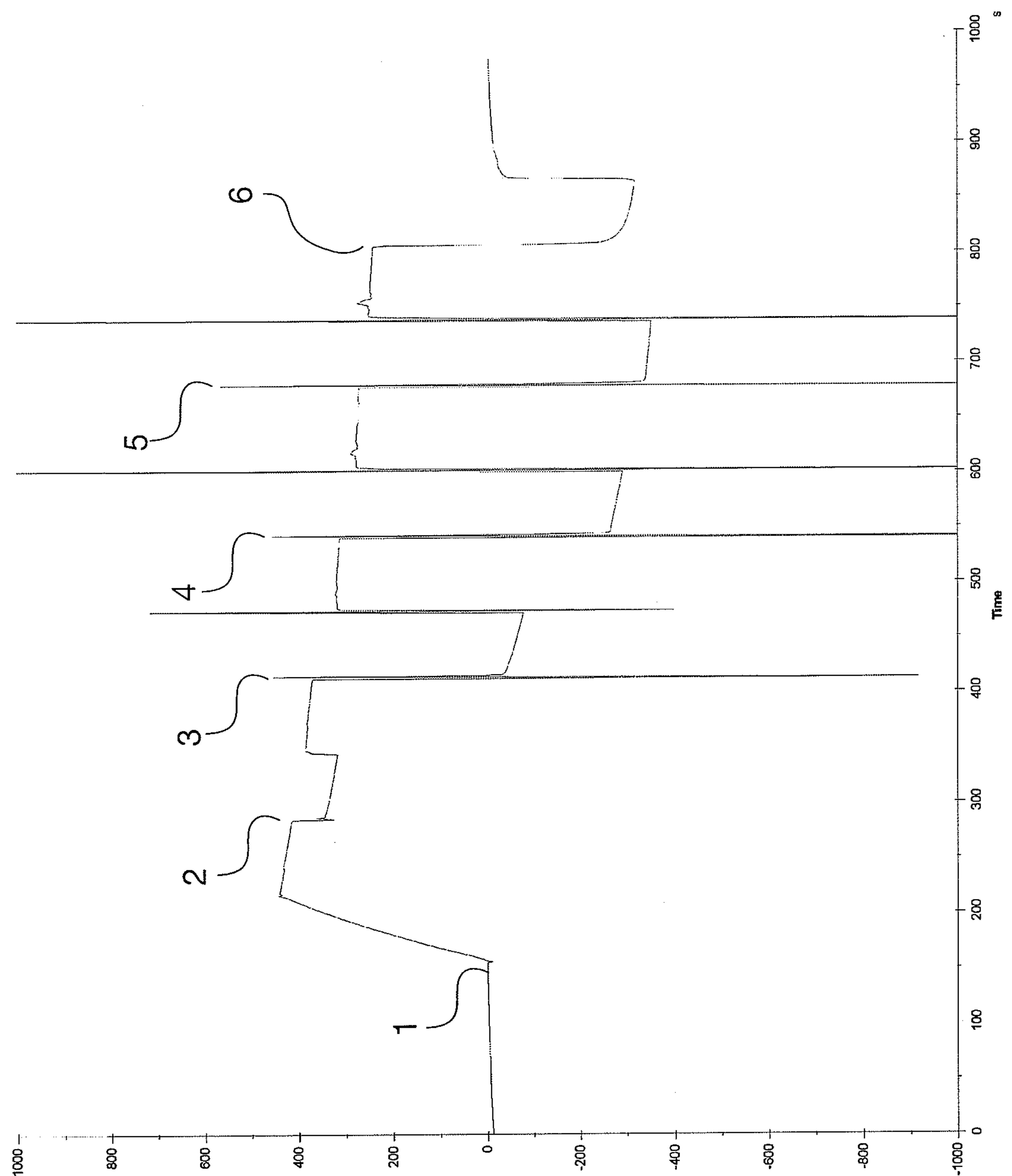
22/26

FIG. 22



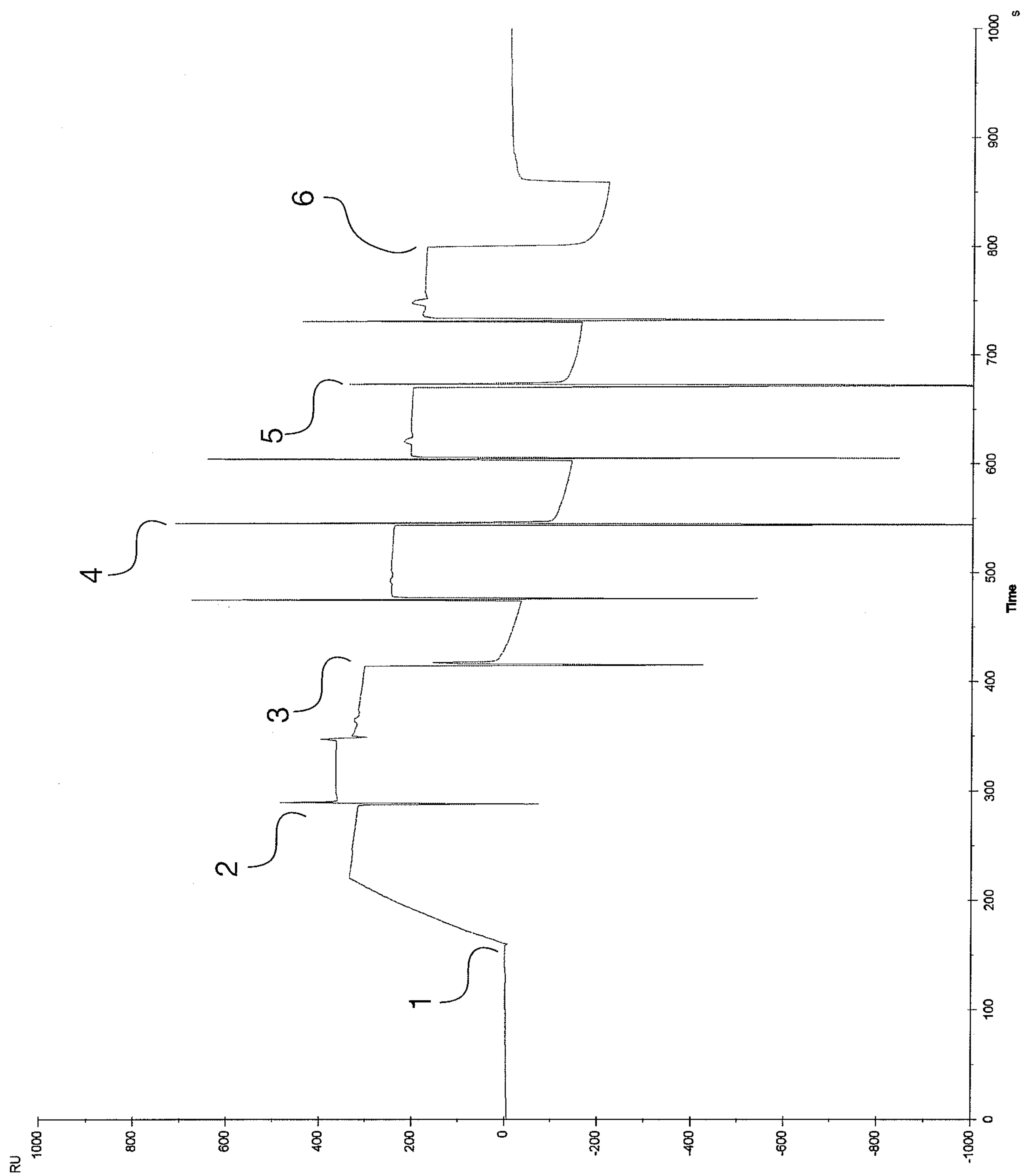
23/26

FIG. 23



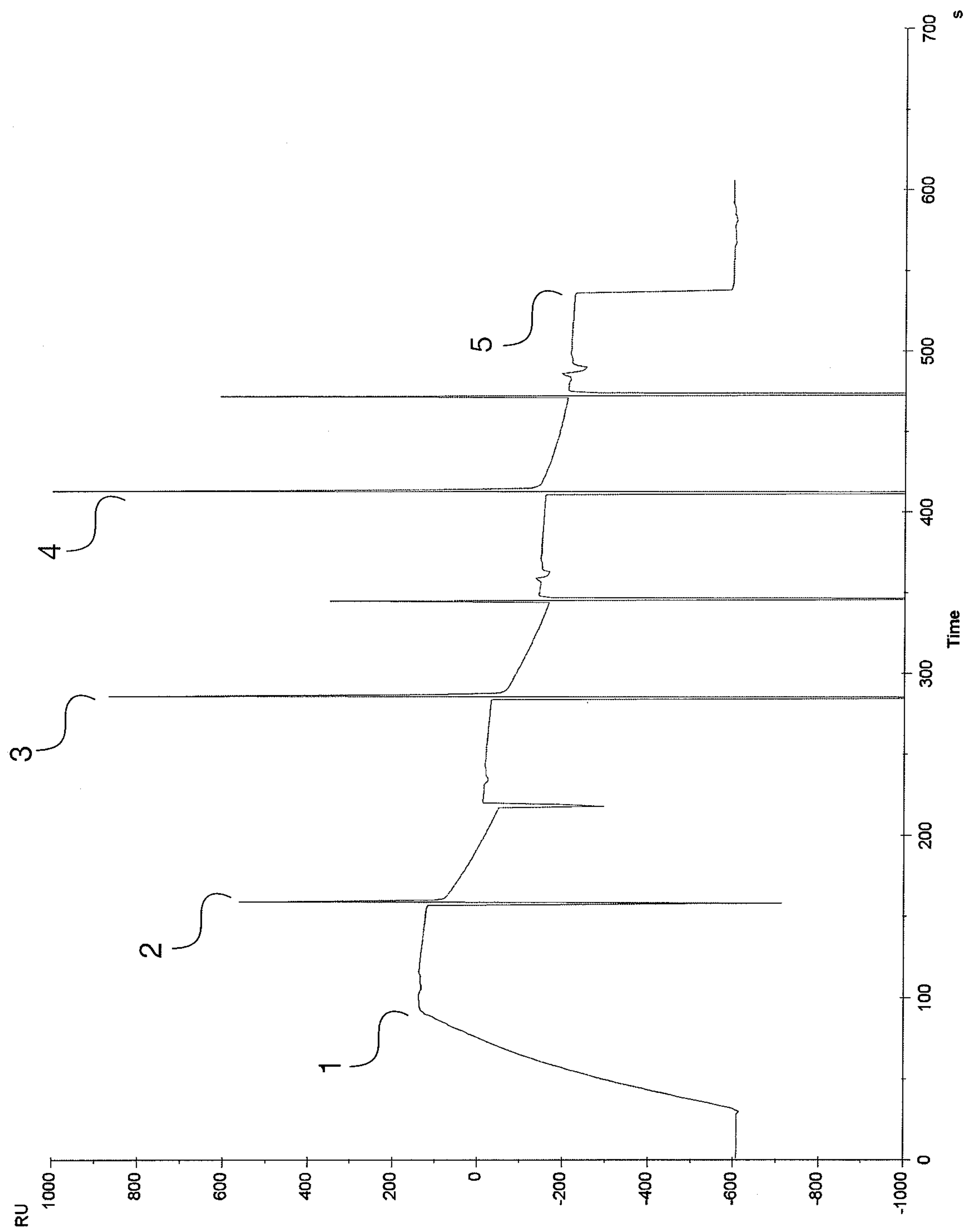
24/26

FIG. 24



25/26

FIG. 25



26/26

FIG. 26

