

(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
7 août 2014 (07.08.2014)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2014/118481 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C12N 9/64 (2006.01) C12N 15/12 (2006.01)
A61K 38/48 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2014/050191

(22) Date de dépôt international :
3 février 2014 (03.02.2014)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
13 50930 4 février 2013 (04.02.2013) FR

(71) Déposant : LABORATOIRE FRANCAIS DU FRAC-
TIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES
[FR/FR]; ZA de Courtaboeuf, 3 av des Tropiques, F-91940
Les Ulis (FR).

(72) Inventeur : PLANTIER, Jean-Luc; 17 rue Anatole
France, F-59170 Croix (FR).

(74) Mandataires : BERNARDI, Céline et al.; Cabinet Plasse-
raud, 52 rue de la Victoire, F-75440 Paris Cedex 09 (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, BN, 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, IR, IS, JP, KE, KG, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA,
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, RW, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, RS, SE, SI, SK, SM,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))
- avec la partie de la description réservée au listage des sé-
quences (règle 5.2.a))

(54) Title : FACTOR X MUTANTS

(54) Titre : MUTANTS DU FACTEUR X

(57) Abstract : The present invention concerns a protein comprising a mutated sequence of SEQ ID NO: 1, said mutated sequence of SEQ ID NO: 1 comprising at least one mutation A, A', B, C or C, in which: mutation A consists of substituting amino acids 43 to 52 of sequence SEQ ID NO: 1 with a sequence chosen from DFLAEGLTTPR, KATN*ATLSPPR and KATXATLSPPR, mutation A' consists of substituting amino acids 47 to 52 of sequence SEQ ID NO: 1 with a sequence chosen from TSKLTR, FNDFTTR, LSSMTR, PPSLTR and LSCGQR, mutation B consists of inserting a sequence chosen from DFLAEGLTTPR, KATN*ATLSPPR, KATXATLSPPR, TSKLTR, FNDFTTR, LSSMTR, PPSLTR and LSCGQR, between amino acids 52 and 53 of sequence SEQ ID NO: 1, mutation C consists of inserting a sequence chosen from DFLAEGLTTPR, KATN*ATLSPPR and KATXATLSPPR, between amino acids 52 and 53 of sequence SEQ ID NO: 1, and of deleting amino acids 4 to 13 from sequence SEQ ID NO: 1, mutation C consists of inserting a sequence chosen from TSKLTR, FNDFTTR, LSSMTR, PPSLTR and LSCGQR, between amino acids 52 and 53 of sequence SEQ ID NO: 1, and of deleting amino acids 4 to 9 from sequence SEQ ID NO: 1.

(57) Abrégé : La présente invention concerne une protéine comprenant une séquence mutée de SEQ ID NO : 1, ladite séquence mutée de SEQ ID NO : 1 comprenant au moins une mutation A, A', B, C ou C, dans laquelle : la mutation A consiste en la substitution des acides aminés 43 à 52 de la séquence SEQ ID NO : 1 par une séquence choisie parmi DFLAEGLTTPR, KATN*ATLSPPR et KATXATLSPPR, la mutation A' consiste en la substitution des acides aminés 47 à 52 de la séquence SEQ ID NO : 1 par une séquence choisie parmi TSKLTR, FNDFTTR, LSSMTR, PPSLTR et LSCGQR, la mutation B consiste en l'insertion d'une séquence choisie parmi DFLAEGLTTPR, KATN*ATLSPPR, KATXATLSPPR, TSKLTR, FNDFTTR, LSSMTR, PPSLTR et LSCGQR, entre les acides aminés 52 et 53 de la séquence SEQ ID NO : 1, la mutation C consiste en l'insertion d'une séquence choisie parmi DFLAEGLTTPR, KATN*ATLSPPR et KATXATLSPPR, entre les acides aminés 52 et 53 de la séquence SEQ ID NO : 1, et en la délétion des acides aminés 4 à 13 de la séquence SEQ ID NO : 1, la mutation C consiste en l'insertion d'une séquence choisie parmi TSKLTR, FNDFTTR, LSSMTR, PPSLTR et LSCGQR, entre les acides aminés 52 et 53 de la séquence SEQ ID NO : 1, et en la délétion des acides aminés 4 à 9 de la séquence SEQ ID NO : 1.

WO 2014/118481 A1

Mutants du facteur X

La présente invention concerne des mutants du facteur X, et leur utilisation pour le traitement des troubles de la coagulation sanguine.

5

Le facteur X est une protéine présente dans le sang. Cette protéine joue un rôle important dans la cascade de la coagulation. La coagulation du sang est un processus complexe qui permet d'éviter l'écoulement du sang par les vaisseaux endommagés. Aussitôt qu'un vaisseau est brisé, les éléments responsables de la coagulation interagissent entre eux pour former un bouchon, le clou plaquettaire, à l'endroit où le vaisseau est brisé. Les facteurs de la coagulation sont requis pour tenir le clou plaquettaire en place et stabiliser le caillot.

10

La formation d'un caillot normal s'effectue en quatre étapes :

15 **Étape 1** Le vaisseau sanguin est endommagé.

Étape 2 Le vaisseau sanguin se contracte de façon à restreindre l'apport de sang vers la zone lésée.

20

Étape 3 Les plaquettes adhèrent à l'espace sous-endothélial exposé lors de la lésion du vaisseau ainsi qu'aux parois des vaisseaux sanguins stimulées. Les plaquettes s'étalent, c'est ce que l'on appelle « l'adhésion plaquettaire ». Ces plaquettes étalées libèrent des substances qui activent d'autres plaquettes avoisinantes de sorte qu'elles s'agglomèrent au siège de la lésion afin de former le clou plaquettaire. C'est ce que l'on appelle « l'agrégation plaquettaire ».

25

Étape 4 La surface des plaquettes activées constitue ainsi une surface sur laquelle la coagulation du sang peut s'effectuer. Les protéines de la coagulation qui circulent dans le sang (dont le facteur X) sont activées à la surface des plaquettes et forment un caillot de fibrine.

30

Ces protéines de la coagulation (c'est-à-dire, les facteurs I, II, V, VIII, IX, X, XI, XII et XIII, ainsi que le facteur de Von Willebrand) fonctionnent en une réaction en chaîne, *i.e.* la cascade de la coagulation.

Le facteur X sous forme activée (Xa) intervient plus particulièrement dans l'activation de la prothrombine (facteur II) en thrombine (facteur IIa), notamment lorsqu'il est complexé avec le co-facteur V activé pour former le complexe prothrombinase. Ce facteur est un élément essentiel dans la cascade de la coagulation.

5

Lorsque ce facteur fait défaut, des saignements se manifestent, comme une épistaxis (saignements de nez), une hémarthrose (épanchement de sang dans une cavité articulaire) ou des saignements gastro-intestinaux. La déficience en facteur X est extrêmement rare. Sa transmission est autosomique récessive, et sa prévalence est de 1/1

10 000 000.

L'activation du FX intervient :

- soit très précocement lors de l'étape d'initiation de la cascade de la coagulation par le complexe facteur VIIa/facteur tissulaire, dans une réaction peu efficace qui conduit à la formation de trace de thrombine ;

- soit lors de l'étape d'amplification de la cascade de la coagulation issue d'un rétrocontrôle positif effectué par les traces de thrombine conduisant à l'activation des facteurs VIII et IX.

Ces deux derniers facteurs sont manquants chez les hémophiles A et B, causant ainsi un trouble hémorragique qui peut être fatal sans traitement. L'absence de ces facteurs ne permet pas de générer des quantités suffisantes de facteur X activé, pour juguler l'hémorragie.

Ainsi il existe un besoin pour un facteur X modifié pouvant être activé par la thrombine, qui permettrait d'avoir une coagulation efficace en absence de facteur VIII et/ou de facteur IX, par l'utilisation directe des traces de thrombine générées lors de l'initiation de la coagulation.

Les inventeurs ont identifié des mutants spécifiques du facteur X (appelés également facteurs X variants), qui sont efficacement activés par la thrombine, permettant ainsi de restaurer la coagulation en absence de facteur VIII, de facteur IX et même de facteur X. En effet, comme démontré en exemples, ces mutants du facteur X peuvent être activés

30

par la thrombine, et permettent une coagulation efficace, et ce, même en absence de facteur VIII et/ou de facteur IX et/ou de facteur X endogène.

Les sites de clivage du peptide d'activation générés dans ces facteurs X variants peuvent aussi être la cible d'autres protéases de la coagulation, telles que le facteur VIIa, le
5 facteur IXa, le facteur Xa, le facteur XIa, le facteur XIIa ou la kallikréine.

Par ailleurs, une modification du peptide d'activation du facteur X peut conduire à une modification additionnelle de ses propriétés pharmacologiques, différentes de la seule reconnaissance par la thrombine. Cette modification peut conférer au facteur X variant
10 une amélioration de l'activité spécifique, de la stabilité, ou de la résistance aux protéases, ou encore une augmentation de la pharmacocinétique. En outre, la présence de glycosylations et phosphorylations additionnelles, ou au contraire l'absence de ces modifications par rapport à la molécule de type sauvage, pourront être causées par les modifications introduites dans le peptide d'activation.

15

La présente invention concerne donc une protéine comprenant une séquence mutée de SEQ ID NO :1, ladite séquence mutée de SEQ ID NO :1 comprenant au moins une mutation A, A', B, C ou C', dans laquelle :

la mutation A consiste en la substitution des acides aminés 43 à 52 de la séquence SEQ
20 ID NO :1 par une séquence choisie parmi DFLAEGLTTPR, KATN*ATLSPR et KATXATLSPR,

la mutation A' consiste en la substitution des acides aminés 47 à 52 de la séquence SEQ ID NO :1 par une séquence choisie parmi TSKLTR, FNDFTTR, LSSMTR, PPSLTR et LSCGQR,

25 la mutation B consiste en l'insertion d'une séquence choisie parmi DFLAEGLTTPR, KATN*ATLSPR, KATXATLSPR, TSKLTR, FNDFTTR, LSSMTR, PPSLTR et LSCGQR, entre les acides aminés 52 et 53 de la séquence SEQ ID NO :1,

la mutation C consiste en l'insertion d'une séquence choisie parmi DFLAEGLTTPR, KATN*ATLSPR et KATXATLSPR, entre les acides aminés 52 et 53 de la
30 SEQ ID NO :1, et en la délétion des acides aminés 4 à 13 de la séquence SEQ ID NO :1, la mutation C' consiste en l'insertion d'une séquence choisie parmi TSKLTR, FNDFTTR, LSSMTR, PPSLTR et LSCGQR, entre les acides aminés 52 et 53 de la

séquence SEQ ID NO :1, et en la délétion des acides aminés 4 à 9 de la séquence SEQ ID NO :1,

où N* est une asparagine éventuellement glycosylée.

- 5 Un autre objet de l'invention est un polynucléotide codant pour ladite protéine.
Un autre objet de l'invention est un vecteur d'expression comprenant ledit polynucléotide.
Un autre objet de l'invention est une cellule hôte comprenant ledit vecteur d'expression ou ledit polynucléotide.
- 10 Un autre objet de l'invention est l'utilisation de ladite protéine comme médicament. En particulier, ladite protéine peut être utilisée pour le traitement des troubles de la coagulation sanguine, notamment les troubles hémorragiques, tels que les hémophilies A, B et C (déficit en facteur XI), les déficits en facteur X voire des besoins en coagulation d'urgence pour se substituer au Facteur VIIa. Lorsqu'une réponse
- 15 procoagulante puissante et rapide est requise, ladite protéine peut être utilisée en combinaison avec d'autres molécules hémostatiques, telles que le facteur VIIa et/ou le fibrinogène, voire en association avec des composés procoagulants (transfusion de plaquettes, mélange procoagulant comme FEIBA, Kaskadil, Kanokad etc), qui pourront renforcer l'efficacité du traitement.
- 20
- Tel qu'il est utilisé ici, les termes «protéine» et «polypeptide» sont utilisés ici de manière interchangeable et se réfèrent à une séquence d'acides aminés ayant plus de 100 acides aminés. Tel qu'utilisé ici, le terme "protéine" comprend des séquences d'acides aminés ayant entre 100 et 1000 acides aminés, de préférence entre 120 et 500 acides
- 25 aminés.

La présente invention se rapporte à une protéine comprenant une séquence mutée de SEQ ID NO :1, ladite séquence mutée de SEQ ID NO :1 comprenant au moins une mutation A, A', B, C ou C', dans laquelle :

- 30 la mutation A consiste en la substitution des acides aminés 43 à 52 de la séquence SEQ ID NO :1 par une séquence choisie parmi DFLAEGLTTPR, KATN*ATLSPR et KATXATLSPR,

la mutation A' consiste en la substitution des acides aminés 47 à 52 de la séquence SEQ ID NO :1 par une séquence choisie parmi TSKLTR, FNDFTR, LSSMTR, PPSLTR et LSCGQR,

la mutation B consiste en l'insertion d'une séquence choisie parmi DFLAEGLTTPR,
5 KATN*ATLSPR, KATXATLSPR, TSKLTR, FNDFTR, LSSMTR, PPSLTR et LSCGQR, entre les acides aminés 52 et 53 de la séquence SEQ ID NO :1,

la mutation C consiste en l'insertion d'une séquence choisie parmi DFLAEGLTTPR, KATN*ATLSPR et KATXATLSPR, entre les acides aminés 52 et 53 de la séquence SEQ ID NO :1, et en la délétion des acides aminés 4 à 13 de la séquence SEQ ID NO :1,

10 la mutation C' consiste en l'insertion d'une séquence choisie parmi TSKLTR, FNDFTR, LSSMTR, PPSLTR et LSCGQR, entre les acides aminés 52 et 53 de la séquence SEQ ID NO :1, et en la délétion des acides aminés 4 à 9 de la séquence SEQ ID NO :1,

où N* est une asparagine éventuellement glycosylée.

15 De préférence, ladite protéine comprend, de préférence consiste en, la séquence SEQ ID NO :7, avec au moins une mutation A, A', B, C ou C' telle que décrite ci-avant.

La séquence SEQ ID NO :7 (500 acides aminés) comprend toute la séquence SEQ ID NO :1 (306 acides aminés). Plus particulièrement, la séquence SEQ ID NO :7 comprend, dans le sens N- à C-terminal, un peptide signal et un propeptide (40 acides
20 aminés au total), la séquence SEQ ID NO :5, la séquence SEQ ID NO :1, puis un tag (des acides aminés en position 489 à 500, soit une longueur de 12 acides aminés), i.e. le tag HPC4. La séquence SEQ ID NO : 103 correspond à la séquence SEQ ID NO :7 sans peptide signal et sans propeptide.

25 Ladite protéine selon l'invention est un facteur X muté qui est efficace dans le traitement de troubles de la coagulation.

Le facteur X, appelé également facteur de Stuart-Prower, est codé par le gène F10 et se réfère à la sérine protéase EC3.4.21.6. Le facteur X est composé d'une chaîne lourde,
30 de 306 acides aminés, et d'une chaîne légère, de 139 acides aminés.

Le facteur X est une protéine de 488 acides aminés, constitué d'un peptide signal, d'un propeptide, et des chaînes légère et lourde.

Le facteur X humain peut être trouvé dans UniProtKB sous le numéro d'accension P00742. Sa structure native est illustrée en figure 1.

La protéine est traduite sous forme de prépropeptide. Après clivage du peptide signal, le propeptide est finalement coupé, résultant en une chaîne légère et une chaîne lourde (respectivement de 142 et 306 acides aminés) (zymogène). Suite au déclenchement de la coagulation, la chaîne lourde est finalement activée par clivage du peptide d'activation, pour ne contenir que 254 acides aminés aminés (les 52 premiers acides aminés sont clivés lors du traitement): c'est la chaîne lourde du facteur Xa (SEQ ID NO :6).

Le prépropeptide de facteur X humain correspond à SEQ ID NO: 4. La chaîne lourde correspond à SEQ ID NO: 1, et la chaîne légère correspond à SEQ ID NO: 5. le peptide d'activation de la chaîne lourde correspond à SEQ ID NO :3, et comprend 52 acides aminés.

SEQ ID NO: 2 est identique aux acides aminés 1 à 182 de SEQ ID NO: 4.

SEQ ID NO: 1 est identique aux acides aminés 183 à 488 de SEQ ID NO: 4.

La chaîne lourde du facteur Xa (SEQ ID NO :6) correspond à la SEQ ID NO :1, dans laquelle le peptide SEQ ID NO :3 a été clivé.

Les protéines selon l'invention comprennent des protéines de facteur X mutées, sous forme de zymogène, comprenant, en fonction des constructions, un peptide d'activation :

-modifié par substitution d'un nombre identique de résidus au même site compris au plus large entre les résidus 42 et 52 ; ou

-ayant reçu une insertion de résidus entre les résidus 52 et 53 ; ou

-ayant reçu une insertion de résidus au plus large entre les résidus 52 et 53 couplée à une délétion d'un nombre identique de résidus au plus large entre les résidus 4 et 13.

La protéine selon l'invention peut être une protéine comprenant une séquence mutée de SEQ ID NO :1, ladite séquence mutée de SEQ ID NO :1 comprenant au moins une mutation A, dans laquelle la mutation A consiste en la substitution des acides aminés 43 à 52 de la séquence SEQ ID NO :1 par une séquence choisie parmi DFLAEGLTTPR, KATN*ATLSPR et KATXATLSPR, où N* est une asparagine éventuellement

glycosylée. De préférence, la protéine comprend la séquence SEQ ID NO :7 avec au moins une mutation A.

De préférence encore, dans ce cas, la protéine mutée comprend une séquence choisie parmi SEQ ID NO :9, SEQ ID NO :10 et SEQ ID NO :11.

5

La protéine selon l'invention peut être une protéine comprenant une séquence mutée de SEQ ID NO :1, ladite séquence mutée de SEQ ID NO :1 comprenant au moins une mutation A', dans laquelle la mutation A' consiste en la substitution des acides aminés 47 à 52 de la séquence SEQ ID NO :1 par une séquence choisie parmi TSKLTR, FNDFTR, LSSMTR, PPSLTR et LSCGQR. De préférence, la protéine comprend la

10

séquence SEQ ID NO :7 avec au moins une mutation A'.

De préférence encore, dans ce cas, la protéine mutée comprend une séquence choisie parmi SEQ ID NO :12, SEQ ID NO :13, SEQ ID NO :14, SEQ ID NO :15 et SEQ ID NO :16.

15

La protéine selon l'invention peut être une protéine comprenant une séquence mutée de SEQ ID NO :1, ladite séquence mutée de SEQ ID NO :1 comprenant au moins une mutation B, dans laquelle la mutation B consiste en l'insertion d'une séquence choisie parmi DFLAEGLTTPR, KATN*ATLSPPR, KATXATLSPPR, TSKLTR, FNDFTR, LSSMTR, PPSLTR et LSCGQR, entre les acides aminés 52 et 53 de la séquence SEQ ID NO :1, où N* est une asparagine éventuellement glycosylée. De préférence, la protéine comprend la séquence SEQ ID NO :7 avec au moins une mutation B.

20

De préférence encore, dans ce cas, la protéine mutée comprend une séquence choisie parmi SEQ ID NO :18, SEQ ID NO :19, SEQ ID NO :20, SEQ ID NO :21, SEQ ID NO :22, SEQ ID NO :23, SEQ ID NO :24 et SEQ ID NO :25.

25

La protéine selon l'invention peut être une protéine comprenant une séquence mutée de SEQ ID NO :1, ladite séquence mutée de SEQ ID NO :1 comprenant au moins une mutation C, dans laquelle la mutation C consiste en l'insertion d'une séquence choisie parmi DFLAEGLTTPR, KATN*ATLSPPR et KATXATLSPPR, entre les acides aminés 52 et 53 de la séquence SEQ ID NO :1, et en la délétion des acides aminés 4 à 13 de la séquence SEQ ID NO :1, où N* est une asparagine éventuellement glycosylée. De

30

préférence, la protéine comprend la séquence SEQ ID NO :7 avec au moins une mutation C.

De préférence encore, dans ce cas, la protéine mutée comprend une séquence choisie parmi SEQ ID NO :27, SEQ ID NO :28 et SEQ ID NO :29.

5

La protéine selon l'invention peut être une protéine comprenant une séquence mutée de SEQ ID NO :1, ladite séquence mutée de SEQ ID NO :1 comprenant au moins une mutation C', dans laquelle la mutation C' consiste en l'insertion d'une séquence choisie parmi TSKLTR, FNDFTR, LSSMTR, PPSLTR et LSCGQR, entre les acides aminés 52 et 53 de la séquence SEQ ID NO :1, et en la délétion des acides aminés 4 à 9 de la séquence SEQ ID NO :1. De préférence, la protéine comprend la séquence SEQ ID NO :7 avec au moins une mutation C'.

10

De préférence encore, dans ce cas, la protéine mutée comprend une séquence choisie parmi SEQ ID NO :30, SEQ ID NO :31, SEQ ID NO :32, SEQ ID NO :33 et SEQ ID NO :34.

15

De préférence, la protéine selon l'invention comprend, de préférence consiste en, une séquence choisie parmi SEQ ID NO : 9 à 16, 18 à 25, 27 à 34, 105 à 112, 114 à 121 et 123 à 130.

20

Les séquences décrites dans la présente demande peuvent être résumées comme suit:

SEQ ID NO :	Protéine
1	Chaîne lourde de facteur X humain (306 acides aminés), comprenant le peptide d'activation
2	Peptide signal, propeptide, et chaîne légère de facteur X humain (182 acides aminés)
3	Peptide d'activation de la chaîne lourde (52 acides aminés)
4	Prépropeptide de facteur X humain (488 acides aminés)
5	Chaîne légère de facteur X humain (142 acides aminés)
6	Chaîne lourde du Facteur X humain activé (FXa) (254

	acides aminés)
7	FX-WT (correspond à un FX humain dont la séquence nucléotidique a été optimisée)
8	FX-control+ (mutant de SEQ ID NO :7 comprenant la substitution de 10 acides aminés par une séquence correspondant au site de reconnaissance de la thrombine sur le fibrinogène = fibrinopeptide A) (comparatif)
9	FX-IIa (mutant de SEQ ID NO :7 comprenant une mutation A : insertion du site consensus de clivage de la thrombine)
10	FX-PAR1 (mutant de SEQ ID NO :7 comprenant une mutation A : insertion du site modifié de clivage de la thrombine sur le récepteur PAR1)
11	FX-PAR1M (mutant de SEQ ID NO :7 comprenant une mutation A : insertion du site modifié de clivage de la thrombine sur le récepteur PAR1 sans site de glycosylation)
12	FX-FXIa1 (mutant de SEQ ID NO :7 comprenant une mutation A' : insertion du site de clivage 1 du FXIa sur le FIX)
13	FX-FXIa2 (mutant de SEQ ID NO :7 comprenant une mutation A' : insertion du site de clivage 2 du FXIa sur le FIX)
14	FX-Kal1 (mutant de SEQ ID NO :7 comprenant une mutation A' : insertion du site de clivage 1 de la kallikréine sur le FXII)
15	FX-Kal2 (mutant de SEQ ID NO :7 comprenant une mutation A' : insertion du site de clivage 2 de la kallikréine sur le FXII)
16	FX-Kal3 (mutant de SEQ ID NO :7 comprenant une mutation A' : insertion du site de clivage 3 de la kallikréine sur le FXII)

17	FX-control+ (mutant de SEQ ID NO :7 comprenant l'insertion d'une séquence correspondant au site de reconnaissance de la thrombine sur le fibrinogène = fibrinopeptide A) (comparatif)
18	FX-IIa (mutant de SEQ ID NO :7 comprenant une mutation B : insertion du site consensus de clivage de la thrombine)
19	FX-PAR1 (mutant de SEQ ID NO :7 comprenant une mutation B : insertion du site modifié de clivage de la thrombine sur le récepteur PAR1)
20	FX-PAR1M (mutant de SEQ ID NO :7 comprenant une mutation B : insertion du site modifié de clivage de la thrombine sur le récepteur PAR1 sans site de glycosylation)
21	FX-FXIa1 (mutant de SEQ ID NO :7 comprenant une mutation B : insertion du site de clivage 1 du FXIa sur le FIX)
22	FX-FXIa2 (mutant de SEQ ID NO :7 comprenant une mutation B : insertion du site de clivage 2 du FXIa sur le FIX)
23	FX-Kal1 (mutant de SEQ ID NO :7 comprenant une mutation B : insertion du site de clivage 1 de la kallikréine sur le FXII)
24	FX-Kal2 (mutant de SEQ ID NO :7 comprenant une mutation B : insertion du site de clivage 2 de la kallikréine sur le FXII)
25	FX-Kal3 (mutant de SEQ ID NO :7 comprenant une mutation B : insertion du site de clivage 3 de la kallikréine sur le FXII)
26	FX-control+ (mutant de SEQ ID NO :7 comprenant l'insertion d'une séquence correspondant au site de reconnaissance de la thrombine sur le fibrinogène =

	fibrinopeptide A, et la délétion de 10 acides aminés) (comparatif)
27	FX-IIa (mutant de SEQ ID NO :7 comprenant une mutation C : insertion du site consensus de clivage de la thrombine)
28	FX-PAR1 (mutant de SEQ ID NO :7 comprenant une mutation C : insertion du site modifié de clivage de la thrombine sur le récepteur PAR1)
29	FX-PAR1M (mutant de SEQ ID NO :7 comprenant une mutation C : insertion du site modifié de clivage de la thrombine sur le récepteur PAR1 sans site de glycosylation)
30	FX-FXIa1 (mutant de SEQ ID NO :7 comprenant une mutation C' : insertion du site de clivage 1 du FXIa sur le FIX)
31	FX-FXIa2 (mutant de SEQ ID NO :7 comprenant une mutation C' : insertion du site de clivage 2 du FXIa sur le FIX)
32	FX-Kal1 (mutant de SEQ ID NO :7 comprenant une mutation C' : insertion du site de clivage 1 de la kallikréine sur le FXII)
33	FX-Kal2 (mutant de SEQ ID NO :7 comprenant une mutation C' : insertion du site de clivage 2 de la kallikréine sur le FXII)
34	FX-Kal3 (mutant de SEQ ID NO :7 comprenant une mutation C' : insertion du site de clivage 3 de la kallikréine sur le FXII)
35	Séquence nucléique codant pour FX-WT (SEQ ID NO :7)
36 à 75	Amorces
76 à 102	Séquences nucléiques codant respectivement pour les protéines SEQ ID NO :8 à 34
103 à 130	Séquences protéiques correspondant respectivement aux

	protéines SEQ ID NO :7 à 34 sans peptide signal et sans propeptide
131 à 158	Séquences nucléiques codant respectivement pour les protéines SEQ ID NO :103 à 130

La présente invention a également pour objet un complexe protéique comprenant :

- une protéine comprenant une séquence mutée de SEQ ID NO :1 selon l'invention, et
 - 5 - au moins une protéine de séquence SEQ ID NO :2,
- lesdites protéines étant liées entre elles par un pont disulfure.

Un autre objet de l'invention est un acide nucléique (polynucléotide) codant pour ladite protéine. De préférence, l'acide nucléique est choisi parmi les séquences SEQ ID
10 NO :77 à 84, 86 à 93, 95 à 102, 133 à 140, 142 à 149 et 151 à 158.

Un autre objet de l'invention est un vecteur d'expression comprenant ledit polynucléotide codant pour ladite protéine, ou une cassette d'expression comprenant ledit polynucléotide. Selon l'invention, les vecteurs d'expression appropriés pour une
15 utilisation selon l'invention peuvent comprendre au moins un élément de contrôle d'expression fonctionnellement lié à la séquence d'acide nucléique. Les éléments de contrôle d'expression sont insérés dans le vecteur et permettent de réguler l'expression de la séquence d'acide nucléique. Des exemples d'éléments de contrôle d'expression incluent notamment des systèmes lac, le promoteur du phage lambda, les promoteurs de
20 levure ou les promoteurs viraux. D'autres éléments opérationnels peuvent être incorporés, comme une séquence de tête, des codons de terminaison, des signaux de polyadénylation et des séquences nécessaires pour la transcription et la traduction ultérieure de la séquence d'acide nucléique dans le système hôte. Il sera compris par l'homme de l'art que la combinaison correcte des éléments de contrôle d'expression
25 dépend du système hôte choisi. Il sera également entendu que le vecteur d'expression doit contenir les éléments supplémentaires nécessaires pour le transfert et la répllication ultérieure du vecteur d'expression contenant la séquence d'acide nucléique dans le système hôte.

De tels vecteurs sont facilement construits en utilisant des méthodes conventionnelles ou disponibles dans le commerce.

Un autre objet de l'invention est une cellule recombinante comprenant un vecteur d'expression tel que décrit ci-dessus, ou un polynucléotide tel que décrit ci-dessus. Selon l'invention, des exemples de cellules hôtes qui peuvent être utilisées sont des cellules eucaryotes, comme les cellules animales, végétales, d'insectes et de levure ; et des cellules procaryotes, comme E. coli. Les moyens par lesquels le vecteur portant le gène peut être introduit dans les cellules comprennent notamment la microinjection, l'électroporation, la transduction ou la transfection à l'aide de DEAE-dextran, la lipofection, le phosphate de calcium ou d'autres procédures connues de l'homme de l'art. Dans un mode de réalisation préféré, les vecteurs d'expression eucaryotes qui fonctionnent dans les cellules eucaryotes sont utilisés. Des exemples de tels vecteurs comprennent les vecteurs viraux tels que les rétrovirus, adénovirus, virus de l'herpès, virus de la vaccine, virus de la variole, le poliovirus, lentivirus, les vecteurs d'expression bactériens ou des plasmides tels que pcDNA5. Les lignées cellulaires eucaryotes préférées comprennent les cellules COS, les cellules CHO, les cellules HEK, les cellules BHK, les cellules PerC6, les cellules HeLa, les cellules NIH/3T3, 293 (ATCC # CRL1573), des cellules T2, les cellules dendritiques ou les monocytes.

20

La protéine selon l'invention peut être produite dans le lait d'animaux transgéniques.

Dans ce cas, selon un premier aspect, l'expression d'une séquence d'ADN contenant un gène codant pour la protéine selon l'invention est contrôlée par un promoteur de caséine de mammifère ou un promoteur de lactosérum de mammifère, ledit promoteur ne contrôlant pas naturellement la transcription dudit gène, et la séquence d'ADN contenant en outre une séquence de sécrétion de la protéine. La séquence de sécrétion comprend un signal de sécrétion interposé entre le gène et le promoteur.

L'animal transgénique utilisé est capable non seulement de produire la protéine désirée, mais également de transmettre cette capacité à sa descendance. La sécrétion de la protéine dans le lait facilite la purification et évite l'utilisation de produits sanguins. L'animal peut ainsi être choisi parmi la chèvre, la lapine, la brebis ou la vache.

30

La protéine selon l'invention peut être utilisée en tant que médicament. Par conséquent, la protéine selon l'invention peut être introduite dans une composition pharmaceutique. En particulier, la protéine selon l'invention peut être utilisée pour le traitement des troubles de la coagulation, notamment des troubles hémorragiques.

5

La composition pharmaceutique de l'invention peut être combinée avec des excipients pharmaceutiquement acceptables, et éventuellement des matrices à libération prolongée, comme des polymères biodégradables, pour former une composition thérapeutique.

La composition pharmaceutique de la présente invention peut être administrée par voie
10 orale, sublinguale, sous-cutanée, intramusculaire, intraveineuse, intra-artérielle, intrathécale, intra-oculaire, intra-cérébrale, transdermique, locale ou rectale. Le principe actif, seul ou en association avec un autre principe actif, peut alors être administré sous forme unitaire d'administration, en mélange avec des supports pharmaceutiques classiques. Des formes unitaires d'administration comprennent les formes par voie orale
15 telles que les comprimés, les gélules, les poudres, les granules et les solutions ou suspensions orales, les formes d'administration sublinguale et buccale, les aérosols, les implants sous-cutanés, transdermique, topique, intrapéritonéale, intramusculaire, intraveineuse, sous-cutanée, intrathécale, les formes d'administration par voie intranasale et les formes d'administration rectale.

20 De préférence, la composition pharmaceutique contient un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation susceptible d'être injectée. Il peut s'agir en particulier de formules isotoniques, stériles, de solutions salines (avec phosphate monosodique ou disodique, chlorure de sodium, de potassium, de calcium ou de magnésium et analogues, ou des mélanges de tels sels), ou de compositions
25 lyophilisées, qui, lors de l'addition d'eau stérilisée ou de sérum physiologique selon les cas, permettent la constitution de solutés injectables.

Les formes pharmaceutiques appropriées pour une utilisation injectable comprennent des solutions aqueuses stériles ou des dispersions, des formulations huileuses, y compris l'huile de sésame, l'huile d'arachide, et des poudres stériles pour la préparation
30 extemporanée de solutions injectables stériles ou de dispersions. Dans tous les cas, la forme doit être stérile et doit être fluide dans la mesure où elle doit être injectée par seringue. Elle doit être stable dans les conditions de fabrication et de stockage et doit

être préservée contre l'action contaminante de micro-organismes, comme les bactéries et les champignons.

Les dispersions selon l'invention peuvent être préparées dans du glycérol, des polyéthylèneglycols liquides ou leurs mélanges, ou dans des huiles. Dans des conditions
5 normales de stockage et d'utilisation, ces préparations contiennent un conservateur pour empêcher la croissance des micro-organismes.

Le véhicule pharmaceutiquement acceptable peut être un solvant ou milieu de dispersion contenant, par exemple, l'eau, l'éthanol, un polyol (par exemple, la glycérine, le propylène glycol, le polyéthylène glycol, et analogues), des mélanges appropriés de
10 ceux-ci, et/ou les huiles végétales. La fluidité convenable peut être maintenue, par exemple, par l'utilisation d'un tensioactif, tel que la lécithine. La prévention de l'action de micro-organismes peut être provoquée par divers agents antibactériens et antifongiques, par exemple, des parabènes, le chlorobutanol, le phénol, l'acide sorbique ou encore le thimérosal. Dans de nombreux cas, il sera préférable d'inclure des agents
15 isotoniques, par exemple, des sucres ou du chlorure de sodium. L'absorption prolongée des compositions injectables peut être provoquée par l'utilisation dans les compositions d'agents retardant l'absorption, par exemple, le monostéarate d'aluminium ou la gélatine. Les solutions injectables stériles sont préparées en incorporant les substances actives en quantité requise dans le solvant approprié avec plusieurs des autres ingrédients
20 énumérés ci-dessus, le cas échéant, suivie d'une stérilisation par filtration. En règle générale, les dispersions sont préparées en incorporant les divers ingrédients actifs stérilisés dans un véhicule stérile qui contient le milieu de dispersion basique et les autres ingrédients requis parmi ceux énumérés ci-dessus. Dans le cas de poudres stériles pour la préparation de solutions injectables stériles, les procédés de préparation préférés
25 sont le séchage sous vide et la lyophilisation. Lors de la formulation, les solutions seront administrées d'une manière compatible avec la formulation posologique et en une quantité thérapeutiquement efficace. Les formulations sont facilement administrées dans une variété de formes galéniques, telles que les solutions injectables décrites ci-dessus, mais les capsules de libération de médicament et similaires peuvent également être
30 utilisés. Pour l'administration parentérale dans une solution aqueuse par exemple, la solution doit être convenablement tamponnée et le diluant liquide rendu isotonique avec suffisamment de solution saline ou de glucose. Ces solutions aqueuses particulières

conviennent particulièrement pour une administration intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée et intrapéritonéale. À cet égard, les milieux aqueux stériles qui peuvent être utilisés sont connus de l'homme de l'art. Par exemple, une dose peut être dissoute dans 1 ml de solution de NaCl isotonique puis ajoutée à 1000 ml de liquide approprié, ou injectée sur le site proposé de la perfusion. Certaines variations de posologie devront nécessairement se produire en fonction de l'état du sujet traité.

La composition pharmaceutique de l'invention peut être formulée dans un mélange thérapeutique comprenant environ 0.0001 à 1.0 milligrammes, soit environ 0.001 à 0.1 milligrammes, soit environ de 0.1 à 1.0 milligrammes, voire environ 10 milligrammes par dose ou plus. Des doses multiples peuvent également être administrées. Le niveau de dose thérapeutiquement efficace spécifique pour un patient particulier dépendra d'une variété de facteurs, y compris le trouble qui est traité et la gravité de la maladie, l'activité du composé spécifique employé, la composition spécifique utilisée, l'âge, le poids corporel, la santé générale, le sexe et le régime alimentaire du patient, le moment de l'administration, la voie d'administration, le taux d'excrétion du composé spécifique utilisé, la durée du traitement, ou encore les médicaments utilisés en parallèle.

Les exemples suivants sont donnés en vue d'illustrer divers modes de réalisation de l'invention.

Légende des figures

Figure 1 : Structure du facteur X natif humain.

Figure 2 : Stratégies de développement des mutants.

La famille 1 englobe les mutants comprenant les mutations A ou A'.

La famille 2 regroupe les mutants comprenant la mutation B.

La famille 3 regroupe les mutants comprenant la mutation C ou C'.

Figure 3 : Niveau d'expression des facteurs variants produits dans CHO.

Les 3 familles de FX ont été exprimées suite à une transfection dans CHO. Les surnageants à jour 7 ont été analysés en triplicat avec le kit Zymutest FX (Hyphen). Les concentrations ($\mu\text{g/ml}$) sont indiquées en ordonnées. Les déviations standards sont indiquées au-dessus des histogrammes. Famille 1, barre grise ; famille 2, barre noire ;
5 famille 3, barre blanche.

Figure 4 : Niveau d'expression des facteurs X et variants produits dans HEK.

Les 3 familles de FX ont été exprimées suite à une transfection dans HEK293S. Les surnageants à jour 7 ont été analysés en triplicat avec le kit Zymutest FX (Hyphen). Les
10 concentrations ($\mu\text{g/ml}$) sont indiquées en ordonnées. Les déviations standards sont indiquées au-dessus des histogrammes. Famille 1, barre grise ; famille 2, barre noire ; famille 3, barre blanche.

Figure 5 : Activité chronométrique des facteurs X et variants produits dans CHO dans du plasma déficient en facteur X.

Les 3 familles de FX ont été exprimées suite à une transfection dans CHO-S. Les surnageants à jour 7 ont été analysés au moins en duplicat par un test TP sur automate STAR (Stago). Les temps de coagulation ont permis de calculer une activité spécifique (en $\text{s}/(\mu\text{g/ml})$) puis ont été transformés en pourcentage de l'activité du facteur X
20 recombinant sauvage. Ces valeurs sont présentées en ordonnées. Les déviations standards sont indiquées au-dessus des histogrammes. Famille 1, barre grise ; famille 2, barre noire ; famille 3, barre blanche.* FX-Kal2 famille 3, non fait.

Figure 6 : Activité des facteurs X variants de la famille 1 produits dans CHO après activation par la fraction RVV-X.

Les FX variants de la famille 1 ont été exprimés suite à une transfection dans CHO-S. Les surnageants à jour 7 ont été incubés à deux concentrations de FX (au moins en duplicat) en présence de la fraction RVV-X du venin de la vipère de Russell. L'apparition de FXa a été mesurée en suivant l'hydrolyse du substrat pNAPEP 1025 à
30 405 nM. Les vitesses initiales de transformation (mUDO/min/nM) ont été comparées à celle du FX-WT, fixée à 100%. La moyenne des valeurs à deux concentrations est

établie et présentée en ordonnées. Les déviations standards sont indiquées au-dessus des histogrammes.

Figure 7 : Thrombinogrammes obtenus à partir de l'ajout de FX ou de ses variants de la famille 2 dans un pool de plasma déficient en facteur VIII suite à l'activation par du facteur tissulaire (1 pM).

- en abscisses : le temps (en minutes)
- en ordonnées : la concentration maximale de thrombine observée (en nM)

L'échantillon de pool de plasma normal est représenté par la courbe noire (●) et celui déficient en FVIII par (○). Les courbes correspondant au plasma déficient surchargé par 1 U/ml ou 0.1 U/ml FVIII sont représentées par les symboles ■ et □ respectivement. Les symboles représentant les FX de type sauvage et les variants sont les suivants : FX-WT (◆), FX- control+ (◇), FX-IIa (▲), FX-PAR1 (△), FX-PAR1M (× en trait plein), FX-FIXa1 (*), FX-FIXa2 (× avec courbe pointillée), FX-Kal1 (), FX-Kal2 () et FX-Kal3 (trait plein sans symbole). Le facteur X ou ses variants ont été utilisés à 5 µg/ml sauf pour les FX-Kal2 et 3 qui pour des raisons techniques ont été utilisés à 3.5 et 1.65 µg/ml respectivement.

Figure 8 : Thrombinogrammes obtenus à partir de l'ajout de FX ou de ses variants de la famille 2 dans un pool de plasma déficient en facteur VIII suite à l'activation par de la céphaline.

- en abscisses : le temps (en minutes)
- en ordonnées : la concentration maximale de thrombine observée (en nM)

L'échantillon de pool de plasma normal est représenté par la courbe noire (●) et celui déficient en FVIII par (○). Les courbes correspondant au plasma déficient surchargé par 1 U/ml ou 0.1 U/ml de FVIII sont représentées par les symboles ■ et □ respectivement. Les symboles représentant les FX de type sauvage et les variants sont les suivants : FX-WT (◆), FX- control+ (◇), FX-IIa (▲), FX-PAR1 (△), FX-PAR1M (× en trait plein), FX-FIXa1 (*), FX-FIXa2 (× avec courbe pointillée), FX-Kal1 (), FX-Kal2 () et FX-Kal3 (trait plein sans symbole). Le facteur X ou ses variants ont été

utilisés à 5 µg/ml sauf pour les FX-Kal2 et 3 qui pour des raisons techniques ont été utilisés à 3.5 et 1.65 µg/ml respectivement.

Figure 9 : Vitesses des thrombogrammes obtenus à partir de l'ajout de FX ou de ses variants de la famille 2 dans un pool de plasma déficient en facteur VIII, suite à l'activation par du facteur tissulaire ou de la céphaline.

Les valeurs des vitesses (en nM/min de thrombine générée) issues des figures 7 et 8 sont présentées. A noter que les FX-Kal2 et 3 (*) ont été utilisés à 3,5 et 1,65 µg/ml respectivement au lieu de 5 µg/ml pour les autres FX et variants. Barres blanches, valeurs obtenues par une activation au facteur tissulaire (1 pM); Barres noires valeurs obtenues par une activation à la céphaline.

Figure 10 : Thrombinogrammes obtenus à partir de l'ajout de FX ou de ses variants de la famille 2 dans un pool de plasma déficient en facteur IX suite à l'activation par du facteur tissulaire (1 pM).

- en abscisses : le temps (en minutes)
- en ordonnées : la concentration maximale de thrombine observée (en nM)

L'échantillon de pool de plasma normal est représenté par la courbe noire (●) et celui déficient en FVIII par (○). Les courbes correspondant au plasma déficient surchargé par 1 U/ml ou 0.1 U/ml de FVIII sont représentées par les symboles ■ et □ respectivement. Les symboles représentant les FX de type sauvage et les variants sont les suivants : FX-WT (◆), FX- control+ (◇), FX-IIa (▲), FX-PAR1 (△), FX-PAR1M (× en trait plein), FX-FIXa1 (*), FX-FIXa2 (× avec courbe pointillée), FX-Kal1 (), FX-Kal2 () et FX-Kal3 (trait plein sans symbole).). Le facteur X ou ses variants ont été utilisés à 5 µg/ml sauf pour les FX-Kal2 et 3 qui pour des raisons techniques ont été utilisés à 3.5 et 1.65 µg/ml respectivement.

Figure 11: Thrombinogrammes obtenus à partir de l'ajout de FX ou de ses variants de la famille 2 dans un pool de plasma déficient en facteur IX suite à l'activation par de la céphaline.

- en abscisses : le temps (en minutes)

- en ordonnées : la concentration maximale de thrombine observée (en nM)

L'échantillon de pool de plasma normal est représenté par la courbe noire (●) et celui déficient en FVIII par (○). Les courbes correspondant au plasma déficient surchargé en FVIII 1 U/ml ou 0.1 U/ml sont représentées par les symboles ■ et □ respectivement. Les symboles représentant les FX de type sauvage et les variants sont les suivants : FX-WT (◆), FX-control+ (◇), FX-IIa (▲), FX-PAR1 (△), FX-PAR1M (× en trait plein), FX-FIXa1 (*), FX-FIXa2 (× avec courbe pointillée), FX-Kal1 (), FX-Kal2 () et FX-Kal3 (trait plein sans symbole). Le facteur X ou ses variants ont été utilisés à 5 µg/ml sauf pour les FX-Kal2 et 3 qui pour des raisons techniques ont été utilisés à 3.5 et 1.65 µg/ml respectivement.

Figure 12 : Vélocities des thrombogrammes obtenus à partir de l'ajout de FX ou de ses variants de la famille 2 dans un pool de plasma déficient en facteur IX, suite à l'activation par du facteur tissulaire (1 pM) ou de la céphaline.

Les valeurs des vélocités (en nM/min de thrombine générée) issues des figures 10 et 11 sont présentées. A noter que les FX-Kal2 et 3 (*) ont été utilisés à 3,5 et 1,65 µg/ml respectivement au lieu de 5 µg/ml pour les autres FX et variants. Les résultats sont présentés en échelle logarithmique. Pour plus de lisibilité, les valeurs inférieures à 1 nM/min de thrombine générée ne sont pas représentées (+). Barres blanches, valeurs obtenues par une activation au facteur tissulaire (1 pM); Barres noires valeurs obtenues par une activation à la céphaline.

Figure 13: Activation par la thrombine du FX-WT et de variants de la famille 2.

L'activation du FX-WT et certains de ses variants de la famille 2 a été réalisée en présence de thrombine (10 nM) en tampon Hepes contenant du substrat Pefachrome FXa 8595. L'apparition du paranitroannilide libéré par le FXa généré a été suivie à 405 nm au cours du temps. Du facteur X activé, à différentes concentrations, a été utilisé en contrôle positif.

Figure 14 : Thrombinogrammes obtenus à partir de l'ajout de FX ou de ses variants de la famille 1 dans un pool de plasma déficient en facteur VIII suite à l'activation par le facteur tissulaire

- en abscisses : le temps (en minutes)
- 5 - en ordonnées : la concentration maximale de thrombine observée (en nM)

L'échantillon de pool de plasma normal est représenté par la courbe noire (●) et celui déficient en FVIII par (○). Les courbes correspondant au plasma déficient surchargé par 1 U/ml ou 0.1 U/ml de FVIII sont représentées par les symboles ■ et □
 10 respectivement. Les symboles représentant les FX de type sauvage et les variants sont les suivants : FX-WT (◆), FX- control+ (◇), FX-IIa (▲), FX-PAR1 (△), FX-PAR1M (× en trait plein), FX-FIXa1 (*), FX-FIXa2 (× avec courbe pointillée), FX-Kal1 (), FX-Kal2 () et FX-Kal3 (trait plein sans symbole). Le facteur X ou ses variants ont été
 15 utilisés à 7,5 µg/ml sauf pour FX-Kal3 qui pour des raisons techniques a été utilisé à 1.65 µg/ml.

Figure 15 : Thrombinogrammes obtenus à partir de l'ajout de FX ou de ses variants de la famille 1 dans un pool de plasma déficient en facteur VIII suite à l'activation par de la céphaline

- 20 - en abscisses : le temps (en minutes)
- en ordonnées : la concentration maximale de thrombine observée (en nM)

L'échantillon de pool de plasma normal est représenté par la courbe noire (●) et celui déficient en FVIII par (○). Les courbes correspondant au plasma déficient surchargé par 1 U/ml ou 0.1 U/ml de FVIII sont représentées par les symboles ■ et □
 25 respectivement. Les symboles représentant les FX de type sauvage et les variants sont les suivants : FX-WT (◆), FX- control+ (◇), FX-IIa (▲), FX-PAR1 (△), FX-PAR1M (× en trait plein), FX-FIXa1 (*), FX-FIXa2 (× avec courbe pointillée), FX-Kal1 (), FX-Kal2 () et FX-Kal3 (trait plein sans symbole). Le facteur X ou ses variants ont été
 30 utilisés à 7,5 µg/ml sauf pour FX-Kal3 qui pour des raisons techniques a été utilisé à 1.65 µg/ml.

Figure 16 : Velocités des thrombogrammes obtenus à partir de l'ajout de FX ou de ses variants de la famille 1 dans un pool de plasma déficient en facteur VIII, suite à l'activation par du facteur tissulaire (1 pM) ou de la céphaline

Les valeurs des vélocités (en nM/min de thrombine générée) issues des figures 14 et 15 sont présentées. A noter que le FX-Kal3 (*) a été utilisé à 1,65 µg/ml au lieu de 7,5 µg/ml pour les autres FX et variants. La valeur du FX-WT est la moyenne des deux expériences. Pour plus de lisibilité, les valeurs inférieures à 1 nM/min de thrombine générée ne sont pas représentées (+). Barres blanches, valeurs obtenues par une activation au facteur tissulaire (1 pM); Barres noires, valeurs obtenues par une activation à la céphaline.

Figure 17 : Thrombinogrammes obtenus à partir de l'ajout de FX ou de ses variants de la famille 1 dans un pool de plasma déficient en facteur IX suite à l'activation par le facteur tissulaire

- en abscisses : le temps (en minutes)
- en ordonnées : la concentration maximale de thrombine observée (en nM)

L'échantillon de pool de plasma normal est représenté par la courbe noire (●) et celui déficient en FIX par (○). Les courbes correspondant au plasma déficient surchargé par 1 U/ml ou 0.1 U/ml de FIX sont représentées par les symboles ■ et □ respectivement. Les symboles représentant les FX de type sauvage et les variants sont les suivants : FX-WT (◆), FX-control+ (◇), FX-IIa (▲), FX-PAR1 (△), FX-PAR1M (× en trait plein), FX-FIXa1 (*), FX-FIXa2 (× avec courbe pointillée), FX-Kal1 (), FX-Kal2 () et FX-Kal3 (trait plein sans symbole). Le facteur X ou ses variants ont été utilisés à 7,5 µg/ml sauf pour FX-Kal3 qui pour des raisons techniques a été utilisé à 1.65 µg/ml.

Figure 18: Thrombinogrammes obtenus à partir de l'ajout de FX ou de ses variants de la famille 1 dans un pool de plasma déficient en facteur IX suite à l'activation par de la céphaline

- en abscisses : le temps (en minutes)
- en ordonnées : la concentration maximale de thrombine observée (en nM)

L'échantillon de pool de plasma normal est représenté par la courbe noire (●) et celui déficient en FIX par (○). Les courbes correspondant au plasma déficient surchargé par 1 U/ml ou 0.1 U/ml de FIX sont représentées par les symboles ■ et □ respectivement. Les symboles représentant les FX de type sauvage et les variants sont les suivants : FX-WT (◆), FX- control+ (◇), FX-IIa (▲), FX-PAR1 (△), FX-PAR1M (× en trait plein),
 5 FX-FIXa1 (*), FX-FIXa2 (× avec courbe pointillée), FX-Kal1 (), FX-Kal2 () et FX-Kal3 (trait plein sans symbole). Le facteur X ou ses variants ont été utilisés à 7,5 µg/ml sauf pour FX-Kal3 qui pour des raisons techniques a été utilisé à 1.65 µg/ml.

10 **Figure 19 : Velocités des thrombogrammes obtenus à partir de l'ajout de FX ou de ses variants de la famille 1 dans un pool de plasma déficient en facteur IX, suite à l'activation par du facteur tissulaire (1 pM) ou de la céphaline**

Les valeurs des vélocités (en nM/min de thrombine générée) issues des figures 17 et 18 sont présentées. A noter que le FX-Kal3 (*) a été utilisé à 1,65 µg/ml au lieu de 7,5
 15 µg/ml pour les autres FX et variants. La valeur du FX-WT est la moyenne des deux expériences. Pour plus de lisibilité, les valeurs inférieures à 1 nM/min de thrombine générée ne sont pas représentées (+). Barres blanches, valeurs obtenues par une activation au facteur tissulaire (1 pM); Barres noires valeurs obtenues par une activation à la céphaline.

20

Figure 20 : Thrombinogrammes obtenus à partir de l'ajout de FX ou de ses variants de la famille 3 dans un pool de plasma déficient en facteur VIII suite à l'activation par le facteur tissulaire

- en abscisses : le temps (en minutes)
- 25 - en ordonnées : la concentration maximale de thrombine observée (en nM)

L'échantillon de pool de plasma normal est représenté par la courbe noire (●) et celui déficient en FVIII par (○). Les courbes correspondant au plasma déficient surchargé par 1 U/ml ou 0.1 U/ml de FVIII sont représentées par les symboles ■ et □
 30 respectivement. Les symboles représentant les FX de type sauvage et les variants sont les suivants : FX-WT (◆ et ---), FX- control+ (◇), FX-IIa (▲), FX-PAR1 (△), FX-PAR1M (× en trait plein), FX-FIXa1 (*), FX-FIXa2 (× avec courbe pointillée), FX-

Kal1 (), FX-Kal2 () et FX-Kal3 (trait plein sans symbole). Le facteur X ou ses variants ont été utilisés à 7,5 µg/ml sauf pour FX-Kal3 qui pour des raisons techniques a été utilisé à 1.65 µg/ml.

5 Figure 21 : Thrombinogrammes obtenus à partir de l'ajout de FX ou de ses variants de la famille 3 dans un pool de plasma déficient en facteur VIII suite à l'activation par de la céphaline

- en abscisses : le temps (en minutes)
- en ordonnées : la concentration maximale de thrombine observée (en nM)

10

L'échantillon de pool de plasma normal est représenté par la courbe noire (●) et celui déficient en FVIII par (○). Les courbes correspondant au plasma déficient surchargé par 1 U/ml ou 0.1 U/ml de FVIII sont représentées par les symboles ■ et □ respectivement. Les symboles représentant les FX de type sauvage et les variants sont les suivants : FX-WT (◆ et ---), FX- control+ (◇), FX-IIa (▲), FX-PAR1 (△), FX-PAR1M (× en trait plein), FX-FIXa1 (*), FX-FIXa2 (× avec courbe pointillée), FX-Kal1 (), FX-Kal2 () et FX-Kal3 (trait plein sans symbole). Le facteur X ou ses variants ont été utilisés à 7,5 µg/ml sauf pour FX-Kal3 qui pour des raisons techniques a été utilisé à 1.65 µg/ml.

15

20

Figure 22 : Vélocities des thrombogrammes obtenus à partir de l'ajout de FX ou de ses variants de la famille 3 dans un pool de plasma déficient en facteur VIII, suite à l'activation par du facteur tissulaire (1 pM) ou de la céphaline

Les valeurs des vélocités (en nM/min de thrombine générée) issues des figures 20 et 21 sont présentées. A noter que le FX-Kal3 (*) a été utilisé à 1,65 µg/ml au lieu de 7,5 µg/ml pour les autres FX et variants. La valeur du FX-WT est la moyenne des deux expériences. Barres blanches, valeurs obtenues par une activation au facteur tissulaire (1 pM); Barres noires, valeurs obtenues par une activation à la céphaline.

25

30

Figure 23 : Thrombinogrammes obtenus à partir de l'ajout de FX ou de ses variants de la famille 3 dans un pool de plasma déficient en facteur IX suite à l'activation par le facteur tissulaire

- en abscisses : le temps (en minutes)
- en ordonnées : la concentration maximale de thrombine observée (en nM)

L'échantillon de pool de plasma normal est représenté par la courbe noire (●) et celui déficient en FIX par (○). Les courbes correspondant au plasma déficient surchargé par 1 U/ml ou 0.1 U/ml de FIX sont représentées par les symboles ■ et □ respectivement. Les symboles représentant les FX de type sauvage et les variants sont les suivants : FX-WT (◆), FX-control+ (◇), FX-IIa (▲), FX-PAR1 (△), FX-PAR1M (× en trait plein), FX-FIXa1 (*), FX-FIXa2 (× avec courbe pointillée), FX-Kal1 (), FX-Kal2 () et 10 FX-Kal3 (trait plein sans symbole). Le facteur X ou ses variants ont été utilisés à 7,5 µg/ml sauf pour FX-Kal3 qui pour des raisons techniques a été utilisé à 1.65 µg/ml.

Figure 24 : Thrombinogrammes obtenus à partir de l'ajout de FX ou de ses variants de la famille 3 dans un pool de plasma déficient en facteur IX suite à l'activation par de la céphaline

- en abscisses : le temps (en minutes)
- en ordonnées : la concentration maximale de thrombine observée (en nM)

L'échantillon de pool de plasma normal est représenté par la courbe noire (●) et celui 20 déficient en FIX par (○). Les courbes correspondant au plasma déficient surchargé par 1 U/ml ou 0.1 U/ml de FIX sont représentées par les symboles ■ et □ respectivement. Les symboles représentant les FX de type sauvage et les variants sont les suivants : FX-WT (◆), FX-control+ (◇), FX-IIa (▲), FX-PAR1 (△), FX-PAR1M (× en trait plein), FX-FIXa1 (*), FX-FIXa2 (× avec courbe pointillée), FX-Kal1 (), FX-Kal2 () et 25 FX-Kal3 (trait plein sans symbole). Le facteur X ou ses variants ont été utilisés à 7,5 µg/ml sauf pour FX-Kal3 qui pour des raisons techniques a été utilisé à 1.65 µg/ml.

Figure 25 : Vélocities des thrombogrammes obtenus à partir de l'ajout de FX ou de ses variants de la famille 3 dans un pool de plasma déficient en facteur IX, suite à l'activation par du facteur tissulaire (1 pM) ou de la céphaline

Les valeurs des vélocités (en nM/min de thrombine générée) issues des figures 23 et 24 sont présentées. A noter que le FX-Kal3 (*) a été utilisé à 1,65 µg/ml au lieu de 7,5

µg/ml pour les autres FX et variants. La valeur du FX-WT est la moyenne des deux expériences. Barres blanches, valeurs obtenues par une activation au facteur tissulaire (1 pM); Barres noires, valeurs obtenues par une activation à la céphaline.

5

Exemples

Exemple 1 : Génération des ADN complémentaires des variants de facteurs X

10 1- Généralités

Les séquences nucléotidiques et protéiques des différentes constructions sont fournies dans le listage de séquences, et sont résumées dans le tableau de la description. La molécule de FX sauvage est appelée FX-WT (SEQ ID NO :7), elle correspond à un FX humain dont la séquence nucléotidique a été optimisée. Cette molécule servira de

15 contrôle pour les trois familles de molécules mutées.

Les molécules mutées sont nommées en fonction du site de clivage placé en amont de la chaîne lourde. Le FX-control+ correspond au site de reconnaissance de la thrombine sur le fibrinogène, ou fibrinopeptide A. Les molécules mutées selon l'invention se nomment respectivement FX-IIa (site consensus de clivage à la thrombine), FX-PAR1 (site modifié de clivage de la thrombine sur le récepteur PAR1), FX-PAR1M (site modifié de clivage de la thrombine sur le récepteur PAR1 sans site de glycosylation), FX-FXIIa1 (site de clivage 1 du FXIIa sur le FIX), FX-FXIIa2 (site de clivage 2 du FXIIa sur le FIX), FX-Kal1 (site de clivage 1 de la Kallikreine sur le FXII), FX-Kal2 (site de clivage 2 de la Kallikreine sur le FXII) et FX-Kal3 (site de clivage 3 de la Kallikreine

25 sur le FXII).

Comme montré en Figure 2, chacun de ces sites est présent dans un environnement différent (famille), à savoir :

- soit dans la famille 1 qui consiste en la substitution de 6 ou 10 acides aminés en amont du site de clivage du peptide d'activation (mutation A ou A') ;

30

- soit dans la famille 2 qui consiste en l'insertion des mêmes séquences en amont du site de clivage du peptide d'activation (mutation B) ; ou

- soit dans la famille 3 qui consiste en l'insertion de ces séquences en amont du site de clivage du peptide d'activation, couplée à la délétion d'une partie du peptide d'activation (mutation C ou C').

Ainsi, les protéines de séquence SEQ ID NO : 9 à 16 correspondent à la séquence SEQ ID NO :7, dans laquelle une mutation A ou A' a été insérée. Ces protéines appartiennent donc à la famille 1.

Les protéines de séquence SEQ ID NO : 18 à 25 correspondent à la séquence SEQ ID NO :7, dans laquelle une mutation B a été insérée. Ces protéines appartiennent donc à la famille 2.

Enfin, les protéines de séquence SEQ ID NO : 27 à 34 correspondent à la séquence SEQ ID NO :7, dans laquelle une mutation C ou C' a été insérée. Ces protéines appartiennent donc à la famille 3.

Les séquences SEQ ID NO :8, 17 et 26 correspondent à un FX-control+, et sont des comparatifs.

2- Protocole expérimental

Les séquences spécifiques à chaque variant sont introduites par PCR d'assemblage ou Infusion, à l'aide d'amorces judicieusement conçues pour permettre l'insertion et/ou la délétion de séquences nucléotidiques, au sein d'une séquence nucléotidique synthétique codant le FX optimisée pour une expression dans *Homo sapiens* (SEQ ID NO :35).

2.1. Préparation du vecteur pCEP4-FXWT4HS-gs codant le FX humain

Le vecteur de clonage pUC57 contenant le gène synthétique optimisé pour une expression chez *Homo sapiens* et préparé par Genescript est digéré comme le vecteur d'expression pCEP4 (Life Technologies) par les enzymes BamHI et HindIII. L'insert correspondant au gène du FX (FXWT4HSgs) et le vecteur digéré pCEP4 sont purifiés par Nucleospin extract II (Clontech Laboratories) avant d'être ligués ensemble par la T4 ligase. Le produit de ligation est utilisé pour transformer des bactéries Top10 (Life Technologies). La présence de l'insert dans les colonies bactériennes est déterminée par digestion du plasmide par les enzymes BamHI et HindIII et passage du produit de digestion sur gel d'agarose pour y détecter une bande de 1519 pb. L'ADNc est vérifié par séquençage en utilisant les amorces CMVs1 (5'-GGGACTTTCCTACTTGGCAGT-

3' SEQ ID NO :36) et SV40-3'UTR (5'-TTCAGTGCATTCTAGTTGTGGT-3' SEQ ID NO :37).

2.2- Préparation du vecteur OptiCHO FXWT4HS codant le FX humain

- 5 Pour une expression optimale des variants, ces derniers ainsi que la molécule sauvage sont préparés dans le vecteur OptiCHO.

A partir du vecteur pCEP4-FXWT4HS-gs, l'ADNc de la séquence FXWT4HS est amplifié par PCR (kapa Hifi ; Biosystem) avec les amorces 5'FXWT et 3'FX-SwaI.

- 10 Le produit de PCR de 1551 pb est purifié par Nucleospin extract avant d'être digéré par les enzymes NheI et SwaI, tout comme le vecteur de destination OptiCHO. Ils sont à nouveau purifiés sur Nucleospin extract après digestion.

L'insert et le vecteur sont ligués ensemble par la T4 ligase avant que le produit de ligation ne soit intégré dans des bactéries compétentes Top10. Après amplification

- 15 bactérienne en présence d'ampicilline, des colonies bactériennes sont prélevées sur boîte de Pétri et criblées par PCR pour la recherche d'un amplicon de 296 pb avec les amorces 5'ef1a et 3FX, signe de la présence de l'insert codant le FX dans le vecteur OptiCHO. Le criblage par PCR est complété d'un criblage des vecteurs purifiés par digestion enzymatique par les enzymes Nhe I et SwaI pour rechercher sur gel d'agarose
- 20 un fragment de 1538 pb. Le vecteur OptiCHO-FXWT4HS est séquencé avec les amorces :

- 5'ef1a : 5'-GTGGAGACTGAAGTTAGGCCAG-3' (SEQ ID NO :38)
- 3FX : 5'-CTTCATTTCTCCAGGAAAGAGTTGGC-3' (SEQ ID NO :39)
- 2BGHPA : 5'-CAGATGGCTGGCAACTAGAA-3' (SEQ ID NO :40)

25

2.3. Préparation des variants de la famille 1

La préparation des inserts codant les ADNc des variants de la famille 1 est effectuée selon le tableau 1 à l'aide de PCR d'assemblage et ligation ou par la technique Infusion utilisant les amorces listées dans le tableau 2. La matrice utilisée pour les PCR1 et 2 est

30 le vecteur OptiCHO-FXWT4HS. Les produits de PCR sont traités à la DpnI pour digérer l'ADN parental. Les amplicons d'intérêt sont purifiés par Nucléospin extract.

Pour les molécules OptiCHO-FX WTF1D, OptiCHO-FX WTF1G et OptiCHO-FX WTF1I, les amplicons purifiés des PCR 1 et 2 ont été utilisés comme matrice et

assemblés par PCR d'assemblage selon le tableau 1. Les amplicons des PCR3 purifiés ainsi que le vecteur digéré par *NheI* et *SwaI*, sont assemblés par ligation à la T4 ligase.

Tableau 1

	PCR1		PCR2		PCR 3 d'assemblage après digestion des PCR1 et 2	
variant	amorces	Taille amplicon	amorces	Taille amplicon	amorces	Taille amplicon
FXWT4HS FID	5'FXWT+3'FX1d	720	5'FX1d+3'FX SwaI	842	5'FX WT+3'Fx SwaI	1551
FXWT4HS FIG	5'FXWT+3'FX1g	716	5'FX1g+3'FX SwaI	841	5'FX WT+3'Fx SwaI	1551
FXWT4HS FII	5'FXWT+3'FX1i	716	5'FX1i+3'FX SwaI	838	5'FX WT+3'Fx SwaI	1551

5

Tableau 2

amorces	SEQ ID NO :	séquences
3'FX1a	41	5'-TCCTTCTGCCAGGAAGTCCTGTGTCTGGTTGAAGTCCAGCAGGTCA-3'
3'FX1b	42	5'- TCAGGCCCTCGGCCAGGAAGTCCTGTGTCTGGTTGAAGTCCAGCAGGTCA -3'
3'FX1c	43	5'-TGGCGTTGGTGGCCTTCTGTGTCTGGTTGAAGTCCAGCAGGTCAA-3'
3'FX1d	44	5'-AGGGTGGCCTGGGTGGCCTTCTGTGTCTGGTTGAAGTCCAGCAGGTCA- 3'
3'FX1e	45	5'-TGGTCAGCTTGCTGGTGCCTCTTTCAGGCTGTGTCTGGTTGA-3'
3'FX1f	46	5'-TGGTGAAGTCGTTGAAGCCTCTTTCAGGCTGTGTCTGGTTGAAG-3'
3'FX1g	47	5'-TGGTCATGCTGCTCAGGCCTCTTTCAGGCTGTGTCTGGTTGAAGT-3'
3'FX1h	48	5'-TGGTCAGGCTGGGAGGGCCTCTTTCAGGCTGTGTCTGGTTGAAG-3'
3'FX1i	49	5'-TCTGGCCGCAGGACAGGCCTCTTTCAGGCTGTGTCTGGTTGAAG-3'
3FX-2a	50	5'- CTCCTTCTGCCAGGAAGTCCCTAGTCAGATTGTTATCGCCTCTTTCAGGC- 3'
3FX-2b	51	5'- GTCAGGCCCTCGGCCAGGAAGTCCCTAGTCAGATTGTTATCGCCTCTTTCAGGC- GGC-3'
3FX-2c	52	5'- AGGGTGGCGTTGGTGGCCTTCTAGTCAGATTGTTATCGCCTCTTTCAGGC -3'
3FX-2d	53	5'- AGGGTGGCCTGGGTGGCCTTCTAGTCAGATTGTTATCGCCTCTTTCAGGC -3'
3FX-2e	54	5'-TCAGCTTGCTGGTCCTAGTCAGATTGTTATCGCCTCTTTCAGGC-3'
3FX-2f	55	5'-GGTGAAGTCGTTGAACCTAGTCAGATTGTTATCGCCTCTTTCAGGC-3'
3FX-2g	56	5'-ATGCTGCTCAGCCTAGTCAGATTGTTATCGCCTCTTTCAGGC-3'
3FX-2h	57	5'-GTCAGGCTGGGAGGCCTAGTCAGATTGTTATCGCCTCTTTCAGGC-3'
3FX-2i	58	5'-TCTGGCCGCAGGACAGCCTAGTCAGATTGTTATCGCCTCTTTCAGGC-3'

5'FX1a	59	5'-GCAGAAAGGAGGAGGAGTGAGGATCGTGGGAGGACAGGAGTGCA-3'
5'FX1b	60	5'-AGGGCCTGACCCCTAGGATCGTGGGAGGACAGGAGTGCAAGGA-3'
5'FX1cbis	61	5'- AGGCCACCAACGCCACCCTGTCCCCTAGGATCGTGGGAGGACAGGAGTG CAAGGA-3'
5'FX1d	62	5'-CAGGCCACCCTGAGCCCTAGGATCGTGGGAGGACAGGAGTGCAAG-3'
5'FX1e	63	5'-ACCAGCAAGCTGACCAGGATCGTGGGAGGACAGGAGTGCAAGGA-3'
5'FX1f	64	5'-CAACGACTTCACCAGGATCGTGGGAGGACAGGAGTGCAAGGA-3'
5'FX1g	65	5'-TGAGCAGCATGACCAGGATCGTGGGAGGACAGGAGTGCAAGGA-3'
5'FX1h	66	5'-CCTCCCAGCCTGACCAGGATCGTGGGAGGACAGGAGTGCAAGGA-3'
5'FX1i	67	5'-TGTCCTGCGGCCAGAGGATCGTGGGAGGACAGGAGTGCAAGGA-3'
5'fusion FX	68	5'-TCTTCCATTTTCAGCTAGCAAGCTTGCCGCCAC-3'
3fusionF X	69	5'-AGCTCTAGACAATTGATTTAAATGGATCCTCACTTGCCGTC-3'
5'FXWT	70	5'-ACCAGCTGCTAGCAAGCTTGCCG-3'
3'FX- SwaI	71	5'-GAAACTATTTAAATGGATCCTCACTTGCCGTCAATCAGC-3'
3FXF3	72	5'-CCAGGTAATGCTATCAGCCACTGACCTTTTGCGCCTCTC-3'
5FXF3	73	5'-TCAGTGGCTGATAGCATTACCTGGAAACCTTATGACGC-3'
3FXF3bis	74	5'-GCTAGTTGCCTGAGCCACTGACCTTTTG-3'
5FXF3bis	75	5'-GCTCAGGCAACTAGCGATAGCATTACCTGGAAACCTTATGACGC-3'
5'ef1a	38	5'-GTGGAGACTGAAGTTAGGCCAG-3'
3FX	39	5'-CTTCATTTCTCCAGGAAAGAGTTGGC-3'
2BGHPA	40	5'-CAGATGGCTGGCAACTAGAA-3'

Pour les molécules OptiCHO-FX WTF1a, OptiCHO-FX WTF1b, OptiCHO-FX WTF1c, OptiCHO-FX WTF1e, OptiCHO-FX WTF1f, et OptiCHO-FX WTF1h, les amplicons purifiés des PCR 1 et 2 ont été générés par PCR selon les conditions du

5 tableau 3. Les amplicons purifiés des PCR 1 et 2 sont assemblés par Infusion avec le vecteur préalablement digéré par NheI et SwaI et purifié par nucleospin Extract.

Tableau 3 :

variant	PCR1		PCR2	
	amorces	Taille amplicon	amorces	Taille amplicon
FX4hsF1a	5'fusionFX + 3'FX1a	718	5'FX1A + 3fusionFX	842
FX4hsF1b	5'fusionFX3'F + X1b	722	5'FX1b + 3fusionFX	838
FX4hsF1c	5'fusionFX + 3'FX1c	718	5'FX1cbis + 3fusionFX	859
FX4hsF1e	5'fusionFX + 3'FX1e	714	5'FX1e + 3fusionFX	839
FX4hsF1f	5'fusionFX + 3'FX1f	716	5'FX1f + 3fusionFX	814
FX4hsF1h	5'fusionFX +	716	5'FX1h+ 3fusionFX	839

	3'FX1h			
--	--------	--	--	--

Pour chaque variant le vecteur final est inséré par transformation bactérienne dans des bactéries Top10. Après amplification bactérienne en présence d'ampicilline, des colonies bactériennes sont prélevées sur boîte de Pétri et criblées par PCR pour la recherche d'un amplicon de 296 pb avec les amorces 5'ef1a et 3FX, signe de la présence de l'insert codant le FX dans le vecteur OptiCHO. Les vecteurs OptiCHO-FX WTF1a à OptiCHO-FX WTF1i sont séquencés avec les amorces :

- 5'ef1a
- 2BGHPA

10

2.4- Préparation des variants de la famille 2

La préparation des inserts codant les ADNc des variants de la famille 2 est effectuée selon le tableau 4 par la technique de PCR et assemblage par Infusion en utilisant les amorces listées dans le tableau 2. La matrice utilisée pour les PCR1 et 2 est le vecteur OptiCHO-FXWT4HS. Les produits de PCR sont traités à la DpnI pour digérer l'ADN parental. Les amplicons sont purifiés par nucleospin extract. Les amplicons purifiés des PCR 1 et 2 sont assemblés par Infusion avec le vecteur OptiCHO préalablement digéré par NheI et SmaI et purifié par nucleospin Extract.

20 **Tableau 4 :**

	PCR1			PCR 2		
	Amorces 5'	Amorces 3'	Taille amplicon	Amorces 5'	Amorces 3'	Taille amplicon
Fx-a	5'fusionFX	3FX-2a	781	5'FX-1a	3fusion FX	851
Fx-b	5'fusionFX	3FX-2b	758	5'FX-1b	3fusion FX	847
Fx-c	5'fusionFX	3FX-2c	755	5'FX-1c	3fusion FX	850
Fx-d	5'fusionFX	3FX-2d	755	5'FX-1d	3fusion FX	851
Fx-e	5'fusionFX	3FX-2 e	748	5'FX-1e	3fusion FX	848
Fx-f	5'fusionFX	3FX-2f	750	5FX-1f	3fusion FX	846
Fx-g	5'fusionFX	3FX-2g	746	5'FX-1g	3fusion FX	847
Fx-h	5'fusionFX	3FX-2h	749	5'FX-1h	3fusion FX	848
Fx-i	5'fusionFX	3FX-2i	751	5'FX-1i	3fusion FX	847

Pour chaque variant le vecteur final est inséré par transformation bactérienne dans des bactéries Top10. Après amplification bactérienne en présence d'ampicilline, des colonies bactériennes sont prélevées sur boîte de Pétri et criblées par PCR pour la recherche d'un amplicon de 296 pb avec les amorces 5'ef1a et 3FX, signe de la présence de l'insert codant le FX dans le vecteur OptiCHO. Les vecteurs OptiCHO-FX WTF2a à OptiCHO-FX WTF2i sont séquencés avec les amorces :

- 5'ef1a
- 2BGHPA

2.5.- Préparation des Variants de la famille 3

La famille 3 contient des délétions dans le peptide d'activation qu'il convient de préparer avant de pouvoir y insérer les sites de clivage enzymatique. A ce titre, deux vecteurs intermédiaires sont préparés OptiCHO FXWT F3AD pour les variants de la famille 3 F3a à F3d et OptiCHO FXWT F3EI pour les variants de la famille 3 F3e à F3i. Les inserts des vecteurs intermédiaires sont construits par PCR d'assemblage selon le tableau 5 en utilisant le vecteur OptiCHO FXWT4HS-gs pour matrice et les amorces 5'FXWT, 3'FX-SwaI, 3FXF3, 5FXF3, 3FXF3bis, 5FXF3bis listées dans le tableau 2.

Tableau 5 :

Vecteur intermédiaire	PCR1		PCR2		PCR 3 d'assemblage après digestion des PCR1 et 2	
	amorces	Taille amplicon	amorces	Taille amplicon	amorces	Taille amplicon
OptiCHO FXWT F3AD	5'FXWT + 3FXF3	598	3FX-SwaI + 5FXF3	947	5'FXWT + 3FX-SwaI	1521
OptiCHO FXWT F3EI	5'FXWT + 3FXF3bis	595	3FX-SwaI + 5FXF3bis	953	5'FXWT + 3FX-SwaI	1533

Les produits des PCR d'assemblage sont purifiés par Nucleospin extract avant d'être digérés, tout comme le vecteur destination OptiCHO, par les enzymes NheI et SwaI. Ils sont à nouveau purifiés sur Nucleospin extract après digestion.

L'insert et le vecteur sont ligués ensemble par la T4 ligase avant que le produit de ligation ne soit intégré dans des bactéries compétentes Top10. Après amplification bactérienne en présence d'ampicilline, des colonies bactériennes sont prélevées sur boîte de Pétri et criblées par PCR pour la recherche d'un amplicon de 296 pb avec les

amorces 5'ef1a et 3FX signe de la présence de l'insert codant le FX variant dans le vecteur OptiCHO.

Les vecteurs intermédiaires OptiCHO FXWT F3AD et OptiCHO FXWT F3EI sont séquencés avec les amorces :

- 5 - 5'ef1a
- 3FX
- 2BGHPA

A l'exception de la molécule OptiCHO FXWT F3A, la préparation des inserts codant les ADNc des variants de la série 3 est effectuée selon le tableau 6 par PCR d'assemblage en utilisant les amorces listées dans le tableau 2. La matrice utilisée pour les PCR1 et 2 est le vecteur OptiCHO FXWT F3AD pour les variants de la famille 3, F3a à F3d et OptiCHO FXWT F3EI pour les variants de la famille 3 F3e à F3i. Les amplicons sont purifiés par nucleospin extract. Les amplicons purifiés des PCR 1 et 2 sont assemblés par PCR d'assemblage avec le vecteur OptiCHO préalablement digéré par NheI et SmaI et purifié par nucleospin Extract.

Tableau 6 :

	PCR1		PCR2		PCR 3 d'assemblage après digestion des PCR1 et 2	
	Amorces	Taille amplicon	Amorces	Taille amplicon	Amorces	Taille amplicon
Fx-b	5'FXWT + 3FX-2b	723	5FX-1b + 3'FX-SwaI	838	5'FXWT + 3'FX-SwaI	1551
Fx-c	5'FXWT + 3FX-2c	720	5FX-1c + 3'FX-SwaI	841	5'FXWT + 3'FX-SwaI	1551
Fx-d	5'FXWT + 3FX-2d	720	5FX-1d + 3'FX-SwaI	842	5'FXWT + 3'FX-SwaI	1551
Fx-e	5'FXWT + 3FX-2e	713	5FX-1 ^e + 3'FX-SwaI	725	5'FXWT + 3'FX-SwaI	1551
Fx-f	5'FXWT + 3FX-2f	715	5FX-1f + 3'FX-SwaI	727	5'FXWT + 3'FX-SwaI	1551
Fx-g	5'FXWT + 3FX-2g	711	5FX-1g + 3'FX-SwaI	723	5'FXWT + 3'FX-SwaI	1551
Fx-h	5'FXWT + 3FX-2h	714	5FX-1h + 3'FX-SwaI	726	5'FXWT + 3'FX-SwaI	1551
Fx-i	5'FXWT + 3FX-2i	716	5FX-1i + 3'FX-SwaI	728	5'FXWT + 3'FX-SwaI	1551

Les produits des PCR d'assemblage sont purifiés par Nucleospin extract avant d'être digérés, tout comme le vecteur de destination OptiCHO, par les enzymes NheI et SmaI. Ils sont à nouveau purifiés sur Nucleospin extract après digestion.

L'insert et le vecteur sont ligués ensemble par la T4 ligase avant que le produit de ligation ne soit intégré dans des bactéries compétentes Top10. Après amplification bactérienne en présence d'ampicilline, des colonies bactériennes sont prélevées sur boîte de Pétri et criblées par PCR pour la recherche d'un amplicon de 296 pb avec les amorces 5'ef1a et 3FX, signe de la présence de l'insert codant le FX variant dans le vecteur OptiCHO.

Les vecteurs finaux de la famille 3 sont séquencés avec les amorces :

- 5'ef1a
- 2BGHPA

Exemple 2 : Production des facteurs X recombinants

1 – Protocole expérimental

1.1 – Réactifs

Milieu de culture ProCHO4 ((Lonza) et Freestyle™ F17 (Gibco)

L-glutamine (Gibco)

Milieu de transfection des cellules CHO-S : Opti-Pro SFM (Gibco).

Milieu de transfection des cellules HEK : Opti-MEM (Gibco).

Vitamine K1 (Sigma).

1.2 - Protocole

Le facteur X de type sauvage et ses variants sont produits dans des cellules eucaryotes

CHO-S ou HEK-293-Freestyle (Invitrogen) en expression transitoire.

Les cellules CHO-S sont cultivées en milieu ProCHO4 et les cellules HEK 293F en milieu F17, supplémentés respectivement avec 4 mM et 8 mM de L-glutamine. Les 2 lignées cellulaires sont cultivées en conditions agitées à 135 rpm en atmosphère contrôlée (8% CO₂) à 37°C. La veille du jour de transfection, les cellules sont ensemencées à une densité de 7.10⁵ cellules/ml.

Le jour de la transfection, l'ADN (20-30 µg) et 30µg d'agent de transfection (AT) sont pré-incubés séparément en milieu Opti-Pro pour CHO-S et Opti-MEM pour HEK 293F

durant 5 minutes puis mélangés et incubés durant 20 minutes pour permettre la formation du complexe ADN/AT. L'ensemble est ajouté à une préparation cellulaire de 1.10^6 cellules/ml dans un volume de 30 ml.

Dans le cas des co-transfections des FX avec la vitamine K époxyde-reductase native (VKOR), les 2 vecteurs sont ajoutés à différents ratios pour obtenir une quantité totale d'ADN de 20-30µg. L'enzyme VKOR permet une production de FX actif dans HEK en optimisant la gamma-carboxylation. Immédiatement après la transfection, la vitamine K1 (5 µg/ml) est ajoutée dans le milieu. Les taux de transfections sont évalués le lendemain de la transfection à l'aide d'un plasmide contrôle exprimant la GFP (Green Fluorescent Protein). Les productions sont réalisées en mode « batch » durant 7 jours. En fin de production, les cellules et le surnageant sont séparés par centrifugation. Les cellules sont éliminées et le surnageant est filtré puis congelé.

15 Exemple 3 : Mesure de la concentration en facteur X

1- Protocole expérimental

La concentration en facteur X est mesurée par l'intermédiaire de l'ELISA commercial Zymutest Factor X (HYPHEN BioMed) en suivant les recommandations du fabricant. Les concentrations sont mesurées en triplicat en utilisant des valeurs d'antigène situées dans la zone linéaire de détection de l'essai. Pour s'assurer que les mutations introduites ne perturbent pas la mesure de la concentration, les FX sont déposés en quantité identique et révélés par immunoblotting avec un anticorps polyclonal différent de celui utilisé en ELISA (Polyclonal antibody anti-human FX (CRYOPEP cat n°PAHFX-S) ou par coloration après SDS-PAGE (données non montrées).

2 – Résultats

2.1- Expression des facteurs X variants exprimés transitoirement dans CHO

Les concentrations des facteurs X (FX) variants présents dans les surnageants des cellules CHO-S transfectées avec les ADNc codant pour les familles 1 à 3 ont été mesurées par l'ELISA commercial Zymutest Factor X (figure 3).

Comme attendu, les surnageants de cellules CHO non-transfectées (control) ne contiennent pas de FX. La transfection avec les vecteurs codant pour les différents FX permet d'obtenir des taux allant de 0.5 à 3.06 µg/ml. Il n'y a pas de différence majeure dans l'expression des FX des différentes familles. Au maximum, le FX-IIa de la famille 3 est exprimé 2.1X plus fortement (2.64 µg/ml) que celui de la famille 1 (1.26 µg/ml). Certaines constructions permettent d'obtenir du facteur X en concentration plus importante que le facteur X de type sauvage : ce sont les constructions FX-IIa (famille 3) et les FX-PAR1 (famille 1 et 3). Le FX-Kal3 semble diminuer la production du FX.

2.2– Expression des facteurs X variants exprimés transitoirement dans HEK

Les concentrations des facteurs X variants présents dans les surnageants des cellules HEK293S transfectées avec les ADNc codant pour les familles 1 à 3 ont été mesurées par l'ELISA commercial Zymutest Factor X (figure 4). Comme attendu, les surnageants de cellules HEK293S non transfectées (control) ne contiennent pas de FX. Les molécules de la famille 1 ont été produites à un taux proche de celui du FX-WT (de 0.14 à 1.64 µg/ml). Seule la molécule FX-PAR1 est produite à un taux plus élevée. La molécule FX-Kal3 reste la molécule la moins produite. La famille 2 a été produite de manière similaire pour toutes les constructions avec des valeurs d'expression de 1.79 à 2.54 µg/ml sauf pour la construction FX-Kal3 produite à un taux plus faible (0.66 µg/ml). La famille 3 a été produite à des taux plus faibles de 0.2 à 1.2 µg/ml.

En conclusion, certaines constructions de facteurs X variants permettent de produire le FX à des taux plus importants que le FX-WT :

- ce sont dans les CHO, les constructions FX-IIa (famille 3) et les FX-PAR1 (familles 1 et 3) et

- dans les HEK, le FX-PAR1 de la famille 1.

Exemple 4 : Mesure de l'activité coagulante des facteurs X variants produits dans CHO-S

1 – Protocole expérimental

L'activité chronométrique des FX variants produits par les cellules CHO-S a été mesurée grâce à un automate STAR (Stago) en présence de plasma déficient en FX.

Le plasma déficient en FX, la néoplastine et le tampon Owren-Koller proviennent de
5 chez Stago (Asnières, France).

Le surnageant de culture concentré est dilué au 1/10 en tampon Owren-Koller avant d'être ajouté au plasma déficient en FX. Le mélange est incubé 240 secondes à 37°C puis le temps de prothrombine (TP) est déclenché par l'ajout de 100 µl de néoplastine.

Les temps de coagulation (en s.) sont transformés en activité spécifique du FX.

10

2– Résultats

Les surnageants concentrés issus des différentes transfections dans CHO ont été évalués pour leur capacité à compenser un déficit en facteur X. Les surnageants ont été incubés dans un plasma déficient en FX et un test TP a été pratiqué. Les temps de coagulation
15 (en s.) ont été transformés en activité spécifique (AS ; en seconde par µg de protéine) puis, le pourcentage d'activité spécifique par rapport au FX de type sauvage a été calculé (figure 5). Les résultats sont cohérents entre les différentes familles. Ce résultat indique que les différences de comportement proviennent principalement des sites de clivage et non de la manière dont ils sont clonés.

20 Les constructions peuvent être classées en trois catégories : une première catégorie dont l'AS est similaire à celle du FX-WT (contient le FX-control+), une seconde catégorie dont l'AS est diminuée par rapport à celle du contrôle (contient FX-IIa, FX-PAR1, FX-PAR1M et FX-Kal3) et une troisième catégorie dont l'activité en absence de FX est supérieure à celle du FX-WT (contient FX-FXIa1 et 2, FX-Kal1 et 2). Il est à noter que
25 la construction FX-Kal2 de la famille 3 n'a pas pu être analysée pour des raisons techniques (* sur le graphe).

*Ces résultats indiquent que les modifications introduites et qui forment la famille 3 (FX-FXIa1 et 2, FX-Kal1 et 2) confèrent aux molécules de facteur X une capacité à coaguler
30 plus efficace que le facteur X de type sauvage en absence de facteur X endogène.*

Exemple 5: Mesure de l'activation des facteurs X variants produits dans CHO-S par la fraction de venin RVV-X

1 – Protocole expérimental

- 5 L'activation des FX variants produits par les cellules CHO-S a été mesurée suite à l'incubation des surnageants de culture en présence de la fraction anti-facteur X du venin de la vipère de Russell (RVV-X). Le facteur X activé de contrôle, la fraction X du venin (RVV-X) et le substrat pNAPEP 1025 proviennent de Haematologic Technologies (Cryopep Montpellier, France).
- 10 L'activation a été étudiée à 37°C dans le tampon suivant : 25 mM HEPES, pH 7.4, 0.175 M NaCl, 5 mM CaCl₂, 5 mg/ml BSA. Pour des concentrations de 0 à 100 nM de FX, une concentration de 200 mU/ml de RVV-X a été utilisée. Après 5 min d'incubation, la réaction est arrêtée dans le tampon 50 mM Tris, pH 8.8, 0.475 M NaCl, 9 mM EDTA. La quantité de FXa générée est suivie en mesurant la vitesse d'hydrolyse
- 15 du substrat pNAPEP 1025 (250 µM) à 405 nm.

2 – Résultats

- Les surnageants de CHO exprimant les variants de la famille 1 ont été incubés avec le RVV-X. La génération de FXa a été mesurée suite à ce traitement à partir de différentes
- 20 concentrations en FX. La présence de FXa est quantifiée par la vitesse d'apparition du produit du pNAPEP 1025 en solution (en mUDO/min). Cette génération est le reflet de la reconnaissance et du clivage des FX par le RVV-X ainsi que de la capacité du FXa généré à reconnaître le substrat du FX. La moyenne des vitesses d'apparition est faite pour les différentes concentrations initiales de FX et cette valeur est ramenée en
- 25 pourcentage de la valeur du FX-WT.

- L'analyse de la famille 1 montre pour partie des résultats similaires avec les résultats obtenus en TP, notamment pour les FX- control+, FX-IIa, FX-Kal1, FX-Kal2 et FX-Kal3 (figure 6). Les molécules FX-XIa1 et 2 montrent une activité mais cette fois-ci non supérieure au FX-WT. En revanche les molécules FX-PAR1 et FX-PAR1M démontrent
- 30 une activité significative et supérieure de celle observée en TP.

Ces résultats indiquent que les FX-PAR1M et FX-Kal2 de la famille 1 sont plus efficacement activés par RVV-X que le FX-WT.

5 Exemple 6 : Mesure en temps de génération de thrombine (TGT) de la capacité procoagulante des facteurs X variants de la famille 2 : Activation de la voie extrinsèque de la coagulation (FT 1pM/PL 4µM) en plasma déficient en FVIII

1 – Protocole expérimental

10 1.1 - Réactifs

Thrombin calibrator, PPP reagent low, CK-Prest, Fluca Kit (Fluo-buffer + Fluo-substrat), le PNP et le plasma déficient en FIX proviennent de chez Stago (Asnières, France). Le plasma déficient en FX provient de chez Cryopep (Montpellier, France). Le plasma déficient en FVIII provient de chez Siemens Healthcare (Marburg, Germany).

15 Le FX humain (cat n° HCX-0050), le FXa humain (cat n° HCXA-0060,) proviennent de chez Haematologic Technologies Inc. (Burlington, Vt, USA). Le Facteur VIII recombinant humain de contrôle provient de chez Baxter (Recombinate) (Maurepas, France).

20 1.2 – Protocole

On considère que 1 unité de FX (1 U /ml) = 10 µg/mL dans le plasma, correspondant à 100% de taux de FX dans le plasma.

Le test de génération de thrombine consiste à activer la coagulation *ex vivo* soit à l'aide d'un mélange de facteur tissulaire et de phospholipides (activation de la voie extrinsèque), soit à l'aide de céphaline (activation de la voie intrinsèque) et à mesurer
25 ensuite la concentration de thrombine générée au cours du temps.

Les tests de génération de thrombine sont réalisés sur 80 µl d'un pool de plasma contenant éventuellement les surnageants de cellules ou les contrôles, en présence de 20 µl de réactif PPP (Stago) contenant au final 1 pM de Facteur Tissulaire (FT) et 4 µM de
30 phospholipides (PL). Différents plasmas peuvent être utilisés, normal, déficient en facteur X, déficient en facteur VIII ou déficient en facteur IX.

La réaction est démarrée par l'ajout de 20 µL de Fluca-kit (substrat + CaCl₂) qui constitue le début de la mesure de l'apparition de thrombine. L'apparition de fluorescence est mesurée sur un fluorimètre de type Fluoroskan Ascent (ThermoLabsystems) à une longueur d'onde d'excitation de 390 nm et à une longueur d'émission de 460 nm. Les thrombinogrammes (courbes représentant l'intensité de fluorescence en fonction du temps) sont ensuite analysés grâce au logiciel Thrombinoscope™ qui transforme la valeur de fluorescence en nM de thrombine par calcul comparatif.

10 **2 – Résultats**

Les surnageants ont été concentrés environ 20 fois sur VivaSpin20-30 kDa Sartorius à 2500g pendant au moins 1h jusqu'à l'obtention de la concentration désirée. Les plasmas Unicalibrator, ainsi que les plasmas déficients en FVIII reconstitué par 0, 0.1 ou 1 U/ml sont utilisés comme témoins.

15 Comme attendu suite à l'activation de la coagulation par le facteur tissulaire, le plasma déficient en FVIII donne le signal le plus faible, correspondant au bruit de fond de l'expérience. Le plasma Unicalibrator fournit un signal plus faible que le plasma déficient en FVIII reconstitué par les concentrations de FVIII (0.1 ou 1 U/ml). En revanche, la reconstitution d'un plasma déficient en FVIII par le FX-WT ne permet pas

20 de générer des quantités suffisantes de thrombine. Cette reconstitution est à peine plus forte que le plasma déficient seul (figure 7, tableau 7).

Nom du produit	Unicalibrator	Déficient FVIII	Déf FVIII + 1 U/ml rFVIII	Déf FVIII + 0,1 U/ml rFVIII	Déf FVIII + FX-WT (5 µg/ml)	Déf FVIII + FX-control+ (5 µg/ml)	Déf FVIII + FX-Ila (5 µg/ml)
Lagtime	7,36	8,19	6,19	8,03	7,86	7,36	7,19
ETP	1271	314	1850,5	1415	1278	1539,5	1618
Peak	135,8	11,89	329,1	154,3	75,96	153,28	184,11
ttPeak	11,87	20,88	8,19	12,03	13,37	11,2	10,7
StartTail	40	56	31	41,5	70,5	44	38,5
Velocity	30,11	0,94	164,55	38,58	13,79	39,92	52,45
Nom du produit	Déf FVIII + FX-PAR1 (5 µg/ml)	Déf FVIII + FX-PAR1M (5 µg/ml)	Déf FVIII + FX-FXla1 (5 µg/ml)	Déf FVIII + FX-FXla2 (5 µg/ml)	Déf FVIII + FX-FXla3 (5 µg/ml)	Déf FVIII + FX-Kal1 (3,5 µg/ml)	Déf FVIII + FX-Kal2 (1,65 µg/ml)
Lagtime	6,86	7,36	6,69	7,69	7,19	7,36	7,69
ETP	1604	1534	1582	1467,5	1504	1408	1438
Peak	201,35	169,82	190,67	151,76	167,8	118,53	162,52
ttPeak	10,03	10,87	10,03	11,37	10,53	11,87	11,03
StartTail	36,5	41,5	38	45	42	52	41,5
Velocity	63,52	48,38	57,09	41,24	50,24	26,28	48,66

Tableau 7 : Paramètres cinétiques issus des thrombinogrammes obtenus à partir de l'ajout de FX ou de ses variants de la famille 2 dans un pool de plasma déficient en facteur VIII suite à l'activation par du facteur tissulaire (1 pM)

Les paramètres cinétiques des thrombinogrammes de la figure 7 sont présentés dans le tableau. Lagtime, temps de latence (min); ETP, thrombine totale générée (nM) ; Peak, hauteur du pic se thrombine (nM); ttPEAK, temps du maximum au pic (min); Start Tail, temps du démarrage de la vélocité (min) ; Velocity, vitesse maximale de génération de thrombine (nM/min).

- Toutes les molécules de FX variants donnent un signal plus important que le FX-WT, suggérant que leur capacité à générer de la thrombine en absence de FVIII est significativement augmentée par rapport au FX-WT (tableau 7). Les célérités des FX mutants de la famille 2 oscillent entre 2 et 4.5X celle du FX-WT (figure 9, tableau 7)).
- 5 A noter qu'une célérité de 2X est obtenue avec une quantité de FX-Kal2 30% plus faible (3.5 µg/ml au lieu de 5 µg/ml).

Les mutants permettant de générer les quantités de thrombine les plus importantes en absence de FVIII sont dans l'ordre FX-PAR1, FX-FXla1, FX-IIa et FX-Kal1.

10

Exemple 7 : Mesure en temps de génération de thrombine (TGT) de la capacité procoagulante des facteurs X variants : voie intrinsèque de la coagulation (céphaline seule) en plasma déficient en FVIII

15

1 – Protocole expérimental

Les réactifs, l'automate et le protocole expérimental sont identiques à ceux décrits dans l'exemple 6.

- Les tests de génération de thrombine sont réalisés sur 80 µl d'un pool de plasma normal contenant éventuellement les surnageants de cellules et les contrôles en présence de 20 µl de céphaline (CK-Prest reconstitué avec 1 mL d'H₂O distillée) et de 20 µL fluca-kit (substrat + CaCl₂). Les plasmas utilisés sont un plasma normal et un plasma déficient en facteur VIII.

25

2 – Résultats

Les surnageants utilisés dans l'exemple 6 ont été analysés en TGT après activation par la céphaline en utilisant les mêmes témoins.

- Les témoins se comportent de manière attendue, le plasma déficient en FVIII ne permet pas de génération de IIa et un gradient d'efficacité est retrouvé en augmentant la dose de FVIII (tableau 8).

30

Nom du produit	Unicalibrator	Déficient FVIII	Déf FVIII + 1 U/ml rFVIII	Déf FVIII + 0,1 U/ml rFVIII	Déf FVIII + FX-WT (5 µg/ml)	Déf FVIII + FX-control+ (5 µg/ml)	Déf FVIII + FX-Ila (5 µg/ml)
Lagtime	19,04	35,73	8,69	20,54	23,88	16,37	13,03
ETP	1149,5	0	1417,5	1089,5	589	1134,5	1284,5
Peak	271,07	3,48	292,17	171,4	35,98	102,19	235,25
tiPeak	21,04	70,46	10,53	24,05	34,4	24,05	16,04
StartTail	36	0	29,5	41,5	67,5	47	33,5
Velocity	135,54	0,10	158,79	48,83	3,42	13,31	78,16
Nom du produit	Déf FVIII + FX-PAR1 (5 µg/ml)	Déf FVIII + FX-PAR1M (5 µg/ml)	Déf FVIII + FX-FXIa1 (5 µg/ml)	Déf FVIII + FX-FXIa2 (5 µg/ml)	Déf FVIII + FX-FXIa3 (5 µg/ml)	Déf FVIII + FX-Kal1 (3,5 µg/ml)	Déf FVIII + FX-Kal2 (1,65 µg/ml)
Lagtime	15,53	17,54	16,37	19,54	18,37	20,71	19,88
ETP	950,5	892,5	968	805	869	844,5	814
Peak	87,25	71,5	80,35	59,78	68,08	57,78	59,2
tiPeak	22,88	25,72	24,05	28,22	26,39	30,23	28,89
StartTail	46,5	51,5	49,5	57,5	54,5	61	58,5
Velocity	11,87	8,74	10,46	6,89	8,49	6,07	6,57

Tableau 8 : Paramètres cinétiques issus des thrombinogrammes obtenus à partir de l'ajout de FX ou de ses variants de la famille 2 dans un pool de plasma déficient en facteur VIII suite à l'activation par la céphaline

5 Les paramètres cinétiques des thrombinogrammes de la figure 8 sont présentés dans le tableau. Lagtime, temps de latence (min); ETP, thrombine totale générée (nM) ; Peak, hauteur du pic se thrombine (nM); tiPEAK, temps du maximum au pic (min); Start Tail, temps du démarrage de la vélocité (min) ; Velocity, vitesse maximale de génération de thrombine (nM/min).

L'analyse de la famille 2 montre comme attendu que le FX de type sauvage est la molécule de FX la moins active montrant une faible activité résiduelle (3.4 nM/s). Toutes les autres molécules montrent une capacité à générer de la thrombine plus importante (tableau 8). Les molécules FX-Kal-1 à 3, FX-FXI-2 et FX-PAR1M
5 montrent une activité un peu plus forte (6.6 à 8.7 nM/s) mais moins que les constructions FX- control+, FX-PAR1 et FX-FXI-1 (10.5-13.3 nM/s). En revanche la molécule FX-IIa permet d'obtenir un signal compris entre les valeurs obtenues pour 0.1 et 1 U/ml de FVIII (78.2 nM/s) corrigeant de manière très efficace la déficience en FVIII. Ces différences de célérités montrent pour les mutants une efficacité supérieure
10 de 1.8X (mais pour le mutant FX-Kal2 à 3.5 µg/ml) à 22.8X (pour le mutant FX-IIa) à générer de la thrombine (figure 9).

En conclusion, plusieurs mutants de FX ont la capacité à restaurer la coagulation en absence de FVIII suite à l'activation du plasma par le facteur tissulaire et la céphaline.

15

Exemple 8: Mesure en temps de génération de thrombine (TGT) de la capacité procoagulante des facteurs X variants de la famille 2: Activation de la voie extrinsèque de la coagulation (FT 1pM/PL 4µM) en plasma déficient en FIX

20

1 – Protocole expérimental

Les réactifs, l'automate et le protocole expérimental sont identiques à ceux décrits dans l'exemple 6.

Les tests de génération de thrombine sont réalisés sur 80 µl d'un pool de plasma normal contenant éventuellement les surnageants de cellules et les contrôles en présence de 1
25 pM de Facteur Tissulaire (FT) et 4 µM de phospholipides (PL) et de 20µL fluca-kit (substrat + CaCl₂). Les plasmas utilisés sont soit normal soit déficient en facteur IX.

2 – Résultats

30 Les surnageants utilisés dans l'exemple 6 ont été analysés en TGT après activation par le facteur tissulaire en utilisant comme témoins, un plasma normal (Unicalibrator) ou un

plasma déficient en FIX reconstitué par 0, 0.1 ou 1 U/ml de FIX plasmatique (figure 10, tableau 9).

Le plasma déficient en FIX est négatif (il ne permet pas de génération de IIa) et sa reconstitution avec du FIX lui permet de générer des quantités importante de thrombine.

- 5 Il n'y a cependant pas de différence quantitative entre les deux concentrations de FIX utilisées, ce qui suggère qu'elles permettent de former toutes les deux une quantité maximale de IIa (tableau 9).

Nom du produit	Unicalibrator	Déficient FIX	Déf FIX + FIX 1 U/ml	Déf FIX + FIX 0,1 U/ml	Déf FVIII + FX-WT (5 µg/ml)	Déf FVIII + FX-control+ (5 µg/ml)	Déf FVIII + FX-IIa (5 µg/ml)
Lagtime	7,33	4,5	4,83	5	6,67	6,67	6,67
ETP	1216	295	1645	1623,5	1251	1533	1540,5
Peak	97,46	9,74	292,04	263,36	59,18	112,48	138,17
ttPeak	12,83	19	7,67	7,83	14	12,83	12,5
StartTail	47	68	23,5	24,5	66	46,5	38
Velocity	17,72	0,67	102,83	100,13	8,07	18,26	23,70

Nom du produit	Déf FVIII + FX-PAR1 (5 µg/ml)	Déf FVIII + FX-PAR1M (5 µg/ml)	Déf FVIII + FX-FXla1 (5 µg/ml)	Déf FVIII + FX-FXla2 (5 µg/ml)	Déf FVIII + FX-FXla3 (5 µg/ml)	Déf FVIII + FX-Ka11 (3,5 µg/ml)	Déf FVIII + FX-Ka12 (1,65 µg/ml)
Lagtime	6,67	6,67	6,5	7	6,67	6,33	7
ETP	1483	1506	1580,5	1446	1457,5	1523,5	1483
Peak	160,46	125,64	125,15	97,1	123,59	85,83	103,73
ttPeak	11	11,83	11,83	12,67	11,67	13,33	12,83
StartTail	35,5	43	43,5	54,5	43	61,5	60
Velocity	37,06	24,35	23,48	17,13	24,72	12,26	17,79

Tableau 9 : Paramètres cinétiques issus des thrombinogrammes obtenus à partir de l'ajout de FX ou de ses variants de la famille 2 dans un pool de plasma déficient en facteur IX suite à l'activation par du facteur tissulaire (1 pM)

5 Les paramètres cinétiques des thrombinogrammes de la figure 10 sont présentés dans le tableau. Lagtime, temps de latence (min); ETP, thrombine totale générée (nM) ; Peak, hauteur du pic se thrombine (nM); ttPEAK, temps du maximum au pic (min); Start Tail, temps du démarrage de la vélocité (min) ; Velocity, vitesse maximale de génération de thrombine (nM/min).

Dans cet essai, tous les mutants permettent de générer des quantités de IIa plus importantes que le FX-WT. Les différences sont cependant moins fortes qu'en absence de FVIII : ainsi la célérité varie de 1,50X (pour FX-Kal2 à 3.5 µg/ml) à 4,60X pour (FX-PAR1). En plus de ce mutant, les molécules FX-IIa, FX-PAR1M, FX-FXIa1 et
5 FX-Kal1 sont les plus efficaces (figure 12, tableau 9).

Exemple 9: Mesure en temps de génération de thrombine (TGT) de la capacité procoagulante des facteurs X variants de la famille 2: Activation de la voie
10 **intrinsèque de la coagulation (céphaline) en plasma déficient en FIX**

1 – Protocole expérimental

Les réactifs, l'automate et le protocole expérimental sont identiques à ceux décrits dans l'exemple 6.

15 Les tests de génération de thrombine sont réalisés sur 80 µl d'un pool de plasma normal contenant éventuellement les surnageants de cellules et les contrôles en présence de céphaline (CK-Prest reconstitué avec 1 mL d'H₂O distillée) et de 20 µL fluca-kit (substrat + CaCl₂). Les plasmas utilisés sont soit normal soit déficient en facteur IX.

20 2 – Résultats

Les surnageants utilisés dans l'exemple 6 ont été analysés en TGT après activation par la céphaline en utilisant comme témoins, un plasma normal (Unicalibrator) et un plasma déficient en FIX reconstitué par 0, 0.1 ou 1 U/ml de FIX plasmatique (figure 11, tableau 10).

25 Le plasma déficient en FIX est négatif (il ne permet pas de génération de IIa) et sa reconstitution avec du FIX lui permet de générer des quantités importantes de thrombine. Il n'y a cependant pas de différence quantitative entre les deux concentrations de FIX utilisées, ce qui suggère qu'elles forment une quantité maximale de IIa (tableau 10).

Nom du produit	Unicalibrator	Déficient FIX	Déf FIX + FIX 1 U/ml	Déf FIX + FIX 0,1 U/ml	Déf FVIII + FX-WT (5 µg/ml)	Déf FVIII + FX-control+ (5 µg/ml)	Déf FVIII + FX-IIa (5 µg/ml)
Lagtime	29,17	0	13	13,33	36,67	28	22,17
ETP	1209	0	1539,5	1521,5	0	734	1528,5
Peak	252,9	0	378,46	370,94	12,79	62,02	240,9
ttPeak	31,67	0	14,67	15	51,83	36,83	26,83
StartTail	47	0	30	30,5	0	57	40
Velocity	101,16	0,00	226,62	222,12	0,84	7,02	51,70
Nom du produit	Déf FVIII + FX-PAR1 (5 µg/ml)	Déf FVIII + FX-PAR1M (5 µg/ml)	Déf FVIII + FX-FXla1 (5 µg/ml)	Déf FVIII + FX-FXla2 (5 µg/ml)	Déf FVIII + FX-FXla3 (5 µg/ml)	Déf FVIII + FX-Ka11 (3,5 µg/ml)	Déf FVIII + FX-Kal2 (1,65 µg/ml)
Lagtime	22,17	25,33	25,5	29,5	26,67	29,33	28,5
ETP	452,5	407	370,5	327,5	385	319,5	310,5
Peak	31,86	25,82	22,34	17,99	22,39	17,05	17,53
ttPeak	32,33	36,17	37	42	38	41,67	39,83
StartTail	54,5	62,5	63	70	67,5	70	69,5
Velocity	3,14	2,38	1,94	1,44	1,98	1,38	1,55

Tableau 10 : Paramètres cinétiques issus des thrombinogrammes obtenus à partir de l'ajout de FX ou de ses variants de la famille 2 dans un pool de plasma déficient en facteur IX suite à l'activation par la céphaline

5 Les paramètres cinétiques des thrombinogrammes de la figure 11 sont présentés dans le tableau. Lagtime, temps de latence (min); ETP, thrombine totale générée (nM) ; Peak, hauteur du pic se thrombine (nM); ttPEAK, temps du maximum au pic (min); Start Tail, temps du démarrage de la vélocité (min) ; Velocity, vitesse maximale de génération de thrombine (nM/min).

Suite à l'induction de la coagulation par la céphaline seulement trois molécules permettent de générer significativement plus de thrombine que le FX-WT, se sont les FX-IIa, FX- control+ et FX-PAR1 avec une célérité 61X, 8,3X et 3,8X plus forte que celle du FX-WT respectivement (figure 12, tableau 10). Les autres mutants ont toutefois
5 des célérités plus importantes que celle du FX-WT.

En conclusion, tous les mutants étudiés permettent de générer de la thrombine en absence de FIX et ce quelle que soit l'induction utilisée. Les mutants FX-IIa, FX-control+ et FX-PAR1 sont les plus efficaces.

10

Exemple 10: Activation par la thrombine des facteurs X variants de la famille 2 et de type sauvage produits dans HEK

15 1 – Protocole expérimental

L'activation des FX variants produits par les cellules HEK en présence de Vitamine K époxyde réductase (VKOR) a été mesurée suite à l'incubation des surnageants de culture en présence de thrombine. Le facteur X activé de contrôle, la thrombine et le substrat Pefachrome FXa8595 proviennent de Haematologic Technologies (Cryoep
20 Montpellier, France).

Les phospholipides proviennent de Diagnostica Stago (Asnières, France).

L'activation a été étudiée à 37°C dans le tampon suivant : 25 mM HEPES, pH 7.4, 0.175 M NaCl, 5 mM CaCl₂, 5 mg/ml BSA. Pour des concentrations de 42,5 et 85 nM de FX, une concentration de 10 nM de thrombine et 4 µM de phospholipides ont été
25 utilisées. Après 1 heure d'incubation à 37°C, la quantité de FXa générée est suivie en mesurant la vitesse d'hydrolyse du substrat Pefachrome FXa8595 (250 µM) à 405 nm.

2 – Résultats

Afin de vérifier que les sites destinés à être clivés par la thrombine sont bien reconnus
30 par cette enzyme, les surnageants concentrés du FX-WT, FX- control+ et FX-IIa ont été incubés en présence de thrombine. L'apparition de FXa a été mesurée par l'apparition du produit de dégradation du substrat (figure 13). En contrôle positif, le FXa

plasmatique a été utilisé. La cinétique d'apparition du produit avec les mutants ne peut pas être directement comparée avec celle du FXa car ces molécules ont besoin d'être activées avant de libérer de l'activité. Par ailleurs, les sites de clivage pour la thrombine étant composites, l'activation de molécules n'est pas forcément optimale. En effet, toutes les molécules ont conservé la zone originale en aval du site de clivage, seules les parties en amont sont modifiées. La cinétique de dégradation du substrat du FXa des molécules recombinantes est par conséquent différente de celle du FXa.

Les résultats obtenus confirment les données obtenues en TGT avec, comme attendu, les FX plasmatique et WT négatifs car sans site de reconnaissance à la thrombine. Les FX-IIa et FX-control+ sont en revanche capables d'être activés par la thrombine et de libérer du FXa. Comme en mesure de TGT, le FX-IIa est plus efficacement activé que le FX- control+.

Exemple 11 : Mesure en temps de génération de thrombine (TGT) de la capacité procoagulante des facteurs X variants de la famille 1: voie extrinsèque de la coagulation (FT 1pM/PL 4µM) en plasma déficient en FVIII

1 – Protocole expérimental

Les tests de génération de thrombine sont réalisés sur 80 µl d'un pool de plasma contenant éventuellement les surnageants de cellules ou les contrôles, en présence de 20 µl de réactif PPP (Stago) contenant au final 1 pM de Facteur Tissulaire (FT) et 4 µM de phospholipides (PL). Différents plasmas sont utilisés, normal et déficient en facteur VIII.

La réaction est démarrée par l'ajout de 20 µL de Fluca-kit (substrat + CaCl₂) qui constitue le début de la mesure de l'apparition de thrombine. L'apparition de fluorescence est mesurée sur un fluorimètre de type Fluoroskan Ascent (ThermoLabsystems) à une longueur d'onde d'excitation de 390 nm et à une longueur d'émission de 460 nm. Les thrombinogrammes (courbes représentant l'intensité de fluorescence en fonction du temps) sont ensuite analysés grâce au logiciel Thrombinoscope™ qui transforme la valeur de fluorescence en nM de thrombine par calcul comparatif.

2 – Résultats

Les surnageants de la famille 1 issus d'une transfection de cellules HEK293F en présence de VKOR ont été analysés en TGT après activation par le facteur tissulaire en utilisant les témoins déjà décrits. Les témoins (plasma normal, plasma déficient en FVIII reconstitué ou non par du FVIII recombinant) se comportent de manière attendue. En revanche le FX-WT donne un signal modéré mais supérieur à l'attendu (figures 14 et 16 ; tableau 11). Sa vitesse moyenne (59 nM/min) est toutefois dépassée par celles de plusieurs mutants notamment les FX-FXIa1/2, les FX-Ka1/2 et les FX-control+ et FX-Ila qui ont une vitesse d'au moins 130% celle du contrôle.

Groupname	Unicalibrator	Déficient FVIII	Déf FVIII + Recombinate 1 U/ml	Déf FVIII + Recombinate 0,1 U/ml	Déf FVIII + FX-WT 7,5 µg/ml	Déf FVIII + FX-control+ 7,5 µg/ml	Déf FVIII + FX-IIa 7,5 µg/ml
Lagtime	8	9,33	7,17	9,33	7,83	7	7,83
ETP	1325,5	0	1795	1334,5	1549,5	1619	1652
Peak	136,55	12,25	291,64	125,53	175,6	230,11	240,61
tiPeak	12,5	29,67	9,5	13,67	11,17	10	10,83
StartTail	40	0	33	46,5	40	33	33,5
Velocity	30,34	0,60	125,17	28,92	52,57	76,70	80,20
Groupname	Déf FVIII + FX- PAR1 7,5 µg/ml	Déf FVIII + FX-PAR1M 7,5 µg/ml	Déf FVIII + FX-FXla1 7,5 µg/ml	Déf FVIII + FX-FXla2 7,5 µg/ml	Déf FVIII + FX-Kal1 7,5 µg/ml	Déf FVIII + FX-Kal2 7,5 µg/ml	Déf FVIII + FX-WT 7,5 µg/ml
Lagtime	8,5	7,5	5,17	5,83	6,67	6	7,83
ETP	1337	1562	1704	1678,5	1628	1642,5	1569,5
Peak	112,83	196,08	310,73	308,24	252,3	274,07	199,2
tiPeak	13	10,67	7,17	7,67	9,17	8,33	10,83
StartTail	50	36,5	28,5	29	32	30,5	36,5
Velocity	25,07	61,85	155,37	167,52	100,92	117,63	66,40

Tableau 11 : Paramètres cinétiques issus des thrombinogrammes obtenus à partir de l'ajout de FX ou de ses variants de la famille 1 dans un pool de plasma déficient en facteur VIII suite à l'activation par le facteur tissulaire

5 Les paramètres cinétiques des thrombinogrammes de la figure 14 sont présentés dans le tableau. Lagtime, temps de latence (min); ETP, thrombine totale générée (nM) ; Peak, hauteur du pic se thrombine (nM); tiPEAK, temps du maximum au pic (min); Start Tail, temps du démarrage de la vélocité (min) ; Velocity, vitesse maximale de génération de thrombine (nM/min).

Exemple 12 : Mesure en temps de génération de thrombine (TGT) de la capacité procoagulante des facteurs X variants de la famille 1: voie intrinsèque de la coagulation (céphaline seule) en plasma déficient en FVIII

5

1 – Protocole expérimental

Les réactifs, l'automate et le protocole expérimental sont identiques à ceux décrits dans l'exemple 6.

Les tests de génération de thrombine sont réalisés sur 80 µl d'un pool de plasma contenant éventuellement les surnageants de cellules et les contrôles en présence de 20 µl de céphaline (CK-Prest reconstitué avec 1 mL d'H₂O distillée) et de 20 µL fluca-kit (substrat + CaCl₂). Les plasmas utilisés sont un plasma normal et un plasma déficient en facteur VIII.

15

2 – Résultats

Les surnageants de la famille 1 issus d'une transfection de cellules HEK293F en présence de VKOR ont été analysés en TGT après activation par la céphaline en utilisant les témoins déjà décrits.

Les témoins se comportent de manière attendue, le plasma déficient en FVIII est négatif (il ne permet pas de génération de IIa) et un gradient d'efficacité est retrouvé en augmentant la dose de FVIII (figure 15 ; tableau 12). Dans cet essai, la supplémentation en FX (2 essais ont été pratiqués) ne permet pas de générer des quantités significatives de thrombine (vélocités de 6,06 et 7,65 nM/min). En revanche les mutants FX-IIa, FX-FXIa1 et 2 et FX-control+ de la famille 1 permettent de générer des quantités significativement supérieures de thrombine d'au moins 3,5X celle du contrôle (figures 15 et 16 ; tableau 12).

Groupname	Unicalibrator	Déficient FVIII	Déf FVIII + Recombinate 1 U/ml	Déf FVIII +Recombinate 0,1 U/ml	Déf FVIII + FX-WT 7,5 µg/ml	Déf FVIII +FX-control+ 7,5 µg/ml	Déf FVIII + FX-Ila 7,5 µg/ml
Lagtime	19,33	15,5	7,67	18	28,67	18,17	13,83
ETP	1347,5	0	1803	1442,5	938	1359	1543,5
Peak	304,16	0,48	336,48	278,12	56,51	167,22	295,77
tiPeak	21,5	38,33	9,33	20,17	38	23,67	16,17
StartTail	37	0	32	41,5	71	44	36,5
Velocity	140,17	0,02	202,70	128,17	6,06	30,40	126,40

Groupname	Déf FVIII + FX-PAR1 7,5 µg/ml	Déf FVIII + FX-PAR1M 7,5 µg/ml	Déf FVIII + FX-FXla1 7,5 µg/ml	Déf FVIII + FX-FXla2 7,5 µg/ml	Déf FVIII + FX-Kal1 7,5 µg/ml	Déf FVIII + FX-Kal2 7,5 µg/ml	Déf FVIII + FX-Kal3 7,5 µg/ml	Déf FVIII + FX-WT 7,5 µg/ml
Lagtime	30,83	25,5	14	15,17	21,33	18	16	26,17
ETP	853	1052,5	1359,5	1318,5	1144	1225	1227	1035
Peak	50,44	76,26	161,43	145,34	89,5	106,56	115,43	67,55
tiPeak	41,17	33,83	19	21	28,5	24,5	22,33	35
StartTail	71	63	41,5	44	57,5	52	48	67
Velocity	4,88	9,15	32,29	24,93	12,48	16,39	18,24	7,55

Tableau 12 : Paramètres cinétiques issus des thrombinogrammes obtenus à partir de l'ajout de FX ou de ses variants de la famille 1 dans un pool de plasma déficient en facteur VIII suite à l'activation par la céphaline

Les paramètres cinétiques des thrombinogrammes de la figure 15 sont présentés dans le tableau. Lagtime, temps de latence (min); ETP, thrombine totale générée (nM) ; Peak, hauteur du pic se thrombine (nM); tiPEAK, temps du maximum au pic (min); Start Tail, temps du démarrage de la vélocité (min) ; Velocity, vitesse maximale de génération de thrombine (nM/min).

Exemple 13 : Mesure en temps de génération de thrombine (TGT) de la capacité procoagulante des facteurs X variants de la famille 1: voie extrinsèque de la coagulation (FT 1pM/PL 4μM) en plasma déficient en FIX

5 **1 – Protocole expérimental**

Les réactifs, l'automate et le protocole expérimental sont identiques à ceux décrits dans l'exemple 6.

Les tests de génération de thrombine sont réalisés sur 80 μl d'un pool de plasma contenant éventuellement les surnageants de cellules et les contrôles en présence de 20
10 μl de réactif PPP (Stago) contenant au final 1 pM de Facteur Tissulaire (FT) et 4 μM de phospholipides (PL) et de 20 μL fluca-kit (substrat + CaCl₂). Les plasmas utilisés sont un plasma normal et un plasma déficient en facteur IX.

2 – Résultats

15 Les surnageants de la famille 1 issus d'une transfection de cellules HEK293F en présence de VKOR ont été analysés en TGT en plasma déficient en FIX après activation par le facteur tissulaire en utilisant les témoins déjà décrits. Les témoins (plasma normal, plasma déficient en FIX reconstitué ou non par du FIX plasmatique (à 10 ou 100%) se comportent de manière attendue. En revanche le FX-WT donne un
20 signal modéré mais supérieur à l'attendu (figure 17 ; tableau 13). Sa vitesse moyenne (23 nM/min) est toutefois dépassée par celles de tous les mutants sauf le FX-PAR1. Notamment les FX-FXIa1/2, les FX-Ka2/3 et les FX-control+ et FX-IIa qui ont une vitesse d'au moins 150% celle du contrôle.

Groupname	Unicalibrator	Déficient FIX	Déf FIX + FIX 1 U/ml	Déf FIX + FIX 0,1 U/ml	Déf FIX + FX-WT 7,5 µg/ml	Déf FIX + FX-control + 7,5 µg/ml	Déf FIX + FX-IIa 7,5 µg/ml	
Lagtime	8,33	5,33	5,33	7,17	7,33	6,83	7,5	
ETP	1345,5	238,5	1641	1063,5	1471	1550	1543	
Peak	134,27	7,23	266,66	82,84	110,99	173,16	197,8	
ttPeak	12,67	22,5	8,33	13,33	12,67	11,83	12,33	
StartTail	41	70	26	46	48,5	32,5	31	
Velocity	30,94	0,42	88,89	13,45	20,78	34,63	40,95	
Groupname	Déf FIX+ FX-PAR1 7,5 µg/ml	Déf FIX+ FX-PAR1M 7,5 µg/ml	Déf FIX + FX-FXla1 7,5 µg/ml	Déf FIX + FX-FXla2 7,5 µg/ml	Déf FIX + FX-Kal1 7,5 µg/ml	Déf FIX + FX-Kal2 7,5 µg/ml	Déf FIX + FX-Kal3 1,6 µg/ml	Déf FIX + FX-WT 7,5 µg/ml
Lagtime	7,5	7,17	5,5	6,17	6,5	6,5	6	7,33
ETP	1366	1472,5	1589,5	1583	1543	1549	1594	1472
Peak	67,56	133,76	267,69	257,72	179,29	220	242,54	126,29
ttPeak	14,17	11,67	8,33	8,83	10,5	9,83	9	12,17
StartTail	71	40,5	27	27,5	33	29,5	28,5	43
Velocity	10,13	29,72	94,59	96,89	44,82	66,07	80,85	26,09

Tableau 13 : Paramètres cinétiques issus des thrombinogrammes obtenus à partir de l'ajout de FX ou de ses variants de la famille 1 dans un pool de plasma déficient en facteur IX suite à l'activation par le facteur tissulaire

Les paramètres cinétiques des thrombinogrammes de la figure 17 sont présentés dans le tableau. Lagtime, temps de latence (min); ETP, thrombine totale générée (nM) ; Peak, hauteur du pic se thrombine (nM); ttPEAK, temps du maximum au pic (min); Start Tail, temps du démarrage de la vélocité (min) ; Velocity, vitesse maximale de génération de thrombine (nM/min).

Exemple 14 : Mesure en temps de génération de thrombine (TGT) de la capacité procoagulante des facteurs X variants de la famille 1: voie intrinsèque de la coagulation (céphaline) en plasma déficient en FIX

5 **1 – Protocole expérimental**

Les réactifs, l'automate et le protocole expérimental sont identiques à ceux décrits dans l'exemple 6.

Les tests de génération de thrombine sont réalisés sur 80 µl d'un pool de plasma contenant éventuellement les surnageants de cellules et les contrôles en présence de 20
10 µl de céphaline (CK-Prest reconstitué avec 1 mL d'H₂O distillée) et de 20 µL fluca-kit (substrat + CaCl₂). Les plasmas utilisés sont un plasma normal et un plasma déficient en facteur IX.

2 – Résultats

15 Les surnageants de la famille 1 issus d'une transfection de cellules HEK293F en présence de VKOR ont été analysés en TGT après activation par la céphaline en utilisant les témoins déjà décrits.

Les témoins se comportent de manière attendue, le plasma déficient en FIX est négatif (il ne permet pas de génération de IIa) et un gradient d'efficacité est retrouvé en
20 augmentant la dose de FIX (figure 18 ; tableau 14). Dans cet essai, la supplémentation en FX (2 essais ont été pratiqués) ne permet pas de générer des quantités significatives de thrombine (vélocités de 1,24 et 1,53 nM/min). En revanche les mutants FX-IIa, FX-FXIa1 et 2 et FX-control+ de la famille 1 permettent de générer des quantités significativement supérieures de thrombine d'au moins 4,7 X celle du contrôle à 55X
25 (figures 18 et 19; tableau 14).

Groupname	Unicalibrator	Déficient FIX	Déf FIX + FIX 1 U/ml	Déf FIX + FIX 0,1 U/ml	Déf FIX + FX-WT 7,5 µg/ml	Déf FIX + FX-control+ 7,5 µg/ml	Déf FIX + FX-IIa 7,5 µg/ml
Lagtime	18,33	42,5	13,67	31,83	30,5	22,33	16,33
ETP	1383,5	0	1529	899,5	316,5	1147	1448,5
Peak	311,19	0,49	369,87	107,53	16,16	120,28	279,02
tiPeak	20,33	57,33	15,33	36,33	43,5	29	20
StartTail	36,5	0	31	55	71	44,5	32,5
Velocity	155,60	0,03	222,81	23,90	1,24	18,03	76,03

Groupname	Déf FIX+ FX-PAR1 7,5 µg/ml	Déf FIX+ FX-PAR1M 7,5 µg/ml	Déf FIX + FX-FXla1 7,5 µg/ml	Déf FIX + FX-FXla2 7,5 µg/ml	Déf FIX + FX-Kal1 7,5 µg/ml	Déf FIX + FX-Kal2 7,5 µg/ml	Déf FIX + FX-Kal3 1,6 µg/ml	Déf FIX + FX-WT 7,5 µg/ml
Lagtime	37,17	28,17	15,67	17	23	18,5	16	27,5
ETP	237	402,5	686	626,5	429,5	498,5	496	341
Peak	12,51	24,06	59,45	53,54	28,73	36,12	38,66	18,68
tiPeak	51,17	39,67	23,5	25,17	33	28,17	25,33	39,67
StartTail	71	68,5	44,5	45,5	55	48,5	51	70
Velocity	0,89	2,09	7,59	6,55	2,87	3,74	4,14	1,53

Tableau 14 : Paramètres cinétiques issus des thrombinogrammes obtenus à partir de l'ajout de FX ou de ses variants de la famille 1 dans un pool de plasma déficient en facteur IX suite à l'activation par la céphaline

5 Les paramètres cinétiques des thrombinogrammes de la figure 18 sont présentés dans le tableau. Lagtime, temps de latence (min); ETP, thrombine totale générée (nM) ; Peak, hauteur du pic se thrombine (nM); tiPEAK, temps du maximum au pic (min); Start Tail, temps du démarrage de la vélocité (min) ; Velocity, vitesse maximale de génération de thrombine (nM/min).

Exemple 15 : Mesure en temps de génération de thrombine (TGT) de la capacité procoagulante des facteurs X variants de la famille 3: voie extrinsèque de la coagulation (FT 1pM/PL 4µM) en plasma déficient en FVIII

5 **1 – Protocole expérimental**

Les tests de génération de thrombine sont réalisés sur 80 µl d'un pool de plasma contenant éventuellement les surnageants de cellules ou les contrôles, en présence de 20 µl de réactif PPP (Stago) contenant au final 1 pM de Facteur Tissulaire (FT) et 4 µM de phospholipides (PL). Différents plasmas sont utilisés, normal et déficient en facteur

10 VIII.

La réaction est démarrée par l'ajout de 20 µL de Fluca-kit (substrat + CaCl₂) qui constitue le début de la mesure de l'apparition de thrombine. L'apparition de fluorescence est mesurée sur un fluorimètre de type Fluoroskan Ascent (ThermoLabsystems) à une longueur d'onde d'excitation de 390 nm et à une longueur

15 d'émission de 460 nm. Les thrombinogrammes (courbes représentant l'intensité de fluorescence en fonction du temps) sont ensuite analysés grâce au logiciel Thrombinoscope™ qui transforme la valeur de fluorescence en nM de thrombine par calcul comparatif.

20 **2 – Résultats**

Les surnageants de la famille 3 issus d'une transfection de cellules HEK293F en présence de VKOR ont été analysés en TGT après activation par le facteur tissulaire en utilisant les témoins déjà décrits. Les témoins (plasma normal, plasma déficient en FVIII reconstitué ou non par du FVIII recombinant) se comportent de manière attendue.

25 En revanche le FX-WT donne un signal modéré mais supérieur à l'attendu (figures 20 et 21 ; tableau 15). Sa vitesse moyenne (59 nM/min) est toutefois dépassée par celles de plusieurs mutants notamment les FX-FXIa1/2, les FX-Ka11/2/3 et les FX-control+ et FX-IIa dont les vitesses sont au-dessus de 78 nM/min (soit au moins 130% du contrôle).

Groupname	Unicalibrator	Déficient FVIII	Déf FVIII + Recombinate 1 U/ml	Déf FVIII +Recombinate 0,1 U/ml	Déf FVIII + FX-WT 7,5 µg/ml	Déf FVIII +FX-control+ 7,5 µg/ml	Déf FVIII + FX-IIa 7,5 µg/ml	
Lagtime	8	9,33	7,17	9,33	7,83	7,17	7,5	
ETP	1325,5	0	1795	1334,5	1549,5	1641	1683,5	
Peak	136,55	12,25	291,64	125,53	175,6	233,75	234,31	
ttPeak	12,5	29,67	9,5	13,67	11,17	10,17	10,5	
StartTail	40	0	33	46,5	40	34,5	34,5	
Velocity	30,34	0,60	125,17	28,92	52,57	77,92	78,10	
Groupname	Déf FVIII + FX-PAR1 7,5 µg/ml	Déf FVIII + FX-PAR1M 7,5 µg/ml	Déf FVIII + FX-FXIa1 7,5 µg/ml	Déf FVIII + FX-FXIa2 µg/ml	Déf FVIII + FX-Ka11 7,5 µg/ml	Déf FVIII + FX-Ka12 7,5 µg/ml	Déf FVIII + FX-Ka13 1,65 µg/ml	Déf FVIII + FX-WT 7,5 µg/ml
Lagtime	6,5	8,5	5,67	6,33	8,33	6	6,33	7,83
ETP	1665	1565	1724	1724	1560	1803	1715,5	1589,5
Peak	225,48	189,25	301,86	281,98	213,57	303,58	270,6	199,2
ttPeak	9,5	11,83	7,67	8,5	11	8	9	10,83
StartTail	35	39,5	31	31	37	31	32	36,5
Velocity	75,16	56,83	150,93	129,94	79,99	151,79	101,35	66,40

Tableau 15 : Paramètres cinétiques issus des thrombinogrammes obtenus à partir de l'ajout de FX ou de ses variants de la famille 3 dans un pool de plasma déficient en facteur VIII suite à l'activation par le facteur tissulaire

Les paramètres cinétiques des thrombinogrammes de la figure 20 sont présentés dans le tableau. Lagtime, temps de latence (min); ETP, thrombine totale générée (nM) ; Peak, hauteur du pic se thrombine (nM); ttPEAK, temps du maximum au pic (min); Start Tail, temps du démarrage de la vélocité (min) ; Velocity, vitesse maximale de génération de thrombine (nM/min).

Exemple 14 : Mesure en temps de génération de thrombine (TGT) de la capacité procoagulante des facteurs X variants de la famille 3: voie intrinsèque de la coagulation (céphaline seule) en plasma déficient en FVIII

5 **1 – Protocole expérimental**

Les réactifs, l'automate et le protocole expérimental sont identiques à ceux décrits dans l'exemple 6. Les tests de génération de thrombine sont réalisés sur 80 µl d'un pool de plasma contenant éventuellement les surnageants de cellules et les contrôles en présence de 20 µl de céphaline (CK-Prest reconstitué avec 1 mL d'H₂O distillée) et de 20 µL
10 fluca-kit (substrat + CaCl₂). Les plasmas utilisés sont un plasma normal et un plasma déficient en facteur VIII.

2 – Résultats

Les surnageants de la famille 3 issus d'une transfection de cellules HEK293F en
15 présence de VKOR ont été analysés en TGT après activation par la céphaline en utilisant les témoins déjà décrits.

Les témoins se comportent de manière attendue, le plasma déficient en FVIII est négatif (il ne permet pas de génération de IIa) et un gradient d'efficacité est retrouvé en augmentant la dose de FVIII (figure 21 ; tableau 16). La supplémentation en FX (2
20 essais ont été pratiqués) ne permet pas de générer des quantités significatives de thrombine (vélocités de 6,06 et 7,65 nM/min). En revanche les mutants FX-IIa, FX-FXIa1 et 2 et FX-control+ de la famille 3 permettent de générer des quantités significatives de thrombine avec des vélocités supérieures à 26 nM soit au moins 3,8X plus rapide que le FX-WT (figure 23 ; tableau 16).

Groupname	Unicalibrator	Déficient FVIII	Déf FVIII + Recombinate 1 U/ml	Déf FVIII +Recombine 0,1 U/ml	Déf FVIII + FX-WT 7,5 µg/ml	Déf FVIII +FX-control+ 7,5 µg/ml	Déf FVIII + FX-Ila 7,5 µg/ml	
Lagtime	19,33	15,5	7,67	18	28,67	18,67	14,67	
ETP	1347,5	0	1803	1442,5	938	1491,5	1635,5	
Peak	304,16	0,48	336,48	278,12	56,51	167,62	288,52	
ttPeak	21,5	38,33	9,33	20,17	38	24,17	17	
StartTail	37	0	32	41,5	71	46	38	
Velocity	140,17	0,02	202,70	128,17	6,06	30,48	123,83	
Groupname	Déf FVIII + FX-PAR1 7,5 µg/ml	Déf FVIII + FX-PAR1M 7,5 µg/ml	Déf FVIII + FX-FXla1 7,5 µg/ml	Déf FVIII + FX-FXla2 7,5 µg/ml	Déf FVIII + FX-Kal1 7,5 µg/ml	Déf FVIII + FX-Kal2 7,5 µg/ml	Déf FVIII + FX-Kal3 7,5 µg/ml	Déf FVIII + FX-WT 7,5 µg/ml
Lagtime	19,83	26,17	14,17	15,17	24,5	14,5	17,67	26,17
ETP	1335,5	1054	1396,5	1426,5	1033	1464	1365,5	1035
Peak	113,21	74,28	160,63	149,07	69,4	163,57	119,67	67,55
ttPeak	27,33	35	19,5	20,83	33	20	24,57	35
StartTail	53,5	65	43,5	44,5	65,5	42,5	50,5	67
Velocity	15,09	8,41	30,14	26,34	8,16	29,74	17,10	7,65

Tableau 16 : Paramètres cinétiques issus des thrombinogrammes obtenus à partir de l'ajout de FX ou de ses variants de la famille 3 dans un pool de plasma déficient en facteur VIII suite à l'activation par la céphaline

5 Les paramètres cinétiques des thrombinogrammes de la figure 23 sont présentés dans le tableau. Lagtime, temps de latence (min); ETP, thrombine totale générée (nM) ; Peak, hauteur du pic se thrombine (nM); ttPEAK, temps du maximum au pic (min); Start Tail, temps du démarrage de la vélocité (min) ; Velocity, vitesse maximale de génération de thrombine (nM/min).

Exemple 15 : Mesure en temps de génération de thrombine (TGT) de la capacité procoagulante des facteurs X variants de la famille 3: voie extrinsèque de la coagulation (FT 1pM/PL 4µM) en plasma déficient en FIX

5 **1 – Protocole expérimental**

Les réactifs, l'automate et le protocole expérimental sont identiques à ceux décrits dans l'exemple 6.

Les tests de génération de thrombine sont réalisés sur 80 µl d'un pool de plasma contenant éventuellement les surnageants de cellules et les contrôles en présence de 20
10 µl de réactif PPP (Stago) contenant au final 1 pM de Facteur Tissulaire (FT) et 4 µM de phospholipides (PL) et de 20 µL fluca-kit (substrat + CaCl₂). Les plasmas utilisés sont un plasma normal et un plasma déficient en facteur IX.

2 – Résultats

15 Les surnageants de la famille 3 issus d'une transfection de cellules HEK293F en présence de VKOR ont été analysés en TGT après activation par le facteur tissulaire en utilisant les témoins déjà décrits.

Les témoins se comportent de manière attendue, le plasma déficient en FIX est négatif (il ne permet pas de génération de IIa) et un gradient d'efficacité est retrouvé en
20 augmentant la dose de FIX (figure 23 ; tableau 17). La supplémentation en FX (2 essais ont été pratiqués) ne permet pas de générer des quantités significatives de thrombine (vélocité moyenne de 23 nM/min). En revanche, tous les mutants sauf FX-PAR1M de la famille 3 permettent de générer des quantités significatives de thrombine avec des vitesses supérieures à 33 nM soit au moins 140% plus rapide que le FX-WT (figure
25 23 ; tableau 17).

Groupname	Unicalibrator	Déficient FIX	Déf FIX + FIX 1 U/ml	Déf FIX + FIX 0,1 U/ml	Déf FIX + FX-WT 7,5 µg/ml	Déf FIX + FX- control+ 7,5 µg/ml	Déf FIX + FX-Ila 7,5 µg/ml	
Lagtime	8,33	5,33	5,33	7,17	7,33	7,17	7,17	
ETP	1345,5	238,5	1641	1063,5	1471	1632	1660,5	
Peak	134,27	7,23	266,66	82,84	110,99	185,83	190,32	
ttPeak	12,67	22,5	8,33	13,33	12,67	11,67	12,17	
StartTail	41	70	26	46	48,5	33,5	33	
Velocity	30,94	0,42	88,89	13,45	20,78	41,30	38,06	
Groupname	Déf FIX+ FX-PAR1 7,5 µg/ml	Déf FIX+ FX-PAR1M 7,5 µg/ml	Déf FIX + FX-FXla1 7,5 µg/ml	Déf FIX + FX-FXla2 7,5 µg/ml	Déf FIX + FX-Kal1 7,5 µg/ml	Déf FIX + FX-Kal2 7,5 µg/ml	Déf FIX + FX-Kal3 1,6 µg/ml	Déf FIX + FX-WT 7,5 µg/ml
Lagtime	6,33	8	6	6,67	8,5	6	6,5	7,33
ETP	1606	1451	1599	1646	1428,5	1740	1679	1472
Peak	173,4	126,89	250,41	240,75	143,97	260,48	223,11	126,29
ttPeak	11,5	12,67	9	10	12,5	9	10,17	12,17
StartTail	34	43,5	28	30	41	28	30	43
Velocity	33,54	27,17	83,47	72,30	35,99	86,83	60,79	26,09

Tableau 17 : Paramètres cinétiques issus des thrombinogrammes obtenus à partir de l'ajout de FX ou de ses variants de la famille 3 dans un pool de plasma déficient en facteur IX suite à l'activation par le facteur tissulaire

Les paramètres cinétiques des thrombinogrammes de la figure 23 sont présentés dans le tableau. Lagtime, temps de latence (min); ETP, thrombine totale générée (nM) ; Peak, hauteur du pic se thrombine (nM); ttPEAK, temps du maximum au pic (min); Start Tail, temps du démarrage de la vélocité (min) ; Velocity, vitesse maximale de génération de thrombine (nM/min).

Exemple 16: Mesure en temps de génération de thrombine (TGT) de la capacité procoagulante des facteurs X variants de la famille 3: voie intrinsèque de la coagulation (céphaline) en plasma déficient en FIX

5 **1 – Protocole expérimental**

Les réactifs, l'automate et le protocole expérimental sont identiques à ceux décrits dans l'exemple 6. Les tests de génération de thrombine sont réalisés sur 80 µl d'un pool de plasma normal contenant éventuellement les surnageants de cellules et les contrôles en présence de 20 µl de céphaline (CK-Prest reconstitué avec 1 mL d'H₂O distillée) et de
10 20 µL fluca-kit (substrat + CaCl₂). Les plasmas utilisés sont un plasma normal et un plasma déficient en facteur IX.

2 – Résultats

Les surnageants de la famille 3 issus d'une transfection de cellules HEK293F en
15 présence de VKOR ont été analysés en TGT après activation par la céphaline en utilisant les témoins déjà décrits.

Les témoins se comportent de manière attendue, le plasma déficient en FIX est négatif (il ne permet pas de génération de IIa) et un gradient d'efficacité est retrouvé en augmentant la dose de FXI (figure 24 ; tableau 18). Dans cet essai, la supplémentation
20 en FX (2 essais ont été pratiqués) ne permet pas de générer des quantités significatives de thrombine (vélocités de 1,24 et 1,53 nM/min). En revanche, les mutants FX-IIa, FX-FXIa1 et 2, FX-Kal 2 et 3, et FX-control+ de la famille 1 permettent de générer des quantités significativement supérieures de thrombine d'au moins 3,4X celle du contrôle à 52X (figures 24 et 25 ; tableau 18). Par ailleurs tous les mutants sauf les mutants FX-
25 PAR1M et FX-Kal2 sont plus actifs que le FX-WT.

Groupname	Unicalibrator	Déficient FIX	Déf FIX + FIX 1 U/ml	Déf FIX + FIX 0,1 U/ml	Déf FIX + FX-WT 7,5 µg/ml	Déf FIX + FX- control+ 7,5 µg/ml	Déf FIX + FX-IIa 7,5 µg/ml
Lagtime	18,33	42,5	13,67	31,83	30,5	22,5	17,5
ETP	1383,5	0	1529	899,5	316,5	1233,5	1495,5
Peak	311,19	0,49	369,87	107,53	16,16	125,06	265,59
ttPeak	20,33	57,33	15,33	36,33	43,5	29,67	21,17
StartTail	36,5	0	31	55	71	46	35
Velocity	155,60	0,03	222,81	23,90	1,24	17,44	72,37
Groupname	Déf FIX+ FX-PAR1 7,5 µg/ml	Déf FIX+ FX-PARIM 7,5 µg/ml	Déf FIX + FX-FXIIa1 7,5 µg/ml	Déf FIX + FX-FXIIa2 7,5 µg/ml	Déf FIX + FX-Kal1 7,5 µg/ml	Déf FIX + FX-Kal2 7,5 µg/ml	Déf FIX + FX-WT 7,5 µg/ml
Lagtime	22	29,67	15	17,67	27,67	16,5	27,5
ETP	527	424,5	752,5	618	400	772,5	341
Peak	38,39	24	59,65	48,93	21,04	61,27	18,68
ttPeak	32,67	42	23,67	26,83	39,83	24,67	39,67
StartTail	57	71	45,5	46	70	48	70
Velocity	3,60	1,95	6,88	5,34	1,73	7,50	1,53

Tableau 18 : Paramètres cinétiques issus des thrombinogrammes obtenus à partir de l'ajout de FX ou de ses variants de la famille 3 dans un pool de plasma déficient en facteur IX suite à l'activation par la céphaline

5 Les paramètres cinétiques des thrombinogrammes de la figure 24 sont présentés dans le tableau. Lagtime, temps de latence (min); ETP, thrombine totale générée (nM) ; Peak, hauteur du pic se thrombine (nM); ttPEAK, temps du maximum au pic (min); Start Tail, temps du démarrage de la vélocité (min) ; Velocity, vitesse maximale de génération de thrombine (nM/min).

REVENDICATIONS

1. Protéine comprenant une séquence mutée de SEQ ID NO :1, ladite séquence mutée de SEQ ID NO :1 comprenant au moins une mutation A, A', B, C ou C', dans laquelle :
- 5 la mutation A consiste en la substitution des acides aminés 43 à 52 de la séquence SEQ ID NO :1 par une séquence choisie parmi DFLAEGLTTPR, KATN*ATLSPR et KATXATLSPR,
- la mutation A' consiste en la substitution des acides aminés 47 à 52 de la séquence SEQ ID NO :1 par une séquence choisie parmi TSKLTR, FNDFTR, LSSMTR, PPSLTR et
- 10 LSCGQR,
- la mutation B consiste en l'insertion d'une séquence choisie parmi DFLAEGLTTPR, KATN*ATLSPR, KATXATLSPR, TSKLTR, FNDFTR, LSSMTR, PPSLTR et LSCGQR, entre les acides aminés 52 et 53 de la séquence SEQ ID NO :1,
- la mutation C consiste en l'insertion d'une séquence choisie parmi DFLAEGLTTPR,
- 15 KATN*ATLSPR et KATXATLSPR, entre les acides aminés 52 et 53 de la séquence SEQ ID NO :1, et en la délétion des acides aminés 4 à 13 de la séquence SEQ ID NO :1,
- la mutation C' consiste en l'insertion d'une séquence choisie parmi TSKLTR, FNDFTR, LSSMTR, PPSLTR et LSCGQR, entre les acides aminés 52 et 53 de la séquence SEQ ID NO :1, et en la délétion des acides aminés 4 à 9 de la séquence SEQ
- 20 ID NO :1,
- où N* est une asparagine éventuellement glycosylée.
2. Protéine selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend, de préférence consiste en, la séquence SEQ ID NO :7, avec au moins une mutation A, A', B, C ou C'.
- 25
3. Protéine selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence choisie parmi SEQ ID NO :9 à 16, 18 à 25, 27 à 34, 105 à 112, 114 à 121 et 123 à 130.
- 30
4. Complexe protéique comprenant une protéine selon l'une des revendications 1 à 3, et au moins une protéine de séquence SEQ ID NO :2, lesdites protéines étant liées entre elles par un pont disulfure.

5. Acide nucléique caractérisé en ce qu'il code pour la protéine selon l'une des revendications 1 à 4.
- 5 6. Acide nucléique selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les séquences SEQ ID NO :77 à 84, 86 à 93, 95 à 102, 133 à 140, 142 à 149 et 151 à 158.
7. Cassette d'expression comprenant l'acide nucléique selon la revendication 5 ou 6.
- 10 8. Vecteur d'expression, caractérisé en ce qu'il comprend la cassette d'expression selon la revendication 7.
9. Cellule recombinante comprenant l'acide nucléique selon la revendication 5 ou 6, préférentiellement ledit acide nucléique est compris dans le vecteur selon la
15 revendication 8.
10. Protéine selon l'une des revendications 1 à 4 pour son utilisation en tant que médicament.
- 20 11. Protéine selon l'une des revendications 1 à 4 pour son utilisation pour traiter les troubles hémorragiques.

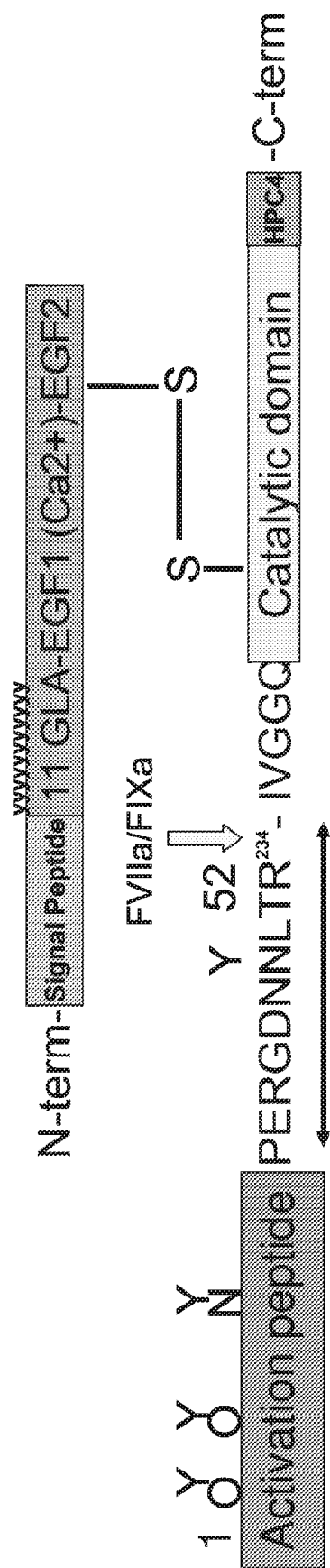


Figure 1

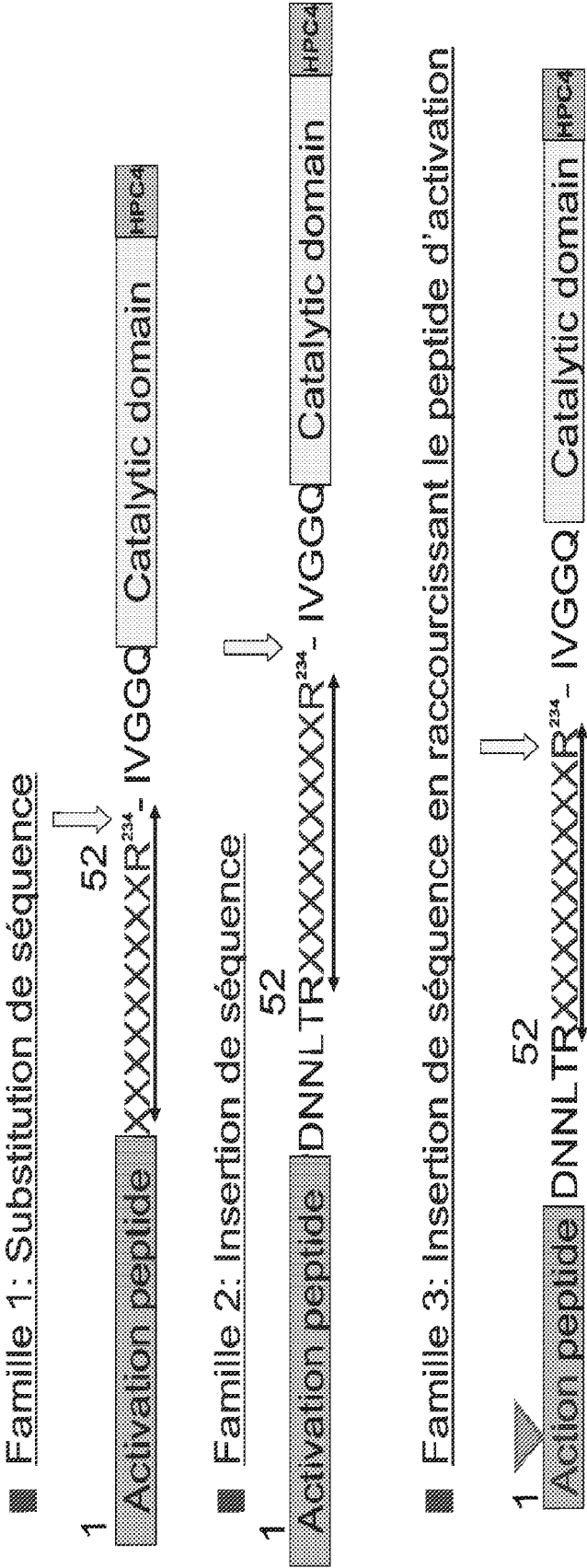


Figure 2

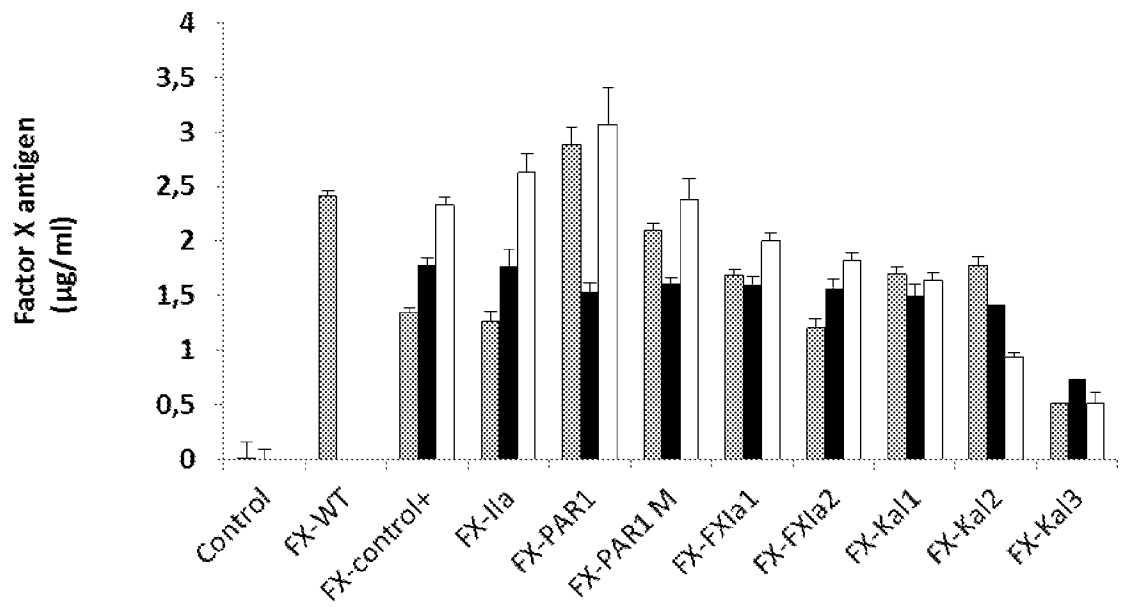


Figure 3

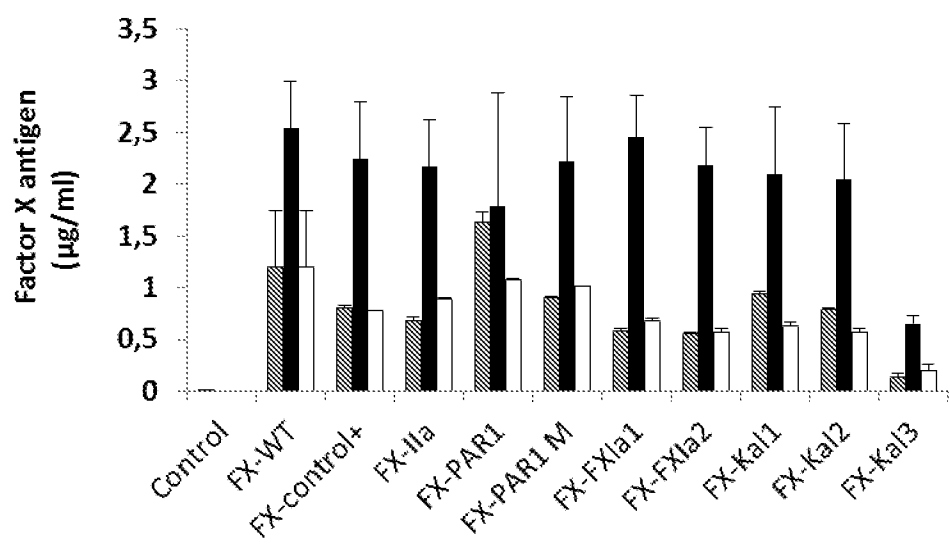


Figure 4

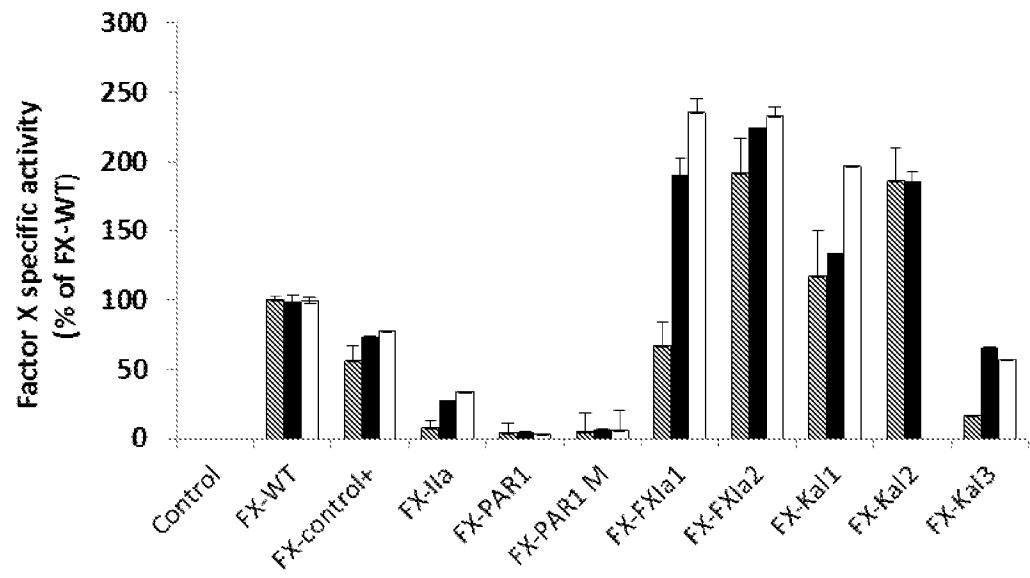


Figure 5

5

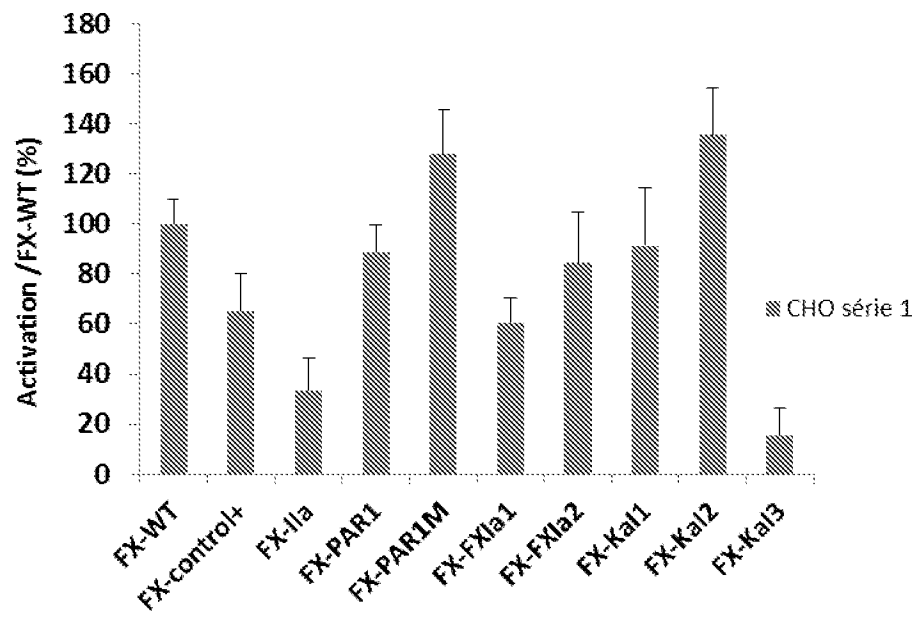


Figure 6

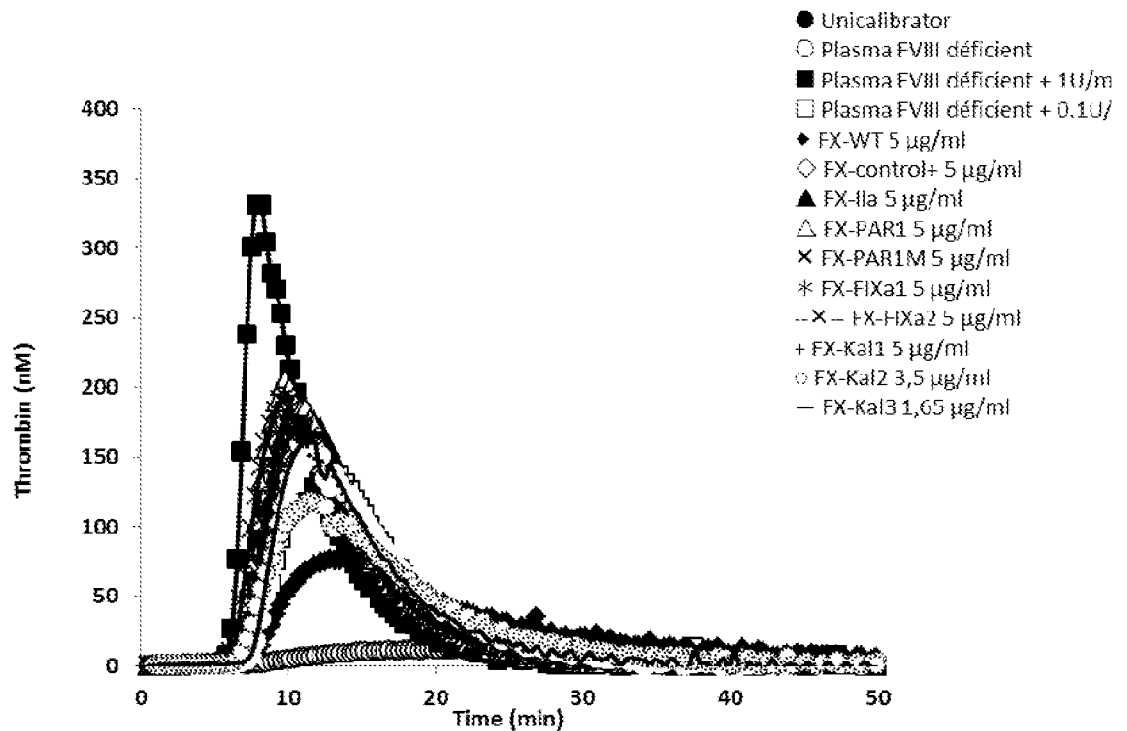


Figure 7

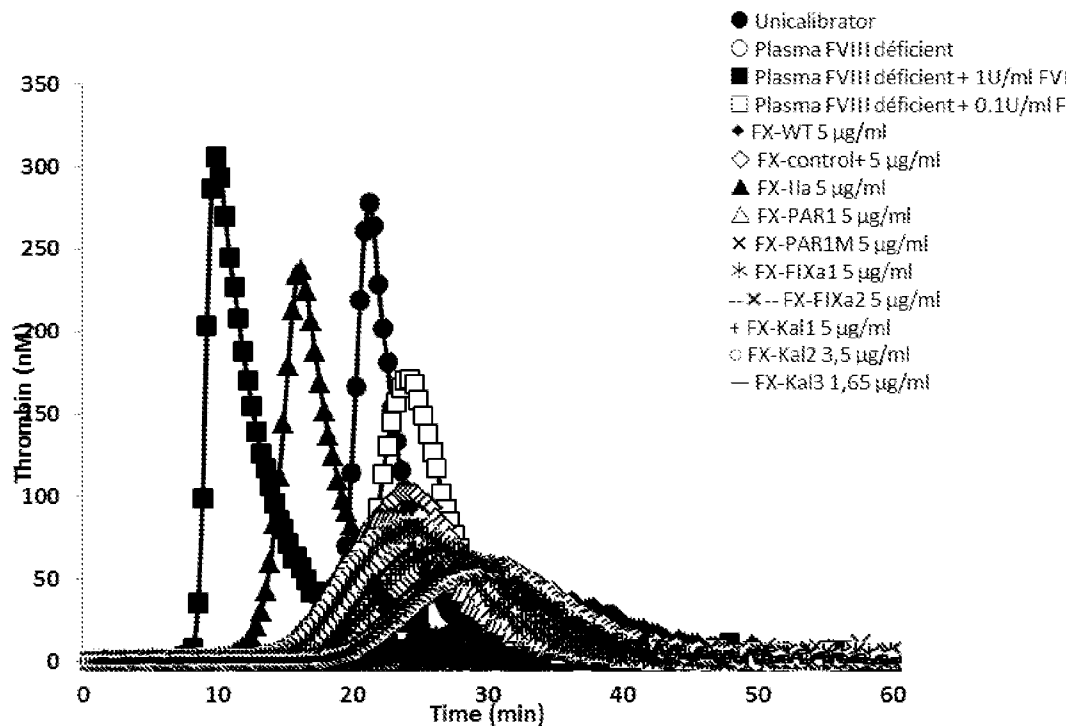


Figure 8

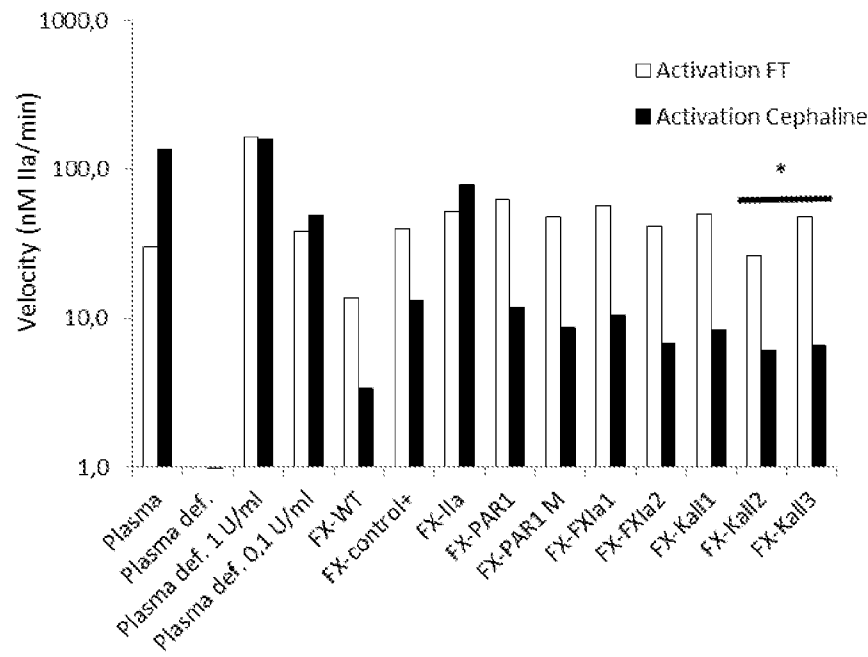


Figure 9

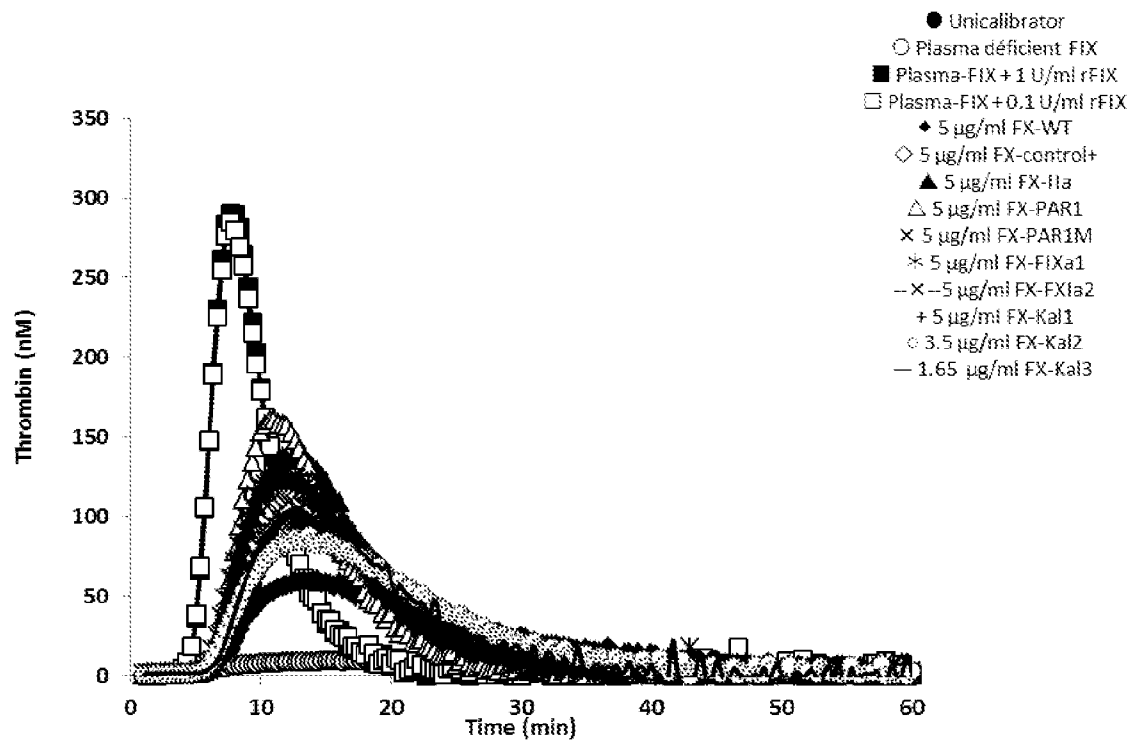


Figure 10

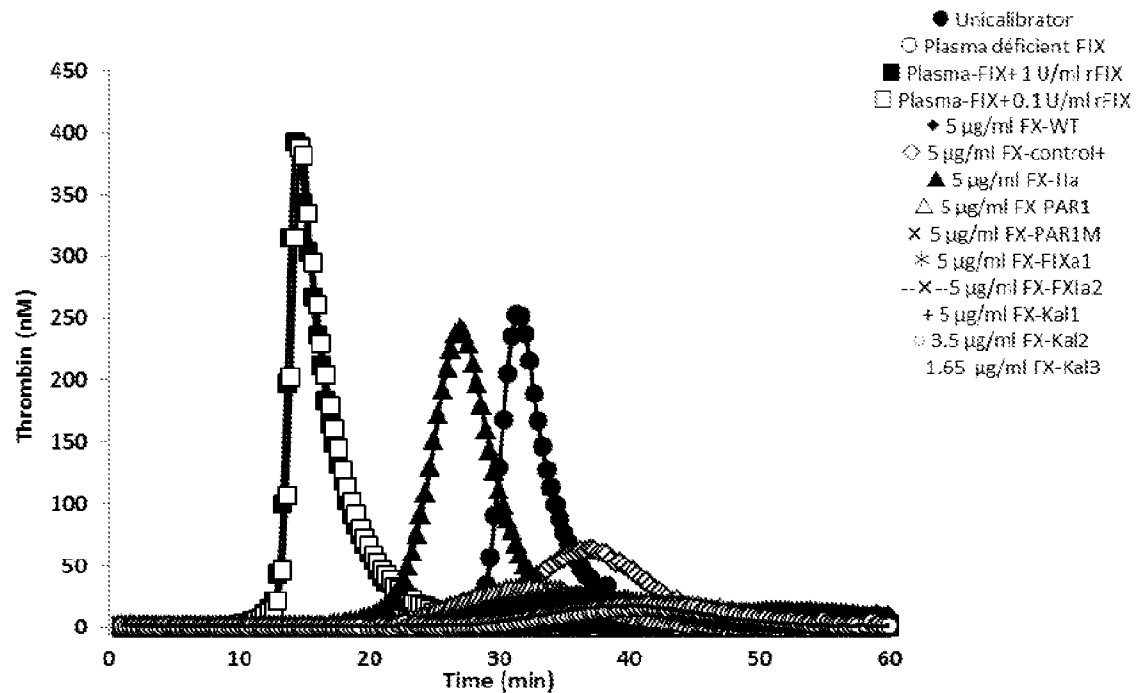


Figure 11

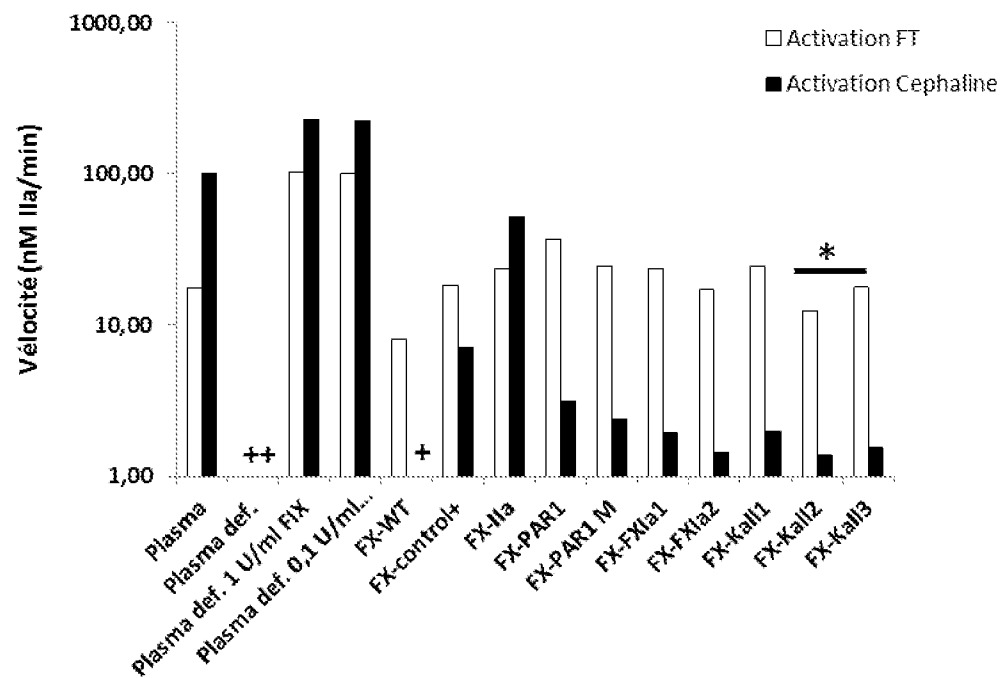


Figure 12

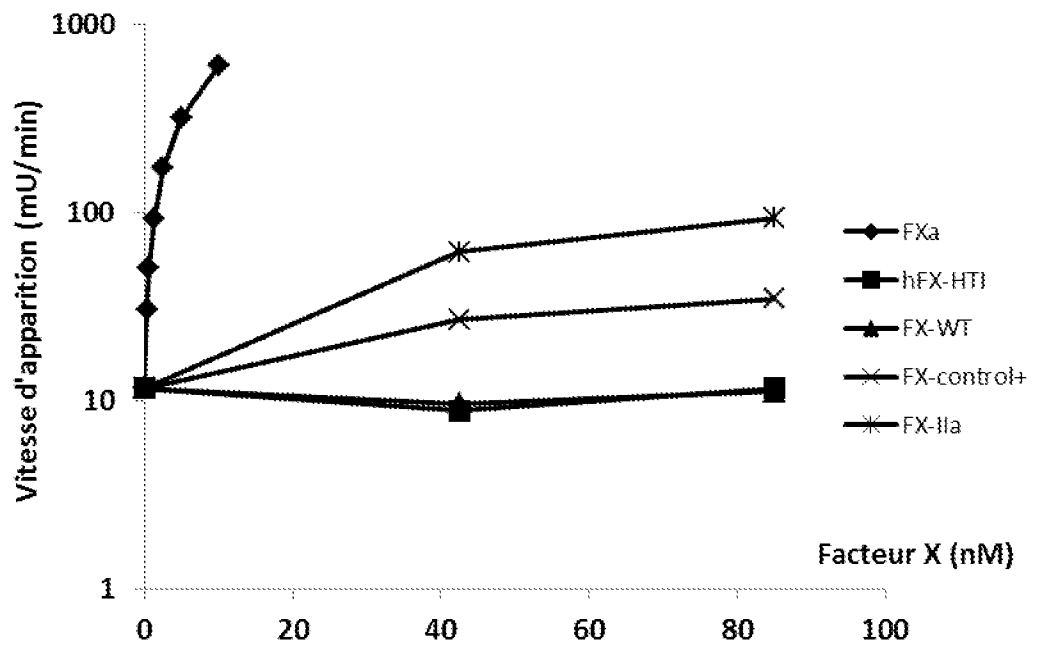


Figure 13

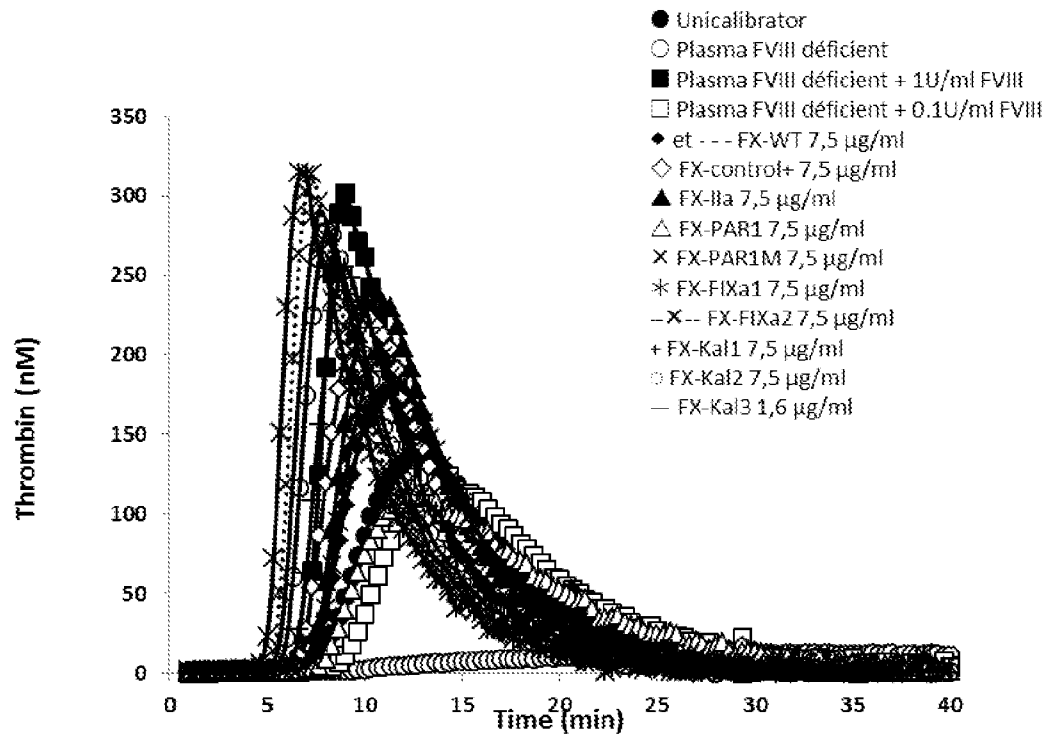


Figure 14

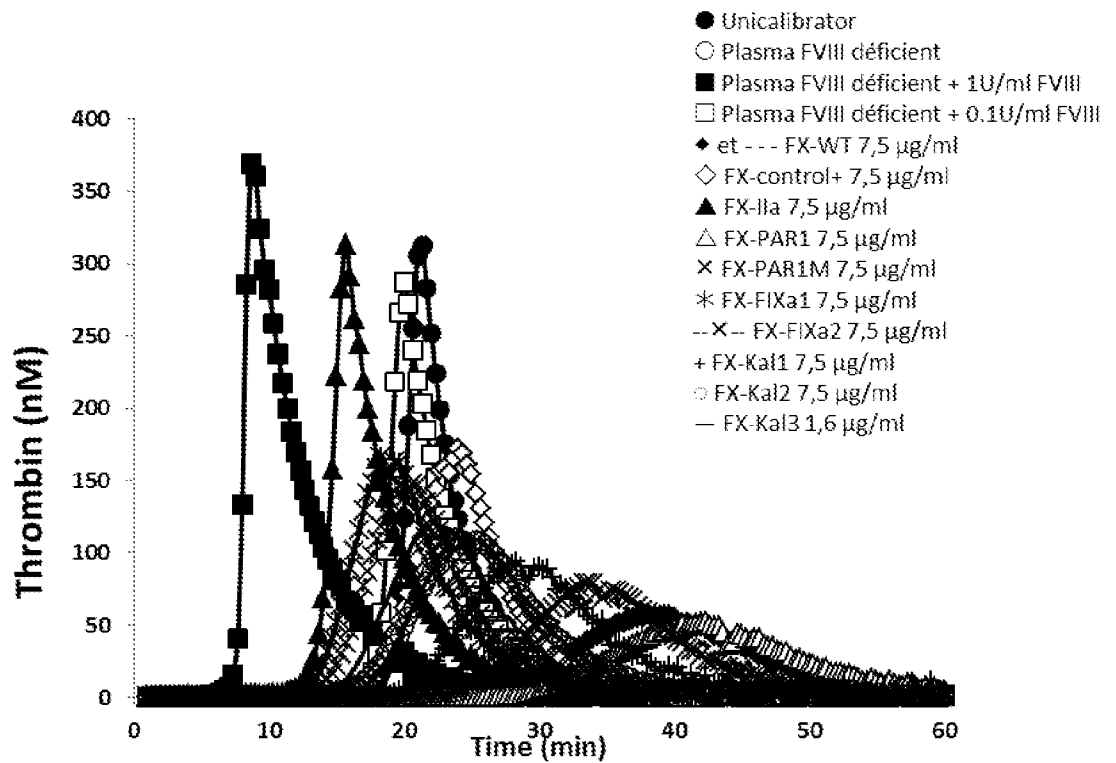


Figure 15

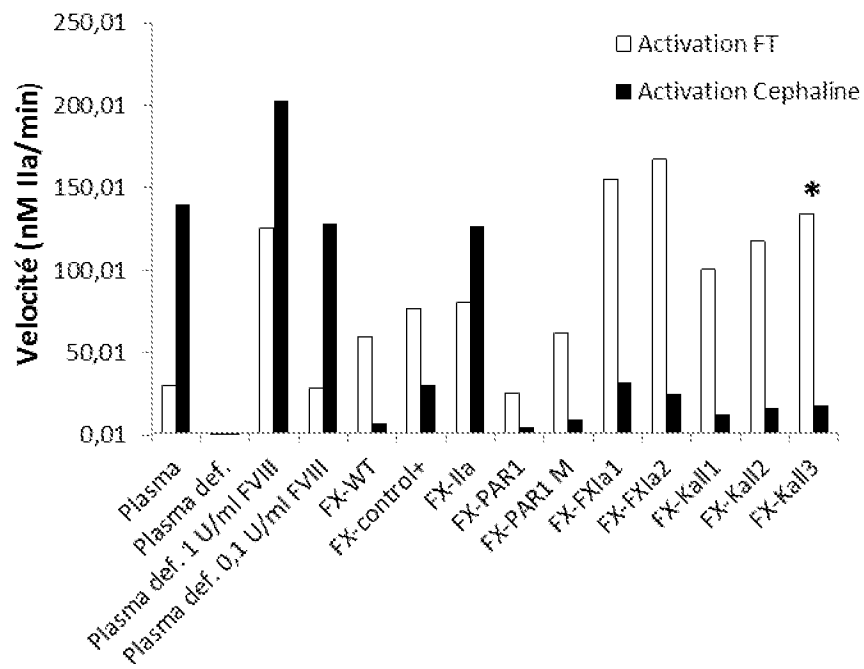


Figure 16

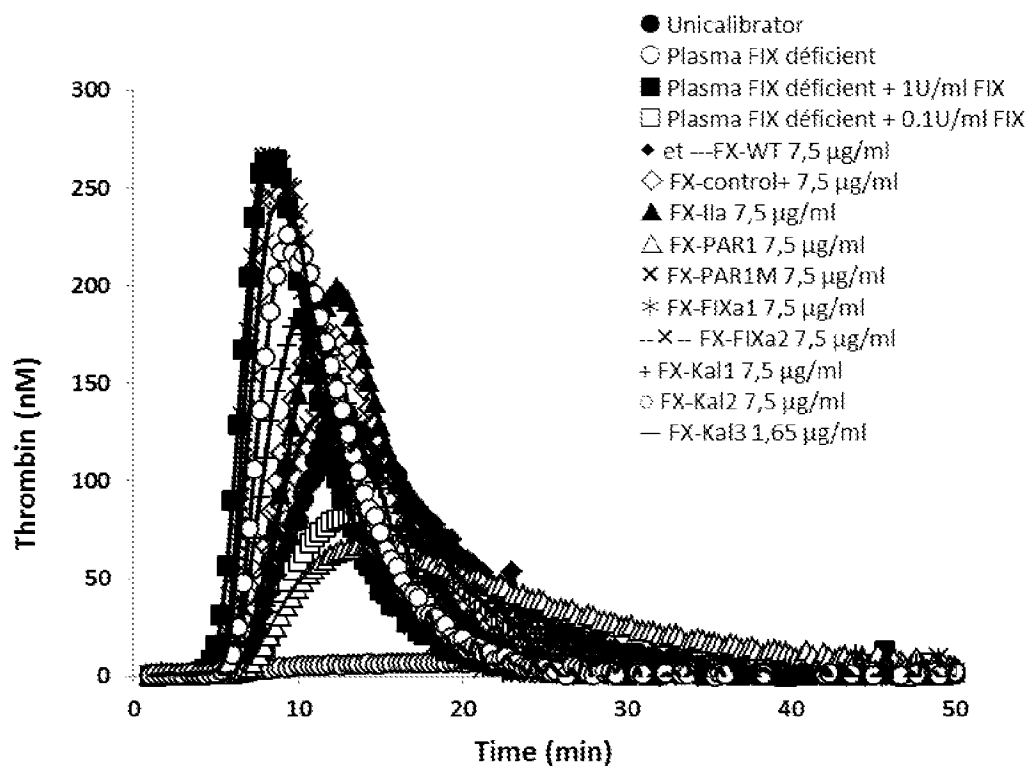


Figure 17

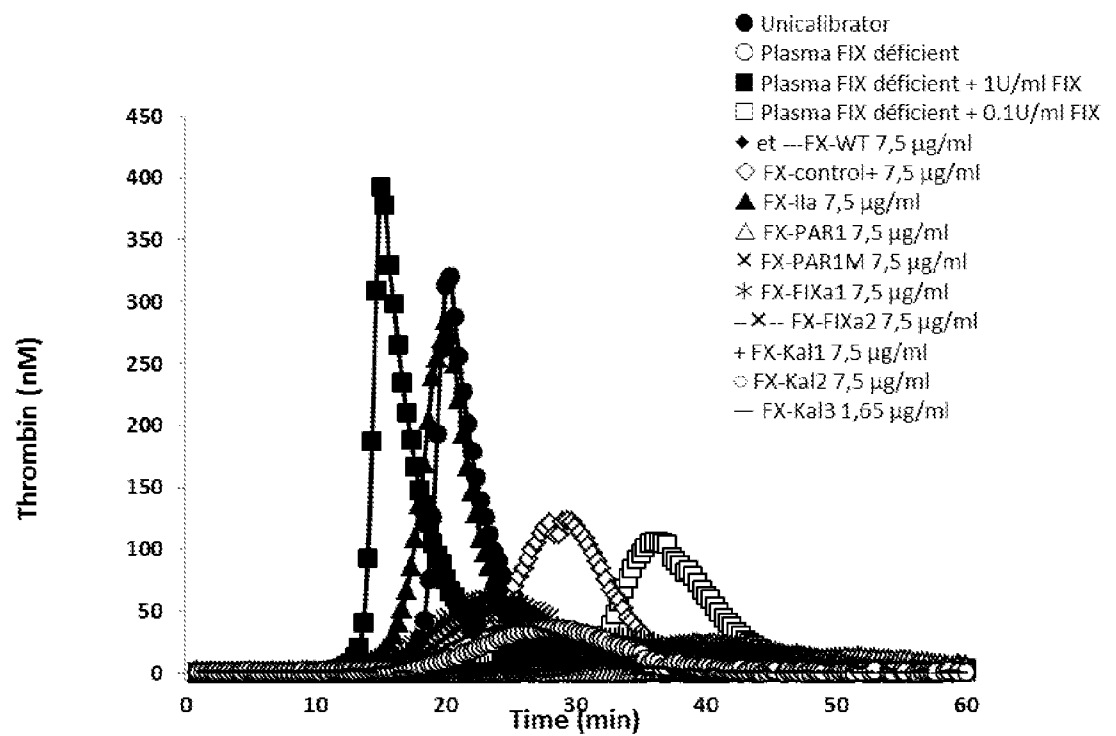


Figure 18

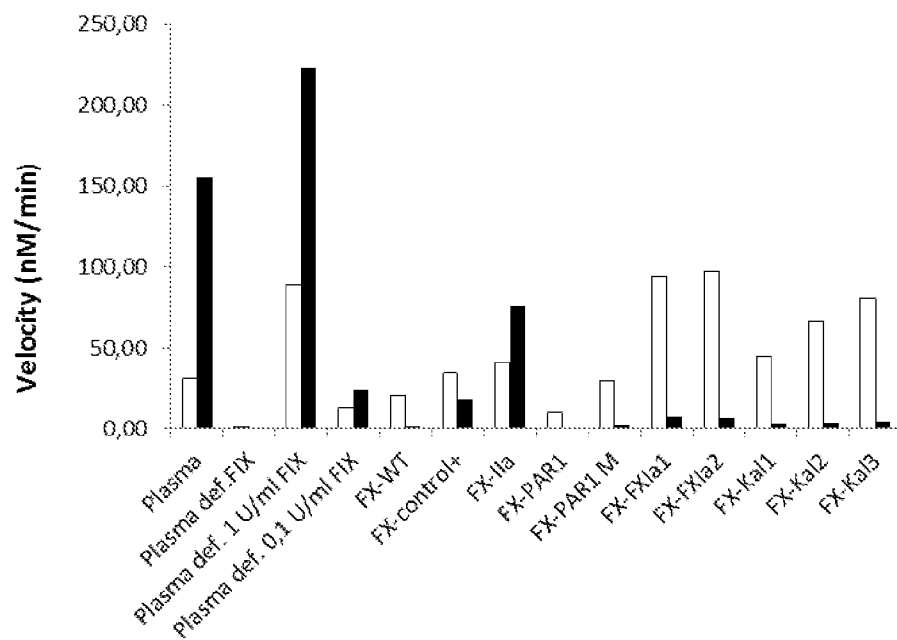


Figure 19

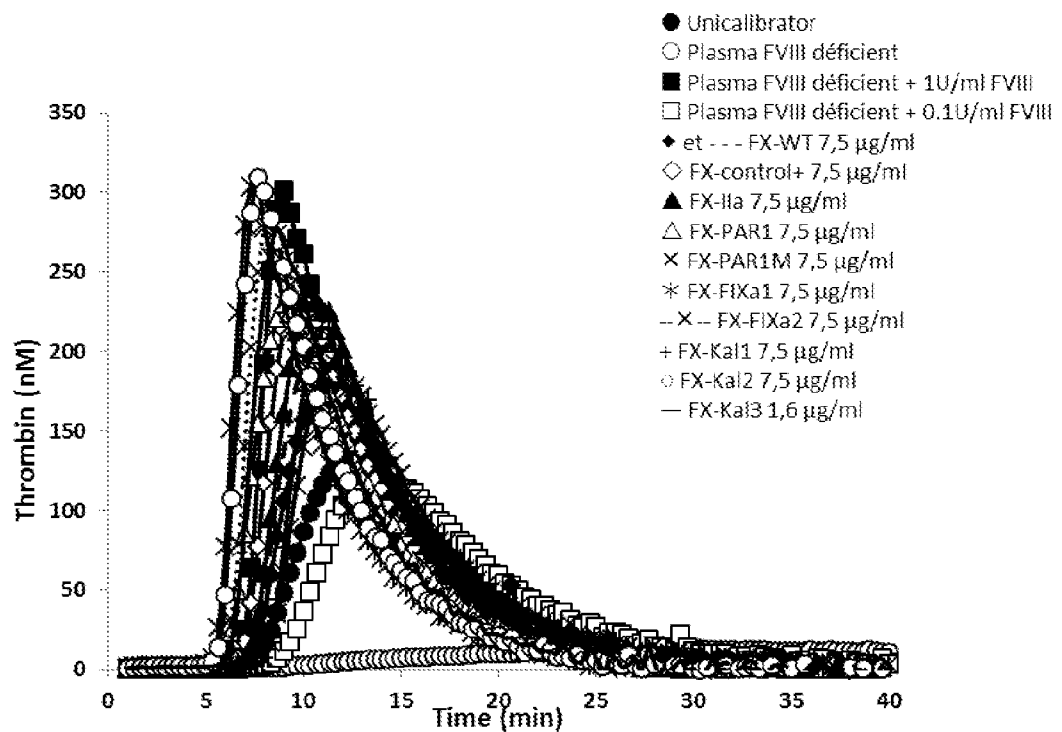


Figure 20

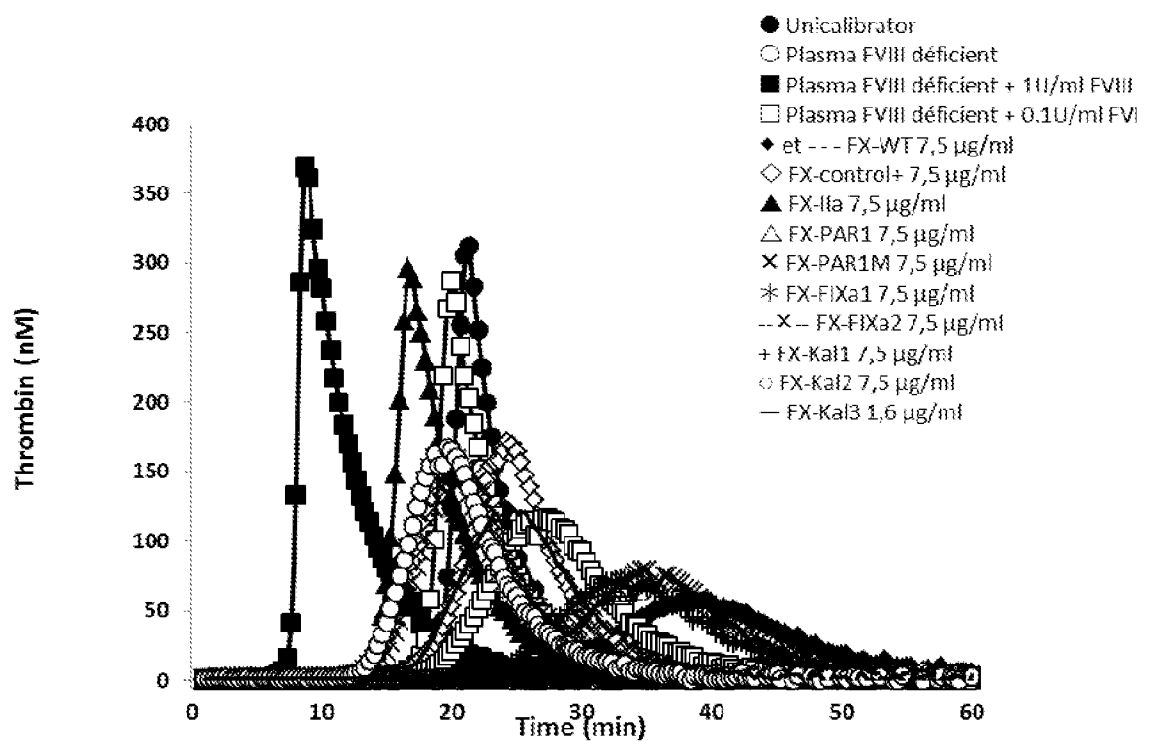


Figure 21

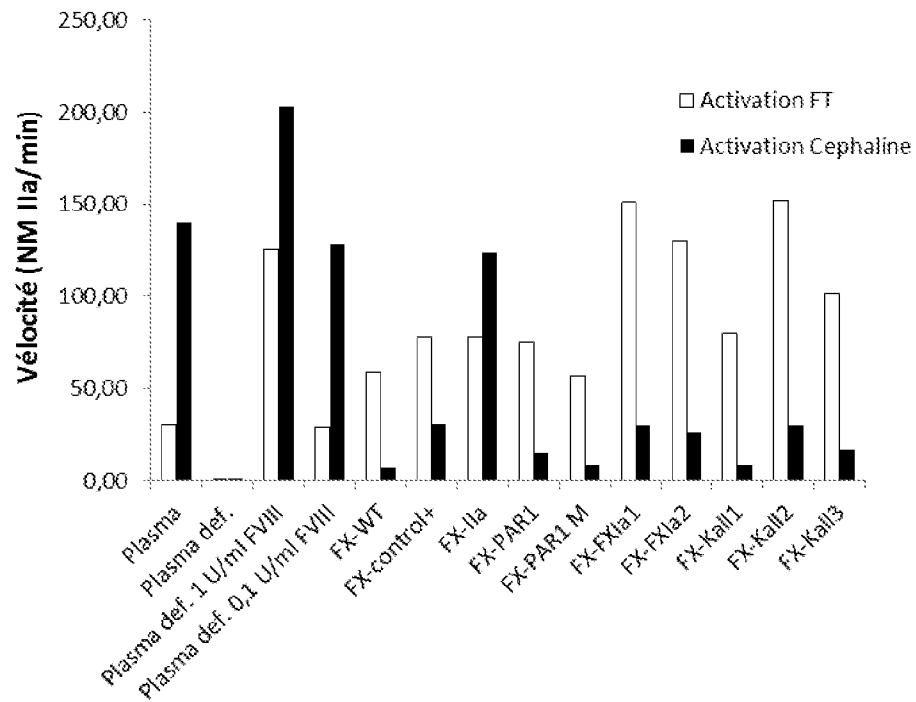


Figure 22

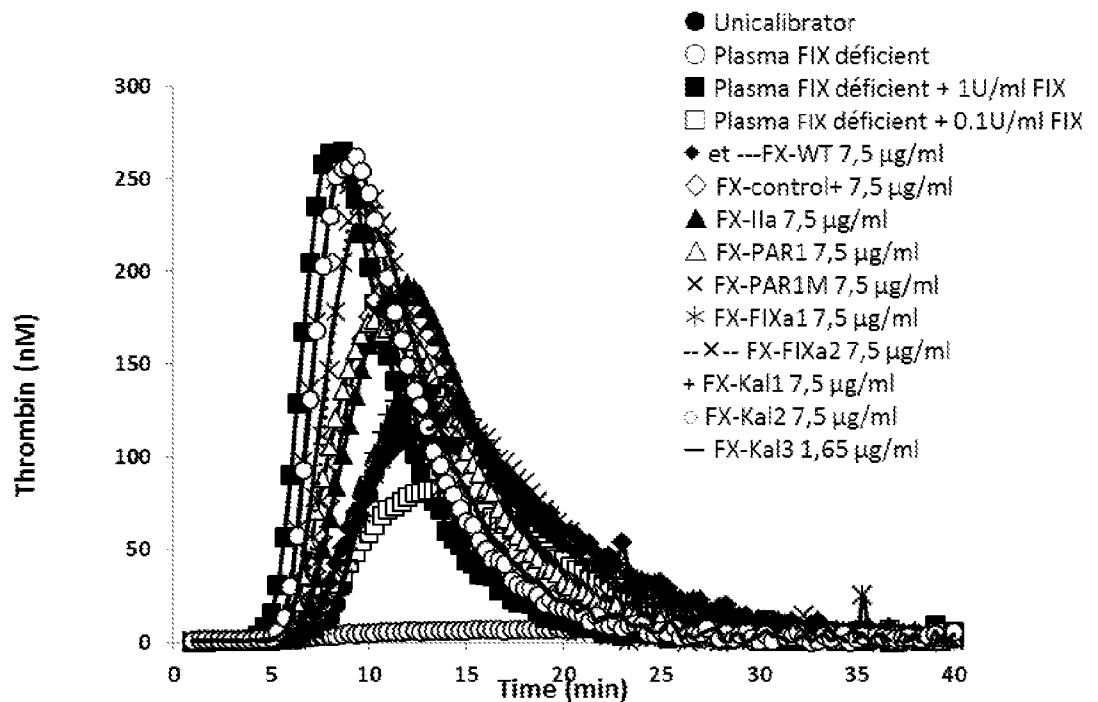


Figure 23

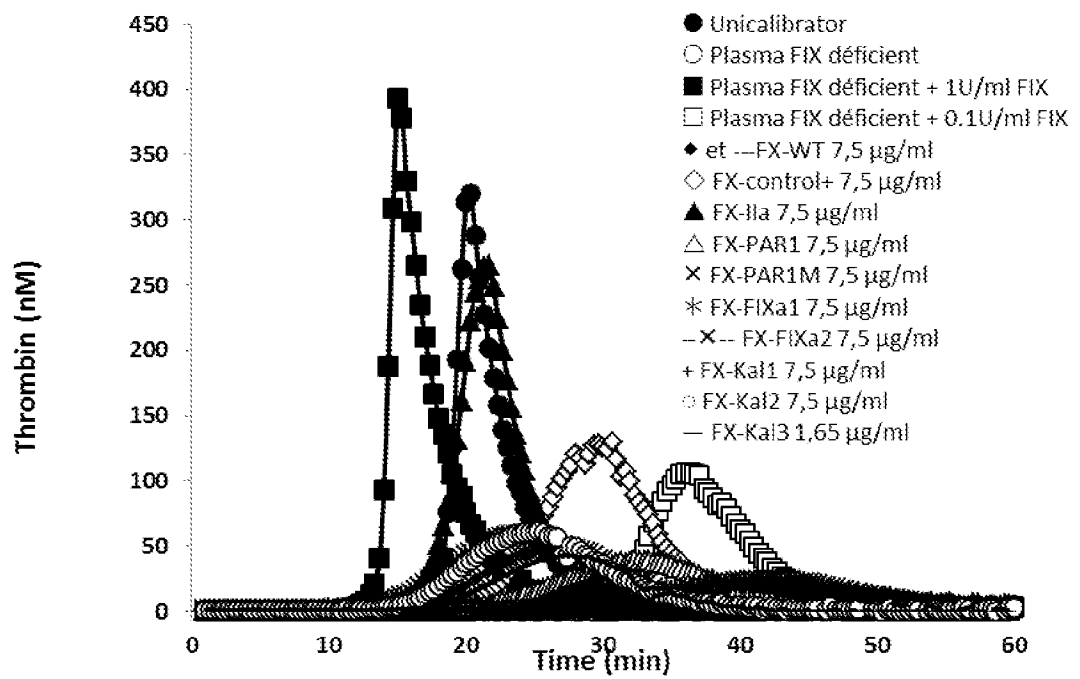


Figure 24

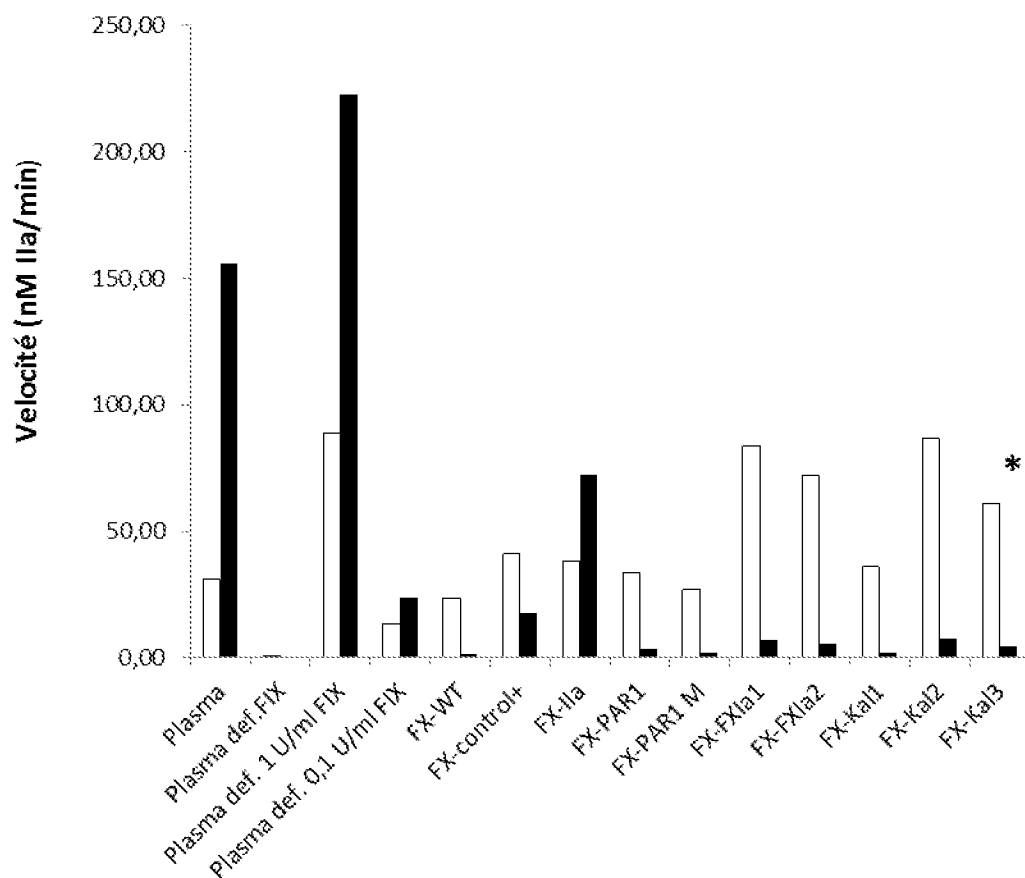


Figure 25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2014/050191

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. C12N9/64 A61K38/48 C12N15/12
 ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 01/10896 A2 (BAXTER AG [AT]) 15 February 2001 (2001-02-15) abstract page 7, line 9; claims 1-43; figures 1,2; sequences 1,2	1-11
A	----- WO 2006/128668 A2 (ZLB BEHRING GMBH [DE]; SCHULTE STEFAN [DE]; HAUSER HANS-PETER [DE]; KA) 7 December 2006 (2006-12-07) abstract; sequence 2 claims 1-23; figures 1-3; examples 3,4	1-11
A	----- WO 2006/018204 A1 (ZLB BEHRING GMBH [DE]; WEIMER THOMAS [DE]; SCHULTE STEFAN [DE]; HOFMAN) 23 February 2006 (2006-02-23) abstract page 40; claims 1-42; figure 1; example 3; sequence 41	1-11



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 April 2014

Date of mailing of the international search report

30/04/2014

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gurdjian, Didier

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2014/050191

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0110896	A2	15-02-2001	AT 389013 T 15-03-2008
		AT 410216 B 25-03-2003	
		AU 778571 B2 09-12-2004	
		AU 6280700 A 05-03-2001	
		CA 2380844 A1 15-02-2001	
		DE 60038312 T2 26-03-2009	
		DK 1238065 T3 07-07-2008	
		EP 1238065 A2 11-09-2002	
		ES 2302696 T3 01-08-2008	
		US 6958322 B1 25-10-2005	
		WO 0110896 A2 15-02-2001	
WO 2006128668	A2	07-12-2006	AU 2006254311 A1 07-12-2006
		CA 2609226 A1 07-12-2006	
		DK 1891091 T3 17-02-2014	
		EP 1728798 A1 06-12-2006	
		EP 1891091 A2 27-02-2008	
		ES 2445394 T3 03-03-2014	
		JP 5049271 B2 17-10-2012	
		JP 2008541742 A 27-11-2008	
		KR 20080022086 A 10-03-2008	
		US 2009053185 A1 26-02-2009	
		WO 2006128668 A2 07-12-2006	
WO 2006018204	A1	23-02-2006	AT 469216 T 15-06-2010
		AU 2005274406 A1 23-02-2006	
		BR PI0514396 A2 12-05-2009	
		CA 2592521 A1 23-02-2006	
		CN 101006175 A 25-07-2007	
		DK 1781782 T3 23-08-2010	
		EP 1781782 A1 09-05-2007	
		ES 2346072 T3 08-10-2010	
		JP 2008509688 A 03-04-2008	
		KR 20070043051 A 24-04-2007	
		US 2009130060 A1 21-05-2009	
		WO 2006018204 A1 23-02-2006	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2014/050191

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. C12N9/64 A61K38/48 C12N15/12 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) C12N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 01/10896 A2 (BAXTER AG [AT]) 15 février 2001 (2001-02-15) abrégé page 7, ligne 9; revendications 1-43; figures 1,2; séquences 1,2 -----	1-11
A	WO 2006/128668 A2 (ZLB BEHRING GMBH [DE]; SCHULTE STEFAN [DE]; HAUSER HANS-PETER [DE]; KA) 7 décembre 2006 (2006-12-07) abrégé; séquence 2 revendications 1-23; figures 1-3; exemples 3,4 -----	1-11
A	WO 2006/018204 A1 (ZLB BEHRING GMBH [DE]; WEIMER THOMAS [DE]; SCHULTE STEFAN [DE]; HOFMAN) 23 février 2006 (2006-02-23) abrégé page 40; revendications 1-42; figure 1; exemple 3; séquence 41 -----	1-11
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <input type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents </div> <div> <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </div> </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"&" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">16 avril 2014</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">30/04/2014</div>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">Gurdjian, Didier</div>

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2014/050191

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 0110896	A2	15-02-2001	AT 389013 T 15-03-2008
			AT 410216 B 25-03-2003
			AU 778571 B2 09-12-2004
			AU 6280700 A 05-03-2001
			CA 2380844 A1 15-02-2001
			DE 60038312 T2 26-03-2009
			DK 1238065 T3 07-07-2008
			EP 1238065 A2 11-09-2002
			ES 2302696 T3 01-08-2008
			US 6958322 B1 25-10-2005
			WO 0110896 A2 15-02-2001
WO 2006128668	A2	07-12-2006	AU 2006254311 A1 07-12-2006
			CA 2609226 A1 07-12-2006
			DK 1891091 T3 17-02-2014
			EP 1728798 A1 06-12-2006
			EP 1891091 A2 27-02-2008
			ES 2445394 T3 03-03-2014
			JP 5049271 B2 17-10-2012
			JP 2008541742 A 27-11-2008
			KR 20080022086 A 10-03-2008
			US 2009053185 A1 26-02-2009
			WO 2006128668 A2 07-12-2006
WO 2006018204	A1	23-02-2006	AT 469216 T 15-06-2010
			AU 2005274406 A1 23-02-2006
			BR PI0514396 A2 12-05-2009
			CA 2592521 A1 23-02-2006
			CN 101006175 A 25-07-2007
			DK 1781782 T3 23-08-2010
			EP 1781782 A1 09-05-2007
			ES 2346072 T3 08-10-2010
			JP 2008509688 A 03-04-2008
			KR 20070043051 A 24-04-2007
			US 2009130060 A1 21-05-2009
			WO 2006018204 A1 23-02-2006