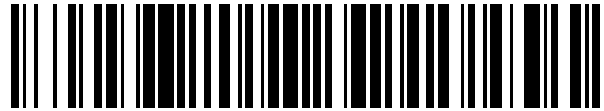


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 599 303**

51 Int. Cl.:

C07K 1/22 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C12N 15/115 (2010.01)

C12N 15/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.08.2008 E 12174841 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.08.2016 EP 2508533**

54 Título: **Procedimiento de selección de un aptámero**

30 Prioridad:

14.08.2007 FR 0757072

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.02.2017

73 Titular/es:

**LABORATOIRE FRANÇAIS DU
FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES
(100.0%)**

**Zone d'Activité de Courtaboeuf, 3, avenue des
Tropiques
91940 Les Ulis, FR**

72 Inventor/es:

**SIRET, LAURENT;
CHTOUROU, ABDESSATAR;
DHAINAUT, FRÉDÉRIC y
PERRET, GÉRALD**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 599 303 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de selección de un aptámero

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la purificación y de la detección de las proteínas. La invención se refiere en particular a la utilización de un aptámero para la purificación o la detección específica de proteínas de interés en unos medios, en particular unas soluciones, susceptibles de comprender también unas proteínas homólogas a las proteínas de interés.

Técnica anterior

Los procedimientos de purificación y de detección de una proteína de interés, que puede ser también designada como "proteína diana", comprenden generalmente una etapa de puesta en contacto del medio a analizar, susceptible de contener la proteína de interés, con unos compuestos que tienen la capacidad de unirse a dicha proteína de interés. Estos compuestos capaces de unirse a una proteína diana pueden ser de diferentes naturalezas. Puede tratarse (i) de compuestos orgánicos que comprenden unos grupos químicos que poseen unas propiedades de unión a proteínas (tales como DEAE, amonio cuaternario, cadena alquilo, silanol), (ii) proteínas (tales como anticuerpos), glicosaminoglicanos (heparina), colorantes (cibacron blue F3GA) o ácidos nucleicos (tales como aptámeros).

La eficacia de un procedimiento de purificación o de detección de una proteína diana está relacionada en particular con la afinidad y a la especificidad del compuesto que se une a la proteína diana.

Con algunos medios de partida de composición compleja, en particular con unas soluciones de partida que comprenden numerosas proteínas distintas, una proteína diana de interés sigue siendo difícil de purificar y de detectar. Este es el caso, en particular, con los medios complejos de partida en los que la proteína diana a purificar o a detectar coexiste con una o varias proteínas distintas, pero fuertemente homólogas. En efecto, cuando la proteína diana se encuentra en solución con una o varias proteínas homólogas a esta proteína diana, se hace entonces difícil desarrollar unas herramientas de purificación o de detección que permitan realizar un alto nivel de discriminación entre la proteína de interés y la o las proteína(s) homóloga(s) indeseable(s), utilizando unos métodos clásicos de purificación o de detección. Incluso los anticuerpos, conocidos por su gran especificidad frente a proteínas dianas, reaccionan frecuentemente de manera cruzada ("cross reactivity") también con varias proteínas que presentan una homología de estructura con las proteínas dianas.

La dificultad de purificar o detectar específicamente unas proteínas que presentan una homología entre sí representa un inconveniente en numerosos campos de aplicación, ya sea en el campo de la investigación académica, que tiene como objetivo estudiar específicamente una proteína diana, independientemente de una eventual proteína homóloga de la proteína diana, o bien en la industria, por ejemplo para el desarrollo de nuevas herramientas de detección o de purificación más eficaces y, llegado el caso, que tengan una mejor compatibilidad con las exigencias administrativas o reglamentarias que las herramientas de purificación o de detección conocidas.

La dificultad de purificar o detectar específicamente unas proteínas que presentan una homología entre sí se encuentra cuando una proteína (aquí denominada proteína transgénica) se produce en una forma recombinante en un organismo o un microorganismo transgénico que expresa también naturalmente una proteína homóloga de dicha proteína transgénica. Se mencionan en particular las proteínas recombinantes producidas en organismos que poseen de manera natural en su genoma un gen denominado "ortólogo" que codifica una proteína fuertemente homóloga a la proteína recombinante codificada por un transgen.

Es habitual que una proteína transgénica humana o animal expresada en un animal transgénico sea la homóloga de una proteína endógena expresada naturalmente en el animal transgénico. La producción de la proteína natural endógena homóloga representa un inconveniente técnico importante en situaciones en las que se busca evitar la realización de una co-extracción o de una co-detección de la proteína transgénica y de la proteína natural endógena homóloga.

Cuando la proteína recombinante transgénica consiste en una proteína de interés terapéutico, destinada a la fabricación de un medicamento, la presencia, en la preparación purificada de la proteína recombinante, de cualquier proteína endógena homóloga de la proteína transgénica puede conllevar unos efectos indeseables para el paciente al que se administra el medicamento, incluyendo la inducción de una respuesta inmunitaria indeseable contra la proteína natural contaminante, que es susceptible de reducir la eficacia del tratamiento médico e incluso a veces provocar unas respuestas auto-inmunes de naturaleza como para poner en peligro la vida del paciente. Tales problemas se encuentran cada vez más a menudo con el uso creciente de la fabricación de proteínas transgénicas terapéuticas en animales transgénicos. A fin de proponer unos productos terapéuticos que tengan una alta inocuidad, las proteínas transgénicas deben por lo tanto ser purificadas específicamente, en presencia de muy bajas cantidades de proteínas homólogas indeseables, y si es posible en ausencia total de proteínas homólogas indeseables. Asimismo, los métodos de detección de proteínas dianas de interés deben ser específicos, sensibles y

eficientes.

Los aptámeros de tipo ARN, moléculas de ácido ribonucleico monocatenario, seleccionados según un procedimiento conocido bajo el nombre de SELEX, son capaces de unir específicamente unas proteínas de interés. En la publicación Liu *et al.* RNA aptamers specific for bovine thrombin, J. Mol. Recognit., 2003: 16, 23-27, el autor presenta un aptámero de tipo ARN que se une a la trombina bovina, pero que no se une a la trombina humana. Este artículo, aunque aislado, muestra que es posible seleccionar por el procedimiento SELEX unos aptámeros ARN de alta especificidad capaces de discriminar unas proteínas homólogas en solución.

Sin embargo, hoy en día, no se ha descrito en la bibliografía ningún procedimiento industrial que utiliza unos aptámeros de alta especificidad que sirvan para discriminar unas proteínas homólogas.

La utilización de los aptámeros de alta especificidad se enfrenta a numerosos problemas técnicos. En primer lugar, los aptámeros se seleccionan en solución según el procedimiento SELEX. Para ser utilizado en un procedimiento de purificación o de detección, el aptámero debe ser inmovilizado sobre un soporte sólido. Ahora bien, numerosas publicaciones muestran que las propiedades de unión del aptámero (afinidad, especificidad, etc.) son alteradas cuando el aptámero es inmovilizado. Además, los aptámeros de tipo ARN, único tipo de aptámero de alta especificidad descrito en la técnica anterior, son unas moléculas muy lábiles que se degradan a temperatura ambiente. Los aptámeros de ARN no son por lo tanto compatibles con los procedimientos industriales de purificación o de detección. Los ARN químicamente modificados podrían constituir una alternativa, pero el coste de síntesis actual para tales moléculas es totalmente incompatible con una utilización industrial.

Debido a su gran afinidad y a su especificidad relativamente elevada para proteínas de interés, los anticuerpos son ampliamente utilizados en los procedimientos de purificación o de detección de proteínas.

Sin embargo, la utilización de los anticuerpos no siempre es muy adecuada para la purificación o la detección de una proteína diana. En efecto, los anticuerpos son fabricados en sistemas biológicos con todos los inconvenientes que esto comporta, incluyendo los riesgos de contaminación por agentes patógenos, o también la dificultad de purificar los anticuerpos fabricados. Además, los anticuerpos son generalmente inmunogénicos y pueden inducir fuertes reacciones inmunitarias si se administran a un paciente. Así, cuando un anticuerpo se utiliza para purificar una proteína terapéutica, existe un riesgo de encontrarse con anticuerpos o fragmentos de anticuerpos en la solución que contiene la proteína terapéutica y, por lo tanto, de generar unos efectos indeseables en el paciente al que se administra tal solución. Es por ello que la utilización de los anticuerpos en procedimientos de purificación se ha vuelto difícilmente compatible con algunas exigencias administrativas, en particular en los campos agroalimentario y farmacéutico. Se puede añadir que con los anticuerpos, los medios de higienización son limitados, debido a su naturaleza proteica frágil, en particular cuando son utilizadas (i) en condiciones desnaturalizantes (por ejemplo en presencia de urea, de DMSO, etc.), (ii) unos pH muy ácidos o muy básicos, (iii) algunos disolventes orgánicos perjudiciales, o también (iv) unas temperaturas elevadas. En última instancia, se recuerda que la selección de anticuerpos es larga (6 meses aproximadamente) y la producción de un anticuerpo purificado es compleja de realizar, lo que conlleva unos costes de selección y de fabricación relativamente elevados.

Existe por lo tanto una necesidad de desarrollo de nuevas herramientas de purificación o de detección de proteínas de interés, que sean eficaces, que sean más simples de aplicar y que sean más seguros que los procedimientos conocidos. Tales procedimientos mejorados deben permitir la purificación o la detección selectiva de una proteína diana presente en una solución cuando dicha solución es susceptible de contener también una proteína homóloga a la proteína diana. Más particularmente, existe una necesidad para el desarrollo de nuevas herramientas de purificación o de detección que permitan mejorar las condiciones de seguridad y de inocuidad para el ser humano de los productos procedentes de la producción de las proteínas transgénicas terapéuticas a partir de organismos transgénicos.

Resumen de la invención

La presente invención tiene por objeto un procedimiento para la purificación o la detección de una proteína diana presente en una solución, comprendiendo dicho procedimiento, previamente a la realización de la etapa de detección o de purificación, una etapa de puesta en contacto de dicha solución con un aptámero de ADN inmovilizado sobre un soporte sólido a través de un espaciador, uniéndose dicho aptámero inmovilizado específicamente a dicha proteína diana pero no uniéndose a una proteína homóloga a dicha proteína diana susceptible de estar también presente en solución.

La presente invención se refiere por lo tanto también a la utilización de un aptámero de ADN inmovilizado sobre un soporte sólido a través de un espaciador, uniéndose dicho aptámero inmovilizado específicamente a una proteína diana, para la purificación o la detección de dicha proteína diana presente en una solución, caracterizada por que dicho aptámero inmovilizado no se une a una proteína homóloga de dicha proteína diana y por que dicha solución es susceptible de contener al menos una proteína homóloga de dicha proteína diana.

La presente invención se refiere también a un procedimiento para purificar específicamente una proteína diana a

partir de una solución que contiene dicha proteína diana y que es susceptible de contener una proteína homóloga de la proteína diana que comprende las etapas de (i) proporcionar un soporte sólido que comprende un aptámero de ADN inmovilizado sobre dicho soporte sólido a través de un espaciador, caracterizado por que dicho aptámero inmovilizado se une específicamente a dicha proteína diana, pero no se une a una proteína homóloga de la proteína diana, (ii) poner en contacto dicho soporte sólido con dicha solución, y (iii) recuperar la proteína diana unida a dicho aptámero.

La presente invención se refiere también a un procedimiento para detectar específicamente una proteína diana a partir de una solución que contiene dicha proteína diana y que es susceptible de contener una proteína homóloga de la proteína diana que comprende las etapas de (i) poner en contacto dicha solución con un aptámero de ADN inmovilizado sobre un soporte sólido a través de un espaciador, uniéndose dicho aptámero inmovilizado específicamente a dicha proteína diana pero no uniéndose a dicha proteína homóloga de la proteína diana, y (ii) detectar los complejos formados entre dicho aptámero y dicha proteína diana.

Descripción de las figuras

La figura 1 ilustra la unión entre un aptámero que se une específicamente al FVII humano y al FVII humano plasmático (FVII HP). La figura 1 representa un gráfico que representa la unión, en función del tiempo, del aptámero anti-FVII humano y del FVII HP a concentraciones en FVII HP comprendidas entre 50 y 400 nM.

La figura 2 ilustra la especificidad de la interacción entre un aptámero inmovilizado sobre un chip y el FVII HP. La figura 2 representa un gráfico que representa la unión, en función del tiempo, del aptámero que se une específicamente al FVII humano inmovilizado sobre un chip y del FVII HP en presencia o no de un anticuerpo policlonal anti-FVII.

La figura 3 ilustra la ausencia de unión entre el aptámero que se une específicamente al FVII humano y el FVII de conejo. La figura 3 representa un gráfico que representa la unión, en función del tiempo, del aptámero que se une específicamente al FVII humano y el FVII de conejo a concentraciones en FVII de conejo comprendidas entre 50 y 400 nM.

La figura 4 ilustra las diferencias de afinidad entre el aptámero que se une específicamente al FVII humano y el FVII HP, el FVII de conejo o el FVII humano transgénico. La figura 4 representa un gráfico que representa la unión, en función del tiempo, del aptámero que se une específicamente al FVII humano y el FVII HP, el FVII de conejo o el FVII humano transgénico a una concentración de 400 nM para cada FVII.

Descripción de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento para la purificación o la detección de una proteína diana presente en una solución, comprendiendo dicho procedimiento, previamente a la realización de la etapa de detección o de purificación, una etapa de puesta en contacto de dicha solución con un aptámero de ADN inmovilizado sobre un soporte sólido a través de un espaciador, uniéndose dicho aptámero inmovilizado específicamente a dicha proteína diana pero no uniéndose a una proteína homóloga a dicha proteína diana susceptible de estar también presente en solución.

La invención se refiere también a la utilización de un ADN inmovilizado sobre un soporte sólido a través de un espaciador, uniéndose dicho aptámero inmovilizado específicamente a una proteína diana, para la purificación o la detección de dicha proteína diana presente en una solución, caracterizada por que dicho aptámero inmovilizado no se une a una proteína homóloga de la proteína diana y por que dicha solución es susceptible de contener al menos una proteína homóloga de la proteína diana.

En el procedimiento para la purificación de una proteína diana de interés, se forma selectivamente un complejo entre (i) dicho aptámero que reconoce específicamente una proteína diana determinada y (ii) la proteína diana, si ésta está contenida en el medio de partida, típicamente la solución de partida. Después, la proteína diana a purificar se recupera por disociación del complejo previamente formado con dicho aptámero.

En el procedimiento para la detección de una proteína diana de interés, se forma selectivamente un complejo entre (i) dicho aptámero que reconoce específicamente una proteína diana determinada y (ii) la proteína diana, si ésta está contenida en el medio de partida, típicamente la solución de partida. Después, se detectan en particular (i) o bien los complejos formados entre dicho aptámero y dicha proteína de interés, (ii) o bien la proteína diana de interés, ya sea complejada a dicho aptámero o en forma libre después de la disociación de los complejos previamente formados.

Otro objeto de la presente invención se refiere a un procedimiento para purificar específicamente una proteína diana a partir de una solución que contiene dicha proteína diana y que es susceptible de contener una proteína homóloga de la proteína diana que comprende las etapas de:

a) proporcionar un soporte sólido que comprende un aptámero de ADN inmovilizado sobre dicho soporte sólido a

través de un espaciador, caracterizado por que dicho aptámero inmovilizado se une específicamente a dicha proteína diana, pero no se une a una proteína homóloga de la proteína diana,

b) poner en contacto dicho soporte sólido con dicha solución, y

c) recuperar la proteína diana unida a dicho aptámero.

Otro objeto de la presente invención se refiere a un procedimiento para detectar específicamente una proteína diana a partir de una solución que contiene dicha proteína diana, y que es susceptible de contener una proteína homóloga de la proteína diana que comprende las etapas de:

a) poner en contacto dicha solución con un aptámero de ADN inmovilizado sobre un soporte sólido a través de un espaciador, uniéndose dicho aptámero inmovilizado específicamente a dicha proteína diana pero no uniéndose a dicha proteína homóloga de la proteína diana,

b) detectar los complejos formados entre dicho aptámero y dicha proteína diana.

El término "aptámero", tal como se utiliza aquí, designa una molécula de ácido nucleico monocatenario capaz de unirse de manera específica a una proteína. Los aptámeros comprenden generalmente entre 5 y 120 nucleótidos y pueden ser seleccionados *in vitro* según un procedimiento conocido bajo el nombre de SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment). Los aptámeros presentan numerosas ventajas. Por su naturaleza oligonucleotídica, los aptámeros poseen una baja inmunogenicidad y una resistencia importante en condiciones fisicoquímicas rigurosas (presencia de urea, de DMSO, de un pH muy ácido o muy básico, utilización de disolventes orgánicos o de temperatura elevada) que permiten unas estrategias de higienización variadas en el ámbito de un uso como ligando de afinidad. Además, su selectividad es importante. Finalmente, la producción de aptámeros implica unos costes relativamente limitados.

El término "aptámero de ADN", tal como se utiliza aquí, designa un aptámero constituido de desoxirribonucleótidos, a diferencia de los aptámeros de ARN, que están constituidos de ribonucleótidos. Los aptámeros de ADN presentan la ventaja de ser estables en solución, y por lo tanto explotables industrialmente para la purificación o la detección de una proteína diana.

El término "proteína", tal como se usa aquí, corresponde a un polímero de aminoácidos. Esto comprende las proteínas, los fragmentos de proteína, las proteínas modificadas genéticamente, los oligopéptidos y sus análogos. La proteína puede ser un anticuerpo, una proteína antiviral, una hormona, un factor de crecimiento, un factor de coagulación, tal como el factor VII (FVII), el factor VIII (FVIII), el factor X (FX), el factor IX (Factor IX), el factor XI (FXI), el factor XII (FXII), el factor XIII (FXIII), el factor II (trombina), la antitrombina III (AT III), el cofactor II de la heparina (HCII), la proteína C (PC), la trombomodulina (TM), la proteína S (PS), el factor V (FV), el factor de Willerbrand (FvW) y el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI). Preferentemente, la proteína es un FVII natural o modificado, o un fragmento de este.

Como ya se ha indicado anteriormente, se utiliza en los procedimientos de la invención un "aptámero de ADN inmovilizado sobre un soporte sólido a través de un espaciador": (también denominado "aptámero" en lo que sigue de la descripción) que tiene la capacidad de unirse selectivamente a una proteína diana determinada, poseyendo dicho aptámero una capacidad reducida o nula para unirse a unas proteínas "homólogas" a dicha proteína diana determinada. Esto significa que se utilizan, según la invención exclusivamente, unos aptámeros que tienen excelentes propiedades de discriminación entre la proteína diana de interés y unas proteínas distintas de dicha proteína diana, a pesar de que poseen una estructura similar a la de dicha proteína diana.

En algunos modos de realización de la invención, la capacidad del aptámero utilizado para discriminar la proteína diana de las proteínas "homólogas" a la proteína diana es tal que dicho aptámero posee una afinidad para la proteína diana de interés definida por un valor de constante de disociación (Kd), expresado en concentración molar, que es inferior en al menos un orden de tamaño con respecto a la constante de disociación de dicho aptámero para la proteína "homóloga" más similar conocida.

En algunos otros modos de realización de la invención, el aptámero no se une a una proteína "homóloga" a la proteína diana de interés. Según la invención, un aptámero no se une a una proteína homóloga cuando la unión de la proteína homóloga a dicho aptámero no es detectable según las técnicas de medición convencionales, por ejemplo según la técnica de detección y de medición de fijación de tipo Biacore[®]. A título ilustrativo, se ha mostrado en los ejemplos que el aptámero de secuencias SEC ID n° 1 que se une selectivamente al Factor VII humano no se une de manera detectable al Factor VII de conejo, utilizando la técnica de medición de unión Biacore[®].

La "proteína diana" con la que se une selectivamente el aptámero puede ser cualquier tipo de proteína. La proteína diana puede en particular consistir en una proteína de interés terapéutico.

La "proteína homóloga" o "proteína homóloga a la proteína diana" consiste en una proteína que presenta una gran

homología estructural con la proteína diana.

El término "homología" tal como se utiliza en la presente invención corresponde a homologías que son esencialmente de dos naturalezas, respectivamente (i) una homología que resulta de diferencias en la secuencia de aminoácidos entre la proteína diana y la proteína homóloga, y (ii) una homología que resulta de diferencias en los grupos químicos adicionales fijados de manera covalente sobre las cadenas laterales de los aminoácidos, incluyendo diferencias en las cadenas osídicas. El experto en la materia comprende fácilmente que la proteína de interés y una proteína "homóloga" pueden distinguirse al mismo tiempo por diferencias en la secuencia de aminoácidos y por diferencias en las cadenas osídicas. A título ilustrativo, la combinación de los dos tipos de diferencias estructurales se encuentra cuando una diferencia en la secuencia de aminoácidos tiene lugar en un aminoácido que consiste en un sitio de glicosilación de la proteína diana o de la proteína homóloga.

Según la invención, la proteína diana determinada y una proteína homóloga correspondiente tienen unas secuencias que poseen entre sí al menos un 50% de identidad en aminoácidos. Según la invención, el porcentaje de identidad entre dos secuencias en aminoácidos, o entre dos secuencias de nucleótidos, se puede calcular por Emboss matcher, EBLOSUM62 utilizando los parámetros por defecto, incluyendo Gap_penalty: 10,0 y Extended_penalty: 0,5.

Preferentemente, la identidad de secuencia en aminoácidos entre la proteína diana y la proteína homóloga es de al menos el 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o el 99%.

Como se ha indicado anteriormente, la distinción entre la proteína diana de interés y la proteína homóloga puede resultar de diferencias en la glicosilación de estas dos proteínas. Una diferencia de glicosilación se refiere a dos proteínas que tienen la misma secuencia en aminoácidos o que tienen unas secuencias en aminoácidos similares, pero cuyas estructuras glicánicas difieren. Las estructuras glicánicas son unas cadenas de azúcares injertadas a las proteínas a nivel de secuencias de consenso de aminoácidos. Las diferencias de glicosilación pueden referirse a las N- u O-glicosilaciones, así como a las ramificaciones glicosídicas que se forman en estas N- u O-glicosilaciones. La diferencia de glicosilación puede referirse a la presencia o ausencia de tales cadenas o ramificaciones, pero también a la presencia o la ausencia de ciertos azúcares tales como los restos de fucosa, manosa, glucosamina o galactosamina. La glicosilación de las proteínas se puede analizar de diferentes maneras. Un método de análisis de la glicosilación consiste en desglicosilar una proteína con una o varias enzimas (PNGasaF, N-glicosidasa) o químicamente (hidrasinólisis, β -eliminación) después de analizar directamente los glicanos obtenidos sobre gel, electroforesis capilar o HPLC (con detección ultravioleta, fluorescente o de espectrometría de masa) o analizar después de la despolimerización enzimática (Neuraminidasa y β -galactosidasa) o química (hidrasinólisis, β -eliminación) con el objetivo de secuenciar los glicanos. Otro método de análisis consiste en emplear la espectrometría de masa en la proteína entera, estas técnicas son conocidas bajo los nombres de MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation), MALDI-TOF (Time Of Flight), ESI (Electrospray Ionisation).

En algunos modos de realización de la invención, un aptámero según la invención consiste en un aptámero que se une específicamente a un factor de la coagulación seleccionado entre el factor VII (FVII), el factor VIII (FVIII), el factor X (FX), el factor IX (Factor IX), el factor XI (FXI), el factor XII (FXII), el factor XIII (FXIII), el factor II (TROMBINA), la antitrombina III (AT III) el cofactor II de la heparina (HCII), la proteína C (PC), la trombomodulina (TM), la proteína S (PS), el factor V (FV), el factor de Willerbrand (FvW) y el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI). Ventajosamente, el aptámero se une específicamente al FVII. Preferentemente, el aptámero según la invención se une específicamente al FVII humano pero no se une al FVII de conejo. A la inversa, un aptámero según la invención se une al FVII de conejo pero no se une al FVII humano.

Un aptámero que se une específicamente a un FVII humano pero que no se une a un FVII de conejo puede ser un aptámero que tiene una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 80% de identidad en nucleótidos con la secuencia SEC ID nº1.

Ventajosamente, el aptámero de la invención se une a la proteína diana con una afinidad caracterizada por un valor de constante de disociación (Kd) comprendido entre 1 pM y 10 μ M, preferentemente comprendido entre 10 nM y 10 μ M. Ventajosamente, la afinidad del aptámero para la proteína diana es de 1000 a 10000 veces superior a la afinidad del aptámero para la proteína homóloga.

En el procedimiento de purificación o de detección según la invención, el aptámero de ADN está inmovilizado sobre un soporte sólido a través de un espaciador. El aptámero inmovilizado sobre un soporte sólido es particularmente muy adecuado para la detección o la purificación de una proteína diana presente en una solución.

El término "espaciador" tal como se utiliza aquí designa una molécula que está intercalada entre el aptámero y el soporte sólido. Ventajosamente, el espaciador está unido al mismo tiempo a un extremo del aptámero y al soporte sólido. Esta construcción con espaciador tiene como ventaja no inmovilizar directamente el aptámero sobre el soporte sólido. La naturaleza del espaciador puede ser seleccionada según los conocimientos del experto en la materia, preferentemente el espaciador es una secuencia oligonucleotídica no específica o un polietilenglicol (PEG). Cuando se trata de una secuencia oligonucleotídica no específica, dicha secuencia comprende preferentemente al

menos 5 nucleótidos, preferentemente entre 5 y 15 nucleótidos.

Para inmovilizar el aptámero sobre un espaciador, el aptámero puede ser modificado químicamente con diferentes grupos químicos, tales como unos grupos que permiten inmovilizar el aptámero de manera covalente tales como tioles, aminas o cualquier otro grupo capaz de reaccionar con unos grupos químicos presentes sobre el soporte, o unos grupos que permiten inmovilizar el aptámero de manera no covalente tales como el sistema biotina-estreptavidina. Estas técnicas son también aplicables para inmovilizar el espaciador sobre el soporte sólido.

Una vez inmovilizado sobre el soporte sólido a través del espaciador, el aptámero es ventajosamente modificado en su extremo libre (extremo no unido al espaciador) gracias a, y sin limitarse a ello, un nucleótido químicamente modificado (tal como el 2'ometilo o 2'fluoropirimidina, 2'ribopurina, fosforamidita), un nucleótido invertido o un grupo químico (PEG, policationes, colesterol). Estas modificaciones permiten proteger el aptámero de las degradaciones enzimáticas.

El soporte sólido puede ser una columna de cromatografía de afinidad compuesta de un gel derivado de la agarosa, de la celulosa o de un gel sintético, tal como un derivado de acrilamida, metacrilato o poliestireno; un chip tal como un chip adaptado para la resonancia plasmónica de superficie; una membrana tal como una membrana de poliamida, poliacrilonitrilo o poliéster; una perla magnética o paramagnética.

Ventajosamente, la solución que contiene la proteína diana y que es susceptible de contener una proteína homóloga de la proteína diana es una solución biológica tal como un fluido corporal, una célula, un triturado celular, un tejido, un triturado tisular, un órgano o un organismo entero. Preferentemente, la solución es una solución biológica líquida que proviene de un animal tal como sangre, un derivado de sangre (derivado sanguíneo), leche de mamífero o un derivado de leche de mamífero. Puede tratarse de plasma, de crioprecipitado de plasma, de leche aclarada o sus derivados. Un animal según la presente invención es un organismo vivo pluricelular, eucariota, desprovisto de cloroplastos y no humano. En un modo de realización particularmente preferido, la solución proviene de un animal transgénico. Ventajosamente, la solución es leche de mamífero transgénico. Según la invención, un animal transgénico es un mamífero tal como una vaca, una cabra, una coneja, un cerdo, un simio, una rata, un ratón o un ave o un insecto tal como un mosquito, una mosca o un gusano de seda. En un modo de realización preferido, el animal transgénico es un mamífero transgénico, preferentemente una coneja transgénica. Ventajosamente, el mamífero transgénico produce una proteína transgénica en sus glándulas mamas bajo el control de un promotor específico que permite la expresión de dicha proteína transgénica en la leche de dicho mamífero transgénico.

Un método de producción de una proteína transgénica en la leche de un animal transgénico puede comprender las etapas siguientes: una molécula de ADN, que comprende un gen que codifica la proteína transgénica, estando este gen bajo el control de un promotor de una proteína segregada naturalmente en la leche (tales como el promotor de la caseína, de la beta-caseína, de la lactalbúmina, de la beta-lactoglobulina o el promotor WAP) está integrada en un embrión de un mamífero no humano. El embrión se coloca después en una hembra de mamífero de la misma especie. Una vez que el mamífero procedente del embrión esté suficientemente desarrollado, se induce la lactancia del mamífero, y después se recoge la leche. La leche contiene entonces dicha proteína transgénica.

Un ejemplo de procedimiento de preparación de proteína en la leche de una hembra de mamífero distinto del ser humano se da en el documento EP 0 527 063, cuya enseñanza puede ser cogida para la producción de la proteína de la invención. Un plásmido que contiene el promotor WAP (Whey Acidic Protein) se fabrica por introducción de una secuencia que comprende el promotor del gen WAP, siendo este plásmido realizado con el fin de poder recibir un gen extraño colocado bajo la dependencia del promotor WAP. El plásmido que contiene el promotor y el gen que codifica para la proteína de la invención se utilizan para obtener unas conejas transgénicas, por microinyección en el pronúcleo macho de embriones de conejas. Los embriones son después transferidos en el oviducto de hembras hormonalmente preparadas. La presencia de los transgenes se revela mediante la técnica de Southern a partir del ADN extraído de los gazapos transgénicos obtenidos. Las concentraciones en la leche de los animales se evalúan con la ayuda de ensayos radioinmunológicos específicos.

Otros documentos describen unos procedimientos de preparación de proteínas en la leche de una hembra de mamífero distinto del ser humano. Se pueden citar, sin limitarse a ello, los documentos US 7,045,676 (ratón transgénico) y EP 1 739 170 (producción de factor von Willebrand en un mamífero transgénico).

Así, la invención tiene también por objeto la utilización de un aptámero de ADN inmovilizado sobre un soporte sólido a través de un espaciador, uniéndose dicho aptámero inmovilizado específicamente al FVII humano, para la purificación o la detección de dicho FVII humano presente en leche de coneja transgénica, caracterizada por que dicho aptámero inmovilizado no se une al FVII de conejo y que dicha leche de coneja transgénica es susceptible de contener FVII de conejo.

La invención tiene también por objeto la utilización de un aptámero de ADN inmovilizado sobre un soporte sólido a través de un espaciador, uniéndose dicho aptámero inmovilizado específicamente al FVII de conejo, para la detección de dicho FVII de conejo susceptible de estar presente en leche de coneja transgénica, caracterizada por que dicho aptámero inmovilizado no se une al FVII humano y por que dicha leche de coneja transgénica contiene

FVII humano.

El FVII humano y el FVII de conejo tienen una homología de secuencias de aminoácidos de aproximadamente un 75% (calculado por BLAST).

5 Otro objeto de la presente invención se refiere a un procedimiento de selección de un aptámero que se une específicamente a una proteína diana, pero que no se une a una proteína homóloga de la proteína diana que comprende las etapas de:

10 a) poner en contacto una mezcla de aptámeros con dicha proteína homóloga de la proteína diana en condiciones favorables a la unión, y recuperar los aptámeros que no se unen a la proteína homóloga,

15 b) poner en contacto la mezcla de aptámeros obtenida en la etapa a) con dicha proteína diana en condiciones favorables a la unión,

c) separar los aptámeros no unidos de los aptámeros que se han unido a dicha proteína diana,

d) disociar las pares aptámero-proteína diana,

20 e) amplificar los aptámeros disociados para dar una mezcla enriquecida en aptámero que se une a la proteína diana, pero que no se une a la proteína homóloga de la proteína diana, y

25 f) reiterar las etapas a), b), c), d) y e) sobre tantos ciclos como se desee para obtener dicho o dichos aptámeros que se unen específicamente a la molécula diana, pero que no se unen a una proteína homóloga de la proteína diana.

El procedimiento de selección de un aptámero de la invención se parece al procedimiento SELEX descrito en la técnica anterior con, además, una etapa denominada de "sustracción" (etapa a). Así, el procedimiento de la invención se denomina "SELEX por sustracción".

30 El procedimiento SELEX de selección de los aptámeros consiste en poner en contacto una proteína con una biblioteca combinatoria de ácidos nucleicos, ADN o ARN (en general 10^{15} moléculas), los ácidos nucleicos que no se unen a la diana se eliminan, los ácidos nucleicos que se unen a la diana se aíslan y se amplifican. El procedimiento se repite hasta que la solución sea suficientemente enriquecida con los ácidos nucleicos que tienen una buena afinidad para la proteína de interés (Tuerk y Gold, "Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase" (1990) Science, 249(4968): 505-10 y Ellington y Szostak, "In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands", (1990) Nature 30 de agosto; 346(6287):818-22). Otros ejemplos de procedimiento SELEX se dan en los documentos EP 0 786 469, EP 668 931, EP 1 695 978, EP 1 493 825 cuyas enseñanzas pueden ser recogidas en la realización del procedimiento de selección de un aptámero de la invención.

40 La etapa de separación (etapa c) se puede realizar mediante cualquier procedimiento que permite separar los aptámeros unidos a la proteína diana, denominados pares aptámero-proteína diana, de los aptámeros no unidos a la proteína diana. La separación puede efectuarse mediante diferentes procedimientos conocidos en la técnica anterior. Así, los pares aptámero-proteína diana pueden ser retenidos en unos filtros de nitrocelulosa mientras que los aptámeros libres no son retenidos. Para la etapa de separación, se pueden utilizar también unas columnas que retienen específicamente los pares aptámero-proteína diana. Se pueden utilizar también otros procedimientos, como la extracción líquido-líquido, la filtración sobre gel de retardo o la centrifugación sobre gradiente de densidad. La selección del procedimiento de separación dependerá de las propiedades de la proteína diana y del par aptámero-proteína diana y puede ser realizado en función de principios conocidos por el experto en la materia.

50 La etapa de disociación (etapa d) se puede realizar mediante unos métodos que permiten disociar unas entidades químicas. Ventajosamente, la disociación se realiza por un aumento de la fuerza iónica o una modificación del pH.

55 La amplificación realizada en la etapa e) se puede realizar mediante cualquier procedimiento que permita aumentar la cantidad o el número de copias de un aptámero. Ventajosamente, la amplificación de un aptámero se realiza mediante la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Ventajosamente, la amplificación se obtiene bien por PCR si se trata de ADN, o bien por RT-PCR si se trata de ARN.

60 El procedimiento "SELEX por sustracción" se caracteriza por la etapa denominada de "sustracción" (etapa a) que permite eliminar los aptámeros que se unen a la proteína homóloga de la proteína diana. Después de haber realizado un ciclo que comprende las etapas a), b), c), d) y e), los ciclos siguientes pueden reanudar o bien las etapas a), b), c), d), y e), o bien partir directamente de la etapa b) a partir de un grupo de aptámeros amplificados en la etapa e) del ciclo anterior. Así, la etapa a) de sustracción se realiza al principio de cada nuevo ciclo o alternativamente después de haber efectuado al menos un ciclo sin etapa a) y hasta obtener unos aptámeros que se unen específicamente a la proteína diana pero que no se unen a la proteína homóloga de la proteína diana. Ventajosamente, cada etapa a) se realiza cada dos o tres ciclos.

Los ejemplos siguientes permiten ilustrar la invención.

EJEMPLOS

5

Ejemplo 1: Unión del aptámero (SEC nº 1) con el FVII humano

Un aptámero de secuencia SEC nº 1 se ha sintetizado por la compañía Sigma-Proligo.

10

SEC nº 1:

**5'PGGGAGAGAGGAAGAGGGGAUGGGAGCCUAUGUAAACAGAU GCAGAU C
CCUAGUCGUCCCAACACCAUAAC-3'-Biotina**

15

Este aptámero se modifica sobre su extremo 3' mediante el injerto de una biotina. Las bases nucleotídicas marcadas en negrita (SEC nº 1) son 2'O-metiladas, lo que permite estabilizar el aptámero haciéndole más resistente a las nucleasas. El aptámero se ha inmovilizado después sobre un chip SA (Biacore GE) que contiene avidina. El aptámero se inmoviliza así de manera orientada por su extremo 3' con un porcentaje de inmovilización de 2700 RU (1 RU corresponde aproximadamente a 1 pg de producto inmovilizado por mm²).

20

Se diluyó un FVII humano purificado a partir del plasma (FVII HP, pureza: 99%) en un tampón de desarrollo (Hepes 20 mM pH=8, NaCl 50 mM, CaCl₂ 2 mM y un 0,01% de BSA) con el fin de obtener cuatro muestras de concentración en FVII HP de 50, 100, 200 y 400 nM. Cada muestra se ha inyectado de manera secuencial sobre un mismo chip que contiene el aptámero inmovilizado por una interacción biotina-estreptavidina. Los controles se obtienen inyectando unos blancos que contienen sólo un tampón de desarrollo. Todas las inyecciones se han realizado con un caudal de 20 µl/min. durante 120 s, después de la inyección, se ha inyectado un tampón de desarrollo sobre el chip a un caudal idéntico durante 240 s. Un tampón de elución (NaCl, 5M) se ha inyectado después durante 60 s con un caudal de 30 µl/min para desacoplar el FVII HP del aptámero. Cada inyección (muestras y blancos) se realizaron en duplicado. El chip permite estudiar en tiempo real la formación y la ruptura de las interacciones entre el FVII HP y el aptámero inmovilizado gracias a la resonancia plasmónica de superficie (RPS). Una unión sobre el aptámero inmovilizado se traduce por un aumento de la señal en unidad de resonancia (RU) registrado por el aparato (Figura 1). Estos análisis se efectúan con el aparato de RPS Biacore T100[®] (GE). La modelización de las interacciones registradas se efectúa con la ayuda del programa Biaevaluation[®] (GE). Con la ayuda de un modelo de unión alostérica, el K_d de unión entre el aptámero y el FVII HP se estimó en 1,4 µM.

25

30

35

40

Con el fin de verificar que el producto que se une al aptámero inmovilizado es en realidad el FVII, se ha realizado sobre el mismo chip una secuencia de inyección que comprende (i) el FVII HP de 200 nM y (ii) un anticuerpo policlonal anti-FVII de 100 nM (Abcam). Las condiciones de inyección y de análisis son idénticas a las descritas anteriormente. Si el aptámero retiene efectivamente el FVII, la inyección de anticuerpo policlonal anti-FVII debe traducirse por un aumento de la señal de RU después de la unión de los anticuerpos sobre el propio FVII unido al aptámero. En los controles, sólo se inyectan unos anticuerpos. El aumento de señal de RU muestra claramente que el aptámero reconoce el FVII (figura 2).

45

Este ejemplo muestra que el aptámero, una vez inmovilizado, se une específicamente al FVII HP, con una afinidad significativa.

Ejemplo 2: Unión del aptámero (SEC nº 1) con FVII de conejo

50

Se ha diluido FVII plasmático de conejo (American Diagnostics) en el mismo tampón que en el ejemplo 1 a concentraciones de 50, 100, 200, 400 nM y después se ha inyectado en las mismas condiciones que en el ejemplo 1 en el mismo chip que contiene el aptámero inmovilizado.

55

Las señales registradas de RU, mostradas en la figura 3, muestran la ausencia total de unión del aptámero para el FVII de conejo a pesar de una fuerte homología de secuencia de aminoácidos entre el FVII de conejo y con el FVII HP (aproximadamente un 75% de homología de secuencia de aminoácidos).

Este ejemplo muestra que el aptámero se une específicamente al FVII HP pero no se une al FVII de conejo.

Ejemplo 3: diferencias de afinidad frente al aptámero (SEC nº 1) entre FVII HP, FVII transgénico y FVII de conejo

60

Se han realizado unas inyecciones sucesivas de FVII HP, de FVII plasmático de conejo y de FVII transgénico humano en condiciones idénticas a las del ejemplo 1 en un mismo chip. Los datos obtenidos (figura 4) muestran que el aptámero se une al FVII HP y a FVII transgénico, con unas afinidades diferentes, pero no obstante fuertes, pero no se une al FVII de conejo.

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la selección de un aptámero que se une específicamente a una proteína diana pero que no se une a una proteína homóloga de dicha proteína diana, que comprende las etapas siguientes:
- 10 a) poner en contacto una mezcla de aptámeros con dicha proteína homóloga de la proteína diana, y recuperar los aptámeros que no se unen a la proteína homóloga,
- 15 b) poner en contacto la mezcla de aptámeros obtenida en la etapa a) con dicha proteína diana,
- 20 c) separar los aptámeros no unidos de los aptámeros que se han unido a dicha proteína diana,
- d) disociar los pares aptámero-proteína diana,
- 25 e) amplificar los aptámeros disociados para dar una mezcla enriquecida de aptámeros que se unen a la proteína diana pero que no se unen a la proteína homóloga de la proteína diana, y
- f) reiterar las etapas a), b), c), d) y e) sobre tantos ciclos como se desee para obtener dicho o dichos aptámeros que se unen específicamente a la molécula diana pero que no se unen a una proteína homóloga de la proteína diana.
- 30 2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que la etapa e) se realiza por PCR.
3. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por que la proteína diana es un polímero de aminoácidos seleccionado entre una proteína, un fragmento de proteína y un oligopéptido.
- 35 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que la proteína diana es una proteína de interés terapéutico.
- 40 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que la proteína diana es una proteína transgénica producida por un mamífero no humano transgénico para el gen que codifica dicha proteína.
- 45 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que la proteína diana se selecciona entre un anticuerpo, una proteína antiviral, una hormona, un factor de crecimiento y un factor de la coagulación.
- 50 7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que la proteína diana es un factor de la coagulación seleccionado entre factor VII (FVII), el factor VIII (FVIII), el factor X (FX), el factor IX (Factor IX), el factor XI (FXI), el factor XII (FXII), el factor XIII (FXIII), el factor II (trombina), la antitrombina III (AT III), el cofactor II de la heparina (HCII), la proteína C (PC), la trombomodulina (TM), la proteína S (PS), el factor V (FV), el factor de Willerbrand (Wf) y el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI).
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que la proteína diana es el factor VII humano.
9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por que la proteína diana es el factor VII natural o modificado o un fragmento de éste.
10. Aptámero que se une al factor VII humano y que no se une al factor VII de conejo obtenido mediante el procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9.

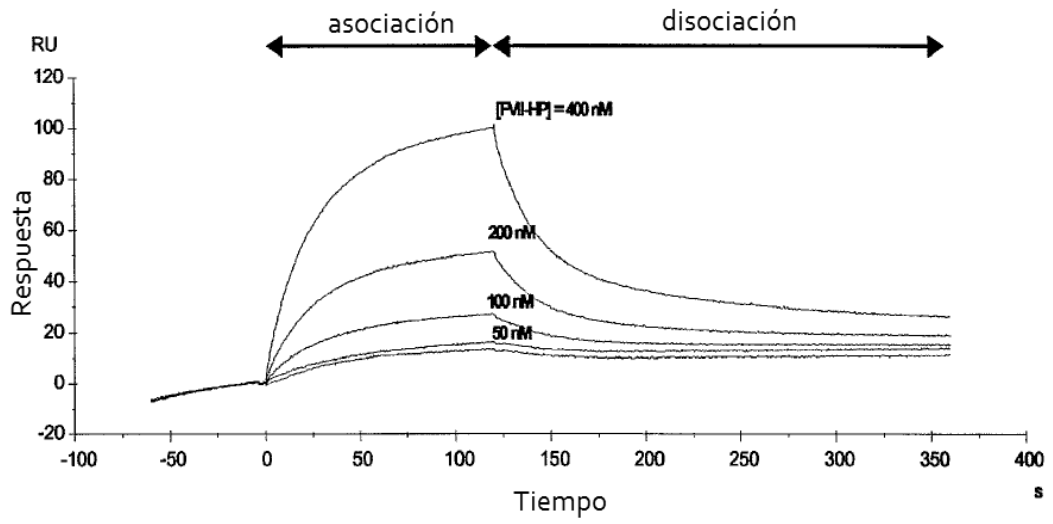


Figura 1

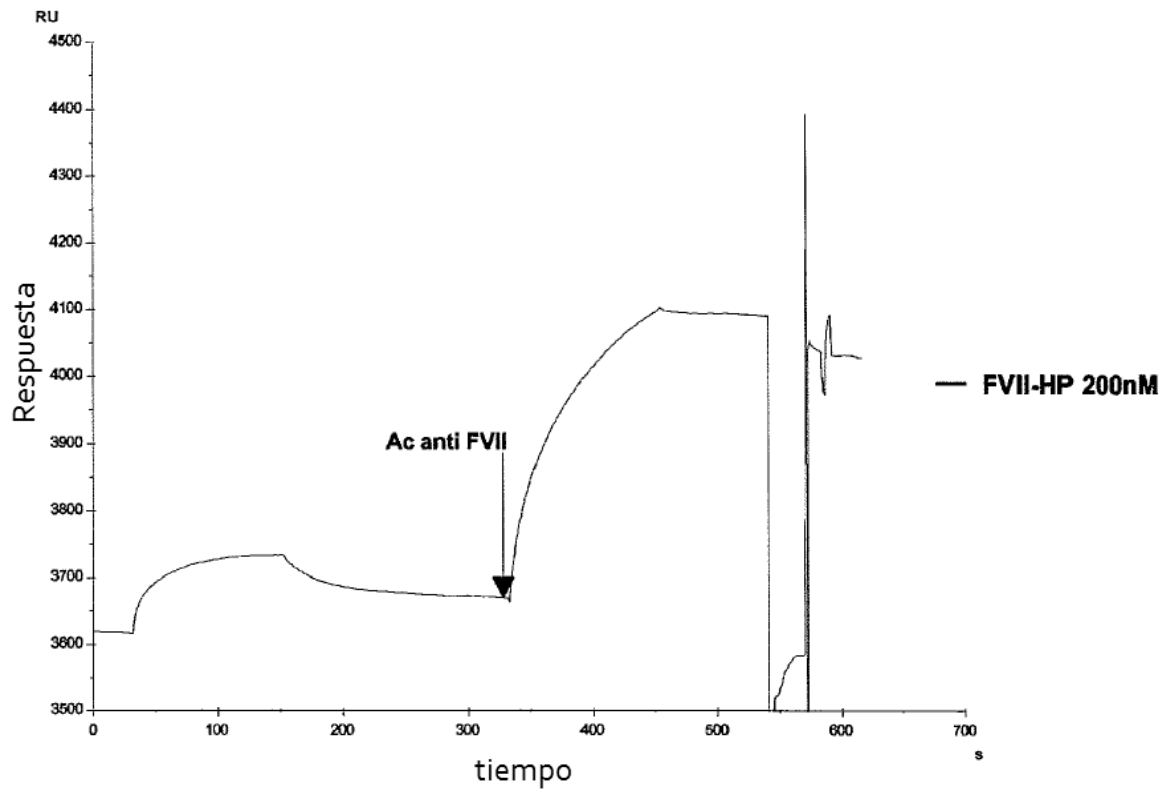


Figura 2

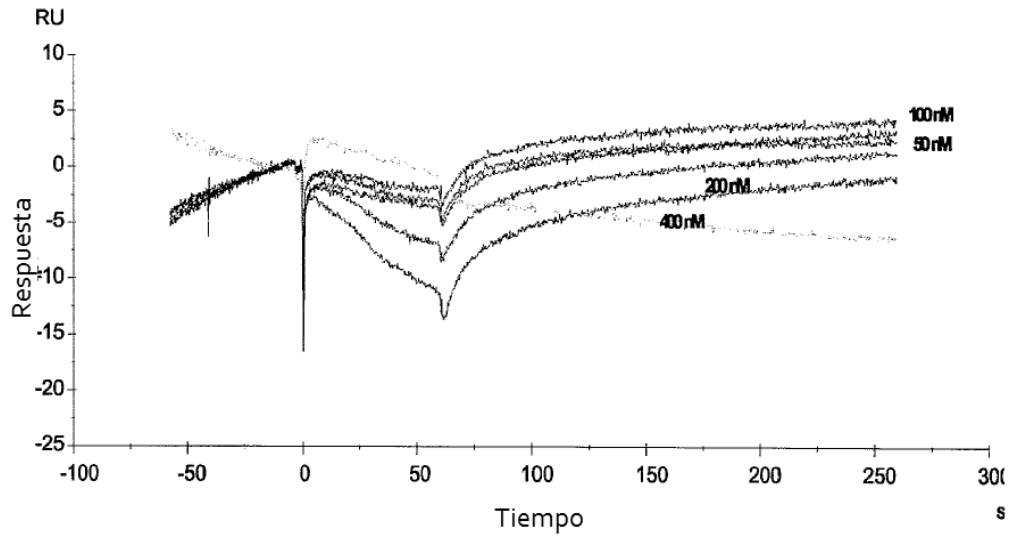


Figura 3

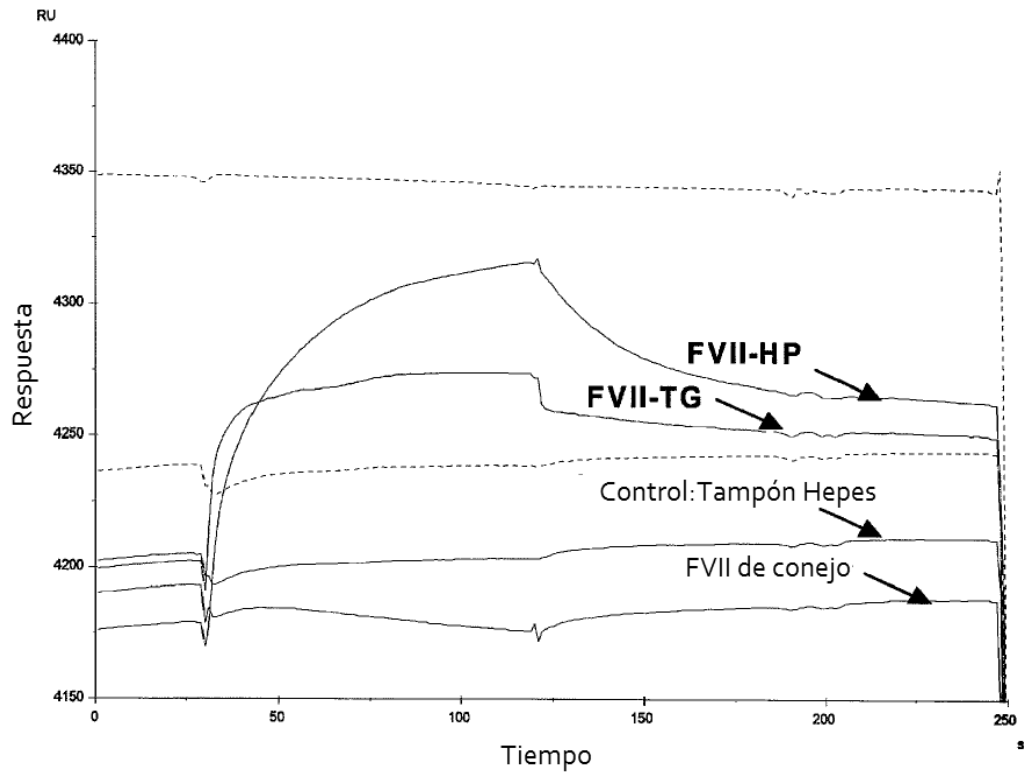


Figura 4