

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 785 323**

21 Número de solicitud: 202030442

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01)
C12N 5/22 (2006.01)
A61P 7/02 (2006.01)
C07K 14/745 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

14.05.2020

43 Fecha de publicación de la solicitud:

06.10.2020

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

10.11.2020

Fecha de concesión:

11.12.2020

45 Fecha de publicación de la concesión:

18.12.2020

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
(55.0%)
AVENIDA SÉNECA 2
28040 MADRID (Madrid) ES y
FUNDACIÓ INSTITUT DE RECERCA DE
L'HOSPITAL DE LA SANTA CREU I SANT PAU
(45.0%)**

72 Inventor/es:

**LIRAS MARTÍN, Antonio;
SERRANO RAMOS, Luis Javier;
BERNAL NOGUERA, Sara**

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **MÉTODO IN VITRO PARA RECUPERAR LA EXPRESIÓN DEL GEN F5 QUE CODIFICA EL FACTOR V DE LA COAGULACIÓN**

57 Resumen:

Método in vitro para recuperar la expresión del gen F5 que codifica el factor V de la coagulación.

La presente invención se relaciona con el déficit de factor V de la coagulación y con la edición génica (CRISPR), para la corrección in vitro de mutaciones en el gen F5 y la generación de herramientas con las que curar la enfermedad que hoy día no tiene tratamiento.

La invención incluye un método in vitro para recuperar la expresión del gen F5 que codifica el factor V de la coagulación, mediante la utilización de la metodología CRISPR/Cas9 que corrige la nueva mutación patológica descrita.

La invención también incluye cultivos celulares in vitro en los que se ha corregido la nueva mutación, así como kits que incluyen las parejas de guías utilizadas en el método CRISPR/Cas9 para recuperar la expresión del gen F5 con esa mutación.

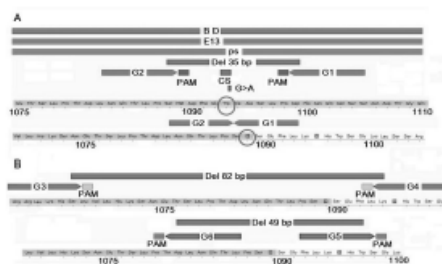


Fig. 3

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 785 323 B2

DESCRIPCIÓN

**MÉTODO IN VITRO PARA RECUPERAR LA EXPRESIÓN DEL GEN F5 QUE
CODIFICA EL FACTOR V DE LA COAGULACIÓN**

5

SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención se encuadra en el sector de las enfermedades relacionadas con la coagulación sanguínea y, más concretamente, con el déficit de factor V, también
10 denominado parahemofilia o enfermedad de Owren. Así mismo, se relaciona con la aplicación de la edición génica para la corrección de mutaciones en el gen que codifica el factor V de la coagulación.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15

El factor V es una proteína esencial que participa en la coagulación y que desempeña un papel clave en la llamada cascada de la coagulación de la sangre debido a su actividad procoagulante y anticoagulante. El 80% del factor V circulante se produce en el hígado y el 20% restante en los gránulos alfa de las plaquetas. En humanos, el gen
20 que expresa esta proteína (*F5*) tiene un tamaño aproximado de 80kb y se encuentra en el cromosoma 1q24.2. La secuencia codificadora del gen *F5* se divide en 25 exones y 24 intrones y su cDNA tiene un tamaño de 6914bp. Hasta ahora, se han descrito, aproximadamente, 150 mutaciones puntuales y pequeñas inserciones y deleciones en el gen. La deficiencia de factor V, una enfermedad ultrarrara ya que ocurre en solo 1 a
25 9 por millón, es un trastorno de la coagulación de tipo autosómico recesivo asociado a mutaciones en el gen *F5*. Este trastorno hereditario de la coagulación se caracteriza clínicamente por un espectro heterogéneo de manifestaciones hemorrágicas que van desde sangrados de mucosas o tejidos blandos, hasta hemorragias potencialmente mortales. En la actualidad no existe un tratamiento ni paliativo ni curativo para esta
30 enfermedad, tan solo la administración de plasma fresco congelado. Esta alternativa es muy poco duradera (4 horas) y la dosificación es muy difícil de ajustar a las características del paciente ya que la concentración de factor V en los acervos de plasma son muy variables según donante (Tabibian S, y col. A Comprehensive Overview of Coagulation Factor V and Congenital Factor V Deficiency. *Semin Thromb Hemost*,

2019;45:523-43).

En la solicitud de patente US2012270708A1 sobre el tratamiento de coagulopatías con hiperfibrinólisis, se describe la utilización de análogos de trombomodulina (nuevas
5 modificaciones de la proteína) para la elaboración de un medicamento con el que tratar las coagulopatías que cursan con hiperfibrinólisis, como los desórdenes relacionados con la hemofilia entre los que incluye la parahemofilia.

En WO2010069946A1 se describe un método para purificar el factor V a partir de fluidos
10 biológicos, con el interés de utilizarlo en casos de deficiencia en este factor de la coagulación.

La solicitud de patente WO2008059009A2 se refiere a un método para prevenir y tratar hemorragias en articulaciones, músculos y tejidos blandos en pacientes hemofílicos,
15 mediante la administración de factor V resistente a APC (proteína C activada), que tiene capacidad para inactivar tanto el factor V como el factor VIII de la coagulación, como hemostático.

WO2010060035A1 describe estrategias terapéuticas que utilizan variantes derivadas
20 del factor V presente en el veneno de serpiente, y sus derivados, para modular la cascada de la coagulación en los pacientes que lo precisan, dado que el factor V del veneno de algunas serpientes presenta alrededor de un 44% de homología en su secuencia con la del factor V de mamíferos.

También se han descrito composiciones y métodos para inhibir la expresión de determinados genes mutantes del factor V, como en la solicitud de patente
25 US2011130443A1 en la que se describe un ARN de doble cadena para inhibir la expresión del gen mutante que provoca una sustitución de G por A en el nucleótido 1691 en el gen del factor V, que provoca un cambio Arg506Gln.

30

A pesar de las aportaciones citadas, sigue sin existir un tratamiento frente a esta enfermedad, en gran medida, debido a que algunas de las soluciones que se describen no son rentables económicamente al tratarse de una enfermedad ultrarrara. En cualquier caso, serían tratamientos paliativos y de baja eficacia en deficiencias severas de

factor V.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

- 5 Método *in vitro* para recuperar la expresión del gen *F5* que codifica el factor V de la coagulación.

Debido a que actualmente en el mercado farmacológico no existe un tratamiento curativo ni paliativo específico de esta patología, a excepción del tratamiento genérico
 10 para diversas coagulopatías como es el plasma fresco congelado, en esta invención se utiliza una metodología génica, basada en la edición génica mediante la herramienta CRISPR/Cas9, para proporcionar herramientas para curar (no paliar) esta patología, actuando de manera específica sobre la mutación que produce ese déficit de factor V de la coagulación. Se trata de un método *in vitro* que no es un método de tratamiento
 15 del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapias realizadas en el cuerpo y tampoco es para modificar la identidad genética de la línea germinal del ser humano. El objetivo es proporcionar las herramientas necesarias que, posteriormente, podrán ser utilizadas para establecer un tratamiento curativo de larga duración o permanente e individualizado para cada paciente.

20

Un aspecto de la presente invención se refiere a un método *in vitro* para recuperar la expresión del gen *F5* que codifica el factor V de la coagulación mediante la utilización de la metodología CRISPR/Cas9. Este método incluye la utilización de una pareja de guías en la que cada una de las guías tiene una longitud de entre 18 y 22 nucleótidos y
 25 ambas están localizadas entre 150 nucleótidos corriente arriba y 150 nucleótidos corriente abajo con respecto a la posición de la mutación localizada en el nucleótido 3279 del gen *F5*. Preferentemente, se utiliza una pareja de guías caracterizadas por SEQ ID NO: 68-69 o una pareja de guías caracterizadas por SEQ ID NO: 70-71. Mediante la utilización de la metodología CRISPR/Cas9 con cualquiera de estas parejas
 30 de guías, se corrige una mutación en el nucleótido 3279 del gen *F5* que genera en la secuencia aminoacídica del factor V una mutación sin sentido que da lugar a un codón stop (de parada) (p.Trp1093*). Esta mutación se ha identificado mediante secuenciación del gen *F5* de una paciente que presenta una deficiencia severa de factor V; la secuencia obtenida está caracterizada por SEQ ID NO: 65.

35

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un cultivo celular *in vitro* en el que se ha recuperado la expresión del gen *F5* que codifica el factor V de la coagulación. En estas células se ha corregido la mutación del gen *F5* identificada en el nucleótido 3279 que generaba en la secuencia aminoacídica del factor V una mutación sin sentido que da lugar a un codón stop (de parada) (p.Trp1093*) mediante la utilización de la metodología CRISPR/Cas9 incluyendo la utilización de una pareja de guías, en la que cada una de las guías tiene una longitud de entre 18 y 22 nucleótidos y ambas están localizadas entre 150 nucleótidos corriente arriba y 150 nucleótidos corriente abajo con respecto a la posición de la mutación localizada en el nucleótido 3279 del gen *F5*. Preferentemente, se utiliza la pareja de guías caracterizadas por SEQ ID NO: 68-69 o la pareja de guías caracterizadas por SEQ ID NO: 70-71. La secuencia completa del gen *F5* mutado puede ser la caracterizada por SEQ ID NO: 65.

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit que comprende una pareja de guías, en la que cada una de las guías tiene una longitud de entre 18 y 22 nucleótidos y ambas están localizadas entre 150 nucleótidos corriente arriba y 150 nucleótidos corriente abajo con respecto a la posición de la mutación localizada en el nucleótido 3279 del gen *F5*. Preferentemente, comprende la pareja de guías caracterizadas por SEQ ID NO: 68-69 y/o la pareja de guías caracterizadas por SEQ ID NO: 70-71. Además, este kit puede comprender una proteína Cas9 o un polinucleótido que codifica la proteína Cas9.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, un juego de dibujos en donde, con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

Figura 1. Variantes genéticas patológicas (mutaciones) encontradas en el gen *F5* de la paciente.

Figura 2. Edición génica de corrección de mutaciones mediante CRISPR/Cas9, según el estado de la técnica.

FIGURA 3. Diseño de guías de edición génica mediante CRISPR/Cas9, para la obtención del modelo celular mutado y para la corrección de la mutación:

A) Obtención del modelo celular mutado.

B) Reversión y corrección de la mutación.

5

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitativos de su alcance.

10

Ejemplo 1. Análisis hematológico y de coagulación.

Se tomaron muestras de sangre de una paciente de 10 años y de sus padres. La niña, procedente del sur de España, presenta una deficiencia severa de factor V (FV:C<1%).

15

Los demás factores de la coagulación presentan niveles normales. Al analizar tanto al padre como a la madre de la niña, resultó que ambos tienen deficiencias del factor V de la coagulación.

20

Para la toma de muestras, se obtuvo con anterioridad la aprobación del Comité Ético del Hospital 12 de Octubre de Madrid y el procedimiento se siguió de acuerdo con la Declaración de Helsinki.

25

Las muestras de sangre se distribuyeron en tubos con 0,105M de citrato sódico (1:10). El plasma se obtuvo mediante centrifugación a 2000xg durante 20 minutos y, posteriormente, se almacenó en alícuotas a -80°C hasta su utilización.

30

Se analizaron los siguientes parámetros hematológicos: concentración de hemoglobina (Hb), hemoglobina corpuscular media (HCM), concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), recuento de eritrocitos, hematocrito, volumen corpuscular medio (VCM), recuento de reticulocitos, recuento de leucocitos, recuento de plaquetas, volumen medio plaquetario (VMP), y plaquetocrito. Todos estos parámetros se obtuvieron en un contador celular automático ADVIA®120 Hematology System; Siemens Healthcare GmbH, Zurich, Suiza).

35

Las muestras de sangre para el análisis de la función plaquetaria y de los tiempos de

coagulación se tomaron en tubos para la extracción de sangre por vacío (Vacutainer, Becton Dickinson) con un 3,8% de citrato sódico y se procesaron en un Platelet Function Analyzer-100 (PFA-100®; Siemens Healthcare Diagnostics AG, Zurich, Suiza). Para determinar el tiempo de sangrado y la agregación plaquetaria se utilizaron cartuchos de colágeno/adenosina-5-difosfato (ADP) (Dade® PFA, Siemens Healthcare Diagnostics, AG, Zurich, Suiza). Los cartuchos se utilizaron a temperatura ambiente añadiéndoles 1 mL de sangre tratada con citrato. Las muestras se aspiraron en vacío constante a través de un capilar y una abertura microscópica practicada en una membrana recubierta de colágeno y ADP.

Todos los parámetros relacionados con la hemostasia, como el tiempo de protrombina (TP), la actividad de protrombina (AP), el tiempo de tromboplastina parcial activada (aTPP) (tiempo de cefalina), el fibrinógeno (F) y el índice normalizado internacional (INI), se determinaron de conformidad con las normas definidas por el Departamento de Hematología del Hospital Universitario de Jaén, España. Se utilizaron los kits HemosIL® (Instrumentation Laboratory; Bedford, Massachusetts, EE.UU.), según las instrucciones del fabricante.

Se utilizó HemosIL® RecombiPlasTin 2G para medir el tiempo de protrombina (TP) y los niveles de fibrinógeno y se utilizó un reactivo de tromboplastina de alta sensibilidad, basado en el factor tisular humano recombinante (rhFT). Tras reconstituir los diluyentes de RecombiPlasTin 2G, el reactivo PT incluido en el kit RecombiPlasTin 2G se convierte en una preparación liposomal que contiene rhFT en una mezcla de fosfolípidos sintéticos y combinado con cloruro de calcio, tampón y un conservante. Como el rhFT no contiene ningún factor de coagulación contaminante, RecombiPlasTin 2G es muy sensible a los factores de coagulación de vías extrínsecas, lo que lo hace especialmente adecuado para los ensayos con esos factores. Por otro lado, la formulación de RecombiPlasTin 2G hace que sea insensible a los niveles de heparina terapéutica. En la prueba de TP, la adición del reactivo al plasma del paciente en presencia de iones de calcio activa la vía de coagulación extrínseca. Esto eventualmente resulta en la conversión de fibrinógeno en fibrina, con la formación de un gel sólido. El fibrinógeno se cuantificó relacionando la absorbancia, o dispersión de la luz, durante la formación del coágulo, con un calibrador. Los resultados del TP se indican en segundos, porcentaje de actividad, o INI; los niveles de fibrinógeno, en g/L.

Para determinar el valor de aTPP se utilizó HemosIL® APTT-SP (líquido). El test de aTPP utiliza un activador de contacto que estimula la producción de factor XIIa. El activador es una dispersión de sílice coloidal con fosfolípidos sintéticos, un tampón y un conservante y proporciona una superficie de contacto para la interacción del kininógeno de alto peso molecular, la calicreína y el factor XIIa. La activación por contacto se produce a 37°C durante un período de tiempo determinado. La adición de cloruro de calcio 0,025 M con un conservante desencadena una serie de reacciones que darán lugar a la formación de coágulos. También son necesarios fosfolípidos para generar los compuestos que actuarán sobre el factor X y la protrombina. Los resultados se expresan en segundos.

Se utilizó plasma deficiente de HemosIL® FV para la determinación cuantitativa de la actividad de factor V. La actividad de factor V en el plasma se determinó utilizando la prueba de tiempo de protrombina modificada realizada en el plasma diluido con citrato del paciente en presencia de plasma humano inmunodeplecionado con factor V. La corrección del tiempo de coagulación prolongado para el plasma deficiente fue proporcional a la concentración (porcentaje de actividad) del factor específico (factor V) en el plasma del paciente, que puede obtenerse trazando una curva de calibración. Los niveles de referencia del factor V oscilaban entre el 60-130% (0,60-1,30 IU).

Tanto en la niña como en sus progenitores, todos los parámetros hematológicos, incluyendo la concentración de hemoglobina (Hb), la hemoglobina corpuscular media (HCM), la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), el recuento total de eritrocitos (RBC), el hematocrito (HCT), el volumen corpuscular medio (VCM), los reticulocitos (RETIC), el recuento de leucocitos (GB), el recuento diferencial de GB, el recuento de plaquetas (PLT), el volumen medio de plaquetas (VMP), y el plaquetocrito (PCT), estaban dentro de los rangos de referencia.

En el análisis de coagulación, la niña mostró valores alterados tanto para las vías de coagulación extrínsecas como para las intrínsecas (tiempo de protrombina (TP), la actividad de protrombina (AP), tiempo de tromboplastina parcial activada (aTPP) (tiempo de cefalina), fibrinógeno (F), índice normalizado internacional (INI), y actividad de factor V. La paciente presenta una deficiencia grave de factor V con una actividad de factor V inferior al 1% con respecto al valor de referencia. En sus padres, las alteraciones de los parámetros de coagulación y la actividad del factor V estuvieron en consonancia con el

nivel de afectación del alelo del gen *F5* y el estado heterocigoto que presentan.

Ejemplo 2. Extracción de ADN.

- 5 Tras el consentimiento informado, se recogieron muestras de sangre anticoagulada con EDTA. El ADN genómico se extrajo automáticamente de los leucocitos periféricos aislados previamente, mediante procedimientos de precipitación salina utilizando la instrumentación de Autopure (Qiagen). Mediante este kit se obtiene DNA genómico listo para su uso de forma simple y rápida a partir de muestras de 200µL de sangre entera.
- 10 Se basa en una centrifugación a vacío y no es necesaria la previa separación de los leucocitos. No se requiere ni la extracción con fenol/cloroformo ni la precipitación con alcohol. El ADN purificado para su uso en PCR se conserva entre -25 °C y -15 °C.

Ejemplo 3. Análisis de las mutaciones.

- 15 Se diseñaron cebadores correspondientes a la secuencia completa que codifica el gen *F5* y las regiones adyacentes intrónicas, según la entrada NC_000001.11 (169511951-169586630, complementaria) de la base de datos del NCBI, para obtener productos de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de un tamaño de entre 300 y 600 pb,
- 20 aproximadamente (Tabla 1).

Tabla 1. Referencia de los cebadores y tamaño de los fragmentos obtenidos para la secuenciación completa del gen *F5* de la paciente en estudio.

Exón	Cebadores	Secuencia 5' → 3'	Fragmento amplificado (bp)
1	F5_1F (SEQ ID NO: 1)	CACCTGCAGTAA AACAGTCAC	532
	F5_1R (SEQ ID NO: 2)	AGCCATGACATTGCAAAGGG	
2	F5_2F (SEQ ID NO: 3)	ACAGTTTGGGTTTCTACTGTG	461
	F5_2R (SEQ ID NO: 4)	GCAATGTGAATGCCAAATTACCC	
3	F5_3F (SEQ ID NO: 5)	AAGTGAGTCAGCCTCAGGAC	451
	F5_3R (SEQ ID NO: 6)	AATGCAGGTCTAGAGGACTC	
4	F5_4F (SEQ ID NO: 7)	TACATGAGCATAGAAATGGGC	528
	F5_4R	TCAAACAATGATCTGGTCTCC	

	(SEQ ID NO: 8)		
5	F5_5F (SEQ ID NO: 9)	CCCCAAAGCAAGAAGGTATC	488
	F5_5R (SEQ ID NO: 10)	CCTTCTTGATAGGGAGTTGC	
6	F5_6F (SEQ ID NO: 11)	AGGGCACAAACTACAACCTGG	494
	F5_6R (SEQ ID NO: 12)	TGAGGAAAGTTTGTCTGCGG	
7	F5_7F (SEQ ID NO: 13)	TCTTGCCTTTTCTGGATGCC	463
	F5_7R (SEQ ID NO: 14)	CCAATACATGTGTCCCCTTG	
8	F5_8F (SEQ ID NO: 15)	ATGCAGGAGACAAATCAGAAG	572
	F5_8R (SEQ ID NO: 16)	TTGAGAAACTGTCTCAGATCC	
9	F5_9F (SEQ ID NO: 17)	AATGCTCCTGCCAAGTGATG	442
	F5_9R (SEQ ID NO: 18)	AACTCCTGAAGTGAGAAGGG	
10	F5_10F (SEQ ID NO: 19)	GCAATATTAATTGGTTCCAGCG	413
	F5_10R (SEQ ID NO: 20)	TCTCTTGAAGGAAATGCCCC	
11	F5_11F (SEQ ID NO: 21)	GGAATAGAGAATCCTTTCCC	433
	F5_11R (SEQ ID NO: 22)	AAGTCTTTGGACTGGAAGTG	
12	F5_12F (SEQ ID NO: 23)	AATCACTGCTTTGACACAACC	459
	F5_12R (SEQ ID NO: 24)	TTGAAAGAAAAGCCTGCAGGG	
13	F5_13AF (SEQ ID NO: 25)	TAGGTCACAGACAAGCAGTG	562
	F5_13AR (SEQ ID NO: 26)	CTTTCTGAGGTTCTGCAAGG	
	F5_13BF (SEQ ID NO: 27)	TGGCTGCAGCATTAGGAATC	549
	F5_13BR (SEQ ID NO: 28)	CCAGTGTCTTGGCTAGGAAGG	
	F5_13CF (SEQ ID NO: 29)	TAAGCATAAGGGACCCAAGG	568
	F5_13CR (SEQ ID NO: 30)	TCTTAGAGGGTGAAAGGTCC	
	F5_13DF (SEQ ID NO: 31)	AACAAGCCTGGAAAGCAGAG	501
	F5_13DR (SEQ ID NO: 32)	TTCACTGAGCTCTGGAGAAG	
	F5_13EF	GCACTGGTCAGGCAAGCTG	651

	(SEQ ID NO: 33)		577
	F5_13ER (SEQ ID NO: 34)	TGGAGAAATGGGCATCTGAC	
	F5_13FF (SEQ ID NO: 35)	AGATGCCCATTTCTCCAGAC	
	F5_13FR (SEQ ID NO: 36)	AGATCTGTCTCACCAAGGTC	
	F5_13GF (SEQ ID NO: 37)	CAACCCTTTCTCTAGACCTC	520
	F5_13GR (SEQ ID NO: 38)	AGTCATCTTCACTGCTCTGG	
	F5_13HF (SEQ ID NO: 39)	CTTATCCAGACCTTGGTCAG	469
	F5_13HR (SEQ ID NO: 40)	ATAGGGGAACCAGACTGTTC	
14	F5_14F (SEQ ID NO: 41)	AGGTCATAGGAAGACTTACC	480
	F5_14R (SEQ ID NO: 42)	TCACCTATAGCTCTCTTGCC	
15	F5_15F (SEQ ID NO: 43)	ACTTGGGCCATATCTCACAG	502
	F5_15R (SEQ ID NO: 44)	GAAATAACCCCGACTCTTCC	
16	F5_16F (SEQ ID NO: 45)	GATCAATCAGAGGAAGGAGG	506
	F5_16R (SEQ ID NO: 46)	GTCTCAGAAGCATCTCATGTC	
17	F5_17F (SEQ ID NO: 47)	GGGAATGCAGAATCATGAGG	449
	F5_17R (SEQ ID NO: 48)	TTTGGGTCTATGGGTTTGCC	
18	F5_18F (SEQ ID NO: 49)	GAAAGCCTCTTGTGAAGCAG	365
	F5_18R (SEQ ID NO: 50)	CAATGCAATCAGACCATGGG	
19	F5_19F (SEQ ID NO: 51)	TTAAGTCAGGGCCACACAAG	357
	F5_19R (SEQ ID NO: 52)	CCCAAATGGAGCTGCTTCAC	
20	F5_20F (SEQ ID NO: 53)	TACAACACAGGTCCTCCAAG	339
	F5_20R (SEQ ID NO: 54)	GCCTCACACTTAGTACTTGC	
21	F5_21F (SEQ ID NO: 55)	AGGCAGTGTGTGACTTGTG	355
	F5_21R (SEQ ID NO: 56)	CCATATGACCCTTAGAAAGCC	
22	F5_22F (SEQ ID NO: 57)	CTGGAAGTGAATTATCCCC	425
	F5_22R	CAAAGGTTTTCTAGGAGCC	

	(SEQ ID NO: 58)		
23	F5_23F (SEQ ID NO: 59)	GCCTGAGAACAGTATTTGGC	414
	F5_23R (SEQ ID NO: 60)	ATACTCCTGCTTCCCAGATC	
24	F5_24F (SEQ ID NO: 61)	GAGACTGTGAATCCTAAGGG	420
	F5_24R (SEQ ID NO: 62)	AGAGGTGGTACATGTCACTG	
25	F5_25F (SEQ ID NO: 63)	GTTTAAGGCTGCAGTGAGCC	473
	F5_25R (SEQ ID NO: 64)	CTTACTTACTGGTAGCAAGGAG	

La amplificación por PCR se realizó en un volumen final de 25µL que contenía 1,5mM-2,5mM MgCl₂ (dependiendo del fragmento que se quería amplificar), 200µM de cada dNTP, 0,2µM de cada cebador, 0,5 unidades de Taq ADN polimerasa (Ecogen) en el tampón recomendado por el fabricante y 150-200ng de ADN genómico. Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: 94°C durante 5 minutos, seguidos de 30 ciclos a 94°C durante 30 segundos (paso de desnaturalización); 58°C-60°C (dependiendo del fragmento que se deseaba amplificar) durante 30 segundos y 72°C durante 2 minutos (paso de elongación), seguidos de un paso de extensión final de 20 minutos a 72°C.

Cuando se completó la amplificación por PCR, se eliminaron los dNTP y los cebadores sobrantes que quedaban en la mezcla de productos de la PCR mediante la utilización de las enzimas de digestión ExoSAP (exonucleasa I y fosfatasa alcalina) (Sigma-Aldrich). Una vez completado el procedimiento de purificación, la reacción de secuenciación bidireccional de la secuencia completa se realizó por el método Sanger utilizando el kit BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing. Las reacciones de secuenciación de los fragmentos amplificados se purificaron mediante el kit de montaje SEQ96 en un colector de vacío, para retirar los terminadores marcados no incorporados y las sales antes de someter a los productos de secuenciación a electroforesis capilar en un analizador genético ABI Prism 3500 (Applied Biosystems). Los cromatogramas de las secuencias se analizaron utilizando SeqScape v.2.1.1.

Para describir las mutaciones y las variantes genéticas se utilizó la nomenclatura de la *Human Genome Variation Society* (HGVS) (den Dunnen JT, y col. *HGVS recommendations for the description of sequence variants. 2016 update. Hum Mutation*, 2016;37:564-9). Todos los cambios de nucleótidos identificados en la paciente con deficiencia de factor V se analizaron mediante el programa informático *Alamut visual*

v.2.6. *software*, que integra la información genética y genómica de diferentes fuentes en un entorno coherente y conveniente para describir las variantes utilizando la nomenclatura de la HGVS y ayudar a interpretar su estado patogénico. Además, todos los cambios detectados en la niña se estudiaron en la madre y en el padre para determinar la segregación familiar.

A todas las mutaciones deletéreas y a las variantes genéticas se les asignó un número de nucleótido a partir de la primera base traducida del gen *F5* según la secuencia de referencia NM_000130.4 de la base de datos NCBI.

En el análisis de las mutaciones del gen *F5* de la paciente, se identificaron un total de 24 variantes de secuencias diferentes, entre ellas 2 mutaciones sin sentido que dan lugar a un codón stop, 1 mutación por desplazamiento del marco de lectura, 6 mutaciones que dan lugar a cambio de aminoácido, 9 variaciones sinónimas (sin cambio de traducción) y 7 cambios en intrones (Tabla 2 y Figura 1).

En la Figura 1, se muestran las dos variantes (mutaciones) patogénicas encontradas en el gen *F5* de la paciente con deficiencia severa de factor V. Son dos mutaciones sin sentido que dan lugar a dos codones de parada (stop codon) (CS). Una de ellas, la NM_000130.4: c. 3279G>A, p.Trp1093*, que implica un cambio de una guanina a una adenina (G>A), y la otra, la NM_000130.4: c. 2218C>T, p.Arg740*, ya descrita previamente, que implica un cambio de una citosina a una timina (C>T). Se indican las siguientes características: Msn: Mutación sin sentido; dominios (D) (A1, A2, B, A3, C1 y C2); los exones (E), la cadena pesada (Hc), la cadena ligera (Lc) y la región de división postraducciona (ps); sitio de inactivación por proteína C activada (APCC); sitio de activación por trombina (TC).

Tabla 2. Variantes genéticas identificadas en el gen *F5* de la paciente.

Gen <i>F5</i>	Exón	Intrón	Proteína FV	SNP	FAM
c.237A>G	2		p.Gln79Gln	rs6028	23
c.952+76C>T		6	*	rs2239854	27
c.1238T>C	8		p.Met413Thr	rs6033	5
c.1242A>G	8		p.Lys414Lys	rs6035	7
c.1297-121T>C		8	*	rs10800456	43
c.1380C>T	9		p.Asn460Asn	rs6015	5
c.1397-164C>T		9	*	rs7537742	50
c.1716G>A	11		p.Glu572Glu	rs6036	5

c.1926C>A	12		p.Thr642Thr	rs6037	5
c.2218C>T	13		p.Arg740*	**	**
c.2289A>G	13		p.Glu763Glu	rs6024	5
c.2450A>C	13		p.Asn817Thr	rs6018	5
c.2758A>G	13		p.Arg920Gly	**	**
c.3279G>A	13		p.Trp1093*	**	**
c.3865T>C.	13		p.Phe1289Leu	**	**
c.3939C>T	13		p.Ser1313Ser	**	**
c.3980A>G	13		p.His1327Arg	rs1800595	5
c.4095C>T	13		p.Thr1365Thr	rs9332607	26
c.4796+50A>C		13	*	**	**
c.5209-134T>C		15	*	**	**
c.5290A>G	16		p.Met1764Val	rs6030	29
c.6194-20C>A		22	*	rs6013	5
c.6529-65A>C		24	*	rs2227243	5
c.6665A>G	25		p.Asp2222Gly	rs6027	5

*No aplicable.

**Datos no disponibles.

De los 24 cambios, 17 tienen una frecuencia alélica pequeña (FAM) $\geq 5\%$ a la descrita en la base de datos de 1000 genomas (5 sin sentido, 7 sinónimos y 5 variantes intrónicas) (Tabla 2). Los siete cambios restantes no tienen valor FAM porque son raras variantes de secuencias que no están descritas previamente.

Además, también detectamos una correcta segregación familiar de los cambios identificados en la paciente con sus progenitores. En la niña, las dos mutaciones sin sentido (p.Arg740* y p.Trp1093*) están ambas en estado heterocigótico, una mutación la hereda de su madre (NM_000130.4: c. 2218C>T, p.Arg740*) y la otra la hereda de su padre (NM_000130.4: c. 3279G>A, p.Trp1093*).

El tipo de mutación se correlacionó con los niveles de actividad del factor V en la paciente y en sus progenitores. La mutación c.3279G>A en el padre se relaciona con una actividad del 21% y la mutación c.2218C>T en la madre, con una actividad de factor V del 62,9%.

De todas las variantes (mutaciones) encontradas en el gen *F5* de la paciente con deficiencia severa de factor V, dos se consideran mutaciones sin sentido patogénicas porque cumplen los criterios de patogenicidad (el propio carácter patógeno de un codón de parada). De ellas, la NM_000130.4: c. 3279G>A, p.Trp1093* es nueva puesto que no está descrita hasta el momento, mientras que la otra, NM_000130.4: c. 2218C>T,

p.Arg740*, ya ha sido descrita previamente (Lunghi B, y col. A Novel Factor V Null Mutation Detected in a Thrombophilic Patient With Pseudo-Homozygous APC Resistance and in an Asymptomatic Unrelated Subject. *Blood*, 1998;92:1463-5).

5 **Ejemplo 4.** Edición génica.

Una vez conocida la mutación específica de la paciente en estudio, se aplicó la edición génica (corrección de la mutación) mediante la técnica CRISPR/Cas9 (Figura 2) en un modelo celular diseñado en el laboratorio que portaba la misma mutación de la paciente.

10 La tecnología CRISPR/Cas9 (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas e intercaladas regularmente) representa una mejora significativa con respecto a otras herramientas de edición génica de nueva generación. El sistema CRISPR/Cas9 permite la focalización genómica específica de un sitio en el genoma en prácticamente cualquier organismo.

15

La figura 2 muestra el estado de la técnica: la diana para CRISPR/cas9 son pequeñas secuencias de ADN, localizadas alrededor de la mutación (MUT **X** –roja-), la cual expresa una proteína no funcional (PPT **X** –roja-). Se trata de una estrategia de terapia génica ya que se precisa introducir las guías (en amarillo) complementarias, que confinan la mutación y mediante una pequeña delección en el DNA genómico en el interior del núcleo de la célula, corrigen el marco de lectura. La proteína funcional se indica como PPT $\sqrt$ -verde-.

20

El sistema CRISPR/Cas tipo II es un sistema de respuesta inmune adaptativa procariótica que utiliza ARN no codificante para guiar la nucleación de Cas9 para inducir la división del ADN en un sitio específico. Este daño al ADN se repara mediante mecanismos de reparación celular del ADN, ya sea a través de la vía de reparación del ADN homóloga o no homóloga.

25

30 El sistema CRISPR/Cas9 se ha aprovechado para crear un método simple y programable de ARN para mediar la edición del genoma en las células de mamíferos, y puede ser usado para generar modelos *knockout* (KO) (inserción/eliminación). Para crear alteraciones genéticas, se genera un único ARN guía (sgARN) para dirigir la nucleasa Cas9 a una ubicación genómica específica. Las roturas de doble cadena

inducidas por Cas9 se reparan a través de la vía de reparación del ADN.

Ejemplo 5. Criterios para el diseño de guías específicas para CRISPR/Cas9.

5 Las guías específicas necesarias para la obtención del modelo celular mutado y para la corrección de la mutación (Figura 3) se diseñaron en función de los mapas genéticos de factor V humano, elaborados gracias a programas informáticos que nos muestran información relevante del gen, así como la secuencia genética completa en forma de ADNc (codificante sin intrones). Para diseñar con la mayor precisión posible las guías
10 de edición génica se utilizó la aplicación web <http://crispor.tefor.net/>. Los criterios de selección se basaron en la longitud de secuencia que se elimina, el “score”, la especificidad y los posibles “off-target”. Tanto las guías diseñadas como la nucleasa Cas 9 se adquirieron de la casa comercial IDT (USA).

15 **Ejemplo 6.** Obtención del modelo celular y corrección de la mutación.

Tanto para la obtención del modelo celular como para la eliminación de la mutación (Figura 3) se utilizó la línea celular HepG2, cedida por el Dr. José Carlos Segovia del Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas. Las células
20 HepG2 pertenecen a una línea de células inmortales que se derivan de carcinoma hepatocelular bien diferenciado. Estas células son epiteliales en morfología, tienen un número de cromosomas modal de 55 y no son tumorigénicas en ratones. Secretan factor V además de una amplia variedad de proteínas importantes, por ejemplo, albúmina, y las proteínas de fase aguda fibrinógeno, alfa 2-macroglobulina, alfa 1-
25 antitripsina, transferrina y plasminógeno.

Para el desarrollo del modelo celular KO para factor V se usaron las siguientes guías de edición:

30 5'-CAATCAGACATTGCCCTCTA-3' (G1) (SEQ ID NO: 66)
5'-GAGGAATTCTGATTATGGTC-3' (G2) (SEQ ID NO: 67)

En el caso de las guías usadas para la corrección de la mutación en el modelo KO, se usaron 2 parejas de guías para comparar la efectividad de edición de cada pareja de
35 guías siendo estas:

Pareja 1

5'-AAGAAGACTTAAGCATTCGT-3' (G3) (SEQ ID NO: 68)

5'-TGCCTGACCAGTGTCATTTG-3' (G4) (SEQ ID NO: 69)

5 Pareja 2

5'-TTCCTCAAATGACACTGGTC-3' (G5) (SEQ ID NO: 70)

5'-CAATGTCTGATTGAGGTCTG-3' (G6) (SEQ ID NO: 71)

10 La estrategia para seguir es similar a la de crear el modelo KO, pero en este caso restaurando el marco de lectura correcto del gen, y como consecuencia, la producción de factor V funcional.

En la Figura 3 se indica:

- BD: Dominio B. E13: Exón 13. ps: Región de división postraduccional.
- 15 • PAM: Motivo adyacente protoespaciador (del inglés *protospacer adjacent motif*). Es una secuencia de ADN de 3 pares de bases inmediatamente después de la secuencia de ADN reconocida por la nucleasa Cas9.
- *Del* 35 bp: Deleción (eliminación) de una secuencia de 35 pares de bases, región que corresponde a la zona mutada en la paciente con un codón stop (CS, G>A, cambio de una guanina a una adenina). La alteración de esta zona mediante las guías G1 y G2 complementarias a la mutación, reproducen la mutación en el modelo.
- 20 • *Del* 82 bp: Deleción (eliminación) de una secuencia de 82 pares de bases, que se complementa con las guías G3 y G4 para dar una secuencia no patológica del gen.
- 25 • *Del* 49 bp: Deleción (eliminación) de una secuencia de 49 pares de bases, que se complementa con las guías G5 y G6 para dar una secuencia no patológica del gen.

La metodología se basó en introducir las guías y la nucleasa Cas9 en el interior de la célula para que después alcancen el núcleo donde se internalizan. Para ello se utilizó el método de producción de una ribonucleoproteína (RNP), formada a partir de las guías y la nucleasa Cas9. La obtención de este complejo se llevó a cabo mediante un protocolo termociclador basado en incubar los 2 elementos de la guía (crRNA y tracrRNA) a 95°C, 5 min y adición posterior de la Cas 9, incubando 2 minutos a temperatura ambiente. Por último, se introdujo esta RNP mediante un 4D-

Nucleofector™ System (Lonza, Switzerland) y el kit de nucleofección “SF line cells” (Lonza, Switzerland) siguiendo el protocolo de la casa comercial para realizar la nucleofección en dicha línea celular. Este procedimiento tiene menos toxicidad celular, mejor internalización en núcleo, mayor eficacia de editado, menos tiempo de producción y es más económico que otros.

Ejemplo 7. Confirmación del modelo y de la corrección de la mutación.

Para confirmar el modelo celular mutado tras CRISPR/Cas9, se estudió la proliferación, morfología y cariotipo de las células HepG2. Después se llevó a cabo una citometría de flujo con marcadores específicos de membrana de las células HepG2. Y, por último, se secuenció el ADNc para factor V en las células HepG2.

En este caso no se observaron diferencias significativas entre las líneas HepG2 nativas y KO, producidas por edición génica, con respecto a datos de proliferación, morfología y expresión de marcadores de membrana, comprobados por inmunocitometría de flujo, lo que indica que las guías diseñadas y la edición no afectan, al menos, a genes relacionados con el ciclo celular y/o proliferación, estructura celular ni a proteínas de membrana, indicando que la edición génica puede ser una alternativa por sus escasos efectos inespecíficos sobre otros genes, en estudios *in vitro*. En cuanto a la secuenciación del ADN, la eficacia de editado para producir el modelo KO, con las guías y protocolos de edición génica utilizados, rondaba el 60% de edición precisa, dando lugar a un cultivo celular en el cual el 60% de las células eran KO para el gen de factor V. Posteriormente, y para obtener una línea celular pura se realizó un crecimiento en colonias para lograr un cultivo celular donde el 100% de las células tuviera la mutación derivada de la edición y por tanto fueran KO para el gen de factor V.

Para confirmar la corrección de la mutación tras CRISPR/Cas9, se llevó a cabo de nuevo una citometría de flujo y se secuenció el ADNc para factor V de las líneas celulares para comprobar la eficacia del editado y la corrección (tratamiento) de la mutación.

En este caso se obtuvo una precisión de editado diferente entre las distintas parejas de guías de edición génica, a saber, con la pareja 1 la eficacia de editado fue de aproximadamente el 40%, mientras que con la pareja 2, fue del 30%. Aun siendo

eficacias más bajas que en el caso anterior del modelo KO, un tratamiento basado en células con una eficacia de corrección del 30-40% supone el paso de un estado o fenotipo grave de la enfermedad a un estado leve o incluso asintomático. La bajada de la eficacia en la corrección de la línea celular KO también puede ser debido a que esa

5 zona del ADN ha sufrido previamente otra edición génica (para desarrollar el modelo KO) lo que puede hacer que el sistema CRISPR pierda eficacia, al editar sobre una zona previamente editada.

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para recuperar la expresión del gen *F5* que codifica el factor V de la coagulación mediante la utilización de la metodología CRISPR/Cas9 que incluye la
5 utilización de una pareja de guías caracterizadas por SEQ ID NO: 68-69 o una pareja de guías caracterizadas por SEQ ID NO: 70-71, donde el gen *F5* presenta una mutación en el nucleótido 3279.
2. Método *in vitro* según la reivindicación 1 en el que el gen *F5* mutado está
10 caracterizado por SEQ ID NO: 65.
3. Cultivo celular *in vitro* en el que se ha recuperado la expresión del gen *F5* que codifica el factor V de la coagulación mediante la utilización del método definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-2.
15
4. Kit que comprende la pareja de guías caracterizadas por SEQ ID NO: 68-69 y/o la pareja de guías caracterizadas por SEQ ID NO: 70-71.
5. Kit según la reivindicación 4 que comprende, además, una proteína Cas9.

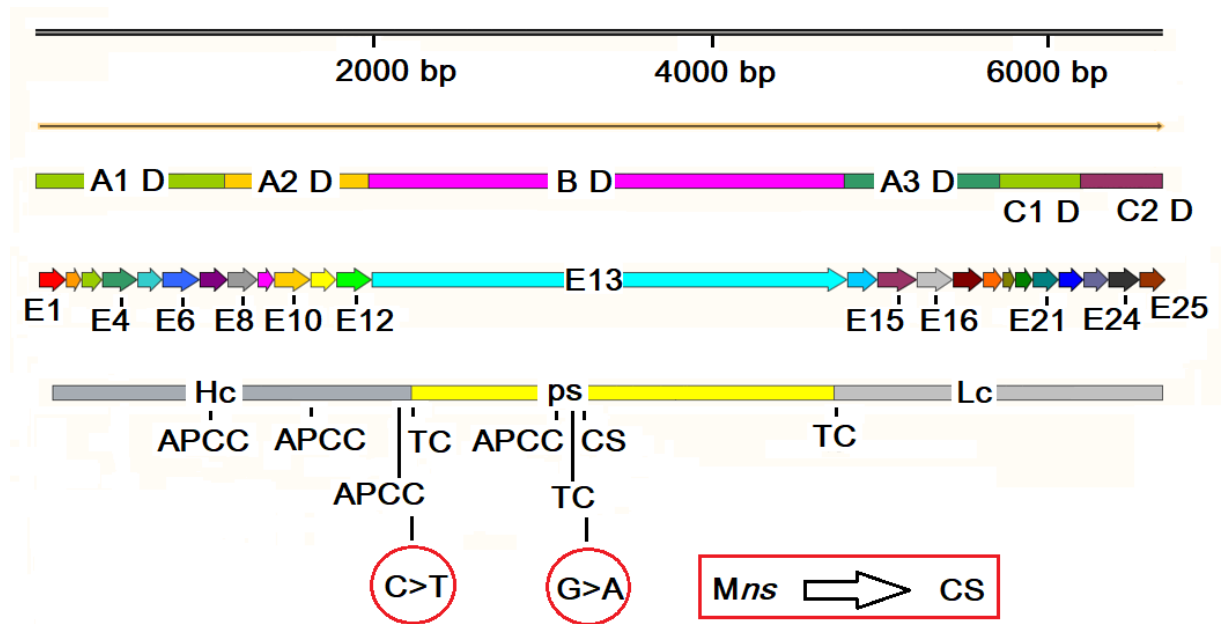


Fig.1

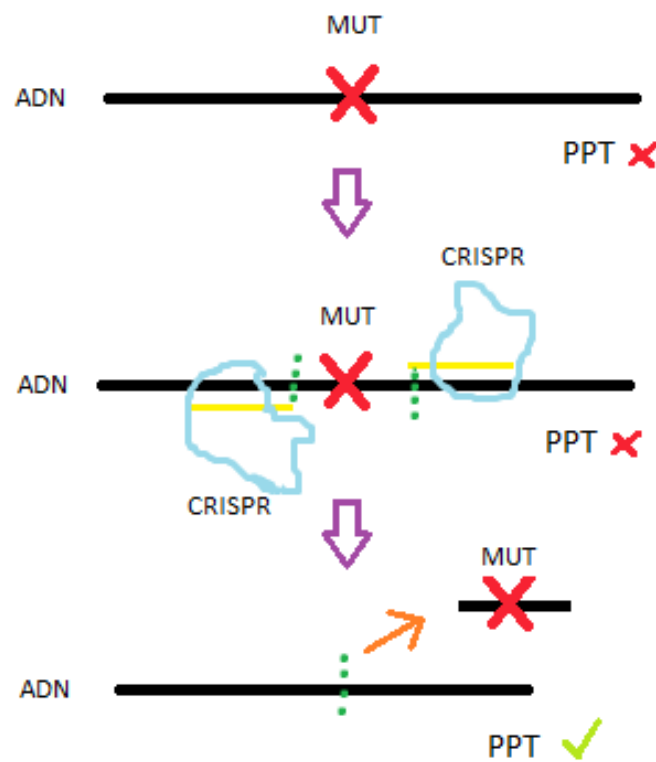


Fig. 2

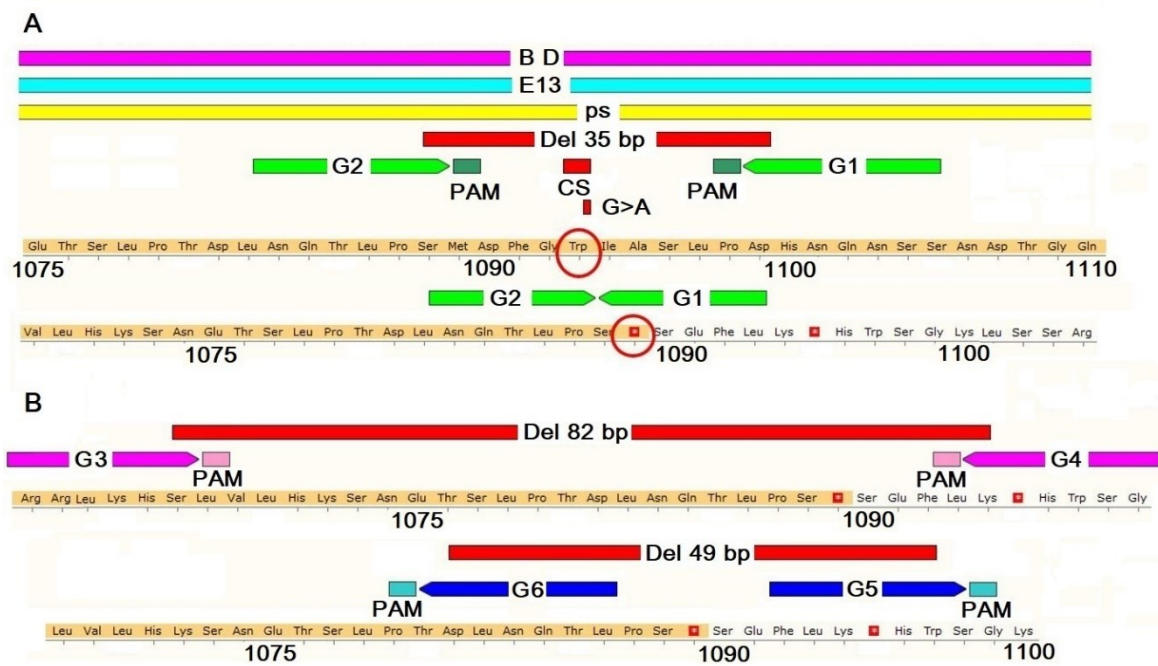


Fig. 3