



HAL
open science

**Vers une meilleure compréhension des mécanismes
moléculaires régissant l'action des thérapies
non-substitutives dans l'hémophilie A et comparaison
avec le facteur VIII**

Thibaud Sefiane

► **To cite this version:**

Thibaud Sefiane. Vers une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires régissant l'action des thérapies non-substitutives dans l'hémophilie A et comparaison avec le facteur VIII. Hématologie. Université Paris-Saclay, 2024. Français. NNT : 2024UPASQ004 . tel-04557521

HAL Id: tel-04557521

<https://theses.hal.science/tel-04557521>

Submitted on 24 Apr 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Vers une meilleure compréhension des
mécanismes moléculaires régissant l'action des
thérapies non-substitutives dans l'hémophilie A
et comparaison avec le facteur VIII

Towards a better understanding of the molecular mechanisms
governing the action of non-replacement therapies in hemophilia A
and comparison with factor VIII

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°569 Innovation Thérapeutique : du Fondamental à l'Appliqué (ITFA)

Spécialité de doctorat : Physiologie et Physiopathologie

Graduate School : Santé et médicaments. Référent: Faculté de pharmacie

Thèse préparée au sein de l'unité de recherche INSERM UMR-S1176 Hémostase, inflammation et Thrombose sous la direction du Dr Peter LENTING, Directeur de recherche INSERM U1176 et la co-direction du Dr Caterina CASARI, Chargée de recherche INSERM U1176

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 16 avril 2024, par

Thibaud SEFIANE

Composition du Jury

Delphine BORGEL PU-PH, INSERM U1176/ CHU Necker APHP	Présidente
Yohann REPESSE PU-PH, CHU Caen Normandie	Rapporteur & Examineur
Benoit HO-TIN-NOE Directeur de recherche, INSERM U1148	Rapporteur & Examineur
Yvette AKWA Chargée de recherche, INSERM U1195	Examinatrice
Laurence PANICOT-DUBOIS Chargée de recherche, INSERM U1263	Examinatrice

Remerciements

Je tiens à exprimer mes remerciements envers toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation et à la réussite de mon doctorat. Leur soutien et leur contribution ont été importants durant ces quatre ans. Malheureusement, la liste ne sera pas exhaustive mais toutes les personnes se reconnaissant dans ces quelques lignes sont concernées.

Je commence par remercier chaleureusement le Dr Cécile Denis, la directrice de l'Unité INSERM U1176 qui m'a donné l'opportunité de réaliser ma thèse dans un environnement scientifique stimulant dans lequel j'ai pu évoluer aussi bien scientifiquement qu'humainement.

Je remercie l'ensemble des membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'évaluer ce travail.

Un immense merci à mes deux co-directeurs de thèse, Dr Peter Lenting et Dr Caterina Casari, pour leur aide, pour tout ce qu'ils m'ont transmis, leur confiance et leur engagement sans faille dans la réussite de mes projets de recherche.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance envers mes collègues du bureau des doctorants, Miao Feng, Kathia Beddek, Sénadé Atsou, Claire Auditeau, Alexis Texier, Jean Solarz, Toscane Viellard et Mouna Mahmoud. L'ambiance que nous avons su créer tous ensemble dans ce bureau, les moments de franche rigolade et de travail ont été pour moi une motivation quotidienne.

Un remerciement spécial à Geneviève McCluskey ainsi qu'à Hortense Maynadié et Christelle Soukaseum pour leur soutien, leurs conseils et leur bienveillance permanente !

Je n'oublie pas de remercier l'ensemble des membres de l'Unité U1176 pour leur contribution collective à la réussite de ce travail de recherche. Tous, sans exception, ont été moteur dans la réussite de ma thèse ! Je garde en mémoire tous les moments conviviaux que nous avons organisés !

Un grand merci à ma famille de la DZK pour leur soutien indéfectible durant tout mon parcours. Les années passent mais rien ne change ! Mes plus sincères remerciements vont à mes amis et à ma famille pour leur soutien et leur encouragement. Je souhaite également exprimer ma sincère gratitude à ma copine Manon Tallet, pour son soutien inébranlable, son aide précieuse et sa foi en moi à chaque étape de ce parcours.

Enfin je vous remercie vous ! Oui vous qui aujourd'hui avez décidé de lire ce manuscrit. Vous êtes peut-être étudiant, chercheur, ingénieur, ami(e), famille, ou juste curieux. Vous trouverez ici le fruit d'un travail que j'ai pris plaisir à réaliser et à écrire et j'espère que vous en apprécierez la lecture.

Pour finir, tout ce que j'ai entrepris durant ma thèse ou durant tout mon parcours ne fut qu'un long périple pendant lequel les conditions, les obstacles, les gens et la vie m'ont fait changer de route plusieurs fois. J'ai gardé le cap, il n'y a pas de chemin tout tracé, seuls les points de départ et d'arrivée nous guident. Au moment où j'écris ces lignes, je m'apprête à terminer un voyage et j'ai hâte de voir où me conduira le prochain.

Table des matières

Liste des abréviations	1
Liste des Figures	2
Liste des tableaux	4
INTRODUCTION.....	5
I) Le facteur VIII de la coagulation et son rôle central dans l'hémostase	6
A) Hémostase	6
1) Hémostase primaire	6
2) Hémostase secondaire ou coagulation	7
3) Fibrinolyse	10
B) Le FVIII de la coagulation.....	11
1) Gène F8.....	11
2) Sites de biosynthèse du FVIII.....	12
3) Structure et domaines du FVIII.....	12
4) Interaction FVIII et FVW	13
5) Activation du FVIII.....	13
6) Inactivation du FVIIIa.....	14
II) Hémophilie A : Une Maladie Hémorragique liée à une anomalie de la coagulation.....	15
1) Définition :	15
2) Causes génétiques de l'hémophilie A :	16
3) Manifestations cliniques de la maladie :	17
a) Hémophilie mineure.....	17
b) Hémophilie modérée.....	18
c) Hémophilie sévère.....	18
d) Hémophilie A féminine.....	18
4) Traitements de l'hémophilie A : Quelles sont les stratégies thérapeutiques ?.....	19
Stratégies actuelles.....	19
a) Thérapies de remplacement du Facteur VIII et ses limites.....	19
b) Thérapies de non remplacement	21
b2) FVIII versus emicizumab : Différences et points communs.....	23
c) Agents by-passants.....	26
d) Traitements non spécifiques de l'hémophilie A.....	27
Nouvelles stratégies/ Développements en cours.....	27
a) FVIII à très longue demi-vie	27
b) MIM8	28

d)	Les anticorps anti-TFPI.....	29
e)	Inhibition transcriptionnelle de l'antithrombine.....	31
f)	Inhibition de la protéine C activée	32
g)	Thérapie génique.....	33
5)	<i>Modèle animal et étude de l'hémophilie A.....</i>	<i>34</i>
1)	Modèles animaux d'hémophilie A.....	34
2)	Modèles de saignements pour l'investigation des thérapies de l'hémophilie A	35
3)	Adaptation du modèle murin pour l'étude des anticorps bispécifiques mimant l'action du FVIII.36	
	III) La microscopie : un outil au service de la recherche en hémostase.....	37
	<i>Apports de la microscopie dans l'analyse du caillot de fibrine.....</i>	<i>37</i>
a)	Microscopie électronique à balayage.....	37
b)	Microscopie à fluorescence.....	39
c)	Application des techniques de microscopie à l'analyse de la fibrine dans l'hémophilie A	43
	OBJECTIFS DE LA THESE	46
	PUBLICATIONS ET RESULTATS EXPERIMENTAUX.....	48
	<i>Article I.....</i>	<i>49</i>
	<i>Article II.....</i>	<i>54</i>
	<i>Article III.....</i>	<i>78</i>
	DISCUSSION	100
	CONCLUSION	114
	BIBLIOGRAPHIE.....	116
	ANNEXES	129

Liste des abréviations

AV	Adeno Associated Virus	GP	Glycoprotéine
ABR	Annual bleeding rate	IgG	Immunoglobuline G
aPCC	Activated Prothrombin Complex Concentrates	ISTH	International Society of Thrombosis and Hemostasis
AT	Antithrombine	ITI	Induction de tolérance immune
ATX	Acide Tranexamique	LRP1	Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1
CE	Cellules Endothéliales	MEB	Microscopie électronique à balayage
CPD	Critical Point Drying	PAI	Plasminogen Activator Inhibitor
EAHAD	European Association for Haemophilia and Allied Disorders	PALM	Photo-Activated Localization Microscopy
EMA	European medicines agency	PAR	Protease Activated Receptor
FI	Prothrombine	PCa	Protéine C activé
Fla	Thrombine	PEG	Polyéthylène Glycol
FII	Fibrinogène	PL	Phospholipides
FIIa	Fibrine	PN1	Protéase Nexine 1
FV	Facteur V	RCL	Reactive Center Loop
FVa	Facteur V activé	RCP	Résumé des caractéristiques du produit
FVII	Facteur VII	SERPIN	Serine Protease Inhibitor
FVIIa	Facteur VII activé	STED	Stimulation émission déplétion
FVIII	FVIII	STORM	Stochastic Optical Reconstruction Microscopy
FVIIIa	Facteur VIII activé	TAFI	Thrombine Activable Fibrinolysis Inhibitor
FIX	Facteur IX	TAT	Tail Artery Transection
FIXa	Facteur IX activé	TCA	Temps de céphaline activée
FX	Facteur X	TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor
FXa	Facteur X activé	tpA	Activateur tissulaire du plasminogène
FXI	Facteur XI	TVT	Tail Vein Transection
FDA	Food and Drug Administration	UB	Unité Bethesda
FT	Facteur Tissulaire	WT	Wild type
FVW	Facteur von Willebrand		

Liste des Figures

Figure 1 : Représentation schématique de la cascade de la coagulation chez l'Homme	8
Figure 2 : Etapes successives de formation du caillot de fibrine.....	9
Figure 3 : Régulation de la cascade de la coagulation par ses principaux inhibiteurs physiologiques	10
Figure 4 : Représentation schématique de la dégradation du caillot de fibrine lors du processus finement régulé de la fibrinolyse	11
Figure 5 : Structure du gène F8 codant pour le FVIII de la coagulation humaine.....	11
Figure 6 : Représentation de la structure hétérodimérique du FVIII inactif et de ses modifications post- traductionnelles	12
Figure 7 : Activation protéolytique du FVIII de la coagulation.....	14
Figure 8 : Inactivation du FVIIIa par protéolyse ou par dissociation spontanée de l'hétérodimère	15
Figure 9 : Fréquence des altérations du gène F8 chez les patients atteints d'hémophilie A	17
Figure 10 : L'emicizumab mime le rôle du FVIII en créant un pont moléculaire entre FIXa et FX	22
Figure 11 : Interactions et affinités du FVIIIa ou de l'emicizumab avec les FIX(a) et FX(a).....	24
Figure 12 : Structure du FVIII à très longue demi-vie BIVV001	28
Figure 13 : Equilibre vs déséquilibre hémostatique dans l'hémophilie A.....	29
Figure 14 : Rétablissement de l'équilibre hémostatique par les inhibiteurs des anticoagulants naturels .	30
Figure 15 : Mécanismes d'action des anticorps anti-TFPI thérapeutiques dans le traitement de l'hémophilie A.....	30
Figure 16 : Mécanisme d'action du siRNA Fitusiran ciblant l'ARNm codant pour l'antithrombine.....	32
Figure 17 : Mode d'action des thérapies géniques par AAV pour le traitement de l'hémophilie A.....	33

Figure 18 : Principaux modèles de saignements murins utilisés pour la recherche en hémostase.....	36
Figure 19 : Principe du microscope électronique à balayage.....	38
Figure 20 : Définition de la limite de résolution en microscopie optique	39
Figure 21 : Principe de la microscopie confocale.....	41
Figure 22 : Principe de la microscopie à super résolution STED.....	42
Figure 23 : Principe de la microscopie à super résolution PALM/STORM	42
Figure 24 : Modèle murin de clairance de l'emicizumab.....	102
Figure 25 : Microscopie électronique à balayage des caillots générés chez la souris WT et FVIII-KO	106
Figure 26 : Microscopie électronique à balayage des caillots générés chez la souris FVIII-KO traitée par FVIII ou par FVIII-Fc.....	107
Figure 27 : Microscopie électronique à balayage des caillots générés chez la souris FVIII-KO traitée par emicizumab	108
Figure 28 : Microscopie électronique à balayage des caillots générés chez la souris FVIII-KO traitée par emicizumab ou par FVIII à t=2, 5, 7 ou 10 minutes post-blessure	108
Figure 29 : Impact de l'emicizumab sur les étapes successives de formation du caillot de fibrine.....	110
Figure 30 : Etude de la fibrinolyse in vitro sur du plasma déficient en FVIII supplémenté en FVIII ou en emicizumab	110
Figure 31: Génération de thrombine dans un plasma déficient en FVIII supplémenté en un analogue de séquence du marstacimab.....	112

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les facteurs de la coagulation chez l'Homme	7
Tableau 2 : Symptômes de l'hémophilie A associés au taux résiduel de FVIII	16
Tableau 3 : Comparaison des propriétés du FVIIIa vs emicizumab	23
Tableau 4 : Tableau récapitulatif des anticorps anti TFPI en essais cliniques	31
Tableau 5 : Modèles animaux d'études de l'hémophilie A	35
Tableau 6 : Comparaison des différentes études concernant l'effet de l'emicizumab sur le réseau de fibrine	45
Tableau 7 : Equivalence-FVIII de l'emicizumab dans différents modèles murins de saignement	104
Tableau 8 : Equivalence de l'anticorps emicizumab en terme d'activité FVIII mesurée in vitro	112

INTRODUCTION

I) Le facteur VIII de la coagulation et son rôle central dans l'hémostase

A) Hémostase

L'hémostase, dont l'étymologie provient du grec « Hemo » et « Stasi », qui signifient respectivement « sang » et « arrêt », définit l'ensemble des processus et mécanismes qui vont contribuer à stopper un saignement issu d'une brèche vasculaire en la colmatant. L'hémostase est un exemple frappant de la manière dont la sélection naturelle a préservé des mécanismes biologiques cruciaux, car celle-ci est très conservée chez les vertébrés au cours de l'évolution.¹ Classiquement, on décrit l'hémostase en trois étapes de façon séquentielle afin d'en simplifier la description, mais il s'agit plutôt de mécanismes qui ont lieu simultanément. Nous décrivons ici les trois étapes que sont 1) l'hémostase primaire, 2) l'hémostase secondaire ou coagulation et enfin 3) la fibrinolyse.

1) Hémostase primaire

On définit l'hémostase primaire comme le processus de formation du clou plaquettaire occlusif qui va adhérer à l'endothélium en réponse à une blessure vasculaire. La réponse initiale à la lésion vasculaire est la vasoconstriction en réponse à la libération d'une protéine par l'endothélium endommagé : l'endothéline.² La rupture d'intégrité de l'endothélium permet également l'exposition de collagène sous endothélial auquel va se fixer une protéine qui va servir de pont moléculaire entre l'endothélium et les plaquettes : Le facteur de von Willebrand (FVW). En effet le FVW est capable d'adhérer au collagène de la matrice sous endothéliale et suite à cette fixation et en présence de contraintes de cisaillement importantes dues à la blessure vasculaire il va subir un changement de conformation.³ A la suite de ce changement de conformation, il va lier le complexe de glycoprotéines (GP) membranaire à la surface des plaquettes, GPIb-IX-V via le récepteur GPIb α .^{4,5} L'action du FVW va résulter en une adhésion des plaquettes au sous endothélium, mais cette liaison est réversible et insuffisante pour une adhésion stable. Celle-ci va être renforcée par une seconde interaction entre les plaquettes et le collagène via une seconde GP, la GPVI qui agit comme un récepteur plaquettaire pour le collagène⁶ mais également via l'intégrine $\alpha 1\beta 2$ qui renforce à son tour l'interaction au collagène.⁷ L'adhésion des plaquettes induit un début d'activation se traduisant par un changement de morphologie et la libération du contenu de ses granules avec, entre autres, le FVW, le Facteur V (FV) et l'adénosine diphosphate (ADP).⁸ L'ADP va se fixer à son récepteur plaquettaire et induire un changement conformationnel de la GPIIb/IIIa (également appelée intégrine $\alpha IIb\beta 3$) qui est l'intégrine centrale capable de promouvoir l'agrégation des plaquettes au site de blessure vasculaire par l'intermédiaire de sa liaison au fibrinogène et au FVW.⁹

Outre le changement de morphologie des plaquettes et l'expression de divers récepteurs à la surface des plaquettes, l'activation plaquettaire est responsable de différents mécanismes :

- Un changement de la distribution des lipides constituant la membrane plasmique des plaquettes. Les phospholipides anioniques constitués majoritairement de phosphatidylsérine vont basculer du feuillet interne vers le feuillet externe ¹⁰ de sorte à exposer une surface chargée négativement à l'extérieur de la membrane plasmique des

plaquettes. Cet évènement est central dans le déroulé de la coagulation car il va contribuer au recrutement et à l'activation des facteurs de la coagulation à la surface des plaquettes.¹¹

- La libération de polyphosphates contenus dans les granules denses. Il s'agit de polymères linéaires de phosphates inorganiques ayant un effet pro-coagulant via l'interaction avec différentes protéines pro-coagulantes afin de favoriser leur activation et l'inhibition de protéines anticoagulantes.¹²

2) Hémostase secondaire ou coagulation

L'hémostase secondaire met en jeu un ensemble de réactions enzymatiques régulées en séries médiées par des protéines appelées facteurs de la coagulation: La cascade de la coagulation. Classiquement, elle était décrite en deux voies distinctes, intrinsèque et extrinsèque, qui convergent vers une voie commune aboutissant à la formation de thrombine puis de fibrine venant renforcer le clou plaquettaire. Cette conception a été remise en cause par la mise en évidence d'interaction entre les acteurs de ces deux voies.¹³ La vision actuelle de la coagulation consiste en un enchaînement de trois étapes interdépendantes : 1) phase d'initiation, 2) phase d'amplification et 3) phase de propagation. Nous décrirons ici la coagulation en détaillant ces 3 étapes. Malgré une description séquentielle afin d'en simplifier la compréhension, il faut garder à l'esprit que l'ensemble des mécanismes que nous allons décrire se déroule de façon simultanée.

Facteurs de la coagulation	Noms	Concentration plasmatique en μM
<i>FI</i>	Fibrinogène	9
<i>FII</i>	Prothrombine	2
<i>FV</i>	Proaccélerine	0,05
<i>FVII</i>	Proconvertine	0,01
<i>FVIII</i>	Facteur anti hémophilique A	0,0004
<i>FIX</i>	Facteur anti hémophilique B	0,09
<i>FX</i>	Facteur Stuart	0,13
<i>FXI</i>	Facteur Rosenthal	0,03
<i>FXII</i>	Facteur Hageman	0,4
<i>FXIII</i>	Facteur stabilisateur de la fibrine	0,03

Tableau 1 : Les facteurs de la coagulation chez l'Homme

(F: Facteur)

a) Phase d'initiation

La phase d'initiation commence au moment de la blessure vasculaire avec l'exposition des composants cellulaires et protéiques de la matrice sous endothéliale (collagène, cellules musculaires lisses, fibroblastes, etc.) au flux sanguin.¹⁴ Ces cellules expriment à leur surface une protéine importante pour l'initiation de la coagulation (on parle de voie extrinsèque) : Le facteur tissulaire (FT). Le FT se fixe au facteur VII (FVII) de la coagulation et agit en tant que cofacteur de celui-ci. Il semblerait que le FT stimule l'auto activation du FVII en facteur VII activé (FVIIa).¹⁵ Une

autre hypothèse évoque également la présence en très faible quantité (100 pM) de FVIIa circulant (inactif en absence du FT) et sur lequel le FT va aller se fixer.¹⁶ Dans les deux cas, le complexe FT/FVIIa va permettre l'activation de faibles quantités de facteur IX (FIX) en facteur IX activé (FIXa) et de facteur X (FX) en facteur X activé (FXa), conduisant à la formation du complexe prothrombinase à la surface des cellules exprimant le FT.¹⁷ Ce complexe est composé du FXa et du facteur V activé (FVa) (lui-même activé par le FXa¹⁸). Son rôle est de convertir la prothrombine (FII) en thrombine (FIIa) par l'action du FXa et de son cofacteur le FVa.¹⁹ Le FXa se dissocie ensuite des cellules exprimant le FT pour aller se fixer sur des surfaces riches en phospholipides (PL) afin de participer aux phases de propagation et d'amplification de la coagulation.

b) Phase d'amplification

Comme décrit précédemment, au cours de l'hémostase primaire, les plaquettes s'accumulant au niveau de la blessure vasculaire vont être activées par les faibles quantités de thrombine générée durant la phase d'initiation. Cette activation est médiée par l'intermédiaire du récepteur plaquettaire à la thrombine « protease activated receptor 1 » (PAR 1) (impliqué dans l'activation plaquettaire en présence de faibles concentrations de thrombine, contrairement à PAR4 qui est mis en jeu en présence de fortes concentrations de thrombine).²⁰ La thrombine va également amplifier la cascade de réactions enzymatiques en activant le FVa qui permet d'augmenter l'activité du complexe prothrombinase et donc la génération de thrombine.²¹ La seconde amplification majeure est l'activation par la thrombine d'un cofacteur clé, le facteur VIII activé (FVIIIa) (description détaillée: cf. partie B).²² En effet, le FVIIIa est un cofacteur du FIXa dans la conversion du FX en FXa sur la surface des plaquettes activées. Cette activation du facteur VIII (FVIII) s'accompagne d'une activation du facteur XI (FXI) (impliqué dans l'activation du FIX) par la thrombine²³ et permet l'activation de la voie intrinsèque de la coagulation. La thrombine joue un rôle majeur dans l'amplification de la cascade de réactions enzymatiques de la coagulation pour permettre la phase de propagation.

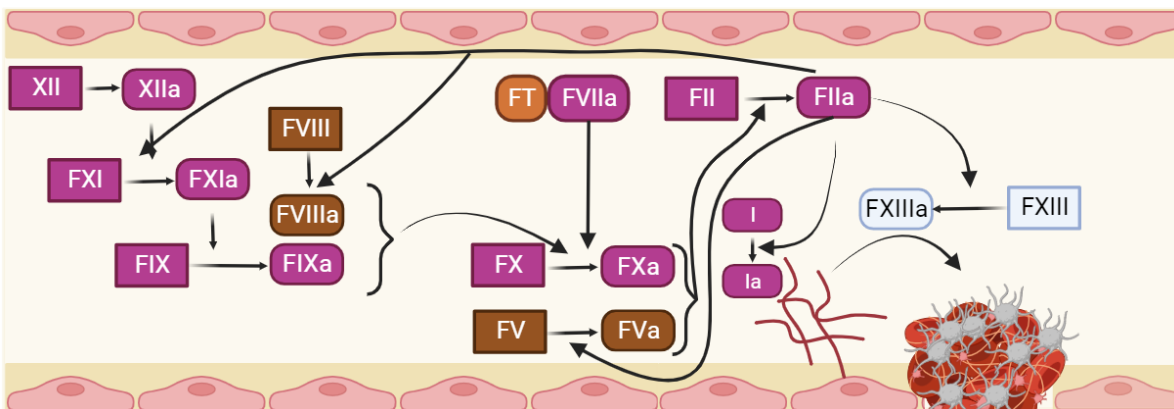


Figure 1 : Représentation schématique de la cascade de la coagulation chez l'Homme

c) Phase de propagation

A la différence de la phase d'initiation qui a lieu à la surface des cellules exprimant le FT, la phase de propagation a lieu sur les surfaces riches en PL des plaquettes, ce qui permet la survenue des

réactions d'activation du FIX par le FXIa. Le FIXa et son cofacteur le FVIIIa forment le complexe tenase et permettent la conversion du FX en FXa et donc la génération d'une grande quantité de thrombine par le complexe FVa/FXa. La thrombine ainsi générée va former massivement de la fibrine (FIIa) en clivant le fibrinogène (FI). En effet, la fibrine est un des constituants majeurs du caillot et va permettre la consolidation du clou plaquettaire. Plusieurs étapes sont nécessaires à l'organisation de la fibrine nouvellement formée en un réseau de fibrine organisé et stabilisé. La thrombine va permettre le clivage du fibrinogène (FI) soluble en monomères de fibrine (FIIa) qui vont spontanément s'assembler en double brins de fibrine appelés protofibrilles. Cette première étape est directement dépendante de la thrombine.²⁴ L'organisation de la fibrine en réseau structuré et stabilisé est dépendante de l'activation par la thrombine du facteur XIII (FXIII) qui va permettre d'interconnecter de façon covalente les protofibrilles.^{24,25} L'ensemble de ces étapes permet la formation d'un caillot de fibrine dense, élastique et occlusif. La structure microscopique de ce caillot de fibrine peut être analysée et permet d'obtenir des informations sur le déroulé et les mécanismes de la cascade de la coagulation (cf. partie III)

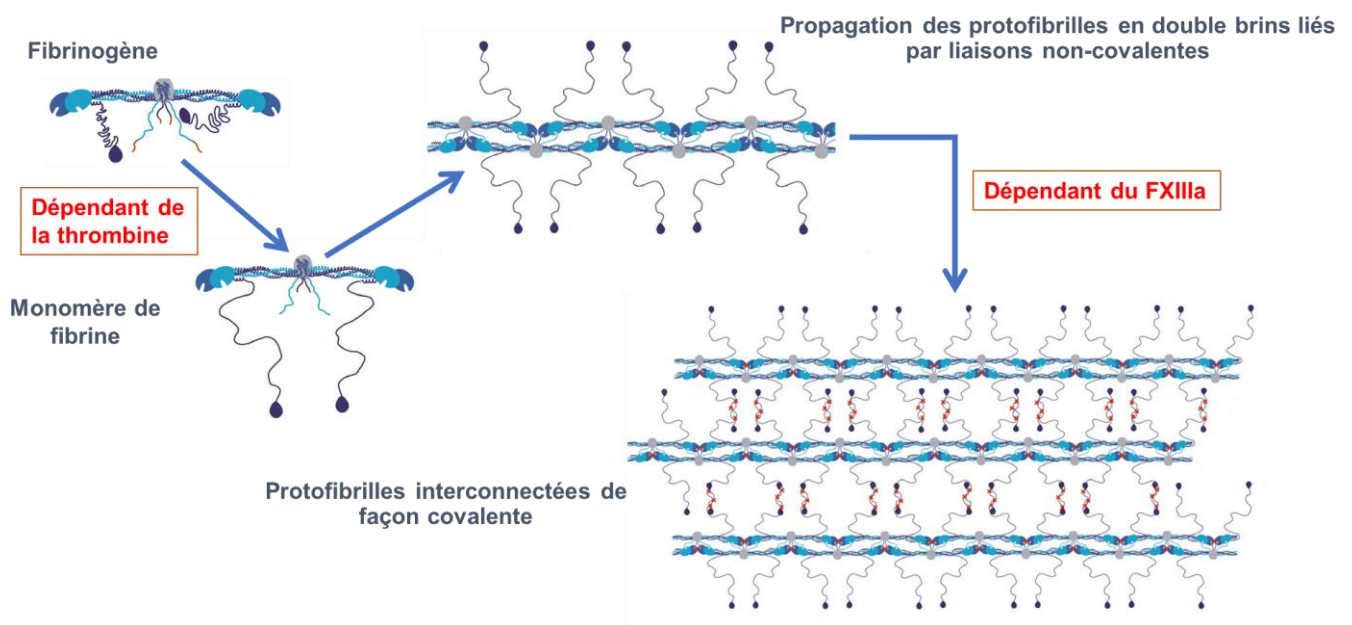


Figure 2 : Etapes successives de formation du caillot de fibrine

(Adapté de *Why fibrin biomechanical properties matter for hemostasis and thrombosis*, Feller et al)²⁴

d) Mécanismes de régulation de la cascade de la coagulation

La cascade de la coagulation est un système pouvant amplifier son activité mais elle nécessite une fine régulation afin de maîtriser celle-ci. Plusieurs mécanismes physiologiques anticoagulants permettent de freiner le système.

- L'antithrombine (AT) est un inhibiteur majeur de la coagulation et plus particulièrement des sérine-protéases de la coagulation (thrombine, FXa et de façon moins importante le FIXa et le FXIa). Elle appartient au groupe inhibiteur des sérines protéases ou SERPINs (serine protease inhibitors)^{26,27} Son action est augmentée d'un facteur mille lorsqu'elle est en présence de son cofacteur l'héparine.²⁸

- L'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire, également connu sous le nom de Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI), est un anticoagulant naturel. Il a été principalement étudié pour son rôle d'inhibition du complexe FT/FVIIa pendant l'initiation de la coagulation. Cependant, il agit également en tant qu'inhibiteur du FXa.²⁹
- La protéine C activée (PCa) et son cofacteur, la protéine S, exercent une activité anticoagulante en clivant et par conséquent en inactivant les FVIIIa et FVa et en bloquant l'activité des complexes tenase et prothrombinase. La PCa est activée par la thrombine/thrombomoduline afin de remplir son rôle anticoagulant.³⁰ D'autre part, la protéine S présente également une activité cofacteur du TFPI.³¹

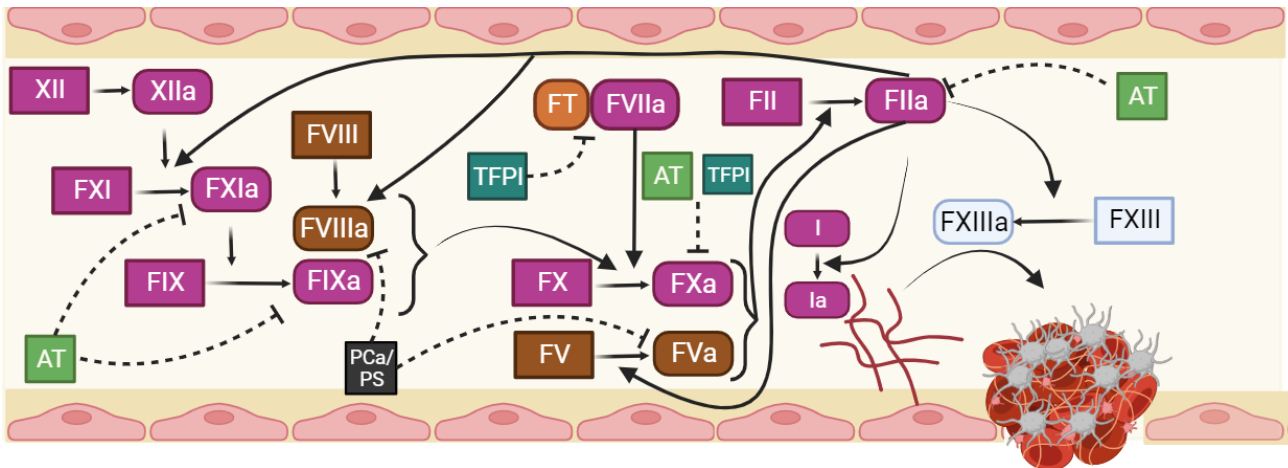


Figure 3 : Régulation de la cascade de la coagulation par ses principaux inhibiteurs physiologiques

3) Fibrinolyse

La fibrinolyse qui constitue l'étape finale de l'hémostase est un processus hautement régulé qui débute durant la formation du caillot de fibrine. Elle permet l'élimination du caillot de fibrine, une fois la blessure vasculaire réparée. La protéine centrale impliquée dans la fibrinolyse est la plasmine qui permet de dégrader la fibrine en un produit de dégradation de la fibrine sous forme de monomère et de dimère (D-Dimer).³² Le plasminogène est le zymogène de la plasmine et est activé par l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) sécrété par les cellules endothéliales et par l'activateur du plasminogène urokinase (uPA) produit par les monocytes/macrophages et l'épithélium urinaire.³³ Leurs actions sont contrôlées par PAI-1, PAI-2 et PAI-3 (plasminogène activator inhibitor) et la protéase nexine 1 (PN1) qui les inhibent.^{34,35} L'action de la plasmine est également contrôlée par une enzyme activable par la thrombine, le TAFI (thrombine activable fibrinolysis inhibitor), qui est une carboxypeptidase. En effet le TAFI agit en clivant les arginines et lysines en position C-terminale de la fibrine qui correspondent aux sites de liaisons de la plasmine sur la fibrine^{36,37}, ce qui empêche l'action de celle-ci. La plasmine est également inhibée par l' α 2-antiplasmine³⁸ et l' α 2-macroglobuline.³⁹ En résumé, la fibrinolyse est un processus très finement régulé visant à éliminer le caillot de fibrine en contrôlant la formation de celui-ci, tout en garantissant l'intégrité vasculaire.

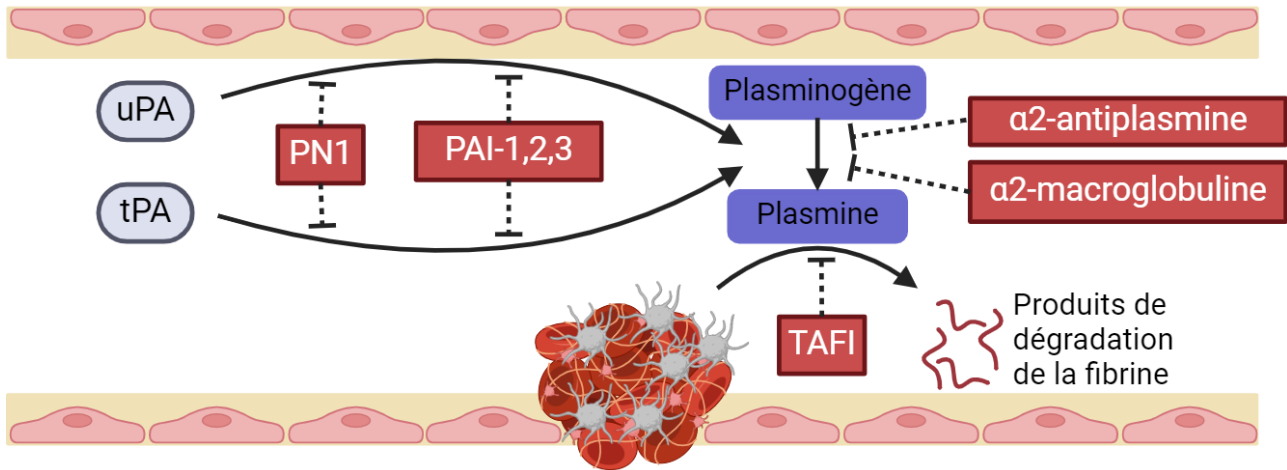


Figure 4 : Représentation schématique de la dégradation du caillot de fibrine lors du processus finement régulé de la fibrinolyse

B) Le FVIII de la coagulation

Le FVIII codé par le gène *F8* est une glycoprotéine agissant dans la cascade de la coagulation en tant que cofacteur du FIXa dans l'activation du FX. Son rôle dans l'amplification de la réponse hémostatique via le complexe tenase fait de lui un acteur central de la coagulation.

1) Gène *F8*

Le gène *F8* a été cloné pour la première fois en 1984⁴⁰ et code pour le facteur VIII de coagulation. Il est localisé au niveau de l'extrémité du bras long du chromosome X en position Xq28. *F8* est l'un des plus grands gènes connus avec une taille de 186 kb : il est composé de 26 exons et 25 introns.⁴¹ Un ARN messenger (ARNm) d'environ 9 kb est transcrit à partir de ce gène. L'ARNm comprend une région 5' non traduite (UTR) de 150 nucléotides et une région 3' UTR de 1806 nucléotides. Ces régions encadrent une séquence codante de 7056 nucléotides.

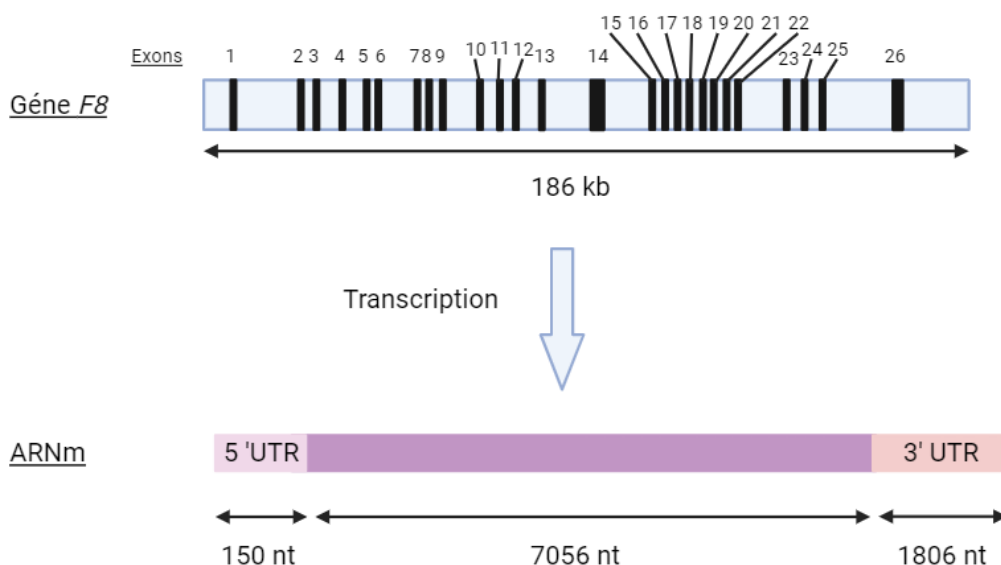


Figure 5 : Structure du gène *F8* codant pour le FVIII de la coagulation humaine

2) Sites de biosynthèse du FVIII

La production de FVIII est décrite dans plusieurs organes. A l'origine, on décrivait une synthèse hépatique mais différentes études de détection d'ARNm ont permis d'affiner cette localisation et de montrer une synthèse au niveau des cellules endothéliales (CE) sinusoidales du foie.^{42,43} Des sites de production du FVIII extra hépatiques ont également été mis en évidence comme les CE pulmonaires.⁴⁴ Il a été établi que cette synthèse par les cellules endothéliales est faite par les CE lymphatiques et les CE fenestrées.⁴⁵ Bien que les synthèses hépatiques et pulmonaires soient probablement les plus importantes, une étude a également permis de montrer une synthèse par les cellules hématopoïétiques (monocytes, macrophages, mégacaryocyte, etc.).⁴⁶

3) Structure et domaines du FVIII

Le FVIII est une protéine multi-domaines constituée de 2351 acides aminés incluant un peptide signal de 19 acides aminés. Après une phase initiale de maturation, celui-ci est clivé, réduisant ainsi la taille de la protéine à 2332 acides aminés. Dans le réticulum endoplasmique, le FVIII subit des modifications avec notamment des N- et O-glycosylations, puis il est transféré vers l'appareil de Golgi. Au sein de l'appareil de Golgi, d'importantes modifications post-traductionnelles surviennent, incluant des N- et O-glycosylations, ainsi que des sulfatations.⁴⁷ Enfin, le FVIII subit une étape de protéolyse aux positions Arg1313 et/ou Arg1648 (domaine B) qui aboutit à la sécrétion d'une protéine ayant un poids moléculaire apparent de 280 kDa.^{41,48}

La forme mature du FVIII en circulation est un hétérodimère composé de deux chaînes distinctes : une chaîne lourde renfermant les domaines A1, a1, A2, a2 et B, et une chaîne légère comprenant les domaines a3, A3, C1 et C2, reliées entre elles par un ion divalent.⁴⁹ La taille de la chaîne lourde est variable en raison de clivages ayant lieu à la jonction des domaines B-A3 ou à l'intérieur du domaine B. Il semble que le domaine B ne soit pas indispensable à l'activité pro coagulante⁵⁰ du FVIII mais qu'il pourrait avoir un rôle dans le transport intracellulaire du FVIII.⁵¹

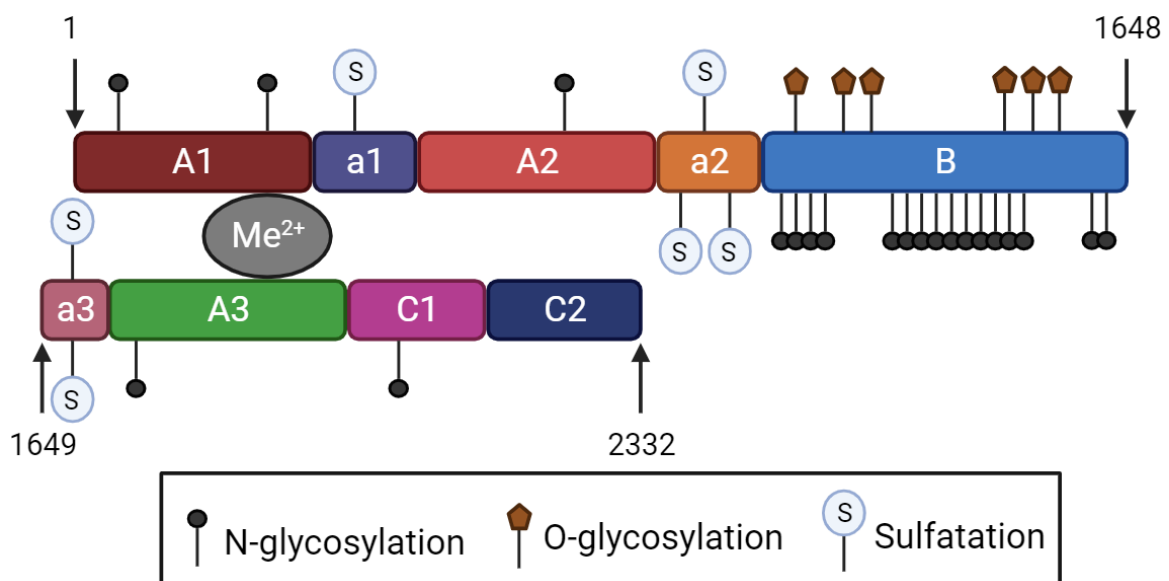


Figure 6 : Représentation de la structure hétérodimérique du FVIII inactif et de ses modifications post-traductionnelles

4) Interaction FVIII et FVW

Tout de suite après sa libération dans la circulation, le FVIII est pris en charge et se fixe au FVW de façon non covalente, permettant à ce dernier de jouer un rôle de protéine chaperonne.⁵² L'association FVIII/FVW se fait au niveau de la chaîne légère du FVIII via la tyrosine sulfatée en position 1680 du domaine a3⁵³ ainsi que sur le domaine C2, en position 2303–2332. Il semblerait que le domaine C1^{54–56} participe à cette interaction de manière directe ou indirecte en modifiant la conformation du domaine C2.⁵⁷ Cette interaction non covalente présente une très forte affinité (inférieure au nanomolaire).⁵⁸

Cette association avec le FVW est essentielle pour le maintien du FVIII dans la circulation. En effet, le FVW va permettre de prolonger la demi-vie du FVIII plasmatique. Cela a pu être observé chez des patients atteints de la maladie de Willebrand de type 3 (déficit quantitatif total du FVW) et de type 2N (anomalie qualitative du FVW avec liaison du FVIII au FVW abolie), chez qui différentes doses de FVIII ont été injectées et dont la demi-vie de celui-ci a été mesurée.^{59,60} Plusieurs mécanismes par lesquels le FVW protège le FVIII sont décrits dans la littérature :

- Le FVW protège le FVIII en stabilisant sa structure hétérodimérique dans la circulation et évite sa dégradation par les contraintes mécaniques liées au flux sanguin.⁶¹
- Il permet également de prévenir et empêcher la dégradation précoce du FVIII par des protéases telle que la protéine C activée mais également son activation précoce par le FXa, ce qui constitue un niveau de régulation de son activité.^{62–64}
- Le FVW permet également de prévenir l'interaction précoce du FVIII avec le FIXa ce qui retarde son intégration au complexe d'activation du FX⁶⁵ mais également avec la surface riche en phospholipides plaquettaires.^{66,67}
- Le complexe FVIII/FVW permet également de prévenir l'endocytose du FVIII en bloquant l'interaction avec les récepteurs cellulaires lipoprotéiques tels que le «Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1» (LRP1) et autres récepteurs de clairance.^{68,69}

Enfin le FVW a un rôle très important dans le transport et l'adressage du FVIII au site de blessure vasculaire afin qu'il puisse remplir son rôle de cofacteur du FIXa.⁷⁰

5) Activation du FVIII

Afin d'exercer son rôle de cofacteur dans la cascade de la coagulation, le FVIII inactif doit être converti dans sa forme active. Cette activation est dépendante de l'action de la thrombine. En effet, celle-ci va permettre l'activation du FVIII en réalisant des clivages sur la chaîne lourde au niveau des arginines 372 et 740, et sur la chaîne légère au niveau de l'arginine 1689.⁷¹ Cette protéolyse du FVIII génère 3 fragments différents : A1-a1 lié via des interactions électrostatiques au fragment A2-a2 sur la chaîne lourde, et le fragment A3-C1-C2 sur la chaîne légère du FVIIIa.⁷² Le clivage de la chaîne légère permet également la dissociation du domaine a3 qui abolit la liaison du FVIII au FVW et génère une structure hétérotrimérique instable.⁷³ En effet, une fois libéré du FVW, la conformation du FVIII change et dévoile des sites d'interaction importants, notamment pour les surfaces riches en phospholipides au niveau du domaine C2.⁷⁴ Le domaine C1 semble également participer à la liaison du FVIIIa sur ces surfaces.⁷⁵ Les sites d'interaction du FVIIIa pour les FIXa et FX sont également exposés. Ainsi, le FVIII devient disponible pour remplir son rôle de cofacteur au sein du complexe

tenase. Le FXa est également impliqué dans la protéolyse du FVIII avec des clivages au niveau des arginines 372 et 1721, et le FIXa en position 1719.⁷⁶

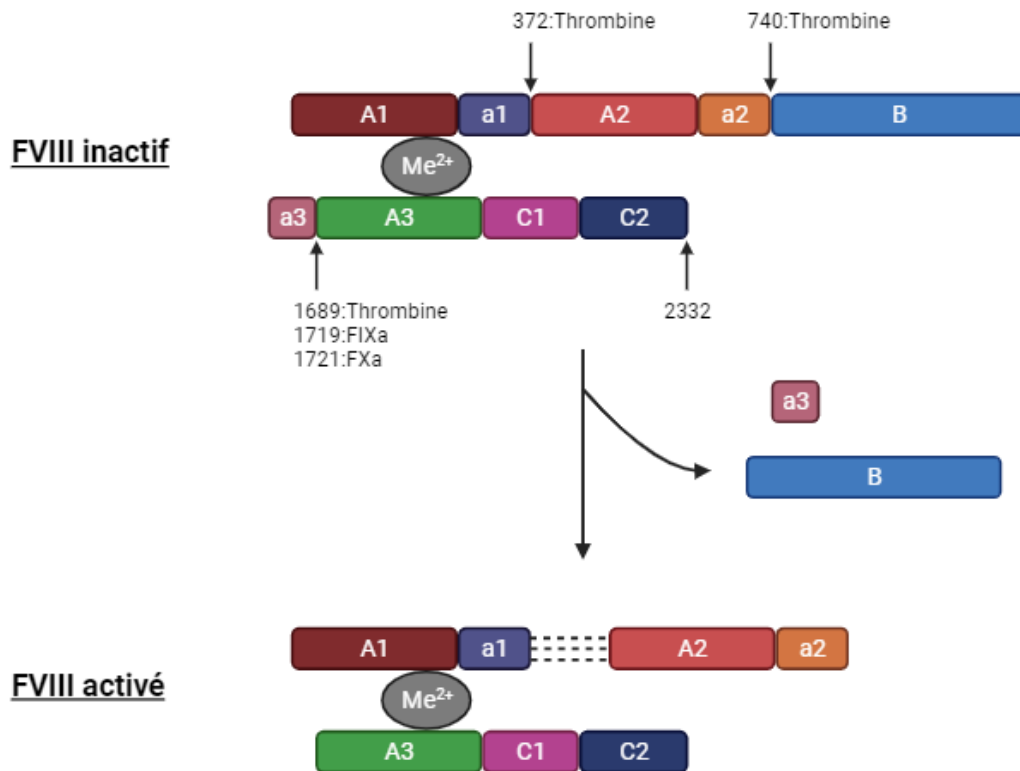


Figure 7 : Activation protéolytique du FVIII de la coagulation

(Adapté de "The disappearing act of factor VIII", Lenting et al)⁷⁷

6) Inactivation du FVIIIa

L'inactivation du FVIIIa est un élément majeur dans la régulation de l'activité du complexe tenase. Deux mécanismes différents sont décrits : La dissociation spontanée du FVIIIa ou sa dégradation protéolytique qui met en jeu plusieurs protéases : La FVIIIa est un hétérodimère très instable dans lequel le domaine A2 est lié aux domaines A1/A3-C1-C2 par une liaison ionique qui constitue une interaction faible. La dissociation spontanée du FVIIIa a lieu par la rupture de cette liaison.⁷⁸⁻⁸⁰ Il est intéressant de noter que la structure du FVIIIa dans le complexe tenase est stabilisée par son interaction avec le FIXa via A2 et A3.⁸¹⁻⁸³ D'autre part, le FIXa est également impliqué dans le clivage du FVIIIa sur les arginines 1719 et 336.⁸⁴ Le clivage sur l'arginine 336 induit la libération du fragment a1 qui déstabilise à son tour le FVIIIa et accélère sa dissociation en changeant l'affinité du domaine A2 pour le reste de la protéine.⁸⁵ Le clivage sur l'arginine 336 peut également être réalisé par d'autres protéases comme le FXa⁸⁶, la plasmine⁸⁷ et la PCa.⁸⁸ Plus récemment, il a été montré que le FXa et la plasmine clivent le FVIIIa au niveau de la lysine 36 dans le domaine A1 affectant potentiellement la stabilisation du FVIIIa par le FIXa.⁸⁹ La PCa clive également sur l'arginine 562 en présence de protéine S et FV ce qui induit une diminution de la fixation du FIXa sur le FVIIIa.⁹⁰

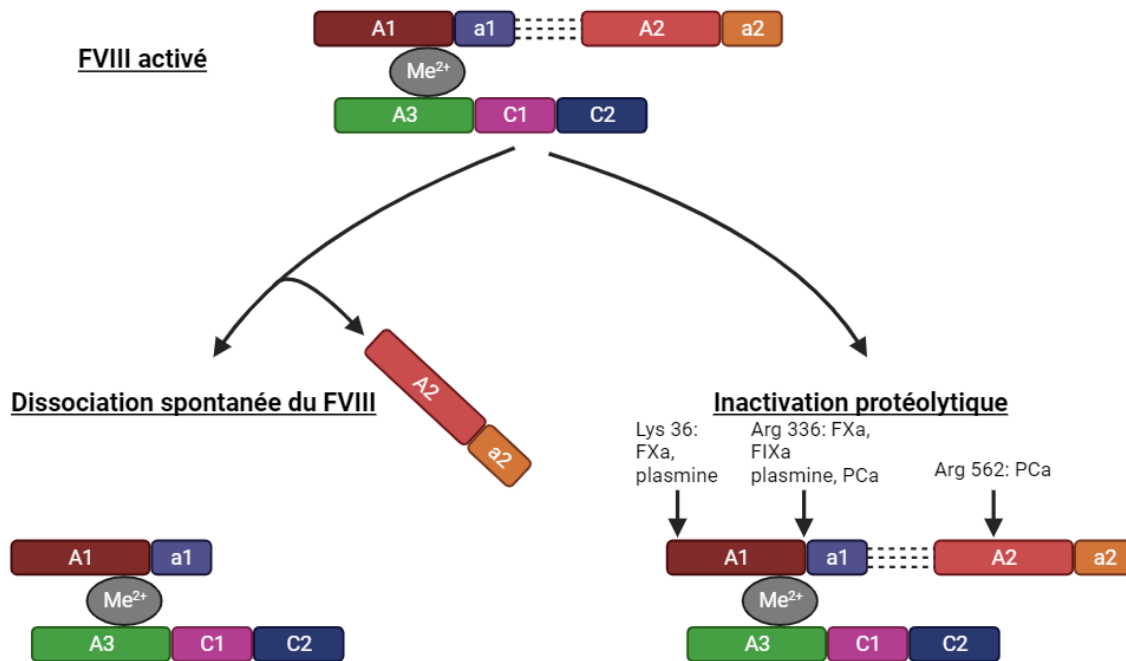


Figure 8 : Inactivation du FVIIIa par protéolyse ou par dissociation spontanée de l'hétérodimère

(Adapté de "The disappearing act of factor VIII", Lenting et al)⁷⁷

II) Hémophilie A : Une Maladie Hémorragique liée à une anomalie de la coagulation

1) Définition :

L'hémophilie A est une maladie hémorragique héréditaire causée par un déficit en un facteur de la coagulation : le FVIII. Une anomalie dans le gène codant le FVIII peut entraîner une altération fonctionnelle et/ou quantitative de cette protéine. La prévalence de la maladie est d'environ 1 à 2 naissances de garçon sur 10 000, et elle est transmise de manière récessive liée au chromosome X.⁹¹

La gravité de la maladie varie d'un patient à l'autre, avec une corrélation directe entre la sévérité et les taux résiduels de FVIII circulant dans le plasma. On distingue ainsi trois groupes de patients au sein de la population atteinte d'hémophilie A :

Les patients atteints d'hémophilie A mineure présentent un taux de 5 à 40 % de FVIII résiduel, correspondant à 5-40 UI/dL. Ils représentent environ 50 % de la population hémophile A. Ils ne présentent pas de saignements spontanés, mais plutôt en lien avec des traumatismes graves ou des procédures invasives telles que la chirurgie.⁹²

Les patients atteints d'hémophilie A modérée présentent un taux de 1 à 5 % de FVIII résiduel, correspondant à 1-5 UI/dL. Ils représentent environ 10 % de la population hémophile A. Des saignements anormaux peuvent se produire en réponse à des blessures mineures, des chirurgies ou des extractions dentaires. Il est également possible de constater des saignements spontanés plus rares, qui peuvent affecter les articulations (hémarthroses) et les muscles (hématomes).⁹²

Les patients atteints d'hémophilie A sévère présentent moins de 1 % de FVIII résiduel, correspondant à moins de 1 UI/dL. Ils représentent environ 40 % de la population hémophile A.⁹³

Ces patients présentent des saignements spontanés sans traumatisme visible, que ce soit dans les muscles ou les articulations. En effet, des saignements spontanés dans les articulations surviennent : les hémarthroses. Elles conduisent à la destruction de l'articulation suite à une arthropathie sévère sans prise en charge adaptée.⁹⁴

Type Hémophilie A	Activité FVIII résiduel	Symptômes associés
<i>Mineure</i>	5-40 %	<ul style="list-style-type: none"> • Absence de saignements spontanés • Saignements anormalement longs en lien avec des traumatismes importants ou des procédures invasives : chirurgies
<i>Modérée</i>	1-5 %	<ul style="list-style-type: none"> • Saignements suite à des blessures ou traumatismes mineurs, chirurgies • Possibilité de saignement spontané dans de rares cas.
<i>Sévère</i>	>1 %	<ul style="list-style-type: none"> • Saignements importants sans traumatismes visibles, intra-musculaires et intra-articulaires (Hémarthrose conduisant à des arthropathies)

Tableau 2 : Symptômes de l'hémophilie A associés au taux résiduel de FVIII

2) Causes génétiques de l'hémophilie A :

Altérations de F8

Les altérations possibles du gène *F8* sont nombreuses et variées et expliquent l'hétérogénéité des phénotypes observés chez les patients hémophiles A : mutations ponctuelles, délétions, insertions ou des altérations de l'épissage altérant la séquence de la protéine. Ces anomalies peuvent survenir au niveau des exons et des introns dans des parties plus ou moins importantes de *F8*. La "European Association for Haemophilia and Allied Disorders" (EAHAD) recense au sein de sa base de données sur les différents facteurs de la coagulation, 3052 variants différents du gène *F8*. (Mise à jour en mars 2022)

La majorité des variants de *F8* sont liés à des mutations ponctuelles se matérialisant sous la forme de mutations faux-sens et non-sens. Le phénotype de la maladie est directement corrélé à l'importance des régions dans lesquelles surviennent les mutations et de la façon dont elles les affectent.

En effet des mutations faux-sens semi-conservatrices sont associées à des formes mineures d'hémophilie alors que des mutations faux-sens non-conservatrices seront plutôt associées à des formes modérées ou sévères selon la localisation sur *F8*. Les mutations non-sens peuvent induire l'introduction de codons stop précoces et sont le plus souvent associées à des formes sévères de la maladie car elles génèrent une protéine tronquée qui ne sera pas ou peu fonctionnelle. Certaines mutations peuvent avoir pour effet de générer ou supprimer un ou des sites d'épissage et donc de

changer la taille ou la composition en exons lors de la transcription. La forme de la maladie dépend dans ce cas de la possibilité pour la protéine à être produite correctement (forme mineure/modérée) ou non produite (forme sévère de la maladie).^{95,96}

Les délétions sont également un type d'anomalie observée fréquemment dans l'hémophilie A. Celles-ci peuvent être d'ampleur plus ou moins importante selon les cas en étant partielles ou totales, avec pour autres conséquences, d'éventuels changements dans le cadre de lecture. L'élimination de larges parties du gène est majoritairement associée à des formes sévères d'hémophilie A.⁹⁷

Les réarrangements géniques constituent des événements plus rares, mais l'inversion de l'intron 22 est retrouvée chez la moitié des patients hémophiles A sévères. Après un événement de recombinaison homologue, une interruption du gène *F8* apparaît, qui se divise en deux orientations : les exons 1 à 22 vont dans une direction tandis que les exons 23 à 26 vont dans l'autre. Par conséquent, la production d'un ARNm contenant l'ensemble des exons devient impossible, entraînant l'absence de production de FVIII. Cette altération du gène est liée à un phénotype sévère.^{98 99} Un second type d'inversion est observé chez 1-5% des patients hémophiles sévères, l'inversion de l'intron 1. Cette inversion entraîne une séparation de l'exon 1 du reste du gène et génère deux ARNm chimériques conduisant à des protéines tronquées et non fonctionnelles.¹⁰⁰

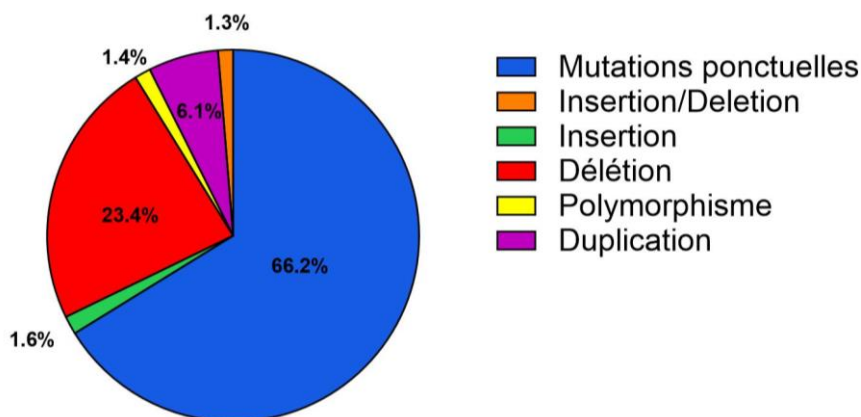


Figure 9 : Fréquence des altérations du gène *F8* chez les patients atteints d'hémophilie A

(Adapté depuis la base de données EAHAD)

3) Manifestations cliniques de la maladie :

L'importance des symptômes observés chez les patients hémophiles dépend directement de l'activité résiduelle du FVIII, avec une corrélation inverse entre sévérité des manifestations et activité du FVIII. De plus, la fréquence des épisodes de saignement varie selon la localisation observée : Articulations, muscles, système nerveux central.

a) Hémophilie mineure

Cette catégorie de patients présente une activité résiduelle facteur VIII comprise entre 5 et 40 %, qui est suffisante pour qu'ils ne manifestent pas de saignements spontanés. En l'absence de prise

en charge, ces patients souffrent de saignements anormaux en cas de procédure invasive plus ou moins lourde (chirurgies majeures, extraction dentaire) ou en cas de traumatisme grave générant des blessures importantes. La fréquence de survenue des saignements varie d'un individu à un autre (quelques saignements par an à un saignement tous les cinq ou dix ans). On quantifie les saignements annuels chez un patient, on parle alors d'ABR (Annual Bleeding Rate). Du fait de cette fréquence peu élevée d'évènements hémorragiques, le diagnostic de l'hémophilie mineure se fait généralement tardivement à l'occasion d'une chirurgie ou d'un accident en absence d'antécédent familial d'hémophilie.¹⁰¹

b) Hémophilie modérée

Les patients atteints d'une hémophilie A modérée présentent peu fréquemment des saignements spontanés. L'activité FVIII comprise entre 1 et 5 % conduit à un groupe de patients hétérogènes concernant la survenue des épisodes hémorragiques. De manière générale, les épisodes hémorragiques surviennent après un choc ou un traumatisme peu violent ou mineur. En l'absence de traitement, les saignements sont prolongés dans le temps et plus fréquents par rapport aux hémophiles mineurs. Le diagnostic est plus précoce et se fait en général avant l'âge de 5-6 ans. L'hétérogénéité de ce groupe de patients porte également sur la prise en charge, avec une partie des individus qui sont sous traitement prophylactique ou pré exposition en concentrés de FVIII. Des saignements graves et comparables à ceux des hémophiles sévères, nécessitant un traitement adapté, peuvent survenir chez certains patients à des fréquences variant entre une fois par semaine et une fois par mois.

c) Hémophilie sévère

Les personnes atteintes d'hémophilie A sévère présentent moins de 1% d'activité FVIII et présentent des épisodes graves et récurrents de saignements spontanés incontrôlés sans traumatisme préalable. Ces hémorragies spontanées surviennent principalement au niveau des articulations et des tissus mous : les tendons, les ligaments et les muscles. Des saignements intracrâniens peuvent parfois se produire dès la naissance, mais en général, les symptômes hémorragiques n'apparaissent qu'au moment de l'apprentissage de la marche chez l'enfant du fait du risque accru de traumatismes, même minimes, pouvant être rencontrés.¹⁰² La principale cause de décès chez les patients atteints d'hémophilie A sont les hémorragies intra crâniennes. Les saignements chroniques au niveau des articulations, connus sous le nom d'hémarthroses, constituent l'évènement hémorragique le plus fréquent. En effet, ces saignements intra-articulaires conduisent à un gonflement douloureux de l'articulation, devenant très inflammatoire et pouvant conduire un blocage total de l'articulation et la perte de mobilité irréversible du ou des membres concernés, entraînant le développement d'arthropathies extrêmement invalidantes touchant en particulier les hanches et les genoux.¹⁰³

d) Hémophilie A féminine

Du fait de sa transmission liée au chromosome X, l'hémophilie A touche majoritairement les hommes. En effet, les femmes étaient généralement considérées comme porteuses de la maladie

plutôt que comme étant cliniquement affectées. Cependant, des études récentes ont montré que pour chaque homme atteint d'hémophilie A, il y a 4 femmes porteuses de la maladie, 30 % d'entre elles présentant des taux de FVIII inférieurs à 40%.¹⁰⁴ Ainsi, 70% de ces femmes souffrent de ménorragies et de saignements post-partum. Ces nouvelles études suggèrent donc de considérer et prendre en charge ces hémophilies A féminines comme des hémophilies A mineures.^{105,106}

4) Traitements de l'hémophilie A : Quelles sont les stratégies thérapeutiques ?

Stratégies actuelles

Entre les années 1960-1970 et 2020, la prise en charge des patients hémophiles n'a cessé de s'améliorer. Depuis les cryoprécipités, en passant par les concentrés de FVIII purifiés, puis les FVIII recombinants, les agents by-passants ou bien encore les approches non facteur, le traitement de la maladie mais également la qualité de vie des patients ont considérablement évolué en mettant à disposition des patients et des médecins un arsenal thérapeutique large qui continue encore d'évoluer.

a) Thérapies de remplacement du Facteur VIII et ses limites

Le traitement « standard » des patients hémophiles A jusqu'à très récemment consistait en un remplacement du FVIII manquant ou non fonctionnel par un FVIII exogène d'origine plasmatique (purifié à partir de sang issu de donneurs) ou recombinant par voie intraveineuse. La stratégie est double : Traiter sur demande les saignements qui surviennent, ou traiter de manière préventive : la prophylaxie

a1) Traitement à la demande

Le traitement à la demande est administré le plus tôt possible après la survenue du traumatisme, l'apparition de l'hématome ou des premiers symptômes faisant penser à un saignement. La prise en charge optimale implique une adaptation de la dose et de la fréquence d'injection en fonction de l'ampleur et du type de saignement. Les taux de FVIII plasmatique à atteindre jusqu'à arrêt du saignement ou résorption de l'hématome sont également variables : de 40 à 100 % d'activité FVIII.¹⁰⁷ Le traitement sur demande s'applique également selon un protocole différent en cas de chirurgie, que ce soit en pré opératoire (cible: 50-100% FVIII) ou en post opératoire (cible: 30-80% FVIII) et selon le type de chirurgie pratiquée et la sévérité de l'hémophilie.

a2) Traitement par prophylaxie

La prophylaxie dans le traitement des patients atteints d'hémophilie A consiste en l'injection intraveineuse de concentré de FVIII à intervalle régulier. Le but est de prévenir à la fois les saignements spontanés, mais également les complications qui découlent des hémarthroses comme les arthropathies sévères et la perte de mobilité articulaire irréversible. L'objectif est de maintenir la fonction musculo-squelettique des patients et donc leur mobilité. L'idée de mettre en place une

prophylaxie est née d'une observation : les patients atteints d'hémophilie modérée (avec un taux de FVIII supérieur à 1 UI/dL) présentent rarement des saignements spontanés et bénéficient d'une meilleure préservation de la fonction articulaire par rapport aux patients atteints d'hémophilie sévère.¹⁰⁸ La prophylaxie est donc largement recommandée dans l'hémophilie A sévère. Le traitement est administré à raison de 2 à 3 fois par semaine à faible dose : 25-40 UI/kg. La stratégie consiste à modifier le taux de FVIII résiduel correspondant à un phénotype sévère, à celui d'un phénotype modéré et ainsi préserver la qualité de vie du patient.

Le traitement par FVIII est efficace mais contraignant. En effet, une des principales limitations est son mode d'administration (intraveineux) qui rend difficile l'observance du traitement par les patients. Une éducation thérapeutique des patients est mise en place dans certaines conditions afin que les patients puissent s'auto-administrer le FVIII. La seconde limitation est la demi-vie très courte du FVIII thérapeutique, qui est d'environ 7 à 20 heures (médiane à 12h)¹⁰⁹ et responsable de la fréquence élevée des injections et donc du coût important de ces traitements. Enfin une autre limitation majeure est le développement d'une réponse immunitaire contre le FVIII exogène. (cf. partie a4)

a3) Facteur VIII à demi-vie prolongée

Afin de répondre aux enjeux autour de la diminution de la fréquence des injections tout en conservant un niveau de protection suffisant contre les saignements, le développement de FVIII thérapeutique à demi-vie prolongée a permis de multiplier celle-ci d'un facteur 1,5 en moyenne (12-18h)^{110,111} en conservant ses propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques tout en diminuant la fréquence des injections. Deux méthodes différentes ont été utilisées pour cela :

- La modification chimique par liaison covalente au FVIII, de polymère de polyéthylène glycol (PEG). Trois stratégies de pégylation ont été développées. 1) La liaison d'une chaîne de PEG de 60 kDa sur une cystéine introduite dans un domaine du FVIII par mutagenèse dirigée afin de créer un site spécifique de liaison pour la pégylation.¹¹² 2) Les extrémités C- et N-terminales du domaine B ont été fusionnées afin de former une séquence de 21 AA séparant les chaînes lourdes et légères, créant un site unique de pégylation (chaîne de 40 kDa) sur la seule O-glycosylation présente sur ce domaine B modifié. L'activation du FVIII induit l'élimination de ce domaine B.¹¹³ 3) La pégylation aléatoire des lysines avec des chaînes de 20 kDa. Plus de 60% de ces conjugaisons se font sur le domaine B.¹¹⁴ A l'origine, la pégylation a été développée pour réduire l'immunogénicité de protéines thérapeutiques mais rapidement son potentiel dans l'amélioration des propriétés pharmacocinétiques des protéines thérapeutiques a été montré. En effet, la liaison d'une ou plusieurs chaînes de PEG permet d'inhiber la dégradation enzymatique de la protéine et de bloquer l'interaction avec les récepteurs de clairance et par conséquent, augmenter la demi-vie.¹¹⁵
- La seconde stratégie consiste en la fusion de la région constante (Fc) d'une immunoglobuline humaine G1 (IgG1) à une molécule de FVIII sans domaine B (Efmoroctocog alfa, Elocta®/Eloctate®, Sobi/Sanofi). En effet, grâce au fragment Fc, la protéine de fusion profite du mécanisme de recyclage des immunoglobulines via le récepteur néonatal pour le fragment Fc (FcRn).¹¹⁶

Dans la partie « Développements en cours » nous discuterons d'une nouvelle molécule faisant appel à une autre stratégie de prolongement de la demi-vie du FVIII : Le BIVV001

a4) Développement et traitement des inhibiteurs anti-FVIII

La complication majeure des thérapies de remplacement par le FVIII est le développement d'une réponse immunitaire anti-FVIII. Elle se manifeste par l'apparition d'anticorps anti-FVIII, neutralisant son activité pro-coagulante et rendant partiellement ou totalement inopérant le traitement au FVIII.¹¹⁷ Il est estimé qu'entre 20 et 30 % des patients hémophiles A sévères traités par FVIII développent ou développeront un inhibiteur.^{117,118}.

Le taux d'inhibiteur est mesuré en unités Bethesda (UB). Une UB correspond à la quantité d'anticorps présente dans un échantillon de plasma d'un patient qui peut neutraliser 50 % de l'activité pro-coagulante du FVIII d'un plasma normal. Le seuil de positivité est établi à 0,6 UB. Dans le contexte de l'hémophilie A, on distingue deux catégories de patients ayant développé des inhibiteurs contre le facteur VIII (FVIII) : les "faibles répondeurs" (<5 UB) et les "forts répondeurs" (>5 UB).

Il a été montré que les inhibiteurs sont des IgG anti-FVIII et que l'isotype varie selon le titre en inhibiteurs. Pour les patients avec un taux élevé d'inhibiteurs, il s'agira d'une IgG4 et à l'inverse, pour les patients avec un taux d'inhibiteurs faible, il s'agira d'une IgG1.^{119,120} Les inhibiteurs peuvent interférer avec l'activité pro-coagulante du FVIII en agissant par exemple sur:^{121,122}

- L'interaction entre le FVIII et les facteurs IX et X.
- L'interaction entre le FVIII et le FVW
- La fixation du FVIII à la surface des plaquettes
- L'activation du FVIII par la thrombine (FIIa)

La prise en charge des patients avec inhibiteurs peut être résumée selon trois cas distincts :

- Le patient est un faible répondeur : l'activité pro coagulante du FVIII injecté peut être rétablie en augmentant fortement la dose dans le but de saturer l'inhibiteur. Cela s'envisage ponctuellement mais aura pour conséquence d'augmenter le titre de l'inhibiteur.
- Le patient est un fort répondeur, une forte augmentation de la dose de FVIII n'aura pour conséquence que d'augmenter le titre d'inhibiteurs. Dans ce cas, il est possible de procéder à une induction de tolérance immune (ITI). Ce protocole implique des administrations répétées de très fortes doses de FVIII pouvant être en combinaison avec des immunosuppresseurs ou de faibles doses plusieurs fois par semaine, durant plusieurs mois, dans le but d'éradiquer les inhibiteurs et rendre à nouveau possible le traitement par FVIII.¹²³
- En cas d'échec de l'ITI (30% des cas), les patients étaient classiquement traités par des agents by-passants (cf. partie c)). Mais l'apparition des thérapies non facteurs avec emicizumab donne une nouvelle option thérapeutique dans la prise en charge des hémophiles sévères avec inhibiteurs en augmentant également leur qualité et confort de vie.

b) Thérapies de non remplacement

Comme leur nom l'indique, ce groupe de thérapie ne consiste pas en un remplacement du FVIII manquant mais à un contournement de l'action du FVIII afin de rétablir l'hémostase. Différentes stratégies sont disponibles: un anticorps bispécifique mimant l'action du FVIII et les agents

bypassants : le FVIIa et l'APCC. Dans la partie « Développements en cours » nous discuterons d'autres stratégies actuellement en essais cliniques.

b1) Emicizumab

L'emicizumab (Hemlibra®) est un anticorps recombinant bispécifique possédant un bras capable de reconnaître le FIX/FIXa et un bras reconnaissant le FX/FXa, dans le but de rapprocher spatialement ces deux facteurs de la coagulation et de mimer le rôle de cofacteur du FVIII dans la conversion du FX en FXa par le FIXa.

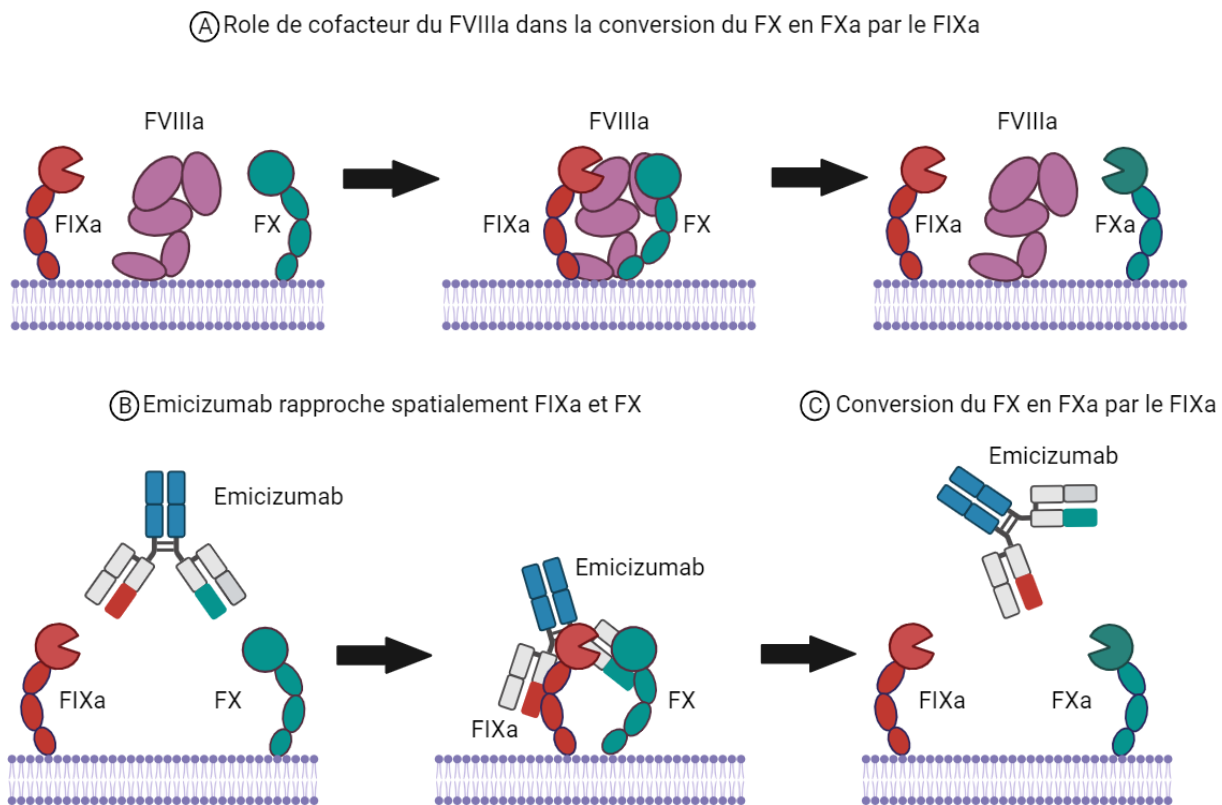


Figure 10 : L'emicizumab mime le rôle du FVIII en créant un pont moléculaire entre FIXa et FX

La mise sur le marché de l'emicizumab en 2018 a permis de changer la prise en charge des patients hémophiles A sévères avec ou sans inhibiteurs mais également de simplifier l'administration puisque l'emicizumab est utilisé par voie sous-cutanée et possède une longue demi-vie (4-5 semaines). De plus, il s'agit de la seule thérapie non-substitutive approuvée par la « Food and Drug Administration » (FDA) et par la « European Medicine Agency » (EMA) pour une utilisation prophylactique pour ces patients.^{124,125} L'injection sous-cutanée permet la mise en place simplifiée de la prophylaxie chez les patients en bas âge par exemple chez lesquels l'injection intra veineuse est complexe. La demi-vie longue de l'emicizumab permet également une réduction de la fréquence des injections et contribue à augmenter la qualité de vie des patients. En effet le schéma de traitement consiste en une injection par semaine à la dose de 3 mg/kg pendant les quatre premières semaines de traitement, puis une dose d'entretien par semaine de 1,5 mg/kg à partir de la cinquième semaine ou 3 mg/kg toute les deux semaines, ou 6 mg/kg toutes les 4 semaines. (Résumé des Caractéristiques du Produit (RCP) Hemlibra, Roche).

Différentes études cliniques ont été menées et ont démontré l'efficacité de l'emicizumab dans la correction du phénotype hémorragique et dans la prise en charge de l'hémophilie A sévère. Le principal critère qui a été observé est la diminution importante du nombre de saignements annuels ABR (Annual Bleeding Rate) qui ont été réduits de 95 à 98% en moyenne dans les différents essais cliniques. Il faut ajouter à cela plus de 82 % des patients n'ayant présenté aucun saignement et 97% ayant présenté moins de 3 saignements durant la période observée (144 semaines).¹²⁶ Les essais HAVEN1 et 2 ont évalué l'efficacité de l'emicizumab chez des patients adultes, adolescents et enfants hémophiles A sévères avec inhibiteurs.^{125,127} L'utilisation a ensuite été étendue aux patients adultes et adolescents hémophiles A sévères sans inhibiteurs suite aux essais HAVEN3 et 4.^{124,128} Des essais cliniques sont actuellement en cours pour évaluer la potentielle extension de l'utilisation aux patients avec hémophilie A mineure ou modérée (HAVEN6 et 7) chez l'enfant et l'adulte. Les résultats ont montré une importante efficacité de l'emicizumab en prophylaxie chez ces patients.^{129,130}

Ces résultats ont démontré l'efficacité de l'emicizumab dans la prévention des saignements chez les patients hémophiles A mais cette molécule reste fondamentalement différente du FVIII et ne mime par conséquent qu'une partie des fonctions du FVIII.

b2) FVIII versus emicizumab : Différences et points communs

En dépit des différences structurelles entre ces deux molécules qui vont influencer leurs propriétés moléculaires, il est important de rappeler que l'emicizumab mime l'activité cofacteur du FVIII dans la conversion du FX en FXa par le FIXa qui permet ensuite la génération de thrombine, l'enzyme clé de la coagulation. Malgré cela, des différences majeures subsistent :

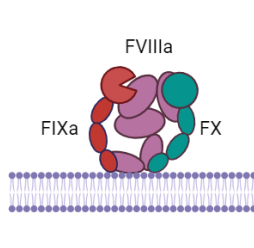
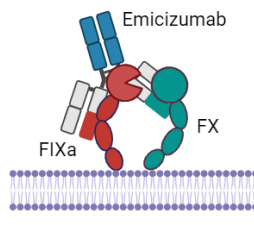
	Interaction avec les FIXa et FX	Localisation	Activité cofacteur	Stœchiométrie du complexe tenase	Activité FVIII
 <p>FVIIIa FIXa FX</p>	<p>Multiples sites d'interactions avec le FIXa et le FX</p>	<p>Ancrage aux phospholipides</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Rapproche spatialement les FIXa et FX - Stabilise et oriente le site actif du FIX - Favorise la localisation des FIXa et FX à la surface plaquettaire 	<p>Le FVIIIa est le facteur limitant la réaction de conversion du FX en FXa</p>	<p>Régulable</p>
 <p>Emicizumab FIXa FX</p>	<p>Un seul site d'interaction pour le FIXa et pour le FX</p>	<p>Pas d'ancrage aux phospholipides</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Rapproche spatialement les FIXa et FX 	<p>Le FIXa est le facteur limitant la réaction de conversion du FX en FXa</p>	<p>Non régulable</p>

Tableau 3 : Comparaison des propriétés du FVIIIa vs emicizumab

(adapté de "Emicizumab, a bispecific antibody recognizing coagulation factors IX and X: how does it actually compare to factor VIII?", Lenting et al)¹³¹

1. Interaction entre l'emicizumab ou le FVIII avec les FIX/FX

Les sites et affinités d'interactions du FVIII ou de l'emicizumab avec les FIXa/FX sont différents. En effet, le FVIII possède de multiples sites d'interactions avec les FIXa et FX situés à la fois sur les chaînes légères et lourdes des différentes protéines. L'interaction FVIII/FIXa a une affinité de 15 nM¹³² et se fait au niveau des domaines A2¹³³, A3^{65,133} et également C2.¹³⁴ D'autre part, l'interaction FVIIIa/FX a une affinité de 0,3 μM¹³² et se fait au niveau des domaines A1¹³⁵ et A3.¹³⁶ Les FVIIIa et FIXa possèdent une affinité pour les PL de respectivement <1 nM et 20 à 40 nM. Ainsi la liaison du FVIIIa à la surface des PL génère une affinité plus importante du FVIIIa pour le FIXa (1-2 nM) et du FIXa pour les PL (1-2nM) et permet de localiser les différents acteurs sur ces surfaces.

Plusieurs différences existent concernant l'emicizumab : Cet anticorps bispécifique est capable de reconnaître les FIX/FIXa et FX/FXa avec des affinités différentes mais uniquement au niveau d'un site unique sur chacune des deux protéines sans favoriser leurs localisations à la surface des plaquettes. Sur le FIX/FIXa, l'épitope se situe dans le domaine EGF1-like et pour le FX/Xa sur le domaine EGF2-like.¹³⁷ L'affinité de l'emicizumab pour les formes activées et non activées des deux enzymes est similaire : 1,6 μM pour emicizumab/FIX et 1,5 μM pour emicizumab/FIXa, 1,9 μM pour emicizumab/FX et 1 μM pour emicizumab/FXa.¹³⁷

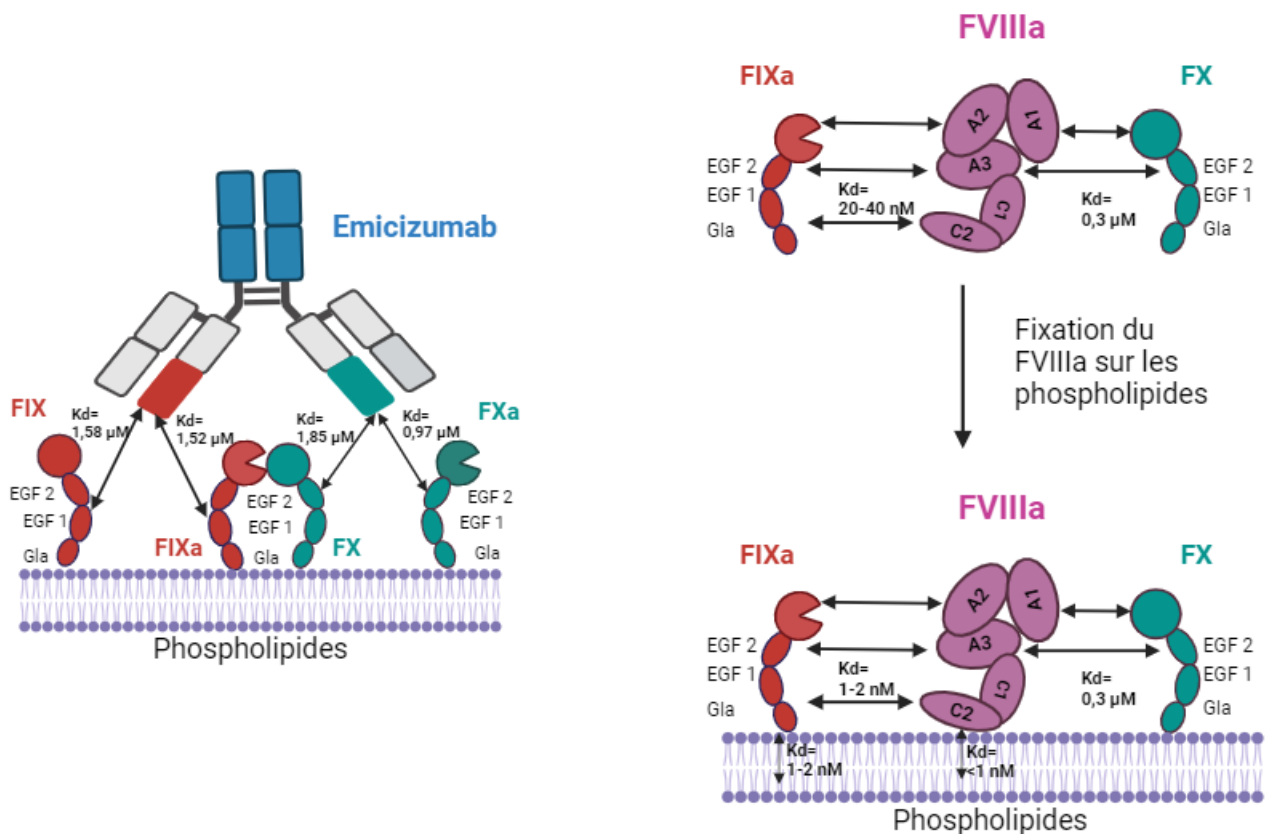


Figure 11 : Interactions et affinités du FVIIIa ou de l'emicizumab avec les FIX(a) et FX(a)

(Adapté de "Factor VIIIa-mimetic cofactor activity of a bispecific antibody to factors IX/IXa and X/Xa, emicizumab, depends on its ability to bridge the antigens", Kitazawa et al)¹³⁷

2. Localisation

Afin d'accomplir ses fonctions, le FVIIIa doit être fixé sur une surface riche en PL (surface plaquettaire activée). Cette fixation est assurée par son domaine C2 et a pu être mise en évidence par des techniques de cristallographie.^{138,139} Une autre étude montre que le domaine C1, et plus particulièrement les résidus Lys 2092 et Phe 2093, participent à la fixation sur la surface riche en PL.¹⁴⁰ Il est également décrit que la fixation de la fibrine soluble augmente le nombre de sites d'interactions pour le FVIII à la surface des plaquettes et promeut l'assemblage du complexe tenase à la surface des plaquettes.¹⁴¹ L'emicizumab ne possède aucun site de fixation pour des surfaces riches en phospholipides et échappe donc à ce mécanisme.

3. Activité cofacteur

L'activité cofacteur du FVIIIa au sein du complexe tenase peut être résumée par trois fonctions qui permettent de promouvoir la génération du FXa. - Permettre la stabilisation et la bonne orientation du site actif du FIXa. - Favoriser la bonne fixation des FIXa et X à la surface des plaquettes activées. - Rapprocher spatialement les FIXa et FX pour favoriser la réaction enzymatique. L'emicizumab ne mime qu'une seule de ces trois fonctions en créant un pont moléculaire entre les FIXa et FX qui permet de les rapprocher spatialement sur une surface riche en PL sans favoriser les localisations des différents acteurs à cet endroit.¹³²

4. Concentration des différents acteurs du complexe tenase

La concentration plasmatique des différents acteurs du complexe tenase est également importante et permet de mettre en évidence une différence stœchiométrique dans la réaction enzymatique impliquant le FVIII ou l'emicizumab. La concentration en FIX est de 90 nM et de 130 nM pour le FX. Concernant le FVIII (1U/ml), sa concentration est de 0,3 nM, ce qui implique que la réaction enzymatique de conversion du FX en FXa par le FIXa est limitée par le FVIII. Le traitement prophylactique des patients sous emicizumab vise à obtenir une concentration plasmatique de 0,37 μ M (55 μ g/ml) en large excès par rapport aux autres facteurs. Dans ce cas, c'est donc le FIXa qui devient le facteur limitant de la génération du FXa et la réaction ne cesse pas tant que du FIXa est généré et disponible.¹³²

5. Activation et régulation de l'activité FVIIIa

A l'état inactif, le FVIII ne présente aucune activité cofacteur. Différentes étapes sont nécessaires pour l'activation du FVIII (clivage, libération de la liaison au FVW, cf. chapitre « Activation du FVIII »). Ces étapes sont obligatoires avant de permettre l'action du FVIIIa. En parallèle, le FIX doit être activé afin de pouvoir générer du FXa. Pour l'emicizumab, aucune de ces étapes n'est nécessaire et dès que du FIXa est disponible, la génération de Xa débute.

En ce qui concerne la régulation, plusieurs niveaux de régulation sont décrits pour le complexe tenase. Que ce soit en présence du FVIIIa ou de l'emicizumab, le premier niveau de régulation concerne l'activité du FIXa qui est sensible à l'inhibition par des anticoagulants naturels tels que

l'antithrombine, la protéine S et la protéase nexin-2.¹⁴²⁻¹⁴⁴ Un second niveau de régulation est décrit ciblant directement le FVIIIa : La dissociation spontanée du domaine A2 du FVIIIa et la protéolyse du FVIIIa par le complexe protéine S/ protéine C activé.¹⁴⁵ L'inactivation du FVIIIa est donc centrale dans la régulation de l'activité du complexe tenase, un aspect qui est absent avec l'emicizumab.

b3) Immunogénicité et anticorps anti-emicizumab

Tout comme le FVIII utilisé en prophylaxie, l'emicizumab présente un potentiel risque immunogène chez certains patients. Au cours des essais cliniques, 3,5% des patients ont développé des « Anti drug antibodies » ADA : 2/111, 4/88, 6/151 et 2/48 respectivement dans HAVEN1, 2, 3 et 4.¹⁴⁶ Parmi ces patients, un seul a développé un anticorps neutralisant qui a nécessité un arrêt du traitement (patients issus de l'essai HAVEN2), ce qui représente 0,75% des patients inclus dans l'étude.¹⁴⁶ Plusieurs cas de patients traités par emicizumab avec ADA ont été décrits depuis :

- Le premier cas qui a été décrit est un patient pédiatrique issu de l'essai HAVEN2, âgé de 13 ans, atteint d'une hémophilie A sévère (inversion 22) avec inhibiteur chez qui l'induction de tolérance immune a échoué. Après 2 mois de traitement, des hématomes sont apparus sur son bras gauche, un temps de céphaline activée (TCA) prolongé a été mesuré (130 secondes) et aucune activité "FVIII-like" n'a pu être détectée par test chromogénique, suggérant la perte d'efficacité de l'emicizumab. L'analyse a mis en évidence un anticorps neutralisant anti-emicizumab bloquant l'activité FVIII-like chez ce patient, chez qui des traitements by-passants ont dû être remis en place.¹⁴⁷

- Le second cas décrit est un patient âgé de 6 ans atteint d'une hémophilie A sévère avec inhibiteur depuis l'âge de 19 mois chez qui l'induction de tolérance immune a échoué. Après 3 mois de traitement par emicizumab, des hématomes sont apparus sur les bras et un TCA prolongé a été mesuré (137 secondes) ainsi qu'une activité FVIII nulle. Un anticorps neutralisant anti-emicizumab a été mis en évidence.¹⁴⁸

- Le troisième cas décrit dans la littérature est un patient de 62 ans atteint d'hémophilie A sévère avec inhibiteur. Après 11 semaines de traitement par emicizumab, le patient a présenté des saignements et un TCA prolongé, ainsi qu'une activité FVIII faible. L'analyse de ce cas a permis de mettre en évidence un anticorps neutralisant anti-emicizumab.¹⁴⁹

- Enfin, le quatrième cas décrit dans la littérature est un patient de 5 ans atteint d'hémophilie A sévère **sans** inhibiteur. Après 41 semaines de traitement par emicizumab, le patient a présenté des saignements et un TCA prolongé, ainsi qu'une activité FVIII faible, conduisant à objectiver un anticorps neutralisant anti-emicizumab chez ce patient.¹⁵⁰

Dans les quatre cas décrits, l'apparition d'anticorps anti-emicizumab avec un effet neutralisant de l'activité d'emicizumab a conduit à devoir traiter ces patients avec des agents by-passants. Les approches anti-TFPI ou le Fitusiran, que nous allons décrire plus tard, constituent des alternatives très intéressantes pour ces patients.

c) Agents by-passants

Les agents by-passants sont des thérapies qui vont viser à contourner l'action du FVIII en court-circuitant la voie endogène de la coagulation. Dans la plupart des cas, ils sont utilisés pendant la

période d'induction de tolérance immune au FVIII, afin de procurer une protection aux patients durant cette période. Ils sont également utilisés en cas d'échec d'ITI afin de traiter un saignement.

Deux agents by-passants sont disponibles et utilisés pour le traitement de l'hémophilie A avec inhibiteur.

- Le rFVIIa (Novoseven[®], Novo Nordisk) qui permet une génération de thrombine via la voie exogène de la coagulation en activant le FX avec son cofacteur le facteur tissulaire.
- Les concentrés de protéines du complexe prothrombinique activé (aPCC). Le seul sur le marché est le FEIBA[®](Takeda), il contient un mélange de zymogènes pro coagulants (Prothrombine, FVII, FIX, FX), anticoagulants (Protéine C) et des enzymes pro coagulantes (Thrombine, FIXa, FXa, FVIIa). Il contient également des cofacteurs pro coagulants (FVIII, FV) et anticoagulants (Protéine S).¹⁵¹

d) Traitements non spécifiques de l'hémophilie A

d1) Acide tranexamique

L'acide tranexamique (ATX) est une molécule synthétique analogue de la lysine qui possède une action anti-fibrinolytique. L'ATX agit en bloquant les sites de liaison de la lysine sur le plasminogène¹⁵² et bloquant par conséquent son activation en plasmine. Par ce mécanisme, l'ATX permet une stabilisation du réseau de fibrine en bloquant sa dégradation.

Ce traitement est indiqué lors de procédures invasives telles que la chirurgie dentaire chez les patients hémophiles A et montre un effet important dans la réduction des saignements post-opératoires et la réduction de la quantité de FVIII administrée aux patients.^{153,154}

d2) Desmopressine

La desmopressine est un analogue structural synthétique de l'hormone anti diurétique : la vasopressine. Son mode d'action consiste en une augmentation du taux circulant de FVIII en stimulant le relargage de FVIII et de FVW contenu dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales.¹⁵⁵ Ce type de thérapie peut être surtout utilisé chez des patients atteints d'hémophilie A mineure.

Nouvelles stratégies/ Développements en cours

a) FVIII à très longue demi-vie

La principale limitation à la prolongation de la durée de vie des FVIII recombinants est sa liaison au FVW qui a une demi-vie très courte (12 à 15h). Le développement de nouveaux FVIII à demi-vie étendue s'est donc concentré sur l'affranchissement de cette liaison du FVIII au FVW. Le BIVV001 ou efanesoctocog alfa est un nouveau FVIII humain possédant un fragment Fc d'IGG1 humaine et s'affranchissant de la liaison au FVW car il est fusionné à un fragment de celui-ci : le domaine D'D3.¹⁵⁶ Il contient également deux polypeptides XTEN, alternative à la pegylation permettant la prolongation de la demi-vie.¹⁵⁷ Cette protéine de fusion a une demi-vie de 32-42 heures et constitue

une amélioration majeure des thérapies de remplacement en diminuant la fréquence des injections malgré sa voie d'injection intraveineuse.¹⁵⁶

Le BIVV001 est actuellement en essai clinique de phase 3 chez des patients hémophiles A sévères avec ou sans inhibiteurs chez l'enfant, l'adolescent et l'adulte. Les résultats publiés début 2023 ont montré une forte efficacité dans la réduction des ABR moyens (0,71) chez les 122 patients âgés de plus de douze ans inclus dans l'étude. Parmi eux 86 n'ont présenté aucun saignement durant les 54 semaines de l'essai.¹⁵⁸ L'effet à long terme sur la préservation des articulations de ces patients est actuellement en cours d'évaluation.

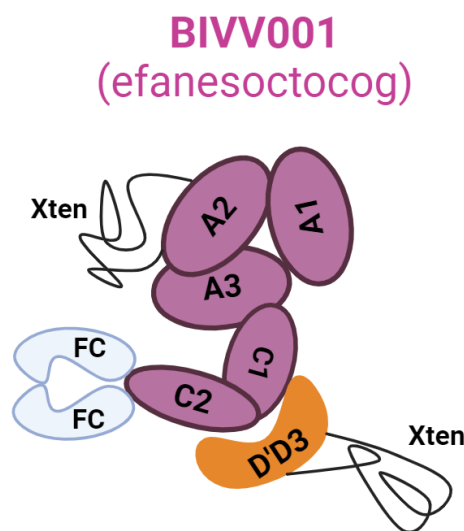


Figure 12 : Structure du FVIII à très longue demi-vie BIVV001

(Adapté de « BIVV001 Fusion Protein as Factor VIII Replacement Therapy for Hemophilia A » Konkle et al, NEJM)¹⁵⁶

b) MIM8

Le MIM8 est un anticorps bispécifique mimant l'action du FVIIIa, de nouvelle génération. En effet tout comme l'emicizumab, le MIM8 est administré par voie sous-cutanée et agit également en permettant de rapprocher spatialement les FIXa et FX afin d'activer le FX en FXa. Les épitopes reconnus par MIM8 sont localisés dans les domaines protéases des FIX et FX alors que pour l'emicizumab, ils sont au niveau des domaines EGF-like. De plus, MIM8 se différencie de l'emicizumab en permettant une meilleure localisation des FIXa et FX sur les surfaces riches en phospholipides et en interagissant beaucoup moins avec ces facteurs de la coagulation en circulation. Les études pré-cliniques ont montré une efficacité plus importante de MIM8 par rapport à emicizumab in vitro dans les tests de génération de thrombine et in vivo dans différents modèles de saignement.¹⁵⁹

Plusieurs essais cliniques de phase 2 et 3 sont en cours actuellement afin d'évaluer l'efficacité de MIM8 chez des patients hémophiles A adultes et adolescents avec ou sans inhibiteurs (FRONTIER 1 et 2). Des essais chez l'enfant sont actuellement en cours (FRONTIER 3). A cela s'ajoute des études qui vont commencer afin d'évaluer l'effet du traitement par MIM8 à long terme (FRONTIER 4) mais

également évaluer les conditions nécessaires pour basculer les patients sous emicizumab vers le MIM8 (FRONTIER 5).

En ce qui concerne le potentiel de développement d'ADA par les patients, aucun cas n'a pour l'instant été rapporté mais une étude a permis de montrer que les ADA anti-emicizumab ne cross réagissaient pas avec le MIM8. Cela pourrait offrir une nouvelle alternative thérapeutique pour les patients avec inhibiteurs et ADA anti emicizumab.¹⁶⁰

c) NXT007

Tout comme le MIM8, NXT007 est un anticorps bispécifique anti-FIXa/anti-FX mimant l'action du FVIIIa. Il est issu de la modification d'emicizumab par une nouvelle technologie de modification des immunoglobulines thérapeutiques recombinantes. Celle-ci permet d'introduire des mutations qui vont changer la charge électrostatique à l'interface entre la chaîne légère et la chaîne lourde de l'immunoglobuline de départ afin de stabiliser la structure hétérodimérique de la chaîne lourde et potentiellement promouvoir l'efficacité de fixation et d'orientation de l'anticorps sur son antigène cible.¹⁶¹ NXT007 montre une efficacité supérieure à emicizumab dans les tests de génération de thrombine et in vivo dans des modèles de primates atteints d'hémophilie A.¹⁶² Cette molécule est actuellement en essais cliniques de phase 1 et 2 chez des adultes et adolescents hémophiles A sévères et modérés.

d) Les anticorps anti-TFPI

Lors des quinze dernières années, le développement d'inhibiteurs des anticoagulants naturels s'est imposé comme une nouvelle alternative thérapeutique pour traiter l'hémophilie A. Cette nouvelle stratégie s'appuie sur le fait que l'hémostase peut être représentée comme une balance à l'équilibre avec d'un côté les protéines coagulantes et de l'autre les anticoagulants naturels. Dans le cadre de l'hémophilie A, la balance est déséquilibrée du côté anticoagulant.

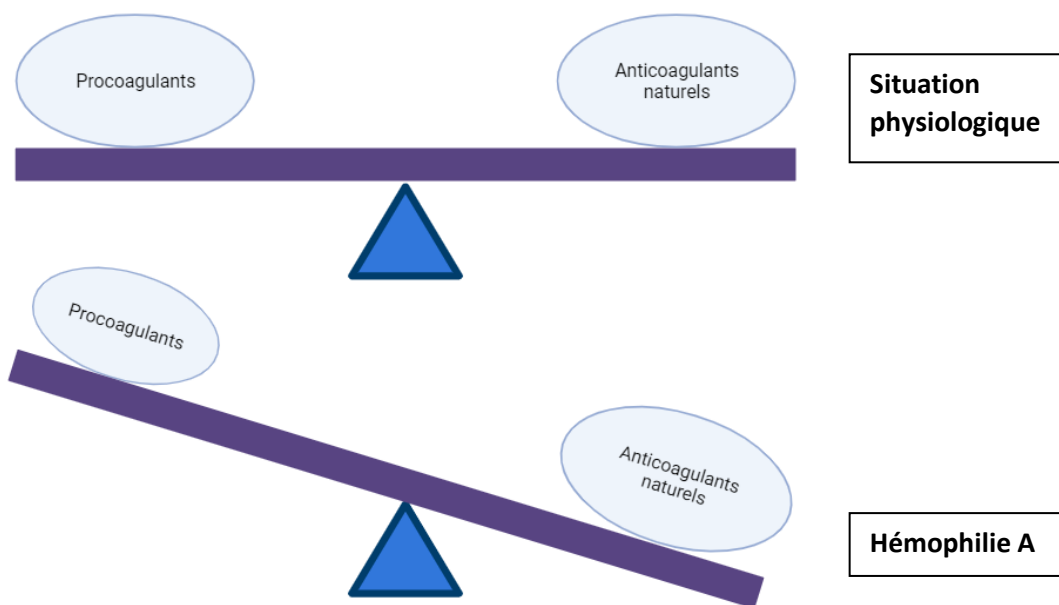


Figure 13 : Equilibre vs déséquilibre hémostatique dans l'hémophilie A

L'inhibition des anticoagulants vise à tendre à nouveau vers l'équilibre.

C'est notamment le cas pour les anticorps ciblant l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire : le TFPI.¹⁶³

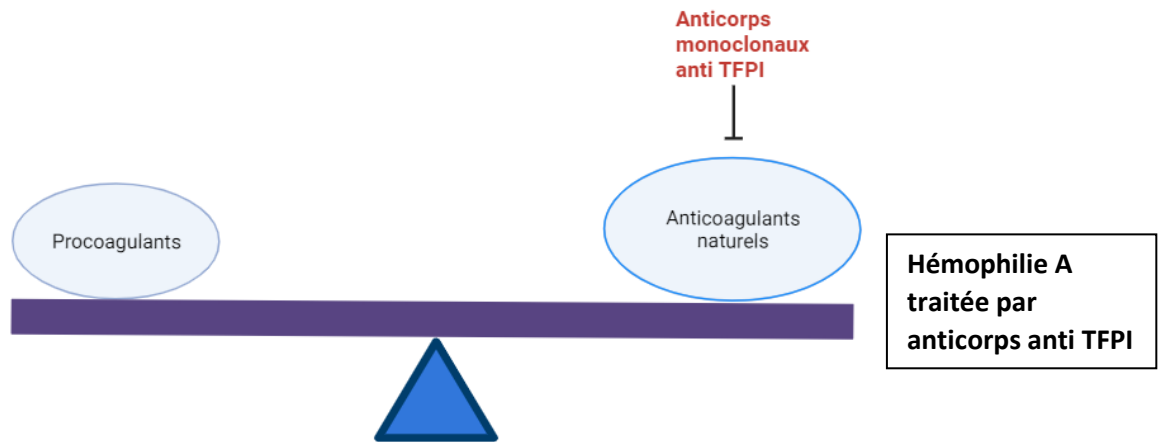


Figure 14 : Rétablissement de l'équilibre hémostatique par les inhibiteurs des anticoagulants naturels

En ciblant le TFPI, le but est de limiter son rôle inhibiteur du FXa et/ou du FVIIa et augmenter la quantité de FXa disponible pour générer de la thrombine.¹⁶³

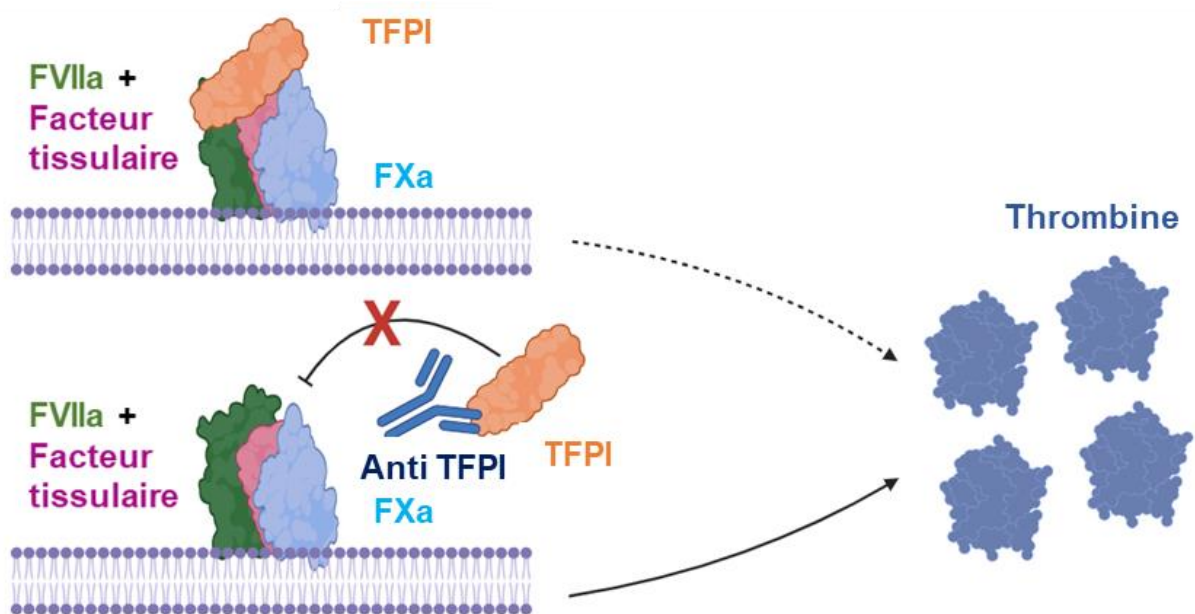


Figure 15 : Mécanismes d'action des anticorps anti-TFPI thérapeutiques dans le traitement de l'hémophilie A

On dénombre quatre anticorps anti TFPI qui ont été développés ces dernières années :

- Concizumab qui est un anti domaine K2 du TFPI en essai clinique de phase 3 qui a montré son efficacité chez les patients hémophiles A sévères avec et sans inhibiteurs et administré par injection sous-cutanée. Au cours de la phase 3, trois patients ont présenté des évènements thrombotiques graves qui ont conduit à la suspension de l'essai clinique en mars 2020. Il a repris en Août 2020 après autorisation de la FDA.¹⁶⁴

- Marstacimab est également un anti domaine K2 du TFPI en essai clinique de phase 3 chez les patients hémophiles A sévères avec et sans inhibiteurs et administré par injection sous-cutanée. Les résultats n'ont pas encore été publiés mais les résultats partiels communiqués ainsi que ceux de la phase 2 montrent une importante efficacité du traitement en prophylaxie dans la diminution des saignements annuels.¹⁶⁵

- MG1113 est un troisième anticorps anti domaine K2 du TFPI, en essai clinique de phase 1, actuellement dans la phase de recrutement des patients.

- Befovacimab est un anticorps anti domaine K1 et K2 du TFPI qui a complété la phase 1 et s'est arrêté en phase 2 suite à trois cas graves de thrombose observés.¹⁶⁶

Ensemble, toutes les données collectées grâce aux essais cliniques permettent de confirmer le potentiel des anticorps anti-TFPI mais les essais cliniques mettent en évidence les potentielles complications thrombotiques accompagnant les thérapies visant à rétablir la balance hémostatique en inhibant les anticoagulants naturels.

	Caractéristiques des anticorps monoclonaux	Domaines du TFPI ciblé	Etapas dans les essais cliniques
Concizumab	Humanisé, IgG4	K2	Phase 3 en cours
Marstacimab	Humain, IgG1	K2	Phase 3 en cours
MG1113	Humanisé, IgG4	K2	Phase 1 en cours
Befovacimab	Humain, IgG2	K1 & K2	Arrêt en phase 2

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des anticorps anti TFPI en essais cliniques

e) Inhibition transcriptionnelle de l'antithrombine

Une seconde stratégie visant à rétablir la balance hémostatique est le ciblage de l'antithrombine (inhibiteur de la thrombine et du FXa et dans une moindre mesure du FVIIa, et du FIXa). Elle a pour point de départ deux observations : La survenue moindre de thromboses veineuses chez des patients atteints d'une déficience en antithrombine¹⁶⁷ et l'observation d'une atténuation¹⁶⁸ du phénotype hémorragique chez les patients hémophiles A ayant une double déficience FVIII/antithrombine.

Afin d'inhiber l'antithrombine sans pour autant totalement réprimer son expression, la stratégie qui a été développée est l'utilisation de siRNA (small interfering RNA) qui permet de cibler

spécifiquement l'ARNm de l'antithrombine et inhiber son expression par les hépatocytes et donc promouvoir la génération de thrombine. Afin de cibler spécifiquement les hépatocytes, le siRNA est conjugué à une chaîne de N-acétylgalactosamine qui est le ligand du récepteur de l'asiologlycoprotéine à la surface des hépatocytes^{169,170} et qui permet son endocytose puis son action dans le blocage et la dégradation de l'ARNm de l'antithrombine.

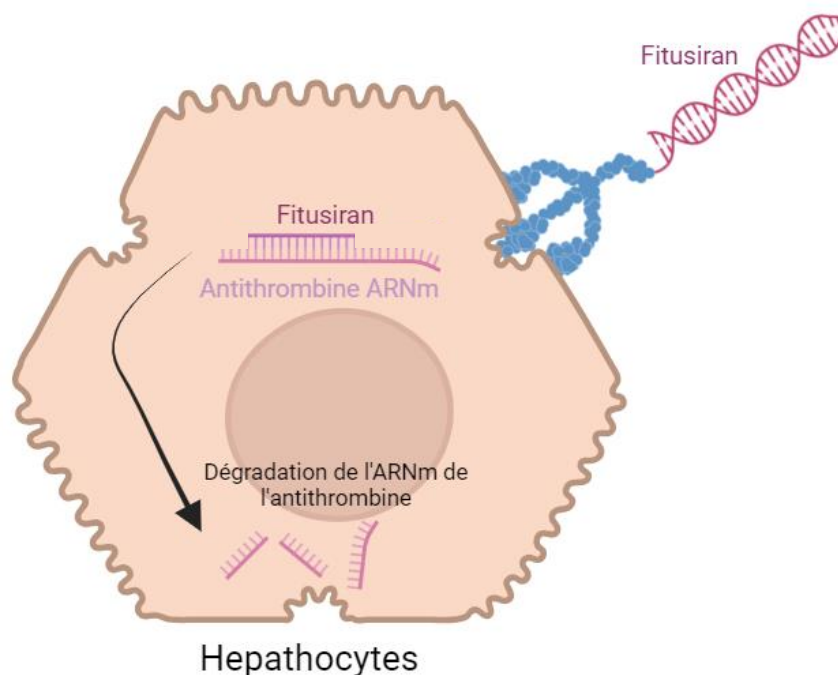


Figure 16 : Mécanisme d'action du siRNA Fitusiran ciblant l'ARNm codant pour l'antithrombine

Le Fitusiran est actuellement en essai clinique de phase 3 et a montré une efficacité dans la réduction des ABRs de l'ordre de 90%. Il est également important de signaler que 5 patients ont présenté des évènements thrombotiques plus ou moins importants durant les essais.¹⁷¹

f) Inhibition de la protéine C activée

Le ciblage de la protéine C activée est également une stratégie d'inhibition d'une protéine anticoagulante naturelle. L'inhibition de son activité inhibitrice des cofacteurs FVIIIa et FVa, impliqués respectivement dans les complexes tenase et prothrombinase, permet d'augmenter la quantité de thrombine générée et de rétablir la balance hémostatique chez les patients hémophiles A.

Les SERPINS sont une superfamille d'inhibiteurs des protéases à sérine (PCa, thrombine, FXa,...). Leur spécificité est déterminée par une structure importante : le "reactive center loop" ou RCL. Des modifications au niveau du RCL changent leurs spécificités.¹⁷² Une SERPIN spécifique de la PCa (SerpPC) a été développée et testée pour une potentielle utilisation pour le traitement des patients hémophiles A.¹⁷³ Le SerpPC est actuellement en essai clinique de phase 2 chez des patients hémophiles A sévères adultes.

g) Thérapie génique

L'hémophilie A est une maladie monogénique ce qui en fait une maladie de choix pour le recours à la thérapie génique. En effet la thérapie génique vise à remplacer le gène du FVIII altéré par un gène fonctionnel et rétablir une synthèse de FVIII. L'idée consiste à délivrer du matériel génétique par l'intermédiaire d'un vecteur viral AAV (Adeno Associated Virus) qui va cibler le foie afin de réaliser une « transfection in vivo » des hépatocytes qui vont intégrer l'ADNc du F8 délivré, l'exprimer et sécréter le FVIII.

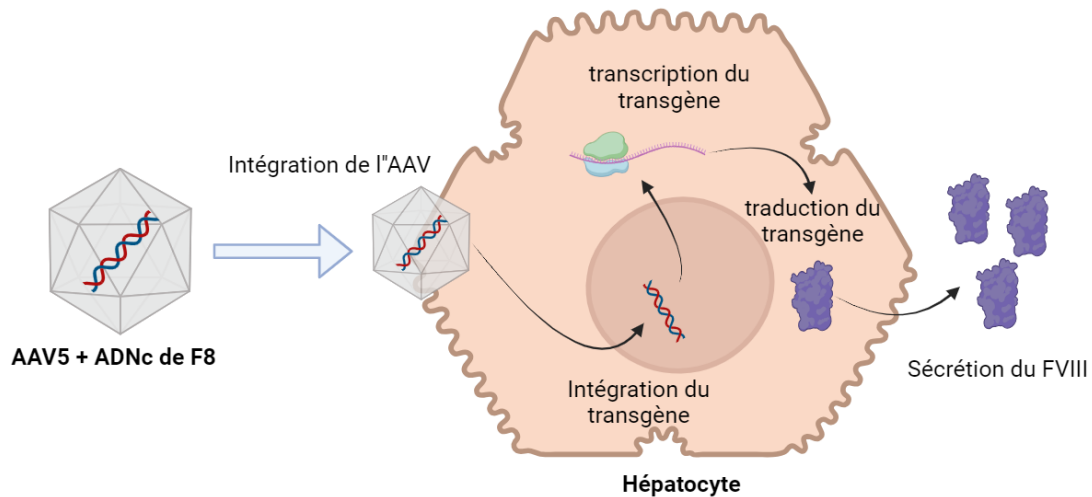


Figure 17 : Mode d'action des thérapies géniques par AAV pour le traitement de l'hémophilie A

Une vingtaine d'essais cliniques ont été ou sont actuellement menés par 8 compagnies pharmaceutiques, mais pour le moment, seule une a reçu une approbation par la FDA et de l'EMA pour une utilisation chez des patients hémophiles A sévères : Valoctogene roxaparvovec. Le premier patient européen a été traité en août 2023 (Communiqué de Biomarin). Les critères de sélection des patients sont très restrictifs :¹⁷⁴

- Être âgé de 18 ans et plus car le foie continue de se développer jusqu'à l'âge de 14 ans chez l'être humain
- Être atteint d'une hémophilie A sévère sans inhibiteurs ou antécédents d'inhibiteurs du FVIII
- Être négatif aux anticorps anti AAV de type 5 AAV5 : En effet, une partie de la population a rencontré des AAV au cours de sa vie et a donc développé des anticorps contre leurs protéines de surfaces.
- Ne présenter aucun antécédent de maladies hépatiques : cirrhose, fibrose, hépatite.

Les 132 patients inclus ont été suivis pendant deux ans post injection et les résultats ont montré 85 % de réduction des ABR, 99% de réduction du recours aux injections de FVIII et 77% de réduction des évènements hémorragiques.¹⁷⁵

Les principales limitations de thérapie génique actuelle sont :

- La variabilité de l'activité FVIII post thérapie génique (0 à 150 %)
- La diminution de l'expression du transgène dans le temps.¹⁷⁵

Les premiers résultats obtenus avec la thérapie génique sont prometteurs, mais le développement de nouvelles versions plus efficaces et ouvertes à un plus grand nombre de patients reste nécessaire.

5) Modèle animal et étude de l'hémophilie A

1) Modèles animaux d'hémophilie A

L'utilisation des modèles animaux dans l'étude des mécanismes hémostatiques et le développement de nouvelles approches thérapeutiques de l'hémophilie A est essentielle. Ces modèles présentent des avantages importants comparativement aux tests *in vitro* : - Absence d'utilisation d'un activateur artificiel de la coagulation, puisque celle-ci est déclenchée par la blessure dans les modèles de saignement. – Tous les acteurs participant à l'hémostase, qu'ils soient pro ou anti-coagulants sont présents. - Les éléments cellulaires tels que les plaquettes, les globules rouges et les cellules endothéliales sont également présents ce qui n'est pas le cas dans les modèles *in vitro*.^{176,177}

Différents modèles animaux d'hémophilie A existent, ils sont classés en trois catégories :

- Les modèles présentant des mutations naturelles congénitales. Le premier modèle à avoir été décrit est le modèle canin, décrit pour la première fois en 1946.¹⁷⁸ Quelques années plus tard, la première colonie de Setters irlandais était utilisée aux Etats-Unis pour la recherche.¹⁷⁹ Le modèle canin reproduit les mêmes manifestations cliniques de la maladie que l'humain : Hémarthroses, hématomes sous cutanées et hémorragies post traumatiques.¹⁸⁰ Des inhibiteurs du FVIII ont également été observés chez des chiens hémophiles A traités par FVIII canin. Le principal désavantage de ce modèle est le développement d'une réponse immunitaire rapide et forte contre les facteurs de la coagulation humaine¹⁸¹ ce qui limite son utilisation pour le développement de nouvelles thérapies.

D'autres animaux présentent des mutations naturelles du gène du FVIII, tels que le mouton^{182,183}, le cheval¹⁸⁴ et le rat qui présentent des phénotypes hémorragiques similaires à celui observé chez les chiens.

- La seconde catégorie correspond aux modèles d'hémophilie A induits par utilisation d'anticorps neutralisant l'activité du FVIII. Cela permet de générer des modèles d'hémophilie A transitoires par injection de ces anticorps. Des modèles de lapins et de singes ont pu être développés et utilisés notamment pour tester le développement et l'efficacité des anticorps ciblant le TFPI¹⁸⁵ ou pour l'emicizumab.¹⁸⁶
- Enfin, la dernière catégorie regroupe les modèles d'hémophilie A génétiquement modifiés. Le modèle murin est le modèle le plus utilisé dans le développement pré clinique. Ce modèle présente l'avantage d'être peu coûteux et bien moins encombrant pour le maintien et le développement de la colonie. D'autre part, du fait de sa taille, le modèle souris ne nécessite que de très faibles quantités de thérapies pour les différents tests. Les facteurs de la coagulation et protéines régulatrices de l'hémostase sont présentes de façon comparable aux protéines humaines.¹⁸⁷ Ainsi, l'efficacité des traitements par FVIII^{188,189} a pu être largement analysée chez la souris ainsi que le développement des inhibiteurs¹⁹⁰⁻¹⁹² du FVIII et la mise en place des ITI.¹⁹³ Ces caractéristiques en font un modèle de choix pour les différents tests de saignements. (cf. partie 2) Il présente tout de même certains désavantages comme le fait de ne pas présenter de saignements spontanés ou d'hémarthroses.

Un modèle de cochon génétiquement modifié a aussi été développé. L'avantage du cochon est qu'il présente des mécanismes de coagulation très proches de ceux observés chez l'homme. De plus, les

cochons développent également des arthropathies suite à des hémarthroses répétés.¹⁹⁴ Ce modèle procure une autre option pour tester les nouvelles thérapies de l'hémophilie A.¹⁹⁵

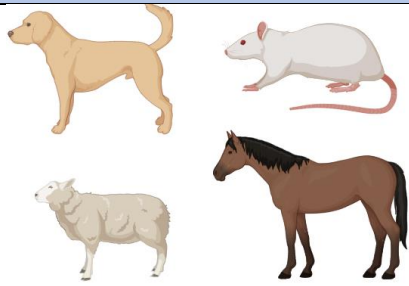


	Modèles animaux d'hémophilie A
Mutations naturelles	
Déficit en FVIII induit	
Modifications génétiques	

Tableau 5 : Modèles animaux d'études de l'hémophilie A

Les contraintes de coût, d'espace et de compatibilité avec les facteurs de coagulation humains, ainsi que les enjeux éthiques, font du modèle murin le modèle le plus utilisé en laboratoire, notamment dans les tests de saignement.

La suite de cette partie sur les modèles animaux sera donc dédiée à la description des tests de saignement appliqués au modèle murin.

2) Modèles de saignements pour l'investigation des thérapies de l'hémophilie A

Afin d'évaluer différentes thérapies de l'hémophilie A, nous disposons de 3 tests principaux permettant de mesurer le saignement chez la souris. Ces différents tests sont de sévérités différentes et nous les décrivons ici du moins sévère au plus sévère, en précisant les paramètres qu'ils permettent de renseigner afin d'analyser l'efficacité des thérapies.

- « Le Tail Vein ou Artery Transection », TVT ou TAT : Ce test consiste en une incision standardisée de 0.7 mm de profondeur sur une des deux veines latérales de la queue de la souris pour le TVT ou de l'artère ventrale de la queue pour le TAT.^{196,197} Durant 30 à 60 minutes, le sang perdu est récupéré dans une solution saline et les arrêts et reprises de saignement sont chronométrés. Les principales

données qui en résultent sont les quantités de sang perdu et les profils de saignement illustrant les périodes de saignement et d'arrêt de saignement dans le temps.

- « Le Tail clip » : Ce modèle consiste en l'incision des 3 mm distaux de la queue de la souris et donc en la section des 4 vaisseaux de la queue de la souris (deux veines latérales, deux artères, ventrale et dorsale). L'expérience est réalisée durant 30 minutes et, de façon similaire au TVT, le sang perdu est récupéré afin d'être quantifié, et les périodes de saignement sont monitorées. Les principales données qui en résultent sont les quantités de sang perdu et les profils de saignement illustrant les périodes de saignement et d'arrêt de saignement dans le temps.^{198,199}
- « Le modèle de la veine saphène » consiste en une fine ponction de la veine saphène à l'aide d'une aiguille. A chaque caillot formé, celui-ci est essuyé et le nombre d'arrêts de saignement est quantifié durant 30 minutes. Les périodes de saignement sont monitorées. Ici, les principales données analysées sont le nombre de caillots formés et le temps cumulé des périodes de saignement.^{200,201}

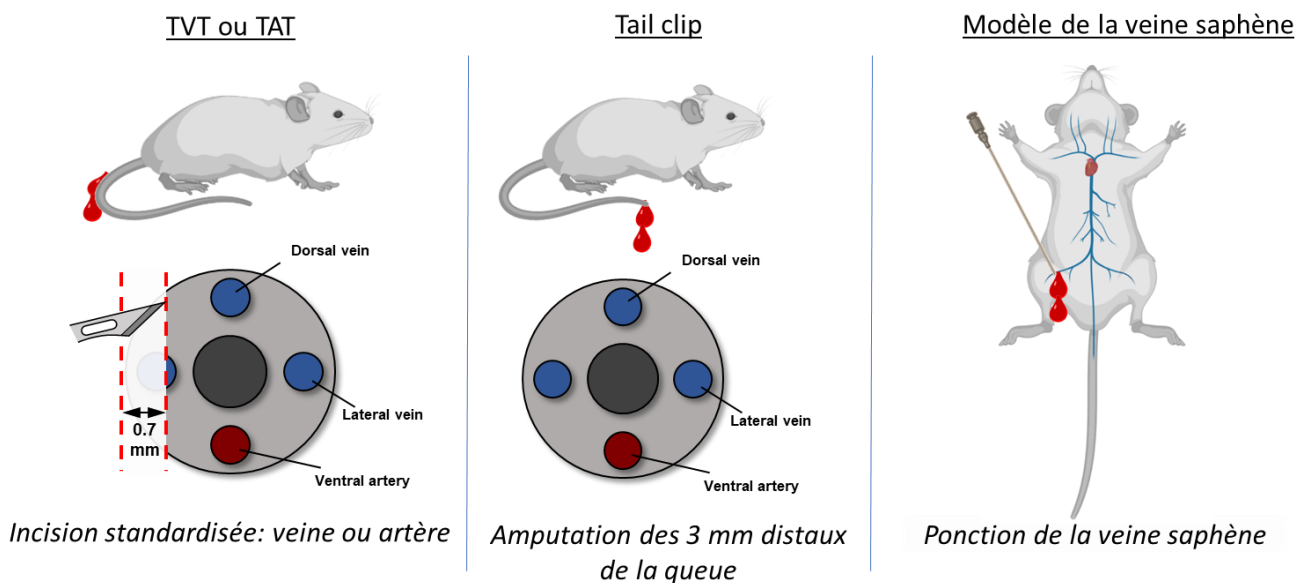


Figure 18 : Principaux modèles de saignements murins utilisés pour la recherche en hémostase

- 3) Adaptation du modèle murin pour l'étude des anticorps bispécifiques mimant l'action du FVIII. Contrairement au FVIII humain qui peut être injecté à la souris et remplacer le FVIII murin, les anticorps bispécifiques mimant l'action du FVIII ne sont pas actifs chez la souris. En effet, que cela soit l'emicizumab ou le MIM8, ces anticorps sont spécifiques des FIX et FX humains et ne cross réagissent pas avec les FIX et FX murins.^{137,159,202} Afin de permettre l'étude de ces molécules, un modèle murin a été mis en place permettant d'étudier l'efficacité et les mécanismes d'actions de ces anticorps bispécifiques in vivo. L'injection de FIX et FX humains, combinée à l'injection des anticorps, permet de les rendre actifs chez la souris déficiente en FVIII (FVIII -/-) et ainsi de corriger leur phénotype hémorragique.¹⁹⁸ Ce modèle a également été utilisé pour tester l'emicizumab en combinaison avec le FVIII ou avec l'acide tranexamique in vivo.²⁰³ Plus récemment, l'efficacité in vivo du MIM8 chez la souris FVIII -/- a pu être étudiée grâce à ce modèle.¹⁵⁹

L'émergence de nouvelles stratégies thérapeutiques pour l'hémophilie A nécessite des modèles de plus en plus complexes pour analyser l'ensemble des mécanismes moléculaires mis en jeu.

Pour conclure cette partie, les modèles animaux sont aujourd'hui indispensables à la recherche en hémostasie mais la prise en compte du bien-être animal, la réduction du nombre d'animaux utilisés et la recherche d'alternatives à ces modèles doivent être au cœur des stratégies que nous développons au laboratoire.

III) La microscopie : un outil au service de la recherche en hémostasie

L'hémostasie est un processus complexe impliquant de nombreux acteurs protéiques et cellulaires conduisant à la formation d'un caillot occlusif dense colmatant la brèche vasculaire. La cinétique d'apparition des acteurs, leurs localisations et les caractéristiques des structures qui constituent le caillot, sont des éléments qui nécessitent d'être analysés pour permettre une meilleure compréhension des processus hémostatiques et des régulations qui sont mis en jeu. L'analyse de cet ensemble de paramètres est rendue possible par la généralisation et l'évolution de la résolution des différentes techniques de microscopie disponibles : La microscopie optique et électronique. Nous décrivons le principe général de ces techniques et leur application dans le cadre de la recherche en hémostasie.

Apports de la microscopie dans l'analyse du caillot de fibrine

La fibrine est un constituant fondamental du caillot hémostatique. Comme nous l'avons écrit précédemment, la fibrine s'organise en réseau afin de stabiliser le caillot qui colmate la brèche vasculaire. La capacité de ce réseau protéique à remplir son rôle peut être analysée en mesurant différents paramètres physiques : le diamètre des fibres, le nombre de pores formés par le réseau et leurs tailles, le nombre d'intersections des fibres entre elles.²⁰⁴ Si la mesure de ces paramètres fait l'unanimité, les approches dans la préparation des échantillons et la technique de microscopie utilisée ne font pour l'instant pas l'objet de consensus, même si plusieurs études ont essayé de standardiser les techniques.²⁰⁵ Nous décrivons ici les deux principales techniques utilisées.

a) Microscopie électronique à balayage

1) Principes de la microscopie électronique à balayage

La microscopie à balayage (MEB) est une technique de microscopie de haute résolution (1-30 nm)^{206,207} permettant d'observer la morphologie de surface, la topographie mais également la composition d'un échantillon afin d'obtenir des informations qualitatives et quantitatives à propos du ou des phénomènes observés : Texture, forme, taille, arrangement des objets d'intérêts entre eux et dans l'espace.²⁰⁸

Le principe de la MEB consiste en différentes étapes :

- L'émission d'électrons primaires de haute énergie (1 à 50 keV) générés par le canon à électrons du système, dirigés sur la surface de l'échantillon.²⁰⁹
- En réponse, les atomes en surface de l'échantillon vont libérer des électrons secondaires qui seront captés par un détecteur et analysés afin d'obtenir une topographie de la surface de l'échantillon.

Afin d'éviter l'interaction des électrons primaires avec les électrons des molécules de l'air, la MEB est réalisée dans une chambre à vide.²¹⁰

- Les électrons secondaires sont accompagnés de rayonnements de rétrodiffusion qui permettent d'analyser la composition de l'échantillon.²⁰²
- Certains électrons primaires peuvent également provoquer l'émission de rayons X à partir des atomes de l'échantillon. Ces rayons X sont caractéristiques des éléments présents dans l'échantillon.²¹¹
- Des détecteurs spécifiques sont disposés autour de l'échantillon pour capturer les électrons secondaires, le rayonnement de rétrodiffusion et les rayons X émis. Ces détecteurs convertissent ces signaux en images ou en spectres qui peuvent être analysés pour obtenir des informations détaillées sur la surface et la composition de l'échantillon.²¹²

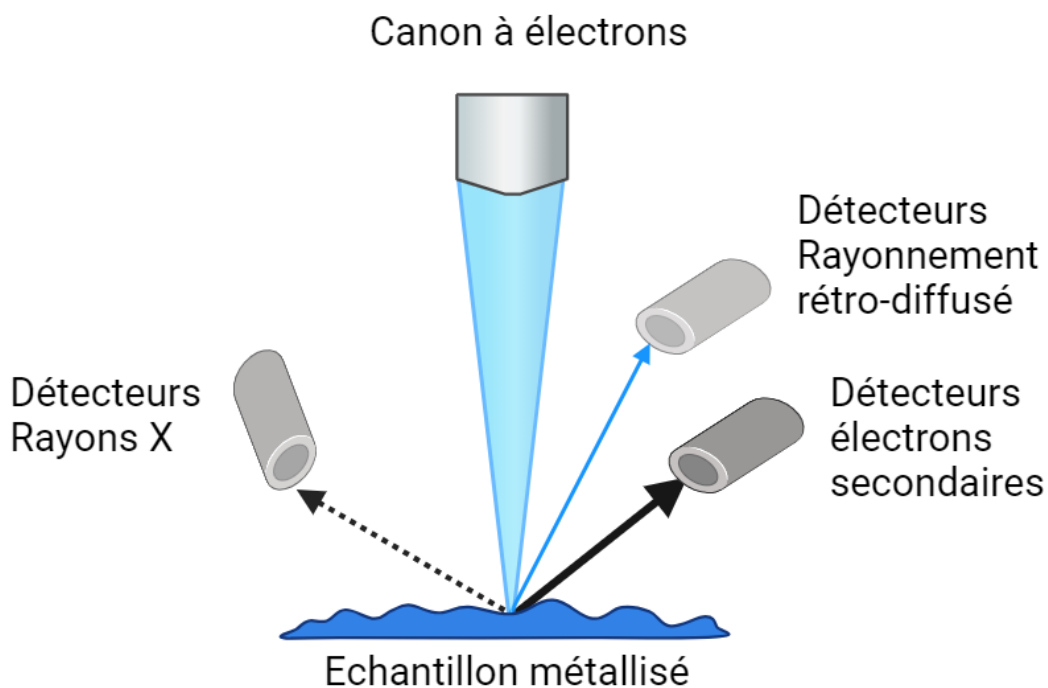


Figure 19 : Principe du microscope électronique à balayage

2) Préparation des échantillons en MEB

Afin de maximiser la résolution de l'image, plusieurs paramètres doivent être pris en compte. En effet, afin de maximiser l'émission des électrons secondaires, la surface doit être suffisamment chargée en électrons. Pour cela, il est nécessaire de réaliser une métallisation avec des matériaux hautement conducteurs : or, argent, platine ou palladium.²¹³ De plus, l'observation d'échantillons biologiques ou riches en eau nécessite une déshydratation importante afin d'éviter des dommages irréversibles de l'échantillon et du système. Différentes techniques de déshydratation existent, avec chacune leurs limites :

- **Déshydratation physique** : Après avoir été immergés dans des bains d'alcool ou d'acétone, les échantillons sont positionnés dans la cuve d'un appareil utilisant la méthode du point critique. Une fois refroidi, le solvant est substitué par du dioxyde de carbone liquide. Ensuite, la cuve est soumise à des conditions de température et de pression supérieures au point critique du dioxyde de carbone (31,1°C et 72,9 atm)²¹⁴, où la densité de la phase liquide équivaut à celle de la phase gazeuse. Cette

approche permet d'éliminer les tensions de surface entre les deux phases, réduisant ainsi le risque de déformation des structures des échantillons.²¹⁵

- Déshydratation chimique : Après plusieurs bains dans des concentrations croissantes d'éthanol, les échantillons sont plongés dans des concentrations croissantes de hexaméthylsilazane un solvant hydrophobe très volatil qui va venir remplacer l'eau avant de s'évaporer.^{216,217}

Ces deux techniques sont largement décrites dans la littérature, mais chacune d'elle impacte l'organisation moléculaire de l'échantillon et génère des artefacts, cela doit être pris en compte dans l'analyse réalisée par MEB.²¹⁸

Plus récemment, un nouveau moyen de préparer les échantillons sans procéder à la déshydratation de celui-ci a été décrit. Cela consiste en l'utilisation d'une « nano-combinaison » constituée de sucres et d'électrolytes dilués dans du glycérol. Celle-ci permet de ne pas déshydrater l'échantillon et de le protéger d'une déshydratation induite par les électrons. Cette technique permettrait d'éviter la génération d'artefacts liés à la préparation de l'échantillon.²¹⁹

b) Microscopie à fluorescence

1) Principes des différents types de microscopie à fluorescence

La microscopie à fluorescence est une technique de microscopie optique permettant l'observation de structures (cellules, protéines, etc.) préalablement marquées grâce à des anticorps couplés à un fluorochrome : on parle d'immunofluorescence. Un anticorps primaire non couplé dirigé contre la cible d'intérêt est utilisé dans un premier temps pour localiser la cible.²²⁰ Cet anticorps primaire est révélé par l'utilisation d'un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome émettant à une longueur d'onde qui lui est propre. La reconnaissance de l'anticorps primaire par l'anticorps secondaire est permise par la spécificité pour l'isotype et l'espèce dans laquelle ont été produits les anticorps.²²⁰ L'anticorps secondaire est le plus souvent polyclonal afin de permettre plusieurs fixations d'anticorps secondaires sur le primaire : On parle d'amplification du signal fluorescent qui contribue largement à améliorer la qualité de l'acquisition.²²¹ Ce système rend possible le marquage de plusieurs cibles de façon simultanée via des fluorophores émettant à des longueurs d'ondes différentes.²²² La fluorescence émise est ensuite observée par microscopie à fluorescence. Il existe différents systèmes avec des résolutions qui leur sont propres et dépendantes de la technologie utilisée. La résolution définit la distance minimale entre deux objets distincts à partir de laquelle le système peut identifier et imager deux événements. Pour des distances entre deux objets, supérieures à la résolution du système, nous pourrions identifier deux événements. Pour des distances inférieures, nous observerons à tort un seul événement.^{216, 217}

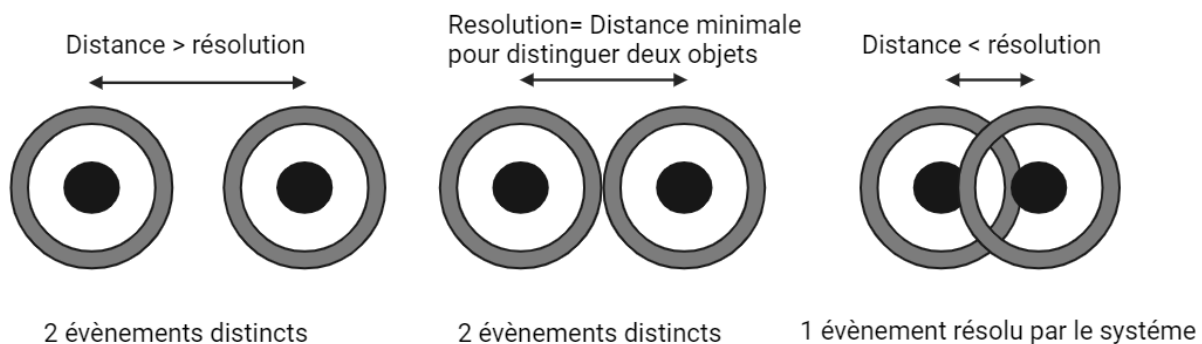


Figure 20 : Définition de la limite de résolution en microscopie optique

La prise en considération de la résolution est importante dans le contexte de ce que nous souhaitons imager et dans le choix du système le plus adapté. Nous les présenterons ici du moins résolutif au plus résolutif.

Microscopie à fluorescence ou widefield : Il s'agit d'une technique d'imagerie développée pour observer des échantillons très fins. Lors de l'observation de l'échantillon, celui-ci est excité en totalité sans tenir compte de son épaisseur.²²⁵ Il en résulte que le signal émis par le plan focal est bruité par le signal des plans focaux adjacents engendrant une perte de qualité. L'observation d'échantillons d'épaisseurs importantes n'est pas optimale dans ce type de système. La résolution latérale de ces systèmes est variable mais est de l'ordre de 250- 400 nm.²²⁴

Microscopie confocale : Cette technique de microscopie a été développée afin d'augmenter la résolution de l'imagerie optique mais également permettre l'observation d'échantillons plus épais.²²⁶ En effet, elle limite la détection au seul signal du plan focal sélectionné : on parle de sectionnement optique. Le laser du système passe à travers un pinhole (trou optique) et un miroir dichroïque (miroir séparant les signaux d'excitation et d'émissions) afin de traverser l'objectif et cibler un plan focal. Il en résulte l'émission d'un signal passant à travers le miroir dichroïque, puis un second pinhole afin d'être focalisé sur un détecteur.²²⁶ La microscopie confocale a permis l'apparition des reconstructions 3D des structures étudiées en imageant un grand nombre de plans focaux successifs.²²⁷ La principale limite est due au fait que seule une faible proportion des photons émis est analysée, ceux qui sont émis par le plan focal. L'augmentation de la puissance laser n'est pas une solution adéquate au problème car elle conduit à un photo blanchiment de l'échantillon et donc à une perte de signal irréversible ou à l'altération de celui-ci.²²⁸ La focalisation de la lumière sur l'échantillon augmente la résolution latérale à 200-300 nm. Il possède également une résolution axiale du fait de sa capacité à imager en profondeur, de l'ordre de 160-180nm.²²⁹

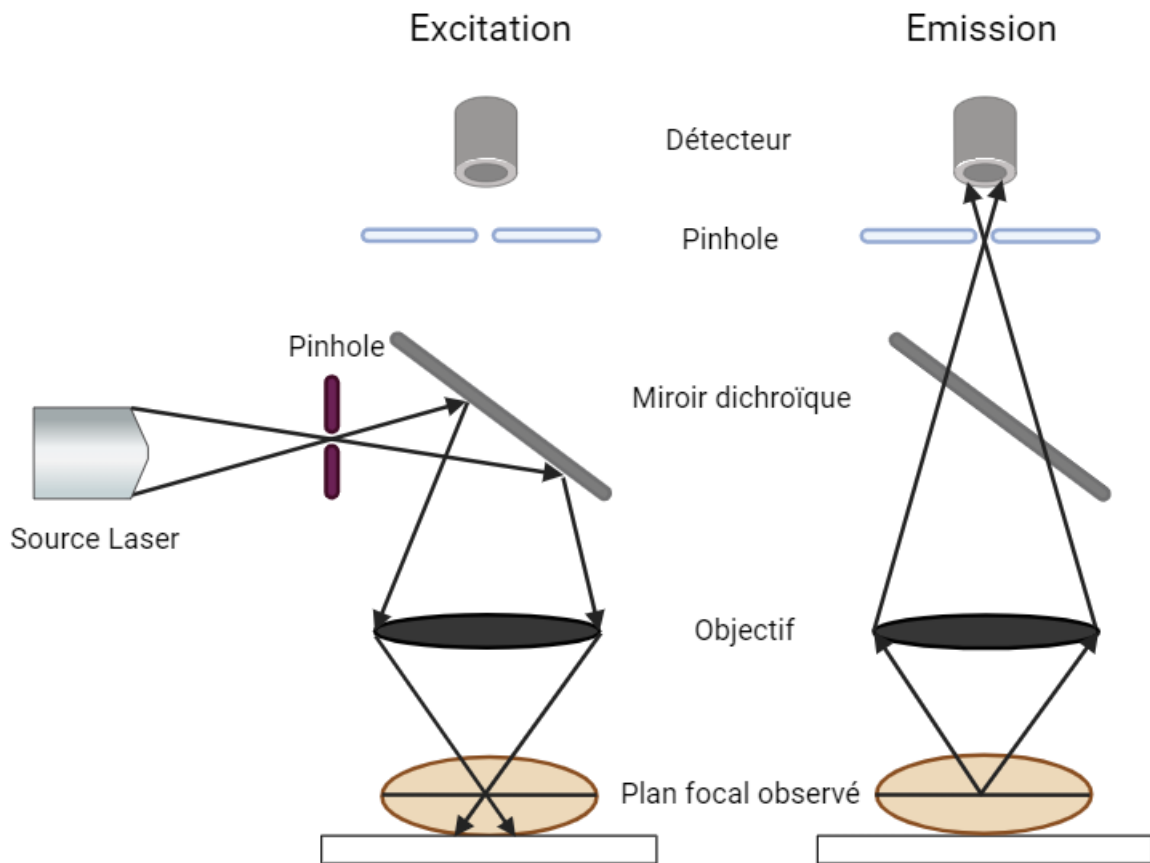


Figure 21 : Principe de la microscopie confocale

Microscopie à super résolution : Il s'agit d'un ensemble de systèmes qui ont permis de dépasser la limite de résolution imposée par la diffraction de la lumière et donc d'améliorer significativement celle-ci: de l'ordre de 40 nm. - Le STED (Stimulation émission déplétion) permet la déplétion sélective des fluorophores en périphérie de la zone focalisée sur l'échantillon par un laser de déplétion. Cela réduit grandement le champ mais permet de balayer l'échantillon et obtenir une image super-résolue sans la contribution des fluorophores au voisinage.²³⁰

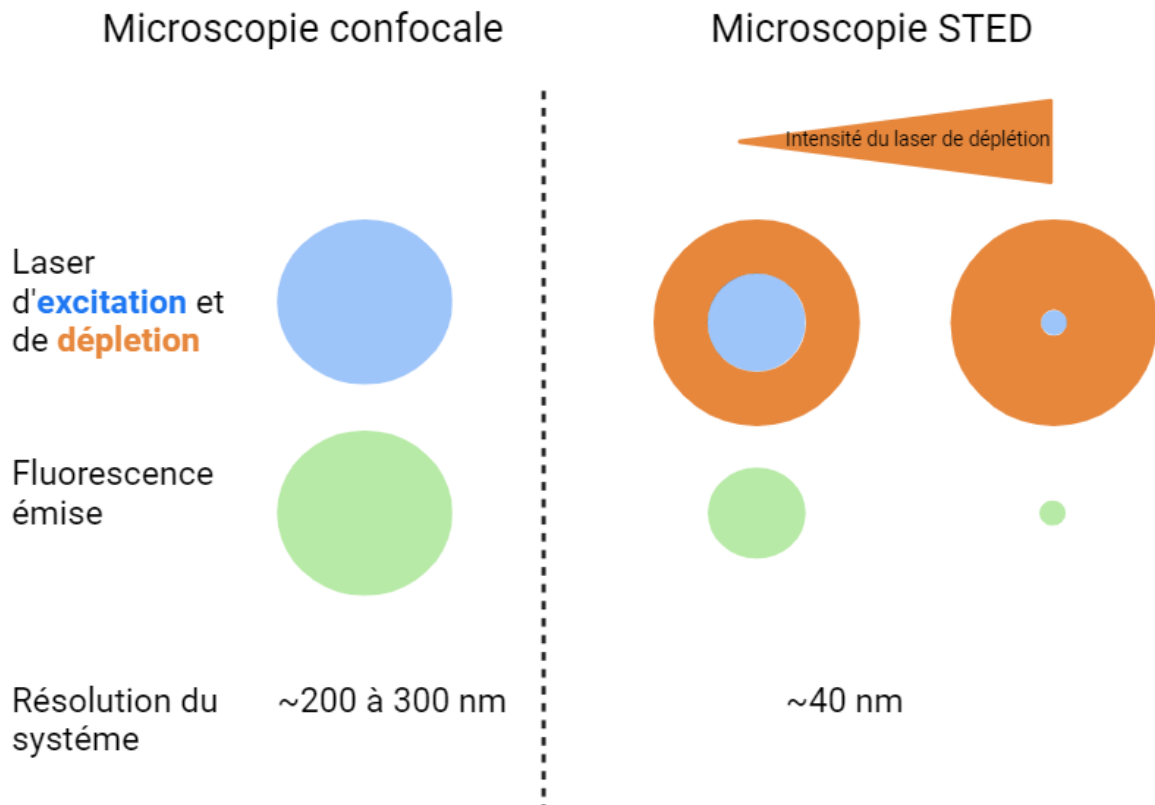


Figure 22 : Principe de la microscopie à super résolution STED

- Le PALM/STORM (PhotoActivated Localization Microscopy / Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) sont basés sur le même principe d'activation d'un faible nombre de sondes fluorescentes (qui s'activent et se désactivent séquentiellement sous stimulation laser) à la fois sur plusieurs mesures. La combinaison des différentes acquisitions permet une localisation précise des sondes sur l'échantillon et l'amélioration de la résolution.²³¹

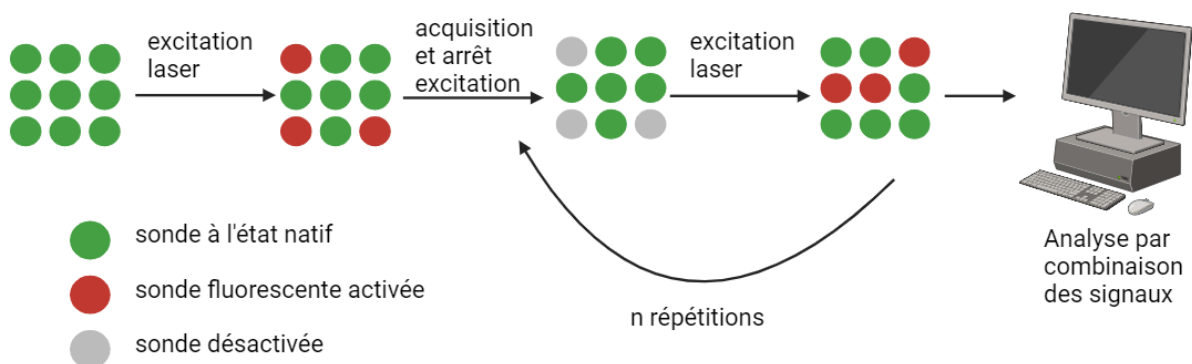


Figure 23 : Principe de la microscopie à super résolution PALM/STORM

2) Préparation des échantillons

Pour la microscopie à fluorescence, la fixation des échantillons est nécessaire selon le type d'échantillons utilisés. L'inclusion est nécessaire afin de réaliser par la suite des sections très fines de l'échantillon. Deux stratégies d'inclusion sont disponibles :

-L'inclusion en paraffine : La paraffine est un composé possédant une basse température de fusion et se solidifiant à température ambiante. Ce composé étant hydrophobe, il est nécessaire de procéder à une déshydratation de l'échantillon au préalable grâce à des bains de concentrations croissantes en éthanol et toluène.²³² Après section en coupes de 3 à 7 μm , une étape de démasquage des épitopes est nécessaire.²³³

-La Cryo-inclusion se fait en température négative dans une cryo-matrice sous forme de gel à température ambiante, et solide à température négative. Les sections sont réalisées dans un cryostat.²³⁴ Aucune étape de démasquage des épitopes n'est nécessaire.

Les coupes sont ensuite disponibles pour les étapes d'immunomarquage si l'échantillon ne possède pas déjà une fluorescence endogène (GFP, protéines couplées à un fluorophore, etc.)

c) Application des techniques de microscopie à l'analyse de la fibrine dans l'hémophilie A

L'étude du réseau de fibrine est un point important de la recherche en hémostase et le développement de techniques de microscopie performantes a permis son analyse et la découverte de liens entre des structures spécifiques de la fibrine et certaines maladies. En effet, l'altération des propriétés structurelles du réseau de fibrine a pu être mise en lien direct avec des maladies cardiovasculaires telles que les infections myocardiques²³⁵, les accidents vasculaires cérébraux ischémiques²³⁶ et le thrombo-embolisme veineux²³⁷. Des maladies ayant des complications vasculaires ou cardiovasculaires secondaires ont également été mises en lien avec des structures de la fibrine altérée : le diabète²³⁸ et le Covid-19.²³⁹ D'autre part, certaines maladies engendrent des concentrations en fibrinogène plasmatique élevées et l'impact de ce paramètre sur la structure de la fibrine a été évalué. En effet, certaines études montrent qu'une élévation de la concentration en fibrinogène génère un diamètre des fibres de fibrine augmenté²⁴⁰⁻²⁴² alors qu'une autre étude montre le contraire.²⁴³

L'ensemble de ces données rend l'étude de la fibrine nécessaire pour la bonne compréhension des mécanismes hémostatiques, et dans le cas de l'hémophilie A permet d'obtenir des informations importantes en absence du FVIII mais également en présence des thérapies actuellement utilisées chez les patients hémophiles A. Ces analyses nous permettent de comprendre les régulations mises en jeu et les régulations dans lesquelles le FVIII est impliqué.

1) Impact de la concentration plasmatique en FVIII sur la structure du réseau de fibrine

Plusieurs études ont analysé le réseau de fibrine généré *in vitro* à partir de plasma présentant une déficience en FVIII par rapport à un plasma normal par microscopie confocale ou MEB. Chacune d'entre elles ont décrit un réseau de fibrine lâche avec des pores très larges formés par le maillage. Une plus faible densité de fibres par unité de surface est également observée.²⁴⁴ Les fibres semblent être plus courtes et la mesure du diamètre moyen des fibres de fibrine montre une augmentation importante de celui-ci : 200-250 nm²⁴⁵ contre 120 à 160 nm^{245,246} pour un plasma normal. Il a également été montré que la normalisation de ces paramètres dans un plasma déficient en FVIII pouvait être obtenue en rajoutant du FVIII. En effet, l'addition de doses croissantes de FVIII permet

de générer des caillots de fibrine plus denses et compacts, avec des pores de taille réduite induits par une densité de fibre plus élevée et de diamètre diminué pour tendre à la normale.^{244,246}

Il est important de noter que l'observation d'une relative variabilité dans les paramètres mesurés parmi les plasmas étudiés a permis de montrer que la structure du réseau de fibrine est sensible à différents paramètres tels que la quantité de thrombine générée mais également la quantité de fibrinogène plasmatique disponible.²⁰⁵ Le FXIIIa est également fondamental dans la structuration de la fibrine et son action est conditionnée par la quantité de thrombine générée.²⁴⁷ La génération de thrombine altérée dans l'hémophilie A est restaurée de façon dose dépendante par ajout de FVIII. Dans le même temps, le diamètre des fibres de fibrine est progressivement réduit.^{205,248} Cela a différentes conséquences sur les propriétés du réseau de fibrine. En effet, il semble que le diamètre de la fibrine soit un élément crucial dans la résistance de celle-ci aux contraintes physiques du flux sanguin via les paramètres d'élasticité²⁴⁹ : le réseau de fibrine, constitué de fines fibres organisées entre elles présente une élasticité importante et une résistance importante.²⁴⁹ De plus, il semble que le diamètre des fibres de fibrine influence également la vitesse de la fibrinolyse du caillot de fibrine par la plasmine.^{250 251} Ensemble, ces paramètres vont déterminer la stabilité du caillot²⁵² qui est altérée dans l'hémophilie A et semble être restaurée par l'ajout de FVIII.

2) Effet des thérapies de l'hémophilie A sur le réseau de fibrine

Agents by passant

- L'analyse de la fibrine in vitro dans un plasma déficient en FVIII supplémenté en aPCC a permis de montrer qu'il n'y a pas de différence de structure ou de diamètre comparativement au plasma supplémenté en FVIII.²⁵³
- L'ajout de FVIIa à un plasma déficient en FVIII génère un réseau de fibrine très dense et plus épais qu'en présence de FVIII.²⁵⁴

Thérapies non-substitutive

Les observations microscopiques de la fibrine en présence et en absence FVIII soulèvent la question de l'impact des thérapies non-substitutive sur ces paramètres. C'est un point qui reste encore à évaluer pour beaucoup de ces nouvelles thérapies qui, à l'exception de l'emicizumab, ne sont pas encore largement disponibles. C'est donc uniquement l'emicizumab qui a pour l'instant été étudié pour son action sur le réseau de fibrine.

Ainsi, l'analyse de la structure par MEB de la fibrine en présence d'emicizumab a été rapportée par trois études avec trois résultats différents. La première étude a montré que in vitro, un plasma déficient en FVIII supplémenté en FVIII ou en emicizumab génère un réseau de fibre de fibrine similaire, avec de fines fibres présentant un diamètre moyen d'à peu près 120 nm.²⁵⁵ Une seconde étude a montré que les fibres de fibrine générées étaient plus épaisses en présence d'emicizumab (150-270nm).²⁵³ Enfin, la dernière étude a conclu à un diamètre des fibres de fibrine plus fin en présence d'emicizumab qu'en présence de FVIII.²⁰³

Cette hétérogénéité de résultats peut être liée aux différents protocoles utilisés dans les étapes de préparation des échantillons de caillot de fibrine dans les trois études. Une standardisation de l'analyse des caillots de fibrine générés in vitro est nécessaire afin d'obtenir des données qui seront comparables et cohérentes entre elles.

Comparaison du diamètre de la fibrine : FVIII vs Emicizumab	Techniques de fixations et déshydratation utilisées	Référence
FVIII = Emicizumab	Fixation 2% glutaraldéhyde + 1 % osmium Déshydratation éthanol + alcool butylique + congélation	Shimonishi et al, Haemophilia 2020
FVIII < Emicizumab	Fixation 2,5% glutaraldéhyde Déshydratation éthanol + Acétone + CPD	Zong et al, TH open 2019
FVIII > Emicizumab	Fixation 1 % osmium Déshydratation éthanol sous vide	Janbain et al, Haemophilia 2021

Tableau 6 : Comparaison des différentes études concernant l'effet de l'emicizumab sur le réseau de fibrine

Il est important de noter que la littérature ne décrit que des études réalisées in vitro à partir de plasma mais les composants cellulaires sanguins jouent un rôle important dans l'architecture du caillot de fibrine et leur rôle n'est pas pris en compte dans les modèles in vitro.²⁵⁶⁻²⁵⁸ Les cellules endothéliales ont également un rôle majeur et cela a été décrit récemment sur la génération de thrombine avec le FVIII ou l'emicizumab²⁵⁹ et pourrait donc affecter la structure du réseau de fibrine. L'utilisation de modèles in vivo semble donc nécessaire pour une meilleure observation des mécanismes hémostatiques liée à la fibrine.

OBJECTIFS DE LA THESE

Depuis sa mise sur le marché, l'emicizumab a révolutionné le traitement de l'hémophilie A. Malgré le nombre important d'études cliniques qui ont largement prouvé son efficacité clinique, les études précliniques portant sur son mode d'action sont peu nombreuses et en grande partie restreintes aux études in vitro. Par conséquent ses fonctions et ses interactions au niveau moléculaire sont encore assez mal décrites. Dans ce contexte, durant ma thèse, mes recherches se sont déclinées en trois projets principaux centrés autour d'une même problématique : comment la thérapie non-substitutive emicizumab se compare-t-elle au FVIII au niveau de ses propriétés moléculaires et fonctionnelles ?

Dans un premier temps, nous avons analysé un cas unique, à ce jour, de patient avec un anticorps anti-emicizumab non-neutralisant. En effet grâce à une collaboration avec l'hôpital Necker à Paris, nous avons participé à l'étude d'un patient sous prophylaxie par emicizumab ayant présenté une hémarthrose. L'objectif de l'étude était donc de déterminer les mécanismes moléculaires à l'origine de la perte d'efficacité de l'emicizumab. L'analyse de l'activité « FVIII-like » nous a permis de montrer que cet anticorps n'inhibait pas l'activité de l'emicizumab. L'utilisation d'un modèle de souris immunodéficiente était nécessaire pour montrer que l'anticorps présent dans le sérum du patient présentait un mécanisme d'action jamais reporté jusqu'à présent en induisant une clairance accrue de l'emicizumab sans inhiber directement son activité.

Ensuite, nous avons comparé l'effet du FVIII/FVIII-Fc versus emicizumab sur la structure et la stabilité du réseau de fibrine. En effet l'emicizumab mime l'action du FVIII mais leurs modes d'actions sont différents. Malgré son efficacité clinique, des saignements ont été reportés chez des patients sous prophylaxie avec emicizumab, ce qui nous a amené à nous intéresser à la cinétique de formation du caillot in vitro et à sa stabilité in vivo. L'objectif était d'expliquer les différences observées, nous nous sommes donc intéressés à la structure du caillot de fibrine in vivo dans un modèle de souris déficiente en FVIII traité par FVIII/FVIII-Fc ou par emicizumab en mettant en œuvre des techniques de microscopie de haute résolution.

Enfin, nous avons essayé de déterminer une équivalence entre l'activité du FVIII et celle des thérapies non-substitutive comme l'anticorps bispécifique emicizumab et un analogue de séquence de l'anticorps anti-TFPI, marstacimab. En effet les différents tests d'activités in vitro (TCA, génération de thrombine, test chromogénique) permettent de déterminer des équivalences avec le FVIII variables selon le test utilisé. Afin de déterminer si l'utilisation des modèles de saignement murins permettent de déterminer une équivalence FVIII plus précise, nous avons essayé de mesurer celle-ci en appliquant différents modèles de saignement de sévérité croissante chez la souris déficiente en FVIII traité par les différentes thérapies.

PUBLICATIONS ET RESULTATS EXPERIMENTAUX

Article I

Anticorps non inhibiteurs induisant une clairance accrue d'emicizumab chez un patient atteint d'hémophilie A sévère avec inhibiteur

Thibaud Sefiane*, Annie Harroche*, Maximilien Desvages, Delphine Borgel, Dominique Lasne, Caterina Casari, Ivan Peyron, Laurent Frenzel, Stéphanie Chhun, Peter J. Lenting et Cécile Bally

**Co-premier auteur*

Publié le 20 mai 2021 dans Haematologica

Contexte et objectifs :

L'hémophilie A est liée à un déficit en FVIII de la coagulation. Pendant de nombreuses années, le traitement standard consistait en un remplacement du FVIII manquant par un FVIII exogène recombinant ou plasmatisé purifié. Le but était de maintenir un taux de FVIII suffisant pour protéger les patients contre les saignements et les complications liées aux saignements articulaires ou cérébraux. La principale limitation de ces thérapies de remplacement est le développement par 30% des patients hémophiles A sévères d'anticorps inhibiteurs de l'action du FVIII.

Récemment, emicizumab, un anticorps bispécifique anti-FIX et anti-FX, mimant le rôle de cofacteur du FVIII dans la conversion du FX en FXa par le FIXa, a été développé et mis sur le marché. Il est désormais utilisé pour le traitement de l'hémophilie A sévère avec ou sans inhibiteur. Cependant, quelques cas de patients ayant développé des anticorps anti-emicizumab, inhibiteurs de son activité, ont été décrits.

Au cours de ma thèse, j'ai participé à l'étude d'un patient pris en charge à l'hôpital Necker pour une hémophilie A sévère avec inhibiteurs, traité en prophylaxie par emicizumab. Après six mois de traitement, le patient a présenté une hémarthrose au niveau de l'articulation de la cheville. Après analyse, un TCA prolongé et une concentration plasmatique en emicizumab inférieure à 1 µg/ml ont été observés alors que la concentration attendue est d'environ 55 µg/ml. Des anticorps anti-emicizumab ont été mis en évidence et de façon surprenante, nous avons montré qu'ils n'étaient pas inhibiteurs de son activité.

Afin de déterminer les mécanismes par lesquels l'anticorps anti-emicizumab de ce patient agissait, nous avons tout d'abord étudié l'effet de l'anticorps sur la fixation de l'emicizumab sur les FIX et FX, mais également la clairance de l'emicizumab en présence de l'anticorps.

En utilisant un modèle de souris immunodéficientes, nous avons pu ainsi décrire, chez ce patient, le premier cas d'anticorps anti-emicizumab induisant une clairance accélérée d'emicizumab et n'inhibant pas directement son activité, comme c'était le cas dans les quatre cas d'inhibiteurs décrits précédemment.

Non-inhibitory antibodies inducing increased emicizumab clearance in a severe hemophilia A inhibitor patient

Hemophilia A is a bleeding disorder that results from coagulation factor VIII (FVIII) deficiency, which can be treated via substitution therapy using FVIII concentrates. However, the generation of neutralizing antibodies renders treatment ineffective in up to 30% of the severe patients.^{1,2} Emicizumab is a humanized bispecific antibody that binds simultaneously to activated factor IX (FIXa) and factor X (FX), thereby mimicking the cofactor function of activated factor VIII (FVIIIa), even in the presence of FVIII inhibitors.^{3,4} Once-weekly subcutaneous administration of emicizumab markedly decreased the bleeding rate in patients who had hemophilia A with or without FVIII inhibitors.⁵⁻⁸ However, anti-drug antibodies with neutralizing potential can develop in a small number of patients and have been associated with decreased emicizumab plasma concentrations and loss of efficacy.^{9,10} Although the development of neutralizing anti-emicizumab antibodies is rare and routinely biological monitoring is not recommended in patients treated with emicizumab, it is still important to detect the presence of such antibodies in case of bleeding events. In this study, we describe the development of non-inhibitory anti-emicizumab antibodies that selectively provoke increased emicizumab clearance in a severe hemophilia A patient with inhibitors.

A 2-year-old boy with severe hemophilia A developed an anti-FVIII inhibitor (1 BU/mL) at 19 exposure days. The patient failed to respond to immune tolerance induction and venous access became extremely complicated.

Treatment with emicizumab was therefore initiated with four loading doses (3 mg/kg/week) followed by weekly treatment (1.5 mg/kg/week). Clinical outcomes were excellent with no bleeding episodes or bruising. Blood samples were taken as part of routine care, with excess being stored for research (The Hôpital Necker's hemophilia bio-library/Necker Biobank, registration number: DC-2009-955; procedure is in accordance with the Helsinki declaration and participants gave written informed consent). Analysis revealed emicizumab concentrations in the expected range (66 µg/mL 52 days after emicizumab initiation),⁵ and a dramatic decrease in activated partial thromboplastin time (APTT) ratio (0.74, normal range <1.2) was measured (Figure 1).

A spontaneous hemarthrosis of the ankle occurred 6 months after emicizumab initiation, which was confirmed via clinical examination and ultrasound evaluation. Simultaneously, the APTT-ratio rose to 2.67, and circulating emicizumab concentrations were below 1 µg/mL (Figure 1). Hence, the development of anti-emicizumab antibodies was suspected, and the presence of emicizumab-specific immunoglobulin G (IgG) in the patient's serum was analyzed in immunosorbent assays, using normal serum and IgG-depleted patient serum as controls. Binding of IgG to immobilized emicizumab (5 µg/mL) was determined using isotype-specific peroxidase-labeled monoclonal antibodies. Whereas no specific IgG2 or IgG3 anti-emicizumab antibodies were detected, the patient's serum was indeed enriched in anti-emicizumab antibodies of the IgG1 subtype (Figure 2A and B). We could not test for IgG4 antibodies, since emicizumab is of this subtype.³

Treatment of the hemarthrosis included rFVIIa and oral

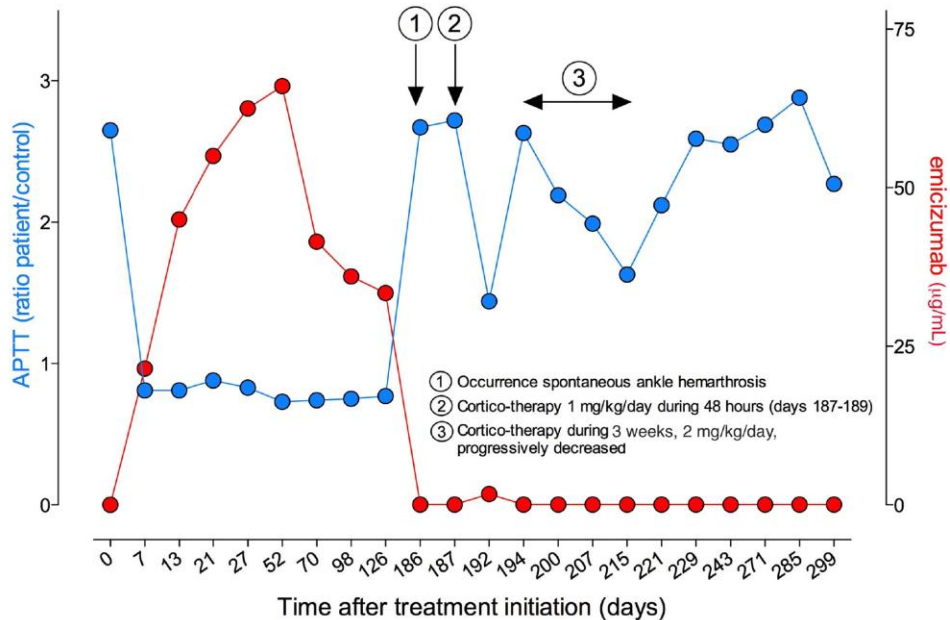


Figure 1. Evolution of APTT and emicizumab plasma concentration over time. At indicated time points, blood samples were taken from the patient. Plasma was then analyzed for APTT (left Y-axis, blue circles) and emicizumab concentration (right Y-axis; red circles). Arrow 1 indicates bleeding event; arrows 2-3 indicate periods of cortico-therapy (2: 1 mg/kg/day for 48 hours during day 187-189; 3: 2 mg/kg/day during 3 weeks during days 194-214, with progressive decrease in dosing). APTT: activated partial thromboplastin time.

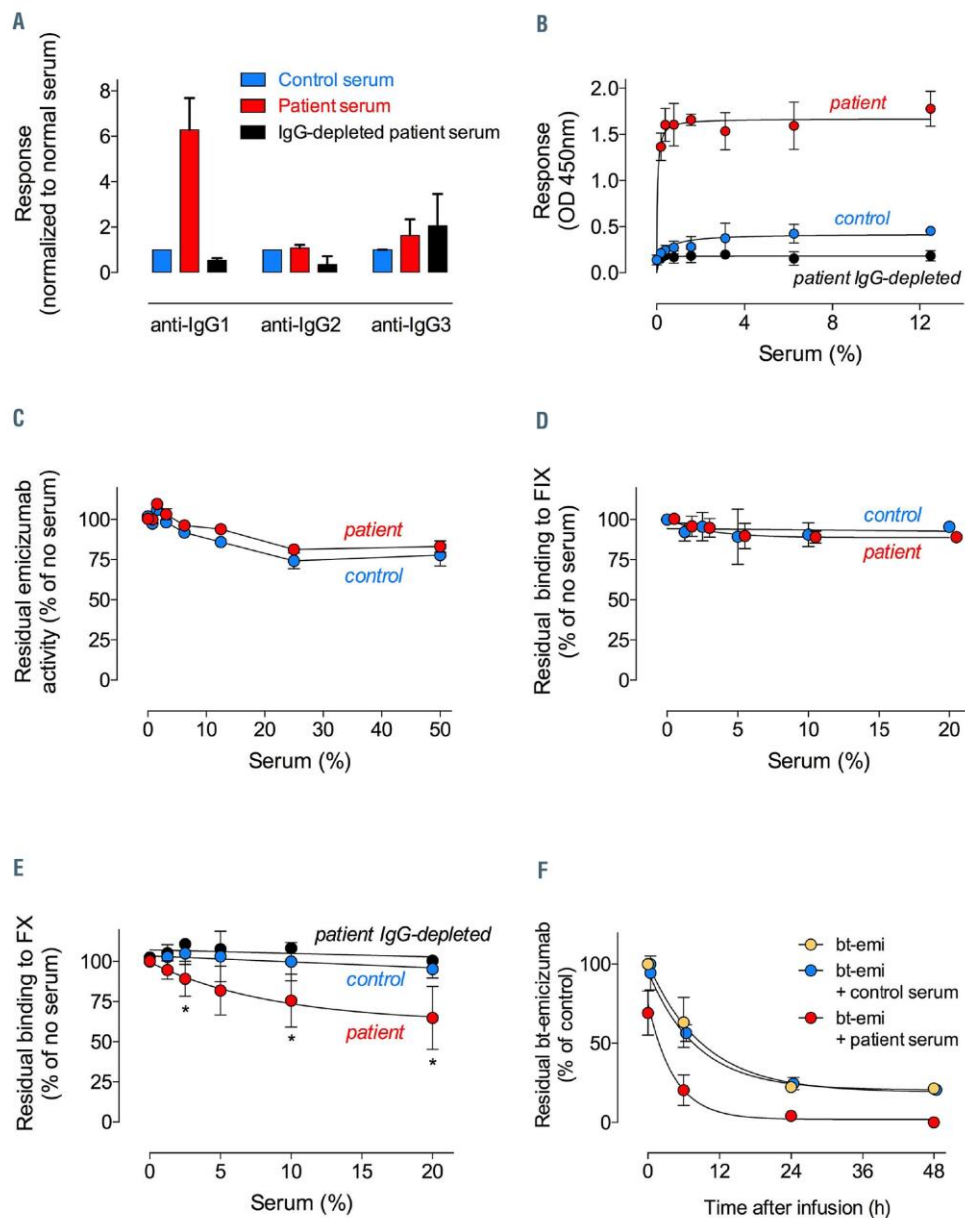


Figure 2. Characterization of anti-emicizumab antibodies. (A and B) Emicizumab was immobilized (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and incubated with control serum (blue), patient serum (red) or immunoglobulin G (IgG)-depleted patient serum (black). Bound anti-emicizumab antibodies were probed using peroxidase-labeled IgG-subtype specific antibodies, and detected via 3,3',5,5'-tetramethyl benzidine (TMB) hydrolysis. For panel A, samples were diluted 256-fold, and response was normalized to that of normal plasma, which was arbitrarily set at 1. For panel B, the dose-response for binding of IgG1 antibodies to emicizumab is shown. (C) Emicizumab (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was incubated in the absence or presence of various dilutions of control serum (blue circles) or patient serum (red circles). Presented is the percentage residual emicizumab activity relative to the absence of serum as measured in a chromogenic factor VIII (FVIII)-activity assay using human FIXa and factor X (FX). (D) Binding of bt-emicizumab (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) to immobilized factor IX (FIX) (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was performed in the absence or presence of various dilutions of control serum (blue circles) or patient serum (red circles). Bound bt-emicizumab was probed with peroxidase-labeled streptavidin and detected via TMB hydrolysis. Shown is the percentage residual FIX binding relative to the absence of serum. (E) Binding of bt-emicizumab (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) to immobilized FX (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was performed in the absence or presence of various dilutions of control serum (blue circles) or patient serum (red circles). Bound bt-emicizumab was probed with peroxidase-labeled streptavidin and detected via TMB hydrolysis. Shown is the percentage residual FX binding relative to the absence of serum. Statistical assessment was performed using multiple t-test analysis between control and patient serum. Stars indicate $P < 0.05$ as analyzed in a multiple t-test comparing control serum and patient serum. (F) Immuno-deficient mice received bt-emicizumab (0.25 mg/kg) alone (orange circles) or in the presence of control serum (100 μL ; blue circles) or patient serum (100 μL ; red circles) via intravenous injection in the retro-orbital plexus. At indicated time points, samples were taken and plasma was analyzed for the presence of residual bt-emicizumab. Presented is the percentage of residual bt-emicizumab relative to bt-emicizumab alone at 3 minutes after injection, which was arbitrarily set at 100%. Lines were generated by fitting the data to an equation describing a single-exponential decay. Data represent the mean \pm standard deviation of three experiments.

corticoids (1 mg/kg/day for 48 hours [h] to reduce peritardular inflammation). A minor increase in emicizumab concentrations (1.7 µg/mL) and reduction in APTT-ratio (1.44) was observed (Figure 1), suggesting a potential cortico-sensitivity of the anti-emicizumab antibody-producing plasmocytes. Although no bleeds were observed during a 3-week period, emicizumab levels remained undetectable following a short corticosteroid therapy (2 mg/kg/day, conform to the management of children's immunologic thrombocytopenic purpura). Corticosteroid-therapy was therefore halted. Since anti-emicizumab antibodies have been reported to be transient in some patients,¹¹ emicizumab therapy (1.5 mg/kg/week) was continued for 3 months. As no improvement was observed, emicizumab therapy was terminated.

In order to further characterize the anti-emicizumab antibodies, additional tests were performed. We next analyzed eventual inhibition of emicizumab activity using the chromogenic activity assay (Biophen FVIII:C activity assay [ref 221402]; Hyphen BioMed, Andresy, France). Surprisingly, no reduction in emicizumab activity was observed, irrespective of whether normal or patient serum was tested (Figure 2C). Similar data were obtained using a one-stage clotting assay, suggesting that the anti-emicizumab antibodies are essentially non-inhibitory.

This was further assessed by analyzing binding of biotinylated (bt)-emicizumab to immobilized purified recombinant FIX (Pfizer, Paris, France) or plasma-derived FX (Cryoep; Montpellier, France). Biotinylation was performed using the NHS-PEO4-biotin kit (ref: UPR2027B; Griener Bio-one; Frickenhausen, Germany) without loss of cofactor activity. No inhibition of emicizumab binding to FIX was observed with normal or patient serum (Figure 2D). However, a modest inhibition of emicizumab binding to FX was observed using patient serum (Figure 2E). Maximal inhibition was 35±20% (n=4, $P=0.0124$ compared to normal serum) using 5-fold diluted serum. The absence of a dominant inhibitory effect on the interactions between emicizumab and FIX/FX is compatible with the non-inhibitory nature of the patient's anti-emicizumab antibodies in the activity assays. Indeed, a modest decrease in emicizumab-FX complex formation would still allow for sufficient ternary complex to be formed (555 pM vs. 851 pM in the absence of inhibitor, when calculated according to Kitazawa *et al.*).¹² We previously showed that a threshold of about 300 pM ternary complex is needed to produce sufficient hemostatic activity *in vivo*.¹³

As low emicizumab levels in the patient can be explained by an increased clearance, we determined survival of bt-emicizumab in the absence or presence of serum in immuno-deficient mice. Bt-emicizumab was added to 0.9% NaCl, 100 µL control serum or 100 µL patient serum (both 5 µg per 100 µL), and incubated for 30 minutes (min) at ambient temperature. Mixtures were then injected via the retro-orbital plexus (at a dose of 0.25 mg/kg bt-emicizumab) to male NOD.CB17-Prkdcscid/NCrHsd-mice (age 9 weeks; ENVIGO, Gannat, France). Housing and experiments of NOD.CB17-Prkdcscid/NCrHsd-mice were performed in accordance with French regulations and the experimental guidelines of the European Community. Experimentation was approved by the local ethical committee of the Université Paris-Sud (Comité d'Éthique en Experimentation Animale no. 26, protocol APAFIS#4400-2016021716431023v5). Blood samples were taken at 15 min, 6 h, 24 h and 48 h after infusion. Plasma was used to determine residual bt-emicizumab levels in an

enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in which streptavidin-coated microtiter wells were incubated with plasma samples, and bound bt-emicizumab was probed using peroxidase-labeled anti-human IgG4-Fc antibodies. No difference in the disappearance from the circulation was found between bt-emicizumab alone or the bt-emicizumab/normal serum combination ($t_{1/2}=8.5$ h and 8.3 h, respectively; Figure 2F). In contrast, bt-emicizumab was eliminated significantly faster in the presence of patient serum ($t_{1/2}=2.2$ h; $P=0.0013$; Figure 2F), with no bt-emicizumab detectable at 48 h after infusion (compared to 21% for both other conditions). It, thus, seems that the main effect of the anti-emicizumab antibodies is to accelerate clearance of emicizumab.

Contrary to previously reported inhibitors of emicizumab, we here describe the presence of antibodies that leave emicizumab activity unaffected, but that provoke the rapid elimination of emicizumab in mice, providing an explanation for the low emicizumab levels in the patient. Although the occurrence of anti-emicizumab antibodies is rare, their presence may severely diminish its clinical efficacy, resulting in the re-appearance of spontaneous bleeds. Clinical monitoring will usually be sufficient for patients receiving emicizumab therapy. However, in case of bleeding in the absence of any compliance concerns, biological monitoring (APTT and emicizumab concentration) is therefore helpful to detect possible anti-drug antibodies.

Annie Harroche,^{1*} Thibaud Sefiane,^{2*} Maximilien Desvages,^{2,3} Delphine Borgel,^{2,3} Dominique Lasne,^{2,3} Caterina Casari,² Ivan Peyron,² Laurent Frenzel,¹ Stéphanie Chluun,⁴ Peter J. Lenting² and Cécile Bally¹

¹Centre de Traitement de l'Hémophilie, AP-HP, Hôpital Necker Enfants Malades, Paris; ²Laboratory for Hemostasis, Inflammation & Thrombosis, Unité Mixte de Recherche 1176, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Université Paris-Saclay, Le Kremlin-Bicêtre; ³Laboratoire d'Hématologie, AP-HP, Hôpital Necker Enfants Malades, Paris and ⁴Laboratoire d'Immunologie Biologique, AP-HP, Hôpital Necker Enfants Malades, Paris, France

*AH and TS contributed equally as co-first authors.

Correspondence: PETER J. LENTING - peter.lenting@inserm.fr
doi:10.3324/haematol.2021.278579

Received: February 15, 2021.

Accepted: May 3, 2021.

Pre-published: May 20, 2021.

Disclosures: AH received fees for consultancy and board expert membership from Roche, Takeda, LFB, CSL-Behring, Sobi and NovoNordisk; DL received consulting fees from Roche (with fees going to Association de Recherche en Hématologie à Necker-Enfants Malades; ARHNEM); PJJ received speaker fees from Biotest, Chugai, CSL-Behring, LFB-Biomedicament, NovoNordisk, Roche, Sanofi, Takeda and research support from Sobi, Catalyst Biosciences. All other authors declare no conflicts of interest.

Contributions: AH, CB were in charge of the patients and provided the clinical samples; MD, DB and DL performed the coagulation tests; TS, CC, IP and PJJ designed and performed the *in vitro* and *in vivo* experiments. All authors contributed to the interpretation of the data. AH, CB and PJJ wrote the first draft of the manuscript, and all authors contributed to the editing of the final manuscript.

Acknowledgments: we thank Dr. Ahyanakian MA who leads the biological Necker Biobank.

Data sharing statement: data are available upon reasonable request to the corresponding author.

References

1. Cormier M, Batty P, Tarrant J, Lillicrap D. Advances in knowledge of inhibitor formation in severe haemophilia A. *Br J Haematol.* 2020;189(1):39-53.
2. Scott DW, Pratt KP. Factor VIII: perspectives on immunogenicity and tolerogenic strategies. *Front Immunol.* 2019;10:3078.
3. Kitazawa T, Igawa T, Sampei Z, et al. A bispecific antibody to factors IXa and X restores factor VIII hemostatic activity in a hemophilia A model. *Nat Med.* 2012;18(10):1570-1574.
4. Sampei Z, Igawa T, Soeda T, et al. Identification and multidimensional optimization of an asymmetric bispecific IgG antibody mimicking the function of factor VIII cofactor activity. *PLoS One.* 2013;8(2):e57479.
5. Oldenburg J, Mahlangu JN, Kim B, et al. Efficacy of emicizumab prophylaxis in hemophilia A with inhibitors. *N Engl J Med.* 2017;377(9):809-818.
6. Mahlangu J, Oldenburg J, Paz-Priel I, et al. Efficacy of emicizumab prophylaxis in patients who have hemophilia A without inhibitors. *N Engl J Med.* 2018;379(9):811-822.
7. Young G, Liesner R, Chang T, et al. A multicenter, open-label phase 3 study of emicizumab prophylaxis in children with hemophilia A with inhibitors. *Blood.* 2019;134(24):2127-2138.
8. Pipe SW, Shima M, Lehle M, et al. Efficacy, safety, and pharmacokinetics of emicizumab prophylaxis given every 4 weeks in people with hemophilia A (HAVEN 4): a multicentre, open-label, non-randomised phase 3 study. *Lancet Haematol.* 2019;6(6):e295-e305.
9. Harkins Druzgal C, Kizilcok H, Brown J, Sennett M, Young G. Neutralizing antidrug antibody to emicizumab in a patient with severe hemophilia A with inhibitors: new case with detailed laboratory evaluation. *J Thromb Haemost.* 2020;18(9):2205-2208.
10. Valsecchi C, Gobbi M, Beeg M, et al. Characterization of the neutralizing anti-emicizumab antibody in a patient with hemophilia A and inhibitor. *J Thromb Haemost.* 2021;19(3):711-718.
11. Paz-Priel I, Chang T, Asikanius E, et al. Immunogenicity of emicizumab in people with hemophilia A (PwHA): results from the HAVEN 1-4 studies. *Blood.* 2018;132(Suppl 1):S633.
12. Kitazawa T, Esaki K, Tachibana T, et al. Factor VIIIa-mimetic cofactor activity of a bispecific antibody to factors IX/IXa and X/Xa, emicizumab, depends on its ability to bridge the antigens. *Thromb Haemost.* 2017;117(7):1348-1357.
13. Ferriere S, Peyron I, Christophe OD, et al. A hemophilia A mouse model for the in vivo assessment of emicizumab function. *Blood.* 2020;136(6):740-748.

Article II

Etude des différences dans la structure des caillots veineux dans un modèle de souris hémophiles traitées par emicizumab, par facteur VIII ou par facteur VIII Fc

Thibaud Sefiane, Hortense Maynadié, Carmen Escurola Ettingshausen, Vincent Muczynski, Xavier Heiligenstein, Julien Dumont, Olivier D. Christophe, Cécile V. Denis, Caterina Casari, Peter J. Lenting

Accepté le 30 novembre 2023 dans Haematologica

Contexte et objectifs :

Le FVIII et l'anticorps bispécifique emicizumab mimant son rôle de cofacteur sont aujourd'hui des traitements utilisés en routine pour le traitement de l'hémophilie A sévère. Cependant, 5% des patients traités par emicizumab présentent des saignements anormaux nécessitant une prise en charge par les thérapies de remplacement ou les agents bypassants. Des différences importantes entre les mécanismes d'action du FVIII et d'emicizumab sont décrites dans la littérature et nous les avons décrites précédemment dans ce manuscrit. Parmi celles-ci, l'emicizumab influence la génération de thrombine, enzyme clé de la coagulation impliquée dans le clivage du fibrinogène en fibrine et dans le contrôle de la fibrinolyse.

Ces mécanismes et leurs cinétiques sont fondamentaux pour la génération d'un caillot de fibrine stable avec des propriétés physiques lui permettant de résister aux contraintes du flux notamment. Plusieurs études ont analysé la structure du réseau de fibrine en présence de FVIII et d'emicizumab en se limitant aux analyses *in vitro*. Ces approches sont certainement informatives mais présentent comme limite majeure de ne pas prendre en compte l'influence des composants cellulaires retrouvés *in vivo* tout en utilisant des activateurs artificiels de la coagulation.

Afin d'évaluer *in vivo* la formation du caillot de fibrine, nous avons développé un modèle murin de saignement consistant en l'incision standardisée d'une des veines latérales de la queue de la souris déficiente en FVIII afin de récupérer et analyser la structure du caillot formé. Le but était de comparer l'effet de l'emicizumab à celui du FVIII/rFVII-Fc sur la structure du caillot formé.

Pour cela, nous avons utilisé différentes techniques d'analyses par microscopie avec des résolutions suffisantes pour réaliser une étude précise du réseau de fibrine. Enfin, dans le but d'expliquer les différences observées, nous nous sommes intéressés à la stabilisation du caillot par le FXIIIa.

Ainsi nous avons pu montrer que le FVIII et le FVIII-Fc impactent de façon similaire la formation et la structure du caillot. En revanche, le mode d'action différent de l'emicizumab modifie la cinétique de formation de la fibrine et d'activation du FXIII entraînant des différences dans la morphologie des caillots, pouvant potentiellement expliquer les saignements observés chez les patients.

Differences in venous clot structures between hemophilic mice treated with emicizumab versus factor VIII or factor VIII Fc

Thibaud Sefiane,¹ Hortense Maynadié,^{1,2} Carmen Escurola Ettingshausen,³ Vincent Muczynski,¹ Xavier Heiligenstein,⁴ Julien Dumont,⁵ Olivier D. Christophe,¹ Cécile V. Denis,¹ Caterina Casari^{1#} and Peter J. Lenting^{1#}

¹Laboratory for Hemostasis, Inflammation & Thrombosis, Unité Mixed de Recherche 1176, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Université Paris-Saclay, Le Kremlin-Bicêtre, France; ²Centre de Référence de l'Hémophilie et des Maladies Hémorragiques Constitutionnelles Rares, Hôpital Bicêtre AP-HP, Université Paris-Saclay, Le Kremlin-Bicêtre, France; ³HZRM Hemophilia Center Rhine-Main, Frankfurt-Mörfelden, Mörfelden-Walldorf, Germany; ⁴CryoCapCell, Le Kremlin-Bicêtre, France and ⁵Collège de France, Centre Interdisciplinaire de Recherche en Biologie (CIRB), Unité Mixed de Recherche 1050, Paris, France

[#]CC and P.J.L. contributed equally to this study as senior authors.

Correspondence: C.V. Denis
cecile.denis@inserm.fr

Received: August 23, 2023.
Accepted: November 29, 2023.
Early view: December 7, 2023.

<https://doi.org/10.3324/haematol.2023.284142>

©2024 Ferrata Storti Foundation
Published under a CC BY-NC license 

Abstract

Recombinant factor VIII (rFVIII), rFVIII Fc and emicizumab are established treatment options in the management of hemophilia A. Each has its unique mode of action, which can influence thrombin generation kinetics and therefore also the kinetics of thrombin substrates. Such differences may potentially result in clots with different structural and physical properties. A starting observation of incomplete wound closure in a patient on emicizumab prophylaxis led us to employ a relevant mouse model in which we noticed that emicizumab-induced clots appeared less stable compared to FVIII-induced clots. We therefore analyzed fibrin formation *in vitro* and *in vivo*. *In vitro* fibrin formation was faster and more abundant in the presence of emicizumab than in the presence of rFVIII/rFVIII Fc. Furthermore, the time-interval between the initiation of fibrin formation and factor XIII activation was twice as long for emicizumab than as for rFVIII/rFVIII Fc. Scanning electron microscopy and immunofluorescent spinning-disk confocal microscopy of *in vivo*-generated clots confirmed increased fibrin formation in the presence of emicizumab. Unexpectedly, we also detected a different morphology between rFVIII/rFVIII Fc- and emicizumab-induced clots. Contrary to the regular fibrin mesh obtained with rFVIII/rFVIII Fc, fibrin fibers appeared to be fused into large patches upon emicizumab treatment. Moreover, fewer red blood cells were detected in regions in which these fibrin patches were present. The presence of highly dense fibrin structures associated with a diffuse fiber structure in emicizumab-induced clots was also observed when using super-resolution imaging. We hypothesize that the modified kinetics of thrombin, fibrin and factor XIIIa generation contribute to differences in structural and physical properties between clots formed in the presence of FVIII or emicizumab.

Introduction

The blood coagulation cascade is a series of highly regulated enzymatic reactions designed to generate thrombin, which is needed to produce fibrin in a timely and spatially correct manner.¹ To achieve this goal, the coagulation cascade consists of (among others) thrombin-dependent feedback loops that allow for the amplification of thrombin formation. Thrombin is also needed to generate activated factor XIII (FXIIIa), which converts the freshly produced fibrin protofibrils into a co-

valently linked network, and activated thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor, which delays fibrinolytic degradation of the fibrin network.^{2,3} Any disturbance of this complex process may potentially lead to an improperly formed fibrin network. Indeed, thrombin concentration has been shown to be a critical determinant of the fibrin network structure and its physical properties.⁴ One of the key cofactor proteins in the coagulation cascade is factor VIII (FVIII), the functional absence of which is associated with markedly reduced thrombin formation.⁵ The

thrombin-activated derivative of FVIII, FVIIIa, functions as a cofactor in the tenase complex, which participates in the amplifying portion of the coagulation cascade. Within the tenase complex, FVIIIa stimulates the generation of activated factor X (FXa) by the enzyme activated factor IX (FIXa). The physiological relevance of FVIII is illustrated by the severe bleeding complications associated with its deficiency, a disorder known as hemophilia A.

To compensate for the deficiency of FVIII in people with hemophilia A, replacement therapy using FVIII concentrates has been the treatment of choice over the last four decades.⁶ Prophylactic treatment proved efficient in reducing spontaneous bleeding and subsequent joint damage. Despite its effectiveness, replacement therapy had a number of disadvantages, including the need for frequent intravenous infusions and an immunological response leading to the presence of neutralizing allo-antibodies against FVIII. These complications have led to the development of alternative treatment options, such as activated factor VII, extended half-life FVIII variants, gene therapy, and so-called non-factor therapies.^{7,8} One non-factor approach that has been approved for clinical use is emicizumab, a bispecific antibody that binds both the enzyme FIXa and its substrate FX, thereby mimicking part of the FVIIIa function.^{9,10} Emicizumab therefore allows the generation of a certain amount of thrombin without completely correcting coagulation. Clinical studies have shown marked therapeutic benefit from the use of emicizumab, with annual bleeding rates being fewer than two among patients treated with emicizumab prophylactically.¹¹ Because of its efficacy and its subcutaneous mode of administration, increasing numbers of people with hemophilia A are using emicizumab as prophylactic therapy.¹² Despite this success, it has been reported that about 5% of the patients receiving emicizumab may develop spontaneous or trauma-induced muscle bleeds, which are sometimes difficult to stop and require intensive factor replacement therapy.¹³

It is therefore important to better understand the molecular basis by which emicizumab, in comparison to FVIII, contributes to coagulation. Indeed, the mode of action of these two treatments is quite different.¹⁴ Both components may differ by the timing with which they start acting and when their activity stops, as well as by the location where they may act. A similar point can also be made for extended half-life variants, such as recombinant FVIII Fc (rFVIII Fc), in which the presence of the Fc portion may affect FVIII distribution and activation during coagulation. Knowing that the formation of thrombin is both time- and spatially dependent, it is of relevance to investigate whether and how emicizumab and rFVIII Fc may differ from “classic” FVIII regarding the formation of a fibrin network.

It should be noted that so far studies on fibrin formation using emicizumab have been restricted to *in vitro* settings.¹⁵⁻¹⁷ Moreover, the activity of emicizumab is often examined in global assays, such as thrombin generation assays.¹⁸⁻²² Although this may provide insight into the potential of emicizumab to

stimulate thrombin generation relative to FVIII, it provides little insight into the upstream processes that are required to generate a stable clot.

We have therefore explored *in vivo* clot formation by recombinant FVIII (rFVIII), rFVIII Fc and emicizumab using specific bleeding models and microscopic analysis, with focus on the structure of the fibrin network. We found differences in structural morphology between FVIII- and emicizumab-induced clots. Furthermore, kinetics of fibrin and FXIIIa generation are modified when using emicizumab, which could explain in part the differences in clot structure.

Methods

A description of the experimental procedures can be found in the *Online Supplementary Materials*.

Ethics statement

Photographs of the patient’s wound were taken during consultation, and informed consent was given by the parents for their anonymous use in this study. Animal housing and experiments were performed in accordance with French regulations and the experimental guidelines of the European Community. This project was approved by the local ethical committee of Université Paris-Saclay (Comité d’Ethique en Experimentation Animale n. 26, protocol APAFIS#26510-202007061525281 v2).

Patient

The patient was a 2-year-old boy with severe hemophilia A (FVIII <1%) on regular prophylaxis with emicizumab (6 mg/kg every 4 weeks, subcutaneously) who experienced a deep laceration of his left foot and subsequent insufficient wound healing. A more extensive description of the patient is available in the *Online Supplementary Materials*.

In vitro assays

A description of fibrin formation and FXIIIa generation is available in the *Online Supplementary Materials*.

In vivo models

A tail-vein transection model was used in this study. The model is described in the *Online Supplementary Materials*.

Microscopy

The use of spinning-disk confocal microscopy, scanning electron microscopy and stimulated emission depletion (STED) microscopy is described in the *Online Supplementary Materials*.

Results

Patient

A 2-year-old boy with severe hemophilia A under regular

emicizumab prophylaxis for 2 years (6 mg/kg every 4 weeks), experienced a deep laceration of his left foot (Figure 1). The wound was treated with local application of tranexamic acid and covered with Steri-strips. Emicizumab prophylaxis continued, and bleeding stopped. However, when the Steri-strips were removed after 10 days, no wound closure or wound healing had occurred, and the covering clot appeared loose and fragile. The patient was then administered three consecutive doses of FVIII (66 IU/kg intravenously, followed by 33 IU/kg intravenously at 12-hourly intervals) on days 10 and 11 after the injury. Complete wound closure was observed at day 12, and wound healing progressed naturally in the following days.

In vivo clot formation

To further explore clot formation *in vivo*, we compared mice given emicizumab, rFVIII or rFVIII-Fc using a previously validated mouse model. In this model, mice receive emicizumab in combination with human FIX and human FX (100 IU/kg), or a single dose of rFVIII or rFVIII-Fc.²³ Bleeding is then assessed following transection of a tail vein.²⁴ At the

time of injury, plasma concentrations of rFVIII and rFVIII-Fc were 10 IU/dL, whereas that of emicizumab was 55 µg/mL. The FVIII concentrations were chosen based on the apparent FVIII-equivalence for emicizumab that we observed in our previous *in vivo* studies.²³ Whereas all vehicle-treated mice started to rebleed after the initial primary stop, treatment with rFVIII, rFVIII-Fc or emicizumab resulted in a permanent arrest of bleeding when the wound remained unchallenged (Figure 2A). Efficient bleeding arrest was accompanied by limited blood loss (*Online Supplementary Figure S7*). In contrast, when the clot covering the injury was removed 15 and 30 min after the injury, differences in response between FVIII- and emicizumab-treated mice were observed. In mice receiving rFVIII or rFVIII-Fc, the bleeding readily stopped again, whereas emicizumab-treated mice displayed a pattern of frequent spontaneous re-bleeding (Figure 2B). Spontaneous re-bleeds were associated with increased blood loss (*Online Supplementary Figure S7*). We considered the possibility that levels of FIX and FX had diminished below the necessary threshold to support emicizumab, since their respective half-lives are relatively



Figure 1. Incomplete wound closure. (A) A boy with hemophilia on emicizumab prophylaxis arrived at the hospital with a deep laceration in his foot (day 1). (B) The wound was treated with local application of tranexamic acid and covered with Steri-strips. On day 10, the Steri-strips were removed, but the wound was still open, and no wound closure or healing was observed. The patient received treatment with factor VIII on days 10 and 11. (C) On day 12, wound closure was observed and the wound healing process progressed gradually during the following days, as shown by the photographs taken on day 13 (D) and day 16 (E).

short in mice (3-5 h) compared to those in humans (>20 h).²³ However, re-injection of FIX and FX (100 IU/kg) 3 min before clot removal did not affect either bleeding profile or blood loss (Figure 2B, *Online Supplementary Figure S1*). We also examined whether the use of tranexamic acid (10 mg/kg) could improve the phenotype of emicizum-ab-treated mice. Interestingly, tranexamic acid did not prevent spontaneous re-bleeds after clot removal (Figure 2B, *Online Supplementary Figure S1*), suggesting that the

clot instability is unrelated to increased fibrinolysis of the fibrin network. In conclusion, these *in vivo* data point to potential differences in clot construction between FVIII- and emicizumab-treated mice.

In vitro fibrin formation

Given that a stable fibrin network is key to the formation of a stable thrombus, we evaluated whether differences in the mode of action between rFVIII and emicizumab could

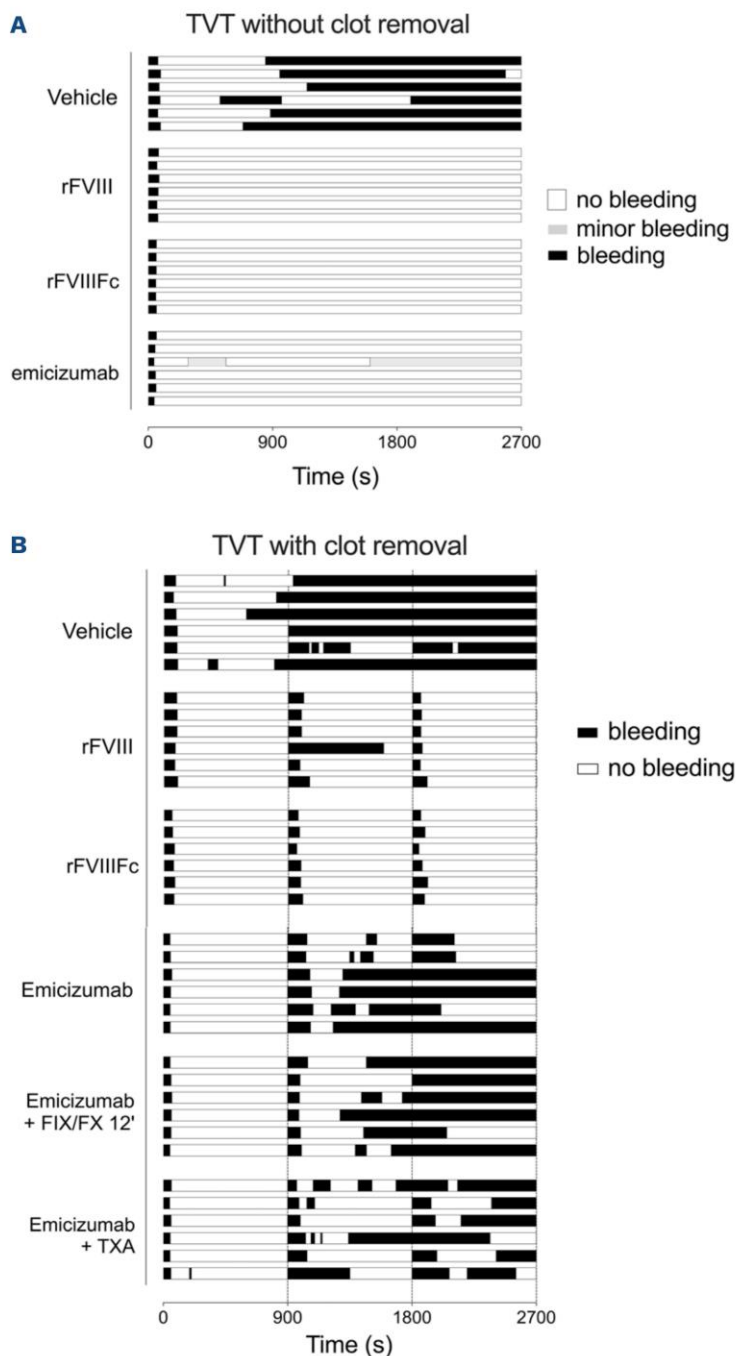


Figure 2. Hemostatic responses after tail-vein transection without and with clot removal. Where the diameter of the tail was 2.3 mm, an incision 0.5 mm deep was made in the left lateral vein. Mice receiving emicizumab also received human FIX and human FX (both at a dose of 100 IU/kg) 5 min before the injury. Both the upper and lower panels depict the bleeding profile of mice receiving vehicle, recombinant FVIII (rFVIII), recombinant FVIII Fc (rFVIII Fc) or emicizumab. Plasma concentrations at the start of the procedure were 10 IU/dL for rFVIII and rFVIII Fc and 55 µg/mL for emicizumab. Black represents periods of bleeding, gray periods of minor bleeding, and white periods of non-bleeding. (A) The wound remained unchallenged after transection of the vein. (B) The dotted lines at 900 seconds and 1,800 seconds indicate the timing of clot removal in mice that were not bleeding at those instants. Amounts of blood loss measured in the mice are presented in *Online Supplementary Figure S1*. Emicizumab + FIX/FX 12': re-injection of FIX and FX at 12 min in emicizumab-treated mice (i.e., 3 min before the first clot removal). Emicizumab + TXA: emicizumab-treated mice that also received tranexamic acid (10 mg/kg) 5 min before injury; TVT: tail-vein transection.

affect upstream fibrin formation. To this end, we performed *in vitro* experiments using human plasma; in these experiments rFVIII (at doses of 10 IU/dL and 100 IU/dL) or emicizumab (55 µg/mL) was added to fibrinogen-enriched FVIII-deficient plasma (Figure 3A). Fibrin formation was monitored by measuring optical density (OD) at 405 nm. In the absence of rFVIII or emicizumab, the lag-time was 32 min, and half-maximal fibrin formation was reached at 42 min (Figure 3B). The addition of rFVIII (10 and 100 IU/dL) dose-dependently shortened the lag-time to 24 and 18 min,

with half-maximal fibrin formation being achieved at 33 and 26 min, respectively (Figure 3C, D). Similar data were obtained using rFVIIIc, indicating that coagulation proceeds similarly for both FVIII variants (*Online Supplementary Figure S2*). Interestingly, lag-time and time to half-maximal fibrin formation were markedly shortened in the presence of emicizumab, to 6 and 14 min, respectively (Figure 3E). In addition, the maximum OD reached with emicizumab (OD=1.17±0.03; n=6) was higher than that with either rFVIII (OD=0.95±0.06; n=6) or rFVIIIc (0.97±0.08; n=10; P<0.0001),

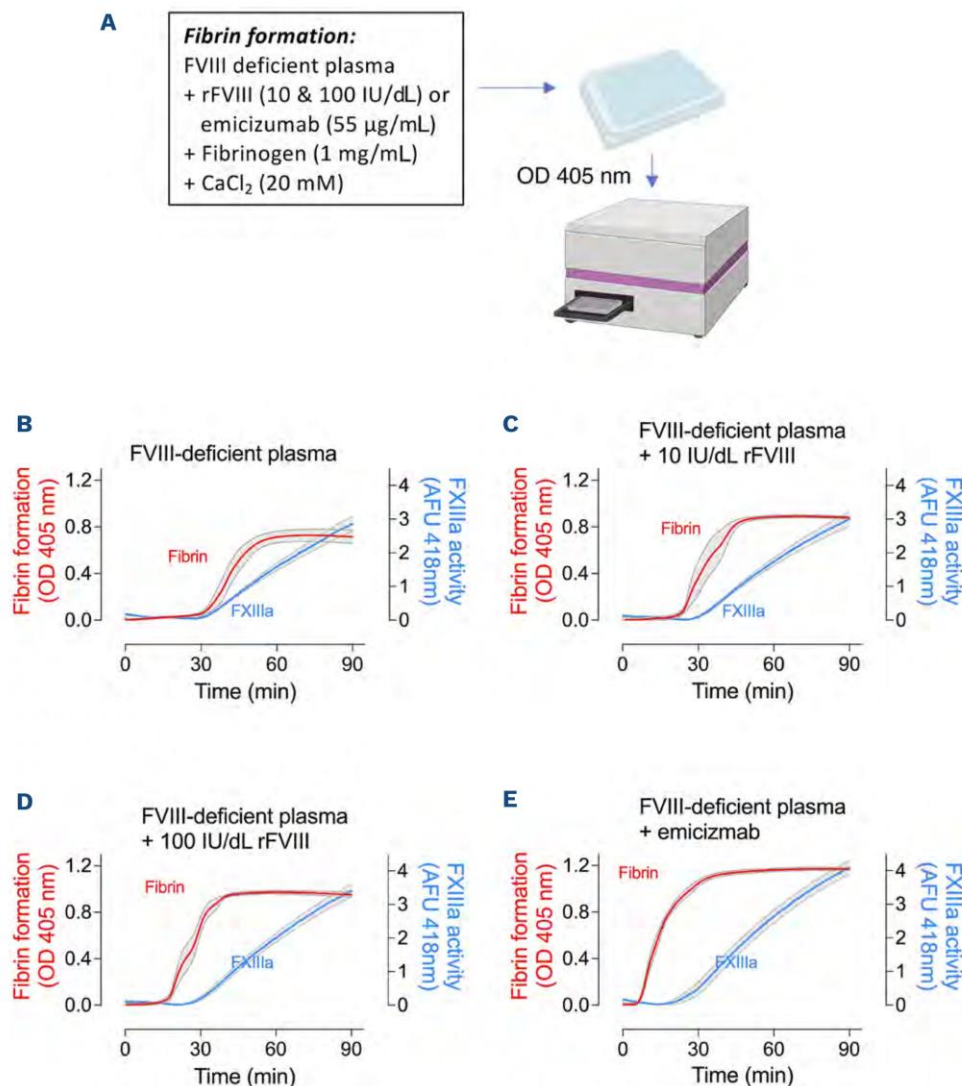


Figure 3. *In vitro* fibrin formation and fibrinolysis. (A) Schematic representation of *in vitro* fibrin formation in human FVIII-deficient plasma supplemented with recombinant FVIII (rFVIII) or emicizumab. (B-E) FVIII-deficient plasma (B) was supplemented with rFVIII at a dose of 10 IU/dL (C) or 100 IU/dL (D) or emicizumab at 55 µg/mL (E). In addition, fibrinogen was added (1 mg/mL final concentration) and the reaction was initiated by the addition of CaCl₂. No other additives (tissue factor or FXIa) were used. Fibrin formation was detected by monitoring optical density values at 405 nm, while FXIII activity was measured via hydrolysis of the fluorescent A101 substrate (excitation 313 nm; emission 418 nm). Red line: fibrin formation (left Y axis) and blue line: FXIII activity (right Y axis). The mean (solid lines) and standard error (gray area around the solid line) of six to eight measurements are presented. CaCl₂: calcium chloride; OD: optical density; AFU: arbitrary fluorescence units.

pointing to rapid and increased fibrin formation. Together, these data suggest that modifying the kinetics of FXa generation affects upstream fibrin formation.

In vitro generation of activated factor XIII

Since fibrin formation involves two distinct steps following the conversion of fibrinogen into fibrin monomers (non-covalent polymerization of fibrin monomers into protofibrils, and subsequent covalent crosslinking via FXIIIa), we decided to monitor FXIII activation in parallel experiments. FXIIIa activity was detected in all conditions (Figure 3B-E). However, the synchronization between the initiation of fibrin formation and FXIIIa generation varied between the different conditions. In particular, a longer interval was observed between the initiation of fibrin and FXIIIa formation in mice treated with emicizumab (12 ± 2 min) compared to mice given rFVIII at a dose of 100 IU/dL (7 ± 1 min) or 10 IU/dL (4 ± 1 min). Furthermore, more FXIIIa was generated in the presence of emicizumab (0.14 OD/min, 95% confidence interval [95% CI]: 0.13-0.15 OD/min) than in the presence of rFVIII 100 IU/dL (0.12 OD/min, 95% CI: 0.11-0.13; $P=0.026$), rFVIII 10 IU/dL (0.10 OD/min; $P<0.0001$) or FVIII-deficient plasma (0.11 OD/min; $P<0.0001$). Thus, relative to fibrin generation, activation of FXIII starts later in the presence of emicizumab than in the presence of rFVIII, while once started, more FXIIIa is formed.

In vivo generation of fibrin: scanning electron microscopy analysis

We next studied whether the *in vitro* differences in the kinetics of fibrin formation were also observed *in vivo* by applying the same tail-vein transection model described for Figure 2. Tails were collected 10 min after injury, when bleeding had stopped in all treated mice (Figure 2), and tissue sections were prepared for whole-mount scanning electron microscopy, which enables visualization of the outer portion of the clot (Figure 4A).

rFVIII-derived clots contained a fibrin network in which thin, tubular-shaped fibers of homogeneous thickness were in a regular mesh over the clot, and cellular components were evenly distributed (Figure 4B). Similar structures were also observed in tail fragments obtained from wild-type mice, whereas FVIII-deficient mice displayed a disturbed network with less fibrin and fewer fibers which had a 1.4-fold increased diameter ($P=0.032$) (Online Supplementary Figure S3). The emicizumab-derived clots were characterized by a completely different fibrin morphology. They consisted of thick, uneven fiber structures that seemed to fuse together, thereby forming large layered structures. Strikingly, these patch-like structures were almost devoid of cellular components, and included small and large circular-shaped holes (Figure 4C).

We analyzed these images using ImageJ-software for four different parameters: fibrin coverage, fiber diameter, number of pores and number of intersections (Figure 4D-G). In

line with the *in vitro* fibrin generation experiments, more fibrin was detected in emicizumab-treated mice than in rFVIII-treated ones ($42 \pm 8\%$ vs. $24 \pm 8\%$ per field; $P<0.0001$) (Figure 4D). The average diameter of the fibrin fibers was also significantly increased, 1.8-fold, in emicizumab-treated mice (average of 534 ± 90 nm vs. 292 ± 101 nm; $P<0.0001$) (Figure 4E). Furthermore, there were 2-fold fewer pores in emicizumab-derived clots compared to rFVIII-derived clots (119 ± 45 vs. 248 ± 58 per field; $P<0.0001$) (Figure 4F). Finally, 1.7-fold more intersections per field of view were detected in rFVIII-induced clots compared to emicizumab-induced clots ($11,078 \pm 2935$ vs. $6,510 \pm 1157$ per field; $P<0.0001$) (Figure 4G). These data indicate that clots derived from mice receiving emicizumab have a different structure from clots generated in mice receiving rFVIII.

In vivo generation of fibrin: spinning-disk confocal immunofluorescence analysis

To investigate whether differences in fibrin formation were also occurring within the interior of the injury, we first performed spinning-disk confocal imaging using anti-fibrin antibodies (Figure 5A). Five mice were analyzed for each group, with two tissue sections/mouse. Representative images are provided for each condition (wild-type mice, FVIII-deficient mice, and FVIII-deficient mice treated with rFVIII, rFVIII-Fc or emicizumab) (Figure 5B-F). Similar amounts of fibrin (in terms of mean fluorescence intensity) were found in clots from rFVIII- and rFVIII-Fc-treated mice compared to wild-type mice (Figure 5G). This parameter did not increase further with higher doses of rFVIII or rFVIII-Fc (500 IU/dL) (Online Supplementary Figure S4).

Unexpectedly, the mean fluorescence intensity was significantly increased in clots from emicizumab-treated mice (0.66 ± 0.30 vs. 0.14 ± 0.05 , 0.17 ± 0.10 and 0.26 ± 0.09 for emicizumab, rFVIII, rFVIII-Fc and wild-type mice, respectively; $P<0.0001$) (Figure 5B-F). These data are in line with our *in vitro* data, which showed that fibrin formation is more abundant in the presence of emicizumab than in the presence of FVIII.

In vivo generation of fibrin: stimulated emission depletion microscopy

Although spinning-disk confocal imaging enables a quantitative analysis of fibrin formation within the interior of a clot, its resolution is insufficient to detect potential differences in structure. We therefore proceeded to perform STED microscopy, a form of super-resolution microscopy, which is less suited for quantitative analysis of large regions, but enables imaging with sub-diffraction resolution of ≤ 50 nm. Detailed images of fibrin structures within the interior of a clot were obtained for wild-type, FVIII-deficient and rFVIII-Fc- and emicizumab-treated mice (Figure 6A). As expected, typical fiber-like structures, similar to those observed using scanning electron microscopy, were readily distinguished in the clots of wild-type, FVIII-deficient and

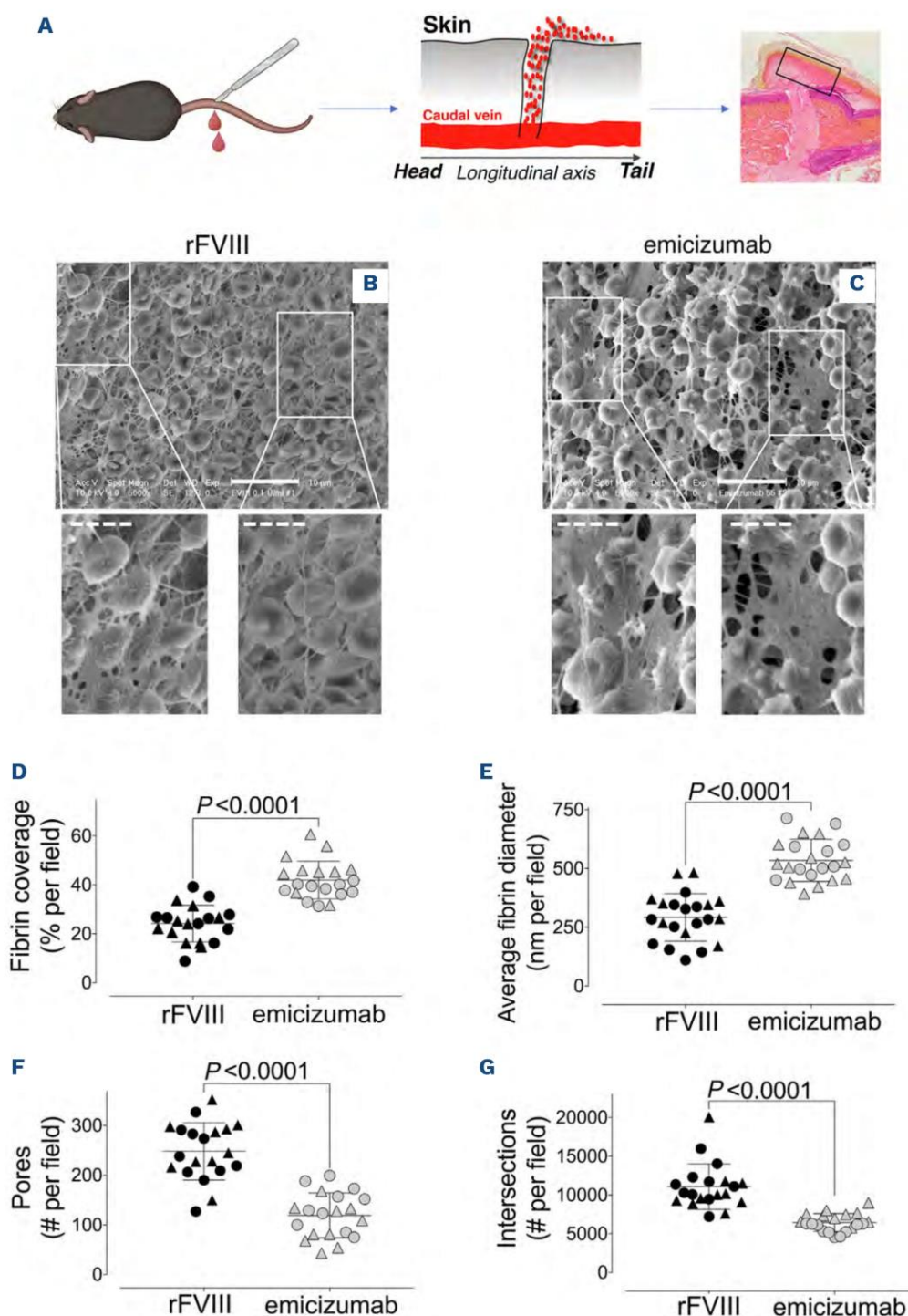


Figure 4. Scanning electron microscopy imaging of *in vivo*-generated fibrin networks. (A) Experimental approach for the preparation of tissue sections. The black rectangle indicates the region examined using scanning electron microscopy. (B, C) Tail fragments obtained 10 min after tail-vein transection were prepared for scanning electron microscopy using standard pre-fixation with 4% glutaraldehyde and 1% OsO_4 , and dehydration. Representative images of FVIII-deficient mice treated with recombinant FVIII (B) or emicizumab (C) are shown. Plasma concentrations at the start of the procedure were 10 IU/dL for rFVIII and 55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for emicizumab. Scale bars represent 10 microns in the large image, and 5 microns in the amplified images. White boxes indicate regions of numeric zooms. (D-G) ImageJ-plugin software was used to determine fibrin coverage (D), average fibrin diameter (E), number of pores per field (F) and number of intersections per field (G). For each experiment shown in the graphs, two mice were included (round and triangle symbols) and ten fields per mouse were examined. Each symbol represents the result in a single field. The statistical analysis was performed using an unpaired Student *t* test.

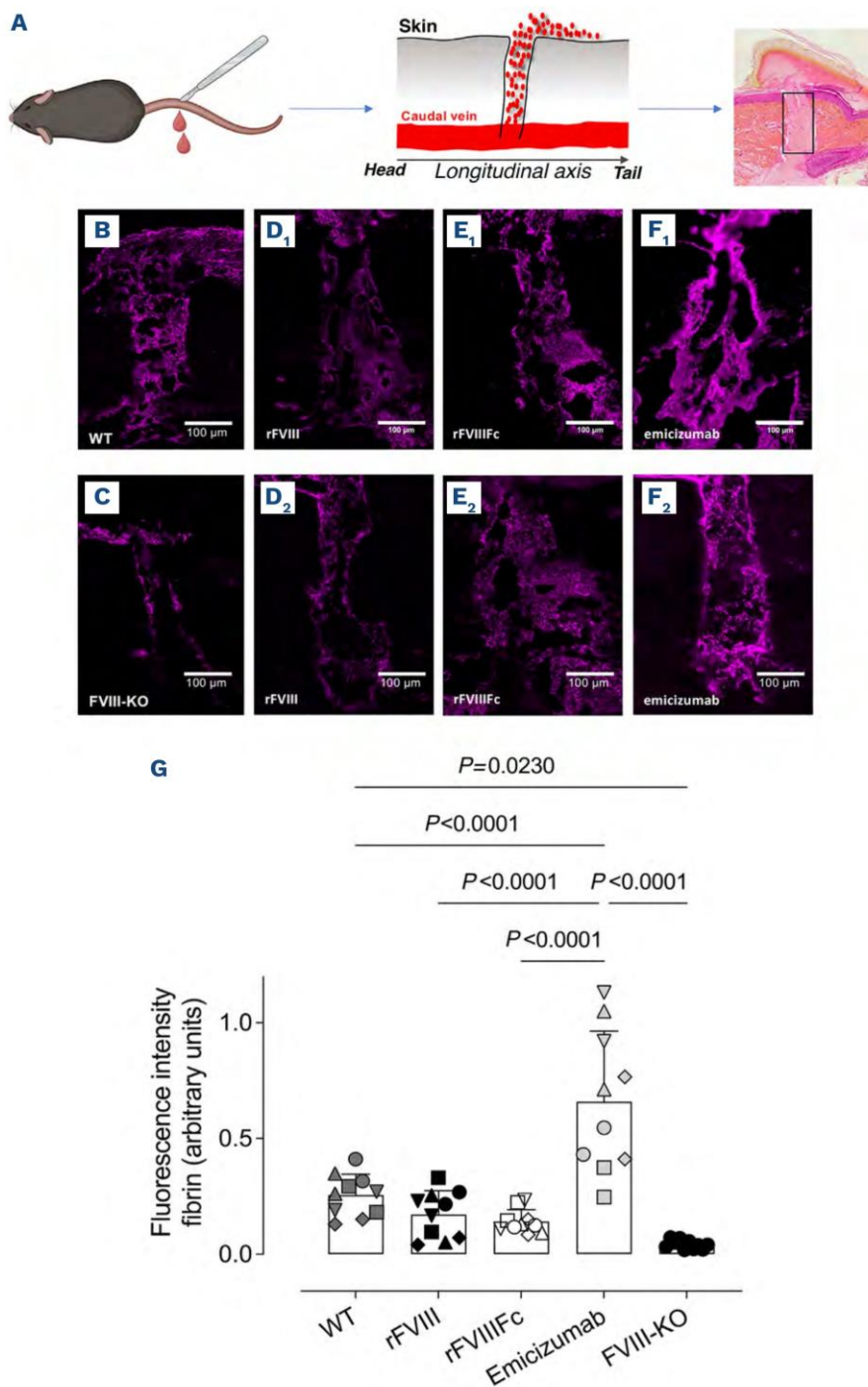


Figure 5. Fibrin content within the injured area. (A) Experimental approach for the preparation of tissue sections. The black rectangle indicates the region examined using spinning disk confocal imaging. (B-F) Sections of tail tissue obtained 10 min after tail-vein transection were prepared for immunofluorescence staining using an anti-mouse fibrin antibody. Representative images are shown for wild-type mice (B), untreated FVIII-deficient mice (C); FVIII-deficient mice treated with recombinant FVIII (D₁-D₂), recombinant FVIII Fc (E₁-E₂), or emicizumab (F₁-F₂). Plasma concentrations at the start of the procedure were 10 IU/dL for recombinant FVIII and recombinant FVIII Fc and 55 μg/mL for emicizumab. (G) For each condition, two non-successive tissue sections from five mice (represented by square, round, diamond, up-triangle and down-triangle symbols) were analyzed using ImageJ-software for the fluorescence intensity (E). Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance with Tukey corrections for multiple comparisons. Only statistically significant differences ($P<0.05$) are indicated. Each symbol represents a separate tissue section from an individual mouse, and the mean ± standard deviation are indicated for each condition. WT: wild-type; FVIII-KO: factor VIII-knockout; rFVIII: recombinant factor VIII; rFVIII Fc: recombinant factor VIII Fc.

rFVIIIc-treated mice. The fibrin mesh was characterized by a homogeneous thickness of the fibers (Figure 6B-D). Interestingly, in each of the images (obtained from three different mice), intensely stained dot-like structures were observed, which for convenience we like to refer to as focal points. With regard to the structures observed in emicizumab-treated mice, fiber-like structures were also present (Figure 6E). However, these appeared more diffuse and their thickness was less homogeneous. In addition, the number of focal points was considerably increased in these clots. When calculating the number of focal points using specific ImageJ-software, it was found that, on average, there were twice as many focal points in emicizumab-derived clots compared to those formed under other conditions (0.36 ± 0.12 for emicizumab vs. 0.18 ± 0.07 , 0.21 ± 0.08 and 0.18 ± 0.08 for wild-type, FVIII-deficient and rFVIIIc-treated mice, respectively ($P < 0.0001$) (Figure 6F). Together, these findings support the concept that different fibrin structures are generated when emicizumab or FVIII is being administered.

Discussion

There have been anecdotal communications on unusual bleeding episodes in patients receiving emicizumab. Here, we provide one example in which a laceration in the foot of a 2-year-old boy with severe hemophilia A on emicizumab prophylaxis showed compromised wound closure and healing. This complication was readily corrected upon treatment with FVIII. Although this single example cannot be said to be representative of the majority of people with hemophilia, it is noteworthy that Batsuli *et al.* reported that about 5% of patients on emicizumab prophylaxis develop spontaneous or trauma-induced muscle bleeds requiring intensive factor replacement therapy.¹³ These observations may originate from emicizumab being a less efficient cofactor than FVIIIa for FIXa. They might also point to fundamental differences in how clots are generated in the presence of FVIII or emicizumab.

Based on differences in functionality between FVIII and emicizumab, in this study we explored and compared fibrin formation and structure in the presence of rFVIII or rFVIIIc and emicizumab. Our data demonstrate that there are differences not only in the amount of fibrin that is generated, but also in the structure of the fibrin network that is formed.

In order to assess clot structures *in vivo* consistently, we used a bleeding model that involves guided transection of the caudal vein, i.e., the tail-vein transection model. The advantage of this model lies in the reproducibility with which the injury is made using a specific template.²⁴ FVIII-deficient mice are an established model to assess the hemostatic efficiency of FVIII and variants thereof.^{25,26} In contrast, there is less information regarding the use of

emicizumab in FVIII-deficient mice, because emicizumab is unable to bind to murine FIXa and FX. To overcome this limitation, we previously developed a protocol involving the co-infusion of human FIX and FX, enabling testing of the functionality of emicizumab in FVIII-deficient mice.²³ Importantly, we showed that addition of human FIX and FX did not alter hemostasis in FVIII-treated mice, and that human FIX was as functional as murine FIX in *in vitro* clotting assays using murine plasma. In the tail-clip model, emicizumab ($55 \mu\text{g/mL}$) significantly reduced blood loss, with an efficacy that was similar to FVIII plasma concentrations of about 10 IU/dL. These concentrations were therefore used in the present study.

rFVIII, rFVIIIc and emicizumab were similar in that they all corrected bleeding in FVIII-deficient mice in the tail-vein transection model (Figure 2). Bleeding stopped shortly after the injury, and no spontaneous re-bleeding was observed. In contrast, when clots were removed, emicizumab-treated mice displayed a pattern of frequent re-bleeds that was absent in rFVIII- or rFVIIIc-treated mice. Control experiments verified that the re-bleeds were not due to an absence of human FIX or FX at the time of clot removal. Increased fibrinolysis was also excluded, since the use of tranexamic acid was unable to prevent these re-bleeds. Moreover, preliminary data presented by Locke *et al.* suggest that clot-lysis time of emicizumab-induced clots is prolonged 1.6-fold when compared to that of FVIII-induced clots.²⁷ Our *in vivo* data suggest the formation of unstable clots when emicizumab is used.

With fibrin being key in stabilizing wound-covering clots, we focused the rest of this study on fibrin network formation. We realize that other factors, in particular platelet activation and aggregation, are also of relevance to maintain clot stability. We are currently investigating this specific aspect as part of a separate study. When examining unbiased fibrin formation using human FVIII-deficient plasma spiked with rFVIII or emicizumab, it was clear that fibrin generation was quickest in the presence of emicizumab, and also that more fibrin was generated (Figure 3). This increased and more rapid fibrin formation is compatible with the hyper-reactivity of emicizumab in standard activated partial thromboplastin time assays, which rely on fibrin clot formation.²⁸ One possible explanation for increased and accelerated fibrin formation is related to the different kinetics by which FVIII and emicizumab stimulate coagulation. Emicizumab will promote FXa generation as soon as FIXa becomes available. In contrast, rFVIII (or rFVIIIc) requires feedback activation by thrombin before it will exert its cofactor function. The modified kinetics in turn alter the kinetics with which thrombin is able to activate its various substrates, including fibrinogen and FXIII.^{29,30} The observation that emicizumab accelerates fibrin formation is not limited to the *in vitro* experiments, but is also detected *in vivo*. Two independent microscopic approaches (scanning electron microscopy and immuno-

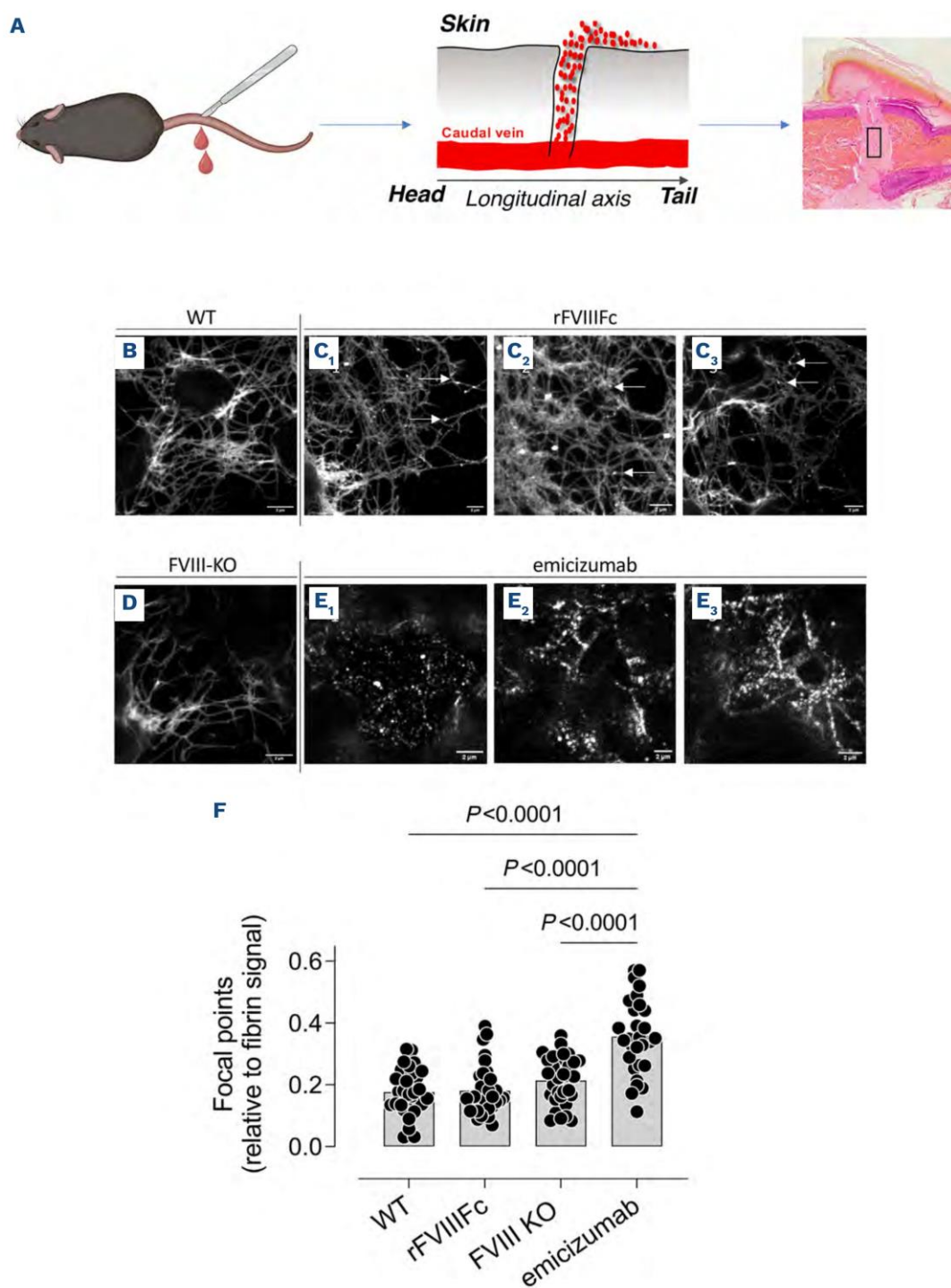


Figure 6. Fibrin structures imaged using stimulated emission depletion microscopy. (A) Experimental approach for the preparation of tissue sections. The black rectangle indicates the region examined using stimulated emission depletion microscopy (STED) microscopy. (B-E) Representative images of wild-type mice (B), FVIII-deficient mice treated with rFVIII Fc (C₁-C₃), untreated FVIII-deficient mice (D) or FVIII-deficient mice treated with emicizumab (E₁-E₃). Fibrin was detected using polyclonal goat anti-murine fibrin antibodies, and probed using STAR-RED-labeled donkey anti-goat antibodies. Plasma concentrations at the start of the procedure were 10 IU/dL for rFVIII Fc and 55 µg/mL for emicizumab. (F) For each condition, 30 images from three different mice (10/mouse) were analyzed using ImageJ-software to calculate the presence of dot-like structures. The white arrows in panels C₁-C₃ indicate examples of dot-like structures. The statistical analysis was performed using one-way analysis of variance with the Dunnett test for multiple comparisons. WT: wild-type; FVIII-KO: factor VIII-knockout; rFVIII: recombinant factor VIII; rFVIII Fc: recombinant factor VIII Fc.

fluorescent spinning-disk confocal imaging) revealed an excess of fibrin in emicizumab-treated mice compared to the fibrin in FVIII-treated mice (Figures 4 and 5). Moreover, a significant correlation was observed between *in vitro* and *in vivo* fibrin formation, irrespectively of whether scanning electron microscopy or immunofluorescent spinning-disk confocal imaging was used (Figure 7).

To get insight into the structure of the fibrin network generated *in vivo*, we used two different microscopic techniques. With scanning electron microscopy we were able to visualize the outer region of the clot, i.e., the part that covers the injury. Unexpectedly, we observed quite an unusual fibrin network in the clots of emicizumab-treated mice. In contrast to individual intertwined fibers that are present in the structures of clots from wild-type mice and FVIII-treated mice, fibrin fibers appeared to be fused into large patches, with few individual fibers present. Consequently, average diameters were found to be excessively large (>500 nm) (Figure 4). In addition, the presence of the patches seemed to prevent the inclusion of red blood cells in these areas, resulting in a less dense clot structure.

Likewise, when super-resolution (STED) microscopy was used to study the interior of the clot, obvious differences were present between FVIII- and emicizumab-dependent clots (Figure 6). A normal fibrin mesh was found in the clots of FVIII-treated mice, whereas less recognizable fibrin staining was detected in the clots of emicizumab-treated mice. In the latter, we observed very large, diffusely stained patterns, characterized by a large number of intense spots, which we refer to as focal points. As of now, we have no information on what these focal points represent in terms of fibrin structure, but they could correspond to the patches we have seen in scanning electron microscopy images.

Another possibility is that these spots represent fibrin that is accumulated at the surface of platelets which are captured in the fibrin network. Additional studies will be performed to gain more insight into this aspect.

An intriguing question is what causes the formation of such unusual fibrin networks under the influence of emicizumab. We observed that the synchronization between fibrin formation and FXIII activation was different between mice treated with emicizumab or FVIII. The interval between the initiation of fibrin and FXIIIa formation was longer in animals receiving emicizumab than in those treated with FVIII (Figure 3). This suggests that the non-covalent po-lymerization of fibrin profibrils continues over a longer period before FXIIIa starts making covalent connections. Furthermore, the generation of FXIIIa was more efficient in the presence of emicizumab, indicating that larger amounts of FXIIIa are available and more covalent connections can be made. These changes in kinetics could potentially contribute to the altered fibrin-network formation. The kinetics by which FXIII is activated has indeed been reported to have an important effect on the final structure of the fibrin network. For instance, the Val34Leu polymorphism in FXIII is associated with accelerated activation by thrombin, and results in a fibrin meshwork with thinner fibers and reduced porosity.^{31,32}

It should be noted that there are discordant data regarding the formation of the fibrin network in the presence of emicizumab. Shimonishi *et al.* reported that the activated partial thromboplastin time reagent-triggered fibrin network generated *in vitro* in the presence of emicizumab was similar to that of FVIII-induced fibrin.¹⁶ In contrast, Janbain *et al.* found that fibrin fibers produced in the presence of emicizumab were almost 2-fold thinner than those pro-

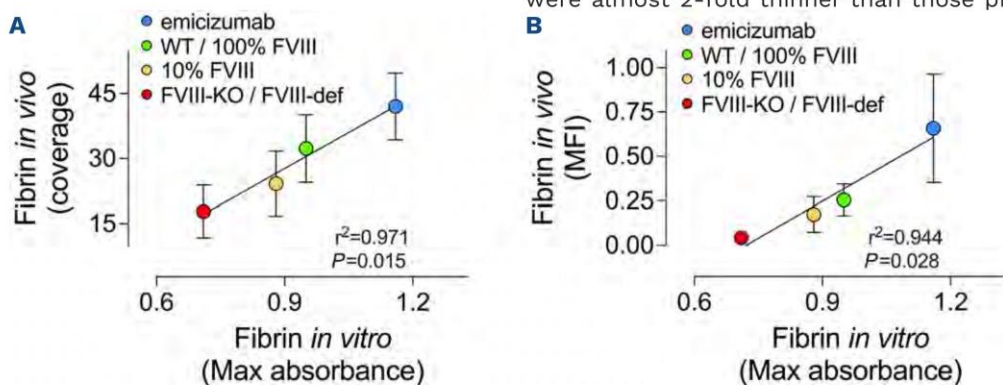


Figure 7. Correlation between *in vitro* and *in vivo* fibrin generation. (A) The amount of fibrin generated *in vivo* (evaluated as fibrin coverage) under different conditions (data presented in Figure 4 and *Online Supplementary Figure S3*) was plotted against the amount of fibrin generated *in vitro* (evaluated as maximal [max] absorbance; data presented in Figure 3). (B) The amount of fibrin generated *in vivo* (evaluated as mean fluorescence intensity [MFI]) under different conditions (data presented in Figure 5) was plotted against the amount of fibrin generated *in vitro* (evaluated as maximal [max] absorbance; data presented in Figure 3). Red symbol: FVIII-KO mice *versus* FVIII-deficient plasma; orange symbol: FVIII-KO mice receiving 10 IU/dL rFVIII *versus* FVIII-deficient plasma spiked with 10 IU/dL rFVIII; green symbol: wild-type mice *versus* FVIII-deficient plasma spiked with 100 IU/dL rFVIII; blue symbol: FVIII-KO mice receiving emicizumab (55 µg/mL) *versus* FVIII-deficient plasma spiked with emicizumab (55 µg/mL). WT: wild-type; FVIII: factor VIII; FVIII-KO: factor VIII knockout mice; FVIII-def: factor VIII-deficient.

duced in the presence of FVIII at a concentration of 10 IU/dL.^{17,33} When comparing the protocols to obtain scanning electron microscopy images to analyze the fibrin structure, it appears that each of these studies used a different protocol for dehydration. Differences in dehydration protocols may affect how fibers are represented within the scanning electron microscopy images. Second, artificial activating reagents were used in the *in vitro* studies by Shimonishi et al. and Janbain et al., whereas the fibrin structures in our study were obtained from clots generated *in vivo*, a more physiological environment that also contains other blood components (red blood cells, platelets). Each of these blood components contributes to the formation of the fibrin network and its ultimate structure.³⁴

As far as concerns the consequences of different clot architecture, it is tempting to speculate that the unstable clots originate from a modified fibrin network. Although no direct evidence is provided in this study, the presented *in vivo* data are compatible with this scenario. In particular, a dense fibrin structure may modify the biomechanical properties of a clot, and the unusual thick fibers may reduce the clot's elasticity.³⁵ Such increased rigidity seems in keeping with the re-bleeds that are observed upon clot removal in emicizumab-treated mice, but not rFVIII- or rFVIII-Fc-treated mice (Figure 2).

In conclusion, rFVIII and rFVIII-Fc act similarly regarding clot formation and structure. In contrast, the different mode of action of emicizumab alters the kinetics of fibrin and FXIIIa

formation, resulting in different clot morphologies. We are aware that these data represent only part of the differences that may occur in FVIII- versus emicizumab-dependent clot formation. Additional studies are in progress aiming to expand our notion of how non-factor molecules, such as emicizumab, modify clot architecture and, therefore, the process of hemostasis.

Disclosures

PJL receives research support (paid to the institute) from Sobi, Roche, Pfizer and Sanofi. XH is co-owner of CryoCapCell.

Contributions

TS, HM, VM, XH, JD and PJL performed experiments and analyzed data. CEE provided the patient's data; ODC, CVD, CC and PJL designed and supervised the study. All authors contributed to the interpretation of the data. PJL wrote the first draft of the manuscript, and all authors contributed to editing the final manuscript.

Funding

This study was supported by a research grant to the institute from Sobi.

Data-sharing statement

Data are available upon reasonable request to the corresponding author.

References

- Versteeg HH, Heemskerk JW, Levi M, Reitsma PH. New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev*. 2013;93(1):327-358.
- Wolberg AS, Sang Y. Fibrinogen and factor XIII in venous thrombosis and thrombus stability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2022;42(8):931-941.
- Sillen M, Declerck PJ. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI): an updated narrative review. *Int J Mol Sci*. 2021;22(7):3670.
- Domingues MM, Macrae FL, Duval C, et al. Thrombin and fibrinogen gamma' impact clot structure by marked effects on intrafibrillar structure and protofibril packing. *Blood*. 2016;127(4):487-495.
- Lenting PJ, van Mourik JA, Mertens K. The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function. *Blood*. 1998;92(11):3983-3996.
- Mancuso ME, Mahlangu JN, Pipe SW. The changing treatment landscape in haemophilia: from standard half-life clotting factor concentrates to gene editing. *Lancet*. 2021;397(10274):630-640.
- Sankar AD, Weyand AC, Pipe SW. The evolution of recombinant factor replacement for hemophilia. *Transfus Apher Sci*. 2019;58(5):596-600.
- Weyand AC, Pipe SW. New therapies for hemophilia. *Blood*. 2019;133(5):389-398.
- Oldenburg J, Mahlangu JN, Kim B, et al. Emicizumab prophylaxis in hemophilia A with inhibitors. *N Engl J Med*. 2017;377(9):809-818.
- Mahlangu J, Oldenburg J, Paz-Priel I, et al. Emicizumab prophylaxis in patients who have hemophilia A without inhibitors. *N Engl J Med*. 2018;379(9):811-822.
- Callaghan MU, Negrier C, Paz-Priel I, et al. Long-term outcomes with emicizumab prophylaxis for hemophilia A with or without FVIII inhibitors from the HAVEN 1-4 studies. *Blood*. 2021;137(16):2231-2242.
- Mahlangu J, Iorio A, Kenet G. Emicizumab state-of-the-art update. *Haemophilia*. 2022;28 Suppl 4(Suppl 4):103-110.
- Batsuli G, Wheeler AP, Weyand AC, Sidonio RF Jr, Young G. Severe muscle bleeds in children and young adults with hemophilia A on emicizumab prophylaxis: real-world retrospective multi-institutional cohort. *Am J Hematol*. 2023;98(10):E285-E287.
- Lenting PJ, Denis CV, Christophe OD. Emicizumab, a bispecific antibody recognizing coagulation factors IX and X: how does it actually compare to factor VIII? *Blood*. 2017;130(23):2463-2468.
- Zong Y, Antovic A, Soutari NMH, Antovic J, Pruner I. Synergistic effect of bypassing agents and sequence identical analogue of emicizumab and fibrin clot structure in the *in vitro* model of hemophilia A. *TH Open*. 2020;4(2):e94-e103.
- Shimonishi N, Nogami K, Ogiwara K, et al. Emicizumab improves the stability and structure of fibrin clot derived from factor VIII-deficient plasma, similar to the addition of factor VIII. *Haemophilia*. 2020;26(3):e97-e105.

17. Janbain M, Enjolras N, Bolbos R, Brevet M, Bordet JC, Dargaud Y. Haemostatic effect of adding tranexamic acid to emicizumab prophylaxis in severe haemophilia A: a preclinical study. *Haemophilia*. 2021;27(6):1002-1006.
18. Schultz NH, Glosli H, Bjornsen S, Holme PA. The effect of emicizumab and bypassing agents in patients with hemophilia - an in vitro study. *Res Pract Thromb Haemost*. 2021;5(5):e12561.
19. Bravo MI, Raventos A, Perez A, Costa M, Willis T. Non-additive effect on thrombin generation when a plasma-derived factor VIII/von Willebrand factor (FVIII/VWF) is combined with emicizumab in vitro. *J Thromb Haemost*. 2020;18(8):1934-1939.
20. Dargaud Y, Lienhart A, Janbain M, Le Quellec S, Enjolras N, Negrier C. Use of thrombin generation assay to personalize treatment of breakthrough bleeds in a patient with hemophilia and inhibitors receiving prophylaxis with emicizumab. *Haematologica*. 2018;103(4):e181-e183.
21. Kizilocak H, Marquez-Casas E, Phei Wee C, Malvar J, Carmona R, Young G. Comparison of bypassing agents in patients on emicizumab using global hemostasis assays. *Haemophilia*. 2021;27(1):164-172.
22. Atsou S, Schellenberg C, Lagrange J, et al. Thrombin generation on vascular cells in the presence of factor VIII and/or emicizumab. *J Thromb Haemost*. 2023 Sep 29. [Epub ahead of print].
23. Ferriere S, Peyron I, Christophe OD, et al. A hemophilia A mouse model for the in vivo assessment of emicizumab function. *Blood*. 2020;136(6):740-748.
24. Johansen PB, Tranholm M, Haaning J, Knudsen T. Development of a tail vein transection bleeding model in fully anaesthetized haemophilia A mice - characterization of two novel FVIII molecules. *Haemophilia*. 2016;22(4):625-631.
25. Rawle FE, Lillicrap D. Preclinical animal models for hemophilia gene therapy: predictive value and limitations. *Semin Thromb Hemost*. 2004;30(2):205-213.
26. Lozier JN, Nichols TC. Animal models of hemophilia and related bleeding disorders. *Semin Hematol*. 2013;50(2):175-184.
27. Locke M, Receveur N, Kiialainen A, David T. In vitro investigation of emicizumab efficacy and mode of action in vWD type 2 and 3 samples. *Res Pract Thromb Haemost*. 2022;6(S1):630.
28. Adamkewicz JI, Chen DC, Paz-Priel I. Effects and interferences of emicizumab, a humanised bispecific antibody mimicking activated factor VIII cofactor function, on coagulation assays. *Thromb Haemost*. 2019;119(7):1084-1093.
29. Antovic A, Mikovic D, Elezovic I, Zabczyk M, Huttenby K, Antovic JP. Improvement of fibrin clot structure after factor VIII injection in haemophilia A patients treated on demand. *Thromb Haemost*. 2014;111(4):656-661.
30. Wolberg AS, Allen GA, Monroe DM, Hedner U, Roberts HR, Hoffman M. High dose factor VIIa improves clot structure and stability in a model of haemophilia B. *Br J Haematol*. 2005;131(5):645-655.
31. Ariens RA, Philippou H, Nagaswami C, Weisel JW, Lane DA, Grant PJ. The factor XIII V34L polymorphism accelerates thrombin activation of factor XIII and affects cross-linked fibrin structure. *Blood*. 2000;96(3):988-995.
32. Kattula S, Bagoly Z, Toth NK, Muszbek L, Wolberg AS. The factor XIII-A Val34Leu polymorphism decreases whole blood clot mass at high fibrinogen concentrations. *J Thromb Haemost*. 2020;18(4):885-894.
33. Janbain M, Enjolras N, Bordet JC, et al. Hemostatic effect of tranexamic acid combined with factor VIII concentrate in prophylactic setting in severe hemophilia A: a preclinical study. *J Thromb Haemost*. 2020;18(3):584-592.
34. Leong L, Chernysh IN, Xu Y, et al. Clot stability as a determinant of effective factor VIII replacement in hemophilia A. *Res Pract Thromb Haemost*. 2017;1(2):231-241.
35. Feller T, Connell SDA, Ariens RAS. Why fibrin biomechanical properties matter for hemostasis and thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2022;20(1):6-16.

Supplementary materials

Differences in venous clot structures between hemophilic mice treated with emicizumab versus factor VIII or factor VIII Fc

Thibaud Sefiane et al.

Supplementary methods

Animals and ethics statement

F8-deficient mice¹ were backcrossed (>10 times) on a C57Bl/6 background. Males and females were used throughout the study (8-12 weeks old, 20-25 g). Housing and experiments were performed in accordance with French regulations and the experimental guidelines of the European Community. This project was approved by the local ethical committee of Université Paris-Saclay (Comité d'Ethique en Experimentation Animale n°26, protocol APAFIS#26510-202007061525281 v2).

Patient information

A 2-year-old boy with severe haemophilia A (FVIII <1%) on regular prophylaxis with emicizumab (6 mg/kg every 4 weeks, subcutaneously) since the age of 8 months (*per* policy of the local treatment center). The patient had no relevant bleeding history and has no history of FVIII inhibitors. He experienced a first small muscle bleed after intramuscular vaccination at the age of 2 months, which was treated with standard half-life rFVIII. A second bleed at the age of 5 months due to an injury of his finger, was also treated with standard half-life rFVIII. The patient has no comorbidities or other chronic treatment besides emicizumab. While on emicizumab, the patient had zero treated bleeds, but reported three non-treated bleeds (post-traumatic haematoma, small wound and dentition, for the latter of which the patient received additional tranexamic acid). The incidence described in this study concerns a glass-induced deep laceration at his left foot.

Proteins & materials

Emicizumab (marketed under Hemlibra) was from F. Hoffman-La Roche (Basel, Switzerland). Recombinant factor IX (FIX, Benefix) was from Pfizer (Paris, France). Plasma-derived factor X (FX) was from Cryoep (Montpellier, France). Recombinant factor VIII (rFVIII, Advate) was from Shire France SAS (Paris, France). Recombinant FVIII Fc (rFVIII Fc, Elocta) was from Sobi (Stockholm, Sweden). Tranexamic acid was from Mylan (Paris, France), and generously provided by Dr. Dominique Lasne. DAPI and Alexafluor 647-labeled chicken anti-goat antibodies were from Invitrogen (Saint Aubin, France). Polyclonal rabbit anti-human Fc was from Synobiological (Düsseldorf, Germany). Polyclonal goat anti-mouse fibrin antibodies (cat#

YNGMFBG7S) were from Accurate chemical (Carle Place, NY). Although categorized as anti-murine fibrinogen antibodies, these antibodies recognize fibrin and cross-linked fibrin but not murine fibrinogen in Elisa and tissue sections. STAR RED-labeled donkey anti goat antibodies used for Stimulated Emission Depletion (STED)-microscopy were from Abberior (Göttingen, Germany). FVIII-deficient plasma and purified fibrinogen (depleted for VWF and fibrin) were from Stago BNL (Leiden, the Netherlands). Fluorescent substrate A101 for FXIIIa was from Interchim (Montluçon, France).

Emicizumab-compatible mouse model

Mice were given emicizumab via retro-orbital intravenous injection 24 h before tail vein-transection (TVT) to obtain plasma concentrations of 55 µg/ml at the time of the transection.² A second retro-orbital injection was given 5 min before the TVT-procedure, using a solution containing human FIX and FX (both 100 U/kg).

FVIII-mediated correction of bleeding

Mice were given rFVIII or rFVIII-Fc (100 µl volume) via retro-orbital injection 5 min before TVT to obtain plasma concentrations of 10 IU/dl at the time of the transection.

Tail vein-transection

For the tail vein-transection (TVT)-procedure, mice were anesthetized with isoflurane and a precise cut of the caudal tail vein was performed as described.³ After vein transection, the tail was immediately immersed in physiological saline, prewarmed at 37 °C. At the end of the assay (45 min observation time) animals were sacrificed by cervical dislocation. Mean values of the blood loss volume (µl) were reported. The mixture of collected blood and physiological saline was centrifuged at 1,500 g. The red blood cell pellet was then lysed in H₂O and the amount of hemoglobin was determined by reading the absorbance at 416 nm. The volume of blood loss in each sample was calculated from a standard curve, which was obtained by lysing defined volumes of mouse blood (20-40-60-80-100 µl) in H₂O to extract hemoglobin.

Fibrin formation

Fibrin formation experiments were performed in half-well microtiter-plates in a volume of 100 µl. Mixtures consisted of FVIII-deficient plasma (50 µl), purified fibrinogen (40 µl of 2.5 mg/ml), and rFVIII, rFVIII-Fc or emicizumab (5 µl of 200 IU/dl to reach 10 IU/dl rFVIII or rFVIII-Fc; 5 µl of 2000 IU/dl to reach 100 IU/dl rFVIII or rFVIII-Fc; 5 µl of 1.1 mg/ml to reach 55 µg/ml emicizumab). The reaction was started by the addition of CaCl₂ (5 µl/well). OD at 405 nm was measured every 30 sec for a 2 h period.

FXIIIa generation

FXIIIa generation experiments were performed in half-well microtiter-plates in a volume of 100 μ l. Mixtures consisted of FVIII-deficient plasma (50 μ l), purified fibrinogen (40 μ l of 2.5 mg/ml), and rFVIII, rFVIII-Fc or emicizumab (5 μ l of 200 IU/dl to reach 10 IU/dl rFVIII or rFVIII-Fc; 5 μ l of 2000 IU/dl to reach 100 IU/dl rFVIII or rFVIII-Fc; 5 μ l of 1.1 mg/ml to reach 55 μ g/ml emicizumab). The reaction was started by the addition of CaCl_2 (5 μ l/well). FXIIIa generation was monitored using fluorescent substrate A101 (excitation 313 nm; emission 418 nm).

Scanning electron microscopy

Dehydration-preparation: 10 min after the TVT-procedure, the whole tail was dissected and immediately immersed in 4% PFA/1% glutaraldehyde and fixed overnight at 4 °C. Preparation of the sections for analysis was performed essentially as described.⁴ A 1-cm tail section centered around the injury was progressively dehydrated via serial alcohol incubations: 2x 10 min in 50% ethanol, 2x 10 min in 70% ethanol, 2x 10 min in 95% ethanol, 3x 15 min in 100% ethanol. All incubation were performed under gentle agitation. Dehydrated sections were dried using hexamethyldisilazane (HMDS) as follows: 15 min in 2:1 100% ethanol/HMDS, 15 min in 1:1 100% ethanol/HMDS, 15 min in 1:2 100% ethanol/HMDS and 3x 15 min in HMDS. Samples were metallized using a sputtering device (Balzers Sputter Coater SCD 050; Leica) with the following setting: 10 nm of silver; 120 seconds at 5 cm; 30 mA.

Samples were immediately analyzed using a Philips XL-Environmental Scanning Electron Microscope.

Immunostaining of fibrin

The whole tail was dissected 10 min after the TVT-procedure, immediately immersed in 4% paraformaldehyde (PFA), and fixed overnight at 4 °C. A 1-cm tail section centered around the injury was prepared and washed for 2h in PBS and embedded in Tissue-Tek optimum-cutting temperature (OCT)-compound. Tissues sections of 7 μ m were collected using a cryostat (Leica) on glass slides. Staining of fibrin was performed using polyclonal goat antibodies against murine fibrin/fibrinogen (6 μ g/ml) and Alexafluor 647-labeled chicken anti-goat antibodies (4 μ g/ml). Images were obtained using high-resolution tiling reconstruction using spinning disk confocal microscopy (Olympus IX73 equipped with CrestOptics X-Light V1) as described previously.⁵ Quantification of immunofluorescence was performed using ImageJ-software.

Stimulated Emission Depletion (STED)-microscopy

Tissues sections were generated and stained for fibrin as described under “Immunostaining for fibrin”, with the exception that STAR RED-labeled donkey anti goat antibodies (5 µg/ml) were used as secondary antibody. STED microscopy was performed on the Stedycon system (Abberior Instruments, Göttingen, Germany) composed of an AxioObserver 7 inverted microscope (Zeiss, Germany).⁶

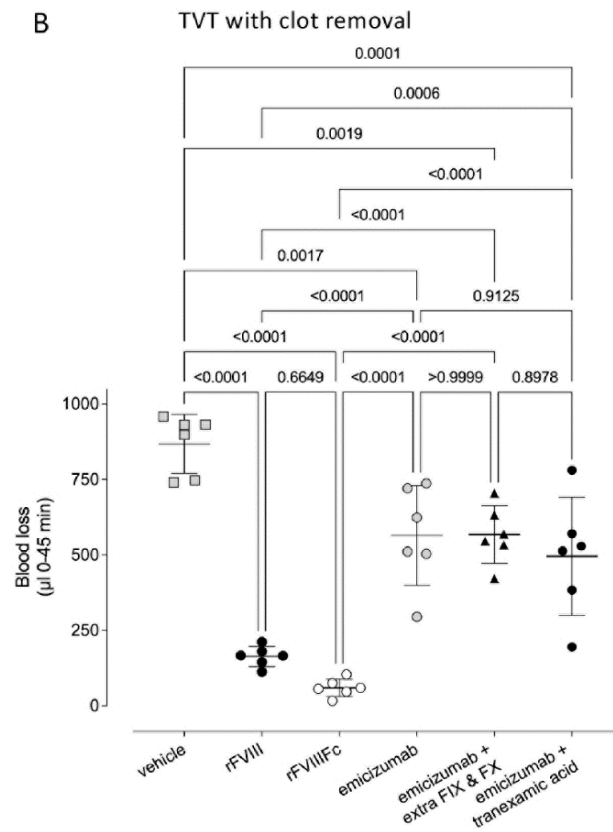
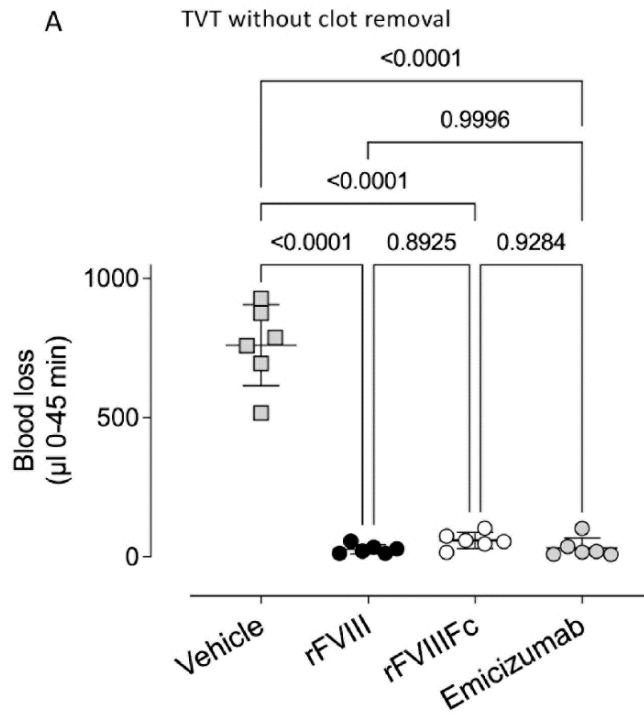
Image analysis

Image analysis was performed using ImageJ-software. DiameterJ-plugin was used for the analysis of the Scanning-EM images of the fibrin-network.

Statistical analysis

All data are presented as mean±standard deviation (mean±SD) unless indicated otherwise. Number (*n*) refer to the number of independent experiments or animals. The statistical analysis was performed using GraphPad Prism 9 software for Mac (La Jolla, California, USA). One-way analysis of variance (1-way ANOVA) followed by Tukey’s or Dunnett’s multiple comparison test was performed when comparing multiple groups. Pairwise analysis was performed using the unpaired Student’s t-test or the Mann-Whitney test, where appropriate. $P < 0.05$ was considered as statistically significant.

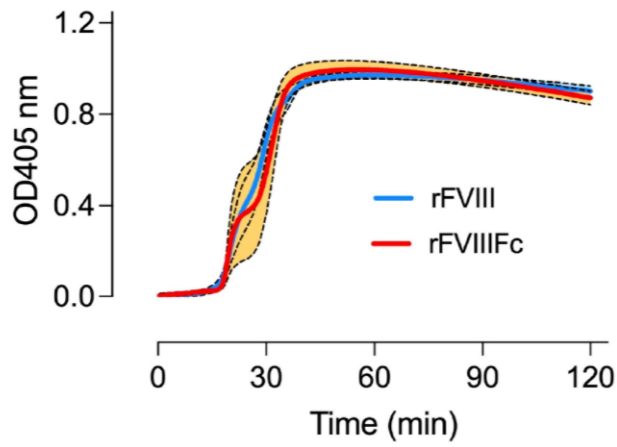
Supplementary figure S1



Supplementary figure S1: Blood loss in FVIII-deficient mice after treatment with rFVIII, rFVIII Fc or emicizumab.

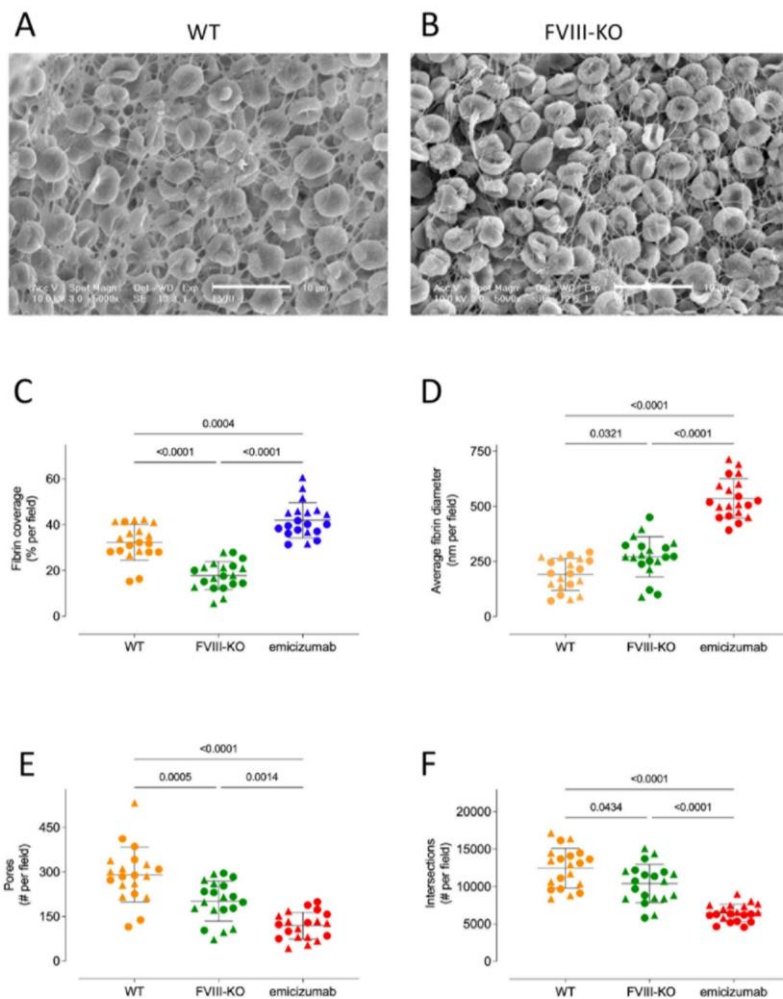
At a tail-diameter of 2.3 mm, an incision with a depth of 0.5 mm in the left lateral vein was made, and blood loss was monitored for 45 min. Mice were given emicizumab 24 h before injury, allowing plasma concentrations of 55 µg/ml at the start of the TVT-procedure. In addition, mice received human factor IX and factor X (both 100 IU/kg) 5 min before injury. Concentrations of rFVIII and rFVIII Fc were 10 IU/dl at the time of injury. *Panel A:* Blood loss in mice without clot removal. *Panel B:* At 15 min and 30 min after injury, the clot was removed via gentle wiping, but only if the mouse was not bleeding at that particular moment. One series of mice (Emicizumab + extra FIX & FX) received additional FIX/FX at a dose of 100 IU/kg at 12 min after injury, *ie.* 3 min before the first clot removal. A second series of mice (Emicizumab + tranexamic acid) received tranexamic acid at a dose of 10 mg/kg at 5 min before injury. Statistical analysis was performed via One-way ANOVA with Tukey's correction for multiple comparisons.

Supplementary figure S2



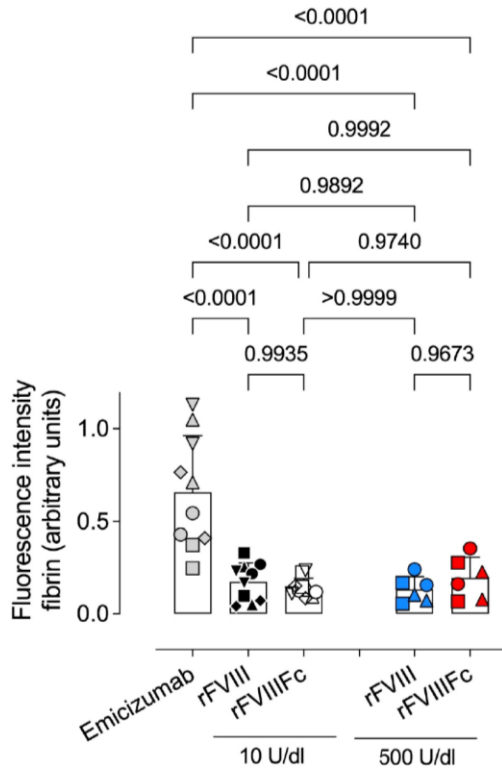
Legend Supplementary figure S2: In vitro fibrin formation comparing rFVIII to rFVIII Fc. FVIII-deficient plasma was supplemented with rFVIII or rFVIII Fc at 100 IU/dl. In addition, fibrinogen was added (1 mg/ml final concentration) and the reaction was initiated by the addition of CaCl_2 . No other additives (tissue factor or factor XIa) were used. Fibrin formation was detected by monitoring OD-values at 405 nm. Blue line: rFVIII and red line: rFVIII Fc. Presented are the mean (solid lines) and standard error (orange-colored areas around the solid line) of 6-8 measurements.

Supplementary figure S3



Legend Supplementary Figure S3: Scanning-EM imaging of *in vivo* generated fibrin networks. *Panel A-B:* Tail fragments obtained 10 min after TVT were prepared for scanning-EM using standard pre-fixation with 4% glutaraldehyde and 1% OsO₄ and dehydration. Presented are representative images of wild-type (WT; *panel A*) and FVIII-deficient (FVIII-KO; *panel B*) mice. Scale bars represent 10 microns. *Panels C-F:* ImageJ-plugin software was used to determine fibrin coverage (% per field; *panel C*), average fibrin diameter (in micron per field; *panel D*), number of pores per field (*panel E*) and the number of intersections per field (*panel F*). For each graph, 2 mice were included (round and triangle symbols) and 10 fields per mouse were examined. Each symbol represents the result of a single field. Data for emicizumab (presented in Figure 4D-G) are included for comparison. Statistical analysis was performed using One-way ANOVA with Tukey's test for multiple comparisons.

Supplementary figure S4



Legend Supplementary figure S4: Fibrin content within the injured area. Tail tissue sections obtained 10 min after TVT of FVIII-deficient mice that were given rFVIII, rFVIII Fc or emicizumab were prepared for immunofluorescence staining using an anti-mouse fibrin antibody. Plasma concentrations at the start of the procedure were 10 IU/dl or 500 IU/dl for rFVIII (black and blue symbols, respectively) and rFVIII Fc (white and red symbols, respectively) and 55 μ g/ml for emicizumab (grey symbols). For each condition, two non-subsequent tissue sections of five mice (represented by square, round, diamond, up-triangle and down-triangle symbols) were analyzed using ImageJ-software for the fluorescence intensity. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA with Tukey's corrections for multiple comparisons. Each symbol represents a tissue section of an individual mice, and mean \pm SD are indicated for each condition. Data for emicizumab and 10 IU/dl for rFVIII and rFVIII Fc are identical to those presented in figure 5.

Supplementary references

1. Bi L, Lawler AM, Antonarakis SE, High KA, Gearhart JD, Kazazian HH, Jr. Targeted disruption of the mouse factor VIII gene produces a model of haemophilia A. *Nat Genet.* 1995;10(1):119-21.
2. Ferriere S, Peyron I, Christophe OD, et al. A hemophilia A mouse model for the in vivo assessment of emicizumab function. *Blood.* 2020;136(6):740-748.
3. Johansen PB, Tranholm M, Haaning J, Knudsen T. Development of a tail vein transection bleeding model in fully anaesthetized haemophilia A mice - characterization of two novel FVIII molecules. *Haemophilia.* 2016.
4. Takaku Y, Suzuki H, Kawasaki H, et al. A modified 'NanoSuit(R)' preserves wet samples in high vacuum: direct observations on cells and tissues in field-emission scanning electron microscopy. *R Soc Open Sci.* 2017;4(3):160887.
5. Wohner N, Muczynski V, Mohamadi A, et al. Macrophage scavenger receptor SR-AI contributes to the clearance of von Willebrand factor. *Haematologica.* 2018;103(4):728-737.
6. Crozet F, Letort G, Bulteau R, et al. Filopodia-like protrusions of adjacent somatic cells shape the developmental potential of oocytes. *Life Sci Alliance.* 2023;6(6) e202301963.

Article III

Une équivalence facteur VIII "absolue" est illusoire en présence des thérapies non-substitutives de l'hémophilie A

Thibaud Sefiane, Geneviève McCluskey, Marie Clavel, Hortense Maynadié, Ivan Peyron, François Saller, Mariem Khamari, Cécile V. Denis, Olivier D. Christophe, Caterina Casari, Peter J. Lenting

Manuscrit en cours de finalisation

Contexte et objectifs :

L'apparition d'inhibiteurs du FVIII chez 30 % des patients atteints d'hémophilie A a mené à repenser la prise en charge de ces patients. La mise sur le marché de l'emicizumab a permis l'apparition d'une alternative thérapeutique de choix pour les patients hémophiles avec ou sans inhibiteurs. Comme nous l'avons décrit précédemment, d'autres approches non substitutives sont actuellement en cours d'évaluation clinique. Parmi celles-ci, une des approches les plus proches d'une mise sur le marché est le ciblage d'une protéine anticoagulante -le TFPI- par des anticorps capables d'inhiber son action (concizumab, marstacimab,..).

L'une des principales interrogations concernant ces nouvelles thérapies non-substitutives est la manière de les comparer au FVIII, que ce soit pour étudier leurs modes d'actions mais également pour évaluer leur activité. Une des méthodes qui a été utilisée pour étudier l'emicizumab est l'utilisation détournée des tests d'activité du FVIII, comme le test chromogénique et le test chromométrique ainsi que les tests globaux d'hémostase comme la génération de thrombine. La synthèse des résultats rapportés montre que l'équivalence en termes de FVIII pour l'emicizumab est variable et dépendante du test utilisé. Ces résultats sont imputables au fait que le mode d'action d'emicizumab est différent de celui du FVIII rendant emicizumab difficilement adaptable aux tests existants et à leurs spécificités. De ce fait, les tests *in vitro* de mesure de l'activité du FVIII ne sont pas en mesure de nous permettre de déterminer une équivalence absolue entre le FVIII et les thérapies non-substitutives.

L'objectif de notre étude a été d'évaluer s'il était possible de déterminer *in vivo* dans un modèle de souris déficiente en FVIII, une équivalence absolue entre le FVIII et deux thérapies de remplacement : l'emicizumab et un analogue de séquence du marstacimab. Pour cela, nous avons comparé les deux thérapies dans quatre modèles de saignement de sévérité croissante afin d'évaluer leur effet sur la correction du saignement : TVT, TAT, veine saphène et tail-clip.

Nous avons pu observer que l'équivalence en termes de FVIII observée pour l'emicizumab et l'analogue de séquence du marstacimab était différente en fonction du modèle de saignement utilisé. Les analyses *in vivo* et *in vitro* de l'équivalence en termes de FVIII de ces thérapies nous ont conduit à proposer qu'il était illusoire de vouloir déterminer une équivalence absolue et qu'il serait plus pertinent de définir un intervalle d'activité FVIII pour ces thérapies non-substitutives.

A consistent in vivo factor VIII-equivalence is unlikely to exist for non-factor therapies

Thibaud Sefiane¹, Geneviève McCluskey¹, Marie Clavel², Hortense Maynadié¹, Ivan Peyron¹, François Saller¹, Mariem Khamari¹, Cécile V. Denis¹, Olivier D. Christophe¹, Caterina Casari¹, Peter J. Lenting¹

¹Université Paris-Saclay, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Hémostase inflammation thrombose U1176, 94276, Le Kremlin-Bicêtre, France

Correspondence:

Peter J. Lenting, Inserm U1176, 80 rue du Général Leclerc, 94270 Le Kremlin-Bicetre, France

Tel: +331-49595600; Fax: +331-46719472; Email: peter.lenting@inserm.fr

Running title: non-factor therapies and FVIII-equivalence

Data sharing statement: Data are available upon reasonable request to the corresponding author

Word count: 3177; **Abstract:** lacking so far; **References:** 35; **Figures/tables:**

Introduction

The clinical management of hemophilia A has experienced major advances over the past decade.¹ Particularly, the development of non-factor therapies has changed the treatment paradigm, which was previously dominated by factor VIII (FVIII)-replacement therapy. One example hereof is emicizumab, a bispecific antibody that binds both the enzyme FIXa and its substrate FX, thereby mimicking part of the FVIIIa function.²⁻⁴ Emicizumab allows therefore the generation of a certain amount of thrombin without completely correcting coagulation. Clinical studies have shown marked therapeutic benefit of emicizumab, with average annual bleeding rates being below 2 among patients treated with emicizumab prophylactically.⁵ Because of its efficacy and its subcutaneous mode of application, increasing numbers of hemophilia A patients are using emicizumab as prophylactic therapy.⁶ A second example concerns the strategy to restore hemostasis by interfering with anticoagulant molecules, such as tissue factor pathway inhibitor (TFPI). Several anti-TFPI monoclonal antibodies are currently in advanced clinical evaluation, including concizumab and marstacimab, and promising data on distinctly reduced bleeding complications have been reported.⁷⁻⁹

One issue that often returns in discussions on non-factor therapies is how they compare to FVIII in terms of mode of action and, perhaps more importantly, activity (referred to as FVIII-equivalence). One way to compare these non-factor agents to FVIII is to test them in FVIII-activity assays, like one-stage clotting assays, chromogenic FVIII-activity assays and global hemostasis assays (thrombin generation assays, rotational thrombo-elastometry). However, for emicizumab it has been shown that a different FVIII-equivalence has been found dependent on the activity assay used.¹⁰⁻¹² Indeed, based on their mode of action being different from FVIII, it is unlikely that *in vitro* assays could provide an absolute FVIII-equivalence for non-factor molecules.

Here, we explored *in vivo* testing of non-factor molecules to evaluate whether or not an absolute FVIII-equivalence exists for these agents. To this end, we used several different bleeding models in which emicizumab and a sequence-identical analogue of marstacimab (SIA-marstacimab) were compared to FVIII for their capacity to correct bleeding. We noticed that dependent on the bleeding model that was used, emicizumab and SIA-marstacimab displayed a different FVIII-equivalence. These observations led us propose that the idea of a FVIII-equivalence for non-factor molecules is unrealistic, and that we probably should consider a range of FVIII-activities to which non-factor molecules may compare.

Materials and methods

Ethics statement

All experiments were performed using FVIII-deficient mice¹³ which were backcrossed (>10 times) on a C57Bl/6 background and their wild-type littermates. Male and female mice were used throughout the study (8-12 weeks old, 20-25 g). Animal housing and experiments were performed in accordance with French regulations and the experimental guidelines of the European Community. This project was approved by the local ethical committee of Université Paris-Saclay (Comité d'Ethique en Experimentation Animale n°26, protocols APAFIS#26333-2020070214599234-v1, APAFIS#26510-202007061525281-v2, APAFIS#38228-202208021331789-v2 and APAFIS #37499-2022052712138879-v3).

Proteins

Recombinant FVIII (Advate) was obtained from Shire France SAS (Paris, France). Emicizumab (marketed as Hemlibra) was obtained from F. Hoffman-La Roche (Basel, Switzerland). Sequence identical analogue (SIA)-marstacimab was produced via transient expression in HEK293F-cells, and purified to homogeneity via protein A-affinity chromatography.

Tail vein transection model

For the tail vein-transection (TVT)-procedure, mice were anesthetized with isoflurane and a precise cut of the caudal tail vein with the support of a template was performed as described.¹⁴ After vein transection, the tail was immediately immersed in physiological saline, prewarmed at 37°C. Twice during the observation period (at 15 and 30 min after transection), occlusive clots were dislodged using a humidified compress to reinitiate bleeding. Animals were sacrificed by cervical dislocation at the end of the assay.

Tail artery-transection model

For the tail artery-transection (TAT)-model, a similar approach was used as for the TVT-procedure, except that the template was used to transect the tail artery. In addition, the observation time was limited to 30 min. At 15 min after transection, occlusive clots were dislodged using a humidified

compress to reinitiate bleeding. Animals were sacrificed by cervical dislocation at the end of the assay.

Tail clip-model

Mice were anesthetized using ketamine (100 mg/kg)/xylazine (10 mg/kg). The terminal 3 mm of the tail were removed, and the tail was immersed in pre-warmed physiological saline (37°C), and blood was collected for 30 minutes. Animals were sacrificed by cervical dislocation at the end of the assay.

Saphenous vein puncture-model

The saphenous vein puncture (SVP)-model was performed as described elsewhere with mice being under isoflurane anesthesia.¹⁵ Under observation with an operating microscope, the saphenous vein was exposed and the initial injury was inflicted by puncturing the saphenous vein with a 23-gauge needle. When hemostasis occurred, the injury was enlarged to 1 mm using micro-scissors. Subsequently, clots were dislodged using a humidified compress to reinitiate bleeding. The total number of clots formed (hemostatic events) within a 30-min period was recorded. In this model, higher numbers of reforming clots correspond to better hemostatic control/capacity.

Measuring blood loss

The mixture of collected blood and physiological saline was centrifuged at 1,500 *g*. The red blood cell pellet was then lysed in H₂O and the amount of hemoglobin was determined by reading the absorbance at 416 nm. The volume of blood loss in each sample was calculated from a standard curve, which was obtained by lysing defined volumes of mouse blood (20-40-60-80-100 µl) in H₂O to extract hemoglobin.

Measuring bleeding profile

For the TVT-, TAT- and tail clip-models, periods of bleeding and non-bleeding were noted in order to visualize the bleeding pattern.

Treatments

FVIII was given via intra-orbital injection 5 min before injury. Dosages were as follows: TVT-model 0, 2.5 and 5.0 IU/kg, TAT-model: 0, 2.5, 5.0 and 10 IU/kg, tail clip-model: 0, 2.5, 5.0, 7.5 and 10 IU/kg, SVP-model: 0, 2.0, 10, 25 IU/kg. SIA-marstacimab was given as a single intravenous bolus (intra-orbital) at a dose of 6 mg/kg 5 min before injury, allowing for plasma levels at the start of the procedures to be 16 µg/ml. Emicizumab was given as a single intravenous bolus (intra-orbital) at a dose of 5 mg/kg 24 h before injury, allowing for plasma levels at the start of the procedures to be 57±4 µg/ml. Since emicizumab does not react with murine factors IX and X, human factors IX and X were given intravenously 5 min before injury at a dose of 100 U/kg each.¹⁶

Statistical analysis

Analysis of blood loss between groups was performed using one-way ANOVA with Tukey's correction for multiple comparisons (all versus all). A list of p-values for each comparison is provided in Tables 1-4.

Results

FVIII dose response in different bleeding models

The efficacy of FVIII to arrest bleeding similar to wild-type mice was explored in four different bleeding models using FVIII-deficient mice. First, we found that a dose of 2.5 IU FVIII/kg (which results in 5 IU/dl in plasma) proved sufficient to arrest bleeding to the level of wild-type mice in the tail vein-transection (TVT)-model ($63\pm 31\ \mu\text{l}$ ($n=7$; mean \pm SD) and $70\pm 34\ \mu\text{l}$ ($n=12$), respectively; $p=1.0$; Figure 1A; all p-values are summarized in Table 1-4). Upon tail artery-transection (TAT), blood loss was no longer different from that of wild-type littermates at a dose of 5 IU/kg (resulting in 10 IU/dl FVIII): $321\pm 137\ \mu\text{l}$ ($n=15$) and $183\pm 76\ \mu\text{l}$ ($n=15$), respectively ($p=0.156$; Figure 1B). Regarding the tail clip-model, a dose of 7.5 IU/kg (corresponding to 15 IU/dl FVIII) was required to reach wild-type levels of blood loss: $174\pm 219\ \mu\text{l}$ ($n=8$) and $32\pm 25\ \mu\text{l}$ ($n=19$), respectively ($p=0.135$; Figure 1C). Finally, a FVIII dose of 25 IU/kg (resulting in 50 IU/dl) was needed in the saphenous vein puncture (SVP)-model to achieve a similar number of clots as for wild-type littermates: 23 ± 5 clots/30 min and 26 ± 2 clots/30 min, respectively ($p=0.565$; Figure 1D).

Apart from blood loss, we also monitored clot stability by noting the number of spontaneous rebleeds. At FVIII-doses that were sufficient to have blood loss similar to that of wild-type mice, no spontaneous rebleeds were observed in the TVT-, TAT- and tail clip-models (Figure 2A-C). Together, these data demonstrate that the efficacy by which FVIII corrects bleeding is determined by the bleeding model that is applied, with the TVT-model being the mildest and the SVP-model being the most severe. In addition, it shows that clots generated in the presence of FVIII are stable, with few if any spontaneous rebleeds being observed.

Emicizumab response in different bleeding models

We next applied these models to test emicizumab. Emicizumab levels at time of injury were $57\pm 4\ \mu\text{g/ml}$, with human FIX and FX levels being $0.9\pm 0.1\ \text{U/ml}$ and $1.0\pm 0.1\ \text{U/ml}$, respectively (*cf.* Ferrière et al.)¹⁶ As reported previously, emicizumab reduced blood loss in both the TVT- and tail-clip-model (Figure 1A & 1C).^{16,17} In the TVT-model, blood loss was $565\pm 165\ \mu\text{l}$, compared to $750\pm 133\ \mu\text{l}$ and $63\pm 31\ \mu\text{l}$ for vehicle- and FVIII-treated (2.5 IU/kg), respectively. In the tail clip-model, blood loss was $422\pm 140\ \mu\text{l}$, compared to $861\pm 129\ \mu\text{l}$ and $173\pm 219\ \mu\text{l}$ for vehicle- and FVIII-treated (7.5 IU/kg), respectively. Noteworthy, despite reduced blood loss in these models, emicizumab was different from FVIII in that frequent spontaneous rebleeds were observed (Figure 2A & 2C). FVIII-equivalence

was therefore estimated to be between 0 and 2.5 IU/kg and between 5 and 7.5 IU/kg for the TVT- and tail clip-model, respectively (Table 5A).

Unexpectedly, emicizumab was associated with a lack of hemostatic response in the TAT-model, with blood loss and being similar to that of vehicle-treated mice ($904 \pm 135 \mu\text{l}$ and $953 \pm 133 \mu\text{l}$ for vehicle- and emicizumab treated mice, respectively; Figure 1B). Also, the bleeding profile was resembling that of vehicle-treated mice (Figure 2B). Since a dose of 2.5 IU/kg FVIII is associated with reduced blood loss, the FVIII-equivalence of emicizumab should be considered to be <2.5 IU/kg in this model (Table 5A).

Opposite to the lack of emicizumab activity in the TAT-model, emicizumab proved more potent in the SVP-model, with the number of clots being similar to those obtained at a dose of 10 IU FVIII/kg (12 ± 4 clots/30 min and 13 ± 3 clots/30 min, respectively; Figure 1D). Regarding emicizumab, there is thus a variable FVIII-equivalence *per* model applied. Furthermore, it seems that emicizumab is more efficient in models involving injuries inflicted in veins rather than in arteries.

SIA-marstacimab response in different bleeding models

We next evaluated SIA-marstacimab, an anti-TFPI antibody that cross-reacts with murine TFPI.¹⁸ SIA-marstacimab was given at a dose of 6 mg/kg, resulting in plasma levels being $16 \mu\text{g/ml}$. In the TVT-model, this dose resulted in a complete arrest of bleeding, and blood loss was similar to that of FVIII-deficient mice receiving 2.5 IU FVIII/kg ($100 \pm 81 \mu\text{l}$ and $63 \pm 31 \mu\text{l}$, respectively; Figure 1A). In terms of clot stability, 1 mouse out of 6 displayed spontaneous rebleeds in this model (Figure 2A). Based on these data, the FVIII-equivalence is estimated to be ≥ 2.5 IU/kg (Table 5B).

A variable response was observed when SIA-marstacimab was tested in the TAT-model (Figure 1B). 5 of 11 mice displayed blood loss beyond the range observed for wild-type mice ($>285 \mu\text{l}$; average $257 \pm 239 \mu\text{l}$; Figure 1B). Increased blood loss in these 5 mice originated from spontaneous rebleeds, events that were not observed in FVIII-deficient mice treated with FVIII at 5 IU/kg (Figure 2B). As such, the FVIII-equivalence of SIA-marstacimab in the TAT-model is between 2.5 and 5 IU/kg (Table 5B).

A variable response with SIA-marstacimab was also observed regarding the tail clip-model (Figure 1C). A complete arrest of bleeding was observed in about 50% of the mice, whereas the remainder displayed increased blood loss compared to wild-type mice (average $149 \pm 126 \mu\text{l}$). Again, increased

blood loss seemed to originate from frequent rebleeds in these mice (Figure 2C). Given the amount of blood loss, the FVIII-equivalence was estimated to be between 5 and 7.5 IU/kg (Table 5B).

Similar to emicizumab, SIA-marstacimab also displayed improved hemostasis in the SVP-model, with the number of clots generated being similar to that of mice treated with FVIII at 10 IU/kg: 14 ± 6 clots/30 min and 13 ± 3 clots/30 min, respectively (Figure 1D). This number of clots is significantly lower compared to the number of clots observed in wild-type mice (26 ± 2 clots/30 min).

By analyzing the hemostatic effect of SIA-marstacimab in the different models, it appears that its FVIII-equivalence is dependent on the model that is used.

Discussion

The aim of the present study was to compare the activity of the bispecific antibody emicizumab and a sequence identical analogue (SIA) of the anti-TFPI antibody marstacimab to FVIII in a series of bleeding models. Our data demonstrate that there is no consistent FVIII-equivalence for emicizumab nor SIA-marstacimab between the different models.

The clinical management of hemophilia A has long relied on the use of FVIII-concentrates, and broad consensus has been achieved on which dose of concentrate would be required for specific situations, like for the prophylactic prevention of spontaneous joint bleeds, for surgery or for specific physical activities.¹⁹⁻²¹ Dosing is usually expressed as IU/kg, and specific FVIII plasma and concentrate standards are available to validate FVIII concentrations in either one-stage or chromogenic activity assays.^{22,23} Alternatively, thrombin generation assays or other global hemostatic assays have been used to assess FVIII activity.²⁴⁻²⁷ These same assays are now being applied to quantify the effect of non-factor agents, like emicizumab or anti-TFPI antibodies.²⁸⁻³⁰ Do these assays generate a reliable FVIII-equivalence? Most likely, they do not.¹⁰ If we consider emicizumab, the limiting factor in its functioning is FIXa, contrary to the tenase-complex in which FVIII is the limiting component. However, the amounts of FIXa that will be generated in thrombin generation assays are fully dependent on the concentrations of TF or FXIa that are used to initiate the reactions. Indeed, emicizumab has quite different FVIII-like activity when comparing the aPTT, chromogenic FVIII assay or FXIa- and TF-initiated thrombin generation assays. Between these assays, the FVIII-equivalence may vary between more than 100% in the aPTT to about 10% in TF-initiated thrombin generation.^{12,31,32} Similarly, anti-TFPI antibodies have variable activity in TF-initiated thrombin generation assays (ie. dependent on the amount of TF used to initiate the assay), while it has virtually no activity in FXIa-initiated thrombin generation assays (Sefiane & Lenting, unpublished observation). Thus, *in vitro* assays do not constitute the appropriate conditions to assign a FVIII-equivalence to emicizumab or anti-TFPI antibodies.

Rather than using *in vitro* assays, we considered the possibility that *in vivo* models could provide an alternative approach to determine FVIII-equivalence for non-factor agents. *In vivo* assessment differs from the *in vitro* approaches in that all hemostatic participants are present, including all pro- and anti-coagulant actors, cellular and vascular components and flow. By comparing different bleeding models, it became evident that each model requires a different dose of FVIII in order to correct bleeding to the level of wild-type mice. The model that required the lowest amount of FVIII for correction was the TVT-model, in which a single tail vein is transected. At the lowest dose tested

(2.5 IU/kg, which corresponds to 5 IU/dl) full correction of bleeding was obtained. When transecting the tail artery, a higher dose of FVIII was needed, *ie.* 5 IU/kg. It should be noted that the vein and artery were transected in an identical manner, indicating that higher concentrations of FVIII are needed to correct an arterial bleed compared to a venous bleed. An even higher dose of FVIII (7.5 IU/kg) was required to correct bleeding to the level of wild-type mice in the tail clip-model. In this model both lateral tail veins and the tail artery are being transected, albeit at a smaller diameter compared to the TVT- and TAT-model. Importantly, in each of these models bleeding was not only corrected in terms of the amount of blood shed, but the clots that were generated were stable and no spontaneous rebleeds were observed. The highest dose of FVIII was needed to achieve wild type-level hemostasis involved the SVP-model, with 25 IU/kg. Although it relates to a venous injury, it concerns a large vein (larger than the lateral veins in the tail) with continuous removal of occlusive clots that are being formed. As such, it seems to be the most severe of the models we have used. Together, we demonstrate that infusion of FVIII is associated with complete hemostatic activity similar to that observed in wild-type mice. In addition, the notion that different doses of FVII are needed in each model provides an opportunity to assess the potential FVIII-equivalence of non-factor agents by using these different models.

Previously, both emicizumab and marstacimab have been tested for their capacity to correct for FVIII-deficiency in animal models (cynomolgus monkey and mice for emicizumab and mice for marstacimab).^{16,18,33,34} However, only for emicizumab there has been an attempt to define a FVIII-equivalence in a single bleeding model: Ferrière *et al.* determined a potential FVIII equivalence of emicizumab corresponding to 5 IU FVIII/kg in terms of blood loss in the tail clip-model.¹⁶ Interestingly, no dose-response of emicizumab was observed, with a similar reduction in blood loss for emicizumab levels between 25 and 185 µg/ml.¹⁶ Importantly, despite the reduction in blood loss, no complete arrest of bleeding upon emicizumab-treatment was observed in the tail-clip assay in that particular study.

Emicizumab and SIA-marstacimab were efficient in both the TVT- and tail clip-model in significantly reducing blood loss compared to vehicle-treated mice. In addition, SIA-marstacimab also reduced blood loss in the TAT-model, contrary to emicizumab. However, we noticed an important difference compared to FVIII, in that treatment with either emicizumab or SIA-marstacimab was characterized by the occurrence of spontaneous rebleeds. The reason for the presence of spontaneous rebleeds is yet unclear, but can be related to a different clot morphology. Indeed, it seems that emicizumab-derived clots are more fragile and lack elasticity due to an altered fibrin-network structure.¹⁷ Current

studies are ongoing to identify whether such differences in clot structure are also present upon treatment with anti-TFPI antibodies.

This study was not designed to compare efficacy between anti-TFPI and emicizumab, and we do not intend to give any opinion on this either. We believe that our mouse models are insufficiently humanized allow such comparison, and clinical trials and real-life data are more equipped to compare efficacy of these different treatment options. Instead, we actually used these models to compare both agents to FVIII, hoping to identify a FVIII-equivalence for each of the molecules. However, dependent on the model that was used, a different FVIII-equivalence was determined, irrespective whether emicizumab or SIA-marstacimab was considered. The reason for this is probably quite similar to that of what is seen in the *in vitro* assays, despite the presence of the complete hemostatic system in the *in vivo* models. In FVIII-mediated coagulation, FVIII is the limiting factor (based on its low concentration of <1 nM and its rather instable nature once activated), since concentrations of phosphatidyl-serine containing membranes, FIXa and FX are well in excess over FVIII during coagulation. In contrast, emicizumab and anti-TFPI antibodies, both are strictly dependent on the local availability of FIXa and TFPI, respectively. FIXa generation will be different between locations and depend on the severity of the injury. TFPI availability is variable per location, with more TFPI activity being present on venous endothelial cells compared to arterial endothelial cells.³⁵ The capacity of emicizumab and anti-TFPI antibodies to correct hemostasis will therefore be controlled by the location and severity of an injury. Therefore, it is unlikely that a consistent FVIII-equivalence for these agents can be attributed.

References

1. Weyand AC, Pipe SW. New therapies for hemophilia. *Blood*. 2019;133(5):389-398.
2. Kitazawa T, Igawa T, Sampei Z, et al. A bispecific antibody to factors IXa and X restores factor VIII hemostatic activity in a hemophilia A model. *Nat Med*. 2012;18(10):1570-1574.
3. Oldenburg J, Mahlangu JN, Kim B, et al. Emicizumab Prophylaxis in Hemophilia A with Inhibitors. *N Engl J Med*. 2017;377(9):809-818.
4. Mahlangu J, Oldenburg J, Paz-Priel I, et al. Emicizumab Prophylaxis in Patients Who Have Hemophilia A without Inhibitors. *N Engl J Med*. 2018;379(9):811-822.
5. Callaghan MU, Negrier C, Paz-Priel I, et al. Long-term outcomes with emicizumab prophylaxis for hemophilia A with or without FVIII inhibitors from the HAVEN 1-4 studies. *Blood*. 2021;137(16):2231-2242.
6. Mahlangu J, Iorio A, Kenet G. Emicizumab state-of-the-art update. *Haemophilia*. 2022;28 Suppl 4(Suppl 4):103-110.
7. Matsushita T, Shapiro A, Abraham A, et al. Phase 3 Trial of Concizumab in Hemophilia with Inhibitors. *N Engl J Med*. 2023;389(9):783-794.
8. Mahlangu J, Luis Lamas J, Cristobal Morales J, et al. Long-term safety and efficacy of the anti-tissue factor pathway inhibitor marstacimab in participants with severe haemophilia: Phase II study results. *Br J Haematol*. 2023;200(2):240-248.
9. Mahlangu JN, Lamas JL, Morales JC, et al. A phase 1b/2 clinical study of marstacimab, targeting human tissue factor pathway inhibitor, in haemophilia. *Br J Haematol*. 2023;200(2):229-239.
10. Lenting PJ. Laboratory monitoring of hemophilia A treatments: new challenges. *Blood Adv*. 2020;4(9):2111-2118.
11. Lenting PJ, Denis CV, Christophe OD. Emicizumab, a bispecific antibody recognizing coagulation factors IX and X: how does it actually compare to factor VIII? *Blood*. 2017;130(23):2463-2468.
12. Leksa NC, Aleman MM, Goodman AG, Rabinovich D, Peters R, Salas J. Intrinsic differences between FVIIIa mimetic bispecific antibodies and FVIII prevent assignment of FVIII-equivalence. *J Thromb Haemost*. 2019;17(7):1044-1052.
13. Bi L, Lawler AM, Antonarakis SE, High KA, Gearhart JD, Kazazian HH, Jr. Targeted disruption of the mouse factor VIII gene produces a model of haemophilia A. *Nat Genet*. 1995;10(1):119-121.
14. Johansen PB, Tranholm M, Haaning J, Knudsen T. Development of a tail vein transection bleeding model in fully anaesthetized haemophilia A mice - characterization of two novel FVIII molecules. *Haemophilia*. 2016.

15. Pastoft AE, Lykkesfeldt J, Ezban M, Tranholm M, Whinna HC, Lauritzen B. A sensitive venous bleeding model in haemophilia A mice: effects of two recombinant FVIII products (N8 and Advate((R))). *Haemophilia*. 2012;18(5):782-788.
16. Ferriere S, Peyron I, Christophe OD, et al. A hemophilia A mouse model for the in vivo assessment of emicizumab function. *Blood*. 2020;136(6):740-748.
17. Sefiane T, Maynadie H, Ettingshausen CE, et al. Differences in venous clot structures between hemophilic mice treated with emicizumab versus factor VIII or factor VIII Fc. *Haematologica*. 2023.
18. Pittman DD, Rakhe S, Bowley SR, Jasuja R, Barakat A, Murphy JE. Hemostatic efficacy of marstacimab alone or in combination with bypassing agents in hemophilia plasmas and a mouse bleeding model. *Res Pract Thromb Haemost*. 2022;6(2):e12679.
19. Berntorp E, Astermark J, Bjorkman S, et al. Consensus perspectives on prophylactic therapy for haemophilia: summary statement. *Haemophilia*. 2003;9 Suppl 1:1-4.
20. Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, et al. WFH Guidelines for the Management of Hemophilia, 3rd edition. *Haemophilia*. 2020;26 Suppl 6:1-158.
21. Mancuso ME, Bidlingmaier C, Mahlangu JN, et al. The predictive value of factor VIII/factor IX levels to define the severity of hemophilia: communication from the SSC of ISTH. *J Thromb Haemost*. 2018;16(10):2106-2110.
22. Raut S, Daniels S, Heath AB, Factor SSCS-Co. Value assignment of the WHO 8th International Standard for factor VIII, concentrate (07/350). *J Thromb Haemost*. 2012;10(6):1175-1176.
23. Hubbard AR, Hamill M, Beeharry M, et al. Value assignment of the WHO 6th International Standard for blood coagulation factor VIII and von Willebrand factor in plasma (07/316). *J Thromb Haemost*. 2011;9(10):2100-2102.
24. Bukkems LH, Valke L, Barteling W, et al. Combining factor VIII levels and thrombin/plasmin generation: A population pharmacokinetic-pharmacodynamic model for patients with haemophilia A. *Br J Clin Pharmacol*. 2022;88(6):2757-2768.
25. Maseide RJ, Berntorp E, Nummi V, Lassila R, Tjonnfjord GE, Holme PA. Bleeding phenotype of patients with moderate haemophilia A and B assessed by thromboelastometry and thrombin generation. *Haemophilia*. 2021;27(5):793-801.
26. Milos M, Coen Herak D, Mahmoud Hourani Soutari N, et al. Overall hemostasis potential and aPTT-clot waveform analysis as powerful laboratory diagnostic tools for identification of hemophilia A patients with unexpected bleeding phenotype. *Int J Lab Hematol*. 2021;43(2):273-280.

27. Dargaud Y, Wolberg AS, Gray E, et al. Proposal for standardized preanalytical and analytical conditions for measuring thrombin generation in hemophilia: communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost.* 2017;15(8):1704-1707.
28. Waters EK, Sigh J, Friedrich U, Hilden I, Sorensen BB. Concizumab, an anti-tissue factor pathway inhibitor antibody, induces increased thrombin generation in plasma from haemophilia patients and healthy subjects measured by the thrombin generation assay. *Haemophilia.* 2017;23(5):769-776.
29. Patel-Hett S, Martin EJ, Mohammed BM, et al. Marstacimab, a tissue factor pathway inhibitor neutralizing antibody, improves coagulation parameters of ex vivo dosed haemophilic blood and plasmas. *Haemophilia.* 2019;25(5):797-806.
30. Verhagen MJA, Valke L, Schols SEM. Thrombin generation for monitoring hemostatic therapy in hemophilia A: A narrative review. *J Thromb Haemost.* 2022;20(4):794-805.
31. Adamkewicz JI, Chen DC, Paz-Priel I. Effects and Interferences of Emicizumab, a Humanised Bispecific Antibody Mimicking Activated Factor VIII Cofactor Function, on Coagulation Assays. *Thromb Haemost.* 2019;119(7):1084-1093.
32. Jenkins PV, Bowyer A, Burgess C, et al. Laboratory coagulation tests and emicizumab treatment A United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation guideline. *Haemophilia.* 2020;26(1):151-155.
33. Muto A, Yoshihashi K, Takeda M, et al. Anti-factor IXa/X bispecific antibody (ACE910): hemostatic potency against ongoing bleeds in a hemophilia A model and the possibility of routine supplementation. *J Thromb Haemost.* 2014;12(2):206-213.
34. Muto A, Yoshihashi K, Takeda M, et al. Anti-factor IXa/X bispecific antibody ACE910 prevents joint bleeds in a long-term primate model of acquired hemophilia A. *Blood.* 2014;124(20):3165-3171.
35. Crawley J, Lupu F, Westmuckett AD, Severs NJ, Kakkar VV, Lupu C. Expression, localization, and activity of tissue factor pathway inhibitor in normal and atherosclerotic human vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(5):1362-1373.

Figures:

Figure 1
Sefiane et al.

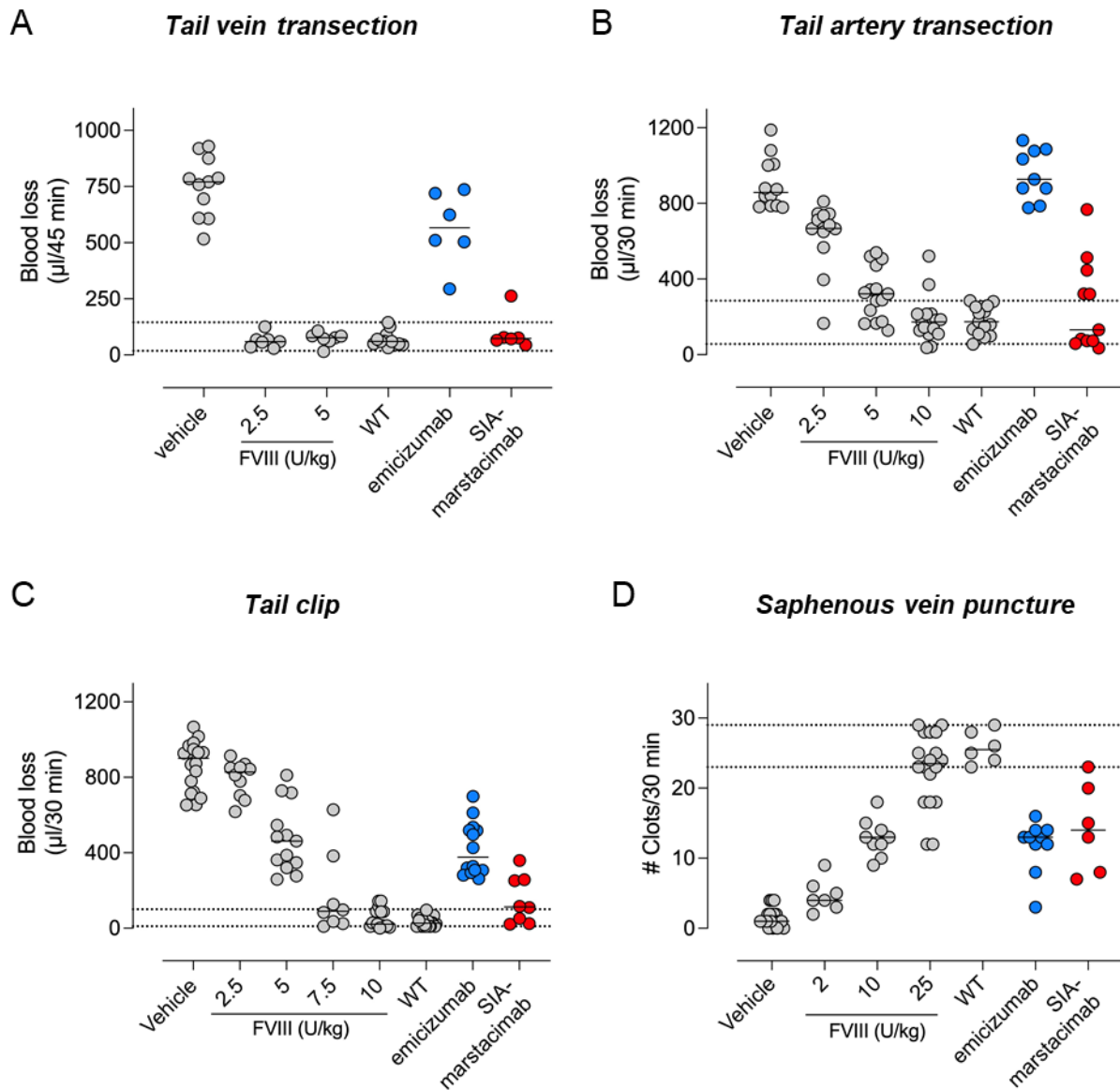


Figure 1: Effect of FVIII, emicizumab and SIA-marstacimab in different bleeding models

Panel A: FVIII-deficient mice were given intravenously various doses of FVIII (0, 2.5 & 5 IU/kg), emicizumab (5 mg/kg) or SIA-marstacimab (6 mg/kg). Plasma concentrations at time of injury were 5 IU/dl FVIII, 10 IU/dl FVIII, 57 $\mu\text{g}/\text{ml}$ emicizumab or 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SIA-marstacimab. Wild-type (WT)-mice were used as control. Injury was provoked by transection of the lateral tail vein. If mice were not bleeding, clots were dislodged at 15 min and/or 30 min after injury. Mice were monitored for 45 min. *Panel B:* FVIII-deficient mice were given intravenously various doses of FVIII (0, 2.5, 5 or 10 IU/kg), emicizumab (5 mg/kg) or SIA-marstacimab (6 mg/kg). Plasma concentrations at time of injury

were 5 IU/dl FVIII, 10 IU/dl FVIII, 20 IU/dl FVIII, 57 µg/ml emicizumab or 16 µg/ml SIA-marstacimab. Wild-type (WT)-mice were used as control. Injury was provoked by transection of the lateral tail artery. If mice were not bleeding, clots were dislodged at 15 min after injury. Mice were monitored for 30 min.

Panel C: FVIII-deficient mice were given intravenously various doses of FVIII (0, 2.5, 5, 7.5 or 10 IU/kg), emicizumab (5 mg/kg) or SIA-marstacimab (6 mg/kg). Plasma concentrations at time of injury were 5 IU/dl FVIII, 10 IU/dl FVIII, 15 IU/dl FVIII, 20 IU/dl FVIII, 57 µg/ml emicizumab or 16 µg/ml SIA-marstacimab. Wild-type (WT)-mice were used as control. Injury was provoked by transection of the terminal 3 mm of the tail tip. Mice were monitored for 30 min.

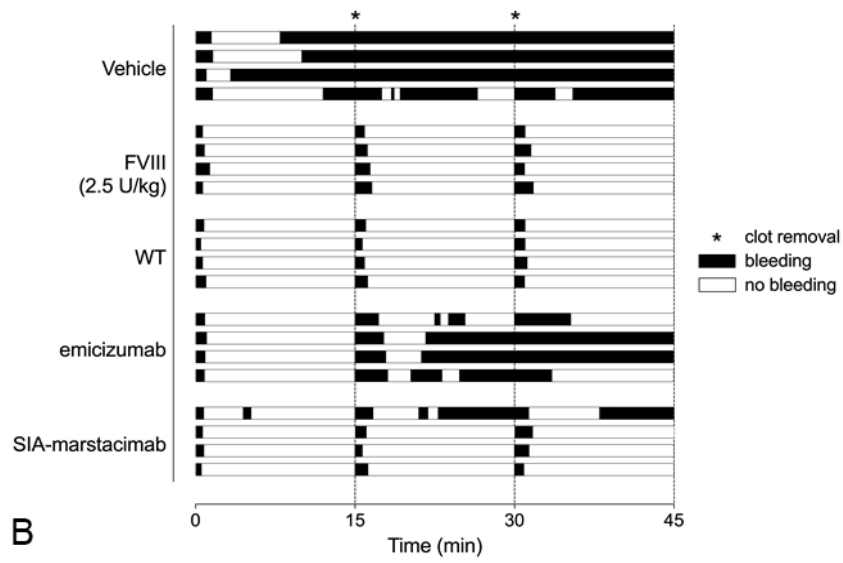
Panel D: FVIII-deficient mice were given intravenously various doses of FVIII (0, 2, 10 or 25 IU/kg), emicizumab (5 mg/kg) or SIA-marstacimab (6 mg/kg). Plasma concentrations at time of injury were 4 IU/dl FVIII, 20 IU/dl FVIII, 50 IU/dl FVIII, 57 µg/ml emicizumab or 16 µg/ml SIA-marstacimab. Wild-type (WT)-mice were used as control. Injury was provoked by puncture of the saphenous vein, and each clot formed was dislodged. Mice were monitored for 30. For panels A-C, blood was collected to measure blood loss over the monitoring period. For panel D, the number of clots generated was determined.

Statistical analysis was performed via one-way ANOVA, with Tukey's correction for multiple comparisons. The p-values for each comparison are summarized in tables 1-4.

Figure 2
Sefiane et al.

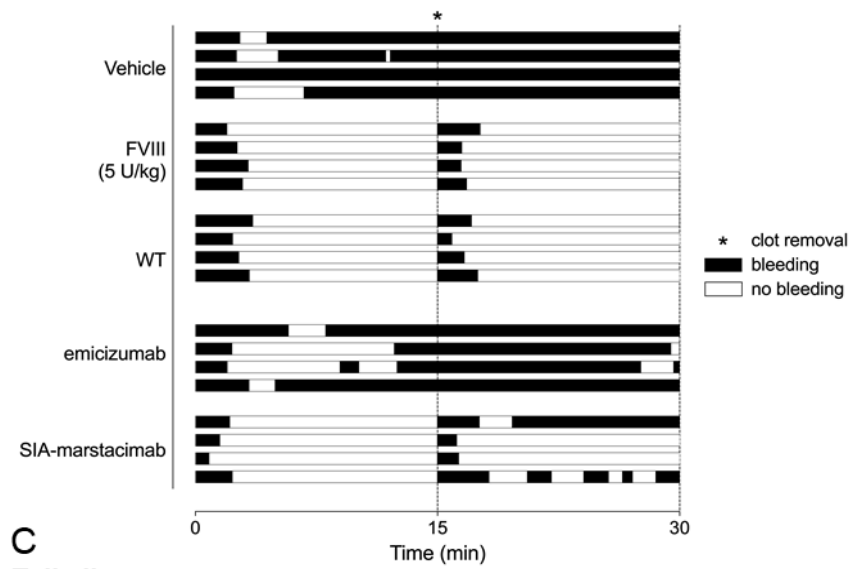
A

Tail vein transection



B

Tail artery transection



C

Tail clip

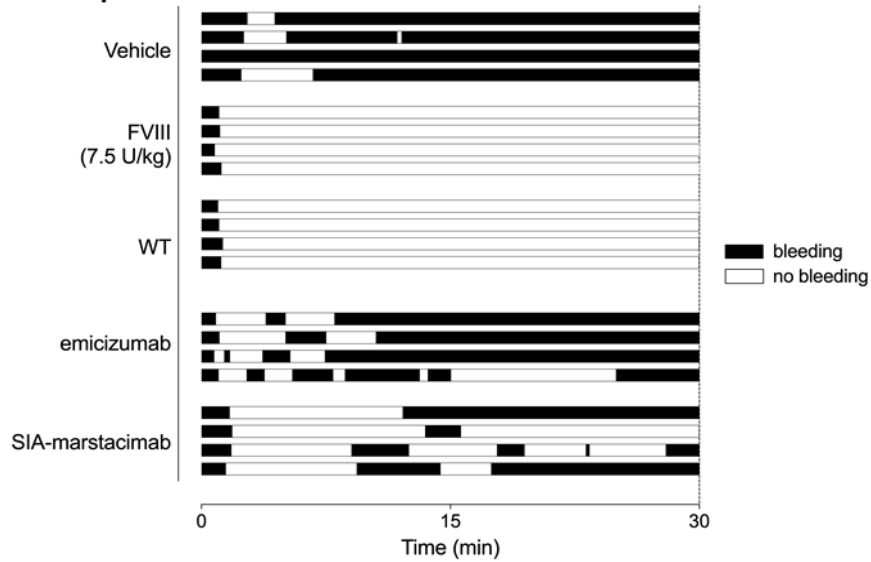


Figure 2: Bleeding pattern of FVIII-deficient mice treated with FVIII, Emicizumab or SIA-marstacimab.

The TVT-, TAT- and tail clip-models were performed as described for figure 1A, 1B and 1C, respectively. During the observation periods, periods of bleeding and bleeding arrest were noted. The bleeding pattern of 4 mice representative for each group is presented. For FVIII-treated mice, data for mice receiving a dose that corrected hemostasis to the level of wild-type mice are depicted. Panel A: TVT-model, panel B: TAT-model and panel C: tail clip-model.

Table 1: p-values for Blood loss in the tail vein transection-model

Comparison	p-value
Vehicle vs FVIII 2.5 IU/kg	<0.0001
Vehicle vs FVIII 5 IU/kg	<0.0001
Vehicle vs wild-type	<0.0001
Vehicle vs emicizumab	0.0037
Vehicle vs SIA-marstacimab	<0.0001
FVIII 2.5 IU/kg vs FVIII 5 IU/kg	1.000
FVIII 2.5 IU/kg vs wild-type	1.000
FVIII 2.5 IU/kg vs emicizumab	<0.0001
FVIII 2.5 IU/kg vs SIA-marstacimab	0.980
FVIII 5 IU/kg vs wild-type	1.000
FVIII 5 IU/kg vs emicizumab	<0.0001
FVIII 5 IU/kg vs SIA-marstacimab	0.994
wild-type vs emicizumab	<0.0001
wild-type vs SIA-marstacimab	0.987
emicizumab vs SIA-marstacimab	<0.0001

Statistical analysis was performed via One-way ANOVA with Tukey's correction for multiple comparisons. Conditions that are above the threshold of statistical significance are indicated in red.

Table 2: p-values for Blood loss in the tail artery transection-model

Comparison	p-value
Vehicle vs FVIII 2.5 IU/kg	0.0003
Vehicle vs FVIII 5 IU/kg	<0.0001
Vehicle vs FVIII 10 IU/kg	<0.0001
Vehicle vs wild-type	<0.0001
Vehicle vs emicizumab	0.988
Vehicle vs SIA-marstacimab	<0.0001
FVIII 2.5 IU/kg vs FVIII 5 IU/kg	<0.0001
FVIII 2.5 IU/kg vs FVIII 10 IU/kg	<0.0001
FVIII 2.5 IU/kg vs wild-type	<0.0001
FVIII 2.5 IU/kg vs emicizumab	<0.0001
FVIII 2.5 IU/kg vs SIA-marstacimab	<0.0001
FVIII 5 IU/kg vs FVIII 10 IU/kg	0.171
FVIII 5 IU/kg vs wild-type	0.156
FVIII 5 IU/kg vs emicizumab	<0.0001

FVIII 5 IU/kg vs SIA-marstacimab	0.927
FVIII 10 IU/kg vs wild-type	1.00
FVIII 10 IU/kg vs emicizumab	<0.0001
FVIII 10 IU/kg vs SIA-marstacimab	0.890
wild-type vs emicizumab	<0.0001
wild-type vs SIA-marstacimab	0.874
emicizumab vs SIA-marstacimab	<0.0001

Statistical analysis was performed via One-way ANOVA with Tukey's correction for multiple comparisons. Conditions that are above the threshold of statistical significance are indicated in red.

Table 3: p-values for Blood loss in the tail clip-model

Comparison	p-value
Vehicle vs FVIII 2.5 IU/kg	0.856
Vehicle vs FVIII 5 IU/kg	<0.0001
Vehicle vs FVIII 7.5 IU/kg	<0.0001
Vehicle vs FVIII 10 IU/kg	<0.0001
Vehicle vs wild-type	<0.0001
Vehicle vs emicizumab	<0.0001
Vehicle vs SIA-marstacimab	<0.0001
FVIII 2.5 IU/kg vs FVIII 5 IU/kg	<0.0001
FVIII 2.5 IU/kg vs FVIII 7.5 IU/kg	<0.0001
FVIII 2.5 IU/kg vs FVIII 10 IU/kg	<0.0001
FVIII 2.5 IU/kg vs wild-type	<0.0001
FVIII 2.5 IU/kg vs emicizumab	<0.0001
FVIII 2.5 IU/kg vs SIA-marstacimab	<0.0001
FVIII 5 IU/kg vs FVIII 7.5 IU/kg	<0.0001
FVIII 5 IU/kg vs FVIII 10 IU/kg	<0.0001
FVIII 5 IU/kg vs wild-type	<0.0001
FVIII 5 IU/kg vs emicizumab	0.945
FVIII 5 IU/kg vs SIA-marstacimab	<0.0001
FVIII 7.5 IU/kg vs FVIII 10 IU/kg	0.346
FVIII 7.5 IU/kg vs wild-type	0.135
FVIII 5 IU/kg vs emicizumab	0.0005
FVIII 7.5 IU/kg vs SIA-marstacimab	1.000
FVIII 10 IU/kg vs wild-type	1.000
FVIII 10 IU/kg vs emicizumab	<0.0001
FVIII 10 IU/kg vs SIA-marstacimab	0.636
wild-type vs emicizumab	<0.0001
wild-type vs SIA-marstacimab	0.340
emicizumab vs SIA-marstacimab	<0.0001

Statistical analysis was performed via One-way ANOVA with Tukey's correction for multiple comparisons. Conditions that are above the threshold of statistical significance are indicated in red.

Table 4: p-values for number of clots in the saphenous vein puncture-model

Comparison	p-value
Vehicle vs FVIII 2 IU/kg	0.439
Vehicle vs FVIII 10 IU/kg	<0.0001
Vehicle vs FVIII 25 IU/kg	<0.0001
Vehicle vs wild-type	<0.0001
Vehicle vs emicizumab	<0.0001
Vehicle vs SIA-marstacimab	<0.0001
FVIII 2 IU/kg vs FVIII 10 IU/kg	0.0008
FVIII 2 IU/kg vs FVIII 25 IU/kg	<0.0001
FVIII 2 IU/kg vs wild-type	<0.0001
FVIII 2 IU/kg vs emicizumab	0.0042
FVIII 2 IU/kg vs SIA-marstacimab	0.0003
FVIII 10 IU/kg vs FVIII 10 IU/kg	<0.0001
FVIII 10 IU/kg vs wild-type	<0.0001
FVIII 10 IU/kg vs emicizumab	0.995
FVIII 10 IU/kg vs SIA-marstacimab	0.990
FVIII 25 IU/kg vs wild-type	0.565
FVIII 25 IU/kg vs emicizumab	<0.0001
FVIII 25 IU/kg vs SIA-marstacimab	0.0002
wild-type vs emicizumab	<0.0001
wild-type vs SIA-marstacimab	<0.0001
emicizumab vs SIA-marstacimab	0.838

Statistical analysis was performed via One-way ANOVA with Tukey's correction for multiple comparisons. Conditions that are above the threshold of statistical significance are indicated in red.

Table 5A: Estimated FVIII-equivalence for emicizumab

Model	FVIII (IU/kg) needed to correct bleeding to WT-level	Emicizumab response	Estimated FVIII-equivalence
Tail vein transection	2.5	Reduced blood loss compared to vehicle-treated mice. Upon clot removal, rebleeds are observed in all mice. Such rebleeds are absent in mice treated with FVIII at 2.5 U/kg	>0 - <2.5 IU/kg FVIII
Tail artery transection	5	Similar bleeding pattern and blood loss as vehicle-treated mice	<2.5 IU/kg FVIII
Tail clip	7.5	After initial bleeding arrest, spontaneous rebleeds in all mice, which is not observed for FVIII-treated mice. Blood loss is similar to that of mice treated with FVIII (5 U/kg)	≥5 - <7.5 IU/kg FVIII
Saphenous vein puncture	25	Significantly increased clot formation relative to vehicle-treated mice, similar to mice treated with FVIII at 10 U/kg	10 IU/kg FVIII

Table 5B: Estimated FVIII-equivalence for SIA-marstacimab

Model	FVIII (IU/kg) needed to correct bleeding to WT-level	SIA-marstacimab response	Estimated FVIII-equivalence
Tail vein transection	2.5	Full correction of bleeding. Spontaneous rebleeds observed only in 1 out of 6 mice (compared to 0 out of 7 mice treated with FVIII at 2.5 U/kg)	≥2.5 IU/kg FVIII
Tail artery transection	5	Total blood loss similar to mice treated with FVIII at 5 U/kg. However, spontaneous rebleeds observed in 6 of 11 SIA-marstacimab-treated mice (compared to 0 of 15 mice treated at 5 U/kg)	≥2.5 - <5 IU/kg FVIII
Tail clip	7.5	After initial bleeding arrest, spontaneous rebleeds in all mice, which is not observed for FVIII-treated mice. Blood loss is similar to that of mice treated with FVIII at 7.5 U/kg	≥5 - <7.5 IU/kg FVIII
Saphenous vein puncture	25	Significantly increased clot formation relative to vehicle-treated mice, similar to mice treated with FVIII at 10 U/kg	10 IU/kg FVIII

DISCUSSION

Comme nous l'avons décrit auparavant dans ce manuscrit, l'hémophilie A sévère est une maladie hémorragique liée à un déficit en un facteur de la coagulation, le FVIII. Durant plusieurs décennies, la stratégie adoptée pour le traitement des patients hémophiles consistait en un remplacement du facteur manquant par un facteur exogène recombinant ou plasmatisque purifié dont la demi-vie a pu être modestement prolongée par génération de protéines de fusion (fragment Fc) ou modifications chimiques (pégylation). La complication majeure des thérapies de remplacement était l'apparition, chez au moins 30% des patients traités, d'anticorps inhibiteurs dirigés contre le FVIII, rendant cette approche inefficace.²⁶⁰ En réponse à cette limite, les agents bypassants l'action du FVIII devaient être utilisés, avec les contraintes de faible demi-vie qui leur sont associées, engendrant des injections intraveineuses répétées et très inconfortables pour les patients. Au cours des dix dernières années, l'anticorps bispécifique emicizumab anti-FIX et anti-FX, mimant l'action du FVIII a été développé et mis sur le marché.²⁶¹ Son mode d'administration sous-cutanée, la fréquence réduite des injections (1 fois par semaine ou par quinzaine) et son efficacité clinique ont révolutionné la prise en charge des patients hémophiles A sévères. Malgré tout, le mécanisme d'action de l'emicizumab et la façon dont il se compare au FVIII restent encore mal connus¹³² et nécessitent d'être étudiés et ceci pour diverses raisons. Tout d'abord, pour améliorer la prise en charge des patients actuellement sous prophylaxie. Ensuite pour mieux comprendre l'action et les fonctions d'emicizumab mais aussi du FVIII au niveau moléculaire afin d'améliorer les thérapies existantes et développer dans le futur des thérapies encore plus efficaces.

Au cours de ma thèse de doctorat, mes travaux ont porté sur l'étude des mécanismes d'action de l'emicizumab en comparaison au FVIII. Pour cela, mes recherches se sont organisées sous la forme de 3 projets : I) Étudier le mécanisme d'action d'un anticorps anti-emicizumab retrouvé chez un patient sous prophylaxie ayant développé une hémarthrose. II) Analyser la structure et la stabilité du caillot veineux généré in vivo dans un modèle murin déficient en FVIII en présence de FVIII, de FVIII-Fc ou d'emicizumab. III) Enfin, utiliser le modèle animal afin de définir l'équivalence d'activité entre le FVIII et les thérapies non-substitutives comme l'emicizumab et le marstacimab, un anticorps anti-TFPI.

Je discuterai ici les résultats que nous avons obtenus au cours de ces trois études.

Case report : Caractérisation d'un anticorps anti-emicizumab non inhibiteur de son activité

Dans un premier temps, en collaboration avec l'hôpital Necker, nous avons eu accès au cas unique à ce jour d'un patient hémophile A sévère avec inhibiteur sous prophylaxie par emicizumab. Après plusieurs semaines de traitement, le patient a présenté un saignement intra-articulaire ce qui suggérait une perte d'efficacité d'emicizumab. Tout au long de la période de traitement par emicizumab, sa concentration plasmatisque ainsi que le TCA ont été mesurés régulièrement. Une concentration en emicizumab inférieure à 1 µg/ml ainsi qu'un TCA prolongé ont été mesurés de façon concomitante à l'apparition des symptômes hémorragiques. Un anticorps anti-emicizumab a été donc soupçonné et mis en évidence dans le sérum du patient par test ELISA. De façon spécifique, nous avons déterminé que les anticorps se fixant sur emicizumab étaient des IgG1 et pas des IgG2 ou IgG3. Étant donné que l'emicizumab est une IgG4, nous n'avons pas pu étudier cet isotype.¹⁸⁶

Dans la littérature, quatre cas de patients avaient été décrits comme exerçant une action inhibitrice sur l'activité de l'emicizumab dans les tests chromogéniques.¹⁴⁷⁻¹⁵⁰ Après analyse dans les mêmes tests, nous avons pu montrer que l'anticorps développé par ce patient ne présentait pas de propriété inhibitrice de l'activité d'emicizumab. De façon assez surprenante, nous avons également pu montrer un effet modéré de l'anticorps sur la fixation de l'emicizumab sur le FX mais pas sur le FIX. Cependant, cet effet relativement faible ne suffisait pas à expliquer la très forte diminution de la concentration plasmatique d'emicizumab observée chez le patient. Dans la littérature, les anticorps dirigés contre des protéines thérapeutiques sont largement décrits. Ils peuvent être inhibiteurs ou non-inhibiteurs ou encore affecter la clairance des biothérapies.^{262,263} Pour tester cette dernière hypothèse, nous avons utilisé un modèle de souris immunodéficientes traitées par emicizumab, selon le modèle décrit précédemment par Ferrière et al¹⁹⁸ dans lequel nous avons injecté le sérum du patient contenant l'anticorps anti-emicizumab ou du sérum contrôle. L'élimination d'emicizumab a été mesurée durant 48h. Nous avons ainsi pu montrer que l'anticorps présent dans le sérum du patient induisait une clairance accélérée d'emicizumab. L'utilisation d'un modèle de souris immunodéficientes était imposé par notre choix d'injecter aux souris le sérum du patient, afin d'éviter une réaction allergique provoquée par l'administration de matériel humain chez la souris.

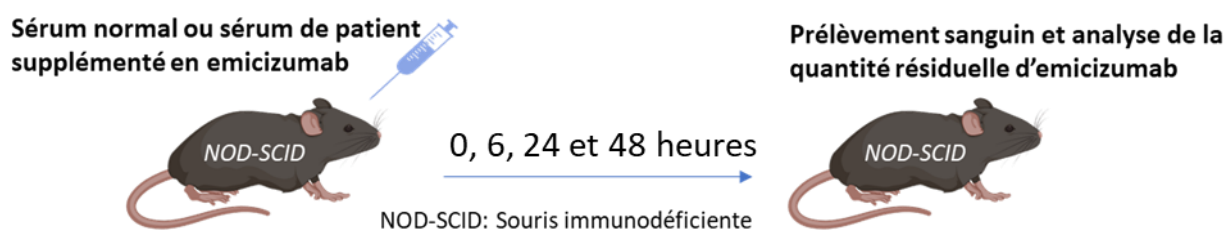


Figure 24 : Modèle murin de clairance de l'emicizumab

La stratégie alternative qui a été envisagée consistait en la purification de l'IgG cible afin de l'injecter à la souris. Toutefois, plusieurs limites n'ont pas permis d'adopter cette stratégie : d'une part la purification de l'IgG aurait nécessité l'utilisation de condition de pH acides susceptibles de dénaturer l'anticorps et d'autre part, la purification aurait également nécessité un volume important de sérum, incompatible avec la possibilité de prélèvement du patient du fait de son très jeune âge.

Contrairement aux quatre cas précédemment reportés, nous avons décrit ici un cas unique de patient avec un anticorps anti-emicizumab qui n'affecte pas directement son activité mais induit une élimination accélérée de la molécule thérapeutique. La caractérisation des anticorps anti-thérapies a des retombées cliniques importantes telles que la bonne prise en charge des patients.

Les anticorps anti-emicizumab demeurent des événements très rares même si le nombre de cas décrits en sous-estime sans doute le nombre réel. Concernant le traitement des patients qui développent des anticorps anti-emicizumab, une des questions qui s'est posée est de savoir si les anticorps anti-emicizumab cross réagissent avec les nouveaux anticorps bispécifiques, développés sur le modèle d'emicizumab. Une partie de la réponse a été apportée par Valsecchi et al qui ont montré que chez quatre patients hémophiles A avec anticorps anti-emicizumab, il n'y avait aucune cross-réaction avec MIM8.¹⁶⁰ Des études détaillées seront nécessaires pour analyser les patients qui

seront traités avec NXT007. Si les résultats de Valsecchi et al se confirment, le panel d'anticorps bispécifiques pour le traitement de l'hémophilie A sévère sera une solution pour les rares patients développant des anticorps anti-thérapies et pourra éviter le recours aux agents by passants.

Etudes des différences dans la structure des caillots veineux génères dans un modèle de souris hémophiles A traitées par emicizumab, par facteur VIII ou par facteur VIII Fc

Dans un second projet de recherche, je me suis longuement intéressé à l'impact de la thérapie non-substitutive emicizumab comparativement au FVIII ou au FVIII-Fc sur la structure du caillot de fibrine.

- ***Le cas clinique d'un patient sous prophylaxie par emicizumab présentant un saignement anormal :***

Grâce à une collaboration avec le Centre de traitement de l'hémophilie Rhein-Main en Allemagne, nous avons étudié le cas d'un patient âgé de deux ans, avec une hémophilie A sévère, traité par emicizumab en prophylaxie qui avait présenté une blessure à son pied gauche. Un suivi de l'évolution de la blessure avait été réalisé. Le seul traitement par emicizumab avait été maintenu pour la prise en charge de la blessure selon l'appréciation du médecin qui avait considéré qu'il s'agissait d'un cas de trauma mineur. En effet, conformément aux recommandations internationales, la prise en charge des traumas des patients hémophiles A sous prophylaxie par emicizumab dépend de la sévérité, appréciée par le médecin. Cependant, 10 jours après la blessure, celle-ci était toujours ouverte sans signes de cicatrisation et à l'observation macroscopique, le caillot recouvrant la blessure semblait être fragile et lâche. Ce n'est qu'après administration de FVIII à J11 et J12 que la cicatrisation a commencé et la résolution complète de la blessure est survenue dans les jours suivants.

Deux études récentes se sont intéressées à la prise en charge des patients sous emicizumab subissant une intervention chirurgicale mineure ou majeure, et ont démontré que l'apport d'une thérapie de remplacement (ou by-passant par FVIIa en cas de patient avec inhibiteur) est nécessaire dans la majorité des cas pour éviter les saignements.^{264,265} Le cas présenté ici s'inscrit dans cette démarche et sa prise en charge sans administration de FVIII correspond à un trauma peu sévère. Ce cas clinique décrit la survenue de saignements d'origine traumatique chez certains patients bien qu'il s'agisse d'évènements rares.²⁶⁶ Ainsi ce patient n'est pas représentatif de la majorité des patients sous emicizumab car il est décrit que seul 5% des patients hémophiles A traités par emicizumab et présentant des saignements spontanés ou induits par des traumatismes vont finalement nécessiter du FVIII.²⁶⁷ Ce cas semble tout de même indiquer que l'emicizumab pourrait affecter la formation mais également la stabilité du caillot de fibrine de façon différente que le FVIII en étant un moins bon cofacteur du FIXa.

- ***Modèle murin de saignement adapté à l'étude du caillot de fibrine :***

Au cours de notre étude, nous avons mis au point un modèle murin permettant l'étude du caillot de fibrine généré in vivo chez la souris FVIII^{-/-} traitée par FVIII, FVIII-Fc ou emicizumab. Pour cela, nous avons adapté le modèle de saignement « TVT » qui est un modèle de blessure standardisée de la

veine latérale de la queue de la souris qui s'obtient à l'aide d'un gabarit permettant de générer des blessures de taille reproductible et standardisée.¹⁹⁶ L'emicizumab ne cross réagissant pas avec le FIX et FX humain, nous avons utilisé le protocole qui a été précédemment décrit au sein de l'équipe et publié en 2020 consistant en la co-injection de FIX et FX humains et d'emicizumab.¹⁹⁸ Les études de la fibrine précédemment rapportées dans la littérature, se sont limitées à la génération des caillots de fibrine in vitro à partir de plasma humain. Dans ce contexte, l'un des avantages de notre étude réside en la présence de tous les éléments cellulaires ayant un effet sur l'hémostase mais également en l'absence d'utilisation d'un déclencheur artificiel de la coagulation, contrairement aux approches in vitro. De plus, très récemment, une étude menée dans notre laboratoire, a montré que la génération de thrombine initiée par emicizumab ou FVIII est en partie dépendante du type cellulaire à la surface de laquelle elle est générée, ce qui confirme l'importance d'inclure la composante cellulaire dans les études des caillots générés en présence des différentes molécules thérapeutiques.²⁵⁹

Il est important de mentionner qu'une des limites de notre étude est le choix d'un seul modèle de saignement. Étant donné que 55 µg/ml d'emicizumab équivalent à des concentrations différentes de FVIII selon la sévérité du modèle de saignement, il est aussi possible que la structure du caillot de fibrine soit différente selon le test de saignement. Dans notre étude, nous avons utilisé le modèle de TVT et choisi de le comparer au FVIII à 10 % (5 UI/kg), équivalence qui avait été décrite précédemment.¹⁹⁸

Modèle de saignement	FVIII nécessaire pour corriger le saignement	Effet de l'emicizumab	Equivalence estimée avec le FVIII
TVT sans challenge	2,5 IU/kg	Correction complète du saignement	>0 - <2.5 UI/kg
TAT	5 IU/kg	Profils de saignements similaires aux souris non traitées (saignements continus)	< 2.5 UI/kg
Tail clip	7,5 IU/kg	Reduction significative de la quantité de sang perdu	>5 - <2.5 UI/kg
Veine saphène	25 IU/kg	Augmentation du nombre de caillots formés	10 UI/kg

Tableau 7 : Equivalence-FVIII de l'emicizumab dans différents modèles murins de saignement

De plus l'analyse des différentes conditions (FVIII -/-, Wild type (WT), FVIII ou emicizumab) nous a permis de remarquer que 10 minutes après la blessure aucune des souris pour chacun de ces groupes ne saignait à ce moment-là ce qui nous permettait de récupérer et d'analyser le caillot à un même moment (résultats discutés plus loin dans la discussion). Néanmoins, il serait intéressant d'élargir l'étude à différents temps après blessure afin de déterminer si les différences que nous avons observées apparaissent progressivement ou sont présentes immédiatement après blessure.

Cela nécessiterait la mise au point de procédures adaptées à chaque modèle afin de réussir à récupérer des caillots intacts dans chaque condition et à chaque temps d'observation.

Une partie de notre étude s'est intéressée à la stabilité du caillot au cours du temps dans le modèle de TVT sur des souris déficientes en FVIII traitées par FVIII, FVIII-Fc ou emicizumab.

Pour les trois thérapies, les résultats observés étaient identiques avec un arrêt rapide du saignement après la blessure sans reprise spontanée des saignements, ce qui était en revanche observé chez les souris non traitées. De façon intéressante, lorsque le caillot était retiré, seules les souris traitées par emicizumab présentaient des reprises spontanées du saignement contrairement aux souris recevant du FVIII ou du FVIII-Fc. Afin de vérifier si la faible demi-vie des FIX et FX humains injectés aux souris (inférieure à 3h)^{268,269} pouvait être responsable de ces reprises de saignement, nous avons réalisé la même expérience en ajoutant une seconde dose de FIX et FX humains, 12 minutes après la blessure, mais nous n'avons observé aucun effet sur le profil de saignement, invalidant cette hypothèse. Nous avons également testé une seconde hypothèse pouvant expliquer ces résultats, qui consistait en une fibrinolyse augmentée en présence d'emicizumab qui aurait déstabilisé le caillot de fibrine. Afin d'étudier cela, nous avons utilisé un agent anti-fibrinolytique inhibant la plasmine : l'acide tranexamique. Des co-injections emicizumab/acide tranexamique ont été réalisées et les profils de saignement obtenus ont invalidé cette hypothèse.

Dans le but de comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine de l'instabilité apparente des caillots formés en présence d'emicizumab, nous nous sommes par la suite intéressés à la structure du caillot de fibrine.

Analyse de la structure du caillot de Fibrine par microscopie:

L'observation de la structure du réseau de fibrine *in vivo* a été réalisée par microscopie électronique à balayage après déshydratation chimique des échantillons. Nous avons réalisé la comparaison des caillots formés en présence de FVIII vs emicizumab. De façon similaire aux souris de type sauvage, les souris traitées par FVIII présentaient un réseau de fibrine organisé en fines fibres longues que l'on pouvait observer individuellement et qui formaient un maillage autour des globules rouges. De façon surprenante, le réseau de fibrine généré chez les souris traitées par emicizumab présentait une structure très différente avec des fibres de fibrine collées entre elles formant de larges patches. Par conséquent, le diamètre moyen des fibres de fibrine mesurées était largement supérieur en présence d'emicizumab comparativement au FVIII (>500 nm contre 260nm) Dans la littérature, il existe peu d'études s'étant intéressées au réseau de fibrine généré avec emicizumab, et les seules études disponibles ont été réalisées sur des caillots de fibrine générés *in vitro* à partir de plasma. De façon peu consistante, ces trois études avaient engendré trois résultats différents concernant le diamètre des fibres de fibrine.^{203,253,255} (cf. tableau 6). Notre étude *in vivo* permet de rendre compte de l'effet des composants cellulaires sur la structure du caillot mais également de ne pas utiliser d'activateur artificiel de l'hémostase. Néanmoins, certaines limites rendent difficile la confrontation directe de nos résultats aux données publiées et pourraient expliquer les différences :

- La première est liée à la méthode de préparation des échantillons. L'hétérogénéité dans les résultats décrits peut s'expliquer par l'hétérogénéité des techniques de fixation et déshydratation utilisées

qui sont différentes pour ces trois études et pour la nôtre. Il est décrit depuis que la déshydratation chimique génère des changements dans l'organisation morphologique des protéines.²⁷⁰ Récemment, une nouvelle façon de préparer les échantillons a été développée en utilisant une « nano combinaison » riche en sucre et électrolytes permettant de s'affranchir de la déshydratation²¹⁹ et qui permettrait d'observer les échantillons sans modifier la morphologie de la fibrine.

C'est l'approche que nous avons choisie et nous avons alors analysé les caillots de souris WT ou de souris FVIII^{-/-} traitées ou non par emicizumab ou par FVIII ou FVIII-Fc 10 minutes après blessure.

En comparant les souris WT aux souris déficientes en FVIII, des différences de structure ont déjà pu être observées à faible grossissement alors qu'un tel grossissement ne permet pas encore de visualiser individuellement les fibres du réseau de fibrine (Figure 25). En effet, chez les souris WT, des caillots solides et denses bouchant la blessure ont été observés et un grossissement plus élevé a révélé une surface homogène et lisse. Ces structures semblent similaires aux biofilms de fibrine qui ont été décrits à la surface des caillots.²⁷¹ Les érythrocytes étaient densément inclus dans le caillot et seuls quelques-uns d'entre eux étaient reconnaissables individuellement. En revanche, pour les souris déficientes en FVIII, le site de blessure restait visible, avec un caillot moins étendu et qui semblait lâche avec des érythrocytes individuels clairement distinguables.

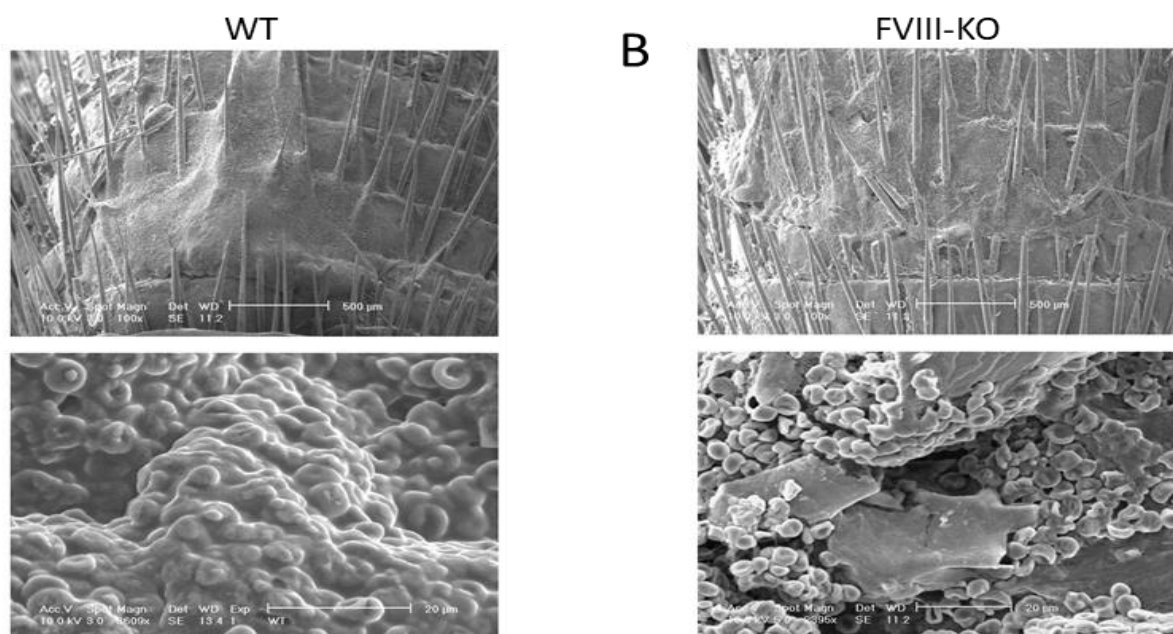


Figure 25 : Microscopie électronique à balayage des caillots générés chez la souris WT et FVIII-KO

Les souris ayant reçu du FVIII ou du FVIII-Fc à la dose de 5U/kg (10% de FVIII) ont généré des caillots qui semblaient similaires à ceux des souris WT (Figure 26). Il est important de noter qu'aucun changement dans la structure du caillot n'a été observé lorsque des doses plus élevées de FVIII ou de FVIII-Fc (250 U/kg) ont été utilisées.

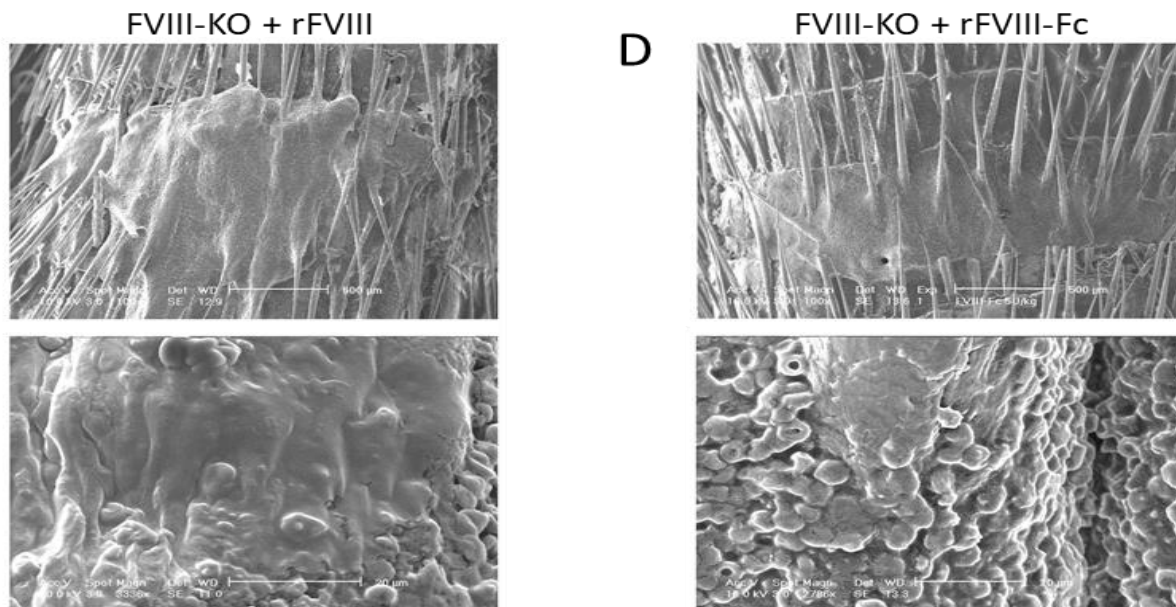


Figure 26 : Microscopie électronique à balayage des caillots générés chez la souris FVIII-KO traitée par FVIII ou par FVIII-Fc

De manière inattendue, les caillots obtenus chez des souris recevant de l'emicizumab présentaient une architecture très différente (Figure 27). Ces caillots présentaient une surface fracturée, une morphologie qui n'avait pas été observée avec le FVIII. De plus, des fibres apparemment rompues étaient visibles dans les espaces entre les îlots d'érythrocytes. Enfin, les caillots générés en présence d'emicizumab contenaient des érythrocytes identifiables individuellement contrairement aux observations faites chez les souris WT ou traitées au FVIII. Ces données indiquent que la structure du caillot généré *in vivo* chez les souris traitées à l'emicizumab et préparé sans déshydratation préalable semble effectivement différente de celle des caillots formés chez les souris traitées au FVIII ou au FVIII-Fc. Cependant, ces résultats sont à nuancer et nous ne pouvons pas exclure la possibilité que les fissures observées pourraient avoir été induites par les conditions de vide et le puissant faisceau d'électrons. Néanmoins, les résultats suggèrent une différence de stabilité du caillot généré avec emicizumab. De plus, les résultats obtenus en MEB questionnent sur la démarche expérimentale la plus pertinente pour l'observation du réseau de fibrine et mettent en évidence la nécessité d'une standardisation des techniques de préparation des échantillons afin de pouvoir comparer les études entre elles.

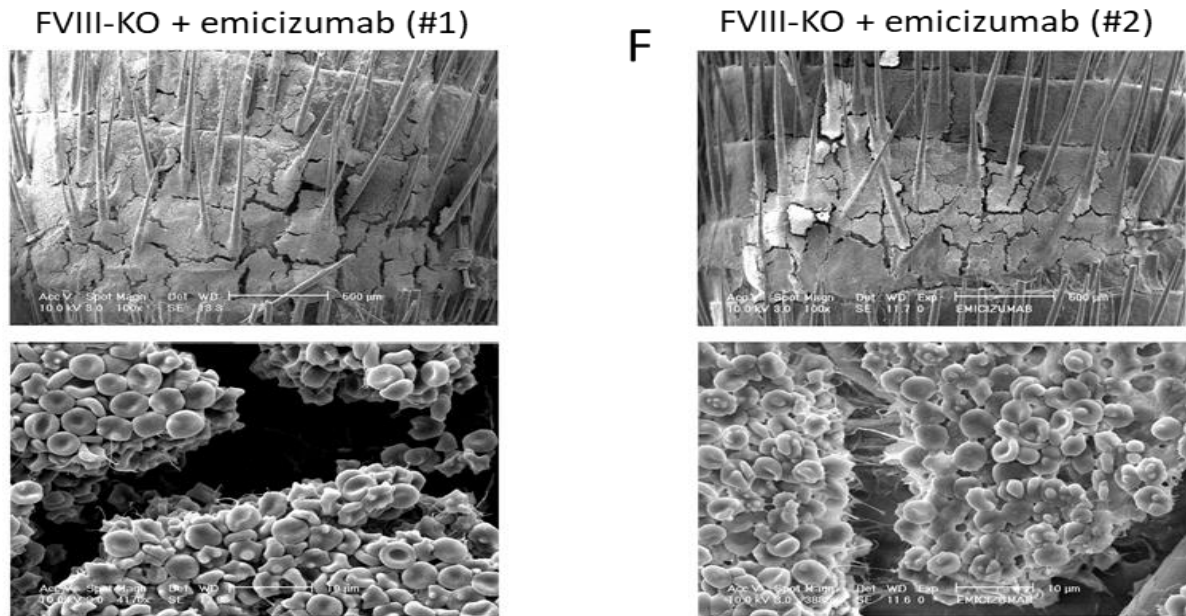
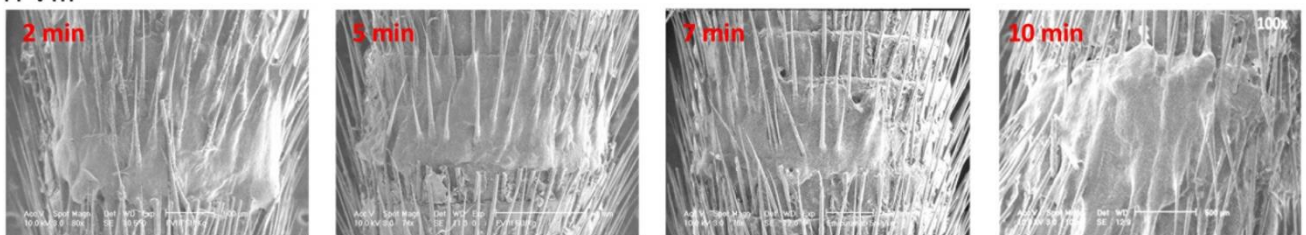


Figure 27 : Microscopie électronique à balayage des caillots générés chez la souris FVIII-KO traitée par emicizumab

Enfin, il est important de noter que ces résultats ont été obtenus sur des caillots récupérés 10 minutes après blessure. Il est apparu donc intéressant d'analyser la structure de ces caillots dans le temps entre 0 et 10 minutes afin de déterminer si ces différences structurales étaient présentes dès le début de la formation du caillot ou apparaissaient dans des temps successifs. Nous avons pu montrer que les caillots générés en présence de FVIII ou d'emicizumab étaient identiques en termes de structure durant les 5 premières minutes, puis les fissures apparaissaient en présence d'emicizumab entre 5 et 7 minutes post-blessure.

rFVIII



emicizumab

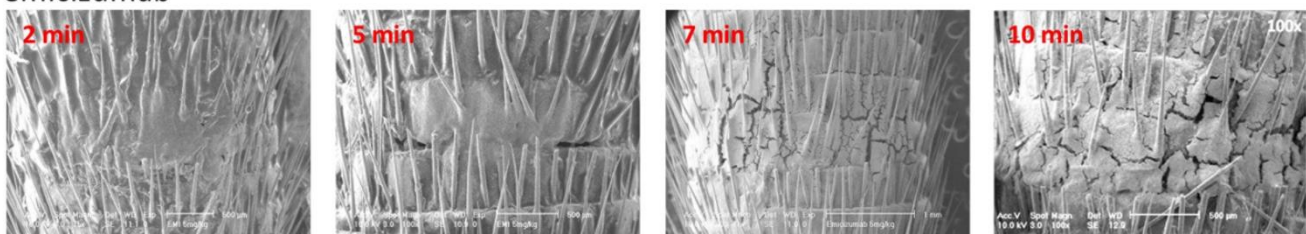


Figure 28 : Microscopie électronique à balayage des caillots générés chez la souris FVIII-KO traitée par emicizumab ou par FVIII à t=2, 5, 7 ou 10 minutes post-blessure

- Avec ou sans déshydratation, la MEB nous a permis d'observer des différences de morphologie du caillot de fibrine en présence ou absence d'emicizumab. Cependant, une limite commune à ces approches est qu'elles ne permettent que l'analyse de la partie externe du caillot qui est la plus exposée aux contraintes externes susceptibles de modifier sa structure. Afin d'aller plus en profondeur et d'étudier en détail la fibrine dans la partie interne du caillot, nous avons utilisé la microscopie confocale, spinning disk, puis à super résolution sur des coupes de tissus se focalisant sur l'intérieur de la blessure générée sur la queue de la souris. L'utilisation de la microscopie spinning disk, bien qu'insuffisamment résolutive, nous a permis de faire une observation intéressante. La quantification de l'intensité du signal de la fibrine dans les caillots générés chez les souris FVIII^{-/-} traitées par FVIII ou par emicizumab a montré que les caillots générés en présence d'emicizumab contiennent plus de fibrine que les caillots générés en présence de FVIII. Ces résultats semblent aller dans le même sens que les observations des larges patches de fibrine visualisés en MEB. De plus, l'analyse de la formation de fibrine *in vitro* dans un plasma déficient en FVIII supplémenté en FVIII ou emicizumab a permis de montrer une génération de fibrine plus rapide et plus importante avec emicizumab. Une explication possible de ces observations pourrait être liée au mécanisme d'action de l'emicizumab. En effet, l'emicizumab est capable d'accélérer la formation de FXa dès que le FIXa est disponible.¹³² De façon différente, le FVIII nécessite une activation par la thrombine avant d'accomplir son rôle de cofacteur.⁷¹

A nouveau, des différences de structures ont pu être observées avec la microscopie à super résolution qui a permis d'observer un réseau de fibrine bien défini lorsque les souris étaient traitées par le FVIII et une structure « à pois » générant des points très intenses en présence d'emicizumab. Il est difficile de déterminer à quels types de structures de la fibrine ces points correspondent mais il pourrait s'agir des patches de fibrine observés en MEB. En effet, une hypothèse pouvant expliquer ces points intenses pourrait être une accumulation de fibrine à la surface des plaquettes. Des analyses plus précises sont actuellement en cours pour confirmer cette possibilité.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la stabilisation du réseau de fibrine par le FXIII. Nous avons pu montrer que l'intervalle de temps entre l'initiation de la génération de fibrine et la génération de FXIIIa était plus long avec l'emicizumab qu'avec le FVIII. Ceci suggère qu'en présence d'emicizumab, la polymérisation non covalente des protofibrilles de fibrine se poursuit sur une période plus longue avant que le FXIIIa commence à établir les connexions covalentes. De plus, nous avons montré que la génération de FXIIIa est plus importante avec l'emicizumab qu'avec le FVIII et donc que davantage de liaisons covalentes peuvent être formées.

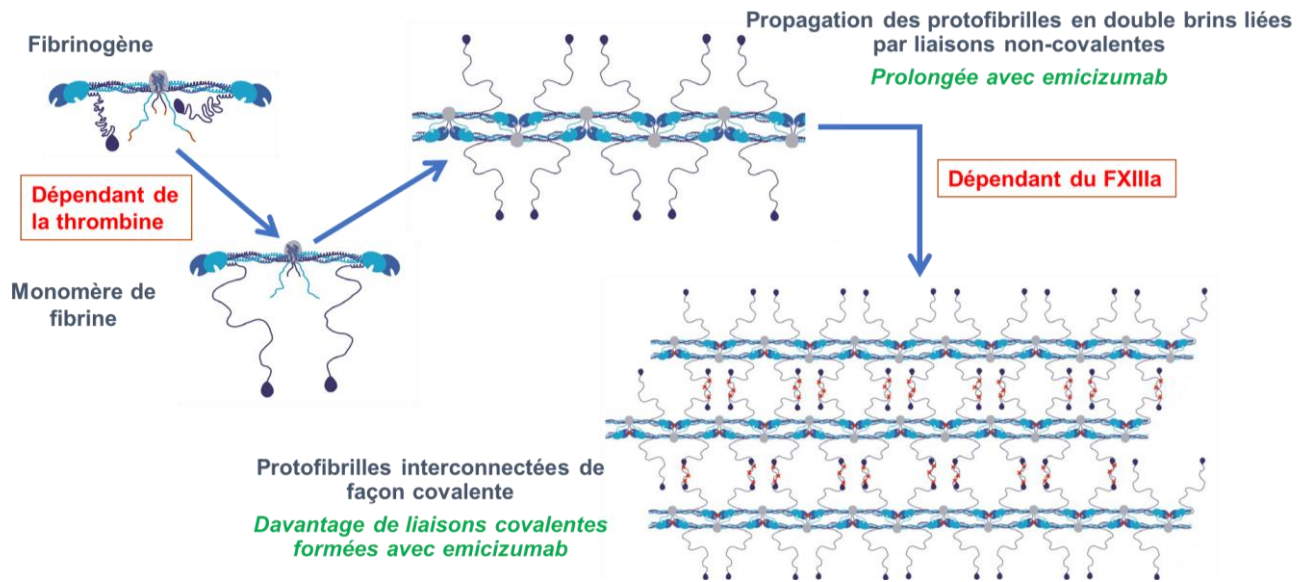


Figure 29 : Impact de l'emicizumab sur les étapes successives de formation du caillot de fibrine

(Adapté de "Why fibrin biomechanical properties matter for hemostasis and thrombosis", Feller et al)²⁴

Ces changements dans la cinétique et la synchronisation de formation et de stabilisation du caillot pourraient contribuer aux différences structurales du caillot que nous avons observées. Notre observation est consistante avec la littérature qui a décrit qu'un polymorphisme du FXIII (V34L) étant associé à une activation du FXIII plus rapide par la thrombine, résultait en un réseau de structure différente avec des fibres de fibrine plus fines.^{272,273}

Un autre élément pouvant expliquer les différences que nous avons observées dans notre modèle de saignement et les différences structurales de la fibrine avec emicizumab pourrait être une fibrinolyse augmentée des caillots générés en présence d'emicizumab. Pour étudier cela, nous avons ajouté l'activateur tissulaire du plasminogène dans l'expérience de génération de fibrine décrite dans notre étude. Dans ces conditions, nous avons pu montrer que l'emicizumab semblait avoir un effet protecteur contre la fibrinolyse comparativement au FVIII.

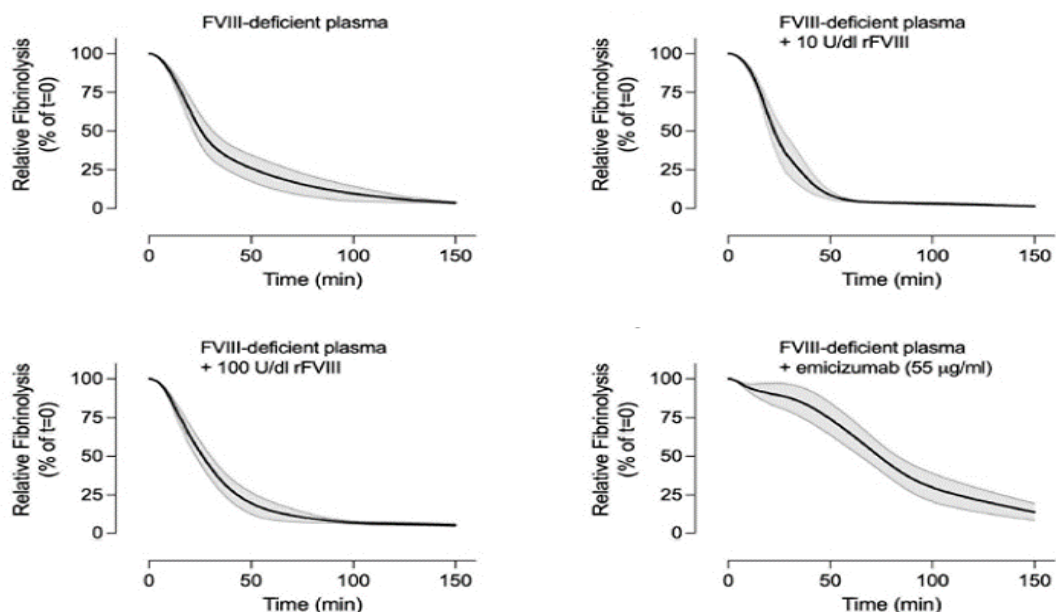


Figure 30 : Etude de la fibrinolyse in vitro sur du plasma déficient en FVIII supplémenté en FVIII ou en emicizumab

Des résultats comparables ont été présentés par Locke et al (Roche, Basel, Switzerland) en juillet 2022 au Congrès de l'International Society of Thrombosis and Hemostasis (ISTH) confirmant un effet protecteur de l'emicizumab sur la fibrinolyse.

Ces résultats surprenants pourraient s'expliquer par la structure du réseau de fibrine observé en présence d'emicizumab pouvant potentiellement rendre plus difficile l'accès de la plasmine à la fibrine afin de remplir son rôle. Dans ce contexte, on peut également s'intéresser au TAFI qui est, comme le FXIII, un substrat de la thrombine et dont l'activité pourrait également être régulée de façon différente par l'emicizumab comparativement au FVIII. Des études supplémentaires seront nécessaires afin d'analyser l'effet de l'emicizumab sur les voies de signalisation impliquées dans la fibrinolyse.

En conclusion, notre modèle a permis d'analyser de façon précise la structure du caillot de fibrine généré *in vivo* chez la souris et d'observer des différences chez les souris traitées par FVIII ou par emicizumab avec toutes les techniques de microscopie que nous avons utilisées. Il est largement décrit qu'une structure modifiée de la fibrine affecte les propriétés biomécaniques du caillot dont l'élasticité.²⁴ Bien que nombre de nos résultats montrent que les caillots générés en présence d'emicizumab présentent une structure différente, il est difficile de mettre en relation directe l'instabilité du caillot observé *in vivo* et la structure modifiée. Il semble donc intéressant d'essayer de comprendre les différences observées en localisant les différents acteurs impliqués dans la génération du caillot de fibrine. Une étude plus détaillée de la localisation des acteurs protéiques et cellulaires sera intéressante afin d'expliquer nos résultats mais également pour une meilleure compréhension des mécanismes généraux de la coagulation.

L'arrivée sur le marché des deux nouveaux anticorps bispécifiques tels que le MIM8 et le NXT007, mais également d'autres thérapies non-substitutives comme le Fitusiran et les anti TFPI, nous permettront de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la génération des réseaux de fibrine en présence des différentes thérapies mais également de mieux comprendre les mêmes mécanismes et le rôle joué par le FVIII en conditions physiologiques.

Une équivalence facteur VIII "absolue" est illusoire en présence des thérapies non-substitutives de l'hémophilie A

Au cours de la troisième partie de ma thèse, je me suis intéressé à la détermination d'une potentielle équivalence en termes de FVIII des thérapies non-substitutives. En effet, l'arrivée sur le marché de l'emicizumab et le développement clinique de nouvelles thérapies de non-remplacement tels que les anticorps anti-TFPI (concizumab, marstacimab,...), le fitusiran ou les nouveaux anticorps bispécifiques, soulèvent deux questions importantes : Comment comparer ces thérapies au FVIII afin de déterminer une équivalence en terme de mode d'action mais aussi en terme d'activité ? Les approches *in vitro* sont-elles adaptées pour mesurer cette équivalence ?

Classiquement avec le FVIII, l'activité est déterminée grâce à des tests dédiés comme les tests chromogéniques et chronométriques.^{274,275} Les tests globaux d'hémostases tels que la génération de thrombine sont également informatifs pour évaluer l'activité du FVIII.^{276,277} L'utilisation des thérapies non-substitutives a de fait nécessité l'utilisation de ces mêmes tests afin de mesurer et monitorer l'activité de celles-ci. L'emicizumab étant la seule thérapie non-substitutive sur le marché et utilisée en routine, plusieurs analyses *in vitro* cherchant à déterminer l'équivalence en termes de FVIII ont été rapportées. Les équivalences qui ont pu être déterminées entre l'emicizumab et le FVIII

dans les différents tests ont donné des résultats dépendants des modèles *in vitro*. En effet, des équivalences de 10 à 100 % sont rapportées, suggérant qu'aucune équivalence absolue en termes d'activité FVIII ne peut être obtenue grâce à ces tests utilisés en routine. Ces différences s'expliquent par le mode d'action d'emicizumab que nous avons longuement décrit dans ce manuscrit.

Tests d'activité <i>in vitro</i>	Equivalence en termes d'activité FVIII de l'emicizumab à concentration thérapeutique
TCA	>100%
Tests chromogéniques	35%
Tests chromométriques	≤ 10%

Tableau 8 : Equivalence de l'anticorps emicizumab en terme d'activité FVIII mesurée *in vitro*

En analysant les données disponibles concernant l'analyse de son activité, il apparaît que les approches *in vitro* ne permettent pas d'obtenir d'équivalence absolue entre FVIII et emicizumab. Nous nous sommes aussi intéressés à une seconde thérapie non-substitutive. En effet, au cours de cette étude, j'ai eu accès à la séquence de l'anticorps anti-TFPI marstacimab, que j'ai produit et purifié à partir du système cellulaire HEK293F afin d'obtenir un analogue de séquence du marstacimab. Peu de données concernant l'analyse de son activité sont rapportées dans la littérature. Néanmoins, nous avons pu analyser l'analogue du marstacimab dans le test de génération de thrombine sur un plasma déficient en FVIII. Nous avons utilisé respectivement deux déclencheurs différents : Le FXIa et le FT. De façon intéressante, nous avons pu montrer que l'analogue de marstacimab présente une réponse différente dans le test de génération de thrombine lorsqu'il est initié par le FT ou par le FXIa. En effet, avec le FXIa comme déclencheur, l'analogue de marstacimab ne présente aucune activité dans ce test. (Sefiane et al, non publié).

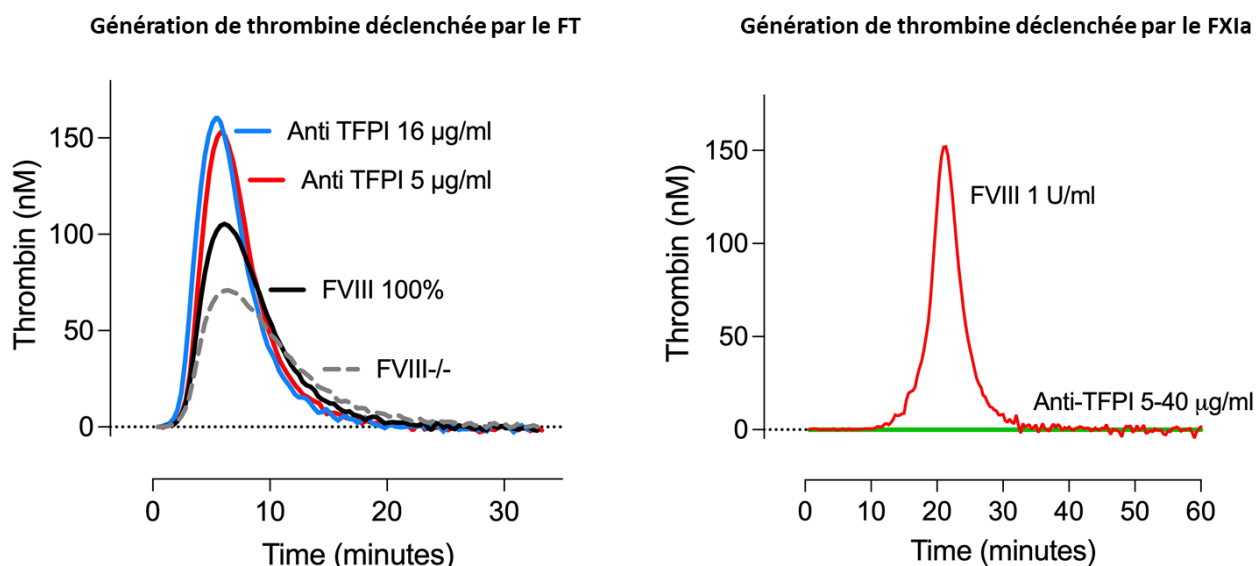


Figure 31: Génération de thrombine dans un plasma déficient en FVIII supplémenté en un analogue de séquence du marstacimab

Ensemble, les données obtenues concernant la détermination d'une équivalence en terme de FVIII et les thérapies non-substitutives semblent indiquer que les tests *in vitro* ne sont pas en mesure de nous permettre d'obtenir une telle équivalence. De plus, ces tests présentent des limites importantes : Tout d'abord, chacun de ces tests nécessite l'utilisation d'un activateur artificiel de la coagulation et la réponse obtenue est dépendante de la concentration en activateur utilisé.²⁷⁸ L'absence des composant cellulaires est une seconde limite importante des tests *in vitro*.²⁵⁹

Nous nous sommes donc proposés d'évaluer si l'utilisation des modèles de saignement *in vivo* pouvait contribuer à établir une équivalence absolue en termes de FVIII pour ces nouvelles thérapies. Dans une étude précédente, une équivalence emicizumab/FVIII de l'ordre de 5 IU/kg de FVIII avait pu être déterminée en utilisant le tail clip appliqué à un modèle de souris déficientes en FVIII traitées par FVIII ou par emicizumab.¹⁹⁸

Au cours de cette étude, j'ai analysé l'effet d'emicizumab et de l'analogue du marstacimab dans quatre tests de saignements différents appliqués au modèle de souris déficient en FVIII. Dans un premier temps, nous avons mis en évidence que la quantité de FVIII nécessaire à la correction du saignement est différente pour chacun des modèles de saignements analysés (de 2,5 à 25 IU/kg). Ces différences pourraient être dues aux conditions locales de la blessure tels que la nature et le nombre de vaisseaux incisés et/ou à des mécanismes hémostatiques différents. En effet, il existe une corrélation entre la sévérité de la blessure générée et la quantité de facteurs de la coagulation disponibles²⁷⁹. L'analyse de la structure du caillot dans les différents modèles, telle que nous l'avons proposée dans ce manuscrit, permettrait probablement d'obtenir des éléments de réponses et mieux comprendre les mécanismes mis en jeu. Il apparaît donc que l'équivalence FVIII est dépendante du modèle de saignement utilisé *in vivo* et que la sévérité du modèle conditionne l'équivalence en termes de FVIII que l'on peut déterminer.

Une des principales limites du modèle murin utilisé est l'humanisation insuffisante de celui-ci. En effet, bien que l'analogue du marstacimab puisse être analysé, le concizumab ne cross-réagissant pas avec le TFPI murin n'a pas pu être étudié. Concernant l'emicizumab, le modèle développé est conditionné par l'ajout de FIX et FX humains. Bien qu'il soit démontré que la présence simultanée de FIX et FX humains et murins n'affecte pas l'activité d'emicizumab dans ce modèle¹⁹⁸, le développement d'un modèle humanisé pour ces facteurs et déficient en FVIII de la coagulation serait intéressant. Un modèle a été rapporté récemment mais présente de faibles taux d'expression du FX et du FIX humains.²⁸⁰ D'autres approches basées sur l'expression de protéines humaines par injections hydrodynamiques pourrait être une alternative mais les taux d'expressions obtenus sont très variables avec cette technique.^{281,282}

En conclusion, il semble qu'il soit irréaliste de vouloir déterminer une équivalence absolue en termes d'activité FVIII pour les thérapies non-substitutives, aussi bien en utilisant les tests d'activité *in vitro* que les tests de saignement *in vivo*. Les mécanismes d'action de ces thérapies sont différents de ceux du FVIII et il est difficile de développer un modèle sans biais permettant de les comparer. En l'état, mes résultats permettent plutôt de suggérer un intervalle d'équivalence avec le FVIII qui doit être affiné selon les conditions étudiées.

CONCLUSION

Au cours de ma thèse j'ai été confronté aussi bien à des cas cliniques qu'à des modèles *in vivo* ou *in vitro*. Cette diversité de projet m'a permis de maîtriser un éventail de techniques et méthodes. J'ai également pu acquérir des compétences transversales comme la gestion de plusieurs projets de recherche, le développement d'une démarche scientifique afin de répondre à des problématiques complexes, l'adaptabilité à différentes thématiques mais également la capacité à communiquer efficacement des données ainsi que le développement d'un esprit critique. Un ensemble de compétence que j'ai pu acquérir et mettre au service des projets de recherche qui m'ont été confiés.

Ces dernières années m'ont permis de développer au sein du laboratoire une expertise en microscopie qui était absente jusque-là. Pour cela j'ai instauré des collaborations aussi bien avec des plateformes d'histologie hospitalières ou de microscopie qu'avec une start-up possédant une expertise en microscopie électronique. Le modèle d'étude du caillot que nous avons ainsi mis en place nous a permis de mettre en évidence certaines différences structurelles liées à l'effet de l'emicizumab chez la souris hémophile A. Notre étude s'est focalisée sur la fibrine du fait de son rôle majeur dans l'architecture du caillot. Les différences que nous avons rapportées restent encore à expliquer. Ce travail va mener à la conduite de nouveaux projets de recherche au laboratoire dans le but de localiser les différents acteurs impliqués dans la formation du caillot par exemple, mais également d'évaluer l'impact des thérapies non substitutives sur les composant cellulaires du caillot comme les plaquettes. En effet la localisation des différentes réactions enzymatiques semble également être un élément crucial dans la formation du caillot et des investigations supplémentaires sont nécessaires.

Les nouvelles thérapies non substitutives en développement comme les anticorps bispécifiques MIM8 et RVX007 mais également les anticorps anti-TFPI ou le fitusiran devraient arriver sur le marché dans un futur proche. Au-delà de leur probable impact majeur dans la prise en charge des patients, ces nouvelles thérapies nous offrent un panel de nouveaux outils qui nous permettront de mieux comprendre l'hémostase et ses régulations et particulièrement le rôle du FVIII.

Pour finir, nous nous sommes intéressés à la structure d'un caillot veineux généré grâce au TVT. L'étude que nous avons menée sur l'équivalence entre FVIII et thérapies non substitutives indique que l'équivalence varie selon le modèle de saignement choisi. Il sera intéressant d'analyser la structure de caillot issus des différents modèles de saignement afin de déterminer d'éventuelles mécanismes hémostatiques dépendant de la zone de blessure. Ces études nécessiteront de surmonter des problématiques techniques mais ouvrent la voie à différents projets de recherche avec un modèle qui est transposable à d'autres maladies hémorragiques tel que l'hémophilie B ou le déficit en FX.

BIBLIOGRAPHIE

1. Kim S, Carrillo M, Kulkarni V, Jagadeeswaran P. Evolution of primary hemostasis in early vertebrates. *PLoS One*. 2009;4(12):e8403.
2. Nishiyama SK, Zhao J, Wray DW, Richardson RS. Vascular function and endothelin-1: tipping the balance between vasodilation and vasoconstriction. *J. Appl. Physiol.* 2017;122(2):354–360.
3. Jackson SP, Nesbitt WS, Kulkarni S. Signaling events underlying thrombus formation. *J. Thromb. Haemost. JTH.* 2003;1(7):1602–1612.
4. Sakariassen KS, Fressinaud E, Girma JP, Meyer D, Baumgartner HR. Role of platelet membrane glycoproteins and von Willebrand factor in adhesion of platelets to subendothelium and collagen. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1987;516:52–65.
5. Moroi M, Jung SM, Nomura S, et al. Analysis of the involvement of the von Willebrand factor-glycoprotein Ib interaction in platelet adhesion to a collagen-coated surface under flow conditions. *Blood.* 1997;90(11):4413–4424.
6. Nieswandt B, Watson SP. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood.* 2003;102(2):449–461.
7. Jung SM, Sonoda M, Tsuji K, et al. Are integrin $\alpha(2)\beta(1)$, glycoprotein Ib and vWf levels correlated with their contributions to platelet adhesion on collagen under high-shear flow? *Platelets.* 2010;21(2):101–111.
8. Sixma JJ, Geuze JJ. Degranulation of human platelets during ADP-induced aggregation. *Vox Sang.* 1968;15(4):309–314.
9. Huang J, Li X, Shi X, et al. Platelet integrin $\alpha\text{IIb}\beta(3)$: signal transduction, regulation, and its therapeutic targeting. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol.* 2019;12:26.
10. Nagata S, Sakuragi T, Segawa K. Flippase and scramblase for phosphatidylserine exposure. *Curr. Opin. Immunol.* 2020;62:31–38.
11. Podoplelova NA, Sveshnikova AN, Kotova YN, et al. Coagulation factors bound to procoagulant platelets concentrate in cap structures to promote clotting. *Blood.* 2016;128(13):1745–1755.
12. Baker CJ, Smith SA, Morrissey JH. Polyphosphate in thrombosis, hemostasis, and inflammation. *Res. Pract. Thromb. Haemost.* 2018;3(1):18–25.
13. New fundamentals in hemostasis - PubMed.
14. Monroe DM, Hoffman M. What does it take to make the perfect clot? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006;26(1):41–48.
15. Yamamoto M, Nakagaki T, Kisiel W. Tissue factor-dependent autoactivation of human blood coagulation factor VII. *J. Biol. Chem.* 1992;267(27):19089–19094.
16. Neuenschwander PF, Fiore MM, Morrissey JH. Factor VII autoactivation proceeds via interaction of distinct protease-cofactor and zymogen-cofactor complexes. Implications of a two-dimensional enzyme kinetic mechanism. *J. Biol. Chem.* 1993;268(29):21489–21492.
17. Mackman N. The Role of Tissue Factor and Factor VIIa in Hemostasis. *Anesth. Analg.* 2009;108(5):1447–1452.
18. Schuijt TJ, Bakhtiari K, Daffre S, et al. Factor Xa activation of factor V is of paramount importance in initiating the coagulation system: lessons from a tick salivary protein. *Circulation.* 2013;128(3):254–266.
19. Krishnaswamy S, Mann KG, Nesheim ME. The prothrombinase-catalyzed activation of prothrombin proceeds through the intermediate meizothrombin in an ordered, sequential reaction. *J. Biol. Chem.* 1986;261(19):8977–8984.
20. Yun S-H, Sim E-H, Goh R-Y, Park J-I, Han J-Y. Platelet Activation: The Mechanisms and Potential Biomarkers. *BioMed Res. Int.* 2016;2016:9060143.
21. Corral-Rodríguez MÁ, Bock PE, Hernández-Carvajal E, Gutiérrez-Gallego R, Fuentes-Prior P. Structural basis of thrombin-mediated factor V activation: the Glu666-Glu672 sequence is critical for processing at the heavy chain–B domain junction. *Blood.* 2011;117(26):7164–7173.
22. Pittman DD, Kaufman RJ. Proteolytic requirements for thrombin activation of anti-hemophilic factor (factor VIII). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1988;85(8):2429–2433.
23. Naito K, Fujikawa K. Activation of human blood coagulation factor XI independent of factor XII. *J. Biol. Chem.* 1991;266(12):7353–7358.
24. Feller T, Connell SDA, Ariens RAS. Why fibrin biomechanical properties matter for hemostasis and thrombosis. *J. Thromb. Haemost.* 2022;20(1):6–16.

25. Lorand L. Factor XIII: Structure, Activation, and Interactions with Fibrinogen and Fibrin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2001;936(1):291–311.
26. Liu L, Dewar L, Song Y, et al. Inhibition of thrombin by antithrombin III and heparin cofactor II in vivo. *Thromb. Haemost.* 1995;73(3):405–412.
27. Pieters J, Willems G, Hemker HC, Lindhout T. Inhibition of factor IXa and factor Xa by antithrombin III/heparin during factor X activation. *J. Biol. Chem.* 1988;263(30):15313–15318.
28. Jin L, Abrahams JP, Skinner R, et al. The anticoagulant activation of antithrombin by heparin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997;94(26):14683–14688.
29. MARONEY SA, MAST AE. New insights into the biology of tissue factor pathway inhibitor. *J. Thromb. Haemost. JTH.* 2015;13(0 1):S200–S207.
30. Esmon CT. The protein C pathway. *Chest.* 2003;124(3 Suppl):26S-32S.
31. Reglińska-Matveyev N, Andersson HM, Rezende SM, et al. TFPI cofactor function of protein S: essential role of the protein S SHBG-like domain. *Blood.* 2014;123(25):3979–3987.
32. Gaffney PJ. Fibrin Degradation Products. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2001;936(1):594–610.
33. Urano T, Castellino FJ, Suzuki Y. Regulation of plasminogen activation on cell surfaces and fibrin. *J. Thromb. Haemost.* 2018;16(8):1487–1497.
34. Chandler WL, Alessi MC, Aillaud MF, et al. Clearance of Tissue Plasminogen Activator (TPA) and TPA/Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 (PAI-1) Complex. *Circulation.* 1997;96(3):761–768.
35. Lobov S, Croucher DR, Saunders DN, Ranson M. Plasminogen activator inhibitor type 2 inhibits cell surface associated tissue plasminogen activator in vitro: potential receptor interactions. *Thromb. Haemost.* 2008;100(2):319–329.
36. Sillen M, Declerck PJ. Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI): An Updated Narrative Review. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(7):3670.
37. Plow EF, Allampallam K, Redlitz A. The Plasma Carboxypeptidases and the Regulation of the Plasminogen System. *Trends Cardiovasc. Med.* 1997;7(3):71–75.
38. Schaller J, Gerber SS. The plasmin-antiplasmin system: structural and functional aspects. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS.* 2011;68(5):785–801.
39. Roche PA, Pizzo SV. Characterization of alpha 2-macroglobulin-plasmin complexes: complete subunit cleavage alters receptor recognition in vivo and in vitro. *Biochemistry.* 1987;26(2):486–491.
40. Gitschier J, Wood WI, Goralka TM, et al. Characterization of the human factor VIII gene. *Nature.* 1984;312(5992):326–330.
41. Vehar GA, Keyt B, Eaton D, et al. Structure of human factor VIII. *Nature.* 1984;312(5992):337–342.
42. Do H, Healey JF, Waller EK, Lollar P. Expression of factor VIII by murine liver sinusoidal endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 1999;274(28):19587–19592.
43. Fomin ME, Zhou Y, Beyer AI, et al. Production of Factor VIII by Human Liver Sinusoidal Endothelial Cells Transplanted in Immunodeficient uPA Mice. *PLoS ONE.* 2013;8(10):e77255.
44. Jacquemin M, Neyrinck A, Hermanns MI, et al. FVIII production by human lung microvascular endothelial cells. *Blood.* 2006;108(2):515–517.
45. Pan J, Dinh TT, Rajaraman A, et al. Patterns of expression of factor VIII and von Willebrand factor by endothelial cell subsets in vivo. *Blood.* 2016;128(1):104–109.
46. Zanolini D, Merlin S, Feola M, et al. Extrahepatic sources of factor VIII potentially contribute to the coagulation cascade correcting the bleeding phenotype of mice with hemophilia A. *Haematologica.* 2015;100(7):881–892.
47. Kaufman RJ, Wasley LC, Dorner AJ. Synthesis, processing, and secretion of recombinant human factor VIII expressed in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 1988;263(13):6352–6362.
48. Lenting PJ, van Mourik JA, Mertens K. The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function. *Blood.* 1998;92(11):3983–3996.
49. Wood WI, Capon DJ, Simonsen CC, et al. Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clones. *Nature.* 1984;312(5992):330–337.
50. Toole JJ, Pittman DD, Orr EC, et al. A large region (approximately equal to 95 kDa) of human factor VIII is dispensable for in vitro procoagulant activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1986;83(16):5939–5942.
51. Pipe SW, Morris JA, Shah J, Kaufman RJ. Differential Interaction of Coagulation Factor VIII and Factor V with Protein Chaperones Calnexin and Calreticulin*. *J. Biol. Chem.* 1998;273(14):8537–8544.

52. Vlot AJ, Koppelman SJ, Meijers JCM, et al. Kinetics of Factor VIII-von Willebrand Factor Association. *Blood*. 1996;87(5):1809–1816.
53. Saenko EL, Scandella D. The acidic region of the factor VIII light chain and the C2 domain together form the high affinity binding site for von willebrand factor. *J. Biol. Chem.* 1997;272(29):18007–18014.
54. Jacquemin M, Lavend'homme R, Benhida A, et al. A novel cause of mild/moderate hemophilia A: mutations scattered in the factor VIII C1 domain reduce factor VIII binding to von Willebrand factor. *Blood*. 2000;96(3):958–965.
55. Leyte A, van Schijndel HB, Niehrs C, et al. Sulfation of Tyr1680 of human blood coagulation factor VIII is essential for the interaction of factor VIII with von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.* 1991;266(2):740–746.
56. Saenko EL, Shima M, Rajalakshmi KJ, Scandella D. A role for the C2 domain of factor VIII in binding to von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.* 1994;269(15):11601–11605.
57. Chiu P-L, Bou-Assaf GM, Chhabra ES, et al. Mapping the interaction between factor VIII and von Willebrand factor by electron microscopy and mass spectrometry. *Blood*. 2015;126(8):935–938.
58. Ganz PR, Atkins JS, Palmer DS, et al. Definition of the affinity of binding between human von Willebrand factor and coagulation factor VIII. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991;180(1):231–237.
59. Mazurier C, Dieval J, Jorieux S, Delobel J, Goudemand M. A new von Willebrand factor (vWF) defect in a patient with factor VIII (FVIII) deficiency but with normal levels and multimeric patterns of both plasma and platelet vWF. Characterization of abnormal vWF/FVIII interaction. *Blood*. 1990;75(1):20–26.
60. Nishino M, Girma JP, Rothschild C, Fressinaud E, Meyer D. New variant of von Willebrand disease with defective binding to factor VIII. *Blood*. 1989;74(5):1591–1599.
61. Weiss HJ, Sussman II, Hoyer LW. Stabilization of Factor VIII in Plasma by the von Willebrand Factor. *J. Clin. Invest.* 1977;60(2):390–404.
62. Koedam JA, Hamer RJ, Beeser-Visser NH, Bouma BN, Sixma JJ. The effect of von Willebrand factor on activation of factor VIII by factor Xa. *Eur. J. Biochem.* 1990;189(2):229–234.
63. Fay PJ, Coumans JV, Walker FJ. von Willebrand factor mediates protection of factor VIII from activated protein C-catalyzed inactivation. *J. Biol. Chem.* 1991;266(4):2172–2177.
64. Koedam JA, Meijers JC, Sixma JJ, Bouma BN. Inactivation of human factor VIII by activated protein C. Cofactor activity of protein S and protective effect of von Willebrand factor. *J. Clin. Invest.* 1988;82(4):1236–1243.
65. Lenting PJ, Donath MJ, van Mourik JA, Mertens K. Identification of a binding site for blood coagulation factor IXa on the light chain of human factor VIII. *J. Biol. Chem.* 1994;269(10):7150–7155.
66. Saenko EL, Scandella D. A mechanism for inhibition of factor VIII binding to phospholipid by von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.* 1995;270(23):13826–13833.
67. Nesheim M, Pittman DD, Giles AR, et al. The effect of plasma von Willebrand factor on the binding of human factor VIII to thrombin-activated human platelets. *J. Biol. Chem.* 1991;266(27):17815–17820.
68. Dasgupta S, Repessé Y, Bayry J, et al. VWF protects FVIII from endocytosis by dendritic cells and subsequent presentation to immune effectors. *Blood*. 2007;109(2):610–612.
69. Lenting PJ, Neels JG, van den Berg BM, et al. The light chain of factor VIII comprises a binding site for low density lipoprotein receptor-related protein. *J. Biol. Chem.* 1999;274(34):23734–23739.
70. Kaufman RJ, Pipe SW, Tagliavacca L, Swaroop M, Moussalli M. Biosynthesis, assembly and secretion of coagulation factor VIII. *Blood Coagul. Fibrinolysis Int. J. Haemost. Thromb.* 1997;8 Suppl 2:S3-14.
71. Nogami K, Zhou Q, Wakabayashi H, Fay PJ. Thrombin-catalyzed activation of factor VIII with His substituted for Arg372 at the P1 site. *Blood*. 2005;105(11):4362–4368.
72. Eaton D, Rodriguez H, Vehar GA. Proteolytic processing of human factor VIII. Correlation of specific cleavages by thrombin, factor Xa, and activated protein C with activation and inactivation of factor VIII coagulant activity. *Biochemistry*. 1986;25(2):505–512.
73. Pipe SW, Montgomery RR, Pratt KP, Lenting PJ, Lillicrap D. Life in the shadow of a dominant partner: the FVIII-VWF association and its clinical implications for hemophilia A. *Blood*. 2016;128(16):2007–2016.
74. Foster PA, Fulcher CA, Houghten RA, Zimmerman TS. Synthetic factor VIII peptides with amino acid sequences contained within the C2 domain of factor VIII inhibit factor VIII binding to phosphatidylserine. *Blood*. 1990;75(10):1999–2004.

75. Hsu T-C, Pratt KP, Thompson AR. The factor VIII C1 domain contributes to platelet binding. *Blood*. 2008;111(1):200–208.
76. Kamikubo Y, Mendolicchio GL, Zampolli A, et al. Selective factor VIII activation by the tissue factor–factor VIIa–factor Xa complex. *Blood*. 2017;130(14):1661–1670.
77. Lenting PJ, Christophe OD, Guéguen P. The disappearing act of factor VIII. *Haemophilia*. 2010;16(102):6–15.
78. Pipe SW, Eickhorst AN, McKinley SH, Saenko EL, Kaufman RJ. Mild hemophilia A caused by increased rate of factor VIII A2 subunit dissociation: evidence for nonproteolytic inactivation of factor VIIIA in vivo. *Blood*. 1999;93(1):176–183.
79. Wakabayashi H, Fay PJ. Identification of residues contributing to A2 domain-dependent structural stability in factor VIII and factor VIIIA. *J. Biol. Chem*. 2008;283(17):11645–11651.
80. Fay PJ, Smudzin TM. Characterization of the interaction between the A2 subunit and A1/A3-C1-C2 dimer in human factor VIIIA. *J. Biol. Chem*. 1992;267(19):13246–13250.
81. Griffiths AE, Rydkin I, Fay PJ. Factor VIIIA A2 Subunit Shows a High Affinity Interaction with Factor IXa. *J. Biol. Chem*. 2013;288(21):15057–15064.
82. Lamphear BJ, Fay PJ. Factor IXa enhances reconstitution of factor VIIIA from isolated A2 subunit and A1/A3-C1-C2 dimer. *J. Biol. Chem*. 1992;267(6):3725–3730.
83. Fay PJ, Beattie TL, Regan LM, O'Brien LM, Kaufman RJ. Model for the factor VIIIA-dependent decay of the intrinsic factor Xase. Role of subunit dissociation and factor IXa-catalyzed proteolysis. *J. Biol. Chem*. 1996;271(11):6027–6032.
84. O'Brien DP, Johnson D, Byfield P, Tuddenham EG. Inactivation of factor VIII by factor IXa. *Biochemistry*. 1992;31(10):2805–2812.
85. Lenting PJ, van Mourik JA, Mertens K. The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function. *Blood*. 1998;92(11):3983–3996.
86. Plantier JL, Rolli V, Ducasse C, et al. Activated factor X cleaves factor VIII at arginine 562, limiting its cofactor efficiency. *J. Thromb. Haemost*. 2010;8(2):286–293.
87. Nogami K, Shima M, Matsumoto T, et al. Mechanisms of Plasmin-Catalyzed Inactivation of the Factor VIII. *Blood*. 2005;106(11):1017.
88. Varfaj F, Wakabayashi H, Fay PJ. Residues surrounding Arg336 and Arg562 contribute to the disparate rates of proteolysis of factor VIIIA catalyzed by activated protein C. *J. Biol. Chem*. 2007;282(28):20264–20272.
89. Nogami K, Nishiya K, Saenko EL, et al. Identification of plasmin-interactive sites in the light chain of factor VIII responsible for proteolytic cleavage at Lys36. *J. Biol. Chem*. 2009;284(11):6934–6945.
90. Parsons NA, Ho MD, Davidson RJ, et al. Regulation of Factor VIII By Activated Protein C: Assessment In Vitro and In Vivo. *Blood*. 2017;130(Supplement 1):3650.
91. Blanchette VS, Key NS, Ljung LR, et al. Definitions in hemophilia: communication from the SSC of the ISTH. *J. Thromb. Haemost*. 2014;12(11):1935–1939.
92. Pavlova A, Oldenburg J. Defining Severity of Hemophilia: More than Factor Levels. *Semin. Thromb. Hemost*. 2013;39(7):702–710.
93. Iorio A, Stonebraker J, Chambost H, et al. Establishing the Prevalence and Prevalence at Birth of Hemophilia in Males. *Ann. Intern. Med*. 2019;
94. Lobet S, Hermans C, Lambert C. Optimal management of hemophilic arthropathy and hematomas. *J. Blood Med*. 2014;5:207–218.
95. von Kodolitsch Y, Berger J, Rogan PK. Predicting severity of haemophilia A and B splicing mutations by information analysis. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph*. 2006;12(3):258–262.
96. Repessé Y, Slaoui M, Ferrandiz D, et al. Factor VIII (FVIII) gene mutations in 120 patients with hemophilia A: detection of 26 novel mutations and correlation with FVIII inhibitor development. *J. Thromb. Haemost. JTH*. 2007;5(7):1469–1476.
97. Bowen DJ. Haemophilia A and haemophilia B: molecular insights. *Mol. Pathol*. 2002;55(2):127–144.
98. Lakich D, Kazazian HH, Antonarakis SE, Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nat. Genet*. 1993;5(3):236–241.
99. Naylor J, Brinke A, Hassock S, Green PM, Giannelli F. Characteristic mRNA abnormality found in half the patients with severe haemophilia A is due to large DNA inversions. *Hum. Mol. Genet*. 1993;2(11):1773–1778.

100. Bagnall RD, Waseem N, Green PM, Giannelli F. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. *Blood*. 2002;99(1):168–174.
101. Franchini M, Favaloro EJ, Lippi G. Mild hemophilia A. *J. Thromb. Haemost.* 2010;8(3):421–432.
102. Berntorp E, Fischer K, Hart DP, et al. Haemophilia. *Nat. Rev. Dis. Primer.* 2021;7(1):1–19.
103. Lafeber FPJG, Miossec P, Valentino LA. Physiopathology of haemophilic arthropathy. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* 2008;14 Suppl 4:3–9.
104. Raso S, Lambert C, Boban A, et al. Can we compare haemophilia carriers with clotting factor deficiency to male patients with mild haemophilia? *Haemophilia*. 2020;26(1):117–121.
105. van Galen KPM, d’Oiron R, James P, et al. A new hemophilia carrier nomenclature to define hemophilia in women and girls: Communication from the SSC of the ISTH. *J. Thromb. Haemost. JTH.* 2021;19(8):1883–1887.
106. Hermans C, Kulkarni R. Women with bleeding disorders. *Haemophilia*. 2018;24(S6):29–36.
107. Peyvandi F, Garagiola I, Young G. The past and future of haemophilia: diagnosis, treatments, and its complications. *The Lancet*. 2016;388(10040):187–197.
108. Fischer K, van der Bom JG, Mauser-Bunschoten EP, et al. Changes in treatment strategies for severe haemophilia over the last 3 decades: effects on clotting factor consumption and arthropathy. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* 2001;7(5):446–452.
109. Dijk K van, Bom J van der, Lenting PJ, et al. Factor VIII half-life and clinical phenotype of severe hemophilia A. *Haematologica*. 2005;90(4):494–498.
110. Mahlangu J, Powell JS, Ragni MV, et al. Phase 3 study of recombinant factor VIII Fc fusion protein in severe hemophilia A. *Blood*. 2014;123(3):317–325.
111. Mei B, Pan C, Jiang H, et al. Rational design of a fully active, long-acting PEGylated factor VIII for hemophilia A treatment. *Blood*. 2010;116(2):270–279.
112. Ivens IA, Baumann A, McDonald TA, et al. PEGylated therapeutic proteins for haemophilia treatment: a review for haemophilia caregivers. *Haemophilia*. 2013;19(1):11–20.
113. Thim L, Vandahl B, Karlsson J, et al. Purification and characterization of a new recombinant factor VIII (N8). *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* 2010;16(2):349–359.
114. Turecek PL, Bossard MJ, Graninger M, et al. BAX 855, a PEGylated rFVIII product with prolonged half-life. Development, functional and structural characterisation. *Hamostaseologie*. 2012;32 Suppl 1:S29-38.
115. Veronese FM, Pasut G. PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discov. Today*. 2005;10(21):1451–1458.
116. Rath T, Baker K, Dumont JA, et al. Fc-fusion proteins and FcRn: structural insights for longer-lasting and more effective therapeutics. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2015;35(2):235–254.
117. DiMichele. Inhibitors in haemophilia: a primer. *Haemophilia*. 2000;6(s1):38–40.
118. de Biasi R, Rocino A, Papa ML, et al. Incidence of factor VIII inhibitor development in hemophilia A patients treated with less pure plasma derived concentrates. *Thromb. Haemost.* 1994;71(5):544–547.
119. Whelan SFJ, Hofbauer CJ, Horling FM, et al. Distinct characteristics of antibody responses against factor VIII in healthy individuals and in different cohorts of hemophilia A patients. *Blood*. 2013;121(6):1039–1048.
120. Hofbauer CJ, Whelan SFJ, Hirschler M, et al. Affinity of FVIII-specific antibodies reveals major differences between neutralizing and nonneutralizing antibodies in humans. *Blood*. 2015;125(7):1180–1188.
121. Lacroix-Desmazes S, Misra N, Bayry J, et al. Pathophysiology of inhibitors to factor VIII in patients with haemophilia A: PATHOPHYSIOLOGY OF FVIII INHIBITORS IN HAEMOPHILIA A. *Haemophilia*. 2002;8(3):273–279.
122. Ananyeva NM, Lacroix-Desmazes S, Hauser CA, et al. Inhibitors in hemophilia A: mechanisms of inhibition, management and perspectives. *Blood Coagul. Fibrinolysis*. 2004;15(2):109–124.
123. Schep SJ, Schutgens REG, Fischer K, Boes ML. Review of immune tolerance induction in hemophilia A. *Blood Rev.* 2018;32(4):326–338.
124. Mahlangu J, Oldenburg J, Paz-Priel I, et al. Emicizumab Prophylaxis in Patients Who Have Hemophilia A without Inhibitors. *N. Engl. J. Med.* 2018;379(9):811–822.

125. Oldenburg J, Mahlangu JN, Bujan W, et al. The effect of emicizumab prophylaxis on health-related outcomes in persons with haemophilia A with inhibitors: HAVEN 1 Study. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* 2019;25(1):33–44.
126. Callaghan MU, Negrier C, Paz-Priel I, et al. Long-term outcomes with emicizumab prophylaxis for hemophilia A with or without FVIII inhibitors from the HAVEN 1-4 studies. *Blood.* 2021;137(16):2231–2242.
127. Young G, Liesner R, Chang T, et al. A multicenter, open-label phase 3 study of emicizumab prophylaxis in children with hemophilia A with inhibitors. *Blood.* 2019;134(24):2127–2138.
128. Pipe SW, Shima M, Lehle M, et al. Efficacy, safety, and pharmacokinetics of emicizumab prophylaxis given every 4 weeks in people with haemophilia A (HAVEN 4): a multicentre, open-label, non-randomised phase 3 study. *Lancet Haematol.* 2019;6(6):e295–e305.
129. Négrier C, Mahlangu J, Lehle M, et al. Emicizumab in people with moderate or mild haemophilia A (HAVEN 6): a multicentre, open-label, single-arm, phase 3 study. *Lancet Haematol.* 2023;10(3):e168–e177.
130. Pipe SW, Collins P, Dhalluin C, et al. Emicizumab Prophylaxis for the Treatment of Infants with Severe Hemophilia A without Factor VIII Inhibitors: Results from the Interim Analysis of the HAVEN 7 Study. *Blood.* 2022;140(Supplement 1):457–459.
131. Lenting PJ, Denis CV, Christophe OD. Emicizumab, a bispecific antibody recognizing coagulation factors IX and X: how does it actually compare to factor VIII? *Blood.* 2017;130(23):2463–2468.
132. Lenting PJ, Denis CV, Christophe OD. Emicizumab, a bispecific antibody recognizing coagulation factors IX and X: how does it actually compare to factor VIII? *Blood.* 2017;130(23):2463–2468.
133. Griffiths AE, Rydkin I, Fay PJ. Factor VIIIa A2 subunit shows a high affinity interaction with factor IXa: contribution of A2 subunit residues 707-714 to the interaction with factor IXa. *J. Biol. Chem.* 2013;288(21):15057–15064.
134. Soeda T, Nogami K, Nishiya K, et al. The factor VIIIa C2 domain (residues 2228-2240) interacts with the factor IXa Gla domain in the factor Xase complex. *J. Biol. Chem.* 2009;284(6):3379–3388.
135. Lapan KA, Fay PJ. Localization of a factor X interactive site in the A1 subunit of factor VIIIa. *J. Biol. Chem.* 1997;272(4):2082–2088.
136. Takeyama M, Wakabayashi H, Fay PJ. Factor VIII light chain contains a binding site for factor X that contributes to the catalytic efficiency of factor Xase. *Biochemistry.* 2012;51(3):820–828.
137. Kitazawa T, Esaki K, Tachibana T, et al. Factor VIIIa-mimetic cofactor activity of a bispecific antibody to factors IX/IXa and X/Xa, emicizumab, depends on its ability to bridge the antigens. *Thromb. Haemost.* 2017;117(7):1348–1357.
138. Stoylova SS, Lenting PJ, Kemball-Cook G, Holzenburg A. Electron crystallography of human blood coagulation factor VIII bound to phospholipid monolayers. *J. Biol. Chem.* 1999;274(51):36573–36578.
139. Stoilova-McPhie S, Villoutreix BO, Mertens K, Kemball-Cook G, Holzenburg A. 3-Dimensional structure of membrane-bound coagulation factor VIII: modeling of the factor VIII heterodimer within a 3-dimensional density map derived by electron crystallography. *Blood.* 2002;99(4):1215–1223.
140. Meems H, Meijer AB, Cullinan DB, Mertens K, Gilbert GE. Factor VIII C1 domain residues Lys 2092 and Phe 2093 contribute to membrane binding and cofactor activity. *Blood.* 2009;114(18):3938–3946.
141. Je P, St, Lord, Ge G. Fibrin stimulates platelets to increase factor VIIIa binding site expression. *J. Thromb. Haemost. JTH.* 2004;2(10):.
142. Rosenberg JS, McKenna PW, Rosenberg RD. Inhibition of human factor IXa by human antithrombin. *J. Biol. Chem.* 1975;250(23):8883–8888.
143. Protease nexin-2/amyloid beta protein precursor. A tight-binding inhibitor of coagulation factor IXa - PubMed.
144. Plautz WE, Pilli VSS, Cooley BC, et al. The Anticoagulant Protein S Targets the Factor IXa Heparin-Binding Exosite to Prevent Thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2018;38(4):816–828.
145. Wilhelm AR, Parsons NA, Samelson-Jones BJ, et al. Activated protein C has a regulatory role in factor VIII function. *Blood.* 2021;137(18):2532–2543.
146. Paz-Priel I, Chang T, Asikanius E, et al. Immunogenicity of Emicizumab in People with Hemophilia A (PwHA): Results from the HAVEN 1-4 Studies. *Blood.* 2018;132:633.
147. Valsecchi C, Gobbi M, Beeg M, et al. Characterization of the neutralizing anti-emicizumab antibody in a patient with hemophilia A and inhibitor. *J. Thromb. Haemost. JTH.* 2021;19(3):711–718.

148. Harkins Druzgal C, Kizilocak H, Brown J, Sennett M, Young G. Neutralizing antidrug antibody to emicizumab in a patient with severe hemophilia A with inhibitors: New case with detailed laboratory evaluation. *J. Thromb. Haemost. JTH.* 2020;18(9):2205–2208.
149. Kaneda M, Kawasaki R, Matsumoto N, et al. Detailed analysis of anti-emicizumab antibody decreasing drug efficacy, using plasma samples from a patient with hemophilia A. *J. Thromb. Haemost. JTH.* 2021;19(12):2938–2946.
150. Kizilocak H, Guerrera MF, Young G. Neutralizing antidrug antibody to emicizumab in patients with severe hemophilia A: Case report of a first noninhibitor patient and review of the literature. *Res. Pract. Thromb. Haemost.* 2023;7(6):102194.
151. Varadi K, Tangada S, Loeschberger M, et al. Pro- and anticoagulant factors facilitate thrombin generation and balance the haemostatic response to FEIBA® in prophylactic therapy. *Haemophilia.* 2016;22(4):615–624.
152. Hochschwender SM, Laursen RA. The lysine binding sites of human plasminogen. Evidence for a critical tryptophan in the binding site of kringle 4. *J. Biol. Chem.* 1981;256(21):11172–11176.
153. Watterson C, Beacher N. Preventing perioperative bleeding in patients with inherited bleeding disorders. *Evid. Based Dent.* 2017;18(1):28–29.
154. Wardrop D, Estcourt LJ, Brunskill SJ, et al. Antifibrinolytics (lysine analogues) for the prevention of bleeding in patients with haematological disorders. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2013;(7):CD009733.
155. Mannucci PM, Ruggeri ZM, Pareti FI, Capitanio A. 1-Deamino-8-d-arginine vasopressin: a new pharmacological approach to the management of haemophilia and von Willebrands' diseases. *Lancet Lond. Engl.* 1977;1(8017):869–872.
156. Konkle BA, Shapiro AD, Quon DV, et al. BIVV001 Fusion Protein as Factor VIII Replacement Therapy for Hemophilia A. *N. Engl. J. Med.* 2020;383(11):1018–1027.
157. Haeckel A, Appler F, Ariza de Schellenberger A, Schellenberger E. XTEN as Biological Alternative to PEGylation Allows Complete Expression of a Protease-Activatable Killin-Based Cytostatic. *PLoS ONE.* 2016;11(6):e0157193.
158. von Drygalski A, Chowdary P, Kulkarni R, et al. Efanesoctocog Alfa Prophylaxis for Patients with Severe Hemophilia A. *N. Engl. J. Med.* 2023;388(4):310–318.
159. Østergaard H, Lund J, Greisen PJ, et al. A factor VIIIa-mimetic bispecific antibody, Mim8, ameliorates bleeding upon severe vascular challenge in hemophilia A mice. *Blood.* 2021;138(14):1258–1268.
160. Valsecchi C, Gualtierotti R, Arcudi S, et al. Anti-emicizumab antibodies do not cross-react with mim8 in vitro. *Res. Pract. Thromb. Haemost.* 2023;7(6):102161.
161. Koga H, Yamano T, Betancur J, et al. Efficient production of bispecific antibody by FAST-Ig™ and its application to NXT007 for the treatment of hemophilia A. *mAbs.* 15(1):2222441.
162. Teranishi-Ikawa Y, Soeda T, Koga H, et al. A bispecific antibody NXT007 exerts a hemostatic activity in hemophilia A monkeys enough to keep a non-hemophiliac state. 2023;2022.12.19.520692.
163. Chowdary P. Inhibition of Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) as a Treatment for Haemophilia: Rationale with Focus on Concizumab. *Drugs.* 2018;78(9):881–890.
164. Matsushita T, Shapiro A, Abraham A, et al. Phase 3 Trial of Concizumab in Hemophilia with Inhibitors. *N. Engl. J. Med.* 2023;389(9):783–794.
165. Mahlangu J, Luis Lamas J, Cristobal Morales J, et al. Long-term safety and efficacy of the anti-tissue factor pathway inhibitor marstacimab in participants with severe haemophilia: Phase II study results. *Br. J. Haematol.* 2023;200(2):240–248.
166. Mancuso ME, Ingham SJM, Kunze M. Befovacimab, an anti-tissue factor pathway inhibitor antibody: Early termination of the multiple-dose, dose-escalating Phase 2 study due to thrombosis. *Haemophilia.* 2022;28(5):702–712.
167. Lijfering WM, Brouwer J-LP, Veeger NJGM, et al. Selective testing for thrombophilia in patients with first venous thrombosis: results from a retrospective family cohort study on absolute thrombotic risk for currently known thrombophilic defects in 2479 relatives. *Blood.* 2009;113(21):5314–5322.
168. Shetty S, Vora S, Kulkarni B, et al. Contribution of natural anticoagulant and fibrinolytic factors in modulating the clinical severity of haemophilia patients. *Br. J. Haematol.* 2007;138(4):541–544.

169. Tanowitz M, Hettrick L, Revenko A, et al. Asialoglycoprotein receptor 1 mediates productive uptake of N-acetylgalactosamine-conjugated and unconjugated phosphorothioate antisense oligonucleotides into liver hepatocytes. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(21):12388–12400.
170. Young G, Lenting PJ, Croteau SE, Nolan B, Srivastava A. Antithrombin lowering in hemophilia: a closer look at fitusiran. *Res. Pract. Thromb. Haemost.* 2023;7(4):100179.
171. Young G, Srivastava A, Kavakli K, et al. Efficacy and safety of fitusiran prophylaxis in people with haemophilia A or haemophilia B with inhibitors (ATLAS-INH): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Lond. Engl.* 2023;401(10386):1427–1437.
172. Sanrattana W, Maas C, de Maat S. SERPINS-From Trap to Treatment. *Front. Med.* 2019;6:25.
173. Polderdijk SGI, Adams TE, Ivanciu L, et al. Design and characterization of an APC-specific serpin for the treatment of hemophilia. *Blood.* 2017;129(1):105–113.
174. Ozelo MC, Mahlangu J, Pasi KJ, et al. Valoctocogene Roxaparovec Gene Therapy for Hemophilia A. *N. Engl. J. Med.* 2022;386(11):1013–1025.
175. Mahlangu J, Kaczmarek R, von Drygalski A, et al. Two-Year Outcomes of Valoctocogene Roxaparovec Therapy for Hemophilia A. *N. Engl. J. Med.* 2023;388(8):694–705.
176. SSC Subcommittee on Models of Thrombosis and Hemostasis - ISTH Community.
177. Yen C-T, Fan M-N, Yang Y-L, et al. Current animal models of hemophilia: the state of the art. *Thromb. J.* 2016;14(1):22.
178. Field RA, Rickard CG, Hutt FB. Hemophilia in a family of dogs. *Cornell Vet.* 1946;36(4):285–300.
179. Graham JB, Buckwalter JA. Canine hemophilia; observations on the course, the clotting anomaly, and the effect of blood transfusions. *J. Exp. Med.* 1949;90(2):97–111.
180. Hemophilia in the female dog - PubMed.
181. Giles AR, Tinlin S, Hoogendoorn H, Greenwood P, Greenwood R. Development of factor VIII:C antibodies in dogs with hemophilia A (factor VIII:C deficiency). *Blood.* 1984;63(2):451–456.
182. Backfisch W, Neuenschwander S, Giger U, Stranzinger G, Pliska V. Carrier detection of ovine hemophilia A using an RFLP marker, and mapping of the factor VIII gene on the ovine X-chromosome. *J. Hered.* 1994;85(6):474–478.
183. Neuenschwander S, Kissling-Albrecht L, Heiniger J, et al. Inherited defect of blood clotting factor VIII (haemophilia A) in sheep. *Thromb. Haemost.* 1992;68(5):618–620.
184. Hutchins D, Lephed E, Crook I. A case of equine haemophilia. *Aust. Vet. J.* 2008;43:83–87.
185. Hemostatic effect of a monoclonal antibody mAb 2021 blocking the interaction between FXa and TFPI in a rabbit hemophilia model - PubMed.
186. Kitazawa T, Igawa T, Sampei Z, et al. A bispecific antibody to factors IXa and X restores factor VIII hemostatic activity in a hemophilia A model. *Nat. Med.* 2012;18(10):1570–1574.
187. Mohammed BM, Monroe DM, Gailani D. Mouse Models of Hemostasis. *Platelets.* 2020;31(4):417.
188. Siner JI, Iacobelli NP, Sabatino DE, et al. Minimal modification in the factor VIII B-domain sequence ameliorates the murine hemophilia A phenotype. *Blood.* 2013;121(21):4396–4403.
189. Di Minno G, Cerbone AM, Coppola A, et al. Longer-acting factor VIII to overcome limitations in haemophilia management: the PEGylated liposomes formulation issue. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* 2010;16 Suppl 1:2–6.
190. Reipert BM, Sasgary M, Ahmad RU, et al. Blockade of CD40/CD40 ligand interactions prevents induction of factor VIII inhibitors in hemophilic mice but does not induce lasting immune tolerance. *Thromb. Haemost.* 2001;86(6):1345–1352.
191. Meeks SL, Cox CL, Healey JF, et al. A major determinant of the immunogenicity of factor VIII in a murine model is independent of its procoagulant function. *Blood.* 2012;120(12):2512–2520.
192. Qian J, Borovok M, Bi L, Kazazian HH, Hoyer LW. Inhibitor antibody development and T cell response to human factor VIII in murine hemophilia A. *Thromb. Haemost.* 1999;81(2):240–244.
193. Chao BN, Baldwin WH, Healey JF, et al. Characterization of a genetically engineered mouse model of hemophilia A with complete deletion of the F8 gene. *J. Thromb. Haemost. JTH.* 2016;14(2):346–355.
194. Kashiwakura Y, Mimuro J, Onishi A, et al. Porcine model of hemophilia A. *PLoS One.* 2012;7(11):e49450.
195. Ohmori T, Mizukami H, Ozawa K, Sakata Y, Nishimura S. New approaches to gene and cell therapy for hemophilia. *J. Thromb. Haemost.* 2015;13:S133–S142.

196. Johansen PB, Tranholm M, Haaning J, Knudsen T. Development of a tail vein transection bleeding model in fully anaesthetized haemophilia A mice – characterization of two novel FVIII molecules. *Haemophilia*. 2016;22(4):625–631.
197. Broze GJ, Yin ZF, Lasky N. A tail vein bleeding time model and delayed bleeding in hemophilic mice. *Thromb. Haemost.* 2001;85(4):747–748.
198. Ferrière S, Peyron I, Christophe OD, et al. A hemophilia A mouse model for the in vivo assessment of emicizumab function. *Blood*. 2020;136(6):740–748.
199. Liu Y, Jennings NL, Dart AM, Du X-J. Standardizing a simpler, more sensitive and accurate tail bleeding assay in mice. *World J. Exp. Med.* 2012;2(2):30–36.
200. Buyue Y, Whinna HC, Sheehan JP. The heparin-binding exosite of factor IXa is a critical regulator of plasma thrombin generation and venous thrombosis. *Blood*. 2008;112(8):3234–3241.
201. Pastoft AE, Lykkesfeldt J, Ezban M, et al. A sensitive venous bleeding model in haemophilia A mice: effects of two recombinant FVIII products (N8 and Advate®). *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* 2012;18(5):782–788.
202. Lauritzen B, Bjelke M, Björkdahl O, et al. A novel next-generation FVIIIa mimetic, Mim8, has a favorable safety profile and displays potent pharmacodynamic effects: Results from safety studies in cynomolgus monkeys. *J. Thromb. Haemost.* 2022;20(6):1312–1324.
203. Janbain M, Enjolras N, Bolbos R, et al. Haemostatic effect of adding tranexamic acid to emicizumab prophylaxis in severe haemophilia A: A preclinical study. *Haemophilia*. 2021;27(6):1002–1006.
204. Daraei A, Pieters M, Baker SR, et al. Automated Fiber Diameter and Porosity Measurements of Plasma Clots in Scanning Electron Microscopy Images. *Biomolecules*. 2021;11(10):1536.
205. Belcher HA, Guthold M, Hudson NE. What is the diameter of a fibrin fiber? *Res. Pract. Thromb. Haemost.* 2023;7(5):100285.
206. Goldstein J, Yakowitz H. Practical scanning electron microscopy : electron and ion microprobe analysis. 1975;
207. Goldstein JI, Newbury DE, Echlin P, et al. Coating and Conductivity Techniques for SEM and Microanalysis. *Scanning Electron Microsc. X-Ray Microanal. Text Biol. Mater. Sci. Geol.* 1992;671–740.
208. McMahon G. Analytical Instrumentation A Guide to Laboratory, Portable and Miniaturized Instruments.
209. Zhou W, Apkarian R, Wang ZL, Joy D. Fundamentals of Scanning Electron Microscopy (SEM). *Scanning Microsc. Nanotechnol.* 2006;1–40.
210. Reimer L. Emission of Backscattered and Secondary Electrons. *Scanning Electron Microsc. Phys. Image Form. Microanal.* 1998;135–169.
211. Reimer L. Electron Scattering and Diffusion. *Scanning Electron Microsc. Phys. Image Form. Microanal.* 1998;57–134.
212. Reimer L. Electron Detectors and Spectrometers. *Scanning Electron Microsc. Phys. Image Form. Microanal.* 1998;171–205.
213. Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis: A Text for Biologists, Materials Scientists, and Geologists | SpringerLink.
214. Bhattacharya R, Saha S, Kostina O, Muravnik L, Mitra A. Replacing critical point drying with a low-cost chemical drying provides comparable surface image quality of glandular trichomes from leaves of *Millingtonia hortensis* L. f. in scanning electron micrograph. *Appl. Microsc.* 2020;50(1):15.
215. Gusnard D, Kirschner RH. Cell and organelle shrinkage during preparation for scanning electron microscopy: effects of fixation, dehydration and critical point drying. *J. Microsc.* 1977;110(1):51–57.
216. Hazrin-Chong NH, Manefield M. An alternative SEM drying method using hexamethyldisilazane (HMDS) for microbial cell attachment studies on sub-bituminous coal. *J. Microbiol. Methods.* 2012;90(2):96–99.
217. Marchi R, Vilar R, Durual S, et al. Fibrin clot properties to assess the bleeding phenotype in unrelated patients with hypodysfibrinogenemia due to novel fibrinogen mutations. *Thromb. Res.* 2021;197:56–64.
218. Tiersch B. Cryotechniques in biological electron microscopy. Hg. Von R. A. STEINBRECHT und K. ZIEROLD. ISBN 3-540-18046-X. Berlin/Heidelberg/New York/London/Paris/Tokio: Springer-Verlag 1987. 297 S., 108 Abb., geb., DM 186,00. *Acta Polym.* 1989;40(1):73–73.

219. Takaku Y, Suzuki H, Kawasaki H, et al. A modified 'NanoSuit®' preserves wet samples in high vacuum: direct observations on cells and tissues in field-emission scanning electron microscopy. *R. Soc. Open Sci.* 2017;4(3):160887.
220. Im K, Mareninov S, Diaz MFP, Yong WH. An introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ.* 2019;1897:299–311.
221. Cho Y, Seo J, Sim Y, et al. FRACTAL: Signal amplification of immunofluorescence via cyclic staining of target molecules. *Nanoscale.* 2020;12(46):23506–23513.
222. Bolognesi MM, Manzoni M, Scalia CR, et al. Multiplex Staining by Sequential Immunostaining and Antibody Removal on Routine Tissue Sections. *J. Histochem. Cytochem.* 2017;65(8):431–444.
223. Galbraith CG, Galbraith JA. Super-resolution microscopy at a glance. *J. Cell Sci.* 2011;124(10):1607–1611.
224. Verdaasdonk JS, Stephens AD, Haase J, Bloom K. Bending the Rules: Widefield Microscopy and the Abbe Limit of Resolution. *J. Cell. Physiol.* 2014;229(2):132–138.
225. Sticker M, Elsässer R, Neumann M, Wolff H. How to Get Better Fluorescence Images with Your Widefield Microscope: A Methodology Review. *Microsc. Today.* 2020;28(6):36–43.
226. Elliott AD. Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices. *Curr. Protoc. Cytom.* 2020;92(1):e68.
227. Klaus AV, Schawaroch V, Frischmann KJ. Confocal Imaging and Three-Dimensional Visualization of Thick Autofluorescent Specimens. *Confocal Microsc. Methods Protoc.* 2014;213–225.
228. Yuste R. Fluorescence microscopy today. *Nat. Methods.* 2005;2(12):902–904.
229. Zucker RM. Evaluating Confocal Microscopy System Performance. *Confocal Microsc. Methods Protoc.* 2014;321–374.
230. Galbraith CG, Galbraith JA. Super-resolution microscopy at a glance. *J. Cell Sci.* 2011;124(10):1607–1611.
231. Henriques R, Griffiths C, Hesper Rego E, Mhlanga MM. PALM and STORM: unlocking live-cell super-resolution. *Biopolymers.* 2011;95(5):322–331.
232. Beckstead JH. A simple technique for preservation of fixation-sensitive antigens in paraffin-embedded tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 1994;42(8):1127–1134.
233. Krenacs L, Krenacs T, Stelkovic E, Raffeld M. Heat-Induced Antigen Retrieval for Immunohistochemical Reactions in Routinely Processed Paraffin Sections. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ.* 2010;588:103–119.
234. Roberts K, Tuck L. Embedding and freezing fresh human tissue in OCT using isopentane. 2019;
235. Siniarski A, Baker SR, Duval C, et al. Quantitative analysis of clot density, fibrin fiber radius, and protofibril packing in acute phase myocardial infarction. *Thromb. Res.* 2021;205:110–119.
236. Undas A, Slowik A, Wolkow P, Szczudlik A, Tracz W. Fibrin clot properties in acute ischemic stroke: relation to neurological deficit. *Thromb. Res.* 2010;125(4):357–361.
237. Undas A, Ariëns RAS. Fibrin clot structure and function: a role in the pathophysiology of arterial and venous thromboembolic diseases. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011;31(12):e88-99.
238. Dunn EJ, Ariëns R a. S, Grant PJ. The influence of type 2 diabetes on fibrin structure and function. *Diabetologia.* 2005;48(6):1198–1206.
239. de Vries JJ, Visser C, Geers L, et al. Altered fibrin network structure and fibrinolysis in intensive care unit patients with COVID-19, not entirely explaining the increased risk of thrombosis. *J. Thromb. Haemost. JTH.* 2022;20(6):1412–1420.
240. Carr ME. Fibrin formed in plasma is composed of fibers more massive than those formed from purified fibrinogen. *Thromb. Haemost.* 1988;59(3):535–539.
241. Weisel JW, Nagaswami C. Computer modeling of fibrin polymerization kinetics correlated with electron microscope and turbidity observations: clot structure and assembly are kinetically controlled. *Biophys. J.* 1992;63(1):111–128.
242. Blombäck B, Banerjee D, Carlsson K, et al. Native fibrin gel networks and factors influencing their formation in health and disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1990;281:1–23.
243. Ryan EA, Mockros LF, Weisel JW, Lorand L. Structural origins of fibrin clot rheology. *Biophys. J.* 1999;77(5):2813–2826.
244. Antovic A, Mikovic D, Elezovic I, et al. Improvement of fibrin clot structure after factor VIII injection in haemophilia A patients treated on demand. *Thromb. Haemost.* 2014;111(04):656–661.

245. Shimonishi N, Nogami K, Ogiwara K, et al. Emicizumab improves the stability and structure of fibrin clot derived from factor VIII-deficient plasma, similar to the addition of factor VIII. *Haemophilia*. 2020;26(3):e97–e105.
246. Leong L, Chernysh IN, Xu Y, et al. Clot stability as a determinant of effective factor VIII replacement in hemophilia A. *Res. Pract. Thromb. Haemost.* 2017;1(2):231–241.
247. Rea CJ, Foley JH, Okaisabor O, Sørensen B. FXIII: mechanisms of action in the treatment of hemophilia A. *J. Thromb. Haemost.* 2014;12(2):159–168.
248. Beltrán-Miranda CP, Khan A, Jaloma-Cruz AR, Laffan MA. Thrombin generation and phenotypic correlation in haemophilia A. *Haemophilia*. 2005;11(4):326–334.
249. Liu W, Jawerth LM, Sparks EA, et al. Fibrin Fibers Have Extraordinary Extensibility and Elasticity. *Science*. 2006;313(5787):634–634.
250. Gabriel DA, Muga K, Boothroyd EM. The effect of fibrin structure on fibrinolysis. *J. Biol. Chem.* 1992;267(34):24259–24263.
251. Collet JP, Park D, Lesty C, et al. Influence of Fibrin Network Conformation and Fibrin Fiber Diameter on Fibrinolysis Speed. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000;20(5):1354–1361.
252. Weisel JW. Structure of fibrin: impact on clot stability. *J. Thromb. Haemost.* 2007;5:116–124.
253. Zong Y, Antovic A, Soutari NMH, Antovic J, Pruner I. Synergistic Effect of Bypassing Agents and Sequence Identical Analogue of Emicizumab and Fibrin Clot Structure in the In Vitro Model of Hemophilia A. *TH Open Companion J. Thromb. Haemost.* 2020;4(2):e94–e103.
254. Dargaud Y, Prevost C, Lienhart A, Claude Bordet J, Negrier C. Evaluation of the overall haemostatic effect of recombinant factor VIIa by measuring thrombin generation and stability of fibrin clots: EVALUATION OF THE HAEMOSTATIC EFFECT OF rFVIIa. *Haemophilia*. 2011;17(6):957–961.
255. Shimonishi N, Nogami K, Ogiwara K, et al. Emicizumab improves the stability and structure of fibrin clot derived from factor VIII-deficient plasma, similar to the addition of factor VIII. *Haemophilia*. 2020;26(3):e97–e105.
256. Gersh KC, Nagaswami C, Weisel JW. Fibrin network structure and clot mechanical properties are altered by incorporation of erythrocytes. *Thromb. Haemost.* 2009;102(6):1169–1175.
257. Wohner N, Sótönyi P, Machovich R, et al. Lytic resistance of fibrin containing red blood cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011;31(10):2306–2313.
258. van Gelder JM, Nair CH, Dhall DP. Erythrocyte aggregation and erythrocyte deformability modify the permeability of erythrocyte enriched fibrin network. *Thromb. Res.* 1996;82(1):33–42.
259. Atsou S, Schellenberg C, Lagrange J, et al. Thrombin generation on vascular cells in the presence of factor VIII and/or emicizumab. *J. Thromb. Haemost.* 2023;
260. Gouw SC, van der Bom JG, Ljung R, et al. Factor VIII Products and Inhibitor Development in Severe Hemophilia A. *N. Engl. J. Med.* 2013;368(3):231–239.
261. Shima M, Hanabusa H, Taki M, et al. Factor VIII–Mimetic Function of Humanized Bispecific Antibody in Hemophilia A. *N. Engl. J. Med.* 2016;374(21):2044–2053.
262. El Amrani M, Göbel C, Egas AC, et al. Quantification of neutralizing anti-drug antibodies and their neutralizing capacity using competitive displacement and tandem mass spectrometry: Infliximab as proof of principle. *J. Transl. Autoimmun.* 2019;1:100004.
263. Gunn GR, Sealey DCF, Jamali F, et al. From the bench to clinical practice: understanding the challenges and uncertainties in immunogenicity testing for biopharmaceuticals. *Clin. Exp. Immunol.* 2016;184(2):137–146.
264. Lewandowska M, Randall N, Bakeer N, et al. Management of people with haemophilia A undergoing surgery while receiving emicizumab prophylaxis: Real-world experience from a large comprehensive treatment centre in the US. *Haemophilia*. 2021;27(1):90–99.
265. Kruse-Jarres R, Peyvandi F, Oldenburg J, et al. Surgical outcomes in people with hemophilia A taking emicizumab prophylaxis: experience from the HAVEN 1-4 studies. *Blood Adv.* 2022;6(24):6140–6150.
266. Warren BB, Chan A, Manco-Johnson M, et al. Emicizumab initiation and bleeding outcomes in people with hemophilia A with and without inhibitors: A single-center report. *Res. Pract. Thromb. Haemost.* 2021;5(5):e12571.
267. Batsuli G, Wheeler AP, Weyand AC, Sidonio RF, Young G. Severe muscle bleeds in children and young adults with hemophilia A on emicizumab prophylaxis: Real-world retrospective multi-institutional cohort. *Am. J. Hematol.* 2023;98(10):E285–E287.

268. Gui T, Lin H-F, Jin D-Y, et al. Circulating and binding characteristics of wild-type factor IX and certain Gla domain mutants in vivo. *Blood*. 2002;100(1):153–158.
269. Muczynski V, Verhenne S, Casari C, et al. A Thrombin-Activatable Factor X Variant Corrects Hemostasis in a Mouse Model for Hemophilia A. *Thromb. Haemost.* 2019;119(12):1981–1993.
270. Kellenberger E. The Response of Biological Macromolecules and Supramolecular Structures to the Physics of Specimen Cryopreparation. *Cryotech. Biol. Electron Microsc.* 1987;35–63.
271. Macrae FL, Duval C, Papareddy P, et al. A fibrin biofilm covers blood clots and protects from microbial invasion. *J. Clin. Invest.* 128(8):3356–3368.
272. Kattula S, Bagoly Z, Tóth NK, Muszbek L, Wolberg AS. The factor XIII-A Val34Leu polymorphism decreases whole blood clot mass at high fibrinogen concentrations. *J. Thromb. Haemost. JTH.* 2020;18(4):885–894.
273. Ariëns RA, Philippou H, Nagaswami C, et al. The factor XIII V34L polymorphism accelerates thrombin activation of factor XIII and affects cross-linked fibrin structure. *Blood*. 2000;96(3):988–995.
274. Hubbard AR, Hamill M, Beeharry M, et al. Value assignment of the WHO 6th International Standard for blood coagulation factor VIII and von Willebrand factor in plasma (07/316). *J. Thromb. Haemost. JTH.* 2011;9(10):2100–2102.
275. Raut S, Daniels S, Heath AB, SSC Sub-Committee on Factor. Value assignment of the WHO 8th International Standard for factor VIII, concentrate (07/350). *J. Thromb. Haemost. JTH.* 2012;10(6):1175–1176.
276. Dargaud Y, Wolberg AS, Gray E, et al. Proposal for standardized preanalytical and analytical conditions for measuring thrombin generation in hemophilia: communication from the SSC of the ISTH. *J. Thromb. Haemost. JTH.* 2017;15(8):1704–1707.
277. Måseide RJ, Berntorp E, Nummi V, et al. Bleeding phenotype of patients with moderate haemophilia A and B assessed by thromboelastometry and thrombin generation. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* 2021;27(5):793–801.
278. Lawson JH, Kalafatis M, Stram S, Mann KG. A model for the tissue factor pathway to thrombin. I. An empirical study. *J. Biol. Chem.* 1994;269(37):23357–23366.
279. Prior SM, Cohen MJ, Conroy AS, et al. Correlation between factor (F)XIa, FIXa and tissue factor and trauma severity. *J. Trauma Acute Care Surg.* 2017;82(6):1073–1079.
280. Li W, Hu J, Leksa N, et al. A Novel Humanized Hemophilia-a Mouse Model to Facilitate Preclinical In Vivo Studies of Human Specific Fviii-a-Mimetic Bispecific Antibodies. *Blood*. 2018;132(Supplement 1):2458.
281. Suda T, Yokoo T, Kanefuji T, et al. Hydrodynamic Delivery: Characteristics, Applications, and Technological Advances. *Pharmaceutics.* 2023;15(4):1111.
282. Liu F, Song Y, Liu D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther.* 1999;6(7):1258–1266.

ANNEXES

Durant mon doctorat j'ai également été impliqué dans deux études supplémentaires:

1) A reactive center loop–based prediction platform to enhance the design of therapeutic SERPINS

Wariya Sanrattanaa, **Thibaud Sefiane**, Simone Smitsa, Nadine D. van Kleefa, Marcel H. Fensc, Peter J. Lenting, Coen Maasa, and Steven de Maat

L'objectif de cette étude consistait à développer un système in silico permettant d'améliorer la spécificité et l'activité des SERPINS thérapeutiques. Ce modèle prédictif permet de déterminer l'impact de différentes mutations dans la boucle "Reactive center loop" (RCL) responsable de la spécificité des SERPINS. Afin de mettre en évidence l'efficacité du modèle développé, une SERPIN ciblant l'action de la PCa a pu être développée. Mon rôle dans cette étude a été de démontrer l'efficacité de cette SERPIN thérapeutique chez la souris hémophile en utilisant un modèle de saignement murin.

2) Efficacy of platelet-inspired hemostatic nanoparticles on bleeding in von Willebrand disease murine models

Stephanie Rouillet, Norman Luc, Julie Rayes, Jean Solarz, Dante Disharoon, Andrew Ditto, Emily Gahagan, Christa Pawlowski, **Thibaud Sefiane**, Frederic Adam, Caterina Casari, Olivier D. Christophe, Michael Bruckman, Peter J. Lenting, Anirban Sen Gupta and Cécile V. Denis

Le but de cette seconde étude était de mettre en évidence le potentiel de l'utilisation de plaquettes synthétiques (Synthoplates®) pour le traitement d'une maladie hémorragique lié à un déficit en FVW: la maladie de von Willebrand. Ces plaquettes synthétiques sont des nanoparticules liposomales présentant à leur surface des peptides permettant la fixation au collagène, au FVW ainsi qu'aux plaquettes activées. Dans le cadre de cette étude j'ai été amené à analyser la morphologie du caillot in vivo dans des modèles de souris de la maladie de Willbrand (Type 2B et Type 3) par MEB.



A reactive center loop–based prediction platform to enhance the design of therapeutic SERPINs

Wariya Sanrattana^a, Thibaud Sefiane^b, Simone Smits^a, Nadine D. van Kleef^a, Marcel H. Fens^c, Peter J. Lenting^b, Coen Maas^a, and Steven de Maat^{a,1}

^aDepartment of Clinical Chemistry and Haematology, University Medical Center Utrecht, Utrecht University, Utrecht 3584, The Netherlands; ^bLaboratory for Haemostasis, Inflammation and Thrombosis, INSERM, Unité Mixte de Recherche 1176, Université Paris-Saclay 94276 Le Kremlin-Bicêtre, France; and ^cUtrecht Institute for Pharmaceutical Sciences, Utrecht University, Utrecht 3584, The Netherlands

Edited by Charles S. Craik, University of California, San Francisco, CA, and accepted by the Editorial Board September 24, 2021 (received for review May 5, 2021)

Serine proteases are essential for many physiological processes and require tight regulation by serine protease inhibitors (SERPINs). A disturbed SERPIN–protease balance may result in disease. The reactive center loop (RCL) contains an enzymatic cleavage site between the P1 through P1' residues that controls SERPIN specificity. This RCL can be modified to improve SERPIN function; however, a lack of insight into sequence–function relationships limits SERPIN development. This is complicated by more than 25 billion mutants needed to screen the entire P4 to P4' region. Here, we developed a platform to predict the effects of RCL mutagenesis by using α 1-antitrypsin as a model SERPIN. We generated variants for each of the residues in P4 to P4' region, mutating them into each of the 20 naturally occurring amino acids. Subsequently, we profiled the reactivity of the resulting 160 variants against seven proteases involved in coagulation. These profiles formed the basis of an in silico prediction platform for SERPIN inhibitory behavior with combined P4 to P4' RCL mutations, which were validated experimentally. This prediction platform accurately predicted SERPIN behavior against five out of the seven screened proteases, one of which was activated protein C (APC). Using these findings, a next-generation APC-inhibiting α 1-antitrypsin variant was designed (KM⁺PR/RIRA; / indicates the cleavage site). This variant attenuates blood loss in an in vivo hemophilia A model at a lower dosage than the previously developed variant AIKR/KIPP because of improved potency and specificity. We propose that this SERPIN-based RCL mutagenesis approach improves our understanding of SERPIN behavior and will facilitate the design of therapeutic SERPINs.

SERPIN | hemophilia | protein engineering

The superfamily of serine proteases is essential for human physiology in processes such as coagulation, fibrinolysis, inflammation, and immunity. They are produced in a resting zymogen form. Upon activation, their enzymatic activity increases tremendously (1). Excessive serine protease activity can cause disease; hence, they require tight regulation by physiological inhibitors.

Serine protease inhibitors (SERPINs) are a superfamily of inhibitors found throughout all the kingdoms of life. SERPINs have a conserved inhibitory mechanism. They target only active serine proteases (i.e., not zymogens) and often have the ability to inhibit multiple proteases within a biological mechanism. SERPIN specificity is predominantly determined via their reactive center loop (RCL) (2, 3). The RCL is a flexible loop that acts as a substrate. Upon RCL cleavage at the reactive center between the P1 and P1' residues, the SERPIN undergoes a rapid conformational change, integrating the N-terminal part of the RCL into its core structure (4, 5). If this occurs during the intermediate step of the cleavage process (when the protease is covalently bound to the N-terminal part of the RCL), the protease is dragged along during the conformational change of the SERPIN (6). As a result, the active site of the protease becomes distorted and loses its enzymatic activity. Subsequently, the stable protease–SERPIN complex is then marked for destruction (7).

Alterations to the RCL sequence can have a dramatic impact on the SERPIN function or specificity. For instance, wild-type α 1-antitrypsin (α 1AT-WT) is a potent inhibitor of neutrophil elastase, whereas the rare pathogenic Pittsburgh mutation (at P1 residue: M³⁵⁸R; α 1AT-Pittsburgh) alters its specificity completely. α 1AT-Pittsburgh no longer inhibits elastase (8) but has become a potent broad specificity inhibitor of proteases, which prefer arginine or lysine as a P1 residue (9). This includes coagulation proteases (e.g., thrombin, activated factor X [FXa], and activated factor XI [FXIa]) as well as anticoagulant or profibrinolytic proteases (e.g., activated protein C [APC] and plasmin), resulting in a bleeding phenotype (10).

Alignment of human SERPIN RCL sequences reveals that the N-terminal region is conserved among inhibitory SERPINs, suggesting that this region is important to maintain proper RCL mobility and loop insertion. In contradiction, the sequences adjacent to the cleavage site in the RCL, particularly residues spanning from P4 to P4', are highly variable between different SERPINs and are thought to be a major determinant of SERPIN specificity (2, 11). The possibility to alter and fine-tune SERPIN specificity via RCL modification encourages their development as therapeutic agents. However, the design of specific RCL sequences has its challenges.

Significance

Serine protease inhibitors (SERPINs) regulate vital physiological processes. Considerable research effort has gone into the development of SERPINs as therapeutic agents. One of the development goals is SERPIN modification for improved specificity toward desired target(s). The specificity and potency of SERPINs can be altered by changing their reactive center loop (RCL). Currently, predicting these properties of a RCL sequence is almost impossible. By characterizing 160 α 1-antitrypsin RCL variants with single-amino acid substitutions, we developed a SERPIN RCL-based platform that predicts the inhibitory behavior for SERPIN variants with compounded RCL mutations. This platform was applied to design a next-generation SERPIN against activated protein C and provides evidence for its value in the treatment of hemophilia A.

Author Contributions: W.S., C.M., and S.d.M. designed the research; W.S., T.S., S.S., N.D.v.K., and S.d.M. performed research; M.H.F. and P.J.L. contributed new reagents/analytic tools; W.S., T.S., N.D.v.K., C.M., and S.d.M. analyzed data; and W.S., C.M., and S.d.M. wrote the paper.

The authors declare no competing interest.

This article is a PNAS Direct Submission. C.S.C. is a guest editor invited by the Editorial Board.

Published under the PNAS license.

¹To whom correspondence may be addressed. Email: s.demaat@umcutrecht.nl.

This article contains supporting information online at <http://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.2108458118/-/DCSupplemental>.

Published November 5, 2021.

Ideally, the design of a “perfect” SERPIN against a target protease would encompass the functional screening of all conceivable RCL variants (P4 to P4’ residues) in a full-length SERPIN backbone. However, this RCL octapeptide represents more than 25 billion possible combinations. This makes the development and functional characterization a challenging undertaking.

Positional scanning synthetic combinatorial libraries (PS-SCL; reflecting PX to P1 residues but not P’ residues) are powerful tools to gain insights into the sequence–function relationship of SERPIN RCLs (12, 13). These libraries allow for the rapid interrogation of serine protease specificity, but have limitations (14, 15), such as issues with the cooperativity of neighboring interactions (reviewed in ref. 16) or the contributions of the essential P’ residues (17, 18). As such, grafting these PS-SCL–derived sequences directly onto the RCL of α 1AT often does not result in the required specificity (17, 18).

To facilitate therapeutic SERPIN design, we here report the development of an SERPIN-based platform to help predict RCL specificity. Hereto, 160 RCL variants were created with α 1AT-Pittsburgh as a template because of its broad and potent inhibitory profile. These variants were divided into eight SERPIN RCL libraries representing each of the eight residues within the P4 to P4’ area. The libraries were profiled against seven coagulation proteases, and outcomes were compounded into an RCL-scoring system. Using this platform, next-generation α 1AT variants were developed against APC, demonstrating improved efficacy and specificity, compared to a previously published variant. Finally, the lead candidate was validated in an in vivo model of hemophilia A.

Results

Predicting RCL Specificity. To develop a prediction model for SERPIN specificity that consists of a manageable number of variants, we set out to identify the contribution of each of the individual residues within the RCL P4 to P4’ sequence. Hereto, α 1AT-Pittsburgh was chosen as a template RCL sequence (AIPR/SIPP; / indicates the reactive center) because of its broad and potent inhibitory profile. A total number of 160 α 1AT variants were generated, spanning the P4 to P4’ area (Fig. 1A). Each of the eight libraries represents a single, individual RCL position, to which each of the 20 different, naturally occurring amino acids were introduced. The α 1AT variants were expressed in human embryonic kidney (HEK) 293F cells, and secreted α 1AT protein levels were equalized by densitometric analysis of Coomassie-stained SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis) gels prior to inhibition experiments (SI Appendix, Fig. S1A). Their inhibitory capacity was screened against seven proteases involved in coagulation: thrombin, FXa, FXIa, APC, plasmin, activated factor XII (FXIIa), and plasma kallikrein (PKa). Hereto, α 1AT variants were preincubated with each of these proteases for 5 min. Subsequently, residual protease activity was measured (SI Appendix, Fig. S1B). Residual protease activity was normalized and expressed as 0 to 100% inhibition, in which vehicle (no inhibition) was set to 0%, and the most potent α 1AT variant (under nonsaturating conditions) within the library was set to 100% (SI Appendix, Fig. S1C). Outcomes of these inhibitory assays are summarized as a heat map for each protease (Fig. 1B–H). As expected for these trypsin-like serine proteases, all favor an arginine (R) at P1, with thrombin, FXIa and plasmin also showing inhibition when lysine (K) is present at P1. At the other RCL positions, proteases show distinct profiles. When incomplete protease inhibition was seen in these experiments, it can either be the result of differences in kinetics or because of the consumption of the SERPIN as a substrate (reviewed in ref. 2).

We went on to develop an in silico model to predict the combined effects of multiple RCL mutations. Hereto, normalized data from the inhibition studies (Fig. 1B–H) for amino acid variation at each RCL position were compounded. This approach allows for the generation of a predicted inhibition score ranging between 0 and 100%, per protease, for any P4 to P4’ sequence. In a similar fashion, we developed a prediction model based on historical PS-SCL studies (12, 13).

We selected the top 10 RCL sequences predicted by either our SERPIN RCL-based prediction algorithm or the PS-SCL–based prediction algorithm, alongside the top 10 of RCL sequences that showed the biggest discrepancy in prediction between both libraries. Duplicate sequences were excluded (SI Appendix, Fig. S2A and SI Appendix, Table S2). As a result, 17 to 25 unique variants were selected for each of the target proteases.

These α 1AT RCL variants were produced and investigated experimentally (Fig. 2). We found strong and significant correlations between the predicted and actual behavior for FXIIa, thrombin, and APC (R^2 : 0.8049, 0.7287, and 0.7248, respectively), when our SERPIN RCL-based prediction model was applied (Fig. 2A–C). Moderate correlations were observed for FXIa and plasmin (Fig. 2D and E), but no significant correlations were found for PKa and FXa (Fig. 2F and G). In comparison, for the PS-SCL predictions, only thrombin and FXIa showed weak but significant correlations (R^2 : 0.3954 and 0.2178; Fig. 2B and D). Overall, these data show that while the SERPIN RCL-based prediction platform is not completely predictive (five out of seven proteases), it is a step forward compared to the prediction based upon PS-SCL data and should aid in the development of therapeutic SERPINs.

Design of a Next-Generation, APC-Specific α 1-Antitrypsin. In 2017, Polderdijk et al. published the development of α 1AT variants for the specific inhibition of APC as a treatment for hemophilia (18). Based upon the protein crystal structures of thrombin and APC, the P2 to P1’ residues of RCL of α 1AT-Pittsburgh were redesigned to KRK (α 1AT-KR/K; / indicates the reactive center). In murine models of hemophilia B, α 1AT-KR/K restores the bleeding phenotype in a dose-dependent manner. Using the random mutagenesis of the P2 and P1’ position, more APC inhibitors were developed (19). While these new variants (α 1AT-RR/Q and α 1AT-KR/Q) showed similar specificity, their capacity to inhibit APC was \sim 1.6-fold lower than α 1AT-KR/K. This excellent work demonstrated the difficulty in tailoring SERPIN specificity. Using our prediction platform, we set out to develop a next-generation APC inhibitor. Our platform predicted KMPR/SIPA (P4 to P4’) to be the most potent APC inhibitor, but showed broad specificity (SI Appendix, Fig. S3A). Subsequently, we tailored this template RCL sequence in a stepwise manner to improve predicted specificity while maintaining APC inhibition (SI Appendix, Fig. S3B). This approach identified a family of three RCL sequences: KMPR/RIRA, KIPR/RIRA, and KRPR/RIRA. These variants were predicted to inhibit APC at least 2.7-fold stronger than the KR/K sequence while maintaining or improving specificity (i.e., the decreased inhibition of thrombin, FXa, FXIa, plasmin, FXIIa, and PKa; SI Appendix, Fig. S3B). We produced these α 1AT variants alongside α 1AT-WT, α 1AT-Pittsburgh, and α 1AT-KR/K as controls and references.

In the buffer, α 1AT-KMPR/RIRA, -KIPR/RIRA, and -KRPR/RIRA showed the improved inhibition of APC, compared to α 1AT-KR/K with a 3.9-, 4.5- and 1.6-fold increase in second-order rate constants (k_2), respectively (Fig. 3A). For thrombin and FXa, inhibition was negligible (i.e., well below that of α 1AT-WT and almost equal to α 1AT-KR/K (Fig. 3B and C) with k_2 values in the $10 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ range. α 1AT-KMPR/RIRA, -KIPR/RIRA, and -KRPR/RIRA inhibited FXIa 9.5-,

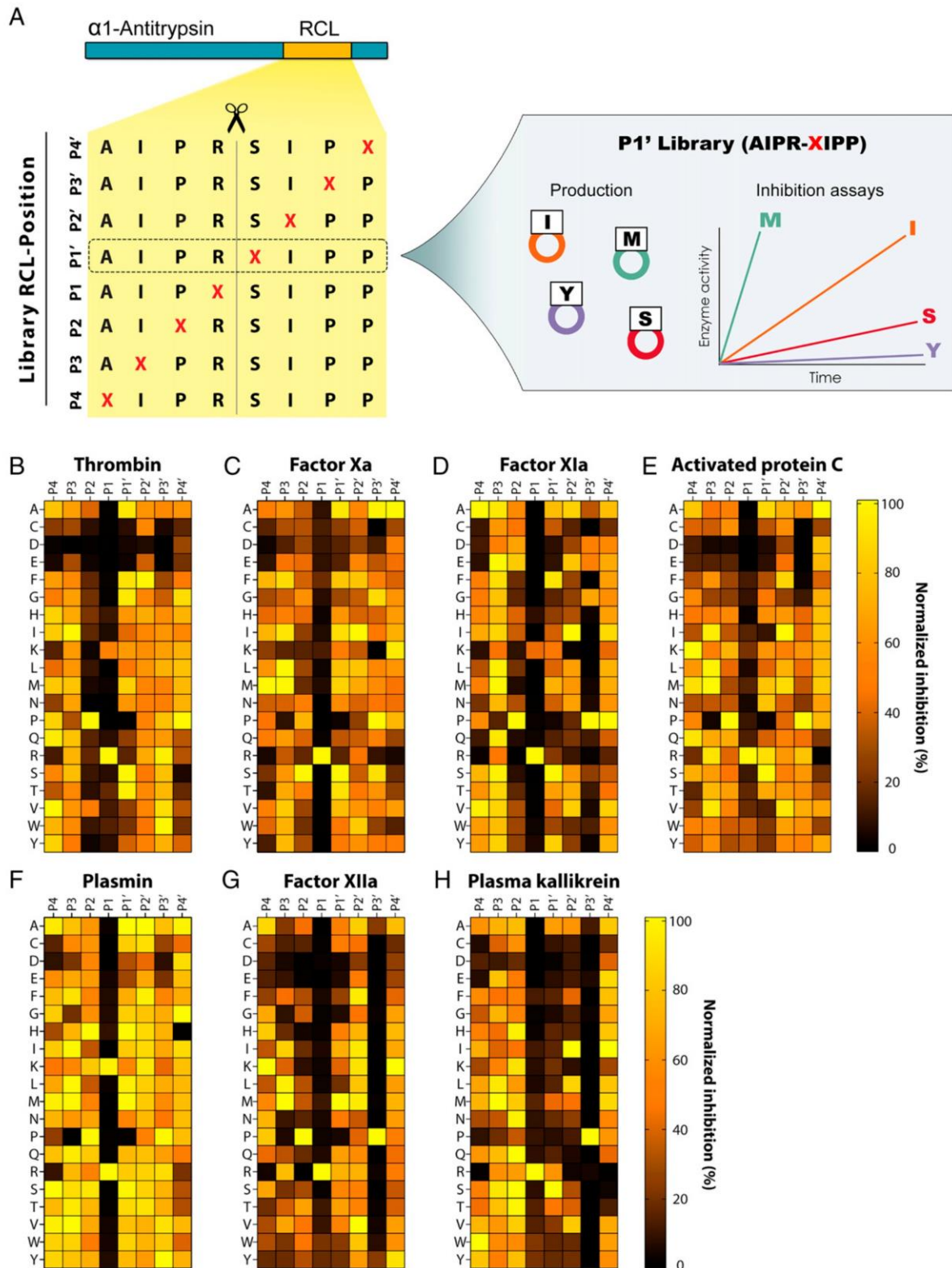


Fig. 1. Platform development and functional characterization of 160 α 1-antitrypsin RCL variants against seven coagulation proteases. (A) Strategy. Eight independent libraries (from P4 to P4') were created to identify the contribution of all naturally occurring amino acids to the inhibitory profile. The RCL sequence of α 1AT-Pittsburgh was used as a template. (B–H) Heat map representations (mean of $n = 3$) for the capacity of SERPIN variants to inhibit various proteases. Strong (100%) inhibition is indicated as yellow; no inhibition (0%) is indicated in black.

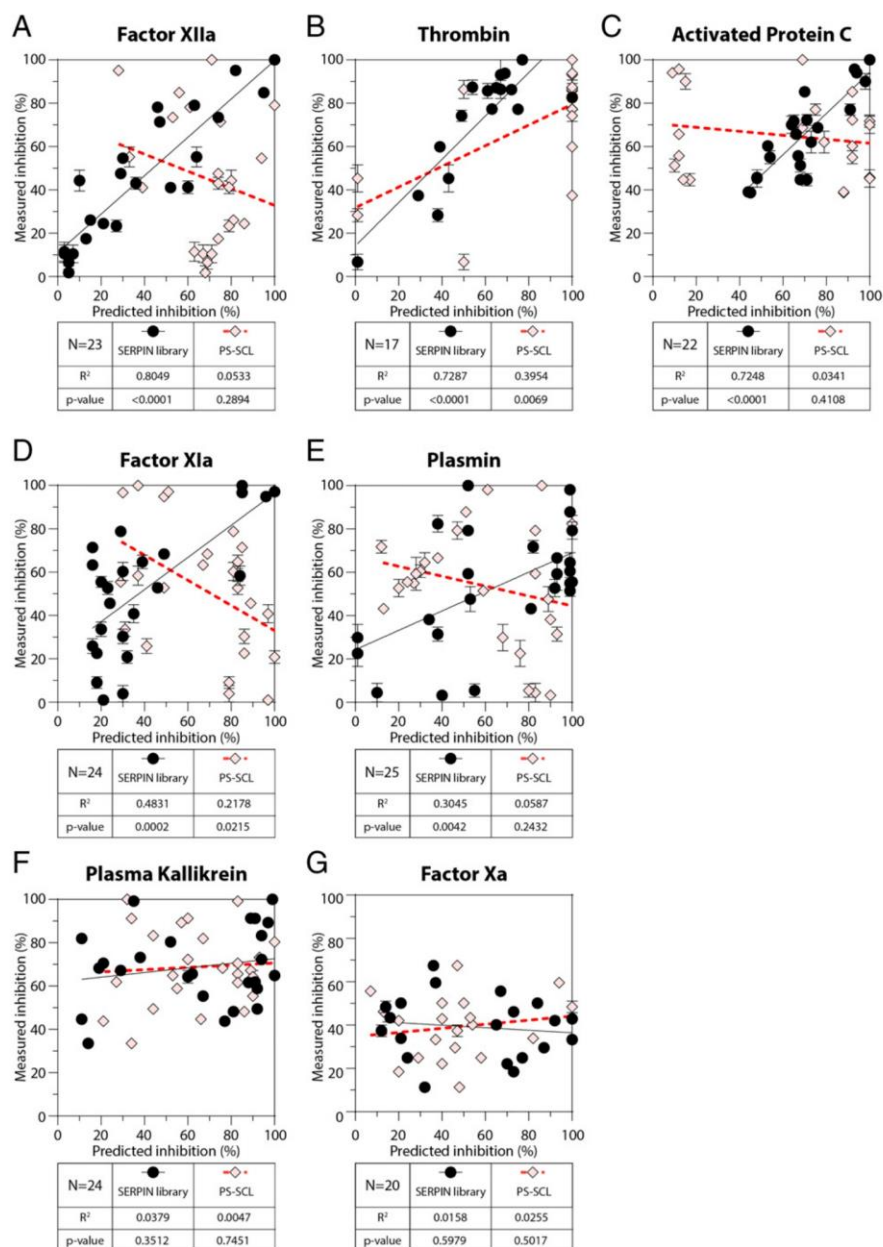


Fig. 2. SERPIN RCL-based predictions are superior to PS-SCL-based predictions for SERPIN development. (A–G) For each protease, a test cohort (17 to 25 variants) was created to investigate sequence–function relationships. Outcomes were compared to predicted inhibitory inferred from either the SERPIN RCL libraries or PS-SCL. For comparison, only P3 and P2 were varied (P1 = R), as PS-SCL are limited in length. Data represents the mean \pm SD from $n = 3$. Correlation and significance were calculated by simple linear regression.

9.5-, and 5.4-fold less than α 1AT-KR/K, indicating improved specificity (Fig. 3D). As our platform predicted, α 1AT-KR/K was a surprisingly potent plasmin inhibitor with a k_2 of $1.27 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Fig. 3E and *SI Appendix, Fig. S3B*). By comparison, α 1AT-KMPR/RIRA, -KIPR/RIRA, and -KRPR/RIRA inhibited plasmin 24.7-, 2.4-, and 2.6-fold less strongly than α 1AT-KR/K. In similar manner, α 1AT-KR/K strongly inhibited PKa with a k_2 of $1.03 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. By comparison, α 1AT-KMPR/RIRA, -KIPR/RIRA, and -KRPR/RIRA inhibited PKa 49.7, 72.3, and 42.4-fold less strongly (Fig. 3F). In contrast, α 1AT-KR/K inhibited FXIIa approximately ninefold less than the three new variants (Fig. 3G). These data demonstrate that

new RCL variants can be designed with an improved efficacy/specificity profile.

Effects of Next-Generation, APC-Specific α 1AT Variants on Plasma Coagulation. Tissue factor (TF) initiates the activation of the extrinsic pathway of the coagulation cascade. This results in the activation of prothrombin into thrombin which allows for fibrin formation, causing plasma to clot (20, 21). In the presence of thrombomodulin, thrombin can also efficiently activate protein C into APC (22). This anticoagulant protease inactivates activated factor VIII (FVIII) and activated factor V (FV) to decrease the rate of thrombin generation. Polderdijk et al.,

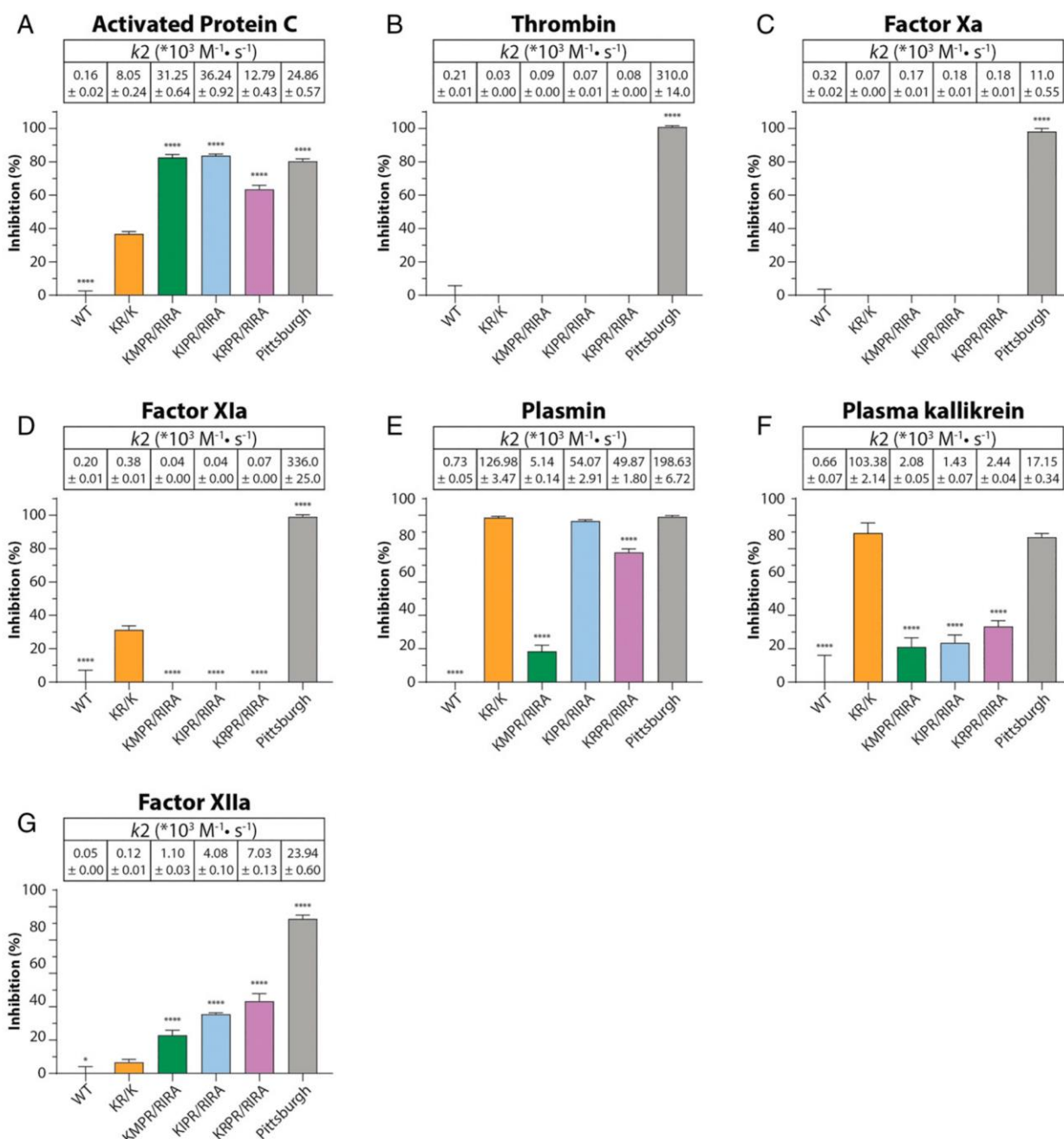


Fig. 3. Development of α 1-antitrypsin variants for the strong and specific inhibition of APC. The inhibition screening of APC and other coagulation proteases by α 1AT variants; table inset shows second-order rate constants (k_2 ; $\times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). (A) Inhibition of 17.8 nM APC by 96.2 nM SERPIN after 5 min preincubation. (B) Inhibition of 8.89 nM thrombin by 38.5 nM SERPIN after 30 min preincubation. (C) Inhibition of 8.7 nM factor Xa by 192.3 nM SERPIN after 30 min of preincubation. (D) Inhibition of 2.5 nM factor XIa by 9.6 nM SERPIN after 30 min of preincubation. (E) Inhibition of 24.1 nM plasmin by 100 nM SERPIN after 30 min of preincubation. (F) Inhibition of 1 nM PKa by 50 nM SERPIN after 30 min of preincubation. (G) Inhibition of 25 nM factor XIIa by 100 nM SERPIN after 30 min of preincubation. Data represents the mean \pm SD of three separate experiments, each performed in duplicate. * $P < 0.05$ and **** $P < 0.0001$ compared to α 1AT-KR/K by one-way ANOVA with post hoc Dunnett's multiple comparison test.

showed that APC inhibition attenuates defective thrombin generation in hemophilia A or B plasma (deficient in FVIII or factor IX [FIX], respectively) (18).

We next investigated our α 1AT variants in plasma coagulation assays. In the absence of thrombomodulin (no APC activation), α 1AT-WT, α 1AT-KR/K, and our three α 1AT variants did not influence thrombin generation, even in concentrations up

to 2 μM (Fig. 4 A–C). Neither the maximum concentration of thrombin formed (peak height) nor the endogenous thrombin potential (ETP) was influenced (SI Appendix, Figs. S5, S9, and S12). In contrast, α 1AT-Pittsburgh, which is a known thrombin inhibitor, dose dependently decreased thrombin generation. These observations match those seen in diluted TF-driven prothrombin (PT) clotting assays (SI Appendix, Fig. S4A).

Remarkably, when coagulation was induced via the intrinsic pathway (dilute partial thromboplastin time [aPTT] assay), both α 1AT-KR/K and -KRPR/RIRA showed a minor, but significant, prolongation of the clotting time compared to α 1AT-WT (*SI Appendix, Fig. S4B*). This observation may correspond to the residual FXIIa, FXIa, or PKa inhibition of these α 1AT variants (Fig. 3 *D, F* and *G*). Nonetheless, the prolongation of the clotting time was not to the extent of that of α 1AT-Pittsburgh (2.7-fold longer than α 1AT-WT).

In the presence of 1.25 nM thrombomodulin, the thrombin potential was lowered by ~50% because of APC activation. As previously reported, α 1AT-KR/K partially reversed the anticoagulant effect of thrombomodulin on thrombin generation both in normal plasma, as well as FVIII- and FIX-deficient plasmas (Fig. 4 *D–F*, respectively; *SI Appendix, Figs. S6, S10, and S13*). Here, α 1AT-KR/K reached a maximum ETP restoration (E_{\max}) of 74.1% ($\pm 11.4\%$) (vehicle remains 50%). A concentration of 202.2 (± 38.6) nM of α 1AT-KR/K was required to reach half of the maximum effect (EC_{50}) (*SI Appendix, Table S6*). By comparison, α 1AT-KMPR/RIRA almost fully restored thrombin potential with an E_{\max} of 92.8% ($\pm 0.5\%$) and an EC_{50} of 120.7 (± 18.8) nM. For α 1AT-KIPR/RIRA, but not α 1AT-KRPR/RIRA, a similar significant improvement was observed (E_{\max} 94.3% [$\pm 2.3\%$] and EC_{50} 74.3 [± 12.9] nM). Similar results were found in normal plasma at higher-thrombomodulin concentrations (Fig. 4 *G* and *J* and *SI Appendix, Figs. S7 and S8*). Even at 10 nM of thrombomodulin, α 1AT-KMPR/RIRA and -KIPR/RIRA strongly restored thrombin potential (Fig. 4*J* and *SI Appendix, Table S6*). We analyzed protease–SERPIN complexes by Western blotting and found that the SERPIN variants that were most capable of restoring thrombin potential formed more complex with APC (*SI Appendix, Fig. S15 A and B*). This was accompanied by increased prothrombin and FX activation (i.e., consumption of single-chain zymogen and formation of thrombin–antithrombin complex) (*SI Appendix, Fig. S15 C–E*). We observed no protease–SERPIN complexes for FVIIa, FIXa, FXIa, or FXIIa during coagulation, confirming the specificity of our α 1AT variants.

In FVIII-deficient plasma, in the presence of thrombomodulin (Fig. 4 *E* and *H* and *SI Appendix, Figs. S10 and S11*), α 1AT-KMPR/RIRA, -KIPR/RIRA and -KRPR/RIRA significantly increased the E_{\max} (15 to 40% higher than α 1AT-KR/K), while their EC_{50} were lower than that of α 1AT-KR/K by at least 20% (*SI Appendix, Table S6*). These differences between α 1AT-KR/K and the three novel variants were smaller in FIX-deficient plasma (Fig. 4 *F* and *I* and *SI Appendix, Figs. S13 and S14*), which is in line with the previous finding that α 1AT-KR/K performed better in FIX-deficient plasma than in FVIII-deficient plasma (15).

Next, we studied the behavior of our SERPIN variants during fibrinolysis in plasma clot lysis turbidity assays (*SI Appendix, Fig. S16*). Hereto, we triggered coagulation (increases turbidity) in the presence of tissue plasminogen activator (tPA), resulting in fibrinolysis (decreases turbidity). In the absence of thrombomodulin, neither clot formation nor fibrinolysis was affected by any of the SERPINs, with α 1AT-Pittsburgh as the only exception (*SI Appendix, Fig. S16 A–C, G–I, and M–O*). In the presence of thrombomodulin, coagulation was delayed as expected. This was unaffected by the SERPIN variants, again with α 1AT-Pittsburgh as exception (*SI Appendix, Fig. S16 D–E, J–K, and P–Q*). Interestingly, clot lysis times were prolonged in normal pooled plasma and FVIII-deficient plasma in the presence of α 1AT-KR/K and the three novel variants (*SI Appendix, Fig. S16 F, L, and R*). This prolongation appears to be associated rather with their capacity to inhibit APC than plasmin (Fig. 3 *A* and *E*). During clot lysis, in the absence of thrombomodulin, plasmin formed ~140 kDa complexes with all recombinant SERPINs (under nonreducing conditions: detection antibody recognizes

plasmin heavy chain) (*SI Appendix, Fig. S17 A and B*) but in particular in the presence of KR/K or KIPR/RIRA. Under reducing conditions, all recombinant SERPINs except for WT formed ~80 kDa complexes (*SI Appendix, Fig. S17 C and D*). α 1AT-Pittsburgh formed these complexes in the absence, but not in the presence, of thrombomodulin. None of the SERPIN variants were cross-reactive for tPA or PKa (*SI Appendix, Fig. S17 E and F*), despite their involvement during thrombolysis (23).

Finally, we set out to validate the efficacy of our SERPINS in a mouse model for hemophilia A (FVIII-deficient mice on a C57BL/6 background). First, we confirmed that α 1AT-KMPR/RIRA (our lead compound) and α 1AT-KR/K are able to improve thrombin generation in mouse plasma in the presence of thrombomodulin (*SI Appendix, Fig. S18*). Also here, the new SERPIN variant was more potent than α 1AT-KR/K.

FVIII-deficient mice were pretreated with saline (negative vehicle control), FVIII (positive control), or α 1AT variants via intravenous injection 5 min prior to tail-clip injury, after which blood loss was monitored (Fig. 4*K*). Whereas FVIII administration fully corrected the bleeding defect, α 1AT-WT was unable to do so. Only at 15 mg/kg, α 1AT-KR/K was able to partially restore blood loss to a median of 363 μ L/30 min. By comparison, α 1AT-KMPR/RIRA treatment already significantly reduced blood loss at 7.5 mg/kg. It is of note that increasing the dose to 15 mg/kg did not lead to further improvement, suggesting that APC inhibition in hemophilia A can maximally attenuate blood loss by ~55%. Overall, these data suggest that the rational redesign of therapeutic SERPINs should hold value to increase the therapeutic window for clinical application.

Discussion

The goal of designing SERPIN specificity by changing its RCL sequence has been pursued for decades. Work with RCL chimeras has shown that α 1AT specificity is almost completely determined by this sequence (24). Despite these tremendous efforts, insights, and advances in various techniques, designing RCL specificity has remained a challenge. In this project, we first mapped out the contribution of single-RCL residues (Fig. 1) and compounded the data into an *in silico* prediction platform. Experimental validation studies confirmed that predictions from our SERPIN-based prediction algorithm were better than those from a PS-SCL–based prediction algorithm. However, these were still limited in accuracy for selected proteases (Fig. 2). Prediction accuracy within this model might be limited as it does not incorporate the effect of neighboring amino acids that are present in the three-dimensional structure (25–28). Indeed, earlier studies with recombinant full-length α 1AT variants provided evidence for cooperativity between RCL amino acids (24, 29). This may directly affect RCL cleavage, but might also be of influence on the RCL integration into the SERPIN backbone, a process that is essential for SERPIN function. Finally, RCL changes could influence the RCL interplay with its surrounding and local hydrophobicity and electrostatics (3, 30). As such, high-throughput screening [i.e., phage-display (31, 32)], guided by our prediction platform, could help the identification of the correct RCL sequences.

To showcase the applicability of our prediction platform, we developed a next-generation panel of APC-specific α 1AT variants. We identified a family of three RCL α 1AT variants and selected α 1AT-KMPR/RIRA as our lead compound based on efficacy and specificity in *in vitro* assays (Figs. 3 and 4 *A–J*). In FVIII-deficient mice (hemophilia type A), α 1AT-KMPR/RIRA reduced blood loss at 7.5 mg/kg, whereas α 1AT-KR/K did not (Fig. 4*K*). Interestingly, we observed no significant improvement at the higher dose of 15 mg/kg α 1AT-KMPR/RIRA, while blood loss was only partially (~55%) restored. This suggests

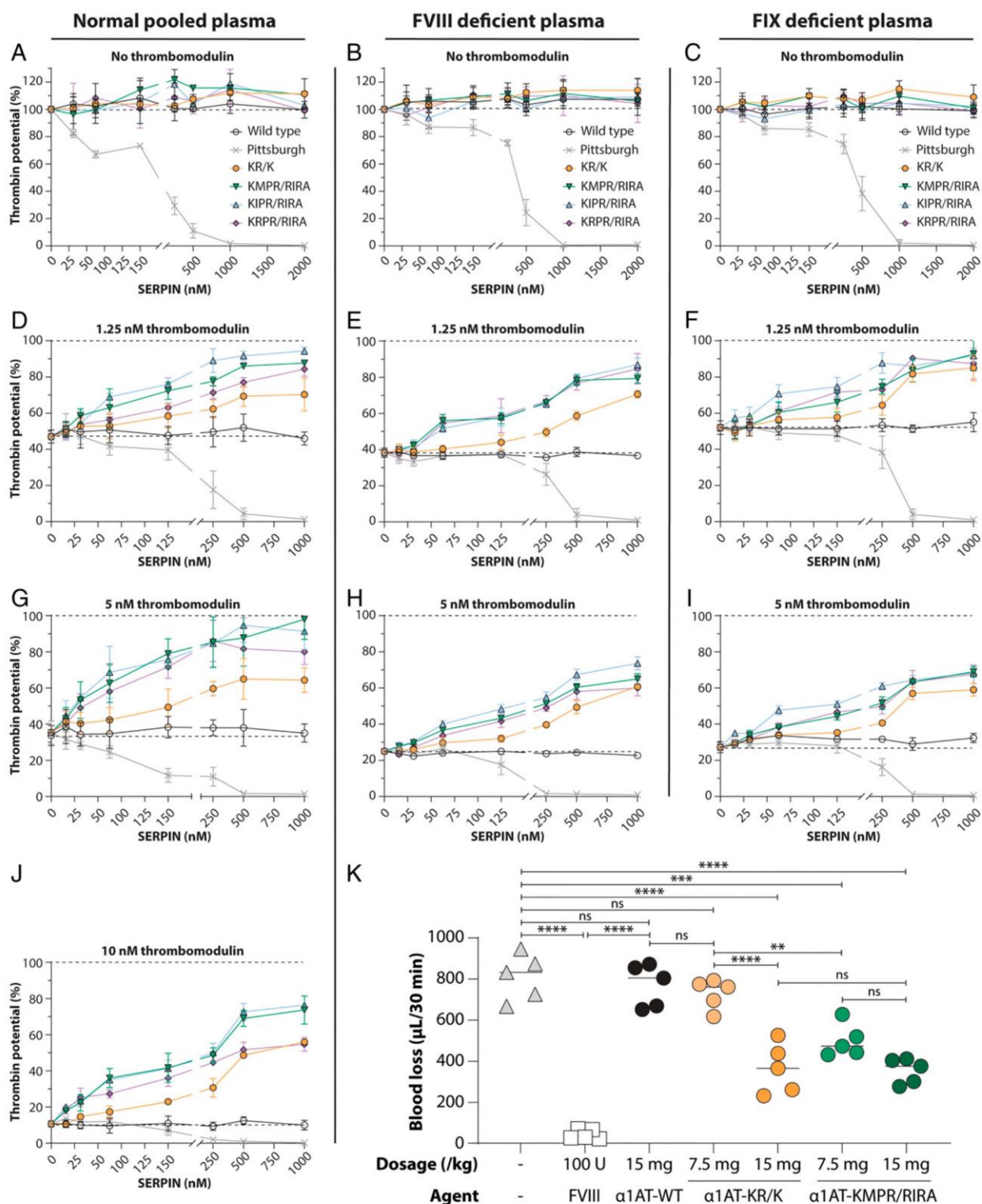


Fig. 4. Next-generation α 1-antitrypsin variants that block APC effectively restore defective hemostasis in vitro and in vivo in hemophilia A mice. (A–C) TF induced thrombin generation in normal pooled plasma (A; 0.5 pM), FVIII-deficient plasma (B; 1 pM), and FIX-deficient plasma (C; 4 pM) in the absence of thrombomodulin. (D–J) Effect of SERPINs on TF-driven thrombin generation in the presence of escalating doses of thrombomodulin. Data represents the mean \pm SD of three separate experiments. (K) Tail-clip model of hemophilia type A mice (factor VIII deficient). Mice ($n = 5$) were pretreated by intravenous injection with SERPIN variants 5 min prior to the tail clip. Data are represented as scatterplots with medians. ns: not significant, $***P = 0.0001$, and $****P < 0.0001$ by one-way ANOVA with post hoc Tukey multiple comparison test.

that the anticoagulant function of APC is only partly responsible for the observed bleeding tendency in hemophilia A mice. Interestingly, a similar observation was observed in this FVIII-deficient model when treated with emicizumab, which also required infusion with human FIX and FX for species compatibility (33). However, in the presence of low-FVIII concentrations, emicizumab was able to completely restore blood loss. Although this requires further investigation, it may suggest that low levels of FVIII (as present in part of the human hemophilia A patients) could further enhance the therapeutic effects of APC-specific SERPINS.

While the efficacy of α 1AT-KR/K has been assigned to its ability to inhibit APC, it is also a potent inhibitor of plasmin (Fig. 3E). This allows α 1AT-KR/K to protect the formed fibrin from the degradation in clot lysis assays (SI Appendix, Fig. S16). We found that α 1AT-KMPR/RIRA was superior to α 1AT-KR/K in our tail-clip model, despite the higher-antifibrinolytic activity of the latter (Fig. 4K). It is important to note that plasmin contributes to bleeding in hemophilia in selective tissues: Antifibrinolytic therapy predominantly attenuates bleeding in mucosal areas of hemophilia patients (34, 35). Conversely, these agents are ineffective in other tissues (36). Indeed, the tail-clip bleeding model is sensitive to defects in primary hemostasis. Since thrombin is a powerful platelet activator, the modulation of thrombin formation is likely to impact this model, explaining our findings.

Besides its anticoagulant role (through cofactor inactivation), APC has effects on endothelial barrier stabilization and has anti-apoptotic and anti-inflammatory properties (through PAR-1 cleavage) (37, 38). Recently, an antibody against APC was developed that normalized hemostasis *in vivo* but did not interfere with these cytoprotective functions (39). Future studies may uncover whether APC-inhibiting SERPINS also inhibit these cytoprotective functions.

Compared to monoclonal antibodies, the circulation half-life of SERPINS is short: WT- α 1AT; 4.5 d [in humans (40)] and recombinant α 1AT; 46.9 min [in mice (41)]. As such, patients with hemophilia would require repeated infusions with these APC-inhibiting SERPINS when continuous treatment is required. To overcome this obstacle, the *in vivo* expression of modified SERPINS might prove beneficial. There is experience in this area: In mice, the *in vivo* expression of α 1AT-WT (for treatment of α 1AT deficiency) has already achieved levels of $1,826 \pm 201 \mu\text{g/mL}$ (42). However, a peak concentration of only 21 to 36 $\mu\text{g/mL}$ has been achieved in humans (43). This is far below the required therapeutic level of 527 $\mu\text{g/mL}$. One way to lower the required therapeutic levels for SERPIN-based therapy could be to further increase their efficacy through RCL redesign.

In conclusion, we demonstrate a strategy to predict SERPIN RCL specificity. The prediction platform provides primary insights into SERPIN RCL sequence–function relationship toward selected proteases. As a showcase, we made use of the platform to enhance the development of next-generation, APC-specific SERPINS. Though, this concept should hold value more broadly by targeting proteases beyond those involved in the hemostatic system.

Materials and Methods

For an extensive material list, please refer to SI Appendix.

Construction of α 1-Antitrypsin Mutants. The complementary DNA sequence of SERPINA1 that encodes α 1AT-WT was obtained from the National Center for Biotechnology Information reference sequence (NM_001127707.1). The signal peptide sequence was replaced by an *EcoRI* digestion site and the tobacco etch virus protease cleavage site. After the naturally occurring stop codon, a *NotI* digestion site, was placed and the entire construct was obtained as a custom gene via integrated DNA technologies. The SERPINA1 sequence was digested from the vector via *EcoRI* and *NotI* and ligated into the digested

pSM2 vector that encodes for an N-terminal Ig κ secretion signal and two STREP-tags for protein purification (17, 44). A dedicated SERPINA1-*BsmBI* pSM2 expression vector was created by removing the C-terminal part of SERPINA1 via digestion by *BstEII* and *NotI* and replacing by a double-stranded DNA fragment (integrated DNA technologies) encoding the C-terminal part of SERPINA1. In this construct, the nucleotide sequence encoding P4 to P4' residue was replaced with a random nucleotide sequence (327 bp) flanked by two *BsmBI* restriction sites. The SERPINA1-*BsmBI* pSM2 vector was digested with *BsmBI* in a presence of 1 mM DTT at 37 °C for 2 h. The desired P4' to P4 nucleotide sequence for SERPINA1 mutants was created as an oligonucleotide duplex by annealing complementary forward custom-made primer and reverse custom-made primer (100 μM /primer) (SI Appendix, Tables S1 and S3) in T4 ligase buffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 10 mM DTT, and pH 7.5) in a presence of T4 Polynucleotide Kinase (5 units). The complementary primers were incubated in 37 °C for 30 min, after which the temperature was raised to 95 °C and incubated for 5 min. Sample temperature was reduced to 25 °C with a ramp rate of 5 °C/min to allow for proper primer–duplex formation. The oligonucleotide duplex was diluted in H₂O (1:200), and 1 μL diluted oligo duplex was ligated into 50 ng digested SERPINA1-*BsmBI* pSM2 vector via T4 DNA ligase. Constructs were confirmed by sequencing.

SERPIN–RCL Library Small-Scale Expression. A total of 2 mL HEK293 Freestyle cells (1.1×10^6 cells/mL) were transfected with 1 $\mu\text{g/mL}$ of plasmid, encoding α 1AT mutants via 293Fectin according to manufacturer instructions. After 4 d the supernatant was collected via centrifugation (2,000 rpm for 5 min). All samples of a library were produced in a single batch, including α 1AT-WT and empty pSM2 vector as controls. The α 1AT protein levels were assayed via SDS-PAGE separation and visualized via Coomassie Blue staining. α 1AT protein bands (52 kDa) were quantified via the Odyssey infrared imager from LI-COR. Based upon the quantification, the samples' protein levels were equalized by diluting the samples with conditioned culture media, resulting in equal α 1AT levels in each library. The equalized supernatants were stored at –20 °C.

SERPIN–RCL Library Inhibition Screening. For testing the inhibitory capacity of the α 1AT mutants, the equalized supernatant was thawed at 37 °C and tested via chromogenic assays. A total of 0.2% (wild-type/volume) bovine serum albumin (BSA) in Hepes-buffered saline (HBS; 10 mM Hepes, 150 mM NaCl, and pH7.4). All the reagents were prewarmed to 37 °C prior to the experiment. α 1AT supernatant was added to a 96-well vinyl assay plate (prewarmed to 37 °C), to which 10 μL protease of interest (SI Appendix, Table S4) was added to α 1AT supernatants and incubated for 5 min. Afterward, 10 μL chromogenic substrate (0.5 mM final concentration) was added to the mixture. Substrate conversion was immediately monitored every 30 s by a SpectraMax M2e plate reader at 37 °C. For thrombin and plasmin activity assays, the conversion of the substrate was measured via fluorescence (excitation/emission: 360/480 nm). For FXa, FXIa, α XIIa, PKa, and APC activity assays, the substrate conversion was measured via absorbance at 405 nm. Relative fluorescent units (RFU) or optical density (OD) after 15 min ($t = 15$) were used for data analysis. After equalization for SERPIN concentration (described in SERPIN–RCL Library Small-Scale Expression), all libraries were titrated into screening experiments for each protease so that 5 to 25% of the protease activity (relative to uninhibited protease) remained in the presence of the best-performing α 1AT variant in that library. In this way, we avoided comparison under saturating conditions. We normalized the absolute effect of the best-performing variant as 100% inhibition to enable comparison.

Generation of RCL Prediction Score. In each library, the substrate conversion was converted to normalized protease inhibition score for each variant ($Score_{\text{position}}^{\text{Amino acid}}$) as follows:

$$Score_{\text{position}}^{\text{Amino acid}} = \frac{1 - \left(\frac{\text{RFU or OD}_{\text{position}}^{\text{Amino acid at } t=15}}{X} \right)}{1 - \left(\frac{Y}{X} \right)} \times 100,$$

where X = RFU or OD of α 1AT-WT at $t = 15$ min, Y = RFU or OD of the strongest α 1AT mutant in the library at $t = 15$ min. To score an α 1AT RCL sequence, the normalized protease inhibition scores of P4 to P4' were compounded as follows:

$$\text{RCL prediction score} = \left(\frac{Score_{\text{P4}}^{\text{Amino acid}}}{100} \times \frac{Score_{\text{P3}}^{\text{Amino acid}}}{100} \times \frac{Score_{\text{P2}}^{\text{Amino acid}}}{100} \right. \\ \left. \times \dots \times \frac{Score_{\text{P4}'}^{\text{Amino acid}}}{100} \right) \times 100.$$

SERPIN-Based Prediction Model Validation. Per target protease, a validation test-cohort (SI Appendix, Fig. S2A) was created which consists of α 1AT mutants selected based on predictions from either the α 1AT RCL library or

PS-SCL data (12, 13). From the α 1AT RCL library, 10 top-scoring P2 and P3 residue combinations were selected as donor RCL sequences for α 1-antitrypsin RCL variants. For comparative prediction studies, we indexed historical, published PS-SCL data to determine candidate donor sequences. Hereto, we converted PS-SCL data (presented as colored three-point scale in refs. (12 and 13) into a numerical value: 0 = no substrate conversion, 1 = intermediate substrate conversion, and 2 = strong substrate conversion (example for APC; *SI Appendix, Fig. S2B*). We subsequently ranked individual amino acids on each position by favorability for inhibiting a target protease based on their cumulative score (i.e., a high score signifies that it combines well with various neighboring amino acids; indicated in the axes of *SI Appendix, Fig. S2B*). Next, we normalized these cumulative scores (highest possible value = 100%) and combined normalized scores of P2 and P3 residues to obtain combinations of P2 and P3 residues that should be favorable (*SI Appendix, Fig. S2C*; P1 was fixed to be an R). The 10 highest ranking P2 and P3 combinations were selected as donor RCL sequences for mutants. Another 10 P2 and P3 combinations with the biggest score differences between α 1AT RCL library and PS-SCL were selected. Eventually, all 30 selected combinations were pooled into a test-cohort (*SI Appendix, Fig. S2D and Table S2*), in which duplicate RCL sequences were excluded. In a blinded manner, another researcher expressed the test-cohort in a single batch and determined protease inhibition, as described in *SERPIN-RCL Library Inhibition Screening*. Data were plotted and analyzed in Prism Graphpad 7.02 software. A simple linear regression model was used to assess sample correlations.

Production and Purification of α 1-Antitrypsin Variants. The SERPINA1 sequences that encode α 1AT-WT, α 1AT-KR/K, α 1AT-KMPR/RIRA, α 1AT-KIPR/RIRA, and α 1AT-KRPR/RIRA were digested from pSM2 vector via *HindIII* and *NotI* and ligated into the digested pcDNA5FRT/TO vector. A total of 2.5×10^5 cells/mL of Flp-In T-REx 293 cells were seeded in a 24-well plate and cultivated in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; 10% volume/volume fetal bovine serum supplemented) for 24 h. Afterward, the cells were cotransfected with SERPINA1 variant in pcDNA5/FRT/TO vector (in a 1:9 ratio with the pOG44 Flp-recombinase expression vector) via Lipofectamine 3000 reagent, according to manufacturer instructions. Around 4 d after transfection, transfected cell lines were selected by 100 μ g/mL hygromycin. Stable transfected cell lines were seeded in Corning HYPERFlask cell culture vessels (Merck) and cultivated for 7 d to reach confluency. After which, protein expression was induced by replacing old culture media with doxycycline supplemented DMEM (DMEM + Ultrosor G, 1,000 U/mL penicillin-streptomycin, 10 μ g/mL blasticidin, 100 μ g/mL hygromycin B, and 1 μ g/mL doxycycline). After 7 d, the supernatant was collected. Cell debris was removed via centrifugation (5,000 \times g for 15 min). Supernatant was concentrated and dialyzed against STREP buffer (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, and pH = 8) via a Quix-Stand Benchtop system. Recombinant α 1AT and variants were purified from the concentrate by strep-tactin Sepharose beads according to manufacturer instructions (IBA Lifesciences). For in vivo studies, purified α 1AT variants were further purified via gel filtration over a HiPrep 26/10 Desalting column (GE Healthcare) with endotoxin-free phosphate-buffered saline (21 mM Na₂HPO₄, 2.8 mM NaH₂HPO₄, 140 mM NaCl, and pH = 7.4). Protein concentrations were determined via absorption spectroscopy at OD_{280nm}. Absorption coefficients were determined via ProtParam (45). Purity was assessed via 4 to 12% Bis-Tris-PAGE gel and Coomassie Blue staining. Purified α 1AT variants were stored at -80°C.

Protease Inhibition with Purified α 1-Antitrypsin. Purified proteases and α 1AT variants were diluted (in 0.2% [wild-type/volume] BSA-HBS, pH = 7.4) to 2.5 \times of their desired in-assay concentrations. A total of 20 μ L protease (final concentration = 17.8 nM APC, 8.9 nM thrombin, 8.7 nM FXa, 2.5 nM FXIa, 25 nM FXIIa, 1 nM PKa, and 24.1 nM plasmin) was incubated with 20 μ L α 1AT variant or vehicle for 5 to 30 min at 37°C in a 96-well assay plate. Hereafter, 10 μ L of chromogenic or fluorogenic substrate was added, and conversion (absorbance: 405 nm; fluorescence: excitation, 380 nm and emission, 460 nm) was monitored for 30 min at 37°C.

Determination of Inhibition Rate Constants. Second-order rate constants were determined via a discontinuous method under pseudo-first-order conditions (18). Both the α 1AT and proteases were diluted in assay buffer (20 mM Tris pH 7.4, 100 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂, 0.2% wild-type/volume BSA, and 0.1% wild-type/volume PEG 8000). Each target protease was preincubated with a concentration range of α 1AT at 37°C. Per concentration, eight preincubation time points were determined, including 0 min. To stop the preincubation, a chromogenic substrate was added, and the residual enzymatic activity was determined. Slopes were determined from the linear part of the chromogenic substrate conversion, transformed into their respective natural log

value, and plotted over time. From the slope of this plot, the apparent first-order constant k_{obs} was calculated and plotted against five different α 1AT concentrations (*SI Appendix, Table S5*). The slope of this linear plot gave the second-order rate constant $k_2 \pm$ the SD of the slope.

Thrombin Generation Assays. Thrombin generation was performed as published (46). Briefly, 60 μ L of human normal pooled citrated plasma was incubated with 20 μ L purified α 1AT variant in 0.2% wild-type/volume BSA-HBS and 10 μ L vehicle or thrombomodulin (0, 1.25, 5, or 10 nM) at 37°C for 5 min. Hereafter, 20 μ L activator was added (4 μ M phospholipid vesicles and 0.5 pM TF). Coagulation was initiated by the addition of 10 μ L FluCa (17.5 mM Hepes, 16.67 mM CaCl₂, 0.42 mM Gly-Gly-Arg-AMC, 5.25% wild-type/volume BSA, and pH = 7.4). Substrate conversion was measured at 380 nm excitation and 460 nm emission wavelengths and monitored for at least 90 min at 37°C. For calibration, the activator was replaced by thrombin- α 2-macroglobulin complex (Thrombin calibrator) in the absence of α 1AT. The obtained data were converted into thrombin generation peaks via Thromboscope software (Synapse). To assess thrombin generation in FVIII- or FIX-deficient plasma, thrombin generation was performed as described earlier except that 1 and 4 pM TF was used for FVIII-deficient plasma and FIX-deficient plasma, respectively.

To assess thrombin generation in mouse plasma, 20 μ L citrated plasma of healthy C57BL/6 mice was incubated with 20 μ L purified α 1AT in 0.2% wild-type/volume BSA-HBS and 10 μ L vehicle or 25 nM thrombomodulin at 37°C for 5 min. Hereafter, 10 μ L activator was added (4 μ M phospholipid vesicles and 0.8 pM TF). Coagulation was initiated by the addition of 5 μ L FluCa. Substrate conversion was measured at 380 nm excitation and 460 nm emission wavelengths and monitored for at least 60 min at 37°C.

Clot Lysis Assay. Clot lysis was assessed in human normal, pooled citrated plasma, FVIII-deficient plasma or FIX-deficient plasma. A total of 60 μ L plasma was incubated with 10 μ L purified α 1AT variant (final concentration 1 μ M) in 0.2% wild-type/volume BSA-HBS and 10 μ L tPA (final concentration 6 nM). In addition, 10 μ L vehicle or 5 nM thrombomodulin was added and incubated at 37°C for 5 min. Hereafter, 20 μ L activator was added (4 μ M phospholipid vesicles and 0.5 pM TF). Coagulation was initiated by an addition of 16.67 mM CaCl₂. Fibrin clot formation and lysis were monitored kinetically via light absorbance at 405 nm for 2 h at 37°C.

To assess clot lysis in FVIII- or FIX-deficient plasma, clot lysis was performed as described earlier, except that 1 and 4 pM TF was used for FVIII-deficient plasma and FIX-deficient plasma, respectively.

Dilute PT. The PT was determined with the Dade Innovin reagent. The Dade Innovin was reconstituted as described by the manufacturer; hereafter, it was diluted 1,000-fold in CaCl₂ (16.6 mM). Normal pooled plasma was supplemented with 3 μ M α 1AT. A total of 50 μ L prewarmed plasma was mixed with 50 μ L prewarmed, diluted Dade Innovin. Plasma coagulation times were measured on an MC10 plus coagulometer (Merlin Medical).

Dilute aPTT. The aPTT was determined via the Dade Actin FS reagent. The Dade Actin FS was diluted 16-fold in HBS. Normal pooled plasma was supplemented with 3 μ M α 1AT. A total of 50 μ L prewarmed plasma was mixed with 50 μ L prewarmed, diluted Dade Actin FS and incubated for 2 min. Hereafter, 50 μ L prewarmed CaCl₂ (25 mM) was added, and plasma coagulation times were measured on an MC10 plus coagulometer (Merlin Medical).

Determination of SERPIN-Protease Complex Formations in Plasma. A total of 60 μ L of human normal pooled citrated plasma was incubated with 1 μ M purified α 1AT variant in 0.2% wild-type/volume BSA-HBS and 5 nM thrombomodulin or vehicle at 37°C for 5 min. Hereafter, 20 μ L activator was added (4 μ M phospholipid vesicles and 0.5 pM TF). Coagulation was initiated by the addition of 16.67 mM CaCl₂. The samples were incubated at 37°C for 60 min. After which, samples were mixed with 3 \times sample buffer (SB; 30% glycerol, 0.18 M Tris-HCl, 6% SDS, bromophenol blue, and in a presence of 25 mM DTT) and heated at 95°C for 10 min. To assess plasmin complexation, 6 nM tPA or vehicle was added to 60 μ L of human normal pooled citrated plasma prior to 1 μ M purified α 1AT variant and 5 nM thrombomodulin or vehicle incubation. Coagulation was initiated by the addition of 16.67 mM CaCl₂. The samples were incubated at 37°C for 2 h. After which, samples were mixed with 3 \times SB (in a presence of 25 mM DTT) and heated at 95°C for 10 min. Samples were separated on 4 to 12% Bis-Tris gels at 165V for 65 to 120 min in MOPS-SDS running buffer. Proteins were transferred to Immobilon-FL membranes at 125V for 55 min in blotting buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, and 20% [volume/volume] ethanol). Membranes were blocked for 2 h at room temperature (RT) with blocking buffer (Odyssey blocking reagent diluted 1:1 in Tris-buffered saline; TBS). Subsequently, the protein of interest was detected by an overnight incubation (at 4°C) of the membranes with primary antibody (*SI Appendix, Table*

57). Membranes were washed with 0.05% (volume/volume) tween in TBS (TBS-T), and primary antibody was detected with corresponding secondary antibody for 1 h at RT. Membranes were washed with TBS-T and analyzed on a near-infrared Odyssey scanner (LI-COR). Band densitometry was analyzed with Odyssey software (LI-COR).

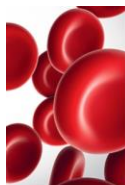
Restoration of Clotting in Hemophilic Mice by SERPINS. The tail-clip model was performed as previously described (33) with approval of the local ethical committee of Université Paris-Sud (Comité d'Éthique en Expérimentation Animale No. 26, protocol APAFIS#4400–201602171643 1023v5). Briefly, FVIII-deficient mice (47) (backcrossed on a C57BL/6 strain) were anesthetized with isoflurane. Around 5 min prior to the tail amputation, mice were administered with the recombinant α 1AT variants by intravenous injection via the retroorbital venous plexus. Subsequently, 3 mm of the distal tip of the tail was amputated, and the tail

was immersed in prewarmed physiological saline (37 °C) for 30 min. Hereafter, the sample was centrifuged at 1,500× *g* for 20 min. The red blood cell pellet was lysed by resuspension in H₂O, and hemoglobin levels were quantified at 416 nm. Blood loss was calculated from a standard curve by lysing defined amounts of mouse red blood cells in distilled H₂O.

Data Availability. All study data are included in the article and/or *SI Appendix*.

ACKNOWLEDGMENTS. W.S. gratefully acknowledges a full PhD scholarship from the Royal Thai Government. S.d.M. gratefully acknowledges the Toegpaste en Technische Wetenschappen (TTW) section of The Netherlands Organization for Scientific Research (2019/TTW/00704802). P.J.L. and T.S. gratefully acknowledge funding from Sobi. We thank Dougald Monroe for valuable advice concerning the in vivo study.

- Hedstrom, Serine protease mechanism and specificity. *Chem. Rev.* **102**, 4501–4524 (2002).
- Sanrattana, C. Maas, S. de Maat, SERPINS-From trap to treatment. *Front. Med. (Lausanne)* **6**, 25 (2019).
- P. G. W. Gettins, S. T. Olson, Exosite determinants of serpin specificity. *J. Biol. Chem.* **284**, 20441–20445 (2009).
- H. Loebermann, R. Tokuko, J. Deisenhofer, R. Huber, Human α 1-proteinase inhibitor. Crystal structure analysis of two crystal modifications, molecular model and preliminary analysis of the implications for function. *J. Mol. Biol.* **177**, 531–557 (1984).
- J. A. Huntington, R. J. Read, R. W. Carrell, Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature* **407**, 923–926 (2000).
- E. Stratikos, P. G. Gettins, Formation of the covalent serpin-proteinase complex involves translocation of the proteinase by more than 70 Å and full insertion of the reactive center loop into β -sheet A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 4808–4813 (1999).
- J. A. Huntington, R. W. Carrell, The serpins: Nature's molecular mousetraps. *Sci. Prog.* **84**, 125–136 (2001).
- C. F. Scott *et al.*, Alpha-1-antitrypsin-Pittsburgh. A potent inhibitor of human plasma factor XIa, kallikrein, and factor XIIf. *J. Clin. Invest.* **77**, 631–634 (1986).
- P. Goettig, H. Brandstetter, V. Magdolen, Surface loops of trypsin-like serine proteases as determinants of function. *Biochimie* **166**, 52–76 (2019).
- M. C. Owen, S. O. Brennan, J. H. Lewis, R. W. Carrell, Mutation of antitrypsin to antithrombin. alpha 1-antitrypsin Pittsburgh (358 Met leads to Arg), a fatal bleeding disorder. *N. Engl. J. Med.* **309**, 694–698 (1983).
- H. Rubin *et al.*, Conversion of α 1-antichymotrypsin into a human neutrophil elastase inhibitor: Demonstration of variants with different association rate constants, stoichiometries of inhibition, and complex stabilities. *Biochemistry* **33**, 7627–7633 (1994).
- D. N. Gosalia, C. M. Salisbury, D. J. Maly, J. A. Ellman, S. L. Diamond, Profiling serine protease substrate specificity with solution phase fluorogenic peptide microarrays. *Proteomics* **5**, 1292–1298 (2005).
- D. N. Gosalia, C. M. Salisbury, J. A. Ellman, S. L. Diamond, High throughput substrate specificity profiling of serine and cysteine proteases using solution-phase fluorogenic peptide microarrays. *Mol. Cell. Proteomics* **4**, 626–636 (2005).
- J. L. Harris, E. P. Peterson, D. Hudig, N. A. Thornberry, C. S. Craik, Definition and redesign of the extended substrate specificity of granzyme B. *J. Biol. Chem.* **273**, 27364–27373 (1998).
- J. L. Harris *et al.*, Rapid and general profiling of protease specificity by using combinatorial fluorogenic substrate libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 7754–7759 (2000).
- S. L. Ivry *et al.*, Global substrate specificity profiling of post-translational modifying enzymes. *Protein Sci.* **27**, 584–594 (2018).
- S. de Maat *et al.*, Design and characterization of α 1-antitrypsin variants for treatment of contact system-driven thromboinflammation. *Blood* **134**, 1658–1669 (2019).
- S. G. I. Polderdijk *et al.*, Design and characterization of an APC-specific serpin for the treatment of hemophilia. *Blood* **129**, 105–113 (2017).
- S. G. I. Polderdijk, J. A. Huntington, Identification of serpins specific for activated protein C using a lysate-based screening assay. *Sci. Rep.* **8**, 8793 (2018).
- E. W. Davie, O. D. Ratnoff, Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science* **145**, 1310–1312 (1964).
- D. A. Lane, H. Philippou, J. A. Huntington, Directing thrombin. *Blood* **106**, 2605–2612 (2005).
- C. T. Esmon, The protein C anticoagulant pathway. *Arterioscler. Thromb.* **12**, 135–145 (1992).
- F. Simão, T. Ustunkaya, A. C. Clermont, E. P. Feener, Plasma kallikrein mediates brain hemorrhage and edema caused by tissue plasminogen activator therapy in mice after stroke. *Blood* **129**, 2280–2290 (2017).
- P. C. Hopkins, D. C. Crowther, R. W. Carrell, S. R. Stone, Development of a novel recombinant serpin with potential antithrombotic properties. *J. Biol. Chem.* **270**, 11866–11871 (1995).
- X. Xia, Z. Xie, Protein structure, neighbor effect, and a new index of amino acid dissimilarities. *Mol. Biol. Evol.* **19**, 58–67 (2002).
- M. Fu, Z. Huang, Y. Mao, S. Tao, Neighbor preferences of amino acids and context-dependent effects of amino acid substitutions in human, mouse, and dog. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 15963–15980 (2014).
- C. J. Crasto, J. Feng, Sequence codes for extended conformation: A neighbor-dependent sequence analysis of loops in proteins. *Proteins* **42**, 399–413 (2001).
- H. M. Fooks, A. C. R. Martin, D. N. Woolfson, R. B. Sessions, E. G. Hutchinson, Amino acid pairing preferences in parallel β -sheets in proteins. *J. Mol. Biol.* **356**, 32–44 (2006).
- P. C. Hopkins, R. N. Pike, S. R. Stone, Evolution of serpin specificity: Cooperative interactions in the reactive-site loop sequence of antithrombin specifically restrict the inhibition of activated protein C. *J. Mol. Evol.* **51**, 507–515 (2000).
- E. M. Marijanovic *et al.*, Reactive centre loop dynamics and serpin specificity. *Sci. Rep.* **9**, 3870 (2019).
- B. M. Scott *et al.*, Phage display of the serpin alpha-1 proteinase inhibitor randomized at consecutive residues in the reactive centre loop and biopanned with or without thrombin. *PLoS One* **9**, e84491 (2014). Correction in: *PLoS One* **15**, e0238969 (2020).
- V. Bhakta *et al.*, Identification of an alpha-1 antitrypsin variant with enhanced specificity for factor XIa by phage display, bacterial expression, and combinatorial mutagenesis. *Sci. Rep.* **11**, 5565 (2021).
- S. Ferrière *et al.*, A hemophilia A mouse model for the in vivo assessment of emicizumab function. *Blood* **136**, 740–748 (2020).
- C. D. Forbes *et al.*, Tranexamic acid in control of haemorrhage after dental extraction in haemophilia and Christmas disease. *Br. Med. J.* **2**, 311–313 (1972).
- M. J. Coetzee, The use of topical crushed tranexamic acid tablets to control bleeding after dental surgery and from skin ulcers in haemophilia. *Haemophilia* **13**, 443–444 (2007).
- R. Stagaard *et al.*, Abrogating fibrinolysis does not improve bleeding or rFVIIa/rFVIII treatment in a non-mucosal venous injury model in hemophilic rodents. *J. Thromb. Haemost.* **16**, 1369–1382 (2018).
- J. H. Griffin, B. V. Zlokovic, L. O. Mosnier, Activated protein C: Biased for translation. *Blood* **125**, 2898–2907 (2015).
- L. O. Mosnier, B. V. Zlokovic, J. H. Griffin, The cytoprotective protein C pathway. *Blood* **109**, 3161–3172 (2007).
- X.-Y. Zhao *et al.*, Targeted inhibition of activated protein C by a non-active-site inhibitory antibody to treat hemophilia. *Nat. Commun.* **11**, 2992 (2020).
- J. E. Gadek, H. G. Klein, P. V. Holland, R. G. Crystal, Replacement therapy of alpha 1-antitrypsin deficiency. Reversal of protease-antiprotease imbalance within the alveolar structures of PiZ subjects. *J. Clin. Invest.* **68**, 1158–1165 (1981).
- A. Lusch *et al.*, Development and analysis of alpha 1-antitrypsin neoglycoproteins: The impact of additional N-glycosylation sites on serum half-life. *Mol. Pharm.* **10**, 2616–2629 (2013).
- M. L. Sosulski *et al.*, Gene therapy for alpha 1-antitrypsin deficiency with an oxidant-resistant human alpha 1-antitrypsin. *JCI Insight* **5**, e135951 (2020).
- T. R. Flotte *et al.*, Phase 2 clinical trial of a recombinant adeno-associated viral vector expressing α 1-antitrypsin: Interim results. *Hum. Gene Ther.* **22**, 1239–1247 (2011).
- S. de Maat *et al.*, Plasmin is a natural trigger for bradykinin production in patients with hereditary angioedema with factor XII mutations. *J. Allergy Clin. Immunol.* **138**, 1414–1423.e9 (2016).
- M. R. Wilkins *et al.*, Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods Mol. Biol.* **112**, 531–552 (1999).
- H. C. Hemker *et al.*, Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* **33**, 4–15 (2003).
- L. Bi *et al.*, Targeted disruption of the mouse factor VIII gene produces a model of hemophilia A. *Nat. Genet.* **10**, 119–121 (1995).



THROMBOSIS AND HEMOSTASIS

Efficacy of platelet-inspired hemostatic nanoparticles on bleeding in von Willebrand disease murine models

Stéphanie Rouillet,¹ Norman Luc,² Julie Rayes,³ Jean Solarz,¹ Dante Disharoon,² Andrew Ditto,⁴ Emily Gahagan,⁴ Christa Pawlowski,⁴ Thibaud Sefiane,¹ Frédéric Adam,¹ Caterina Casari,¹ Olivier D. Christophe,¹ Michael Bruckman,⁴ Peter J. Lenting,¹ Anirban Sen Gupta,² and Cécile V. Denis¹

¹Laboratory for Hemostasis, Inflammation & Thrombosis, Unite Mixte de Recherche 1176 INSERM, Université Paris-Saclay, Le Kremlin-Bicêtre, France; ²Department of Biomedical Engineering, Case Western Reserve University, Cleveland, OH; ³Institute of Cardiovascular Sciences, College of Medical and Dental Sciences, University of Birmingham, Birmingham, United Kingdom; and ⁴Haima Therapeutics LLC, Cleveland, OH

KEY POINTS

- SP nanoparticles improve thrombus formation on collagen using blood from VWD murine models.
- Treatment with SP nanoparticles reduces blood loss in murine models of VWD.

The lack of innovation in von Willebrand disease (VWD) originates from many factors including the complexity and heterogeneity of the disease but also from a lack of recognition of the impact of the bleeding symptoms experienced by patients with VWD. Recently, a few research initiatives aiming to move past replacement therapies using plasma-derived or recombinant von Willebrand factor (VWF) concentrates have started to emerge. Here, we report an original approach using synthetic platelet (SP) nanoparticles for the treatment of VWD type 2B (VWD-2B) and severe VWD (type 3 VWD). SP are liposomal nanoparticles decorated with peptides enabling them to concomitantly bind to collagen, VWF, and activated platelets. In vitro, using various microfluidic assays, we show the efficacy of SPs to improve thrombus formation in VWF-deficient condition (with human platelets) or using blood from mice with VWD-2B and deficient VWF (VWF-KO, ie, type 3 VWD). In vivo, using a tail-clip assay, SP treatment reduced blood loss by 35% in mice with VWD-2B and 68% in mice with VWF-KO. Additional studies using nanoparticles decorated with various combinations of peptides demonstrated that the collagen-binding peptide, although not sufficient by itself, was crucial for SP efficacy in VWD-2B; whereas all 3 peptides appeared necessary for mice with VWF-KO. Clot imaging by immunofluorescence and scanning electron microscopy revealed that SP treatment of mice with VWF-KO led to a strong clot, similar to those obtained in wild-type mice. Altogether, our results show that SP could represent an attractive therapeutic alternative for VWD, especially considering their long half-life and stability.

Introduction

The treatment of von Willebrand disease (VWD) has remained basically unchanged for the past 30 years.¹ It rests on 3 pillars: antifibrinolytics, desmopressin, and von Willebrand factor (VWF) concentrates. However, these different approaches do not consider the heterogeneity of VWD and so far, no type or subtype-specific treatment option has been developed.

In this regard, VWD-type 2B (VWD-2B) could represent an attractive target because of its very specific nature. Indeed, VWD-2B is characterized by gain-of-function mutations in the VWF A1 domain, which increase VWF binding to its platelet receptor, glycoprotein (GP) Iba. Consequently, it is the only VWD subtype associated with a platelet phenotype including the presence of circulating platelet aggregates, giant platelets, a fluctuating thrombocytopenia, and a platelet function defect.²⁻⁴ These distinctive features raise the question of whether correcting the platelet defect could improve hemostasis in VWD-2B.

Thrombocytopenia can be addressed with platelet transfusions⁵ or even with thrombopoietin receptor agonists^{6,7} but these approaches do not solve the thrombocytopathy because the mutant VWF will still bind spontaneously to platelet GPIIb/IIIa. Strategies that can bypass the VWF-GPIIb/IIIa axis while supporting platelet adhesion and aggregation may offer new possibilities to treat VWD-2B. In this regard, platelet-inspired synthetic hemostatic nanoparticles represent a very attractive alternative. These “synthetic platelet” (SP) nanoparticles are made of a phospholipid-based liposomal template that is surface-decorated with 3 different peptides: a fibrinogen mimetic peptide (FMP) that can bind to the active form of platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, a collagen-binding peptide (CBP) that can bind to exposed subendothelial fibrillar collagen, and a VWF-binding peptide (VBP) derived from the C2 domain of Factor VIII that can bind to the D'-D3 domain of VWF.⁸⁻¹⁰ SP have been shown to collaborate with residual platelets to restore hemostatic efficacy in tail-clip model in severely thrombocytopenic mice.¹¹⁻¹³ Their hemostatic efficacy was also demonstrated

in several animal models of traumatic injury, including a murine model of hepatic laceration,¹⁴ a porcine model of traumatic arterial hemorrhage,¹⁵ and a rodent model of traumatic liver resection injury.¹² Because of their promising hemostatic performance efficiency in these models and their unique mode of action toward VWF, that is, binding to the D'-D3 region and not to the A1-domain like platelets, we hypothesized that SP could be used to improve hemostasis in VWD-2B. Furthermore, because SP maintains the ability to bind to collagen irrespective of VWF presence⁸ and still coaggregate with active platelets to reduce bleeding, we postulated that they might also provide hemostatic support in a situation where native platelet adhesion to VWF is lacking because of the absence of VWF. Therefore, we also tested the hemostatic capability of SP in a VWF-knockout (KO) murine model.

Methods

Additional description of the experimental procedures can be found in the supplemental Material (available on the *Blood* website).

Animals and ethics statement

Mice with VWD-2B harboring the p.V1316M mutation in murine VWF and mice with VWF deficiency (VWF-KO) have been described previously.^{16,17} Male and female mice were used throughout the study (8-24 weeks old). This project was approved by the ethical committee CEEA26 (number APAFIS#27290-2020091714275854 v1).

Particle manufacturing methods

VBP and CBP were conjugated to DSPE-PEG_{2K}-Mal via thiol-maleimide coupling to form DSPE-PEG_{2K}-VBP and DSPE-PEG_{2K}-CBP and FMP was conjugated to DSPE-PEG_{2K}-azide via copper-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuCAAC) or 'click chemistry' to form DSPE-PEG_{2K}-FMP. All lipid-peptide conjugates were purified by dialysis and characterized by MALDI-TOF mass spectrometry. For manufacturing liposome-based SP nanoparticles surface-decorated with all 3 peptides, DSPE-PEG-VBP and DSPE-PEG-CBP were combined at 1 mol% each with DSPE-PEG-FMP (15 mol%), DSPC (40 mol%), cholesterol (40 mol%), DSPE-mPEG_{1K} (2 mol%), and DHPE-RhB (1 mol%) in 1:1 chloroform:methanol. They were then subjected to solvent evaporation under reduced pressure to form thin lipid films, rehydrated with 0.9% NaCl, then subjected to 10 freeze-thaw cycles using alternating exposure to liquid nitrogen and 60°C water bath, and finally extruded 5 times through a 200 nm pore size polycarbonate filter (thin film rehydration and extrusion method) (Figure 1A).¹⁸ For nanoparticles with 2, 1, or no peptides, the specific lipid-peptide conjugates were replaced with an equivalent mol% of DSPE-mPEG2000 and subjected to the same process of liposomal nanoparticle fabrication as described above. Before use, nanoparticle size was characterized by dynamic light scattering (Figure 1B) and cryo-transmission electron microscopy (Figure 1C).

BioFlux microfluidic assay to study effect of SP on human platelets in absence of VWF

Human platelet suspensions in buffer, containing 200 000 platelets per μL (Plt-200k), 50 000 platelets per μL (Plt-50K) or

20 000 platelets per μL (Plt-20k) were perfused on collagen-coated channels at 60 dyn/cm² for 10 minutes and the green fluorescence (calcein) for surface-adhered and aggregated platelets was imaged in real time. Next, rhodamine-B labeled (red fluorescence) control nanoparticles (CP) or SP nanoparticles at a particle:platelet ratio of 1000:1 were added to Plt-50K and Plt-20K conditions, to evaluate the ability of CP vs SP in rescuing platelet recruitment on the collagen-coated surface.

Total thrombus formation analysis system (T-TAS) perfusions

The T-TAS Plus (Zacros Fujimori Kogyo, Tokyo, Japan) is an automated microchip-based flow chamber system developed for assessment of platelet thrombus formation under flow conditions.¹⁹⁻²¹ Murine blood was collected under general anesthesia (isoflurane) by retro-orbital puncture within a nonheparinized glass capillary, in one-tenth volume trisodium citrate (13.8 mM final concentration). Blood was half-diluted in citrate solution (3.2% trisodium citrate solution/ 0.9% NaCl at the ratio of 1:9) and complemented with undecorated (control) nanoparticles or SP at a ratio of 50 particles per platelet. T-TAS Plus perfusions were performed on AR chips coated with collagen and tissue factor at a shear rate of 600 s⁻¹ for up to 30 minutes. Area under the curve (AUC), representative of the increase in pressure which relates to thrombus formation, was calculated, or extrapolated at 30 minutes.

Parallel plate flow chamber

Murine blood half-diluted in Tyrode's buffer was labeled with rhodamine 6G and complemented with CP or SP at a ratio of 50 particles per platelet. Thrombus formation was evaluated after perfusion assay on a fibrillar collagen matrix under arterial shear conditions (shear rate of 1500 s⁻¹).²²

Tail-clip bleeding assay

After general anesthesia with ketamine and xylazine, the mice received different formulations of particles via intravenous injection (2 mg/kg, in a final volume of 100 μL NaCl 0.9%, leading to a platelet: particle ratio between 1:5 to 1:10). Ten minutes later, 3 mm of the distal tip of the tail was amputated. Blood collection and blood loss measurement were performed as previously described.²³ Of note, bleeding was assessed over 30 minutes for mice with VWD-2B and 20 minutes for VWF-KO mice.

Immunofluorescence imaging of amputated tails

At the end of the tail-clip bleeding assay, 1 cm of the distal tip of tails from wild-type (WT) mice with VWF or VWF-KO mice injected with SP was amputated and fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 24 hours. Sections were stained for platelets using an antimouse CD41 antibody and for fibrin. Analysis was done in a selected region of interest which was defined inside the vessel. Sections were imaged using epifluorescent microscopy and analyzed using ImageJ software.

Scanning electron microscopy observation of clot morphology after tail vein transection

Untreated VWF-KO mice or VWF-KO mice injected with SP underwent a tail vein transection procedure as previously described.²⁴ After 10 minutes, the tail was immersed in 4% PFA/1% glutaraldehyde and cut. The sample was then

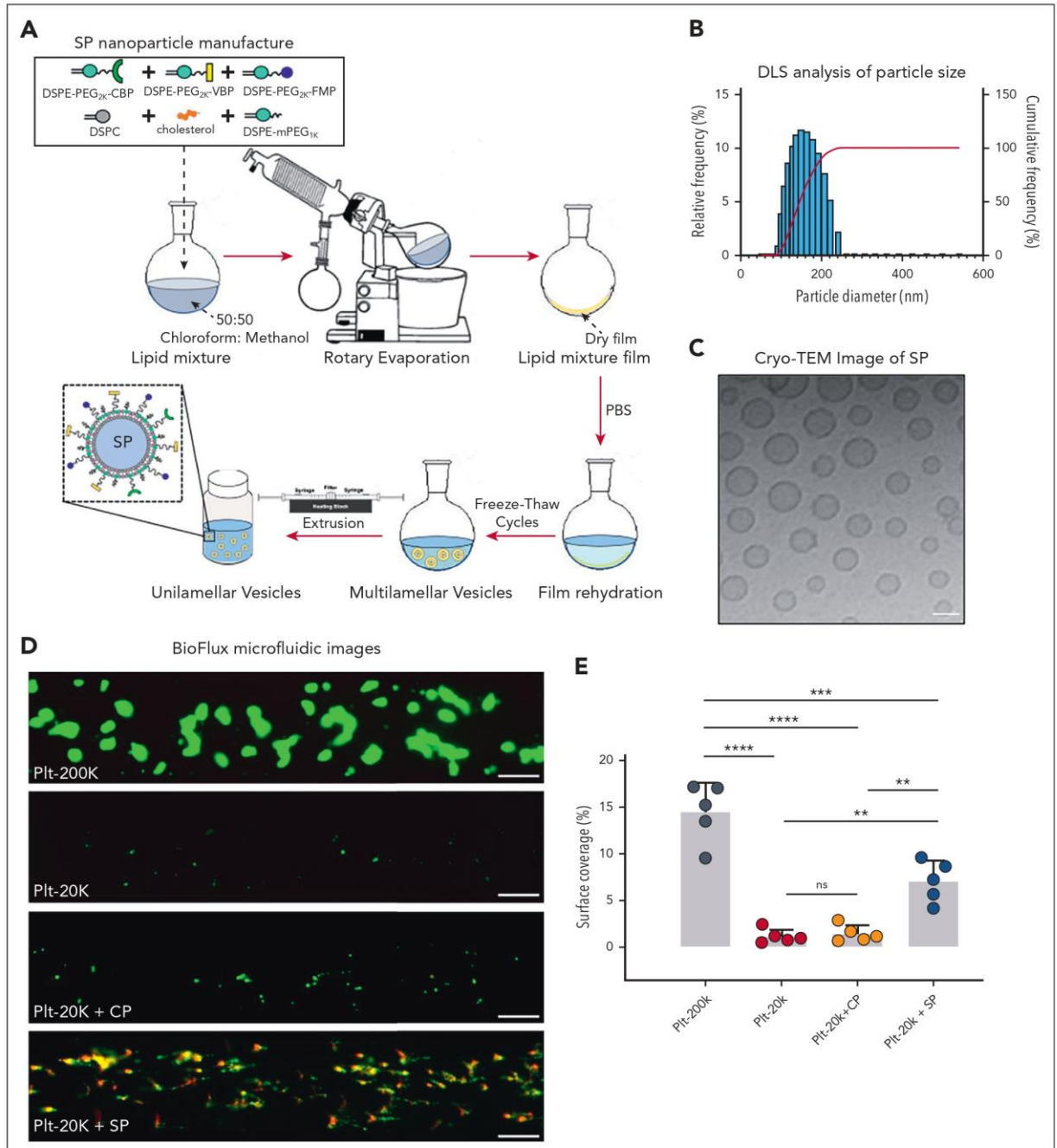


Figure 1. Physical and functional characterization of the SP nanoparticles. (A) Schematic of the manufacturing process for SP nanoparticle with lipids and lipid-peptide conjugates using the thin film rehydration followed by extrusion methodology. (B) Dynamic Light Scattering characterization and (C) Cryo-transmission electron microscopy (Cryo-TEM) imaging of SP nanoparticles indicates a diameter of approximately 150 to 200 nm. (D-E) Representative fluorescence microscopy images and quantitative analysis of imaging data from BioFlux microfluidics studies with platelet suspensions indicate that depletion of platelets from 200 000 per μ L (Plt-200K) to 20 000 per μ L (Plt-20K) results in drastic reduction of platelet coverage of collagen-coated microfluidic channel surface. Treatment of Plt-20K with CP does not rescue this whereas the treatment of Plt-20K with SP nanoparticles significantly rescues platelet recruitment and coverage on the collagen-coated channel surface (colocalization of Rhodamine B-labeled red fluorescent SP with calcein-stained green fluorescent platelets appear yellow). The particle/platelet ratio was 1000:1. Means \pm SD are represented. Statistical analysis was performed using a one-way ANOVA with Tukey's correction. ** $P \leq .01$; *** $P \leq .001$; **** $P \leq .0001$. ns, not significant.

immediately immersed in 10 mL 4% PFA/1% glutaraldehyde and fixed overnight at 4°C. Then, a 1 cm tail section was cut, centered on injury. A “nanosuit” was used to protect the samples from electron beam and hard drying.²⁵ The tails were dipped 3 times during 1 minute in the nanosuit and then pre-irradiated by a sputtering device without the metal emitter. Finally, silver metallization (setting: 10 nm of silver, 120 seconds at 5 cm and 30 mA) of the complete tail section was performed, and the samples were observed with scanning electron microscopy at different magnifications.

Statistical analysis

Data are presented as mean ± standard deviation (SD) unless indicated otherwise. Mann-Whitney test was performed for 2 groups comparison. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey’s multiple comparison test was performed when comparing multiple groups. $P < .05$ was considered statistically significant. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 7 software (La Jolla, CA).

Results

SP enhances platelet surface coverage in BioFlux microfluidics in VWF-deficient condition

Figure 1D shows representative fluorescence images of platelet surface coverage in Plt-200k vs Plt-20k vs “Plt-20k + CP” vs “Plt-20k + SP” conditions on collagen-coated BioFlux microfluidic channels in the absence of any plasma VWF. As is evident from the images, the surface coverage was drastically reduced in Plt-20K condition compared with Plt-200K condition. Adding CP in Plt-20K condition did not rescue or improve platelet surface coverage. In contrast, adding SP in Plt-20K condition substantially improved platelet surface coverage, and a high colocalization of red SP nanoparticles with green platelets was observed (appearing yellow in the merged image), suggesting that SP nanoparticles were able to rapidly bind to the exposed collagen even in the absence of VWF and enable concomitant binding of active platelets onto them to render enhanced recruitment and coverage of platelets on the surface. Figure 1E shows quantitative analysis of the results from these studies ($n = 5$ per condition), confirming that surface coverage of platelets on collagen-coated microchannels is significantly reduced ($P < .0001$) in Plt-20K condition ($1.2\% \pm 0.8\%$) compared to Plt-200K condition ($14.5\% \pm 3.2\%$), and the addition of SP significantly rescued ($7.0\% \pm 2.2\%$, $P = .0014$) this surface coverage compared with the addition of CP ($1.4\% \pm 0.9\%$). Surface-averaged platelet fluorescence intensity (green fluorescence, arbitrary units) from the same conditions, normalized to Plt-200K condition, are shown in supplemental Figure 1. Supplementary Movies A, B, C, and D show representative microfluidic imaging of Plt-200K, Plt-20K, Plt-20K + CP, and Plt-20K + SP conditions. In addition, supplemental Figure 2 shows representative fluorescence images and quantitative analysis data for SP treatment of Plt-50K condition, once again indicating the ability of SP to rescue platelet coverage on collagen-coated microfluidic surface. Altogether, these results indicate that SP nanoparticles can potentially render improved hemostatic responses in VWF-deficient and platelet-depleted conditions, as long as the concomitant collagen-binding (via CBP) and integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -binding (via FMP) properties of SP are able to enhance the recruitment of active platelets on collagen-exposing surface.

Ex-vivo addition of SP to VWD blood improves T-TAS perfusions’ parameters

In the T-TAS perfusion system, the AUC is an integrated parameter, representative of the pressure generated by platelet adhesion and thrombus formation inside a collagen- and tissue factor-coated chip. By analyzing changes in pressure as a function of time, Figure 2A left panel clearly shows that SP addition to murine VWD-2B blood led to a significant increase in AUC (1308 with a 95% confidence interval [CI] 1278-1329) compared with untreated VWD-2B blood (710; 95% CI, 687-734; $P < .0001$) or with undecorated/CP-supplemented blood (733; 95% CI, 717-748; $P < .0001$). For murine VWF-KO blood, we also measured significantly increased AUC when blood was supplemented with SP (988; 95% CI, 954-1022) compared with untreated blood (422; 95% CI, 407-436; $P < .0001$) or with CP-treated blood (558; 95% CI, 541-575; $P < .0001$) (Figure 2A, right panel). For SP-treated VWD-2B or SP-treated VWF-KO blood, the AUC remained lower than for WT blood (1916, 95% CI 1900-1933), indicating that thrombus formation was not completely rescued.

Altogether, the T-TAS perfusion assays show a significant improvement of platelet adhesion when SP were added to VWD blood.

Ex-vivo addition of SP to VWD blood significantly improved thrombus formation in a parallel plate flow chamber

To build on the encouraging results obtained with the T-TAS system, additional blood perfusion studies were performed using a more “classical” collagen-coated parallel plate flow chamber. The addition of SP to VWD-2B blood significantly increased thrombus formation compared with both untreated blood or blood supplemented with CP (174 ± 59 vs 58 ± 9 , $P = .016$ and 174 ± 34 vs 55 ± 2 , $P = .015$, respectively) (Figure 2B, upper panels) as measured by the mean fluorescent intensity, a surrogate marker for thrombus size (Figure 2C, left panel).

The addition of SP to VWF-KO blood also led to a strong increase in thrombus formation compared with untreated blood (523 ± 213 vs 28 ± 14 , $P = .002$) and blood supplemented with CP (523 ± 213 vs 31 ± 2 , $P = .003$), (Figure 2B, bottom panels and Figure 2C, left panel). Interestingly, thrombi formed in VWF-KO blood supplemented with SP appeared bigger than those formed in VWD-2B supplemented with SP.

In terms of percentage platelet coverage, the addition of SP to VWF-KO blood led to an increase in platelet adhesion (Figure 2C, right panel) with $20\% \pm 2\%$ covered area compared with $5.2\% \pm 1.9\%$ with untreated blood and $5.3\% \pm 2\%$ with CP. The results are less clear with VWD-2B blood where in terms of percentage covered area, an increase was seen only in the presence of CP ($24\% \pm 3.4\%$) compared with untreated blood ($13.4\% \pm 3.7\%$) or with SP-supplemented blood ($13.4\% \pm 0.2\%$). However, despite this increased surface coverage seen with control particles, no thrombus formation was observed.

Compared with WT conditions, only thrombus size obtained in SP-treated VWF-KO blood was normalized. All other parameters remained below WT read-outs.

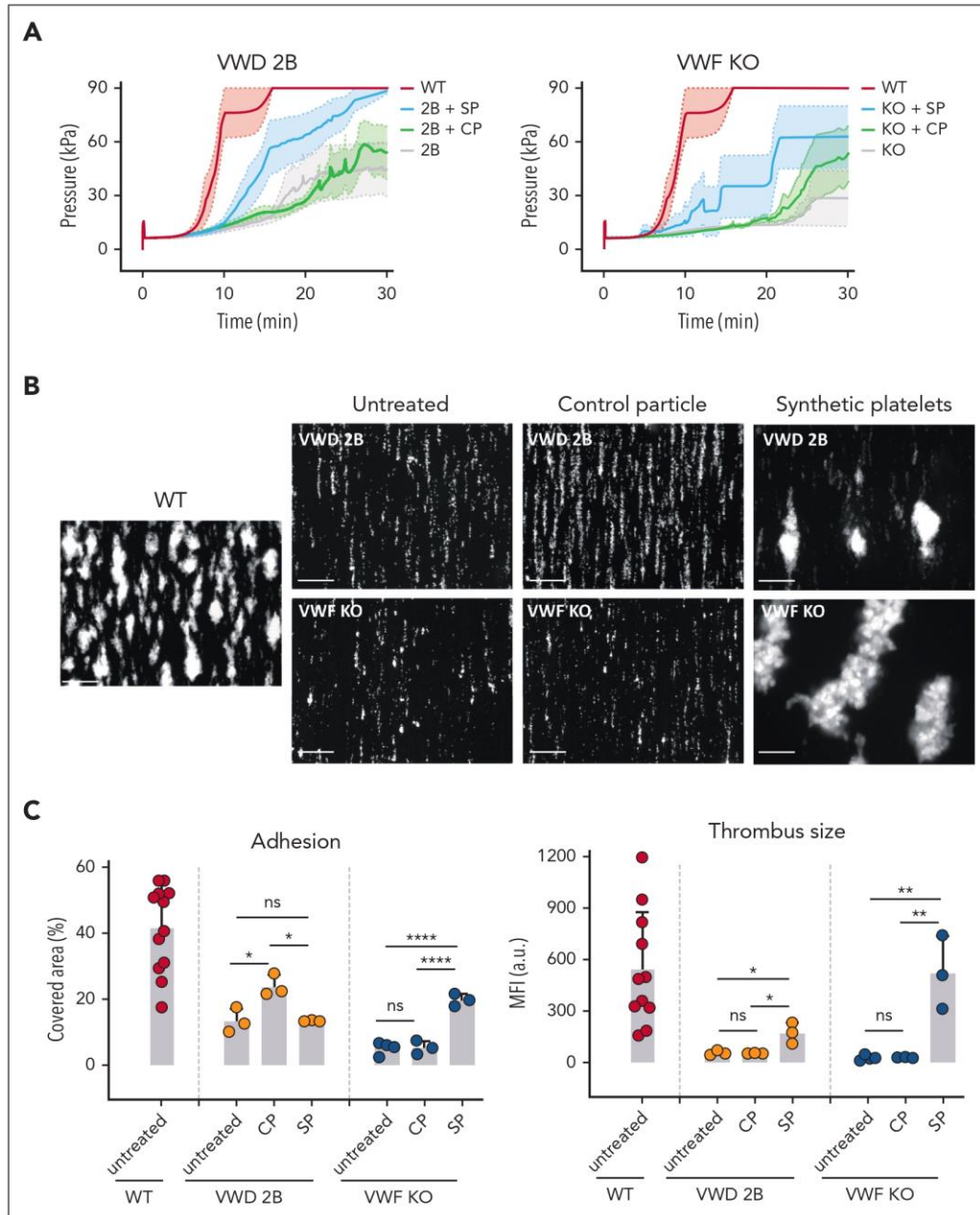


Figure 2. In vitro effect of SP nanoparticles added to VWD murine blood in perfusion assays. (A) SPs or CP were added to VWD-2B blood (left panel) or to VWF-KO blood (right panel) at a ratio of 50 particles per platelet. Particle-supplemented blood or unsupplemented blood (untreated) was perfused over AR chips in the T-TAS Plus system. Graphs represent changes in pressure (a measure for thrombus formation) as a function of time. The colored area represents the standard error of the mean for each condition. Statistical analysis was performed using a one-way ANOVA with Tukey's correction. (B-C) SPs or CP were added to VWD-2B murine blood or to VWF-KO murine blood at a ratio of 50 particles per platelet. Particle-supplemented blood or unsupplemented blood (untreated) was perfused over collagen in a parallel flow chamber at 1500 s^{-1} . untreated representative images of thrombus formation are shown in B while percentage platelet coverage, representing adhesion or mean fluorescence intensity as a marker of thrombus size are represented in C. Results obtained with untreated WT murine blood is shown for comparison. Data are presented as mean \pm SD, $n = 3$. Statistical analysis was performed using a one-way ANOVA with Tukey's correction. * $P \leq .05$; ** $P \leq .01$; **** $P \leq .0001$. a.u., arbitrary units; ns, not significant.

Colocalization of platelets with SP can clearly be seen when both entities were labeled with distinct fluorochromes in thrombi formed using SP-treated VWF-KO blood (supplemental Figure 3).

SP significantly reduced bleeding in VWD mice

We next assessed the bleeding phenotype of VWD-2B and VWF-KO mice treated with SP. As expected, untreated VWD-2B mice lost large amounts of blood compared with WT mice

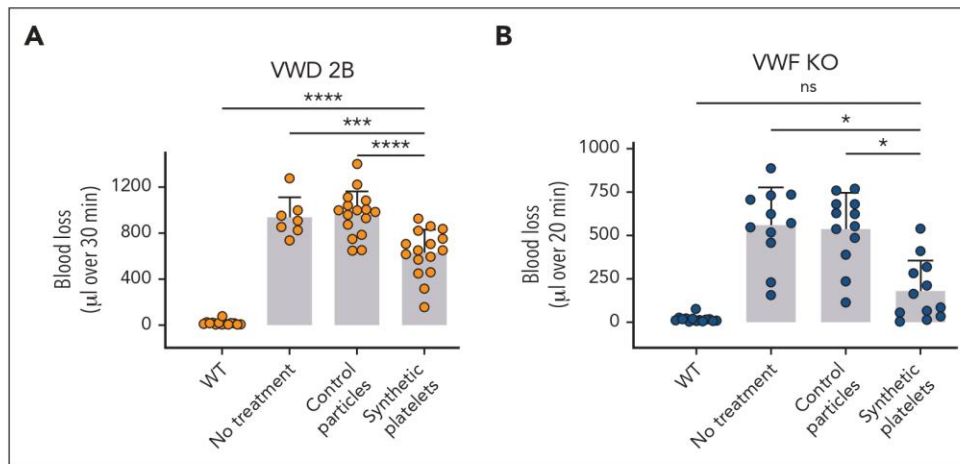


Figure 3. In vivo effect of SP nanoparticles in VWD-2B and VWF-KO murine models. Mice were injected with CP or SP nanoparticles (2 mg/kg) or not injected. Bleeding was measured for 30 minutes (VWD-2B) (A) or 20 minutes (VWF-KO) (B) after amputation of 3 mm of the tail tip. Blood was collected in warm saline and quantified using a hemoglobin calibration curve. Each dot represents an individual mouse. Data are presented as mean \pm SD. Statistical analysis was performed using a one-way ANOVA with Dunnett's correction. * $P \leq .05$; *** $P \leq .001$; **** $P \leq .0001$. ns, not significant.

(938 ± 161 vs 18 ± 17 μL , $P < .0001$; Figure 3A). Treatment with CP did not improve hemostasis in these mice (966 ± 192 vs 938 ± 161 μL , $P = .98$). In contrast, addition of SP significantly reduced blood loss by an average of 35% (631 ± 199 vs 966 ± 192 μL with control particles, $P < .001$ and 631 ± 199 vs 938 ± 161 μL without treatment, $P = .001$). Nevertheless, complete correction was not obtained (631 ± 199 vs 18 ± 17 μL in WT mice; $P < .0001$) (Figure 3A). Of note, SP did not affect the multimeric profile of VWD-2B mice (supplemental Figure 4).

For VWF-KO mice, untreated mice as well as CP treated-mice bled profusely compared with WT mice (561 ± 207 μL and 539 ± 194 μL vs 19 ± 17 μL) (Figure 3B). SP treatment of VWF-KO mice demonstrated an important efficacy in reducing bleeding (183 ± 167 μL vs 561 ± 207 μL in untreated mice, $P = .01$). Strikingly, blood loss after SP treatment was no longer statistically different than blood loss in WT mice (183 ± 167 μL vs 19 ± 17 μL , $P = .15$). SP thus appeared more efficient in VWF-KO mice compared with VWD-2B mice, probably because of the platelet function defect described in the latter model.

Mechanisms underlying hemostatic efficacy of SP in VWD

To investigate whether the 3 different peptides were equally important in the hemostatic efficiency of SP in VWD murine models, we tested different combinations of particles harboring only 1 peptide or combinations of 2 peptides (Figure 4).

In VWD-2B, particles decorated with any of the single peptides were not efficient in reducing blood loss (CBP: 761 ± 287 μL , FMP: 1072 ± 174 μL , and VBP: 856 ± 125 μL vs 966 ± 192 μL with CP, $P = .08$, $.71$, and $.81$ respectively). Second, when using particles decorated with combinations of 2 peptides, only "CBP + VBP" and "CBP + FMP" combinations were as efficient as SP in correcting blood loss (CBP + VBP: 587 ± 255 μL and CBP + FMP: 568 ± 173 μL vs 631 ± 199 μL with SP; $P = .99$ and $.97$ respectively). In contrast, particles decorated with the

"VBP + FMP" combination did not show any efficacy (929 ± 156 μL vs 966 ± 192 μL with CP; $P = .99$) (Figure 4A).

In VWF-KO mice, similar to VWD-2B mice, particles decorated with single peptides were not efficient in reducing blood loss with even a slight increase with FMP (CBP: 636 ± 239 μL ; FMP: 859 ± 161 μL ; VBP: 618 ± 200 μL vs 539 ± 194 μL with CP; $P = .16$, $.0016$, and $.82$ respectively). Surprisingly, the combination of CBP + FMP was less efficient in reducing blood loss than SP (530 ± 100 μL vs 183 ± 167 μL ; $P = .0001$), pointing to an unexpected effect of the VBP (Figure 4B), likely because of the phospholipid binding capacity of this factor-VIII derived peptide. However, particles decorated with VBP only did not show any hemostatic efficacy. Complete statistical analysis is provided in supplemental Table 1.

In conclusion, CBP appears to be the most important peptide in the SP but is not sufficient by itself to support hemostasis in VWD-2B mice whereas all 3 peptides are necessary in VWF-KO mice.

SP colocalizes with platelets and fibrin in the clot observed after tail-clip

Next, we sought to image the clots observed after SP treatment in the tail-clip experiment. Here, we only imaged clots from the treated VWF-KO mice. SP, labeled with Rhodamine B could be seen as colocalizing with platelets and fibrin in the clots formed in VWF-KO mice after SP treatment (Figure 5A). A large clot, occluding the vessel from side to side could clearly be seen in SP-treated VWF-KO mice. Although this experiment is mostly of a qualitative nature, our attempt to quantify these data suggested that both the area and fluorescence intensity of the platelets and fibrin signals were similar to those obtained after imaging of a clot formed in WT mice (Figure 5B).

SP leads to substantial hemostatic clot as visible by scanning electron microscopy

To extend our observation of the SP-induced clot formation in VWF-KO mice, we collected the clot obtained after lateral tail

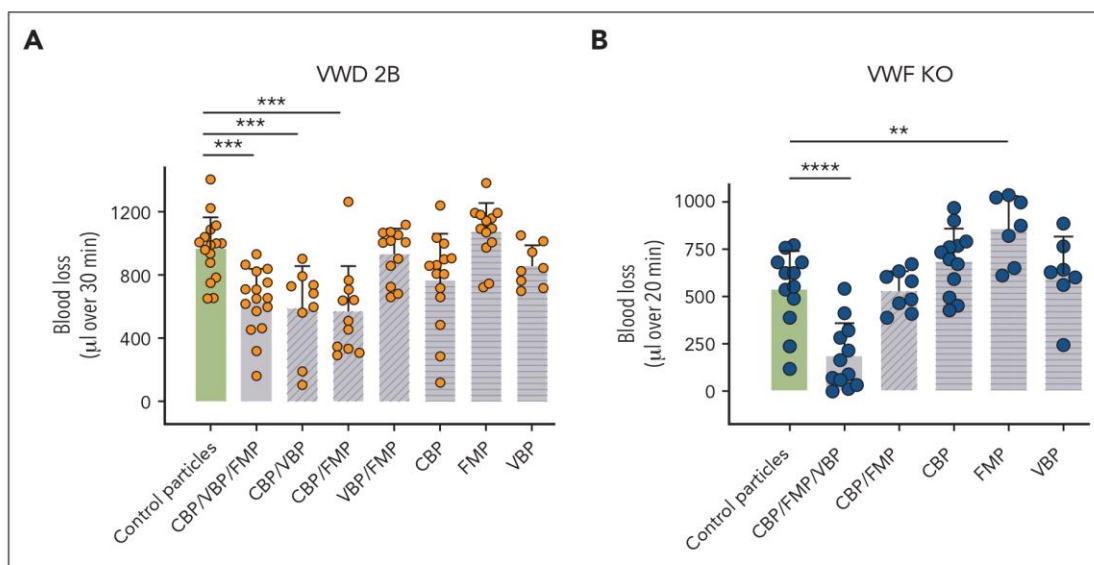


Figure 4. In vivo effect of various peptide-decorated particles in VWD-2B and VWF-KO murine models. Mice were injected with control particles, SP nanoparticles or particles decorated with various combinations of peptides (2 mg/kg). Bleeding was measured for 30 minutes (VWD-2B) (A) or 20 minutes (VWF-KO) (B) after amputation of 3 mm of the tail tip. Blood was collected in warm saline and quantified using a hemoglobin calibration curve. Each dot represents an individual mouse. Data are presented as mean \pm SD. Statistical analysis was performed using a one-way ANOVA with Dunnett's correction. $**P \leq .01$; $***P \leq .001$; $****P \leq .0001$. SP nanoparticles (3 peptides) are represented with the plain gray bar whereas particles decorated with dual peptides appear in diagonally striped bars and single-decorated particles appear in horizontally striped bars.

vein transection in untreated and SP-treated mice. On the upper panels of Figure 5C, the sectioned hair indicates the area where the cut was performed (shown by the black arrows). In the untreated VWF-KO mouse, a thin thrombus could be spotted as covering the scar, thrombus formed of individualized red blood as visible at higher magnification. Upon SP treatment (Figure 5C, right panels), a larger thrombus was visible, covering the entire scar section with red blood cells aggregated together in the clot.

Discussion

Platelet-mimicking nanoparticles are currently under preclinical development to mitigate bleeding in various hemostatic dysfunction settings spanning thrombocytopenia, coagulopathy, and trauma.¹¹⁻¹⁵ However, they have not yet been tested in congenital bleeding disorders linked to platelet and VWF defects. Considering our team's interest in developing tailored therapeutic options for different VWD types/subtypes, we hypothesized that, by circumventing the VWF-GPIIb/IIIa axis, SP could represent an attractive option for VWD type 2B. In vitro, using a BioFlux microfluidic system, we first showed the capacity of SP to rescue human platelet recruitment in thrombocytopenic conditions and in VWF-deficient conditions, serving as a basis for testing their efficacy in our VWD-2B and VWF-KO mouse models. Next, using VWD-2B or VWF-KO murine blood, we confirmed that SP indeed significantly improved thrombus formation in perfusion assays both in a regular parallel plate perfusion chamber (Maastricht flow chamber),²⁶ and in the T-TAS assay.

Building on these in vitro results, and when injected in vivo, SP were able to reduce bleeding in VWD-2B mice and to achieve near-complete correction of hemostasis in VWF-KO mice.

These results raise a number of questions: firstly, regarding why SP are functional in VWF-KO mice because platelets are fully functional in these mice, and second, why SP are more efficient in the VWF-KO than VWD-2B mice? SP have been shown to collaborate with platelets¹⁰⁻¹³ and in the absence of platelet-VWF interaction in VWF-KO mice, we can rationalize that the adhesion of SP to vascular collagen creates a new *landing platform* for native platelets to adhere to. Platelets would therefore be recruited to sites of vascular injury via SP, a hypothesis supported by the colocalization of SP with platelets and fibrin following tail-clip injury. As to why SP display higher efficiency in VWF-KO mice compared to VWD-2B animals, it should be emphasized that the latter model is characterized by thrombocytopenia/thrombocytopeny. Platelet counts in VWD-2B mice are reduced by 50% than VWF-KO.¹⁶ Although this decrease is not very profound, the inability of these VWD-2B platelets to fully activate²⁷ may also explain why less coagulation will take place on their surface, limiting fibrin formation and ultimately, hampering bleeding correction.

To investigate mechanisms by which SP contributed to hemostasis in VWD mice, we tested several types of particles decorated with different peptide combinations. In VWD-2B mice, only particles decorated with combination of "CBP + VBP" and "CBP + FMP" proved as efficient as SP to reduce bleeding, highlighting the pivotal role of collagen in injury site-specific particle anchoring and hemostatic action. However, the CBP alone was not efficient, suggesting that at least, another platelet-mimicking characteristic was necessary for particle efficiency. Nevertheless, restoring full hemostasis in VWD-2B remains difficult because both defects in VWF and in platelets need to be overcome.²⁸ New generations of platelet-inspired nanoparticles are currently under development: platelet-mimicking procoagulants nanoparticles, with a plasmin-triggered exposure of

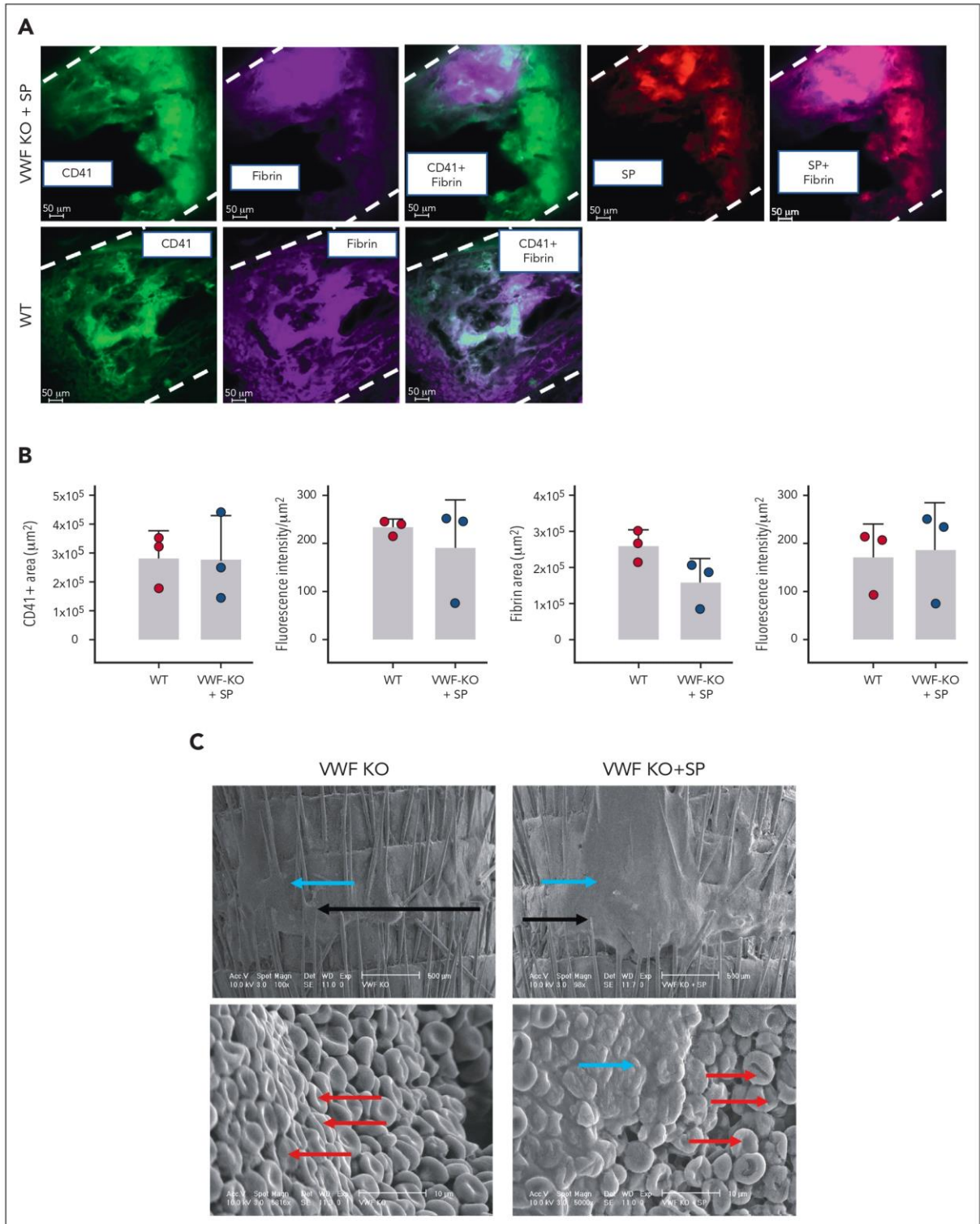


Figure 5. Imaging of the clots obtained after SP treatment of VWF-KO mice. (A) Representative images of the fluorescent staining of clots recovered after amputation of the tail tip of mice with VWF WT and VWF-KO injected with SP (2 mg/kg). Dashes represent the vessel's edges. Rhodamine-labeled SP are visible in red, fibrin/fibrinogen is visible in magenta and CD41-labeled platelets appear in green. (B) Quantification of the platelets (CD41⁺) and fibrin area and fluorescence intensity in WT (n = 3) and VWF-KO mice injected with SP (n = 3). Data are presented as mean ± SD. Statistical analysis was performed using a Mann-Whitney test. (C) Scanning electron microscopy of the clot recovered after tail vein transection in mouse with VWF-KO left untreated and treated with SP. In the upper images, black arrows indicate the transection area recognizable by

phosphatidylserine at the site of injury,¹² or the release of thrombin at the site of injury.²⁹ Increasing site-specific coagulation outputs with such particles might be key to improve their potential use in VWD-2B. It should also be emphasized that our VWD-2B mouse model carries the p.V1316M variant, one of the most severe VWD-2B causing mutation. Milder forms of VWD-2B may potentially be more responsive to SP treatment.

In VWF-KO mice, the result that the combination of 'CBP + FMP' was less efficient than SP to correct the hemostatic defect can appear very surprising at first glance. Indeed, VBP, the missing peptide in these dual-decorated particles, should be of no use in the absence of VWF. However, this VBP is derived from the FVIII C2 domain and binds not only to the VWF D'-D3 region but also to phospholipids.⁸ It seems conceivable therefore that even in the absence of VWF, this peptide contributes to the hemostatic response by reinforcing the interactions between SP and activated platelets. However, particles decorated with the VBP peptide alone have no hemostatic efficiency by themselves. Although theoretically, this peptide could compete with FVIII for VWF binding in the VWD-2B mice, this is unlikely to occur given that its concentration (≤ 500 nM) is lower than the IC50 (6 μ M).³⁰

Imaging of the clots in the presence of SP was carried out only in VWF-KO mice for technical reasons. Indeed, imaging clots of bleeding mice, such as was the case for VWD-2B mice, proved unsuccessful. The clots obtained in VWF-KO mice treated with SP appeared very similar to those obtained in WT mice as visible by fluorescent analysis. The overlap between platelets and fibrin in SP-treated mice suggests that by recruiting platelets, SP contribute not only directly to the formation of the platelet-enriched thrombus but also indirectly to the availability of platelet-exposed procoagulant phospholipids on which coagulation can occur. Scanning electron microscopy confirmed that SP led to a more compact and solid thrombus than those obtained in untreated VWF-KO mice.

So where does such an approach fit as a potential treatment for VWD? Originally, the study was intended to test a new therapeutic for VWD-2B but, although promising, the SP particle design does not appear to be optimally efficient in this VWD subtype. However, this technology has the advantage that it can be further tailored for augmenting coagulation by incorporating additional prohemostatic molecules on the particle surface or in the particle core, mimicking platelet's procoagulant and secretory functions. Therefore, the present study should be seen as a first proof-of-concept that platelet-mimicking particles can be used for patients with VWD-2B. For severe VWD (type 3), SP particles have proven very efficient. Because of their unique characteristics, they can thus be considered as a potential new therapeutic approach for severe VWD. Indeed, their manufacturing process and stability, that is, lyophilizability, no requirement for cold storage and >6 months shelf-life, may render them very attractive compared with VWF concentrates. Furthermore, from a pharmacokinetic point of view, SP have a clear advantage over VWF concentrates. In

mice, 2 hours after injection, only about 10% of VWF can still be detected.³¹ In contrast, 2 hours after injection in mice, only 15% of SPs have been cleared from the circulation,¹³ and recent studies with procoagulant platelet-mimicking particles have reported a half-life of 12 hours.¹² SP thus display a much longer circulatory half-life than VWF. The use of SP could also be considered in patients with severe VWD who have developed alloantibodies, precluding the use of VWF concentrates.

In summary, there is clearly room for such a technology in a VWD setting and our results warrant further investigation of platelet-inspired nanoparticles as a novel strategy for the hemostatic management of VWD.

Acknowledgments

The work was supported by INSERM and by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-21-CE14-0076-01 to C.V.D.). J.R. holds a British Heart Foundation Intermediate Fellowship (FS/IBSRF/20/25039). A.S.G. is supported by NIH R01 HL121212.

Authorship

Contribution: S.R., N.L., J.R., J.S., D.D., T.S., F.A., C.C., O.D.C., P.J.L., and C.V.D. performed experiments and analyzed the data; A.D., E.G., C.P., M.B., and A.S.G. provided essential reagents; J.R., P.J.L., A.S.G., and C.V.D. designed the study; S.R., C.V.D., and A.S.G. wrote the manuscript; and all authors contributed to the final editing of the manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: A.D., E.G., C.P., and M.B. are employees of Haima Therapeutics LLC. A.S.G. is cofounder and chief scientific adviser for Haima Therapeutics. The remaining authors declare no competing financial interests.

ORCID profiles: S.R., 0000-0002-1064-0621; N.L., 0000-0003-0020-5850; J.S., 0000-0003-3282-2976; D.D., 0000-0002-4896-674X; F.A., 0000-0001-6603-2687; C.C., 0000-0002-8271-6795; P.J.L., 0000-0002-7937-3429; A.S.G., 0000-0002-5773-0667; C.V.D., 0000-0001-5152-9156.

Correspondence: Cécile V. Denis, Laboratory for Hemostasis, Inflammation & Thrombosis, INSERM U1176, 80 rue du General Leclerc, 94276 Le Kremlin-Bicêtre Cedex, France; email: cecile.denis@inserm.fr; and Anirban Sen Gupta, Case Western Reserve University, Department of Biomedical Engineering, 10900 Euclid Ave, Cleveland, OH 44106; email: axs262@case.edu.

Footnotes

Submitted 3 November 2022; accepted 6 March 2023; prepublished online on *Blood* First Edition 17 March 2023. <https://doi.org/10.1182/blood.2022018956>.

Data are available upon request from corresponding author Cécile V. Denis (cecile.denis@inserm.fr).

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

Figure 5 (continued) the hair that appear sectioned and the blue arrows point to the clot. In the bottom left image, red arrows show individualized red blood cells. In the bottom right image, blue arrow shows the clot characterized by aggregated red blood cells and red arrows show individualized red blood cells. Two mice per group were imaged and representative images are shown.

REFERENCES

1. Denis CV, Susen S, Lenting PJ. von Willebrand disease: what does the future hold? *Blood*. 2021;137(17):2299-2306.
2. Casari C, Berron E, Lebret M, et al. von Willebrand factor mutation promotes thrombocytopenia by inhibiting integrin α IIb β 3. *J Clin Invest*. 2013;123(12):5071-5081.
3. Federici AB, Mannucci PM, Castaman G, et al. Clinical and molecular predictors of thrombocytopenia and risk of bleeding in patients with von Willebrand disease type 2B: a cohort study of 67 patients. *Blood*. 2009;113(3):526-534.
4. Kauskot A, Poirault-Chassac S, Adam F, et al. LIM kinase/cofilin dysregulation promotes macrothrombocytopenia in severe von Willebrand disease-type 2B. *JCI Insight*. 2016;1(16):e88643.
5. Kruse-Jarres R, Johnsen JM. How I treat type 2B von Willebrand disease. *Blood*. 2018;131(12):1292-1300.
6. Casari C, Favier R, Legendre P, et al. A thrombopoietin receptor agonist to rescue an unusual platelet transfusion-induced reaction in a p.V1316M-associated von Willebrand disease type 2B patient. *Ther Adv Hematol*. 2022;13:20406207221076812.
7. Espitia O, Ternisien C, Agard C, Boisseau P, Denis CV, Fouassier M. Use of a thrombopoietin receptor agonist in von Willebrand disease type 2B (p.V1316M) with severe thrombocytopenia and intracranial hemorrhage. *Platelets*. 2017;28(5):518-520.
8. Haji-Valizadeh H, Modery-Pawlowski CL, Sen Gupta A. A factor VIII-derived peptide enables von Willebrand factor (VWF)-binding of artificial platelet nanoconstructs without interfering with VWF-adhesion of natural platelets. *Nanoscale*. 2014;6(9):4765-4773.
9. Ravikumar M, Modery CL, Wong TL, Dzuricky M, Sen Gupta A. Mimicking adhesive functionalities of blood platelets using ligand-decorated liposomes. *Bioconjug Chem*. 2012;23(6):1266-1275.
10. Ravikumar M, Modery CL, Wong TL, Gupta AS. Peptide-decorated liposomes promote arrest and aggregation of activated platelets under flow on vascular injury relevant protein surfaces in vitro. *Biomacromolecules*. 2012;13(5):1495-1502.
11. Luc NF, Rohner N, Girish A, Didar Singh Sekhon U, Neal MD, Sen Gupta A. Bioinspired artificial platelets: past, present and future. *Platelets*. 2022;33(1):35-47.
12. Sekhon UDS, Swingle K, Girish A, et al. Platelet-mimicking procoagulant nanoparticles augment hemostasis in animal models of bleeding. *Sci Transl Med*. 2022;14(629):eabb8975.
13. Shukla M, Sekhon UDS, Betapudi V, et al. In vitro characterization of SynthoPlate (synthetic platelet) technology and its in vivo evaluation in severely thrombocytopenic mice. *J Thromb Haemost*. 2017;15(2):375-387.
14. Dyer MR, Hickman D, Luc N, et al. Intravenous administration of synthetic platelets (SynthoPlate) in a mouse liver injury model of uncontrolled hemorrhage improves hemostasis. *J Trauma Acute Care Surg*. 2018;84(6):917-923.
15. Hickman DA, Pawlowski CL, Shevitz A, et al. Intravenous synthetic platelet (SynthoPlate) nanoconstructs reduce bleeding and improve 'golden hour' survival in a porcine model of traumatic arterial hemorrhage. *Sci Rep*. 2018;8(1):3118.
16. Adam F, Casari C, Prevost N, et al. A genetically-engineered von Willebrand disease type 2B mouse model displays defects in hemostasis and inflammation. *Sci Rep*. 2016;6:26306.
17. Denis C, Methia N, Frenette PS, et al. A mouse model of severe von Willebrand disease: defects in hemostasis and thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(16):9524-9529.
18. Zhang H. Thin-film hydration followed by extrusion method for liposome preparation. *Methods Mol Biol*. 2017;1522:17-22.
19. Hosokawa K, Ohnishi T, Fukasawa M, et al. A microchip flow-chamber system for quantitative assessment of the platelet thrombus formation process. *Microvasc Res*. 2012;83(2):154-161.
20. Hosokawa K, Ohnishi T, Kondo T, et al. A novel automated microchip flow-chamber system to quantitatively evaluate thrombus formation and antithrombotic agents under blood flow conditions. *J Thromb Haemost*. 2011;9(10):2029-2037.
21. Sueta D, Kaikita K, Okamoto N, et al. A novel quantitative assessment of whole blood thrombogenicity in patients treated with a non-vitamin K oral anticoagulant. *Int J Cardiol*. 2015;197:98-100.
22. Adam F, Kauskot A, Nurden P, et al. Platelet JNK1 is involved in secretion and thrombus formation. *Blood*. 2010;115(20):4083-4092.
23. Ferriere S, Peyron I, Christophe OD, et al. A hemophilia A mouse model for the in vivo assessment of emicizumab function. *Blood*. 2020;136(6):740-748.
24. Johansen PB, Tranholm M, Haaning J, Knudsen T. Development of a tail vein transection bleeding model in fully anaesthetized haemophilia A mice—characterization of two novel FVIII molecules. *Haemophilia*. 2016;22(4):625-631.
25. Takaku Y, Suzuki H, Kawasaki H, et al. A modified 'NanoSuit(R)' preserves wet samples in high vacuum: direct observations on cells and tissues in field-emission scanning electron microscopy. *R Soc Open Sci*. 2017;4(3):160887.
26. Provenzale I, Brouns SLN, van der Meijden PEJ, Swieringa F, Heemskerk JWM. Whole blood based multiparameter assessment of thrombus formation in standard microfluidic devices to proxy in vivo haemostasis and thrombosis. *Micromachines (Basel)*. 2019;10(11):787.
27. Casari C, Paul DS, Susen S, et al. Protein kinase C signaling dysfunction in von Willebrand disease (p.V1316M) type 2B platelets. *Blood Adv*. 2018;2(12):1417-1428.
28. Rayes J, Hollestelle MJ, Legendre P, et al. Mutation and ADAMTS13-dependent modulation of disease severity in a mouse model for von Willebrand disease type 2B. *Blood*. 2010;115(23):4870-4877.
29. Girish A, Jolly K, Alsaadi N, et al. Platelet-inspired intravenous nanomedicine for injury-targeted direct delivery of thrombin to augment hemostasis in coagulopathies. *ACS Nano*. 2022;16(10):16292-16313.
30. Saenko EL, Shima M, Rajalakshmi KJ, Scandella D. A role for the C2 domain of factor VIII in binding to von Willebrand factor. *J Biol Chem*. 1994;269(15):11601-11605.
31. Lenting PJ, Westein E, Terraube V, et al. An experimental model to study the in vivo survival of von Willebrand factor. Basic aspects and application to the R1205H mutation. *J Biol Chem*. 2004;279(13):12102-12109.

© 2023 by The American Society of Hematology

Titre : Vers une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires régissant l'action des thérapies de non remplacement dans l'hémophilie A et comparaison avec le facteur VIII

Mots clés : Hémophilie A, Facteur VIII (FVIII), emicizumab, Fibrine, Structure du caillot

Résumé : L'hémophilie A est une maladie hémorragique liée à un déficit en une protéine plasmatique de la coagulation : le FVIII. Le traitement standard a longtemps consisté en un remplacement du FVIII manquant par un FVIII exogène mais l'apparition d'inhibiteurs contre le FVIII rend les thérapies substitutives inefficaces chez 30 % des patients. Récemment l'anticorps bispécifique emicizumab anti-FIX/anti-FX mimant l'action cofacteur du FVIII est arrivé sur le marché. L'objectif de ma thèse a été d'étudier comment l'emicizumab se compare au FVIII au niveau de ses propriétés moléculaires et fonctionnelles.

Nous avons d'abord analysé le cas d'un patient sous prophylaxie avec emicizumab. Suite à l'apparition d'une hémarthrose après 6 mois de traitement, des anticorps anti-emicizumab ont été identifiés, entraînant une diminution de la concentration plasmatique d'emicizumab sans affecter directement son activité. Une analyse approfondie a permis de révéler le premier cas de patient traité par emicizumab avec des anticorps provoquant une clairance accélérée de l'emicizumab.

Dans une seconde partie, nous nous sommes intéressés à l'impact du FVIII/FVIII-Fc vs emicizumab sur la formation et la stabilisation du caillot ainsi que sur sa structure. Des études *in vitro* limitées par l'absence des composants cellulaires ont été rapportées menant à

des conclusions variables. Nous avons développé un modèle murin de saignement qui a permis de montrer que l'emicizumab altère la cinétique de formation du caillot, pouvant expliquer les saignements observés chez 5% chez des patients traités par emicizumab. L'analyse microscopique de la structure des caillots indique que le FVIII et le FVIII-Fc impactent de manière similaire la structure du caillot, tandis que l'emicizumab, avec son mode d'action unique, induit des différences morphologiques significatives.

Enfin, nous nous sommes intéressés à l'utilisation des modèles de saignements murins dans la détermination de l'équivalence entre les thérapies non-substitutives (emicizumab et anti-TFPI) et le FVIII. En effet, la question centrale liée à l'utilisation de ces thérapies concerne la détermination d'une éventuelle équivalence avec le FVIII. Les données issues des tests d'activités *in vitro* ne permettant pas de répondre à la question, nous nous sommes proposés d'évaluer *in vivo* cette équivalence en utilisant un panel de modèles de saignements murins. Les résultats ont permis de déterminer des équivalences variables selon la sévérité du modèle et nous ont menés à proposer qu'une équivalence absolue était illusoire et qu'il serait plus réaliste de parler d'un intervalle d'équivalence en terme d'activité FVIII.

Title : Towards a better understanding of the molecular mechanisms governing the action of non-replacement therapies in hemophilia A and comparison with factor VIII

Keywords : Hemophilia A, Factor VIII (FVIII), emicizumab, Fibrin, Clot structure

Abstract : Hemophilia A is a bleeding disorder linked to a deficiency in plasma coagulation protein FVIII. For a long time, the standard treatment consisted in replacing the missing FVIII with exogenous FVIII, but the emergence of inhibitors against FVIII has made replacement therapies ineffective in 30% of patients. Recently, the bispecific anti-FIX/anti-FX antibody emicizumab, which mimics the cofactor action of FVIII, was approved. The aim of my thesis was to study how emicizumab compares with FVIII in terms of its molecular and functional properties.

First, we analyzed the case of a patient undergoing prophylaxis with emicizumab. After 6 months of treatment, the patient developed hemarthrosis and anti-emicizumab antibodies were identified, leading to a decrease of emicizumab plasma concentration without directly affecting its activity. Further analysis revealed the first clinical case treated by emicizumab with antibodies causing accelerated clearance of emicizumab.

In a second part, we investigated the impact of FVIII/FVIII-Fc vs emicizumab on clot formation, stabilization and structure. The previously reported *in vitro* studies were limited by the absence of cellular components, therefore leading to contradicting results.

We developed a murine bleeding model which demonstrated that emicizumab alters the kinetics of clot formation, which could explain the bleeding observed in 5% of patients treated with emicizumab. Microscopic analysis of clot structure indicates that FVIII and FVIII-Fc have a similar impact on the clot structure, while emicizumab, with its unique mode of action, induces morphological differences.

Finally, we investigated the potential use of murine bleeding models to determine equivalence between non-factor therapies (emicizumab and anti-TFPI) and FVIII. Indeed, the important question linked to the use of these therapies concerns the determination of possible equivalence with FVIII. As the data from *in vitro* activity tests did not answer this question, we proposed to assess this equivalence *in vivo* using a panel of murine bleeding models. The results showed that equivalence varied according to the severity of the model and led us to propose that absolute equivalence was unrealistic. Indeed, it would be more realistic to talk about an equivalence range in terms of FVIII activity.

