

# Sprawozdanie z Kongresu *International Society on Thrombosis and Haemostasis*

Kioto (Japonia), 23–28 lipca 2011 roku

Magdalena Łętowska

Instytut Hematologii i Transfuzjologii

## Streszczenie wybranych zagadnień

### Nowe rekombinowane białka

#### Rekombinowany czynnik VIII

Powell i wsp. przedstawili wyniki otwartego, wieloosrodkowego badania z eskalacją dawki, w którym 16 pacjentom (wiek > 12. rż., waga min. 40 kg, liczba ED > 160) z leczoną wcześniej ciężką postacią hemofilii A podawano pojedynczą dawkę 25 (n = 6) lub 65 j.m./kg (n = 10) leku Advate, a następnie, tydzień później, taką samą dawkę białka fuzyjnego składającego się z rekombinowanego ludzkiego czynnika VIII (rFVIII, *recombinant human factor VIII*) genetycznie połączonego z fragmentem domeny Fc ludzkiej IgG1, uzyskanego z komórek H293 (rFVIII-Fc, *recombinant factor VIII Fc fusion protein*). Wcześniejsze badania na modelach zwierzęcych wykazały, że okres półtrwania tego białka fuzyjnego (T<sub>1/2</sub>) jest 2-krotnie dłuższy w porównaniu z rFVIII. Badanie to jest pierwszą próbą porównania bezpieczeństwa i farmakokinetyki (PK, *pharmacokinetic*) rFVIII-Fc z Advate. Działanie i bezpieczeństwo oceniano między innymi na podstawie obecności przeciwciał przeciwko rFVIII-Fc, a PK oceniano, badając aktywność osoczową FVIII za pomocą badania czasu częściowej tromboplastyny po aktywacji (aPTT, *activated partial thromboplastin time*) w teście chromogennym. Po podaniu rFVIII-Fc nie obserwowano ani wytworzenia przeciwciał, ani ciężkich objawów ubocznych. U dwóch pacjentów, którzy otrzymali dawkę 65 j.m./kg obserwowano ból głowy i światłowstręt niezwiązany z podaniem rFVIII-Fc.

W porównaniu z Advate, T<sub>1/2</sub> wzrósł o 66% (badanie aPTT — p < 0,0001) i o 68% w teście chromogennym (p < 0,0001) oraz wynosił 10,47 godzin dla Advate i 17,4 godziny dla rFVIII-Fc. W porównaniu z Advate, autorzy obserwowali zmniejszony klirens osoczowy rFVIII-Fc — 36% w teście aPTT i 42% w teście chromogennym — który wynosił 3,34 ml/h/kg dla Advate i 2,14 ml/h/kg dla rFVIII-Fc. W przypadku Advate i rFVIII-Fc obserwowano zależny od dawki szczyt stężenia i podobny odzysk. We

wnioskach autorzy podkreślili 1,7 raza dłuższy czas półtrwania rFVIII-Fc w porównaniu z Advate, dzięki któremu w przyszłości można by zmniejszyć częstość podawania koncentratu czynnika VIII. Te wyniki otwierają także drogę do dalszych badań klinicznych nad rFVIII-Fc w leczeniu substytucyjnym pacjentów z ciężką hemofilią A.

Powell J. i wsp. O-TU-073. Pharmacokinetics and safety of recombinant factor VIII Fc fusion protein (rFVIII-Fc) in a phase 1/2a trial in previously treated patients (PTPs) with severe hemophilia A

W przeprowadzonych badaniach, BAY 94-9027, rekombinowany czynnik VIII, pozbawiony domeny B, w którym przyłączono do jednego z aminokwasów pojedynczy łańcuch glikolu polietylenowego (PEG, *polyethyleneglycol*) wykazuje przedłużony czas działania, w porównaniu z niepegylowaną cząsteczką. Murphy i wsp. przedstawili wyniki badania oceniającego, czy pegylacja rFVIII wpływa na prezentację antygeny przez komórki dendrytyczne lub aktywację limfocytów T specyficznych dla FVIII. BAY 94-9027 inkubowano z mieloidalnymi komórkami dendrytycznymi (mDCs, *myeloid dendritic cell*) przez 2 h, a następnie mierzono wiązanie za pomocą cytometrii przepływowej i metody immunosorpcji koniugowanych enzymów (ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*). Wiązanie BAY 9-9027 przez mDCs było statystycznie znacznie niższe (o ponad 40%, p < 0,01) w porównaniu z wiązaniem z rFVIII i czynnikiem VIII pozbawionym domeny B (BDD, *B-domain deleted*). To zmniejszone wiązanie prowadziło także do zmniejszonej odpowiedzi limfocytów T na FVIII. Inkubowano mDCs związane z różnymi ilościami cząsteczek BAY 94-9027, rFVIII lub BDD ze specyficznymi dla FVIII limfocytami T, pochodzącymi z klonów BO1-4 i BO11-17 uzyskanych od osobników z ciężką postacią hemofilii A. W otrzymanych hodowlach

oznaczano wbudowanie 3H-tymidyny i produkcję interferonu  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). W porównaniu z klonami hodowanymi z rFVIII i BDD stwierdzono statystycznie znamienne zmniejszenie proliferacji klonów limfocytów T (> 88%) i produkcję IFN- $\gamma$  (> 85%), gdy do hodowli dodawano BAY 94-9027. Badania te potwierdziły wcześniejsze obserwacje, które wykazały, że BAY 94-9027 cechuje istotnie mniejsza immunogenność u szczurów, królików i myszy z hemofilią A, w porównaniu z niepegylowanym rFVIII. W celu potwierdzenia tych obserwacji konieczne jest przeprowadzenie w dalszym etapie badań klinicznych u osób z hemofilią A.

Murphy J.E. i wsp. O-TH-015. Pegylation of FVIII results in reduced uptake by human dendritic cells and a significant reduction in human FVIII-specific T-cell response *in vitro*

Mei i wsp. (Blood 2010; 116, 2: 270–279) wykazali na modelu zwierzęcym, że pegylacja cząsteczki czynnika VIII powoduje wydłużenie czasu półtrwania ( $T_{1/2}$ ) w krążeniu i zwiększa właściwości farmakodynamiczne. Chociaż analiza Biacore wykazała, że pegylowany czynnik VIII (FVIII) zachowuje powinowactwo do czynnika von Willebranda (vWF, *von Willebrand factor*), do końca nie było wiadomo, czy obecność vWF jest niezbędna do wydłużenia  $T_{1/2}$  w badaniach *in vivo*. Aby ocenić rolę vWF w katabolizmie pegylowanego FVIII *in vivo*, Murphy i wsp. otrzymali metodami inżynierii genetycznej cząsteczkę FVIII pozbawioną zdolności wiązania vWF (F8X) poprzez usunięcie regionu wiążącego vWF z domeny a3 BDD. Następnie połączyli F8X z PEG za pomocą reszt cysteinowych. Właściwości biologiczne F8X oceniali *in vitro* oraz *in vivo*. Aktywność oczyszczonej cząsteczki F8X, oceniana w teście chromogennym i zdolność generacji trombin były takie jak BDD. Analiza Biacore wykazała, że ani F8X, ani pegylowany F8X nie wykazały *in vitro* zdolności wiązania vWF. Badania farmakokinetyki u myszy z hemofilią A wykazały, że  $T_{1/2}$  F8X był znacznie krótszy w porównaniu z BDD (0,6 h *v.* 6 h) i był podobny do  $T_{1/2}$  BDD u myszy z VWD (0,3 h). Po podaniu myszom z hemofilią A pegylowanego F8X stwierdzono także krótszy czas  $T_{1/2}$  w porównaniu z pegylowanym-FVIII (7,7 h *v.* 14,3 h) i u męskich osobników szczurów ( $2 \pm 0,3$  h *v.*  $6 \pm 0,5$  h). We wnioskach autorzy stwierdzili, że: 1) wiązanie z vWF powoduje wydłużenie  $T_{1/2}$  pegylowanego BDD; 2) usuwanie z krążenia pegylowanego FVIII będącego w kompleksie z vWF nie wydaje się najważniejszą przyczyną skrócenia czasu półtrwania czynnika VIII o wydłużonym okresie działania.

Murphy J.E. i wsp. P-TH-447. vWF contributes to longer circulating half-life ( $T_{1/2}$ ) of pegylated FVIII *in vivo*

Haanning i wsp. przedstawili badania nad częstością występowania przeciwciał neutralizujących (nADA, *neutralizing anti-drug antibody*) i wiążących (bADA, *bin-*

*ding anti-drug antibody*) po przetoczeniach ludzkiego, rekombinowanego pegylowanego czynnika VIII — BAY 94-9027. Obecność bADA i nADA badano u myszy z hemofilią A, u zdrowych szczurów i królików. Myszy z hemofilią A otrzymywały BAY 94-9027 raz w tygodniu przez 5 tygodni. Niepegylowany FVIII podawano im w podobny sposób i w takiej samej dawce. Zdrowe szczury i króliki otrzymywały wstrzyknięcia dożylnie BAY 94-9027 lub rFVIII co 2. dzień przez 2 tygodnie. Miano nADA definiowano jako 50-procentowe zneutralizowanie 1  $\mu\text{mL}$  rFVIII. Zgodnie z oczekiwaniami, we wszystkich 3 grupach badanych zwierząt pojawiły się przeciwciała przeciw BAY 94-9027 lub rFVIII. ADA stwierdzono u 47% myszy z hemofilią A leczonych BAY 94-9027, z czego u 8 (47% wszystkich zwierząt z przeciwciałami lub 22% wszystkich myszy leczonych BAY 94-9027) przeciwciała wykazywały zdolności neutralizujące. Obecność bADA stwierdzono u 83% myszy z hemofilią A leczonych rVIII, z czego u 18 (90% wszystkich zwierząt z przeciwciałami lub 75% wszystkich zwierząt leczonych rVIII) przeciwciała wykazywały zdolności neutralizujące. Podobne wyniki uzyskano w badaniach przeprowadzonych na pozostałych modelach zwierzęcych. We wnioskach autorzy stwierdzili, że u myszy z hemofilią A, zdrowych szczurów i królików BAY 94-9027 jest statystycznie znamienne mniej immunogenne niż rVIII.

Haaning J. i wsp. P-TU-202. Preclinical models show reduced immunogenicity of pegylated recombinant human FVIII relative to unmodified FVIII

Ovlsen i wsp. opisali efekt działania na modelu zwierzęcym (u myszy z hemofilią A z krwawieniami do stawów) 40K glikopegylowanego rFVIII białka (N8-GP, *rFVIII glycopegylated*) w porównaniu z Advate. W tym modelu doświadczalnym krwawienie wywoływano poprzez wprowadzenie do stawu kolanowego myszy igły 30 G w ustalonym czasie (5 minut lub 24, 36, 48, 60, 72 i 88 h) po podaniu 280  $\mu\text{mL}/\text{kg}$  N8-GP. Działanie N8-GP u tej grupy myszy oceniano, porównując z grupą myszy, którym profilaktycznie podawano Advate w dawce 280  $\mu\text{mL}/\text{kg}$ , oraz z grupą myszy bez hemofilii i z hemofilią A, które nie były leczone żadnym lekiem. Dwadzieścia cztery godziny po urazie u myszy oceniano nasilenie krwawienia na podstawie *visual bleeding score* (VBS). Następnie oceniano zmiany średnicy stawu kolanowego. W wyniku przeprowadzonych eksperymentów okazało się, że profilaktyczne podanie N8-GP zapobiegło krwawieniu do stawu u większości myszy z hemofilią A do 72 godzin po leczeniu i u 50% myszy 88 godzin po leczeniu. Nie obserwowano różnic w VBS w grupie myszy z prawidłowym układem krzepnięcia w porównaniu z grupą myszy leczonych N8-GP do 88 godzin poprzedzających indukowane krwawienie do stawu. Natomiast podawanie Advate zapobiegało krwawieniu tylko do 24 godzin. Poza tym, u myszy leczonych N8-GP stwierdzono statystycznie zna-

Tabela 1. Wyniki badań farmakokinetycznych

|              | N9-GP | rIX  | Osoczopochodny IX |
|--------------|-------|------|-------------------|
| T1/2 [h]     | 92,7  | 19,3 | 17,8              |
| AUC [ml/kg]  | 71,3  | 7,15 | 9,1               |
| CL [ml/h/kg] | 0,7   | 6,99 | 5,48              |

T1/2 — okres półtrwania; AUC (area under the curve) — pole pod krzywą stężeń, CL (clearance) — klirens

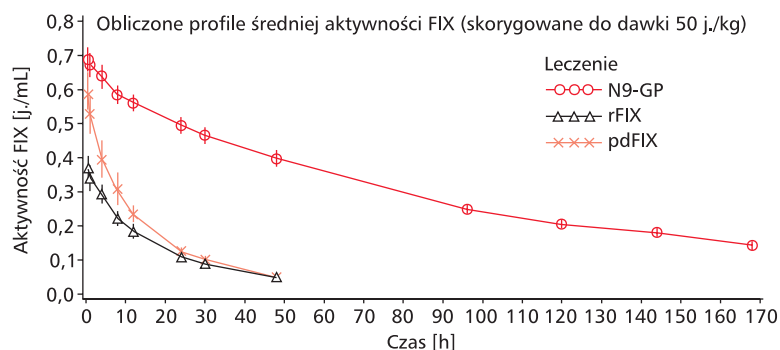
mienne zmniejszenie VBS do 72 godzin w porównaniu z grupą myszy, które nie były leczone; w grupie myszy leczonych Advate efekt ten obserwowano tylko do 24 godzin. We wnioskach autorzy podkreślili znacząco dłuższy czas działania N8-GP w porównaniu z Advate.

Ovlisen K. i wsp. P-MO-238. Prolonged haemostatic effect of N8-GP on joint bleeds in haemophilia A mice

### Rekombinowany czynnik IX

Negrier i wsp. przedstawili wyniki wielośrodkowego, międzynarodowego, otwartego badania ze zwiększaniem dawek, w którym oceniano bezpieczeństwo i farmakokinetykę wzrastających dawek rekombinowanego glikopegylowanego czynnika IX (N9-GP, *rFIX glycopegylated*) u pacjentów z hemofilią B bez cech krwawienia. Grupę badaną stanowiło 20 pacjentów z hemofilią B z aktywnością czynnika IX mniejszą lub równą 2%, w wieku 18–65 lat. Końcowej ocenie poddano 15 pacjentów. Stosowano dawkę eskalacyjną (25, 50, 100  $\mu\text{m}/\text{kg}$ ). U pacjentów wystąpiła 1 ciężka reakcja alergiczna, 10 średnich/lekkich objawów ubocznych (3 związane z podaniem N9-GP). U żadnego pacjenta nie wykryto inhibitora, nie stwierdzono także istotnych zmian w wynikach badań laboratoryjnych. Wyniki badań farmakokinetycznych przedstawiono w tabeli 1 i na rycinie 1.

Negrier C. i wsp. O-TU-074. Safety and pharmacokinetic properties of glycopegylated recombinant factor IX: a first human dose trial in patients with hemophilia B



Rycina 1. Farmakokinetyka N9-GP w porównaniu z FIX i osoczopochodnym FIX (pdFIX)

### Rekombinowany czynnik VIIa

Sim i wsp. przedstawili wyniki badań przeprowadzonych na modelu zwierzęcym z zastosowaniem nowego analogu rekombinowanego czynnika VIIa — BAY 86-6150. U królików wywoływano nabytą hemofilię A poprzez podanie przeciwciał przeciwko czynnikowi VIII. Następnie, w pierwszym eksperymencie, doświadczalnie wywoływano krwawienie i królikom podawano BAY 86-6150 w dawce 0,15  $\text{mg}/\text{kg}$  lub większej. W ciągu 3 minut po uszkodzeniu obserwowano statystycznie znamienne zmniejszenie krwawienia ( $p < 0,05$ ). W celu wywołania takiego samego efektu konieczne było podanie 4-krotnie większej dawki (0,6  $\text{mg}/\text{kg}$ ) aktywowanego eptacogu  $\alpha$ . W drugim eksperymencie badano zdolność tworzenia skrzepu po podaniu BAY 86-6150 (0,1, 0,3 i 1  $\text{mg}/\text{kg}$ ) i takich samych dawek aktywowanego eptacogu  $\alpha$ . Nie stwierdzono różnic w ocenianych parametrach (PT, aPTT, TAT, FDP, AT-III i fibrynogen) ani w wielkości skrzepu. We wnioskach autorzy podkreślili 4 razy większą siłę działania BAY 86-6150 bez zwiększenia działania trombotycznego w porównaniu z aktywowanym eptacogiem  $\alpha$ .

Sim D.S. BAY 86-6150. A novel recombinant factor VIIa a significantly higher therapeutic index than eptacog  $\alpha$  (activated) in rabbit bleeding and thrombosis models

Autorzy z Naukowego Centrum Hematologii w Moskwie przedstawili wyniki przeprowadzonego metodą ślepej próby, krzyżowego, randomizowanego badania, w którym porównali działanie 2 koncentratów rekombinowanych czynników VIIa (rVIIa): NovoSeven (N) (NovoNordisk, Dania) i Koagil VII (K) (Masterclone, Rosja) u pacjentów z hemofilią A i inhibitorem. Badaną grupę stanowiło 10 pacjentów bez epizodów krwawień w chwili włączenia do badania. Otrzymywali oni rFVIIa w dawce 90  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (NovoSeven albo Koagil). Po 3-dniowym okresie wypłukania otrzymywali 90  $\mu\text{g}/\text{kg}$  drugiego leku rFVIIa (albo NovoSeven albo Koagil). Przed podaniem rFVIIa oraz 15, 30, 60, 120 minut, 6, 9, 24 i 48 godzin po podaniu leku badano następujące parametry: aPTT, PT, aktywność w osoczu czynnika VII, obecność i miano inhibitora do FVIII i FIX,

Tabela 2. Parametry hemostazy po podaniu 90 mcg/rFVIIa

|                  | rFVIIa | Przed     | Po           |              |             |           |
|------------------|--------|-----------|--------------|--------------|-------------|-----------|
|                  |        |           | 15 min       | 1 h          | 2 h         | 24 h      |
| FVII, %          | K      | 97 ± 19   | 3642 ± 1377* | 2160 ± 505*  | 1511 ± 516* | 130 ± 38  |
|                  | N      | 93 ± 22   | 3283 ± 787*  | 218 ± 13*    | 1421 ± 313* | 105 ± 52  |
| PT, s            | K      | 11 ± 0.7  | 7.3 ± 0.3*   | 6.5 ± 2.5*   | 7.8 ± 0.6*  | 11 ± 0.7  |
|                  | N      | 10 ± 3.7  | 6.5 ± 2.5*   | 6.6 ± 2.5*   | 6.8 ± 2.6*  | 10 ± 3.8  |
| R, min           | K      | UD        | 27 ± 9*      | 19.8 ± 8.3** | 33.8 ± 20*  | UD        |
|                  | N      | UD        | 26 ± 21*     | 33 ± 7.8*    | 29.4 ± 7*   | UD        |
| ETP nM<br>90 min | K      | 648 ± 165 | 746 ± 202*   | 753 ± 117*   | 734 ± 156   | 697 ± 126 |
|                  | N      | 658 ± 149 | 746 ± 149*   | 772 ± 127*   | 738 ± 150*  | 669 ± 132 |

UD — niezdefiniowany; \*p < 0,05 w porównaniu z wartością przed podaniem rVIIa; \*\*p < 0,05 — pomiędzy N & K; K — rFVIIa Koagil VII (Masterclone, Rosja); N — rFVIIa NovoSeven, Dania; PT (*prothrombin time*) — czas protrombinowy; R — TEG (*thromboelastography*) — tromboelastografia; ETP (*endogenous thrombin potential*) — endogenna zdolność tworzenia trombiny

wykonano badanie tromboelastometryczne (ocena R) oraz ETP (*endogenous thrombin potential* — endogenna zdolność tworzenia trombiny). U wszystkich pacjentów autorzy stwierdzili obecność inhibitora do FVIII (5–463 j B), przedłużenie aPTT (70–170 s), który nie ulegał korekcji po podaniu rFVIIa. Wstrzyknięcia obydwu leków powodowało wzrost aktywności FVII w osoczu, skrócenie PT i R, wzrost ETP (tab. 2). Efekt ten utrzymywał się przez 2 godziny. We wnioskach autorzy stwierdzili, że obydwie leki wywoływały podobne działanie w badanej grupie pacjentów.

Galstyan G.M. P-TU-514. Comparison of the efficacy of two recombinant factor VIIa agents

### Rekombinowany czynnik von Willebranda

Mannucci przedstawił wyniki wielośrodowego badania fazy 1. dotyczącego bezpieczeństwa, tolerancji i farmakokinetyki nowego rekombinowanego czynnika von Willebranda (rhvWF-PFM), pozbawionego białek osocza. Każdemu z 32 pacjentów z typem 3. i typem 1. choroby von Willebranda (VWD, *von Willebranda disease*) o ciężkim przebiegu, podawano w sposób eskalacyjny jedną z 4 dawek rhvWF-PFM: 2, 7,5, 20 i 50 jm. vWF:RCo/kg. Pacjenci dobrze tolerowali lek, nie stwierdzono powikłań zakrzepowozatorowych, nie obserwowano wystąpienia inhibitora ani innych ciężkich niepożądanych zdarzeń. Farmakokinetykę leku oceniano po podawaniu krzyżowym następujących kombinacji leków: 50 jm. vWF:RCo/kg rhvWF-PFM i 38,5 jm. rhFVIII/kg oraz pdVWF/pdFVIII (50 jm. vWF:RCo/kg i 21–25 jm. FVIII/kg). Po podaniu rhvWF/rhFVIII obserwowano wyraźniejszy drugi wzrost aktywności FVIII w porównaniu ze stosowaniem pdvWF/pdFVIII, który nie był wyłącznie związany z różnicą stosunku rhvWF:FVIII w dawkach wstępnych leków (1,3:1 vWF/FVIII v. około 2:1 pdvWF/pdFVIII). Parametry farmakokinetyczne rhvWF-PFM i pdvWF:RCo były porówny-

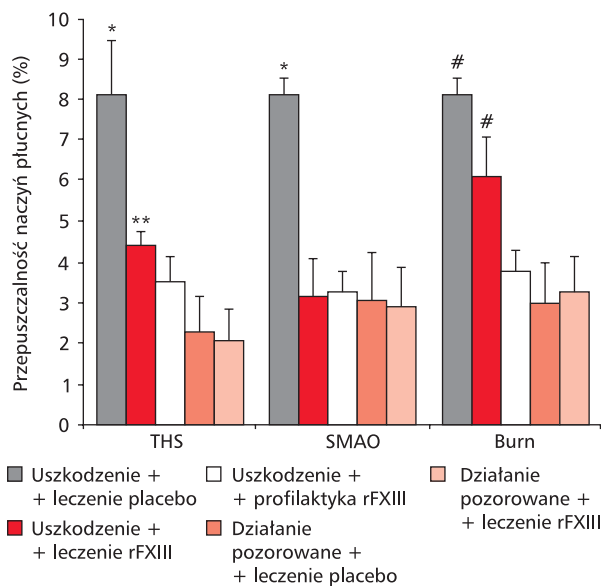
walne. Potwierdzono *in vivo* zdolność endogennego ADAMTS13 (*a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13*) do cięcia wielocząsteczkowych multimerów rhvWF-PFM. Stwierdzane uprzednio przeciwciała (nieneutralizujące) miały wpływ na farmakokinetykę obu leków. We wnioskach autorzy podkreślili bezpieczeństwo i dobrą tolerancję przez pacjentów rhvWF-PFM, farmakokinetycznie porównywalnego z osoczo pochodnym vWF, charakteryzującego się także lepszymi właściwościami stabilizacji FVIII. Wyniki tych badań potwierdzają koncepcję podawania samego rhvWF-PFM, po osiągnięciu poziomu terapeutycznego FVIII.

Mannucci P.M. i wsp. O-TU-086. Recombinant human von Willebrand factor plasma free manufactured: first-in-human study evaluating pharmacokinetics, demonstrating safety and tolerability in severe VWD

### Rekombinowany czynnik XIII

Naukowcy z Uniwersytetu Medycznego New Jersey i firmy NovoNordisk opisali 3 eksperymenty przeprowadzone na modelach zwierzęcych, w których oceniali zdolność rFXIII do ograniczenia objawów uszkodzeń wielonarządowych wywołanych: 90-minutowym kontrolowanym wstrząsem spowodowanym krwotokiem pourazowym (THS, *trauma-hemorrhagic shock*); 45-minutową okluzją górnej tętnicy krezkowej górnej (SMAO, *superior mesenteric artery occlusion*); 10+5 sekund oparzeniem wrzątkiem i odpowiednimi działaniami pozorowanymi. Szczerom wstrzykiwano rFXIII (1 mg/kg) lub placebo natychmiast po pojawieniu się krytycznych objawów (grupa — podawanie lecznicze) lub 24 h przed wystąpieniem objawów krytycznych z powtórzeniem dawki natychmiast po ich wystąpieniu (grupa — podawanie profilaktyczne). Parametry końcowe, takie jak: ocena histologiczna jelita,





\* $p < 0.05$  v. wszystkie pozostałe grupy; \*\* $p < 0.05$  v. działanie pozorowane; # $p < 0.05$  v. rFXIII profilaktyka i działanie pozorowane

**Rycina 2.** Przepuszczalność naczyń płucnych w prowadzonych eksperymentach

przepuszczalność naczyń płucnych, przepływ krwi przez wątrobę i mięśnie, badano 3 godziny po wystąpieniu objawów krytycznych/działania pozorowanego. Autorzy stwierdzili, że nasilenie uszkodzenia śluzówki jelita i przepuszczalność naczyń płucnych po THS lub SMAO były statystycznie znacznie mniejsze, gdy zwierzętom podawano rFXIII (lecniczo lub profilaktycznie) w porównaniu z grupą zwierząt otrzymujących placebo (ryc. 2). W obu grupach zwierząt, w których stosowano rFXIII obserwowano także większy przepływ krwi w wątrobie i mięśniach po THS lub SMAO w porównaniu z grupą otrzymującą placebo. W eksperymencie, w którym wywołano uszkodzenia wielonarządowe na skutek oparzenia zaobserwowano nie zmienioną przepuszczalność naczyń płucnych i przepływ krwi w mięśniach, wówczas gdy rFXIII podawano profilaktycznie. We wnioskach autorzy stwierdzili, że rFXIII zmniejsza uszkodzenia wielonarządowe spowodowane eksperymentalnym wstrząsem krwotocznym pourazowym i okluzją górnej tętnicy kręzkowej. Natomiast efekt ten jest ograniczony w przypadku zmian następujących po oparzeniu.

Zaets S. i wsp. P-MO-239. Experimental use of recombinant factor XIII (rFXIII) in critical conditions: comparison of effectiveness in different animal models

### Rekombinowane białko ADAMTS13

Schiviz i wsp. przedstawili wyniki badań przedklinicznych nad stosowaniem rekombinowanego białka ADAMTS13 u myszy z zespołem TTP (*thrombotic throm-*

*bocytopenic purpura*, plamica zakrzepowa małopłytkowa) podobnym. Zespół ten naukowcy wywoływali poprzez przetaczanie dużych dawek rvWF zawierającego wielkoząsteczkowe multimery vWF.

- Oceniano profilaktyczne działanie leku. Mysiom (B6.129-ADAMTS13tm1Dgi) wstrzykiwano pojedyncze dawki rADAMTS13, (średnio: 1–200 FRETU/kg) przed podaniem rvWF. Grupie kontrolnej przetaczano osocze świeżo mrożone (FFP, *fresh frozen plasma*) w dawkach 1 i 5 mL/kg odpowiadających dawkom: 1 i 5 FRETU/kg ADAMTS13.
- W celu oceny skuteczności dawki leczniczej myszy otrzymywały 200 FRETU/kg rADAMTS13 w okresie 15–180 min po wstrzyknięciu rvWF. Jako kontrolę ujemną stosowano bufor. Skuteczność oceniano na podstawie zahamowania: spadku liczby płytek i wzrostu dyhydrogenazy mleczanowej (LDH, *lactate dehydrogenase*). Śmiertelność w grupie stanowiącej negatywną kontrolę wynosiła 100%. U wszystkich zwierząt, którym przetoczono rvWF zawierający wielkoząsteczkowe multimery vWF stwierdzono ciężką małopłytkowość, wzrost LDH, schistocytosę i uszkodzenie narządów. Profilaktyczne stosowanie ADAMTS13 zapobiegło wzrostowi LDH ( $p < 0,0001$ ) oraz w zależności od dawki, zapobiegło wystąpieniu małopłytkowości ( $p < 0,0003$ ), schistocytosy i uszkodzeniu narządów w porównaniu z grupą myszy otrzymujących bufor zamiast leku. Efekt działania rADAMTS13 przy podawaniu leczniczym był zależny od czasu, w którym podano lek. Autorzy podkreślili we wnioskach skuteczność działania rADAMTS13 na modelu zwierzęcym oraz stwierdzili podobną, a nawet nieznacznie lepszą skuteczność działania rADAMTS13 w porównaniu z FFP.

Schiviz A. i wsp. O-MO-046. Preclinical efficacy testing of BAXTER'S recombinant ADAMTS13 in a mouse model of TTP

### Hamowanie działania TFPI

Obecnie trwają prace nad białkami, które mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu hemofilii dzięki mechanizmowi hamowania inhibitora drogi krzepnięcia zależnej od czynnika tkankowego (TFPI, *tissue factor pathway inhibitor*). Gorczyca i wsp. przeprowadzili doświadczenia *ex vivo*, badając związek pomiędzy hamowaniem TFPI a dawką aptameru ARC19499 (BAX499), potencjalnie specyficznego inhibitora TFPI. Próbkę krwi i osocza pobierano od pacjentów z wrodzoną hemofilią A ( $n = 33$ ) i B ( $n = 6$ ), nabytą hemofilią A ( $n = 1$ ) i od zdrowych mężczyzn stanowiących grupę kontrolną ( $n = 27$ ). Formowanie skrzepu oceniano przy użyciu tromboelastometrii (TEG), zaś tworzenie trombiny za pomocą automatycznej trombografii (CAT, *calibrated automated thrombogram*). Aktywność FVIII w próbkach pacjentów z hemofilią korelowała z wynikami uzyskanymi w trombografii i TEG. Pomiar po-

ziomu aktywności czynnika VIII u chorych na hemofilię korelowały z parametrami uzyskanymi w badaniu CAT oraz pomiarami czasu krzepnięcia uzyskanymi metodą tromboelastometrii (ROTEM, *rotation thromboelastometry*). W obu testach BAX499 wykazywał efekt prohemostatyczny zależny od stężenia. Skuteczne stężenia BAX499 zaczynały się od 2nM, największy efekt osiągano przy stężeniu powyżej 60 nM. BAX499 przywracał prawidłowe krzepnięcie w próbkach z przeciwciałami anti-FVIII (model symulujący nabytą hemofilię). W podsumowaniu autorzy stwierdzili, że BAX499 skutecznie *ex vivo* wzmacnia proces krzepnięcia u pacjentów z wrodzoną lub nabytą hemofilią.

Gorczyca M. i wsp. O-TU-028. Inhibition of tissue factor inhibitor by ARC19499 (BAX499) improves *ex vivo* clotting in hemophilia patients

## Inne doniesienia

Bidlingmaier i wsp. przedstawili dane dotyczące rozpoznawania łagodnej i umiarkowanej hemofilii A w ośrodku pediatrycznym w Monachium. W latach 1985–2008 u 35 pacjentów rozpoznano łagodną, a u 7 pacjentów umiarkowaną postać hemofilii A. Dane dotyczące wszystkich 35 pacjentów z łagodną postacią hemofilii A oraz 7 z postacią umiarkowaną, porównano retrospektywnie z danymi 46 pacjentów z ciężką postacią hemofilii w odpowiednich grupach wiekowych (2–24 lata, mediana 13). Łagodną postacią hemofilii A rozpoznawano później (średnio 46,3 miesiąca i 14,1 miesiąca, jeśli hemofilię A wcześniej rozpoznawano u członków rodziny) niż postacią umiarkowaną (16,9/8,7) bądź ciężką (11,7/3,7). Rozpoznanie postawiono po wystąpieniu krwawienia u: 43% (łagodna postać hemofilii A), 57% (umiarkowana postać hemofilii A) i 54% (ciężka postać hemofilii A), natomiast w grupie z hemofilią A w wywiadzie rodzinnym, odpowiednio — 31%, 43% i 39%. Niezależnie od dodatniego wywiadu rodzinnego, u 18% pacjentów z łagodną, 14% z umiarkowaną i 9% z ciężką postacią hemofilii A, rozpoznanie postawiono dopiero po wystąpieniu krwawienia. Mutacje wykryto u 33% pacjentów z łagodną, 86 z umiarkowaną i 96% z ciężką postacią hemofilii A. Pierwszy epizod krwawienia u pacjentów z postacią łagodną pojawił się pomiędzy 1. a 181. miesiącem życia (mediana: 46,3 mies.), u pacjentów z postacią umiarkowaną pomiędzy 3. a 29. (mediana: 16,9 mies.) i pomiędzy 1. a 54. (mediana: 11,7 mies.) u pacjentów z ciężką postacią hemofilii A. U chorych z łagodną postacią hemofilii A leczenie po wystąpieniu krwawienia rozpoczęto później (2,6 dnia) niż u chorych z postacią ciężką (1,4 dnia). Wylewy do stawów obserwowano u 40% pacjentów z łagodną, 71% z umiarkowaną i 91% z ciężką postacią hemofilii A, a z powodu artropatii cierpiało 6% pacjentów z łagodną, 43% z umiarkowaną i 50% z ciężką postacią hemofilii A. Pacjenci z łagodną i umiarkowaną postacią hemofilii A otrzymywali koncentrat czynnika krzepnięcia VIII na żądanie w dawkach odpowiednio: od 30 do 829,2 jm./kg/rok (mediana 296,8) i od 77,3 do 4009,2 jm./kg/rok (mediana 1659,8), natomiast

pacjenci z ciężką postacią choroby, otrzymywali od 121,7 do 9219,2 jm./kg/rok (mediana 4053,6), z czego u 93% prowadzono profilaktykę. We wnioskach autorzy podkreślili, że łagodna i umiarkowana postać hemofilii A rozpoznawana jest późno, nawet jeżeli występuje u członków rodziny. W związku z tym należy położyć nacisk na szkolenia w tym kierunku lekarzy i członków rodzin chorych na hemofilię. Natomiast dopiero po przeprowadzeniu kolejnych badań będzie można odpowiedzieć na pytanie, czy pacjenci z łagodną i umiarkowaną postacią hemofilii A powinni być leczeni bardziej intensywnie.

Bidlingmaier C. i wsp. P-WE-551. Mild versus severe haemophilia A: the dilemma of an underestimated disease

Baran i wsp. przedstawili wstępne badania dotyczące podłoża genetycznego łagodnej i umiarkowanej postaci hemofilii A. Nasilenie skazy krwotocznej w przebiegu hemofilii A jest zazwyczaj ściśle związane ze stopniem niedoboru czynnika VIII (FVIII). W hemofilii umiarkowanej (aktywność FVIII [FVIII:C] 1–5% normy) samoistne krwawienia dostawowe i domięśniowe zdarzają się rzadko, a w postaci łagodnej (FVIII:C 6–49%) praktycznie nie występują. Jednak nawet u pacjentów z taką samą aktywnością FVIII obserwuje się różne nasilenie skazy krwotocznej. Jedną z przyczyn zróżnicowanego obrazu klinicznego hemofilii może być rodzaj mutacji sprawczej. Celem badania była identyfikacja podłoża genetycznego umiarkowanej i łagodnej hemofilii A w Polsce oraz analiza korelacji mutacji z obrazem klinicznym choroby. Do tej pory do badania włączono 41 pacjentów w wieku 18–65 lat. Badania laboratoryjne objęły między innymi oznaczenie aktywności FVIII, zawartości antygenu vWF i aktywności kofaktora ristocetyny, aktywności czynników krzepnięcia IX i XI. Wywiad chorobowy obejmował między innymi wiek wystąpienia pierwszego krwawienia, częstość, rodzaj i nasilenie krwawień. Mutacje sprawcze zidentyfikowano u 36 z 41 pacjentów. Sześciu mutacji nie opisywano dotychczas w literaturze: Ser210Pro, Pro291Gln, Phe1699Ser, Arg1776Ile, Val1998Met, Thr2291Ile. W pozostałych 30 przypadkach wykryto 19 opisanych uprzednio mutacji sprawczych. W 2 przypadkach wykryto mutacje (Tyr114Cys i Arg531His) odpowiedzialne za występowanie różnic w pomiarze FVIII:C metodą koagulacyjną jednostopniową i chromogenną; u obu pacjentów FVIII:C wynosiła powyżej 40%. Mutacja Tyr1698Cys wykryta u pacjenta z FVIII:C 22%, opisana jest w międzynarodowej bazie HAMSTeRS jako wywołująca ciężki fenotyp. U żadnego z pacjentów nie stwierdzono obecności inhibitora czynnika VIII. Dwoch pacjentów przeżyło krwawienia śródczaszkowe. U 6 pacjentów z hemofilią umiarkowaną oraz u 9 z hemofilią łagodną występowały samoistne krwawienia do stawów. Autorzy dodali, że badanie będzie kontynuowane.

Baran B. i wsp. P-WE-551. Mild and moderate hemophilia A in Poland

Autorki z *Moscow State Haematology Centre* przedstawiły bardzo ciekawe dane dotyczące aktualnego leczenia chorych na hemofilię w Rosji. W ciągu ostatnich 10 lat radykalnie zmieniła się sytuacja dotycząca zakupu koncentratów czynnika VIII (FVIII), na przykład w 2008 roku zakupiono 481 mln jm. FVIII, a w 2009 roku — 530 mln jm. FVIII. Zgodnie z prawem, od 2005 roku każdy pacjent z hemofilią ma prawo do bezpłatnego leczenia. Wprowadzono narodowe standardy leczenia hemofilii i VWD. U większości pacjentów nastąpiła zmiana z leczenia „na żądanie” na leczenie profilaktyczne. Rozpoczęto immunotolerancję (ITL, *immunotolerance induction*) i w ciągu 3 lat inhibitor wyeliminowano u 35% pacjentów. Zużycie koncentratu FVIII wyniosło w 2010 roku — 4,1 j./mieszkańca, natomiast w 2011 planowane zużycie ma wynosić 4,7 j./mieszkańca. Dla porównania, zużycie FVIII w Moskwie wyniosło 6,96 j./mieszkańca w 2010 roku, natomiast w 2011 roku planowane zużycie ma wynosić 7,7 j./mieszkańca.

Plyusch O. i wsp. P-WE-504. Treatment methods of haemophilia in Russian Federation

Collins i wsp. przedstawili wyniki badania dotyczącego częstości występowania inhibitora u pacjentów chorych na hemofilię A w Wielkiej Brytanii, gdzie od 1990 roku do bazy centralnej UKHCDO *National Haemophilia Database* (NHD) wpisywani są chorzy z hemofilią i inhibitorem. Autorzy poddali analizie rekordy wszystkich chorych na hemofilię A wpisanych do bazy w latach 1990–2009. Wśród 2517 chorych na hemofilię A znaleziono 315 chorych z inhibitorem. Stwierdzono, że do 60. roku życia częstość występowania inhibitora zmniejszała się wraz z wiekiem, następnie wzrastała — IRR 1,97;  $p < 0,01$ . Znaleziono 155 rekordów z inhibitorem u dzieci poniżej 5. roku życia, z czego 86 z wysokim mianem (5 j.B.) IRR (95% CI) 12,1 (9,5–15,5;  $p < 0,001$ ). U połowy pacjentów chorych na hemofilię A i inhibitorem (160/315, 51%), inhibitor pojawił się po 5. roku życia, z czego u 82 pacjentów stwierdzano wysokie miano inhibitora. U pacjentów chorych na hemofilię A zakażonych HIV rzadziej występował inhibitor IRR 3,2 (2,22–4,46)  $p < 0,001$ .

Collins P.W. i wsp. P-WE-527. Inhibitors in severe haemophilia A increase above the age of 60 years but are reduced by HIV: a 20 year follow up study from UK Haemophilia Centre Doctors' Organisation

Giansily-Blaizot i wsp. przed wykonaniem zabiegu operacyjnego oceniali w grupie pacjentów z wrodzonym niedoborem czynnika VII wywiad dotyczący krwawień, aktywność prokoagulacyjną czynnika VII (FVII:C) i rodzaj zabiegu operacyjnego. Retrospektywnej analizie poddano 83 pacjentów z wrodzonym niedoborem czynnika VII (mediana FVII:C = 5%, zakres 0,6–35%), u których wykonano 157 zabiegów chirurgicznych bezosłonowego podawania koncentratu czynnika VII. Częstość występowania

krwawienia wynosiła 15,3% (22,8% przed okresem dojrzewania). Autorzy stwierdzili istotny związek pomiędzy występowaniem w wywiadzie dużych krwiaków a krwawieniem w czasie zabiegu. Niektóre zabiegi operacyjne, takie jak appendektomia ( $n = 13$ ), sztuczne poronienie ( $n = 10$ ) wiązały się z niskim ryzykiem krwawienia, podczas gdy tonsillektomia–adenoidektomia ( $n = 20$ ), przepuklina brzuszna ( $n = 8$ ) i obrzezanie ( $n = 5$ ) charakteryzowały się dużą częstością występowania krwawienia (odpowiednio 20%, 25% i 40%). Na podstawie analizowanego materiału autorzy stwierdzili także, że FVII:C mniejsza niż 10% i brak krwawień w wywiadzie może stanowić wystarczającą podstawę do podjęcia decyzji o przeprowadzeniu zabiegu operacyjnego u pacjentów z niedoborem czynnika VII.

Giansily-Blaizot M. i wsp. P-WE-533. A retrospective analysis of 157 surgical procedures performed without replacement therapy in 83 factor VII-deficient patients

Stefańska-Windyga i wsp. przedstawili wyniki pracy, w której oceniali podłoże genetyczne wrodzonego niedoboru FVII u polskich pacjentek. Niedobór FVII jest czwartą co do częstości występowania wrodzoną skazą krwotoczną w Polsce, której przebieg kliniczny może być łagodny lub manifestować się często nawracającymi, samoistnymi krwawieniami. Nasilenie krwawień słabo koreluje ze stopniem niedoboru czynnika VII. Do badania włączono 38 kobiet w wieku 18–77 lat, z aktywnością FVII 1–35 jm./dl ( $n$ . 70–140 jm./dl). Od każdej pacjentki zebrano wywiad dotyczący między innymi rodzaju i nasilenia krwawień oraz sposobu ich leczenia. Badania laboratoryjne objęły oznaczenia aktywności koagulacyjnej czynnika VII (FVII:C), zawartości innych czynników krzepnięcia krwi oraz sekwencjonowanie genu *FVII* (*F7*). Najczęściej zgłaszanym objawem skazy krwotocznej była skłonność do siniaczenia (100% badanych) i krwawienia wklajające ekstrakcje zębów (86,8% chorych). Prawie 90% pacjentek zgłaszało nadmierne krwawienia miesięczkowe, u 2 przeprowadzono z tego powodu histerektomię. Samoistne krwawienia do stawów udokumentowano u 2 chorych, a pourazowe u 5. Trzydzieści cztery pacjentki wymagały leczenia substytucyjnego z powodu nadmiernych krwawień. Mutacje sprawcze zidentyfikowano u 34 pacjentek, mutację punktową c.1061C>T, p.Ala294Val stwierdzono u 28 osób, mutację przesunięcia ramki odczytu c.1391del1C, p.Pro404 — u 21, zaś mutację c.1109G>T, p.Cys310Phe — u 9 chorych. W większości przypadków ciężkiego niedoboru FVII wykrywano więcej niż jedną mutację. Najcięższy przebieg skazy krwotocznej zaobserwowano u kobiet będących homozygotami wobec dwóch mutacji oraz w przypadku heterozygot wobec trzech różnych mutacji w *F7*. U większości kobiet będących heterozygotami wobec dwóch różnych mutacji skaza krwotoczna miała przebieg łagodny.

Stefańska-Windyga E. i wsp. P-TH-562. Inherited factor VII deficiency in Polish women



Fischer i wsp. przedstawili wyniki bardzo ciekawego prospektywnego badania, oceniającego różnice wynikające ze stosowania innych protokołów w leczeniu profilaktycznym chorych na hemofilię w Holandii i Szwecji. Badaną grupę stanowili chorzy z ciężką postacią hemofilii (FVIII/IX < 1%), bez inhibitora, urodzeni i leczeni w Malmö, Sztokholmie i Utrechcie w latach 1970–1994. Oceniano sposób leczenia długoterminowego, 5-letnią historię krwawień, zużycie koncentratów czynników krzepnięcia i parametry społeczno-ekonomiczne. Oceniano: *haemophilia joint health score* (HJHS — 1,0 maks. 128 punktów) w powiązaniu z aktywnością ocenianą przez pacjenta (HAL, maks. 100), aktywność fizyczną (IPAQ, *International Physical Activity Questionnaire*) oraz jakość życia (SF36, EQ5D). Koszty kalkulowano na podstawie cen koncentratów czynników krzepnięcia w Szwecji. Badaną grupę stanowiło 80 Holendrów (NL, średnia dawka) i 50 Szwedów (SE, duża dawka) w wieku od 12 do 37 lat (mediana: 24,3). Wiek, w którym rozpoczynano profilaktykę, różnił się i wynosił dla grupy SE — 1,5 roku (1,2–2,5) *v.* NL — 4,5 roku (3,1–5,7);  $p < 0,01$ . Różnice występowały także w zużyciu koncentratów czynników krzepnięcia od 4273 jm./kg/rok (3214–5119) w grupie SE do 2120 jm./kg/rok (1503–2748);  $p < 0,001$  w grupie NL. Szwedzki protokół dawał nieznacznie lepsze wyniki ( $p < 0,01$ ): 0 (0–2) *v.* 1 (0–3) wylewów do stawów/rok; niższy wynik w punktacji HJHS — 4 (1–6) *v.* 7, 5 (3–15,3) i wyższy wynik w punktacji HAL — 99 (89–100) *v.* 92 (81–99), przy czym różnice w EQ5D były niezamienne statystycznie: 1 (0,8–1) *v.* 0,8 (0,73–1);  $p = 0,7$ . Przewidywane koszty rocznej opieki nad młodym pacjentem z hemofilią A w wieku 23–29 wynosiły 188 896 (SD 10783) EURO w Szwecji i 97 311 (SD 7720) EURO w Holandii. We wnioskach autorzy podkreślili skuteczność leczenia

profilaktycznego w obu krajach, natomiast zwrócili uwagę na 2 razy większe koszty takiego leczenia w Szwecji.

Fischer K. i wsp. O-TH-073. Swedish versus Dutch prophylactic strategy for hemophilia: difference in outcome is small but cost-difference is large

Odnoczko i wsp. przedstawili wstępne wyniki badania, w którym ustalono podłoże genetyczne niedoboru FXI w grupie 33 pacjentów zapisanych w rejestrze wrodzonych skaz krwotocznych Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie. Badaniami objęto 8 pacjentów (5 mężczyzn, 3 kobiety) w wieku 3–71 lat, reprezentujących 5 rodzin. Aktywność prokoagulacyjną czynnika XI (FXI:C) oznaczano metodą koagulacyjną jednostopniową. W celu identyfikacji mutacji sprawczych, gen *FXI* poddano automatycznemu sekwencjonowaniu (ABI 3100 Genetic Analyzer; Applied Biosystems). Aktywność *FXI* w grupie badanej zawierała się w przedziale 3–48 jm./dl (norma 70–140 jm./dl). Defekt genetyczny wykryto u 7 pacjentów; u jednego nie zidentyfikowano mutacji sprawczej. Dwie spośród 4 wykrytych mutacji: Ser420Stop (1 pacjent) i Glu525Lys (3 pacjentów) nie były dotychczas opisane, pozostałe 2 zostały dobrze poznane: Glu117Stop i Phe283Leu. Mutacja Glu525Lys (c.1627G>A) była jedynym wykrytym defektem w *FXI* u pacjenta z łagodnym niedoborem (*FXI* — 41 jm./dl). U innego pacjenta z heterozygotyczną mutacją Ser420Stop (c.1313 C > A) aktywność *FXI* wynosiła 5 jm./dl; pozostali dwaj pacjenci z ciężkim niedoborem *FXI* byli złożonymi heterozygotami wobec mutacji, odpowiednio Phe283Leu/Glu525Lys i Glu117Stop/Phe283Leu. Jeden pacjent był homozygotą wobec mutacji Glu117Stop.

Odnoczko E. i wsp. P-TH-531. Inherited FXI deficiency in Poland