

Mimetyki czynnika VIII (FVIIIa) i ich wpływ na testy laboratoryjne hemostazy

Edyta Odnoczko 

Pracownia Genetyki Hemostazy i Porfirii, Zakład Hemostazy i Chorób Metabolicznych,
Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa

Artykuł jest tłumaczeniem pracy:

Odnoczko E. Mimetics of active factor VIII (FVIIIa) and their impact on laboratory tests of haemostasis. *J Transf Med* 2023; 16 (4): 260–268. DOI: 10.5603/jtm.99303. Należy cytować wersję pierwotną.

Streszczenie

Wprowadzenie do leczenia hemofilii A długodziałających, podskórnie podawanych mimetyków naśladujących aktywny czynnik VIII (FVIIIa) jest bez wątpienia przełomem w leczeniu profylaktycznym tej grupy chorych. Nowatorski charakter i sposób działania cząsteczek mimetyków FVIIIa wiąże się ze znaczącymi implikacjami w dotychczasowych algorytmach laboratoryjnych monitorowania leczenia hemofilii. Monitorowanie stężenia leku w celu dostosowania dawki nie jest wymagane, jednak w praktyce klinicznej kontrolowanie laboratoryjne hemostazy może być przydatne na przykład w przypadku konieczności przeprowadzenia interwencji chirurgicznej lub wystąpienia krwawień mimo stosowanej profilaktyki. Wówczas świadomość wpływu stosowania terapii mimetykami FVIIIa na testy laboratoryjne hemostazy jest warunkiem koniecznym do sprawnego posługiwania się nimi i interpretowania uzyskanych wyników.

Słowa kluczowe: hemofilia A; testy hemostazy; czynnik VIII; mimetyki FVIII; emicizumab; mim8

J. Transf. Med. 2023; 16: 269–277

Wstęp

Hemofilia A (HA, *hemophilia A*) to jedna z najlepiej poznanych wrodzonych osoczowych skaz krwotocznych. U jej podłoża leży brak lub upośledzenie syntezy osoczowego czynnika krzepnięcia VIII (FVIII, *factor VIII*). Jest to genetycznie uwarunkowana choroba monogenowa, dziedziczona w sposób recesywny sprzężony z płcią, co sprawia, że niedobór FVIII i towarzysząca temu skaza krwotoczna objawia się głównie u mężczyzn, natomiast kobiety są nosicielkami zmutowanego wariantu genu kodującego FVIII (*F8*, Xq28) [1].

Jak wspomniano, choroba ta objawia się nadmierną skłonnością do krwawień, zaś ich nasilenie w dużej mierze jest podyktowane stopniem niedoboru FVIII. Hemofilię A rozpoznaje się na podstawie wyników pomiaru aktywności FVIII w osoczu. W zależności od stopnia niedoboru FVIII wyróżnia się 3 postacie HA:

- ciężką, gdy FVIII wynosi mniej niż jedna jednostka międzynarodowa (IU, *International Unit*)/dl;
- umiarkowaną, gdy FVIII mieści się w przedziale 1–5 IU/dl;
- łagodną, gdy FVIII wynosi > 5–50 IU/dl [1].

Adres do korespondencji: dr n. med. Edyta Odnoczko, Pracownia Genetyki Hemostazy i Porfirii, Zakład Hemostazy i Chorób Metabolicznych Instytutu Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie, ul. I. Gandhi 14, 02–776 Warszawa, e-mail: eodnoczko@ihit.waw.pl

Nadesłano: 21.11.2023

Przyjęto do druku: 21.12.2023

Data pierwszej publikacji: 31.12.2023

Artykuł jest dostępny bezpłatnie na podstawie licencji Creative Commons Attribution-Non-Commercial-No Derivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) umożliwiającej jego pobranie oraz udostępnianie pod warunkiem wskazania autorstwa i wydawcy. Niedopuszczalne jest wprowadzanie jakichkolwiek zmian lub wykorzystanie komercyjne bez zgody wydawcy.

Tabela 1. Bispecyficzne przeciwciała naśladujące FVIIIa stosowane w hemofilii A z inhibitorem lub bez (zmodyfikowano za: [1])

Mimetyk FVIIIa	Droga podania	Dawkowanie leku	Zastosowanie/badania kliniczne
Emicizumab	Podskórnice	1 × na tydzień, 1 × co 2 tygodnie lub 1 × co 4 tygodnie	Zatwierdzone przez FDA i EMA Dorośli, młodzież i dzieci z ciężką, umiarkowaną hemofilią A, z inhibitorem lub bez
Mim8	Podskórnice	1 × na tydzień lub 1 × na miesiąc	Badanie kliniczne fazy III: FRONTIER 4/5

FDA (*Food and Drug Administration*) — Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków; EMA (*European Medicines Agency*) — Europejska Agencja Leków

Hemofilia A jest zagrażającą życiu szką krwotoczną, w której ciężka postać choroby (FVIII < 1 IU/dl) objawia się samoistnymi krwawieniami, głównie do stawów i mięśni, a ich początek przypada zazwyczaj na 2–3 rok życia [2]. Podstawą leczenia ciężkiej HA jest stosowanie koncentratów niedoborowego czynnika krzepnięcia krwi (tzw. terapia substytucyjna). Zarówno leczenie aktywnych krwawień oraz długoterminowa profilaktyka krwawień w tej grupie chorych polega na wykonywaniu dożylnych wstrzyknięć koncentratu FVIII, których liczba w przypadku regularnego ich wykonywania może sięgnąć ponad 150 w ciągu roku. Ponadto najpoważniejszym powikłaniem terapii substytucyjnej (dotyczy ok. 20–40% chorych z ciężką i 3–13% z nieciężką HA) jest występowanie alloprzeciwciał neutralizujących aktywność FVIII (tzw. inhibitora FVIII), wskutek czego profilaktyka i hamowanie krwawień w tej grupie chorych nie poddają się leczeniu substytucyjnemu FVIII [3–5]. Dodatkowo obciążenie chorego koniecznością 3–4-krotnego cotygodniowego podania koncentratu FVIII może prowadzić do zmiennego przestrzegania zaleceń klinicysty i gorszych wyników leczenia [6]. Należy także dodać, iż w konsekwencji suboptymalne leczenie HA może prowadzić do zwiększonej liczby powikłań, takich jak nawracające krwawienia do stawów, artropatia hemofilowa i obniżona jakość życia [6].

Z powyższych względów w ciągu ostatnich kilku lat nastąpił znaczny postęp w zakresie innowacyjnych metod leczenia hemofilii, wśród których przełomowe jest opracowanie i wprowadzenie do leczenia profilaktycznego HA cząsteczek naśladujących aktywny FVIII, tzw. mimetyków FVIIIa (*mimetisc FVIIIa*) [1, 7] (tab. 1). Pojawienie się tego rodzaju nowatorskich przeciwciał monoklonalnych zrewolucjonizowało sposób leczenia HA, poszerzając możliwości terapeutyczne tej szki krwotocznej o tak zwaną terapię niesubstytucyjną (*non-replacement therapy*) [7]. Leki te charakteryzuje przede wszystkim długi okres działania, brak neutralizacji przez inhibitor FVIII oraz podskórna

droga ich podawania, co istotnie podnosi jakość życia chorych na HA i skuteczność leczenia profilaktycznego [7].

Pierwszym, wprowadzonym do profilaktycznego leczenia krwawień w HA mimetykiem FVIIIa jest emicizumab (Hemlibra®, Roche Szwajcaria) [3, 6]. To lek będący humanizowaną, bispecyficzną, monoklonalną immunoglobuliną G4 (IgG4), która by przywrócić prawidłowy przebieg hemostazy, zastępuje FVIIIa w kompleksie tenazy, wiążąc ludzkie czynniki krzepnięcia IXa i X [8–11]. Emicizumab jest przeciwciałem, które nie wykazuje podobieństwa strukturalnego do FVIII, co sprawia, że nie jest on neutralizowany przez alloprzeciwciała (inhibitor) wobec FVIII [9, 12]. W listopadzie 2017 roku Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (FDA, *Food and Drug Administration*), a następnie w lutym 2018 roku Europejska Agencja Leków (EMA, *European Medicines Agency*) zatwierdziły stosowanie emicizumabu u pacjentów z HA powikłaną inhibitorem FVIII, natomiast w kolejnych latach jego stosowanie w profilaktyce u pacjentów z ciężką i umiarkowaną HA bez inhibitora, ponieważ wykazano znaczne zmniejszenie częstości krwawień także w tej grupie pacjentów [1, 3, 10, 13, 14]. Bardzo szybko uznano emicizumab za lek sygnalizujący nową erę leczenia HA, gdyż we wszystkich badaniach klinicznych III fazy profilaktyka emicizumabem doprowadziła do spektakularnego zmniejszenia częstości krwawień w ujęciu rocznym (ABR, *annualized bleeding rate*), przy medianie ABR wynoszącej 2,6 dla wszystkich schematów dawkowania u pacjentów w badaniach HAVEN od 1 do 4, a u ponad 80% uczestników nie wystąpiło żadne krwawienie po 24. tygodniu terapii [11]. Emicizumab cechuje się wydłużonym okresem półtrwania w krwiobiegu (4–5 tygodni), co pozwala na dawkowanie tego leku raz na tydzień, 2 lub 4 tygodnie, w porównaniu z konwencjonalną terapią substytucyjną [3, 8]. Drugą nieocenioną korzyścią stosowania Hemlibra® u chorych na HA jest, w przeciwieństwie do stosowania standardowych koncentratów FVIII, podskórna droga jego

podania i związany z tym wzrost komfortu i jakości życia tej grupy pacjentów. Z powyższych powodów, lecz przede wszystkim ze względu na jego skuteczność w hamowaniu krwawień, stosowanie emicizumabu szybko rośnie na całym świecie. Lek ten obecnie jest dopuszczony do użytku klinicznego w wielu krajach, przy czym w Polsce na dzień 06.01.2024 roku może być zastosowany jedynie u pacjentów z ciężką HA powikłaną inhibitorem i w wyjątkowych przypadkach u pacjentów z ciężką postacią hemofilii A bez inhibitora.

Poszukiwania idealnego sposobu leczenia HA i pomyślny rozwój terapii mimetycznej FVIIIa z wykorzystaniem emicizumabu stał się napędem do opracowania kolejnych bispecyficznych przeciwciał nowej generacji opartych na tym koncepcie działania i przeznaczonych do podskórnego profilaktycznego leczenia HA z inhibitorami i bez nich. W literaturze w 2021 roku pojawiły się doniesienia dotyczące opracowania przez Novo Nordisk cząsteczki o nazwie denecimig (Mim8), będącej ludzkim, bispecyficznym przeciwciałem nowej generacji, które podobnie jak emicizumab naśladuje działanie FVIIIa, tworząc kompleks z FX i FIXa na fosfolipidowej powierzchni aktywowanych płytek krwi w celu przyspieszenia aktywacji FX [4, 7, 11, 15, 16]. Dane z badań *in vitro* z użyciem ludzkiej krwi, jak również zwierzęcych modeli HA, wskazują, że Mim8 około 15-krotnie zwiększa wytwarzanie trombin w porównaniu z analogiem emicizumabu [6, 15–17]. To, co różni Mim8 od emicizumabu, to skonstruowanie monowalentnego ramienia anty-FIXa, które silniej stymuluje aktywność proteolityczną FIXa w celu aktywacji FX [6, 15]. Lek ten przeznaczony jest do podskórnego profilaktycznego leczenia pacjentów z HA z inhibitorami lub bez, a jego skuteczność, bezpieczeństwo, farmakokinetyka i farmakodynamika aktualnie oceniana jest w badaniach klinicznych. Bieżące dane z badań klinicznych wykazały, że czas półtrwania ($t_{1/2}$) Mim8 wynosił około 30 dni, co potwierdza możliwość dawkowania leku raz na tydzień lub raz na miesiąc [1, 6].

Inne bispecyficzne mimetyki FVIII nowej generacji, będące w opracowywaniu, to NXT007 (Chugai Pharmaceutical Co, Roche) oraz BS-027125 (Biovenerativ, Sanofi), znajdujące się obecnie w fazie oceny przedklinicznej [1, 3, 7, 11, 18, 19].

Opublikowane dotychczas dane kliniczne wskazują, że schemat leczenia mimetykami FVIIIa zapewnia osiągnięcie stabilnej i trwałej odpowiedzi, dlatego monitorowanie leku w celu dostosowania dawki nie jest wymagane. Stosowanie leku zgodnie z ustalonym schematem zapewnia osiągnięcie po-

żądanego stężenia leku i jego pozostawanie w krążeniu nawet przez kilka miesięcy po wstrzyknięciu ostatniej dawki [14]. Sytuacje kliniczne, w których aktualnie eksperci zgadzają się, że monitorowanie laboratoryjne i kontrolowanie hemostazy mogą być przydatne, to: zabiegi chirurgiczne, krwawienia przebiegające mimo stosowanej profilaktyki, krwawienia w następstwie urazów oraz weryfikacja skuteczności prowadzonego leczenia [10, 20, 21].

Należy podkreślić, że nowatorski charakter i sposób działania cząsteczek mimetyków FVIIIa niesie ze sobą znaczące implikacje w dotychczasowe algorytmy laboratoryjnego monitorowania leczenia hemofilii. Okres półtrwania cząsteczki mimetyku, na przykład emicizumabu, wynosi 4–5 tygodni, co sprawia, że terapia ta może wpływać na wyniki badań laboratoryjnych przez okres do 6 miesięcy po podaniu [12, 22]. Świadomość wpływu stosowania wspomnianej powyżej terapii mimetycznej na testy laboratoryjne hemostazy jest warunkiem niezbędnym do sprawnego posługiwania się nimi i właściwego interpretowania ich wyników. W niniejszym artykule omówiono wpływ działania leków będących mimetykami FVIIIa na poszczególne testy hemostazy, ze szczególnym uwzględnieniem monitorowania skojarzonej terapii substytucyjnej koncentratami FVIII.

Wpływ mimetyków FVIIIa na testy podstawowe i specjalistyczne hemostazy

Jak wspomniano, omawiane mimetyki to cząsteczki naśladujące aktywowany FVIII, które w odróżnieniu od białka FVIII, nie wymagają aktywacji ze sprzężeniem zwrotnym za pośrednictwem trombin [12, 23, 24]. Ta cecha cząsteczek mimetyków istotnie wpływa przede wszystkim na rutynowy test hemostazy, jakim jest czas częściowej tromboplastyny po aktywacji (aPTT, *activated partial thromboplastin time*) oraz wszystkie testy jemu pochodne (tab. 2) [8, 12, 14–16, 20]. Test aPTT ulega bowiem nadmiernemu skróceniu w różnym stopniu zależnie od stosowanego odczynnika, zwykle poniżej prawidłowego zakresu referencyjnego [8, 13, 14, 25]. Co ważne, ze względu na to, iż mimetyki FVIIIa są lekami długodziałającymi, skrócenie to występuje już po podaniu pierwszej dawki leku, nawet przy bardzo małych jego stężeniach i może się utrzymywać przez kilka miesięcy po odstawieniu leczenia [12, 14, 22]. Dodatkowo warto zauważyć, że pomiar aPTT u pacjenta leczonego mimetykami FVIIIa nie nadaje się do monitorowania tej terapii, ale jego wydłużenie może wskazywać na nieprzestrzeżenie przez pacjenta zaleceń lekarskich lub na

Tabela 2. Wpływ mimetyków FVIII na wyniki wybranych testów krzepnięcia (zmodyfikowano za: [8, 9, 22, 26, 27])

Rodzaj testu laboratoryjnego hemostazy	Wynik fałszywy	Wynik wiarygodny	Komentarz
Testy rutynowe			
aPTT	✓		Wynik fałszywie skrócony (nawet < 20 s) Efekt widoczny już przy minimalnym stężeniu leku (> 5 µg/ml)
Test korekcji aPTT	✓		Wynik fałszywie ujemny
PT		✓	Wynik prawidłowy lub nieznacznie wydłużony
Fibrynogen (metoda Claussa)		✓	Brak wpływu
TT		✓	Brak wpływu
Testy specjalistyczne			
Oznaczenie aktywności FVIII testem koagulacyjnym jednostopniowym	✓		Wynik fałszywie zawyżony. Wartość od kilkuset do nawet kilku tysięcy IU/dl (%)
Oznaczenie aktywności FIX, FXI i FXII testem koagulacyjnym jednostopniowym	✓		Wynik fałszywie zawyżony. Pomiar oparty na aPTT
Oznaczenie aktywności FII, FV, FVII i FX testem koagulacyjnym jednostopniowym		✓	Brak wpływu Pomiar oparty na PT
Oznaczenie miana inhibitora wobec ludzkiego FVIII testem Bethesda z pomiarem FVIII metodą koagulacyjną	✓		Wynik fałszywie ujemny. Wskazuje na brak inhibitora
Oznaczenie aktywności FVIII testem chromogennym z użyciem odczynnika pochodzenia ludzkiego (FX, FIX)	✓		Wynik fałszywie zawyżony. Stanowi „surogat” działania leku u pacjenta bez leczenia FVIII
Oznaczenie aktywności FVIII testem chromogennym z użyciem odczynnika pochodzenia wołowego (FX)		✓	Brak wpływu
Oznaczenie miana inhibitora wobec ludzkiego FVIII testem Bethesda z pomiarem FVIII metodą chromogenną z użyciem odczynnika pochodzenia wołowego (FX)		✓	Brak wpływu
Oznaczenia testem immunologicznym (Elisa)		✓	Brak wpływu
Oznaczenie anty-Xa testem chromogennym		✓	Brak wpływu

aPTT (*activated partial thromboplastin time*) — czas częściowej tromboplastyny po aktywacji; PT (*prothrombin time*) — czas protrombinowy; TT (*thrombin time*) — czas trombinowy, FVIII (*factor VIII*) — czynnik VIII; FX (*factor X*) — czynnik X

wytworzenie tak zwanych przeciwciał przeciwlkowych (ADA, *anti-drug antibody*) [9, 13].

W przypadku pozostałych rutynowych testów hemostazy odnotowano klinicznie nieistotny wpływ emicizumabu i mim8 na pomiar czasu protrombinowego (PT, *prothrombin time*) zależnie od stosowanego odczynnika, a związane z nim oznaczenia czynników II, V, VII, X również pozostają bez

istotnych zmian [8, 9, 14, 22, 27, 28]. Pomiar czasu trombinowego (TT, *thrombin time*) oraz oznaczenie stężenia fibrynogenu metodą Claussa pozostają także bez istotnego klinicznie wpływu działania omawianego leku [8, 27].

Testy specjalistyczne oparte na pomiarze aPTT, służące między innymi badaniu aktywności czynników szlaku wewnątrzpochodnego układu

krzepnięcia VIII, IX, XI i XII, wykazują fałszywie podwyższoną wartość [14, 20, 25]. Efekt ten dotyczy także pomiaru aktywności białka C i S testem koagulacyjnym oraz testu odporności na aktywowane białko C (APCR), jeżeli są one wykonywane na podstawie pomiaru aPTT [8, 14, 22, 28, 29]. U wszystkich pacjentów z HA leczonych emicizumabem, którzy wymagają leczenia heparyną, do pomiaru stężenia leku należy stosować chromogenny test anty-Xa [8, 14]. Ponadto testy służące wykrywaniu inhibitorów FVIII, tj. test przesiewowy oparty na pomiarze aPTT mieszaniny osocza badanego z osoczem prawidłowym (tzw. test korekcji) oraz test Bethesda z pomiarem FVIII testem koagulacyjnym jednostopniowym wykazują fałszywie ujemny wynik [8, 14].

Wpływ mimetyków FVIIIa na oznaczenie FVIII w osoczu

Na podstawie ogólnoswiatowych doświadczeń ze stosowania u pacjentów z HA emicizumabu, wiadomo, że długoterminowa profilaktyka krwawień z zastosowaniem tej grupy leków istotnie zmniejsza ryzyko ich występowania. Jednakże w przypadku konieczności leczenia krwawień zidentyfikowanych jako krwawienia przebijające, bądź będące skutkiem urazu lub też konieczności wykonania zabiegu inwazyjnego, lub wdrożenia ITI, może zaistnieć konieczność równoczesnego zastosowania mimetyku FVIIIa i koncentratu FVIII, a wówczas istotny jest właściwy dobór testów pozwalających na wiarygodne monitorowanie takiej terapii [8, 10, 14, 21]. Należy jednak podkreślić, że w zbiorczej analizie badania HAVEN 1–4 podczas stosowania profilaktyki emicizumabem krwawienia przełomowe, zarówno samoistne, jak i pourazowe, występowały bardzo rzadko [3].

W rozpoznawaniu i monitorowaniu leczenia HA są wykorzystywane dwie główne strategie pomiaru aktywności FVIII w osoczu: jednoetapowy test koagulacyjny (FVIII:C, *FVIII coagulation activity*) i test chromogenny [4, 21, 25]. Aktualnie w leczeniu HA dostępna jest dość szeroka gama osoczopochodnych lub rekombinowanych (rFVIII, *recombinant factor VIII*) koncentratów czynnika VIII o standardowym (SHL, *standard half life*) lub przedłużonym okresie półtrwania (EHL, *extended half life*) [12, 30]. W literaturze już od lat są opisywane rozbieżności w wynikach aktywności FVIII mierzonej testem koagulacyjnym i chromogennym [4, 12, 25]. Początkowo dotyczyły one klasyfikacji nieciężkiej HA, potem zaś jako następstwo wprowadzania na rynek zmodyfikowanych strukturalnie

cząsteczek FVIII (rFVIII, EHL), a także terapii genowej HA [4, 14].

Wpływ mimetyków FVIIIa na testy koagulacyjne FVIII

Najczęściej stosowanym na świecie testem do oznaczania aktywności FVIII jest test koagulacyjny jednostopniowy, oparty na pomiarze aPTT. Test ten służy badaniu aktywności koagulacyjnej FVIII:C w diagnostyce, klasyfikacji oraz monitorowaniu leczenia substytucyjnego HA. Z uwagi na to, że Hemlibra® i Mim8 powodują znaczne skrócenie aPTT, aktywność FVIII:C w tym teście jest fałszywie zawyżona [14]. Wyniki przeprowadzonych dotychczas badań sugerują, że stopień przeszacowania wyniku FVIII:C jest w pewnym stopniu zależny od zastosowanych odczynników aPTT, które różnią się między sobą zawartym aktywatorem lub fosfolipidami [4, 12]. Z tego powodu u pacjentów stosujących mimetyki FVIIIa test FVIII:C jest niemiarodajny i w tym przypadku nie zaleca się jego wykonywania [8, 22, 25, 31].

Warto nadmienić, że w praktyce laboratoryjnej znalazła zastosowanie pewna modyfikacja testu FVIII:C polegająca na zastosowaniu swoistego dla leku kalibratora. Ten zmodyfikowany test został zwalidowany dla cząsteczki emicizumabu, umożliwiając w ten sposób ilościowe określenie stężenia leku w osoczu pacjenta (patrz poniżej) [12, 14].

Wpływ mimetyków FVIIIa na testy chromogenne FVIII

Do monitorowania aktywności FVIII u pacjentów z HA stosowany jest także test chromogenny, przy czym badanie to jest zwykle trudniej dostępne i ograniczone do ośrodków leczenia hemofilii [14]. Przeprowadzone dotychczas badania dowiodły, że z uwagi na fałszywie zawyżoną wartość FVIII w teście koagulacyjnym, do monitorowania terapii substytucyjnej FVIII u pacjentów stosujących mimetyki FVIIIa (emicizumab, Mim8) powinno się stosować test chromogenny [9, 10, 14, 15, 25]. Dostępne na rynku testy chromogenne różnią się między sobą źródłem wchodzących w jego skład czynników aktywujących reakcję krzepnięcia: FIXa i FX, które mogą być pochodzenia ludzkiego (*h, human*) lub wołowego (*b, bovine*) [4]. Ponieważ mimetyki FVIIIa wiążą tylko ludzkie FIXa i FX, w testach chromogennych zawierających FIXa i FX pochodzenia wołowego nie obserwuje się interferencji i skrócenia aPTT, gdyż ta bispecyficzna cząsteczka nie wchodzi z nimi w reakcję [4, 12, 21]. Dlatego właśnie, zgodnie z aktualnymi zaleceniami, u pacjentów leczonych emicizumabem

należy wykonywać pomiar aktywności infuzyjnego FVIII testem chromogennym z odczynnikami pochodzenia wołowego [np. zestawami Coamatic FVIII test (Chromogenix), Coatest SP (Chromogenix) lub FVIII Chromogenic FVIII (Siemens)], Electrachrome FVIII (IL Werfen), TriniCHROM FVIII:C (Stago) [4, 8, 9, 14, 22, 25]. W przypadku stosowania hybrydowych zestawów laboratoryjnych zawierających bFX i hFIXa [np. Technochrom FVIII:C (Technoclone), Rossix FVIII (Rossix), BIOPHEN FVIII:C (Hyphen-Biomed)] zaleca się wstępną walidację i lokalną weryfikację wiarygodności oznaczeń FVIII [4, 8, 9, 15, 25].

Warto pamiętać, że testy chromogenne, które zawierają hFIXa i hFX, są w sposób zależny od stężenia wrażliwe na obecność mimetyku FVIIIa, przy czym nie są one specyficzne tylko i wyłącznie dla leku, gdyż mierzą także obecność endogennego lub infuzyjnego FVIII w badanym osoczu [10, 12, 14, 32].

Wpływ mimetyków FVIIIa na oznaczanie inhibitora FVIII (anty-hFVIII)

U każdego pacjenta z HA powikłaną inhibitorem w ramach rutynowej opieki zaleca się regularną kontrolę miana (stężenia) inhibitora FVIII [14]. Wymaganie to dotyczy także grupy pacjentów leczonych profilaktycznie mimetykami FVIIIa z pozytywnym wywiadem na obecność inhibitora. Oznaczenie miana inhibitora (przeciwciał) wobec ludzkiego FVIII (anty-hFVIII) w laboratorium najczęściej wykonuje się, zgodnie z rekomendacjami, z użyciem testu Bethesda w modyfikacji Nijmegen (NBA, *Nijmegen Bethesda Assay*) [4, 25]. Test ten jest testem wieloetapowym, który między innymi obejmuje pomiar aktywności resztkowej FVIII wykonywany rutynowo metodą koagulacyjną jedno-stopniową [8, 14]. Z uwagi na to, że jest on zależny od pomiaru aPTT, wynik miana inhibitora FVIII w tym przypadku także nie jest wiarygodny, gdyż wskazuje na fałszywą jego nieobecność lub znacznie zmniejszoną zawartość [12, 14, 20]. Wstępna procedura laboratoryjna, w postaci ogrzewania próbki osocza badanego w 56°C przed wykonaniem testu Bethesda, nie eliminuje interferencji leku [4, 8, 12, 14]. Dlatego też, aby określić miano inhibitora FVIII u pacjenta otrzymującego mimetyk FVIIIa, do oceny aktywności resztkowej FVIII w teście Bethesda należy wykorzystywać pomiar chromogenny z użyciem odczynników wołowych [8–10, 25, 31]. Zgodnie z zaleceniami ekspertów uważa się, że w każdym ośrodku leczenia HA powinny być dostępne odpowiednie testy do monitorowania in-

hibitora FVIII, w tym także modyfikacja z pomiarem chromogennym FVIII z wołowym FXa [22, 25]. Co ważne, w praktyce w celu zapewnienia spójności diagnostyki inhibitora FVIII rekomendowane jest oznaczenie miana inhibitora FVIII przed rozpoczęciem terapii lekiem Hemilibra® przy użyciu tego samego testu chromogennego, który będzie stosowany podczas terapii emicizumabem [8, 9, 26].

Pomiar stężenia leku w osoczu

Jak wspomniano powyżej rutynowe oznaczanie stężenia mimetyku FVIIIa w celu dostosowania dawki nie jest uważane za konieczne, jednak badanie to w pewnych sytuacjach może być bardzo przydatne (m.in. w sytuacji podejrzenia wytworzenia przeciwciał przeciwleukowych) [3, 8, 9]. Co więcej aktualnie eksperci zalecają, aby w ośrodkach leczenia hemofilii dostępne były testy monitorujące także stężenie emicizumabu [14, 22, 25]. Ponadto w zaleceniach niemieckich opublikowanych w 2020 roku określono częstotliwość monitorowania stężenia emicizumabu po 1 tygodniu od ostatniej dawki nasycającej, następnie co 3 miesiące przez rok i kolejno co 6 do 12 miesięcy lub w przypadku braku skuteczności [22, 31]. Obecnie w literaturze dostępnych jest najwięcej danych dotyczących emicizumabu, można jednak założyć, że zasady wykonywania pomiaru stężenia każdego mimetyku FVIII będą wykonywane w analogiczny sposób.

W celu oznaczenia stężenia mimetyku FVIII najczęściej (głównie dla emicizumabu) korzysta się ze zmodyfikowanego testu opartego na pomiarze aktywności FVIII metodą koagulacyjną jedno-stopniową w rozcieńczonym osoczu pacjenta, w odniesieniu do swoistego dla leku kalibratora [8, 9, 12, 14, 25, 31]. Obecnie komercyjnie jest dostępny kalibrator dla emicizumabu, wyprodukowany w zestawie wraz z kontrolami testu (R2 Diagnostics, Enzyme Research Laboratories, <https://r2diagnostics.com/>), który zawiera 100 µg/ml emicizumabu i może być zastosowany na różnych platformach analizatorów [8, 12, 13]. W dotychczas przeprowadzonych badaniach przy oznaczeniach stężenia Mim8 wykorzystywano jako materiał referencyjny porcję leku, o odpowiednio dostosowanym stężeniu [15]. W przypadku pomiaru stężenia emicizumabu stosowano większe rozcieńczenie próbki w porównaniu z jednoetapowym testem FVIII (wstępne rozcieńczenie próbki w analizatorze 1:8), co umożliwia pomiar zakresu emicizumabu (10–100 µg) w badanej próbce osocza [4, 12]. Wykazano, że stężenia emicizumabu uzyskane za pomocą zmo-

dyfikowanego jednoetapowego testu FVIII korelują istotnie ze stężeniami określonymi za pomocą testu immunoenzymatycznego (ELISA) stosowanego wcześniej w badaniach klinicznych HAVEN. Ponadto w każdym laboratorium rekomendowana jest weryfikacja metody z użyciem odczynników stosowanych lokalnie; w badaniach wykazano zadowalającą powtarzalność testu pomimo stosowania różnych systemów pomiarowych (odczynników APTT, osocza deficytowego FVIII i analizatorów) [8, 13]. Do oznaczenia stężenia leku możliwe jest także wykorzystanie metody chromogennej do pomiaru FVIII w odniesieniu do opisanego powyżej kalibratora [8, 12, 22, 24]. Przy interpretacji wyniku oznaczeń stężenia emicizumabu należy wziąć pod uwagę fakt, że ewentualne równoległe stosowanie koncentratu FVIII i/lub preparatów omijających inhibitor może powodować zawyżenie stężenia leku [20]. Wówczas gdy zajdzie konieczność oznaczenia stężenia emicizumabu w osoczu w obecności FVIII, można rozważyć inaktywację termiczną próbki osocza [4].

W przypadku pacjentów z podejrzeniem obecności przeciwciał neutralizujących anty-emicizumab, Światowa Organizacja Hemofili (WFH, *World Federation of Hemophilia*) zaleca pomiar stężenia emicizumabu przy użyciu zmodyfikowanego jednostopniowego testu obejmującego wspomniany dodatkowy etap wstępnego rozcieńczenia osocza badanego oraz kalibrację testu przy użyciu specyficznych kalibratorów emicizumabu [25]. W tym celu mogą być również stosowane zatwierdzone

testy mierzące w sposób bezpośredni obecność przeciwciał przeciwleukowych, jeśli są one dostępne.

Pomiar przeciwciał przeciwleukowych (anty-emicizumab)

Warto podkreślić, że w przypadku każdej terapii farmakologicznej istnieje niewielkie ryzyko rozwoju przeciwciał przeciwleukowych (ADA). Podejrzenie wytworzenia ADA pojawia się w chwili, gdy u pacjenta zwiększa się częstość krwawień przełomowych i dochodzi do wydłużenia aPTT. Stosowanie emicizumabu wiązało się z rozwojem ADA u 5,1% pacjentów (34/668), którzy uczestniczyli w badaniach klinicznych HAVEN 1–4 [3]. U większości z nich nie zaobserwowano istotnej zmiany stężenia emicizumabu w osoczu oraz zwiększenia częstości występowania krwawień, zaś przeciwciała neutralizujące lek wykryto w < 1% przypadków [3, 8]. Ponadto pojawienie się ADA nie wpływa na skuteczność leczenia substytucyjnego FVIII lub terapii omijającej inhibitor [3]. Z uwagi na to, że dotychczas nie opracowano komercyjnie dostępnych zestawów laboratoryjnych służących bezpośredniemu wykrywaniu ADA, w przypadku podejrzenia wytworzenia przeciwciał przeciwko emicizumabowi zalecane jest oznaczenie stężenia leku we krwi pacjenta [8, 9, 14, 22].

Podsumowanie wykorzystania omówionych powyżej testów laboratoryjnych do monitorowania mimetyku FVIIIa zestawiono w tabeli 3.

Tabela 3. Podsumowanie zastosowania wybranych testów hemostazy w obecności mimetyku FVIIIa (zmodyfikowano za: [8, 9, 12, 14, 25])

Cel badania	Test laboratoryjny
Obecność leku	Test chromogeny do pomiaru FVIII z czynnikami pochodzenia ludzkiego (hFIXa i hFX) Pomiar stężenia leku zmodyfikowanym testem koagulacyjnym do pomiaru FVIII skalibrowanym wobec specyficznego kalibratora
Aktywność FVIII po infuzji	Test chromogeny do pomiaru FVIII z FXa pochodzenia wołowego (bFX) i FIXa pochodzenia wołowego/ludzkiego (bFIXa/hFIXa)
Inhibitor wobec FVIII	Test Bethesda z pomiarem FVIII testem chromogenym z FXa pochodzenia wołowego (bFX) i FIXa pochodzenia wołowego/ludzkiego (bFIXa/hFIXa)
Stężenie leku	Zmodyfikowany test koagulacyjny do pomiaru FVIII skalibrowany wobec specyficznego kalibratora Infuzja koncentratu FVIII zawyża wynik
ADA	Brak testu bezpośredniego Wydłużenie aPTT może wskazywać na obecność ADA Zmodyfikowany test koagulacyjny FVIII do pomiaru stężenia leku

h (*human*) — ludzki; b (*bovine*) — wołowy, FIXa (*activated Factor IX*) — aktywowany czynnik IX; FX (*Factor X*) — czynnik X

Pomiar generacji trombiny

Dotychczas nie ustalono roli globalnych testów oceniających hemostazę, w tym pomiaru generacji trombiny, w monitorowaniu pacjentów stosujących mimetyk FVIIIa [8, 9]. Mimo tego, że test generacji trombiny (TGA, *thrombin generation assay*) nie jest rutynowo stosowanym testem hemostazy w praktyce klinicznej, głównie ze względu na trudności w interpretacji, niską powtarzalność i małą dostępność, to niejednokrotnie w literaturze donoszono o jego przydatności w odniesieniu do oceny potencjału hemostazycznego mimetyków FVIIIa, zwłaszcza emicizumabu. Szczególnie ciekawe wydają się próby wykorzystywania tego testu do oceny wytwarzania trombiny w próbkach pochodzących od pacjentów lub przygotowanych *in vitro* w modelu ze skojarzonym leczeniem FVIII, rVIIa i aPCC [3, 24, 33]. Głównym zamysłem tych badań jest analiza *in vitro* wpływu terapii BPA u pacjenta leczonego mimetykami FVIIIa przed ich podaniem pacjentowi. Próbuje się także wykorzystać TGA do okołoperacyjnej kontroli krwawień, aby zminimalizować potencjalne ryzyko zdarzeń zakrzepowych [20].

Podsumowanie

Wprowadzenie do leczenia hemofilii A terapii niesubstytucyjnej z użyciem długodziałających, podskórnych mimetyków FVIIIa stanowi znaczny postęp w leczeniu tej grupy chorych. Stosowanie u pacjentów z HA tych nowoczesnych cząsteczek i ich nowatorski sposób działania wymagają stałej edukacji personelu medycznego, w tym personelu laboratorium, ponieważ świadomość wpływu leków nowej generacji na testy laboratoryjne hemostazy jest kluczowym elementem procesu diagnostycznego. Dostępność odpowiednich testów laboratoryjnych i stałe podnoszenie wiedzy dotyczącej leków nowej generacji jest szczególnie ważne w ośrodkach mających pod opieką pacjentów z hemofilią, gdyż być może w przyszłości terapia mimetyczna stanie się dominującym paradygmatem w leczeniu HA. Monitorowanie tych nowoczesnych opcji leczenia HA może zatem wymagać ciągłego dostosowania odpowiednich testów, tak by dostarczyć klinicystom wiarygodne ich wyniki. Ponadto niewykluczone, że mimetyki FVIIIa znajdą także zastosowanie w leczeniu profilaktycznym krwawień w chorobie von Willebranda i nabytej hemofilii A (wskazanie dla emicizumabu w trakcie badań klinicznych) [3, 7].

Konflikt interesów

EO — uczestniczyła w badaniach klinicznych i otrzymywała wynagrodzenie za wygłoszone wykłady od firm: Baxalta, Baxter, Shire, Takeda, Novo Nordisk, Roche, SOBI, Siemens, Werfen

Piśmiennictwo

- Lewandowska M, Nasr S, Shapiro AD. Therapeutic and technological advancements in haemophilia care: Quantum leaps forward. *Haemophilia*. 2022; 28 Suppl 4: 77–92, doi: [10.1111/hae.14531](https://doi.org/10.1111/hae.14531), indexed in Pubmed: [35521732](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35521732/).
- Windyga J, Chojnowski K, Klukowska A, et al. Część I: Wytyczne postępowania w hemofilii A i B niepowikłanej inhibitorem czynnika VIII i IX (wydanie zaktualizowane). *Acta Haematologica Polonica*. 2016; 47(2): 86–114, doi: [10.1016/j.achaem.2016.04.009](https://doi.org/10.1016/j.achaem.2016.04.009).
- Alcedo Andrade PE, Mannucci PM, Kessler CM. Emicizumab: the hemophilia A game changer. *Haematologica*. 2023 [Epub ahead of print], doi: [10.3324/haematol.2022.282099](https://doi.org/10.3324/haematol.2022.282099), indexed in Pubmed: [37916312](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37916312/).
- Müller J, Miesbach W, Prüller F, et al. Standing Commission Labor (STA EKOLA) of the Society of Thrombosis and Haemostasis Research (GTH). An Update on Laboratory Diagnostics in Haemophilia A and B. *Hamostaseologie*. 2022; 42(4): 248–260, doi: [10.1055/a-1665-6232](https://doi.org/10.1055/a-1665-6232), indexed in Pubmed: [35104901](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35104901/).
- Windyga J, Chojnowski K, Klukowska A, et al. Część I: Wytyczne postępowania w hemofilii A i B niepowikłanej inhibitorem czynnika VIII i IX (wydanie zaktualizowane). *Acta Haematol Pol*. 2016; 47(2): 86–114, doi: [10.1016/j.achaem.2016.04.009](https://doi.org/10.1016/j.achaem.2016.04.009).
- Persson P, Amstrup AB, Coester HV, et al. Mim8, a novel factor VIIIa mimetic bispecific antibody, shows favorable safety and pharmacokinetics in healthy adults. *Res Pract Thromb Haemost*. 2023; 7(6): 102181, doi: [10.1016/j.rpth.2023.102181](https://doi.org/10.1016/j.rpth.2023.102181), indexed in Pubmed: [37745159](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37745159/).
- Ozelo MC, Yamaguti-Hayakawa GG. Impact of novel hemophilia therapies around the world. *Res Pract Thromb Haemost*. 2022; 6(3): e12695, doi: [10.1002/rth2.12695](https://doi.org/10.1002/rth2.12695), indexed in Pubmed: [35434467](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35434467/).
- 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, doi: [10.1111/hae.13903](https://doi.org/10.1111/hae.13903), indexed in Pubmed: [31859415](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31859415/).
- Windyga J, Chojnowski K, Klukowska A, et al. Emicizumab (Hemlibra®) in hemophilia A patients with inhibitors against factor VIII — guidelines of the Group for Haemostasis of the Polish Society of Haematology and Transfusion Medicine. *J Transf Med*. 2020; 13(3): 165–175, doi: [10.5603/jtm.2020.0006](https://doi.org/10.5603/jtm.2020.0006).
- Lippi G, Favaloro EJ. Emicizumab (ACE910): Clinical background and laboratory assessment of hemophilia A. *Adv Clin Chem*. 2019; 88: 151–167, doi: [10.1016/bs.acc.2018.10.003](https://doi.org/10.1016/bs.acc.2018.10.003), indexed in Pubmed: [30612605](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30612605/).
- Ellsworth P, Ma A. Factor-mimetic and rebalancing therapies in hemophilia A and B: the end of factor concentrates? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2021; 2021(1): 219–225, doi: [10.1182/hematology.2021000253](https://doi.org/10.1182/hematology.2021000253), indexed in Pubmed: [34889356](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34889356/).
- Peyvandi F, Kenet G, Pekrul I, et al. Laboratory testing in hemophilia: Impact of factor and non-factor replacement therapy on

- coagulation assays. *J Thromb Haemost.* 2020; 18(6): 1242–1255, doi: [10.1111/jth.14784](https://doi.org/10.1111/jth.14784), indexed in Pubmed: [32115865](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32115865/).
13. Lowe A, Kitchen S, Jennings I, et al. Effects of Emicizumab on APTT, FVIII assays and FVIII Inhibitor assays using different reagents: Results of a UK NEQAS proficiency testing exercise. *Haemophilia.* 2020; 26(6): 1087–1091, doi: [10.1111/hae.14177](https://doi.org/10.1111/hae.14177), indexed in Pubmed: [33094895](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33094895/).
 14. Bowyer AE, Lowe AE, Tiefenbacher S. Laboratory issues in gene therapy and emicizumab. *Haemophilia.* 2021; 27 Suppl 3: 142–147, doi: [10.1111/hae.13976](https://doi.org/10.1111/hae.13976), indexed in Pubmed: [32469128](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32469128/).
 15. Bowyer AE, Kitchen S, Ezban M. The effect of a next generation factor VIII mimetic bispecific antibody (Mim8) on assays of factor VIII activity and thrombin generation. *J Thromb Haemost.* 2023; 21(3): 480–487, doi: [10.1016/j.jtha.2022.12.023](https://doi.org/10.1016/j.jtha.2022.12.023), indexed in Pubmed: [36696203](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36696203/).
 16. 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, doi: [10.1111/jth.15682](https://doi.org/10.1111/jth.15682), indexed in Pubmed: [35191180](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35191180/).
 17. 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, doi: [10.1182/blood.2020010331](https://doi.org/10.1182/blood.2020010331), indexed in Pubmed: [34077951](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34077951/).
 18. Yamaguchi K, Soeda T, Sato M, et al. Pharmacology and Pharmacokinetics of NXT007; Emicizumab-Based Engineered Fx/Fx Bispecific Antibody with Improved Properties. *Blood.* 2020; 136(Supplement 1): 19–19, doi: [10.1182/blood-2020-138958](https://doi.org/10.1182/blood-2020-138958).
 19. 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 nonhemophilic state. *J Thromb Haemost.* 2023 [Epub ahead of print], doi: [10.1016/j.jtha.2023.09.034](https://doi.org/10.1016/j.jtha.2023.09.034), indexed in Pubmed: [37940048](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37940048/).
 20. López-Jaime FJ, Benítez O, Díaz Jordán BL, et al. Expert opinion paper on the treatment of hemophilia A with emicizumab. *Hematology.* 2023; 28(1): 2166334, doi: [10.1080/16078454.2023.2166334](https://doi.org/10.1080/16078454.2023.2166334), indexed in Pubmed: [36636993](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36636993/).
 21. Tripodi A, Chantarangkul V, Novembrino C, et al. Advances in the Treatment of Hemophilia: Implications for Laboratory Testing. *Clin Chem.* 2019; 65(2): 254–262, doi: [10.1373/clinchem.2017.284356](https://doi.org/10.1373/clinchem.2017.284356), indexed in Pubmed: [30282700](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30282700/).
 22. Holstein K, Albisetti M, Bidlingmaier C, et al. 'Ständige Kommission Hämophilie' (Haemophilia board) of the German, Swiss Austrian Society for Thrombosis Haemostasis Research (GTH). Practical Guidance of the GTH Haemophilia Board on the Use of Emicizumab in Patients with Haemophilia A. *Hamostaseologie.* 2020; 40(5): 561–571, doi: [10.1055/a-1127-6476](https://doi.org/10.1055/a-1127-6476), indexed in Pubmed: [32588417](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32588417/).
 23. Müller J, Miesbach W, Prüller F, et al. Standing Commission Labor (STA EKOLA) of the Society of Thrombosis and Haemostasis Research (GTH). An Update on Laboratory Diagnostics in Haemophilia A and B. *Hamostaseologie.* 2022; 42(4): 248–260, doi: [10.1055/a-1665-6232](https://doi.org/10.1055/a-1665-6232), indexed in Pubmed: [35104901](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35104901/).
 24. Lenting PJ. Laboratory monitoring of hemophilia A treatments: new challenges. *Blood Adv.* 2020; 4(9): 2111–2118, doi: [10.1182/bloodadvances.2019000849](https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019000849), indexed in Pubmed: [32396619](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32396619/).
 25. Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, et al. WFH Guidelines for the Management of Hemophilia panelists and co-authors. WFH Guidelines for the Management of Hemophilia, 3rd edition. *Haemophilia.* 2020; 26 Suppl 6: 1–158, doi: [10.1111/hae.14046](https://doi.org/10.1111/hae.14046), indexed in Pubmed: [32744769](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32744769/).
 26. Castaman G, Santoro C, Coppola A, et al. ad hoc Working Group. Emergency management in patients with haemophilia A and inhibitors on prophylaxis with emicizumab: AICE practical guidance in collaboration with SIBioC, SIMEU, SIMEUP, SIPMeL and SISET. *Blood Transfus.* 2020; 18(2): 143–151, doi: [10.2450/2019.0186-19](https://doi.org/10.2450/2019.0186-19), indexed in Pubmed: [31657709](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31657709/).
 27. Bowyer AE, Hickey K, Kitchen S, et al. A next generation FVIII mimetic bispecific antibody, Mim8, the impact on non-factor VIII related haemostasis assays. *Haemophilia.* 2023; 29(6): 1633–1637, doi: [10.1111/hae.14884](https://doi.org/10.1111/hae.14884), indexed in Pubmed: [37824563](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37824563/).
 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, doi: [10.1055/s-0039-1688687](https://doi.org/10.1055/s-0039-1688687), indexed in Pubmed: [31064025](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31064025/).
 29. Nougier C, Jeanpierre E, Ternisien C, et al. With contributions from the Working Group on Biology of Haemorrhagic Disorders (BIMHO, Under the Aegis of GFHT). Emicizumab treatment: Impact on coagulation tests and biological monitoring of haemostasis according to clinical situations (BIMHO group proposals). *Eur J Haematol.* 2020; 105(6): 675–681, doi: [10.1111/ejh.13490](https://doi.org/10.1111/ejh.13490), indexed in Pubmed: [32668090](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32668090/).
 30. Bowyer AE, Maclean RM, Kitchen S. The combination of emicizumab and recombinant factor VIII in plasma: Which assays can we use for accurate measurement? *Int J Lab Hematol.* 2023; 45(3): 368–376, doi: [10.1111/ijlh.14021](https://doi.org/10.1111/ijlh.14021), indexed in Pubmed: [36710421](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36710421/).
 31. Escuriola-Ettingshausen C, Auerswald G, Königs C, et al. Optimizing the management of patients with haemophilia A and inhibitors in the era of emicizumab: Recommendations from a German expert panel. *Haemophilia.* 2021; 27(3): e305–e313, doi: [10.1111/hae.14010](https://doi.org/10.1111/hae.14010), indexed in Pubmed: [32937002](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32937002/).
 32. Bowyer A, Kitchen S, Maclean R. Effects of emicizumab on APTT, one-stage and chromogenic assays of factor VIII in artificially spiked plasma and in samples from haemophilia A patients with inhibitors. *Haemophilia.* 2020; 26(3): 536–542, doi: [10.1111/hae.13990](https://doi.org/10.1111/hae.13990), indexed in Pubmed: [32249990](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32249990/).
 33. Lund J, Jensen K, Burnier L, et al. In vitro effects of combining Mim8 with factor VIII, FVIIa, and activated prothrombin complex concentrates in thrombin generation assays. *J Thromb Haemost.* 2023; 21(6): 1493–1502, doi: [10.1016/j.jtha.2023.03.007](https://doi.org/10.1016/j.jtha.2023.03.007), indexed in Pubmed: [37037699](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37037699/).