

重组猪凝血因子Ⅷ的功能鉴定及潜在治疗作用的研究

王志军,刘旭,李倩卉,王京,路中枢,龙捷,李齐*

庄亚(北京)生物科技有限公司,北京 100176

摘要: **目的** 评估重组猪凝血因子Ⅷ(recombinant porcine factor Ⅷ, rpFⅧ)对血友病 A 型(hemophilia A, HA)伴抑制物患者的潜在治疗作用。**方法** 通过凝血酶酶切、rpFⅧ与血管性血友病因子(von Willebrand factor, VWF)的亲和力、活化部分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT)及血栓弹力图等方法对 rpFⅧ进行了体外活性分析。并对 rpFⅧ在动物体内外的药效及药代动力学特征进行了评估。**结果** rpFⅧ可被凝血酶激活。在 APTT 检测中,相比阴性对照组(105.2 s),rpFⅧ组的凝血时间显著缩短(43.3 s, $P < 0.05$)。在动物实验中,相比模型对照组(43.1 s),rpFⅧ给药组小鼠的血浆在 APTT 检测中的凝血时间显著缩短(28.8 s, $P < 0.05$);且 rpFⅧ与市售药 Xyntha(重组人 FⅧ)在小鼠体内的血药代谢趋势相似,两者间的各项药代动力学参数相近。在含有 FⅧ抑制物的体外药效评价模型中,当以猴血浆(含有抗人 FⅧ抗体)作为研究对象时,在各实验条件下,相比 Xyntha 组, rpFⅧ组的凝血时间均显著缩短($P < 0.05$);在血栓弹力图实验中,相比阴性对照组与 Xyntha 组, rpFⅧ组的凝血时间明显缩短($P < 0.05$);当以 HA 患者血浆(含有抗人 FⅧ抗体)作为研究对象时,相比阴性对照组(患者 1 血浆:99.2 s,患者 2 血浆:97.7 s),rpFⅧ组的凝血时间显著缩短(患者 1 血浆:55.8 s,患者 2 血浆:43.6 s, $P < 0.05$)。**结论** rpFⅧ具备良好的生物学活性,在动物及体外实验中均展示出了对伴抑制物 HA 患者的潜在治疗作用。

关键词: 血友病 A;猪重组凝血因子Ⅷ;FⅧ抑制物;活化部分凝血活酶时间(APTT)

[中图分类号] R966

[文献标志码] A

[文章编号] 1009-6213(2024)05-0218-09

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6213.2024.05.003

Functional characterization and therapeutic potential of recombinant porcine factor Ⅷ

Wang Zhijun, Liu Xu, Li Qianhui, Wang Jing, Lu Zhongshu, Long Jie, Li Qi*

Zhuangya (Beijing) Biotechnology Co., Ltd., Beijing 100176, China

Abstract: Objective Evaluate the potential therapeutic function of recombinant porcine FⅧ (rpFⅧ) in treating hemophilia A (HA) patient with inhibitor. **Methods** The rpFⅧ was characterized with thrombin activation and affinity binding with human VWF, activated partial thromboplastin time (APTT) assay and thromboelastogram (TEG). The pharmacokinetic of rpFⅧ was compared with commercial recombinant human FⅧ (rhFⅧ) in FⅧ knock-out mice. The therapeutic function of rpFⅧ has been tested (ex-vivo) in hemophilia A/hemophilia A with inhibitor animal models as well as confirmed using the plasma of hemophilia A patient with inhibitor. **Results** The biochemical characterization of rpFⅧ indicated that it is fully functional. The pharmacokinetic assay demonstrated that the rpFⅧ has similar PK parameters with rhFⅧ. In pharmacodynamic studies, the rpFⅧ demonstrated the ability of normalizing clotting time in both plasma of hemophilia A and hemophilia A with inhibitor. Similar results have also been confirmed in patient plasma of hemophilia A with inhibitor. **Conclusion** rpFⅧ demonstrated the potential therapeutic effects in both HA animal model and patient plasma with or without inhibitor.

Key words: Hemophilia A; Recombinant porcine factor Ⅷ; Inhibitors towards FⅧ; Activated partial thromboplastin time

* 通讯作者:李齐, Email: chesterli@neoletix.com

血友病A型(Hemophilia A, HA)是一种X染色体连锁的隐性遗传性疾病,是由于体内凝血因子Ⅷ(factor Ⅷ, FⅧ)基因缺陷,导致患者血浆中FⅧ缺乏,从而使患者终身凝血功能异常的疾病^[1-3]。HA的发病率为每5 000个存活新生男婴中有1例患儿^[4-5],其临床表现主要为反复发生的自发性出血,主要以关节和肌肉出血最常见,反复发生可致残,严重者可颅内出血,如未及时救治可致死亡^[6-8]。HA患者也可能在创伤或手术过程中因凝血功能障碍造成失血过多而危及生命^[9]。

HA目前尚无法被治愈,其主要治疗方式为FⅧ替代疗法^[10-12]。然而,由同种抗原(alloantigen)引起的抗人FⅧ抗体(抑制物)可致该替代疗法在部分HA患者中(20%~30%)失效^[13-15]。临床上对于这部分HA伴抑制物患者可使用旁路药物进行治疗,可供选择的旁路药物包括活化的重组凝血因子Ⅶ(activated recombinant coagulation factor Ⅶ, rFⅦa)与激活的凝血酶原复合物(activated prothrombin complex, aPCC)^[16-18]。然而rFⅦa与aPCC的半衰期短,价格昂贵,有形成血栓的风险且缺乏有效的监测手段,这些弊端影响了旁路治疗广泛使用^[19-21]。近年来非因子类血友病治疗药物发展很快,Emicizumab及Concizumab等抗体可用于治疗产生了抗人FⅧ抗体的HA。由于作用机理与FⅧ不同,这些抗体仅适用于预防治疗,同时没有有效的监测手段,这也为非因子类药物对血友病的治疗带来挑战^[22]。

猪FⅧ与人FⅧ的序列同源性较高(B区以外二者的同源性为83%)^[23],早期实验显示猪FⅧ可以与人凝血因子相互作用,其活化部分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT)活性与人FⅧ相似,因此被认为具备在人体内的促凝血功能^[24-25];同时由于二者序列间存在差异(尤其是在易引起抗人FⅧ抗体的A2与C2区域),猪FⅧ与抗人FⅧ抗体的交叉反应很低^[23,26]。基于以上特征,猪FⅧ于20世纪80年代开始被用于HA伴抑制物患者的治疗。最早的商品化猪FⅧ来自于猪血浆(Hyate:C),其疗效很好,但由于该产品有血栓引起的血小板减少症及存在猪细小病毒传播等风险,导致血浆来源的猪FⅧ于2004年退市^[26-27]。OBIZUR(Susoctocog alfa)是由武田药品工业株式会社生产的重组猪凝血因子Ⅷ(rpFⅧ),于2014年获得美国

食品药品监督管理局以及欧洲药品管理局的批准,目前仅用于获得性血友病A(acquired Hhemoophilia A, AHA)的治疗^[28]。目前国内尚无获得批准上市用作药物的猪FⅧ。

鉴于猪FⅧ蛋白结构的特点以及在治疗HA伴抑制物患者方面存在着明显的未被满足的临床需求,我们对本司制备的rpFⅧ(NX02)进行了生物化学鉴定、药效/药代学实验(体内/体外)等检测,以评估其对HA伴抑制物患者的潜在治疗效果。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 主要仪器 半自动凝血仪(Start 4)购自Stago公司,血栓弹力图仪(UD-T5000)购自深圳优迪生物技术有限公司;非标记生物分子互作分析仪(Gator Pilot)购自Gator Bio公司。

1.1.2 主要试剂 NX02(重组猪凝血因子Ⅷ,效价为12 000 U/mL)为本公司自行制备;OBIZUR(注射用重组猪凝血因子Ⅷ,效价为548 U/mL)购自武田制药;Xyntha[注射用重组人凝血因子Ⅷ(recombinant human FⅧ, rhFⅧ),效价为125 IU/mL]购自辉瑞;APTT试剂(STA®-PTT Automate 5, 货号为00595)、凝血因子Ⅷ缺乏血浆(货号为00725)、通用标定血浆(货号为00675)购自Stago;牛凝血酶购自Solarbio(货号为T8021);Protein A探针购自Gator Bio;全长VWF-Fc(von Willebrand Factor-Fc,浓度为0.7 mg/mL)为本司自行制备;FⅧ抗体(羊抗人,货号为PAHFVIII-S,浓度为17.4 mg/mL)购自Prolytix;血栓弹力图(普通杯)检测试剂盒购自深圳优迪生物技术有限公司;食蟹猴血浆(含抗人FⅧ抗体)购自北京昭衍新药研究中心股份有限公司;伴抑制物HA患者血浆(接受过人FⅧ的治疗,体内已产生抗人FⅧ抗体)来自HA患者(患者签署知情同意;伦理审查2023231)。

1.1.3 实验动物 C57BL/6背景FⅧ基因敲除小鼠(HA模型动物)购自上海南方模式生物科技股份有限公司;C57BL/6野生型小鼠购自北京维通利华实验技术有限公司。

本研究中动物实验均符合中国实验动物护理和使用准则,所有涉及动物使用和福利的操作和活动在操作前经机构动物伦理委员会(IACUC)批

准,本试验 IACUC 编号为:ACU21-1985。

1.2 实验方法

1.2.1 NX02 的凝血酶酶切鉴定 凝血酶酶切实验可作为 NX02 的结构和活性鉴别实验。用 HBS 缓冲液 (50 mmol/L Hepes, 0.1 mol/L NaCl, 0.01% Tween20, pH 7.2) 分别稀释牛凝血酶 (thrombin)、NX02。将稀释的 NX02 与稀释的凝血酶混合、混匀,然后置于 37 °C 水浴锅中孵育 5 min (NX02 与凝血酶的终浓度分别为 1 000 nmol/L 与 40 nmol/L), 孵育结束后通过 SDS-PAGE 分析凝血酶对 NX02 的酶切情况。SDS-PAGE 实验步骤为:将 20 μ L 待测样品与 2.5 μ L DTT、7.5 μ L 上样缓冲液 (4X) 混合,然后将该混合物置于沸水中孵育 10 min,将变性处理后的样品进行电泳 (15% 分离胶)。电泳结束后,将胶置于蛋白快速染液中进行染色,染色结束后将胶置于清水中脱色,观察酶切结果。

1.2.2 活化部分凝血活酶时间 (APTT) 检测 APTT 是临床中常见的凝血功能监测方法,主要用于评估内源性凝血系统是否正常。在本研究中,可用于评估 NX02 的体外凝血活性。首先使用缓冲液 (20 mmol/L HEPES, 0.15 mol/L NaCl, 0.05% Tween80, pH 7.4) 按需要稀释待测样品,然后将含有磁珠的反应杯放入凝血仪的孵育孔中,用反向移液法将 50 μ L FVIII 缺乏血浆加入反应杯的底部,37 °C 孵育 30~45 s。然后向每个孔中分别依次加入 5 μ L 上述稀释的待测样品,50 μ L APTT 试剂,37 °C 孵育 240 s。最后加入 50 μ L 20 mmol/L 的 CaCl₂ 启动凝血反应,记录实验的凝血时间。

1.2.3 生物层干涉测量法 (biolayer interferometry, BLI) 检测 本研究使用非标记生物分子互作分析仪对 NX02 与全长 VWF-Fc 蛋白的亲合力进行了检测。首先将 10 μ g/mL 的 VWF-Fc 融合蛋白 (200 μ L) 包被于蛋白 A 探针。VWF-Fc 融合蛋白包被的探针经 PBST 缓冲液 (PBS+0.02% Tween20) 平衡后置于不同浓度的 Xyntha 或 NX02 样品 (0~10 nmol/L) 中,37 °C 下孵育 300 s 以使 VWF 与 FVIII 结合,然后将探针置于 PBST 缓冲液中孵育 500 s 以使结合的 VWF 与 FVIII 解离。蛋白间的结合速率常数 (K_{on}), 解离速率常数 (K_{off}) 及解离平衡常数 (K_d) 通过仪器软件进行计算。

1.2.4 NX02 对 HA 模型小鼠凝血功能的药效评估

本实验将 18 只 HA 模型小鼠随机分为 3 组,分别为模型对照组 (氯化钠注射液, 5.0 mL/kg)、市售药对照组 (OBIZUR, 100 U/kg)、供试品组 (NX02, 100 U/kg)。另选 6 只 C57BL/6 小鼠作为正常对照组 (氯化钠注射液, 5.0 mL/kg)。将 OBIZUR、NX02 或氯化钠经尾静脉注入小鼠体内,注射结束 30 min 后,使用异氟烷对动物进行麻醉,然后经腹主动脉对每只小鼠进行采血 (0.6 mL, 所用抗凝剂为 3.8% 枸橼酸钠溶液, 抗凝剂与全血的比例为 1:9)。采血完成后,将血样离心 (3 000 g, 10 min) 制备血浆,并采用 APTT 方法检测血浆的凝血时间,评价 NX02 对 HA 模型小鼠凝血指标的纠正作用。

1.2.5 NX02 在 HA 模型小鼠体内的药代动力学 (pharmacokinetics, PK) 实验 本实验拟用于评估本司制备的 NX02 在 HA 模型小鼠体内的药代动力学特征,并与现有 HA 治疗所用市售药 (Xyntha) 进行比较。将 HA 模型小鼠分为两组,分别为市售药对照组 (Xyntha, 300 IU/kg) 和供试品组 (NX02, 300 U/kg)。小鼠经尾静脉注射给药,分别在给药结束后 5 min、30 min、1 h、2 h、4 h、8 h、12 h、24 h 使用异氟烷对动物进行麻醉,然后经腹主动脉采血 (每个采血时间点分别采集 4 只动物的全血),分离血浆并采用 APTT 法检测血浆中的 FVIII 效价。PK 数据的分析采用 WinNonlin 软件。

1.2.6 NX02 在含有 FVIII 抑制物模型中的体外药效评估 NX02 拟应用的临床适应证为治疗含有 FVIII 抑制物 (即抗人 FVIII 抗体) 的 HA 患者,因此,本研究应用三种含有 FVIII 抑制物血浆作为体外模型,考察 NX02 的体外药效:①猴血浆 (含有抗人 FVIII 抗体);②HA 类全血 (正常人全血加入羊抗人 FVIII 抗体);③伴抑制物 HA 患者血浆 (含有抗人 FVIII 抗体)。三种模型血浆通过 Bethesda 法确定血浆中的抗 FVIII 抗体的滴度。对含有抗人 FVIII 抗体的猴血浆和伴抑制物 HA 患者血浆,采用 APTT 方法评价 NX02 的促凝血药效。对含有抗人 FVIII 抗体的 HA 类全血,采用血栓弹力图仪法测定 NX02 的促凝血活性。

Bethesda 检测:

Bethesda 检测常用于鉴定 HA 患者血浆中抗 FVIII 抗体的浓度。简言之,首先用 APTT 稀释液 (20 mmol/L HEPES, 0.15 mol/L NaCl, 0.05% Tween80, pH 7.4) 对待检血浆样品进行一系列二倍梯度稀释,

然后将稀释的血浆样品与等体积的FⅧ标准血浆(1 IU/mL)混合,37℃下孵育2 h。孵育结束后通过APTT实验检测孵育样品中的FⅧ活性。通常将能使正常血浆中的FⅧ活性降低50%的滴度定义为1个Bethesda Unit(BU),由此可以计算出待检血浆样品中抗FⅧ抗体的滴度。

APTT检测:

OBIZUR的临床使用剂量是200 U/kg,按照患者65 kg体重5 000 mL全血计算,OBIZUR在血液中的效价约为3 U/mL。因此我们首先使用APTT稀释液稀释NX02至6 U/mL,然后将稀释的NX02与不同BU的猴血浆等体积(20 μL)混合,使得NX02终浓度达到3 U/mL,37℃下孵育2 h。孵育结束后,用APTT实验检测孵育样品的凝血活性以鉴定NX02的促凝血作用。作为对照,市售药Xyntha使用相同的方法进行稀释及APTT实验。其次,我们使用相同的方法评估了在同一BU条件下,不同效价的NX02的促凝血作用。最后,我们采用该方法检测了NX02(3 U/mL)对含有抑制物的HA患者的血浆原液的促凝血作用。

血栓弹力图仪检测:

为了进一步考察NX02在含有高浓度FⅧ抑制物全血中的促凝血活性,我们应用羊抗人FⅧ抗体制备了高BU值的HA类全血。实验中将新鲜采集的人全血分装至1.5 mL离心管中,然后依次加入羊抗人FⅧ抗体(终浓度为0.1 mg/mL,大约相当于77 BU)和不同浓度的待测样品,37℃孵育30 min。孵育结束后,向血栓弹力图检测试剂盒的试剂1中加入1 mL上述经过37℃孵育处理的血液,颠倒混匀。然后依次加入20 μL CaCl₂及340 μL上述制备的血样至实验杯内,启动凝血反应,记录每份样品的凝血时间(R)。

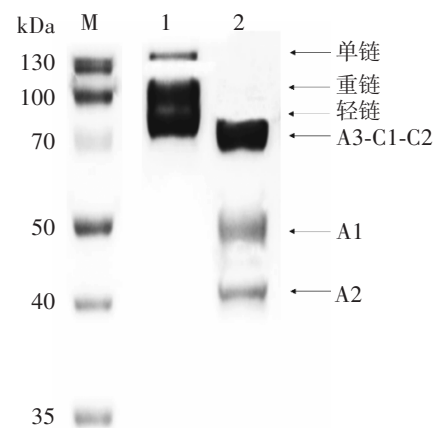
1.2.7 统计分析 采用SPSS 26统计学软件对实验数据进行统计分析,组间两样本均数的比较采用独立样本*t*检验, $P < 0.05$ 时认为有统计学差异。

2 实验结果

2.1 NX02凝血酶激活

前期研究显示rpFⅧ可被凝血酶酶切和激活,从而启动凝血级联反应。为了对制备的NX02进行鉴定,我们首先将凝血酶酶切处理前后的NX02进

行SDS-PAGE分析,实验结果如图1所示:未经过酶切处理的NX02(泳道1)显示出典型的FⅧ图谱:单链(170 kDa)、重链(90 kDa)与轻链(80 kDa)。NX02经凝血酶酶切后(泳道2),其重链(A1-A2)被水解为A1与A2,展现为80 kDa、50 kDa、40 kDa三条电泳条带,分别对应于氨基末端被切割的轻链、重链的A1区、重链的A2区,显示NX02可以被凝血酶完全激活。该实验结果与文献报道一致^[23,29],初步说明我们成功制备了rpFⅧ,具备发挥促凝血活性的结构和活性基础。



注:将制备的重组猪FⅧ(NX02)经过或未经过凝血酶酶切处理后进行SDS-PAGE。M:蛋白分子量标准;泳道1:NX02(未经过凝血酶酶切);泳道2:NX02(凝血酶酶切5 min)

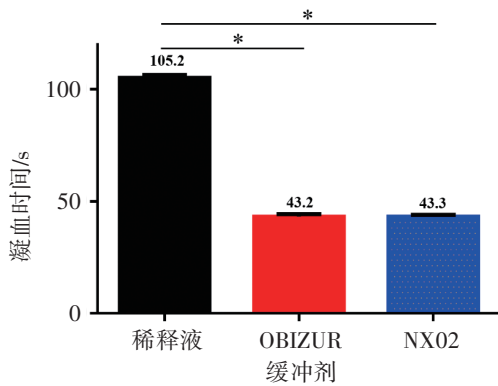
图1 重组猪FⅧ的酶切鉴定

2.2 NX02与市售药(Obizur)体外凝血活性相同

我们应用APTT检测对NX02的促凝血活性进行分析。实验结果如图2所示,相同剂量的NX02与市售药OBIZUR具有相似的促凝血活性。稀释液组(阴性对照)、OBIZUR组(阳性对照)、NX02组的凝血时间分别为:105.2 s、43.2 s、43.3 s。与稀释液组相比,OBIZUR组、NX02组的凝血时间均显著缩短($P < 0.05$),OBIZUR组与NX02组间的凝血时间无统计学差异($P > 0.05$),说明NX02与市售药对照OBIZUR的促凝血活性相当。

2.3 NX02与人VWF的亲合力分析

前期研究证实,FⅧ与VWF的相互作用与FⅧ在体内的药效作用途径和药代动力学特征密切相关^[29]。为了更好地分析NX02的PK/PD特征,我们应用BLI分别检测了Xyntha、NX02与人全长VWF之间的相互作用,根据测定K_d值比较分子间亲和力



注:通过 APTT 实验检测重组猪 FⅧ 的生物活性, * $P < 0.05$

图2 体外药效实验

的大小。实验结果显示(表1)Xyntha 与 VWF 结合的 K_d 值为 2.26 nmol/L, 而 NX02 与 vWF 结合的 K_d 值为 1.17 nmol/L。因此, Xyntha 和 NX02 与 VWF 的亲和力相近。这一结果提示 rpFⅧ(NX02)可能在体内具有与人 FⅧ 相似的药物作用和代谢特征。

表1 亲和力检测

样品名称	$K_{on}/(\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{s}^{-1})$	K_{off}/s	$K_d/(\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$
Xyntha	2.06×10^5	4.65×10^{-4}	2.26×10^{-9}
NX02	9.42×10^5	1.10×10^{-4}	1.17×10^{-9}

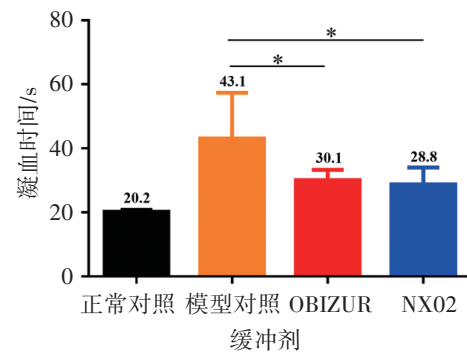
注: K_{on} :结合常数; K_{off} :解离常数; K_d :亲和力常数

2.4 NX02 对 HA 模型小鼠凝血功能的药效评估

FⅧ 基因敲除小鼠具有典型的 HA 表型,是在整体动物水平筛选和评价 HA 治疗药物的理想动物模型。为了评估 NX02 对 HA 的治疗效果,我们以 HA 模型小鼠作为实验动物,将相同剂量的待测样品经静脉给予小鼠。给药 30 min 后,采集小鼠全血及分离血浆,通过 APTT 检测比较 NX02 与 OBIZUR 对 HA 小鼠凝血参数的影响。实验结果显示(图3):正常对照组、模型对照组、OBIZUR 组、NX02 组的凝血时间分别为:20.2 s、43.1 s、30.1 s、28.8 s。与模型对照组相比,OBIZUR 组、NX02 组的凝血时间均显著缩短($P < 0.05$),OBIZUR 组与 NX02 组间的凝血时间无统计学差异($P > 0.05$)。该实验结果证实 NX02 能够在体内发挥与市售药品相似的促凝血药效。

2.5 NX02 在 HA 模型小鼠体内的药代动力学特征

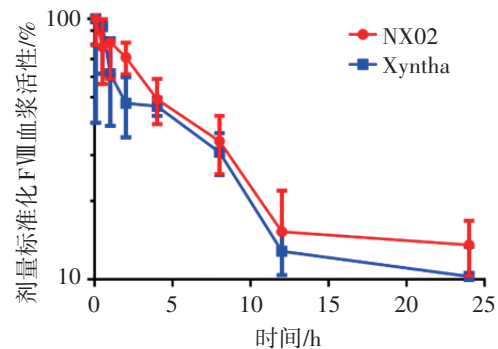
药代动力学参数是 FⅧ 体内作用分析的重要指标。为了观察 NX02 的药代动力学特征,我们以 FⅧ 基因敲除小鼠作为实验动物,将待测样品给予小鼠后,分别在给药后的不同时间采血,分离血浆,采用



注:小鼠经尾静脉注射给药,给药 30 min 后,经腹主动脉采血,分离血浆,进行 APTT 检测。Normal:正常野生型小鼠;模型对照:FⅧ敲除小鼠;OBIZUR:FⅧ敲除小鼠给予 OBIZUR;NX02:FⅧ敲除小鼠给予 NX02, * $P < 0.05$

图3 FⅧ敲除小鼠体外药效实验

APTT 实验检测不同时间点采集的血浆样本中的 FⅧ 活性,绘制血药浓度-时间曲线并计算 NX02 的关键 PK 参数。实验结果显示(图4,表2),NX02 与 Xyntha 的血药浓度随时间变化的曲线相似,且 NX02 与 Xyntha 的各项药代动力学参数相近。该实验证明在 HA 模型动物体内, rpFⅧ(NX02) 与 rhFⅧ(Xyntha) 具有相似的药代动力学特征。



注:FⅧ 基因敲除小鼠经尾静脉注射给药后,分别在给药后的不同时间采血,分离血浆,进行 APTT 检测。

图4 药代动力学 (pharmacokinetics, PK) 实验

2.6 NX02 在含有 FⅧ 抑制物体外模型中的药效评估

抗人 FⅧ 抗体的产生是血友病患者接受 FⅧ 替代疗法时最常见、最棘手的并发症。为了进一步验证 NX02 是否能够用于体内产生了 FⅧ 抑制物的 HA 患者的治疗,本研究分别建立了基于猴血浆(含有抗人 FⅧ 抗体)、HA 类全血(正常人全血加入羊抗人 FⅧ 抗体)和伴抑制物 HA 患者血浆(含有抗人 FⅧ 抗体,共 2 例)的体外药效评价模型。

2.6.1 血浆 FⅧ 抑制物浓度确定 我们首先采用

表2 药代动力学参数

	$T_{1/2}/h$	MRT_{last}/h	$C_{max}/(IU/mL)$	$AUC_{last}/(IU \cdot mL^{-1} \cdot h^{-1})$	$AUC_{INF_{obs}}/(IU \cdot mL^{-1} \cdot h^{-1})$
NX02	7.77	7.40	5.85	42.04	50.59
Xyntha	8.30	7.11	7.78	47.13	56.08

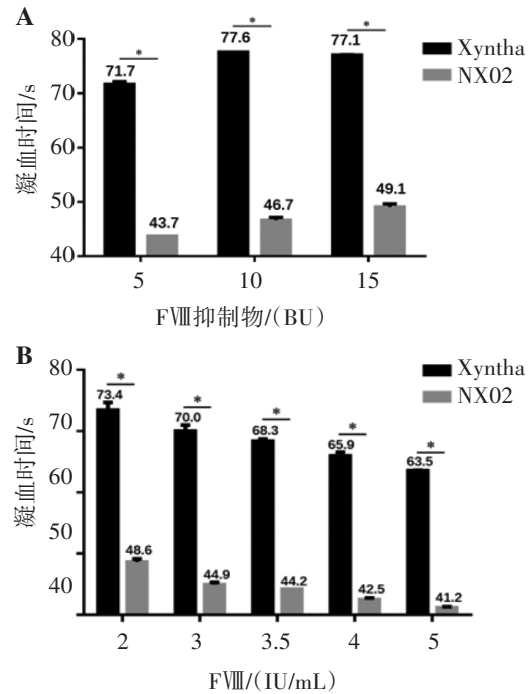
注: IU: 国际单位, $T_{1/2}$: 消除半衰期; MRT_{last} : 平均滞留时间; C_{max} : 药峰浓度; AUC: 药时曲线下面积; AUC_{last} : 从给药时间开始到最后一个点的这段时间的药时曲线下面积; $AUC_{INF_{obs}}$: 从给药开始到理论外推无穷远的时间的药时曲线下面积

Bethesda检测对不同来源血浆或全血中的抗人FVIII抗体的滴度进行了确认。经检测,使正常血浆中的FVIII活性降低50%时,含有抗人FVIII抗体的猴血浆的稀释倍数为39.4倍、羊抗人FVIII抗体制备的HA类全血的稀释倍数为77倍、伴抑制物HA患者1血浆的稀释倍数为62.6倍,伴抑制物HA患者2血浆的稀释倍数为35.6倍。由此得出猴血浆、HA类全血、伴抑制物HA患者1血浆、伴抑制物HA患者2血浆中人源FVIII的抑制物的滴度分别为39.4 BU、77 BU、62.6 BU、35.6 BU。

2.6.2 NX02的体外药效与市售药(Obizur)相当 确定FVIII抑制物滴度后,我们将NX02分别与上述含抗人FVIII抗体的猴血浆、伴抑制物HA患者血浆及HA类全血进行孵育,然后通过APTT或血栓弹力图仪检测NX02的促凝血功能。实验结果(图5A)显示,与Xyntha组相比,NX02(3 U/mL)能够显著缩短含有不同浓度FVIII抑制物的猴血浆凝血时间($P < 0.05$)。又如图5B所示,使用不同浓度的FVIII与含有5 BU抑制物的猴血浆孵育,随着FVIII给药浓度升高,Xyntha组虽然凝血时长呈现下降趋势,但未能有效纠正APTT凝血时间,而NX02组的凝血时间均显著缩短($P < 0.05$),且呈现剂量-反应关系。如图6所示,在2例未稀释的伴抑制物HA患者血浆中分别加入3 U/mL NX02或3 U/mL市售对照药Obizur,与缓冲液组(阴性对照)相比,OBIZUR组与NX02组的凝血时间均显著缩短($P < 0.05$),提示二者均能够纠正体内含FVIII抑制物的HA患者的凝血时间,并且活性相当。

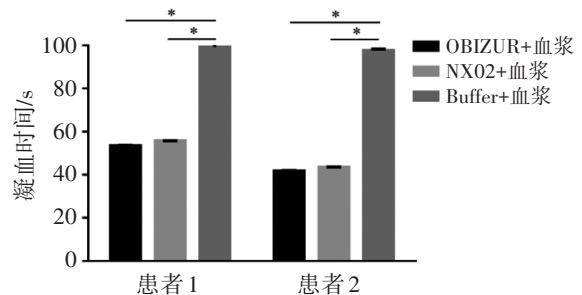
除此之外,我们构建了含有高浓度FVIII抑制物(约77 BU)的HA类全血,并且应用血栓弹力图仪对NX02的体外药效进行了全面评价。结果如表3所示,相比模型对照组及Xyntha组,NX02组展示出了凝血时间缩短的趋势,且该效应呈现剂量依赖性,与上述另外两种体外药效实验结果一致,进一步验证了NX02能够用于含FVIII抑制物HA患者的治疗。

以上实验结果表明在人FVIII抑制物存在的条件下, rpFVIII依然能够发挥促凝血的作用。



注:将稀释的NX02、Xyntha分别与稀释的含有人FVIII抑制物的猴血浆混合,37 °C孵育2 h后,对孵育物进行APTT检测。
A. FVIII(3 IU/mL)与不同浓度的人FVIII抑制物孵育; B. 不同浓度的FVIII与人FVIII抑制物(5 BU)孵育, * $P < 0.05$

图5 体外药效检测



注:将重组猪FVIII(3 U/mL)分别与伴抑制物HA患者的血浆混合,37 °C孵育2 h后,对孵育物进行APTT检测, * $P < 0.05$

图6 体外药效检测

表 3 血栓弹力图仪检测

组别	凝血时间/min		
	检测 1	检测 2	平均值
正常对照组(人全血)	6.7	6.7	6.7
模型对照组(人全血+FVIII抗体)	48.8	56.4	52.6
模型+NX02(3 IU/mL)	10.6	11.9	11.3
模型+Xyntha(3 IU/mL)	29.1	24.1	26.6
模型+NX02(2 IU/mL)	10.2	13.6	11.9
模型+Xyntha(2 IU/mL)	>30.0	>30.0	>30.0
模型+NX02(1 IU/mL)	23.2	16.6	19.9
模型+Xyntha(1 IU/mL)	>30.0	>30.0	>30.0

注:FVIII:八因子

3 讨论

目前,重组 FVIII 主要由哺乳动物细胞表达系统生产,如 CHO 及 BHK 细胞^[30]。研究显示其复杂的蛋白结构与翻译后修饰,如 N 糖基化,唾液酸含量及硫酸化等皆影响着重组 FVIII 的药代动力学及药效动力学^[30]。我们的 FVIII 表达平台是基于 FVIII 与 VWF 的共同表达,独特的表达方式使得 FVIII 重组蛋白表达量得到了大幅的提高(rhFVIII: >2 000 IU/mL, rpFVIII: >6 000 U/mL)。为了验证 NX02 在哺乳动物细胞表达系统高效表达的同时兼备合格的翻译后修饰,我们使用 FVIII 基因敲除小鼠对 NX02 的药效及药代动力学进行了研究。文献报道猪 FVIII 的药代动力学参数与人 FVIII 相似^[31-32],因此 PK 实验中我们以市售药 Xyntha(人源 FVIII)作为对照。HA 小鼠模型药代动力学实验数据显示 rpFVIII(NX02)的半衰期($T_{1/2}$)和药物在体内的吸收与分布(AUC)均与市售药对照 Xyntha 相似。BLI 检测得到的 NX02 与人 VWF 的亲合力数据也为 NX02 药代动力学数据提供了佐证。这说明我司的 FVIII 表达平台可以生产高质量的重组 rpFVIII。

基于猪源 FVIII 与人源 FVIII 序列的同源性^[23]及前文所述二者 A2 及 C2 结构域的序列差异,一般认为猪源 FVIII 既可以用于治疗 HA,同时也对 HA 伴抑制物患者具有疗效。在退市之前,血浆来源的猪 FVIII 在治疗 HA 伴抑制物患者方面已有将近 20 年的历史,其安全性和药效均很好。一项包括 157 名患者(总计 2 472 次出血治疗)的国际回顾性研究显示,血浆来源的猪 FVIII 的治疗总有效率为 90%,其中大

约 80% 的患者的临床反应被评为良好或优秀^[33]。OBIZUR 的 II 期临床试验以 HA 伴抑制物患者作为研究对象,研究结果显示,给予 rpFVIII 后,所有 9 名患者(其中 8 名患者体内的抗人 FVIII 抗体的滴度 >10 BU/mL)的出血现象均得到了有效控制^[34]。这也在实验中得到了验证,等量的 OBIZUR 与 NX02 分别注入 FVIII 基因敲除模型小鼠,实验结果显示两种 rpFVIII 均可缩短凝血时间,且在统计学上无差异。为了验证 NX02 是否可以用于治疗 HA 伴抑制物患者,我们采用了三种不同的方法进行药效评估。第一种方法是采用含有抗人 FVIII 抗体的猴血浆。文献报道当抗人 FVIII 抗体的浓度超过 5 BU/mL 时,人 FVIII 即丧失止血疗效^[33],因此在上述实验中,抗人 FVIII 抗体浓度为 >5 BU/mL 的猴血浆被用于比较 Xyntha 与 NX02 的疗效。APTT 实验结果显示, NX02 的促凝血功能显著优于 Xyntha,表现为 APTT 检测值显著缩短,且与 NX02 的剂量正相关。第二种方法是采用 HA 伴抑制物患者血浆,实验中 NX02 的剂量选择是基于 OBIZUR 在治疗 AHA 时的初始剂量。实验结果显示,尽管患者血浆中的抗人 FVIII 抗体的滴度远高于 5 BU/mL, NX02 仍然能够发挥促凝血药效。第三种方法是采用绵羊抗人 FVIII 多抗制备的 HA 类全血。血栓弹力图实验同样显示 NX02 的促凝血功能明显优于 Xyntha。血栓弹力图实验以全血作为实验材料,模拟人体内环境下的凝血过程,其更接近真实的凝血状态,该实验方法已被用于评估 rpFVIII 对 HA 伴抑制物患者的体外药效^[35]。我们的实验结果进一步验证了 NX02 的药效。

综上所述,我司制备的 rpFVIII 在体外实验及动物实验中展示出了与市售药相当的药效、相似的药代动力学特征,且在人 FVIII 抑制物存在的条件下, rpFVIII 依然能够发挥促凝血的作用,说明我司制备的 rpFVIII 对 HA 伴抑制物患者具有潜在的治疗作用。当然,动物实验与体外实验的研究结果是否能与临床试验的效果一致有待进一步验证。

作者贡献声明 王志军负责文献查阅、实验设计与实施、数据处理分析、文章起草;刘旭、李倩卉、王京、路中枢负责实施实验;龙捷负责文章审阅与修改;李齐负责确定研究方向、构思实验、技术指导、文章审阅。

利益冲突 所有作者均为庄亚生物的雇员。庄亚生物为本研究中涉及的仪器设备、实验试剂提供经费支持。通讯作者为相关专利的作者。我们郑重声明:本文的所有作者均本着诚信、科学和客观的原则进行研究,所有结果均真实可信。

参考文献

- [1] Jankowska K I, Chattopadhyay M, Sauna Z E, et al. A Foundational Study for Normal *F8*-Containing Mouse Models for the miRNA Regulation of Hemophilia A: Identification and Analysis of Mouse miRNAs that Downregulate the Murine *F8* Gene[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(16):5621.
- [2] Gitschier J, Wood W I, Goralka T M, et al. Characterization of the human factor VIII gene[J]. *Nature*, 1984, 312(5992): 326-330.
- [3] Yoneyama K, Schmitt C, Portron A, et al. Clinical pharmacology of emicizumab for the treatment of hemophilia A[J]. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 2023, 16(9):775-790.
- [4] Jardim L L, Chaves D G, Rezende S M. Development of inhibitors in hemophilia A: An illustrated review[J]. *Res Pract Thromb Haemost*, 2020, 4(5):752-760.
- [5] Franchini M, Mannucci P M. Hemophilia A in the third millennium[J]. *Blood Rev*, 2013, 27(4):179-184.
- [6] 雷平冲. 血友病因子VIII及IX抑制物发生机制探讨[J]. *血栓与止血学*, 2016, 22(2):230-234.
- [7] Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, et al. WFH Guidelines for the Management of Hemophilia, 3rd edition [J]. *Haemophilia*, 2020, 26(Suppl 6):1-158.
- [8] Fischer K, De Kleijn P, Negrier C, et al. The association of haemophilic arthropathy with Health-Related Quality of Life: a post hoc analysis[J]. *Haemophilia*, 2016, 22(6): 833-840.
- [9] 侯闪,尹骏,姚文兵,等. 重组人凝血因子VIII药物的结构改造及其类似物开发的研究进展[J]. *药学进展*, 2019 (10):749-758.
- [10] Srivastava A, Brewer A K, Mauser-Bunschoten E P, et al. Guidelines for the management of hemophilia [J]. *Haemophilia*, 2013, 19(1):e1-e47.
- [11] Lambert T, Benson G, Dolan G, et al. Practical aspects of extended half-life products for the treatment of haemophilia[J]. *Ther Adv Hematol*, 2018, 9(9): 295-308.
- [12] Parvathaneni K, Abdeladhim M, Pratt K P, et al. Hemophilia A inhibitor treatment: the promise of engineered T-cell therapy[J]. *Transl Res*, 2017, 187:44-52.
- [13] Eckhardt C L, Van Velzen A S, Peters M, et al. Factor VIII gene (*F8*) mutation and risk of inhibitor development in nonsevere hemophilia A[J]. *Blood*, 2013, 122(11):1954-1962.
- [14] Peyvandi F, Ettingshausen C E, Goudemand J, et al. New findings on inhibitor development: from registries to clinical studies[J]. *Haemophilia*, 2017, 23 Suppl 1:4-13.
- [15] Peyvandi F, Mannucci P M, Garagiola I, et al. A Randomized Trial of Factor VIII and Neutralizing Antibodies in Hemophilia A[J]. *N Engl J Med*, 2016, 374(21):2054-2064.
- [16] 中华医学会血液学分会血栓与止血学组,中国血友病协作组. 血友病合并抑制物诊断与治疗中国指南(2023年版)[J]. *中华血液学杂志*, 2023, 44(11):881-889.
- [17] Meeks S L, Batsuli G. Hemophilia and inhibitors: current treatment options and potential new therapeutic approaches [J]. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2016, 2016(1):657-662.
- [18] Bowyer A, Shepherd F, Platton S, et al. Cross-reacting recombinant porcine F VIII inhibitors in patients with acquired haemophilia A[J]. *Haemophilia*, 2020, 26(6): 1181-1186.
- [19] Huth-Kühne A, Baudo F, Collins P, et al. International recommendations on the diagnosis and treatment of patients with acquired hemophilia A[J]. *Haematologica*, 2009, 94(4):566-575.
- [20] Tjønnfjord G E, Holme P A. Factor eight inhibitor bypass activity (FEIBA) in the management of bleeds in hemophilia patients with high-titer inhibitors[J]. *Vasc Health Risk Manag*, 2007, 3(4):527-531.
- [21] Hoffman M, Dargaud Y. Mechanisms and monitoring of bypassing agent therapy[J]. *J Thromb Haemost*, 2012, 10(8):1478-1485.
- [22] Lenting P J. Laboratory monitoring of hemophilia A treatments: new challenges[J]. *Blood Adv*, 2020, 4(9): 2111-2118.
- [23] Doering C B, Healey J F, Parker E T, et al. High level expression of recombinant porcine coagulation factor VIII [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(41):38345-38349.
- [24] Mahlangu J, Andreeva T A, Macfarlane D, et al. A Phase II Open-Label Study Evaluating Hemostatic Activity, Pharmacokinetics and Safety of Recombinant Porcine Factor VIII (OBI-1) in Hemophilia A Patients with Alloantibody Inhibitors Directed Against Human F VIII [J]. *Blood*, 2007, 110(11):783.

- [25] Campbell S, Mason J, Prasad R, et al. Acquired haemophilia and haemostatic control with recombinant porcine factor VIII: case series[J]. Intern Med J, 2021, 51(2):215-219.
- [26] Fosbury E, Drebes A, Riddell A, et al. Review of recombinant anti-haemophilic porcine sequence factor VIII in adults with acquired haemophilia A [J]. Ther Adv Hematol, 2017, 8(9):263-272.
- [27] Abou-Ismaïl M Y, Vuyyala S, Prunty J, et al. Short term efficacy of recombinant porcine factor VIII in patients with factor VIII inhibitors [J]. Haemophilia, 2020, 26(4): 601-606.
- [28] Janbain M, Leissing C A, Kruse-Jarres R. Acquired hemophilia A: emerging treatment options [J]. J Blood Med, 2015, 6:143-150.
- [29] Lillicrap D, Schiviz A, Apostol C, et al. Porcine recombinant factor VIII (Obizur; OBI-1; BAX801): product characteristics and preclinical profile [J]. Haemophilia, 2016, 22(2): 308-317.
- [30] Canis K, Anzengruber J, Garenaux E, et al. In-depth comparison of N-glycosylation of human plasma-derived factor VIII and different recombinant products: from structure to clinical implications [J]. J ThrombHaemost, 2018, 16: 1592-1603.
- [31] Hermans C, Owens D, Lilley P, et al. Single-dose pharmacokinetics of porcine factor VIII (HyateC) [J]. Haemophilia, 2002, 8(Suppl 1): 33-38.
- [32] Kempton C L, Abshire T C, Deveras R A, et al. Pharmacokinetics and safety of OBI-1, a recombinant B domain-deleted porcine factor VIII, in subjects with haemophilia A [J]. Haemophilia, 2012, 18(5): 798-804.
- [33] Dargaud Y, Escuriola - Ettingshausen C. Recombinant porcine factor VIII: Lessons from the past and place in the management of hemophilia A with inhibitors in 2021 [J]. Res PractThrombHaemost, 2021, 5(8): e12631.
- [34] Mahlangu J N, Andreeva T A, Macfarlane D E, et al. Recombinant B-domain-deleted porcine sequence factor VIII (r-pFVIII) for the treatment of bleeding in patients with congenital haemophilia A and inhibitors [J]. Haemophilia, 2017, 23(1): 33-41.
- [35] Négrier C, Oldenburg J, Kenet G, et al. Recombinant porcine factor VIII corrects thrombin generation in vitro in plasma from patients with congenital hemophilia A and inhibitors [J]. Res PractThrombHaemost, 2022, 6(4): e12731.

(收稿日期:2024-03-06)

(本文编辑:钱婷婷;本文审校:叶絮)

·读者·作者·编者·

本刊关于统计学处理的要求

关于资料的统计学处理,应根据实验或调查设计的条件,选用合适的统计学分析方法。对于定量资料,应正确选用 t 检验、 q 检验或方差分析;对于定性资料应选用卡方检验等。统计结果的解释和表达用概率 P 表达时,对比组之间的差异应叙述为差异具有统计学意义。如: $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$, 差异具有统计学意义。而不应说“对比组之间具有显著性(或非常显著性)的差异”。必要时,应写明所用统计分析方法的具体名称(如成组设计资料的 t 检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的 q 检验等),统计量的具体值(如 $t=3.45$, $\chi^2=4.68$, $F=6.79$ 等)及具体的 P 值(如 $P=0.0238$)应尽可能列出;当涉及到总体参数时最好给出 95% 可信区间。

统计学符号的书写:按 GB 3358—82《统计学名词及符号》的有关规定书写,常用如下:(1)样本的算术平均数用英文 x (中位数仍用 M);(2)标准差用英文小写 s ;(3)标准误用英文字母 S_x ;(4) t 检验用英文小写 t ;(5) F 检验用英文大写 F ;(6)卡方检验用希文小写 χ^2 ;(7)相关系数用英文小写 r ;(8)自由度用希文小写 ν ;(9)概率用英文大写 P (P 值前应给出具体检验值,如 z 值、 χ^2 值、 q 值等)。以上符号均用斜体。

《血栓与止血学》编辑部