

血友病治疗新进展

孙博洋 杨仁池

Recent advances in therapies for haemophilia Sun Boyang, Yang Renchi

Corresponding author: Yang Renchi, Thrombosis and Hemostasis Centre, Institute of Hematology and Blood Diseases Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300020, China. Email: rcyang65@163.com

近两年来,血友病治疗飞速发展,凝血因子替代治疗已经不再是唯一有效的治疗方法。新的治疗方向着眼于延长给药间隔时间,以减少预防治疗和静脉穿刺的频率,从而提高患者的依从性和生活质量。长效凝血因子产品的临床实践表明,由于受到血管性血友病因子半衰期的影响,长效凝血因子Ⅷ(FⅧ)制剂半衰期延长不理想。近年来非因子类替代治疗研究取得长足进步,基因治疗也取得令人振奋的进展。

一、非因子药物治疗

(一)双特异性单克隆抗体 Emicizumab

Emicizumab 又名 ACE910,是一种人源性的针对 FIXa 与 FX 的嵌合双特异性抗体,通过模拟 FⅧ的功能而发挥作用,治疗血友病 A^[1]。Emicizumab 通过其双臂分别与 FIXa 及 FX 结合,并处于合适的空间构象,促进 FIXa 诱导的 FX 活化和酶复合物的形成,加速凝血过程^[1-3]。在获得性血友病(AHA)的动物模型中短期和长期应用 Emicizumab 分别证实了其止血与预防出血的作用^[4-5]。第 1 个人体试验在 64 例健康受试者(40 例日本人和 24 例高加索人)中开展,接受单次皮下注射 Emicizumab^[6]。在此研究中,Emicizumab 的药物代谢动力学呈线性特点,半衰期约为 4~5 周。离体试验表明 Emicizumab 缩短 APTT、增加凝血酶生成的作用呈剂量相关特点。该试验中未发现严重的不良事件^[6]。在一项非盲、非随机、剂量递增的 I 期临床试验中,18 例重型血友病 A 患者被分为 3 组,分别接受了 0.3、1.0、3.0 mg/kg 每周 1 次的皮下注射长达 12 周。三个剂量组患者的年出血率均较前有明显降低,且安全性良好,未发现针对 Emicizumab 的中和性抗体^[7]。

HAVEN1 是一项非盲、随机、多中心的 III 期临床试验,共

纳入 109 例 12 岁及以上伴抑制物的血友病 A 患者^[8]。患者被随机分为 2 组:试验组接受 Emicizumab 预防治疗,对照组不接受预防治疗。试验组的中位年出血率较对照组的 23.3 次降低 87%,显示出显著的预防作用。患者自身对照表明:Emicizumab 预防治疗较之前的旁路途径预防治疗,出血率降低 79%。所有 5 例血栓事件发生于 Emicizumab 与活化凝血酶原复合物(aPCC)联用的患者,单独使用 Emicizumab 及 Emicizumab 联合重组人凝血因子 VIIa(rF VIIa)的患者并未出现不良事件。随后长达 6 个月的研究中,控制旁路途径药物剂量并避免使用 aPCC,未出现血栓事件^[8]。HAVEN2 是一项非盲、随机的 III 期临床试验,最初纳入 20 例 2~12 岁的儿童患者,接受每周 1 次 Emicizumab 预防性治疗,显示了良好的安全性和有效性^[8]。Emicizumab 优点包括可以皮下注射,每周 1 次,并且适用于伴抑制物的血友病 A 患者。缺点为不适用于血友病 B 患者。目前罗氏公司的该药物已获得 FDA 批准上市,商品名为 Hemlibra。国内的 III 期临床试验也已经正式启动。

(二)抗凝途径抑制剂

1. Fitusiran: Fitusiran 是以抗凝血酶为作用靶点的小干扰 RNA (siRNA) ALN-AT3。体内的抗凝血酶通过灭活 FIXa 及凝血酶发挥抗凝作用。通过 RNA 干扰的方法沉默肝脏抗凝血酶基因表达的设想在前期的一系列动物实验中得到证实:对血友病模型动物皮下注射 fitusiran 可以强有力且持续地降低血浆抗凝血酶的水平,并且呈剂量依赖性,从而促进血栓形成、恢复止血^[9]。Pasi 等^[10]报道了关于 ALN-AT3 的一项 I 期临床试验:4 例健康受试者和 25 例不伴抑制物的中型或重型血友病 A 或 B 患者参与试验。健康受试者随机接受单次 0.03 mg/kg Fitusiran 皮下注射或安慰剂。患者共接受 3 次皮下注射,每周 1 次(3 个剂量组分别为 0.015、0.045 和 0.075 mg/kg)或每月 1 次(每组分别给予 0.225、0.45、0.90、1.80 mg/kg 或总量 80 mg)。研究结果显示:每月 1 次的给药方案呈剂量相关性持续降低抗凝血酶水平,从而促进凝血。未发生严重不良反应。由于这项 I 期试验观察时间有限,研究人员在此基础上进行了 II 期试验——开放性延长期(OLE)研究,共纳入 33 例患者(14 例伴抑制物,19 例不伴抑制物),每月给药 1 次,每次剂量固定为 50 mg 或 80 mg。预防出血的疗效与前一致。一项名为 ATLAS 的 III 期临床试验正在进行中,目的是评价 80 mg 每月 1 次的用药方案的疗效和安全性。2017 年 9 月,在 OLE 研究中一例同时接受 FⅧ治疗的不伴抑制物的患者发生了窦静脉血栓^[11],随即暂停了一切 Fitusiran 的临床试验。最近美国 FDA 在公司提供了相关风险管控措施后重新批准了临床试验。Fitusiran 可以皮下

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2018.10.018

基金项目:“十三五”国家重点研发计划精准医学研究重点专项(2016YFC0901503)

作者单位:300020 天津,中国医学科学院、北京协和医学院血液病医院(血液学研究所)

通信作者:杨仁池,Email:rcyang65@163.com

注射,注射间隔长达1个月,适用于血友病A、B患者(包含伴抑制物者),缺点在于存在严重不良事件的可能性。

2. Concizumab:组织因子途径抑制因子(TFPI)是组织因子凝血途径最主要的负性调控因子。在所有TFPI的抑制剂中,Concizumab的研究最为成熟。Concizumab是一种针对组织因子途径抑制因子的人源性单克隆抗体,不但可以竞争性抑制TFPI的KPI-2区域高亲和力结合,阻止FXa与TFPI结合,还可以阻止TFPI对TF-FVIIa复合物的抑制作用,从而增加酶复合物和凝血酶的形成^[12]。在兔血友病模型中,静脉或皮下注射Concizumab较使用rFVIIa可以明显减少皮肤出血^[12]。名为Explorer1的I期剂量递增随机试验在24例血友病A/B患者和28例健康人施行,静脉注射0.5~9 000 μg/kg或皮下注射50~3 000 μg/kg后,最多可在43 d后仍可检测到血浆中的单克隆抗体,14 d后测得的TFPI含量和活性仍低于正常,期间未发生不良事件,亦无药物抗体产生^[13]。在此基础上,在名为Explorer2的多中心、非盲、多次给药的I期临床试验中,对4例健康男性给予Concizumab 250 μg/kg隔日1次共8次可以促进凝血酶的生成,且血浆Concizumab浓度与凝血酶生成呈正相关而与血浆TFPI水平呈负相关。同时,在18例重型血友病患者的血浆中加入Concizumab后,可以使凝血酶的生成恢复至接近正常水平。一项名为Explorer3的多中心、双盲、安慰剂对照的一期临床试验已经完成,主要在血友病A患者中评估了多种给药剂量(0.25、0.5、0.8 mg/kg皮下注射,每4 d给药1次)的安全性、药物代谢动力学特征和药效学特征。事后分析显示至少100 ng/ml的血药浓度可以最有效地减少出血。为了评价在血友病A、B患者中预防性使用Concizumab的安全性和有效性,两项临床试验——Explorer4(伴抑制物)和Explorer5(不伴抑制物)正在进行中^[14]。Concizumab可以皮下注射,适用于血友病A、B患者(包含伴抑制物者)。

3. 蛋白C和蛋白S抑制剂:蛋白C是一种肝脏合成的维生素K依赖蛋白,以丝氨酸蛋白酶原形式存在于血液中。凝血酶与血栓调节蛋白结合后水解蛋白C使其活化,在内皮细胞蛋白C受体的加速下形成活化蛋白C(APC)。APC是一种强力抗凝酶,主要通过蛋白水解作用不可逆地灭活FVa和FVIIIa而下调凝血过程。蛋白C抑制剂(PCI)和 α_1 -抗胰蛋白酶(α_1 -AT)都是丝氨酸蛋白酶抑制剂家族的内源性APC抑制剂,但二者的反应活性及特异性均较差。Polderdijk等^[15]通过对PCI和 α_1 -AT中易断P-P'键内与周围的残基进行修饰,得到了特异性较为理想的丝氨酸蛋白酶抑制剂。其中某种 α_1 -AT的变体(KRK α_1 -AT)在动物模型中可以促进凝血酶生成、纤维蛋白和血小板的聚集,并可以使尾部严重损伤的血友病B模型小鼠停止出血。

理想的APC特异性的抑制剂具有以下特点:快速而特异的作用、长半衰期、可以皮下注射、低免疫原性。蛋白S不但可以作为APC的辅因子,还具有不依赖APC的抗凝活性——通过促进TFPI与FXa的相互作用抑制组织因子活性。鉴于蛋白S的这种关键的双重调节作用,及前期大量小鼠实

验表明蛋白S与TFPI在出血及关节损伤中的关键作用,Prince等^[16]设想由成纤维样滑膜细胞产生的TFPI- α 及其辅因子蛋白S与血栓调节蛋白-内皮细胞蛋白C受体-蛋白C(TM-EPCR-PC)途径组成的关节内抗凝系统在关节出血的发生中起关键作用。在血友病A小鼠模型中使用沉默蛋白S的RNA可以增加凝血酶生成、使纤维蛋白更加密集;与抗TFPI抗体作用一致,蛋白S中和抗体可以使血友病A患者血浆的凝血酶生成潜力恢复正常。因沉默RNA具有较长半衰期,故可减少注射次数,并且有皮下注射用药的可能性。蛋白S作为通过多种途径发挥抗凝作用的辅因子,其可行性及潜在的缺点需要进一步研究。

二、基因治疗

血友病作为单基因遗传病,是基因治疗的最好靶疾病之一。血友病基因的治疗近年来取得了显著进展。代新岳等^[17]从基因载体及基因编辑方法等技术角度对血友病基因治疗的进展做了综述。本部分将重点从近期临床试验的角度总结基因治疗的成果和面临的挑战。

(一)血友病B

由于FIX基因片段较FVIII小,技术上更易实现,故基因治疗血友病B起步更早。2011年公布的一项I/II期临床试验结果显示,Nathwani等^[18]首次采用基因治疗成功治愈血友病。6例未产生抑制物且血清AAV8抗体阴性的重型血友病B患者被纳入试验,通过将携带密码子优化FIX基因的sc-AAV(自身互补的AAV)载体通过外周静脉注射的方式进行基因治疗,所有患者的FIX均呈剂量依赖性升高,最高可升至正常值的8%~12%,其中4例患者完全脱离FIX预防治疗并再无出血,另外2例患者虽然未脱离FIX输注,但预防治疗的间隔明显延长。其中两例高剂量注射患者可能产生了针对病毒的免疫清除反应,表现为肝酶明显升高,但短期注射糖皮质激素之后能抑制这种免疫反应,并未使转基因表达丢失。在6~16个月的随访中,无其他不良事件发生。之后研究者延长观察期至3年,且增加了高剂量组患者病例数,也得到了类似的结果^[19]。2017年12月,George等^[20]发表了一项关于SPK9001的I/II期临床试验结果,是目前为止单次静脉注射基因治疗获得最稳定因子活性水平和最佳临床预后的报道。SPK-9001是辉瑞和Spark Therapeutics合作研发的血友病B试验性新药,本质上是携带肝脏特异性启动子和高活性FIX(Padua)单点突变基因(factor IX-R338L)其衣壳表达经密码子优化的、单链腺相关病毒(ss-AAV)载体。FIX-Padua是一种FIX催化区发生错义突变的FIX变体,可以使FIX活性提高8倍^[21]。10例患有血友病B的成年男性受试者单次注射SPK-9001后12周,测得所有患者的稳态FIX活性为正常值的14%~81%。这个活性水平足以控制出血症状。年出血率(ABR)降低了97%,从注射前每年平均出血11.1次到每年0.4次,而凝血因子IX的使用减少了99%。试验过程中无明显的不良反应,未出现血栓及中和抗体,机体免疫反应导致的短暂的肝酶升高和FIX降低在短期应用糖皮质激素后可恢复正常。Miesbach等^[22]进行了一项多国

联合、多中心、非盲的 II 期临床试验,使用新型基因导入产品 AMT-060 对 10 例血友病 B 患者进行基因治疗。AMT-060 由 AAV5 载体和被肝脏特异性启动子(LP1)调控的密码子优化的野生型人 F IX 基因组成,从而可以使 F IX 特异性在肝脏中表达。结果显示单次 AMT-060 注射可以安全有效地增加 F IX 活性、减少自发出血和预防性 F IX 使用,并且未检测到针对腺病毒的细胞免疫反应,有 3 例患者出现轻度转氨酶升高。SPK-9001 和 AMT-060 均已获得美国 FDA 的突破性疗法资格认定,后者更是获得了欧洲药品管理局的重点药品快速审评资格。除上述产品外,还有多个公司的产品处于不同的试验阶段(包括 AskBio、DTX101、SB-F IX、FLT180),各种产品的差异主要在于使用的基因、AAV 类型以及使用剂量^[23]。我国科研工作者在血友病小鼠基因模型中发现,使用人血清白蛋白培养 AAV8-F IX 可以使血友病 B 小鼠的 F IX 水平升高 5 倍,这一发现可能有助于提高人体试验的疗效^[24]。

(二) 血友病 A

编码 F VIII 的基因片段长约 7 kb,约等于编码 F IX 基因片段长度的 2 倍。因此利用包装能力有限的 AAV 衣壳携带野生型 F VIII 存在很大的困难。Rangarajan 等^[25]对人 F VIII 基因进行改造,删除无功能的 B 区域获得密码子优化的 SQ 型变体 F VIII,并由 AAV5 充当载体。9 例男性重型血友病 A 患者被纳入一项 I / II 期剂量递增的临床试验中,用以评估单次注射 AAV5-hF VIII-SQ 的安全性和有效性,随访期长达 52 周。结果表明 F VIII 在患者中成功表达,且 F VIII 活性水平呈剂量相关性。在接受最高剂量为 6×10^{13} vg/kg 的 7 例患者中,6 例患者的 F VIII 活性水平在 20 ~ 24 周内保持在正常值范围,52 周后仍维持 1 600 ~ 16 400 IU/L (平均 7 700 IU/L)。另外 1 例接受高剂量治疗的患者因子水平波动于 1 200 ~ 3 200 IU/L,转为轻型血友病。所有患者均接受了短期的糖皮质激素治疗,未发现针对 AAV5 的细胞免疫反应及明显的肝细胞损伤。体液中的载体 DNA 水平随时间逐渐下降,并未在配子中检测到载体 DNA,表明未整合入患者的基因组。除此之外还有多个临床试验在招募和进行中,包括 Bio Marin 公司的 BMRN-270、Spark 公司的 SEK-8011、Sangamo 公司的 SB-525 等^[23]。目前,慢病毒载体已经被成功应用于血友病犬中,因其比 AAV 强大的包装携带能力,在血友病 A 患者中显示出非常广阔的应用前景^[26]。

目前基因治疗的研究进展迅速,旨在提高转染效率的基因以及载体选择的优化在不断进行。针对患者本身存在 AAV 抗体的检测策略也在不断完善^[27]。各项临床试验旨在监测给药的安全性和有效性,并探索最低给药剂量以减少不良反应。然而基因治疗仍面临一系列问题,包括如何解决整合基因毒性和脱靶效应、降低致癌性、提高转染和编辑效率、控制免疫反应、提高抗病毒衣壳抗体检出率。伦理问题也是不可回避的,除此之外,基因治疗价格不菲^[28]。

综上所述,在传统的替代疗法以外,血友病患者的治疗有了更多选择,尤其对伴抑制物的患者来说看到了治疗的希望。非因子类药物由于可应用于伴抑制物的患者,并且半衰

期长、可以皮下注射等特点,提高了患者的依从性。AAV 介导的基因治疗在临床试验中取得了里程碑式的突破,使血友病的完全治愈成为可能。

参考文献

- [1] Kitazawa T, Igawa T, Sampei Z, et al. A bispecific antibody to factors IXa and X restores factor VIII hemostatic activity in a hemophilia A model [J]. *Nat Med*, 2012, 18 (10):1570-1574. DOI: 10.1038/nm.2942.
- [2] Arruda VR, Doshi BS, Samelson-Jones BJ. Novel approaches to hemophilia therapy: successes and challenges [J]. *Blood*, 2017, 130(21):2251-2256. DOI: 10.1182/blood-2017-08-742312.
- [3] Kitazawa T, Esaki K, Tachibana T, et al. Factor VIIIa-mimetic cofactor activity of a bispecific antibody to factors IX/IXa and X/Xa, Emicizumab, depends on its ability to bridge the antigens [J]. *Thromb Haemost*, 2017, 117(7):1348-1357. DOI: 10.1160/TH17-01-0030.
- [4] Muto A, Yoshihashi K, Takeda M, et al. Anti-factor IXa/X bispecific antibody ACE910 prevents joint bleeds in a long-term primate model of acquired hemophilia A [J]. *Blood*, 2014, 124 (20):3165-3171. DOI: 10.1182/blood-2014-07-585737.
- [5] Muto A, Yoshihashi K, Takeda M, et al. Anti-factor IXa/X bispecific antibody (ACE910): hemostatic potency against ongoing bleeds in a hemophilia A model and the possibility of routine supplementation [J]. *J Thromb Haemost*, 2014, 12(2):206-213. DOI: 10.1111/jth.12474.
- [6] Uchida N, Sambe T, Yoneyama K, et al. A first-in-human phase 1 study of ACE910, a novel factor VIII-mimetic bispecific antibody, in healthy subjects [J]. *Blood*, 2016, 127(13):1633-1641. DOI: 10.1182/blood-2015-06-650226.
- [7] Shima M, Hanabusa H, Taki M, et al. Factor VIII-mimetic function of humanized bispecific antibody in hemophilia A [J]. *N Engl J Med*, 2016, 374 (21):2044-2053. DOI: 10.1056/NEJMoa1511769.
- [8] Oldenburg J, Mahlangu JN, Kim B, et al. Emicizumab prophylaxis in hemophilia A with inhibitors [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(9):809-818. DOI: 10.1056/NEJMoa1703068.
- [9] Sehgal A, Barros S, Ivanciu L, et al. An RNAi therapeutic targeting antithrombin to rebalance the coagulation system and promote hemostasis in hemophilia [J]. *Nat Med*, 2015, 21 (5):492-497. DOI: 10.1038/nm.3847.
- [10] Pasi KJ, Rangarajan S, Georgiev P, et al. Targeting of antithrombin in hemophilia A or B with RNAi therapy [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(9):819-828. DOI: 10.1056/NEJMoa1616569.
- [11] Tiede A. Thromboembolic risks of non-factor replacement therapies in hemophilia [J]. *Hamostaseologie*, 2017, 37(4):307-310. DOI: 10.5482/20170004.
- [12] Hilden I, Lauritzen B, Sørensen BB, et al. Hemostatic effect of a monoclonal antibody mAb 2021 blocking the interaction between FXa and TFPI in a rabbit hemophilia model [J]. *Blood*, 2012, 119 (24):5871-5878. DOI: 10.1182/blood-2012-01-

- 401620.
- [13] Chowdary P, Lethagen S, Friedrich U, et al. Safety and pharmacokinetics of anti-TFPI antibody (concizumab) in healthy volunteers and patients with hemophilia: a randomized first human dose trial [J]. *J Thromb Haemost*, 2015, 13(5):743-754. DOI: 10.1111/jth.12864.
- [14] Ling G, Nathwani AC, Tuddenham EGD. Recent advances in developing specific therapies for haemophilia [J]. *Br J Haematol*, 2018, 181(2):161-172. DOI: 10.1111/bjh.15084.
- [15] Polderdijk SG, Adams TE, Ivanciu L, et al. Design and characterization of an APC-specific serpin for the treatment of hemophilia [J]. *Blood*, 2017, 129(1):105-113. DOI: 10.1182/blood-2016-05-718635.
- [16] Prince R, Bologna L, Manetti M, et al. Targeting anticoagulant protein S to improve hemostasis in hemophilia [J]. *Blood*, 2018, 131(12):1360-1371. DOI: 10.1182/blood-2017-09-800326.
- [17] 代新岳, 张磊. 血友病基因治疗研究进展 [J]. *中华血液学杂志*, 2018, 39(4): 350-352. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727. 2018.04.022.
- [18] Nathwani AC, Tuddenham EG, Rangarajan S, et al. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B [J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(25):2357-2365. DOI: 10.1056/NEJMoa1108046.
- [19] Nathwani AC, Reiss UM, Tuddenham EG, et al. Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B [J]. *N Engl J Med*, 2014, 371(21):1994-2004. DOI: 10.1056/NEJMoa1407309.
- [20] George LA, Sullivan SK, Giermasz A, et al. Hemophilia B gene therapy with a high-specific-activity factor IX variant [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(23):2215-2227. DOI: 10.1056/NEJMoa1708538.
- [21] Simioni P, Tormene D, Tognin G, et al. X-linked thrombophilia with a mutant factor IX (factor IX Padua) [J]. *N Engl J Med*, 2009, 361(17):1671-1675. DOI: 10.1056/NEJMoa0904377.
- [22] Miesbach W, Meijer K, Coppens M, et al. Gene therapy with adeno-associated virus vector 5-human factor IX in adults with hemophilia B [J]. *Blood*, 2018, 131(9):1022-1031. DOI: 10.1182/blood-2017-09-804419.
- [23] George LA. Hemophilia gene therapy comes of age [J]. *Blood Adv*, 2017, 1(26): 2591-2599. DOI: 10.1182/bloodadvances.2017009878.
- [24] Wang M, Sun J, Crosby A, et al. Direct interaction of human serum proteins with AAV virions to enhance AAV transduction: immediate impact on clinical applications [J]. *Gene Ther*, 2017, 24(1):49-59. DOI: 10.1038/gt.2016.75.
- [25] Rangarajan S, Walsh L, Lester W, et al. AAV5-factor VIII gene Transfer in severe hemophilia A [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(26):2519-2530. DOI: 10.1056/NEJMoa1708483.
- [26] VandenDriessche T, Chuah MK. Hemophilia gene therapy: ready for prime time? [J]. *Hum Gene Ther*, 2017, 28(11):1013-1023. DOI: 10.1089/hum.2017.116.
- [27] Falese L, Sandza K, Yates B, et al. Strategy to detect pre-existing immunity to AAV gene therapy [J]. *Gene Ther*, 2017, 24(12):768-778. DOI: 10.1038/gt.2017.95.
- [28] Dunbar CE, High KA, Joung JK, et al. Gene therapy comes of age [J]. *Science*, 2018, 359(6372): eaan4672. DOI: 10.1126/science.aan4672.

(收稿日期:2018-04-24)

(本文编辑:徐茂强)

·读者·作者·编者·

关于重视引用国内文献的意见

部分作者在撰写论文时,只引用国外文献(或非中文语种的文献)。诚然,在医学的许多领域,国内的研究水平确实有待提高,有引用国外文献的必要。但是,不引用国内相关文献,将存在以下问题:①作者没有阅读国内文献,这样作者阅读的文献就不全面,作者所撰写的论文、综述等的科学性、先进性就值得商榷。②不引用国内文献,就不能准确、全面地反映国内的研究水平和进展,毕竟本刊发表的文章主要的阅读对象是中国医师。③有的作者虽然阅读了国内文献,但未引用。不引用国内文献的想法可能更为复杂,如轻视或忽略国内同行,或暗示首创权。除非是专门的国外医学文摘或国外文献综述,均应有国内文献的复习、引用和注解。本刊倡导在论文的撰写中应维护参考文献的科学性,鼓励作者在引用国外文献的同时检索并引用国内相关的文献。

本刊编辑部