

Postępy w leczeniu chorych na hemofilie

Advances in the treatment of patients with hemophilias

Jerzy Windyga

Klinika Zaburzeń Hemostazy i Chorób Wewnętrznych, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa

Streszczenie

Celem pracy jest omówienie wybranych zagadnień związanych z postępowaniem w leczeniu hemofilii w ostatnich latach, w tym wprowadzenia do praktyki klinicznej nowych, zmodyfikowanych koncentratów czynników krzepnięcia, udanej terapii genowej u chorych na ciężką postać hemofilii B oraz udanej długoterminowej profilaktyki krwawień u pacjentów na ciężką postać hemofilii A powikłaną inhibitorem czynnika VIII o wysokim mianie.

Słowa kluczowe: hemofilia, przedłużony okres półtrwania, terapia genowa, inhibitor, profilaktyka
Hematologia 2015; 6, 1: 97–102

Abstract

This paper aims to discuss selected advances made recently for treating hemophilias consisting of the following; introducing new modified clotting factor concentrates for clinical use, successful gene therapy in patients with severe hemophilia B and successful long-term bleeding prevention in patients with severe hemophilia complicated by a high titre of factor VIII inhibitor.

Key words: hemophilia, extended half-life, gene therapy, inhibitor, prophylaxis

Hematologia 2015; 6, 1: 97–102

Wprowadzenie

Ostatnie dekady są najbardziej fascynującym okresem w historii badań nad leczeniem wrodzonych skaz krwotocznych. Sklonowanie genu czynnika krzepnięcia IX (FIX, *factor IX*) w 1982 roku i genu czynnika krzepnięcia VIII (FVIII, *factor VIII*) w 1984 roku umożliwiło opracowanie technologii produkcji rekombinowanych czynników krzepnięcia, których istotną przewagą nad osoczopochodnymi czynnikami krzepnięcia jest niższe ryzyko przeniesienia cząstek zakaźnych [1, 2]. Ale przewaga leków rekombinowanych nie ogranicza się do większego bezpieczeństwa ich stosowania. Rekombinowane cząsteczki mogą być poddawane genetycznym modyfikacjom, których

wynikiem jest większa aktywność, mniejsza immunogenność, a także dłuższy okres biologicznego półtrwania zmodyfikowanego białka [2, 3]. W 2014 roku w Stanach Zjednoczonych, Kanadzie i kilku innych krajach zarejestrowano dwa rekombinowane czynniki krzepnięcia o przedłużonym działaniu, które zapewniają skuteczną profilaktykę krwawień u pacjentów z hemofilią A i B, choć są wstrzykiwane o 30–80% rzadziej niż standardowe (niemodyfikowane) czynniki krzepnięcia [4].

Ostatecznym celem w leczeniu hemofilii nie jest jednak skuteczna profilaktyka, lecz całkowite wyleczenie choroby, co można osiągnąć poprzez skuteczną terapię genową. W 2011 roku opublikowano po raz pierwszy wstępne, pozytywne wyniki badań nad terapią genową hemofilii B u ludzi [5].

Adres do korespondencji: Jerzy Windyga, Klinika Zaburzeń Hemostazy i Chorób Wewnętrznych, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, ul. Indiry Gandhi 14, 02-776 Warszawa, tel.: 22 349 61 58, faks: 22 349 61 59, e-mail: jwindyga@ihit.waw.pl

W 2014 roku wyniki te potwierdzono w kolejnej publikacji [6]. Co ważne, w 3-letniej obserwacji nie wykazano późnych objawów toksyczności terapii genowej w grupie 10 pacjentów objętych badaniem. Terapia genowa zaczyna się stawać jedną z dostępnych opcji terapeutycznych w hemofilii B.

Największym problemem współczesnego leczenia hemofilii jest inhibitor niedoborowego czynnika krzepnięcia, czyli alloprzeciwciała pojawiające się w odpowiedzi na leczenie substytucyjne i prowadzące do neutralizacji wstrzykiwanego czynnika krzepnięcia [7]. Profilaktyka krwawień u chorych na hemofilię powikłaną inhibitorem wydaje się jedyną atrakcyjną opcją leczenia w przypadku ciężkiego przebiegu skazy i niepowodzenia bądź przeciwwskazań do zastosowania leczenia eradykującego inhibitor (immunotolerancji). W ostatnich latach dostarczono ważnych dowodów naukowych wskazujących na bezpieczeństwo i skuteczność długoterminowej profilaktyki krwawień z zastosowaniem koncentratu aktywowanych czynników zespołu protrombiny (aPCC, *activated prothrombin complex concentrate*) u pacjentów z hemofilią powikłaną inhibitorem [8].

Czynniki krzepnięcia o przedłużonym okresie biologicznego półtrwania

Prace nad czynnikami krzepnięcia o przedłużonym działaniu trwają od kilkunastu lat. Korzyść z wytworzenia takich czynników jest oczywista — możliwość zmniejszenia częstości dożylnych wstrzyknięć w długoterminowej profilaktyce krwawień u pacjentów z ciężką hemofilią A i B. W 2014 roku w Stanach Zjednoczonych, Kanadzie, Australii i Japonii zarejestrowano dwa koncentraty o przedłużonym czasie działania: 1) rekombinowany czynnik VIII połączony z fragmentem Fc immunoglobuliny G (rFVIII-Fc, *recombinant factor VIII fusion to FcIG*) — efralococog alfa oraz 2) rekombinowany czynnik IX połączony z fragmentem Fc immunoglobuliny G (rFIX-Fc, *recombinant factor IX fusion to FcIG*) — eftrenonacog alfa [4]. Rejestracja obu leków była poprzedzona intensywnymi badaniami klinicznymi, w których udowodniono skuteczność i bezpieczeństwo obu koncentratów w profilaktyce i leczeniu krwawień u młodocianych i dorosłych chorych na hemofilię A i B, uprzednio leczonych (PTP, *previously treated patients*) koncentratami czynników krzepnięcia [9, 10].

Szczególnie obiecujące są wyniki uzyskane u pacjentów z hemofilią B. Okres biologicznego półtrwania rFIX-Fc wynosi 82,1 godziny. W przypadku podawaniu rFIX-Fc w dawce 20 jednostek

międzynarodowych (IU, *international units*)/kg mc. co 7 dni lub 40 j.m./kg mc. co 10 dni albo 100 j.m./kg mc. co 14 dni u wielu pacjentów z ciężką hemofilią B udaje się stale utrzymywać aktywność FIX w osoczu powyżej 1 j.m./dl, czyli „przekształcić” hemofilię ciężką w umiarkowaną, dla której charakterystyczne jest niewystępowanie samoistnych krwawień. Innymi słowy, u tych pacjentów jest szansa zmniejszenia liczby dożylnych wstrzyknięć FIX w długoterminowej profilaktyce krwawień o 50–80% przy zachowaniu co najmniej tej samej skuteczności, co zapewniona dzięki obecnie stosowanym rekombinowanym koncentratom FIX wstrzykiwanym 2 razy w tygodniu. Żaden z pacjentów otrzymujących rFIX-Fc w ramach prób klinicznych nie wytworzył inhibitora wobec czynnika IX. W opinii niektórych ekspertów fragment Fc immunoglobuliny może się wręcz przyczyniać do zmniejszenia immunogenności FIX (także FVIII) [2, 4].

Mniej spektakularne wyniki dotyczące rFVIII-Fc tłumaczy się wiązaniem wstrzykniętego FVIII z czynnikiem von Willebranda (vWF, *von Willebrand factor*), który determinuje tempo klirensu FVIII (zarówno endogennego, jak i egzogennego) [4]. Okres biologicznego półtrwania rFVIII-Fc wynosi 19 h, co oznacza, że jest około 1,5-krotnie dłuższy w porównaniu ze standardowymi rFVIII. W praktyce oznacza to, że odstępy między wstrzyknięciami u pacjenta z ciężką hemofilią A poddanego długoterminowej profilaktyce krwawień można wydłużyć do 3–5 dni, a u wybranych chorych z bardzo korzystnymi parametrami farmakokinetycznymi — nawet do 7 dni. W badaniu klinicznym 3. fazy roczna częstość krwawień (ABR, *annualized bleeding rate*) u pacjentów otrzymujących regularne wstrzyknięcia rFVIII-Fc co 3 dni, 2 razy w tygodniu, co 4 dni i co 5 dni wyniosła odpowiednio 0,0, 0,0, 2,0 i 2,0 [3]. Są to obiecujące wyniki, zwłaszcza gdy weźmie się pod uwagę, że badaniem objęto pacjentów należących do grupy PTP, u których nierzadko występowała istotna artropatia hemofilowa.

W badaniach klinicznych u PTP wykazano ponadto, że nowo zarejestrowane koncentraty są skuteczne i bezpieczne w osłonie hemostatycznej zabiegów chirurgicznych, a docelowa aktywność niedoborowego czynnika krzepnięcia w okresie okołoperacyjnym powinna być taka sama, jak w przypadku stosowania standardowych koncentratów FVIII i FIX. Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (FDA, *Food and Drug Administration*) zaleca stosowanie testów koagulacyjnych z użyciem kwasu elagowego do monitorowania aktywności rFIX-Fc oraz odpowiednich testów

Tabela 1. Zmodyfikowane koncentraty czynników krzepnięcia
Table 1. Modified clotting factor concentrates

Czynnik krzepnięcia	Modyfikacja	Korzyść kliniczna/status wg www.clinicaltrials.gov
FIX		
rFIX-Fc	Białko fuzyjne z FcIG	Rejestracja poza Europą (m.in. w Stanach Zjednoczonych). $T_{1/2}$ wydłużony 3–5-krotnie
rFIX-FP	Białko fuzyjne z albuminą	Zakończona 3. faza badań klinicznych. $T_{1/2}$ wydłużony 3–5-krotnie
N9-GP	40 kDa PEG połączony z peptydem aktywacyjnym	Zakończona 3. faza badań klinicznych. $T_{1/2}$ wydłużony > 5-krotnie
FVIII		
rFVIII-Fc	Białko fuzyjne z FcIG	Rejestracja poza Europą (m.in. w Stanach Zjednoczonych). $T_{1/2}$ wydłużony 1,8-krotnie
BAX855	20 kDa PEG dołączony do nieswoistej lizyny w FL-FVIII	W 3. fazie badań klinicznych. $T_{1/2}$ wydłużony 1,5-krotnie
BAY94-9027	60 kDa PEG dołączony do cysteiny	Zakończona 3. faza badań klinicznych. $T_{1/2}$ wydłużony 1,7-krotnie
N8-GP	40 kDa PEG dołączony do 21 aa domeny B	W 3. fazie badań klinicznych. $T_{1/2}$ wydłużony 1,5-krotnie
rhFVIII-SC (<i>recombinant human FVIII-single chain</i>)	Pojedynczy łańcuch FVIII	W 3. fazie badań klinicznych. Zwiększone powinowactwo do vWF
rFVIII-huCL (<i>recombinant FVIII-human cell line</i>)	Produkcja w ludzkich liniach komórkowych	W 3. fazie badań klinicznych. Zachowana glikozylacja natywnego ludzkiego FVIII
FVIIa		
rFVIIa-FP	Białko fuzyjne z ludzką albuminą	W 3. fazie badań klinicznych
rFVIIa-RB	Białko syntetyzowane przez transgeniczne króliki	Zwiększona aktywność swoista. $T_{1/2}$ wydłużony 3–4-krotnie

FIX (*factor IX*) — czynnik IX; FcIG — fragment Fc immunoglobuliny G; $T_{1/2}$ — okres biologicznego półtrwania; FP (*fusion protein*) — białko fuzyjne; PEG — polietylenoglikol; kDa — kilodaltony; FVIII (*factor VIII*) — czynnik VIII; rFVIIa (*recombinant activated factor VII*) — rekombinowany aktywowany czynnik VII; vWF (*von Willebrand factor*) — czynnik von Willebranda

chromogennych i koagulacyjnych do monitorowania rFVIII-Fc [4].

Rejestracja rFIX-Fc i rFVIII-Fc w Europie musi być poprzedzona przeprowadzeniem badań klinicznych w grupie uprzednio leczonych pacjentów pediatrycznych. Takiego wymogu nie stawia FDA, dlatego dopuszczone do obrotu w Stanach Zjednoczonych leki nie są jeszcze dostępne w Europie. W tabeli 1 przedstawiono nowe koncentraty czynników krzepnięcia (w większości o przedłużonym działaniu), które już dopuszczono do obrotu oraz te, które prawdopodobnie zostaną wprowadzone do praktyki klinicznej w najbliższych latach. Różni producenci wykorzystali różne sposoby wydłużenia okresu biologicznego półtrwania czynników krzepnięcia [3, 4]. Oprócz łączenia białka z fragmentem Fc immunoglobuliny zastosowano także pegylowanie czynników krzepnięcia, które polega na połączeniu białka wiązaniem kowalencyj-

nym z polietylenoglikolem (PEG), a także łączenie czynnika krzepnięcia z albuminą [11, 12]. Oprócz czynników krzepnięcia o przedłużonym działaniu w próbach klinicznych testuje się także zmodyfikowane białka o zbliżonym okresie biologicznego półtrwania do okresów półtrwania standardowych czynników krzepnięcia. Przykładem jest rFVIII produkowany w komórkach ludzkich (rFVIII-hcl, *recombinant FVIII-human cell line*), a zatem zachowujący wzór glikozylacji charakterystyczny dla natywnego czynnika VIII [13]. Potencjalną zaletą rFVIII-hcl ma być mniejsza immunogenność w porównaniu ze standardowymi rFVIII. Ciekawą koncepcją jest także produkcja rFVIII o strukturze jednołańcuchowej (rhFVIII-SC, *recombinant human FVIII-single chain*) wykazującej większe powinowactwo do vWF [12]. Przyczynia się to do nawet 2-krotnego wydłużenia okresu biologicznego półtrwania rFVIII.

Terapia genowa w hemofilii B

W grudniu 2011 roku ukazały się wyniki najważniejszej, jak dotąd, próby klinicznej, w której oceniano skuteczność i bezpieczeństwo terapii genowej hemofilii B [5]. Autorzy zastosowali nowy wektor na bazie adenopodobnego wirusa (AAV, *adenoassociated virus*) serotypu 8 (AAV8) u 6 pacjentów z ciężką hemofilią B. W testach przedklinicznych badacze dowiedli, że wysoki poziom transdukcji można osiągnąć po wstrzyknięciu nowego wektora niosącego gen ludzkiego czynnika IX (AAV8-FIX) do żyły obwodowej i że nie jest konieczne podawanie AAV8-FIX do tętnicy wątrobowej (co było niezbędne w pierwszej próbie klinicznej prowadzonej przed laty i zakończonej niepowodzeniem; wówczas zastosowano inny wektor — AAV2). Pacjenci otrzymali trzy różne dawki AAV8-FIX (2 — małą, 2 — średnią i 2 — dużą). Z badania wykluczono osoby z obecnymi przeciwciałami przeciwko AAV8. Wszyscy chorzy bardzo dobrze znieśli infuzję wektora; nie stwierdzono działań niepożądanych. U 4 pierwszych chorych (dwie pierwsze kohorty) zaobserwowano zwiększenie aktywności koagulacyjnej czynnika IX (FIX:C, *factor IX coagulation activity*) do 1–3 j.m./dl. Pacjenci z ostatniej kohorty zanotowali wzrost FIX:C do, odpowiednio, 8 i 6 j.m./dl. Jednak u 1 chorego wystąpił istotny wzrost stężenia aminotransferaz (> 200 j.m./l), który wymógł zastosowanie kortykosteroidów (60 mg prednizolonu/d.). Kortykosteroidy pozwoliły unormować stężenie aminotransferaz, ale wartość FIX:C zmniejszyła się do 2 j.m./dl. U kolejnego pacjenta także zaobserwowano wzrost stężenia aminotransferaz, ale znacznie mniejszy niż u poprzedniego chorego. Bardzo szybko włączone kortykosteroidy pozwoliły znormalizować aminotransferazy, a FIX:C ustabilizował się na poziomie 6 j.m./dl. Testy laboratoryjne (IFN gamma ELISPOT) przeprowadzone u obu pacjentów wykazały, że przyczyną wzrostu stężenia aminotransferaz i obniżenia FIX:C była odpowiedź immunologiczna ustroju przeciwko białkom kapsydowym wektora wirusowego. Odpowiedź ta zależy od klonu komórek T CD8+ swoistych dla kapsydu AAV. Po transdukcji hepatocyta peptydy kapsydu są ekspozowane na powierzchni komórki przez MHC (*major histocompatibility complex*) klasy I, dzięki czemu są rozpoznawane przez komórki T CD8+ swoiste dla kapsydu, co wyzwala mechanizm eliminacji transdukowanego hepatocyta. Ponadto wektor jest także wychwytywany przez komórki prezentujące antygen, które z kolei prezentują go w kompleksie z MHC klasy II, prowadząc do aktywacji komórek

pomocniczych CD4+ i produkcji cytokin. Niepodważalnym osiągnięciem Nathwaniego i wsp. [5] było wykazanie, że kilkutygodniowe podawanie prednizolonu w dawce 60 mg/dobę jest w stanie wygasić odpowiedź immunologiczną ustroju i przywrócić ekspresję transdukowanego genu.

Ostatnio Nathwani i wsp. [6] przedstawili wyniki dłuższej (mediana 3,2 roku) obserwacji 10 chorych na hemofilię B poddanych terapii genowej — 6 opisanych w poprzedniej publikacji oraz 4 włączonych później, u których zastosowano wyłącznie duże dawki wektora wirusowego (2×10^{12} /kg mc.). Pojedyncza dożylna infuzja wektora spowodowała utrzymujący się przez cały czas obserwacji wzrost aktywności FIX u wszystkich 10 chorych na ciężką hemofilię B. U pacjentów, którym wstrzyknięto dużą dawkę wektora, średnia wartość (\pm odchylenie standardowe [SD, *standard deviation*]) FIX:C w osoczu wynosi $5,1 \pm 1,7$ j.m./dl. U tych pacjentów liczba krwawień oraz zużycie koncentratu rFIX zmniejszyły się o 90%. U 4 spośród 6 pacjentów z grupy otrzymującej dużą dawkę wektora, między 7. a 10. tygodniem po jego infuzji, zaobserwowano wzrost stężenia aminotransferazy alaninowej do wartości 36–202 j.m./l (średnio 86 j.m./l), ale po zastosowaniu prednizolonu (początkowo 60 mg/d., ale z szybkim zmniejszaniem dawki leku), w ciągu 2–35 dni (średnio 5 dni), wartość aminotransferazy alaninowej się znormalizowała. Nie zanotowano żadnych późnych powikłań terapii genowej.

Dalsze wysiłki badaczy będą zmierzały do potwierdzenia obserwacji Nathwaniego i wsp. [14] oraz rozszerzenia wskazań do terapii genowej hemofilii B o pacjentów zakażonych ludzkim wirusem niedoboru odporności (HIV, *human immunodeficiency virus*) i wirusem wątroby typu C (HCV, *hepatitis C virus*) oraz tych, u których wykryto przeciwciała przeciwko AAV. W ostatnim przypadku rozwiązaniem może być zastosowanie pustych kapsydów AAV2, które chronią kapsydy AAV8 zawierające gen kodujący FIX, poprzez związanie obecnych w krwiobiegu pacjenta przeciwciał przeciwko AAV [15]. Bardzo interesujące są też badania nad alternatywnymi wektorami, na przykład lentiwirusowymi. Kolejnym krokiem w rozwoju badań nad terapią genową powinno być zapoczątkowanie prób klinicznych u pacjentów z hemofilią A. Niestety, dziś wiadomo, że o sukces w terapii genowej hemofilii A będzie znacznie trudniej niż w hemofilii B — przede wszystkim z powodu wielkości cDNA FVIII oraz silniej odpowiedzi immunologicznej ludzkiego organizmu wobec FVIII [14].

Długoterminowa profilaktyka krwawień w hemofilii A powikłanej inhibitorem

Wśród chorych na hemofilię A powikłaną inhibitorem FVIII potencjalnymi kandydatami do długoterminowej profilaktyki krwawień z zastosowaniem koncentratów czynników krzepnięcia omijających inhibitor są pacjenci, u których nie udało się uzyskać stanu tolerancji immunologicznej (IT, *immune tolerance*) lub u których odstąpiono od indukcji immunotolerancji (ITI, *immune tolerance induction*) z powodu niekorzystnych czynników rokowniczych uzyskania IT, a ponadto: 1) doznają częstych krwawień bądź 2) przebyli krwawieniem zagrażające życiu (np. śródczaszkowe). Długoterminową profilaktykę należałoby także zastosować u pacjentów poddawanych ITI wciąż doznających krwawień, gdyż bez niej uzyskanie IT może być okupione bardzo wysoką ceną, na przykład kompletnie zniszczonych struktur stawowych. Na konieczność prewencji krwawień w hemofilii powikłanej inhibitorem wskazują wyniki ostatnio opublikowanej pracy, której amerykańscy autorzy wykazali, że wystąpienie inhibitora FVIII w przebiegu hemofilii A zwiększa ryzyko zgonu wywołanego krwawieniem [16].

Badanie Pro-FEIBA jest pierwszym prospektywnym, randomizowanym badaniem typu *cross-over* służącym ocenie skuteczności aPCC (FEIBA®) w długoterminowej profilaktyce krwawień [8]. Czas obserwacji w badaniu wynosił 15 miesięcy. Składało się z 3 faz: 1) trwającej 6 miesięcy profilaktyki (85 j./kg mc. \pm 15%) 3 razy w tygodniu, ale nie w następujących po sobie dniach, 2) trwającego 3 miesiące okresu *wash-out* oraz 3) trwającego 6 miesięcy okresu leczenia „na żądanie”. O rozpoczęciu badania od fazy profilaktyki lub od fazy leczenia „na żądanie” decydowała randomizacja. Badaniem objęto 34 chorych na ciężką hemofilię A powikłaną inhibitorem FVIII o wysokim mianie, w wieku ponad 2 lat, przy czym 26 ukończyło badanie i zostało poddanych końcowej analizie. Liczba krwawień do stawów (średnio/6 miesięcy 4,2 v. 10,8) oraz liczba wszystkich krwawień (średnio/6 miesięcy 5,0 v. 13,1) była statystycznie istotnie mniejsza w okresie profilaktyki niż w okresie leczenia „na żądanie” ($p < 0,0001$). Kolejność randomizacji do profilaktyki i leczenia „na żądanie” nie wpływała na wyniki. Leczenie było dobrze tolerowane; zanotowano tylko jedno poważne działanie niepożądane związane z lekiem (odczyn uczuleniowy). W okresie obserwacji profilaktyka spowodowała zmniejszenie o 61% liczby krwawień do stawów i o 62% liczby wszystkich krwawień

w porównaniu z okresem leczenia „na żądanie”. U 16 pacjentów zaliczonych do grupy dobrze odpowiadających na profilaktykę (zmniejszenie liczby krwawień w okresie profilaktyki $> 50\%$ w porównaniu z okresem „na żądanie”) stwierdzono także istotną poprawę parametrów jakości życia zależnej od zdrowia w okresie profilaktyki (kwestionariusz SF-36) [17].

Wyniki badania Pro-FEIBA nie zmieniają strategii postępowania w hemofilii powikłanej inhibitorem; wciąż nadrzędnym celem pozostaje eradykacja inhibitora i wytworzenie IT. Jak jednak wykazały wyniki badania IITS (*International Immune Tolerance Study*), nie więcej niż 70% chorych na hemofilię A powikłaną inhibitorem FVIII o wysokim mianie uzyskuje IT [18]. Co 3. pacjent z hemofilią A powikłaną inhibitorem FVIII o wysokim mianie będzie zatem wymagał stosowania koncentratów omijających inhibitor. Długotrwała profilaktyka z zastosowaniem aPCC staje się dla takich osób prawdopodobnie optymalną opcją terapeutyczną, albowiem stwarza szansę zarówno uniknięcia krwawień zagrażających życiu, jak i zmniejszenia, a u wybranych pacjentów nawet całkowitego wyeliminowania, krwawień do stawów.

Piśmiennictwo

1. Ehrlich H.J., Wong W.Y., Ewenstein B.M. i wsp. Development of novel treatment options for patients with haemophilia. *Hämostaseologie* 2013; 33 (supl. 1): S36–S38.
2. Pipe S.W. Hemophilia: new protein therapeutics. *Hematology Am. Soc. Hematol. Edu. Program* 2010; 2010: 203–209.
3. Oldenburg J., Albert T. Novel products for haemostasis — current status. *Haemophilia* 2014; 20 (supl. 4): 23–28.
4. Powell J.S. Lasting power of new clotting proteins. *Hematology Am. Soc. Hematol. Edu. Program* 2014; 2014: 355–363.
5. Nathwani A.C., Tuddenham E.G., Rangarajan S. i wsp. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N. Engl. J. Med.* 2011; 365: 2357–2365.
6. Nathwani A.C., Reiss U.M., Tuddenham E.G.D. i wsp. Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *N. Engl. J. Med.* 2014; 371: 1994–2004.
7. Kempton C.L., Meeks S.L. Toward optimal therapy for inhibitors in hemophilia. *Blood* 2014; 124: 3365–3372.
8. Leissinger C., Gringeri A., Antmen B. i wsp. Anti-inhibitor coagulant complex prophylaxis in hemophilia with inhibitors. *N. Engl. J. Med.* 2011; 365: 1684–1692.
9. Powell J.S., Pasi K.J., Ragni M.V. i wsp. Phase 3 study of recombinant factor IX Fc fusion protein in hemophilia B. *N. Engl. J. Med.* 2013; 369: 2313–2323.
10. Mahlangu J., Powell J.S., Ragni M.V. i wsp. Phase 3 study of recombinant factor VIII Fc fusion protein in severe hemophilia A. *Blood* 2014; 123: 317–325.
11. Pasut G., Veronese F.M. State of the art in PEGylation: the great versatility achieved after forty years of research. *J. Control. Release* 2012; 161: 461–472.

12. Schulte S. Innovative coagulation factors: albumin fusion technology and recombinant single-chain factor VIII. *Thromb. Res.* 2013; 131 (supl. 2): S2–S6.
13. Sandberg H., Kannicht C., Stenlund P i wsp. Functional characteristics of the novel, human-derived recombinant FVIII protein product, human-cl rhFVIII. *Thromb. Res.* 2012; 130: 808–817.
14. High K.A. The gene therapy journey for hemophilia: are we there yet? *Hematology Am. Soc. Hematol. Edu. Program* 2012; 375–381.
15. Wright J.F. Manufacturing and characterizing AAV-based vectors for use in clinical studies. *Gene Ther.* 2008; 15: 840–848.
16. Walsh C.E., Soucie J.M., Miller C.H. i wsp. Impact of inhibitors on hemophilia A mortality in the United States. *Am. J. Hematol.* 2015; 90: 400–405.
17. Hay C.R.M., DiMichele D.M. The principal results of the International Immune Tolerance Study: a randomized dose comparison. *Blood* 2012; 119: 1335–1344.
18. Gringeri A., Leissinger C., Cortesi P.A. i wsp. Health-related quality of life in patients with haemophilia and inhibitors on prophylaxis with anti-inhibitor complex concentrate: results from the Pro-FEIBA study. *Haemophilia* 2013; 19: 736–743.