· 论著 ·

自制活化凝血酶原复合物的安全性和有效性评价

潘旭[1] 黄雨薇[2] 毛烈火[3] 孙盼[1] 李长清[1] 杜晞[1] 马莉[1]

(1. 中国医学科学院 北京协和医学院 输血研究所,四川 成都 610052;2. 简阳市人民医院,四川 成都 641400;3. 浙江英特生物制品营销有限公司,浙江 杭州 310014)

摘要:目的 评价自制活化凝血酶原复合物(activated Prothrombin Complex Concentrate, aPCC)的体外促凝有效性和体内潜在致血栓风险。**方法** 按 0.5 IU/mL 血浆剂量给药,通过体外实验,将自制 aPCC 浓缩物加入 FⅧ抑制物模拟血浆中,利用自动标准化凝血酶生成试验(Calibrated automated thrombin generation, CAT)、凝血酶原时间(prothrombin time, PT)、活化部分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time, APTT)、凝血酶时间(thrombin time, TT)及纤维蛋白原(fibrinogen, Fib)检测,以正常血浆和 FEIBA®作为对照评价自制 aPCC 浓缩物的促凝能力;通过动物实验,将自制 aPCC 浓缩物经颈静脉注射入大鼠体内,用 $FeCl_3$ 贴片诱导颈动脉血栓形成,再利用激光散斑血流成像监测观察大鼠颈动脉血栓生成情况,并采集大鼠血浆进行 CAT、PT、APTT、TT 及 Fib 检测,并将生理盐水和 FEIBA®做为对照评价自制 aPCC 浓缩物的潜在致血栓风险。**结果** 抑制物血浆中加入 aPCC 后,显著降低了抑制物血浆的 APTT、PT(均 $P<0.001$)。FEIBA®和自制 aPCC 的 APTT、PT 值无显著差异($P>0.05$)。CAT 检测结果显示,抑制物血浆加入 aPCC 后,内源性凝血酶生成潜力(ETP)与凝血酶峰值(Peak)水平显著升高($P<0.001$),且高于正常血浆($P<0.001$),而自制 aPCC 和 FEIBA®的 ETP 无显著差异($P>0.05$)。大鼠颈动脉血流成像监测结果显示,与 FEIBA®相比,自制 aPCC 形成的血栓较小、稳定性差,均发生自溶,大鼠颈动脉血流恢复情况较好。**结论** 自制 aPCC 与 FEIBA®一样能较好恢复抑制物血浆的凝血能力,且致血栓风险性较低。

关键词:活化凝血酶原复合物(aPCC);FⅧ旁路活性(FEIBA);自动标准化凝血酶生成试验(CAT);血栓风险

中图分类号:R457.1+4 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-549X(2026)8-1004-09

DOI:10.13303/j.cjbt.issn.1004-549x.2026.08.002

Preliminary evaluation of the safety and efficacy of a self-prepared activated prothrombin complex concentrate

PAN Xu[1], *HUANG Yuwei*[2], *MAO Liehuo*[3], *SUN Pan*[1], *LI Changqing*[1], *DU Xi*[1], *MA Li*[1].

1. *Institute of Blood Transfusion, Chinese Academy of Medical Sciences& Peking Union Medical College, Chengdu* 610052, *China*; 2. *Jianyang People's Hospital, Chengdu* 641400, *China*; 3. *Zhejiang Int Biologics Marketing Co., Ltd, Hangzhou* 310014, *China*.

Co-corresponding authors: MA Li, Email: mary@ibt.pumc.edu.cn; DU Xi, Email: xi.du@ibt.pumc.edu.cn

Abstract: Objective To evaluate the in vitro procoagulant efficacy and in vivo potential thrombogenic risk of self-prepared activated prothrombin complex concentrate (aPCC). **Methods** The preparation was administered at a dose of 0.5 IU per milliliter of plasma. For in vitro assays, the self-prepared aPCC concentrate was added to plasma spiked with factor Ⅷ (FⅧ) inhibitors. Calibrated automated thrombin generation (CAT), prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT), thrombin time (TT), and fibrinogen (Fib) quantification were performed. Normal saline and FEIBA® were set as controls to evaluate the procoagulant capacity of the self-prepared aPCC concentrate. For in vivo animal studies, the self-prepared aPCC concentrate was injected into rats via the jugular vein. A ferric chloride (FeCl3) filter paper patch was applied to induce carotid arterial thrombosis. Laser speckle blood flow imaging was used to continuously monitor thrombus formation in the rat carotid artery. Plasma samples were collected from rats for CAT, PT, APTT, TT and Fib testing, with normal saline and FEIBA® as controls to evaluate the potential thrombogenic risk of the self-prepared aPCC concentrate. **Results** Supplementation with aPCC significantly shortened APTT and PT values in inhibitor-spiked plasma (all $P<0.001$). There were no statistically significant differences in APTT and PT between FEIBA® and self-prepared aPCC ($P>0.05$). CAT results demonstrated that adding aPCC to inhibitor-containing plasma markedly increased endoge-

基金项目:四川省科技计划项目,活化凝血酶原复合物制品的研究与开发(2021YFS0056)

第一作者简介:潘旭(1987-),女,助理研究员,Email:panxu@ibt.pumc.edu.cn;**共同通信作者:**杜晞,Email:xi.du@ibt.pumc.edu.cn;马莉,Email:mary@ibt.pumc.edu.cn

nous thrombin potential (ETP) and peak thrombin concentration (Peak) ($P<0.001$), with both parameters higher than those of normal plasma ($P<0.05$). No significant intergroup difference in ETP was observed between self-prepared aPCC and FEIBA®($P>0.05$). Carotid blood flow imaging in rats revealed that, compared with FEIBA®, thrombi induced by self-prepared aPCC were smaller and less stable, and all underwent spontaneous lysis, accompanied by better restoration of carotid blood perfusion. **Conclusion** The self-prepared aPCC restores coagulation function in inhibitor-spiked plasma to a comparable extent as FEIBA®, while exhibiting a lower thrombogenic risk.

Key words: activated prothrombin complex concentrate (aPCC); factor eight bypassing activity (FEIBA); calibrated automated thrombin generation (CAT); thrombotic risk

抑制物的产生是 A 型血友病(Hemophilia A)患者最常见和最严重的并发症,约 30%的重型 HA 患者在接受凝血因子Ⅷ(coagulation Factor Ⅷ,FⅧ)替代治疗后产生抑制性抗体[1],导致治疗无效。目前治疗高滴度 HA 抑制物患者出血发作的药物主要包括旁路制剂和艾美赛珠单抗。尽管患者接受艾美珠单抗治疗,仍可能发生突破性出血,需要联合使用旁路制剂进行治疗[2-4]。旁路制剂是通过补充外源性或常见凝血途径中所需的凝血因子形成凝血酶,从而绕过 FⅧ实现止血,主要包括重组活化凝血因子Ⅶ(recombinant activated coagulation factor Ⅶ,rFⅦa)和活化凝血酶原复合物(activated prothrombin complex concentrate,aPCC)。国外有研究比较了 46 例抑制物患者输注 rFⅦa 或 aPCC 治疗后的止血效果,发现在输注这两种制剂后 6 h 出血事件均得到控制,输注 aPCC 治疗后其出血控制率为 80.9%,输注 rFⅦa 治疗后出血控制率为 78.7%[5]。相较于 rFⅦa 制剂,aPCC 的给药间隔更长,治疗费用也显著下降。国外临床对于 HA 抑制物患者的常规治疗,更倾向于优先使用 aPCC[6]。

aPCC 是以健康人的合并血浆为原料制备得到的维生素 K 依赖性凝血因子混合物,成分复杂,包含多种凝血因子、活化凝血因子及抗凝血因子。目前已在 80 多个国家用于治疗 HA 抑制物患者超过 40 年。由武田公司研发生产的 FEIBA®是当前全球唯一上市的 aPCC 制剂,该药物尚未获批进入我国市场。国内针对 HA 抑制物患者的出血急性发作,临床可用的旁路药物仅包括价格高昂的 rFⅦa 与人凝血酶原复合物(prothrombin complex concentrates,PCC)。在国内一项对 HA 抑制物患者的回顾性研究中,研究人员发现使用旁路药物治疗急性出血的患者中,76.2%的患者使用 PCC,29.2%的患者使用 rFⅦa,而 PCC 的治疗有效性远低于 rFⅦa[7]。鉴于 rFⅦa 售价昂贵且半衰期较短,多数患者难以承担治疗费用,国内多数血友病诊疗中心仍将 PCC 作为控制此类患者中度出血的主要药物。综上,自主研发国产 aPCC 制剂已迫在眉睫。

本课题组以新鲜冰冻血浆为原料,经纯化、激活、病毒灭活、浓缩配制等工序制备得到多批自制 aPCC 浓缩物,工艺稳定。为验证其有效性,本研究将自制 aPCC 浓缩物加入含 FⅧ抑制物的模拟血浆,结合自动标准化凝血酶生成试验(Calibrated automated thrombin generation,CAT)、凝血酶原时间(prothrombin time,PT)、活化部分凝血活酶时间(activated partial thromboplastin time,APTT)、凝血酶时间(thrombin time,TT)及纤维蛋白原(fibrinogen,Fib)检测,评估其对抑制物血浆凝血功能的逆转作用,并与上市制剂 FEIBA®进行对比。此外,本研究采用三氯化铁($FeCl_3$)诱导的大鼠颈动脉血栓生成模型,以 FEIBA®为对照,评价自制 aPCC 潜在的致血栓风险。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1) 样品制备

aPCC 为本课题组实验室自制:将新鲜冰冻血浆纯化获得 PCC 初提液,再加入激活剂($CaCl_2$)在一定温度下孵育一段时间激活,随后加入激活终止剂(EDTA)获得活性 aPCC 粗提液,再进一步进行病毒灭活及浓缩配制得到自制 aPCC 浓缩物。在自制 aPCC 浓缩物中加入活性炭,搅拌一段时间去除热源后分装,-80℃冷冻保存。

2) 实验动物

健康的 SPF 级雌性 SD 大鼠,体重(280±20)g,由四川达硕动物实验公司提供。大鼠饲养于标准实验动物环境:温度 22~24°C,相对湿度 40%~60%,12 h 光/暗循环。适应性饲养 1 周后进行实验,5 只/笼,自由进食与饮水,饲喂全价大鼠颗粒饲料。大鼠于实验结束后经颈椎脱臼法处死。

3) 试剂与仪器

凝血仪(CA-1500)购自日本希思美康公司,凝

血酶生成仪(Fluoroskan Ascent)购自美国 Thermo Scientific 公司,激光散斑血流成像仪(PSI-ZR)购自瑞典 Perimed 公司,离心机(Allegra X-15R)购自美国 Beckman Coulter 公司。FEIBA®(批号:F2A023AH)购自日本武田公司;PPP-试剂(批号:2305/01)、荧光试剂(批号:FC2301/01)、凝血酶校准品(批号:TC2308/01)购自加拿大 Affinity Biologicals 公司;FⅧ抑制物血浆(批号:LP38-0043)购自加拿大 Affinity Biologicals 公司;PT(批号:572134A)、APTT(批号:562785)、TT(批号:02676)、Fib(批号:567439)试剂盒;正常质控血浆(批号:507922);血浆标准品(批号:503297)购自德国西门子公司;硫酸鱼精蛋白(批号:M01HS176809)购自上海源叶生物科技有限公司、乙二胺四乙酸(EDTA)(批号:091209)、无水氯化钙(批号:100505)购自汕头市西陇化工厂有限公司。

1.2 实验方法

1)加入 aPCC 后 FⅧ抑制物血浆的凝血四项检测

向自制 aPCC 中加入 5%的硫酸鱼精蛋白溶液(1mg/mL)中和肝素,用 OVB 缓冲液将 FEIBA®及自制 aPCC 稀释一定倍数,使其 FEIBA 活性为 12 IU/mL。自制 aPCC 和 FEIBA®均按 0.5 IU/mL 血浆的剂量加入抑制物血浆中,分别对加入自制 aPCC 和 FEIBA®的抑制物血浆及做为对照的未加药的抑制物血浆和正常血浆进行 PT、APTT、TT、纤维蛋白原含量检测 Fib 测定。

2)加入 aPCC 后 FⅧ抑制物血浆凝血酶生成(CAT)检测

向自制 aPCC 中加入 5%的硫酸鱼精蛋白溶液(1mg/mL)中和肝素,将 FEIBA®及自制 aPCC 浓缩物用缓冲液(25 mM HEPES、175 mM NaCl、5 mg/mL BSA、pH 7.35)稀释一定倍数,使其 FEIBA 活性为 12 IU/mL。自制 aPCC 和 FEIBA®均按 0.5 IU/mL 血浆的剂量加入抑制物血浆中,分别对加入自制 aPCC 和 FEIBA®的抑制物血浆及做为对照的未加药的抑制物血浆和正常血浆进行 CAT 实验。获得内源性凝血酶生成潜力(ETP)、凝血酶峰值(Peak)、达峰时间(ttPeak)、延迟时间(tLag)等主要参数。

3)$FeCl_3$ 大鼠血栓诱导模型建立

将 SD 大鼠随机分为 2 组,按照 12 mL/kg 的剂量腹腔麻醉,待大鼠完全麻醉后置于 37℃恒温垫上保持体温恒定。用酒精消毒颈部皮肤,充分暴露并分离颈动、静脉,用不吸水不透光的纸片将颈动脉与周围组织隔离开。在血栓诱导前 10 min 经颈静脉给予生理盐水 2 mL/kg。将 5×10mm 的滤纸贴片浸于 5%、7.5%$FeCl_3$ 溶液中 1 min,滤纸贴片去除多余溶液后置于颈动脉上 5 min 以诱导血栓形成。移除贴片后用激光散斑血流成像仪监测大鼠颈动脉血流情况。以血栓形成率确定 $FeCl_3$ 浓度。

4)aPCC 对大鼠颈动脉血栓形成的影响

将 21 只 SD 大鼠随机分为 3 组:空白对照组,自制 aPCC 组,FEIBA®组,每组各 7 只。按照上述方法完成麻醉及准备工作。在血栓诱导前 10 min 经颈静脉给药:空白对照组给予生理盐水 2 mL/kg,另外 2 组按 50 IU/kg 给药。将 5 mm×10 mm 的滤纸贴片浸于 5%$FeCl_3$ 溶液中 1 min,滤纸贴片去除多余溶液后置于颈动脉上 5 min 以诱导血栓形成。移除贴片后用激光散斑血流成像仪监测大鼠颈动脉血流情况。60 min 后用 5 mL 3.2%枸橼酸钠抗凝管及 5 mL 一次性注射器经腹主动脉采集血液样本。采血结束后立刻将抗凝管轻柔地颠倒 5 次以上充分混匀。4℃,2 100 g 离心 15 min,离心结束后取上层血浆,对大鼠血浆进行凝血四项及 CAT 测定评价其血栓生成风险。

1.3 统计学分析

数据采用统计软件 GraphPad Prism 9.5 进行分析。经 Shapiro-Wilk 检验,所有样本数据均服从正态分布;运用 one-way ANOVA 多重比较检验对不同实验组的变量进行统计学分析。置信区间定义为 95%,$P<0.05$ 表明差异有统计学意义。

2 结果

2.1 aPCC 对 FⅧ抑制物血浆凝血四项检测的影响

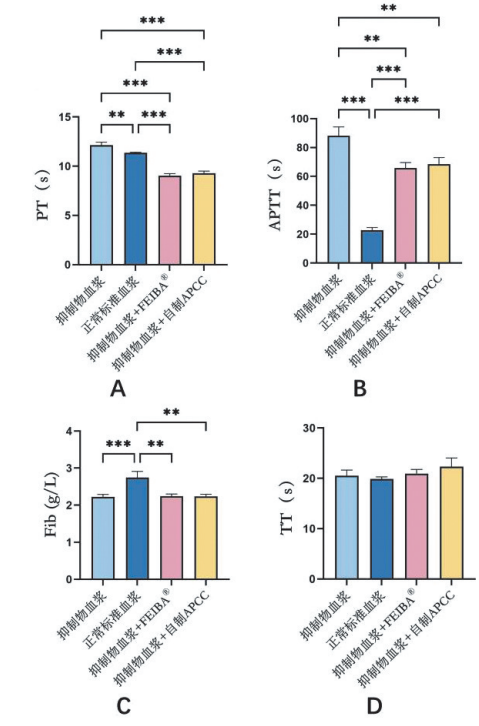
如图 1A 所示,加入自制 aPCC 和 FEIBA®的抑制物血浆 PT 均显著低于抑制物血浆与正常血浆(均 $P<0.001$),自制 aPCC 和 FEIBA®相比则没有统计学差异($P>0.05$)。

如图 1B 所示,与正常血浆相比,抑制物血浆的 APTT 显著延长($P<0.001$),抑制物严重阻断了内源性凝血。加入自制 aPCC 和 FEIBA®后均缩短了抑制物血浆的 APTT(均 $P<0.01$),但仍显著高于正常血浆 APTT($P<0.001$),自制 aPCC 和 FEIBA®

相比则没有统计学差异(P>0.05)。

如图 1C 所示,正常血浆的 Fib 含量显著高于其他 3 个实验组(均 P<0.01),其余 3 组之间没有统计学差异(P>0.05)。

如图 1D 所示,4 个实验组的 TT 检测值均无统计学差异(P>0.05)。



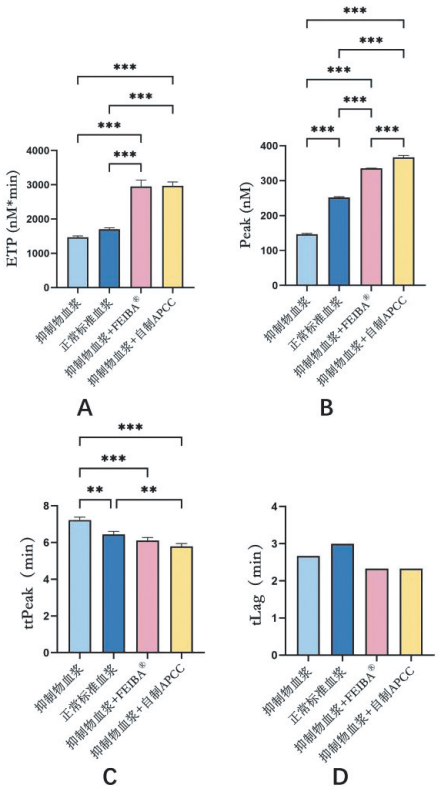
注:2 个 aPCC 实验组给药量均为 0.5 IU/mL 血浆。FEIBA®:武田公司市售 aPCC 制品;自制:本研究制备 aPCC 浓缩物。(A)PT 检测结果;(B)APTT 检测结果;(C)Fib 含量检测结果;(D)TT 检测结果。**表示 P<0.01,***表示 P<0.001,n=3。

图 1 加入 aPCC 前后 FⅧ抑制物血浆的凝血四项检测结果

Figure 1 The results of the four coagulation tests of the plasma spiked with FⅧ inhibitors before and after the addition of aPCC

2.2 aPCC 对 FⅧ抑制物血浆凝血酶生成(CAT)检测的影响

如图 2、图 3 所示,与正常标准血浆相比,抑制物血浆的 Peak 显著下降(P<0.001),同时 ttPeak 显著延长(P<0.01),抑制物血浆的凝血酶生成能力被显著抑制。2 个 aPCC 实验组 ETP 与 Peak 水平较抑制物血浆显著升高(P<0.001),且高于正常血浆(P<0.001),而自制 aPCC 组和 FEIBA®组的 ETP 无显著差异(P>0.05),自制 aPCC 组的 Peak 水平显著高于 FEIBA®组(P<0.001)。两个 aPCC 实验组均显著缩短了抑制物血浆的 ttPeak(P<0.01 或 P<0.001),自制 aPCC 组和 FEIBA®组 ttPeak 无显著差异(P>0.05)。4 个实验组 tLag SD 值均为 0,故未进行统计学分析。



注:2 个 aPCC 实验组给药量均为 0.5 IU/mL 血浆。FEIBA®:武田公司市售 aPCC 制品;自制:本研究制备 aPCC 浓缩物。(A)ETP 检测结果;(B)Peak 检测结果;(C)ttPeak 检测结果;(D)tLag 检测结果。**表示 P<0.01,***表示 P<0.001,n=3。

图 2 加入 aPCC 前后 FⅧ抑制物血浆的 CAT 各参数指标

Figure 2 The various parameters and indicators of CAT in the plasma spiked with FⅧ inhibitors before and after the addition of aPCC

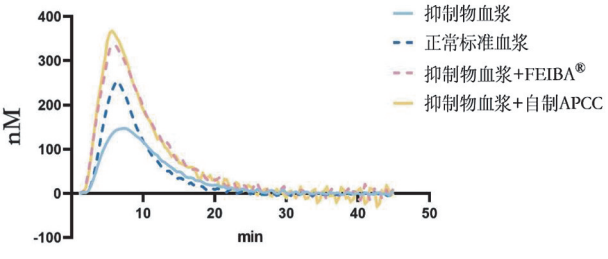
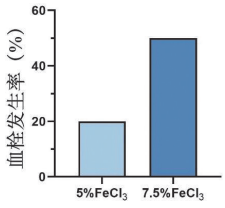


图 3 加入 aPCC 前后 FⅧ抑制物血浆的凝血酶生成图

Figure 3 The thrombin generation graphs of the plasma spiked with FⅧ inhibitors before and after the addition of aPCC

2.3 $FeCl_3$ 诱导大鼠颈动脉血栓形成

如图 4 所示,5%、7.5% $FeCl_3$ 溶液处理组的血栓发生率分别为 20%、50%。鉴于 7.5% $FeCl_3$ 溶液对大鼠颈动脉血栓形成的效果过强,可能导致各实验组之间的血栓形成率没有差异,故采用 5% 的 $FeCl_3$ 溶液展开后续实验。



注：5%$FeCl_3$ 溶液处理组（n=10），7.5%$FeCl_3$ 溶液处理组（n=4）。

图 4　不同浓度 $FeCl_3$ 溶液诱导大鼠颈动脉血栓形成率

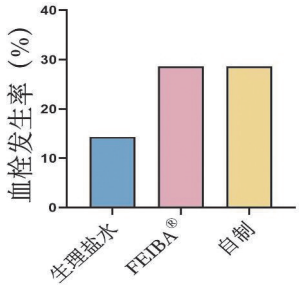
Figure 4　The rate of thrombosis formation in the carotid arteries of rats induced by different concentrations of $FeCl_3$ solutions

2.4　aPCC 对大鼠颈动脉血栓形成的影响

各实验组大鼠颈动脉血栓形成率见图 5，生理盐水处理组的血栓发生率为 14.3%，FEIBA® 和自制 aPCC 处理组的血栓发生率均为 28.6%。各实验组大鼠对应颈动脉血流灌注量变化的代表性图像图 6、图 7。生理盐水组与自制 aPCC 处理组形成的血栓在血流监测期间均发生自溶，血流恢复。FEIBA® 处理组形成的血栓均较为稳定，在血流监测结束时血流仍未恢复。

各实验组大鼠血浆凝血四项检测结果见图 8，FEIBA® 和自制 aPCC 组的 PT 检测值均显著低于生理盐水组（P 均<0.01），2 个 aPCC 组之间则没有统计学差异（P>0.05）。2 个 aPCC 组的 APTT 检测值均显著高于生理盐水组（P 均<0.001），2 个 aPCC 组之间则没有统计学差异（P>0.05）。3 个实验组的 Fib 含量检测值及 TT 检测值均无统计学差异（P>0.05）。

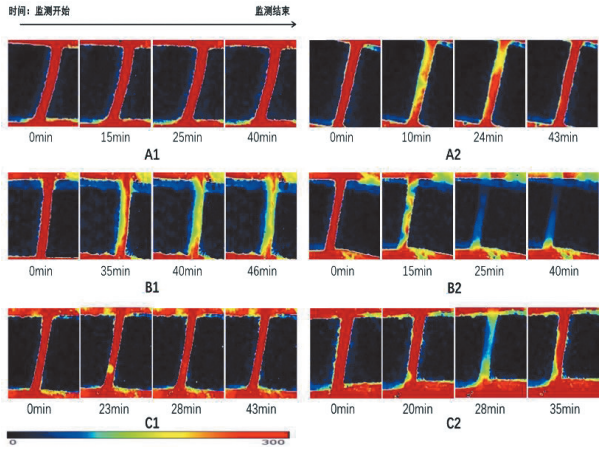
各实验组大鼠血浆 CAT 检测结果见图 9，凝血酶生成图见图 10。2 个 aPCC 组的 ETP、Peak 检测值均显著高于生理盐水组（P 均<0.001），2 个 aPCC 组之间则没有统计学差异（P>0.05）。3 个实验组的 ttPeak、tLag 检测值均没有统计学差异（P 均>0.05）。



注：各组 n=7。

图 5　aPCC 致大鼠颈动脉血栓形成率

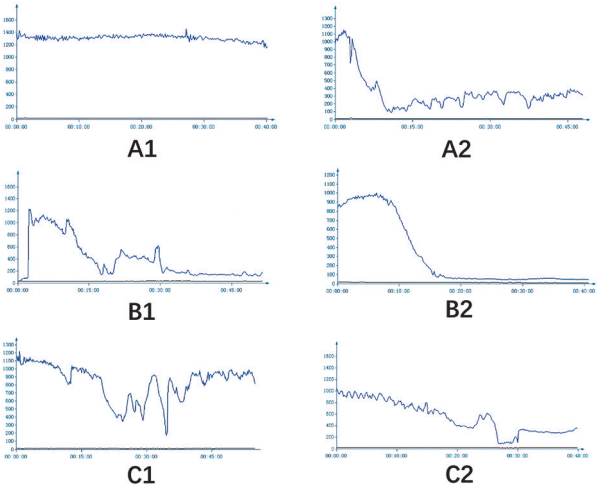
Figure 5　The rate of carotid artery thrombosis in rats caused by aPCC



注：大鼠颈静脉给药（生理盐水 2 mL/kg，2 个 aPCC 实验组 50 IU/kg）后使用 5%$FeCl_3$ 溶液诱导颈动脉血栓形成激光散斑血流成像图像，图像下方标注时间为该图像采集时间。FEIBA®：武田公司市售 aPCC 制品；自制：本研究制备 aPCC 浓缩物。（A1）（A2）生理盐水处理组，（A1）无血栓形成，（A2）血栓形成，发生自溶；（B1）（B2）FEIBA® 处理组；（C1）（C2）自制 aPCC 浓缩物处理组。高血流量时监测区域呈红色，中等血流量时监测区域呈黄绿色，低血流量或无血流量时监测区域呈蓝色。

图 6　大鼠颈动脉激光散斑血流成像监测结果

Figure 6　Monitoring results of laser speckle blood flow imaging of the rat carotid artery



注：与图 5 大鼠颈动脉血栓形成相对应的颈动脉血流灌注量变化监测结果。FEIBA®：武田公司市售 aPCC 制品；自制：本研究制备 aPCC 浓缩物。（A1）（A2）生理盐水处理组；（B1）（B2）FEIBA® 处理组；（C1）（C2）自制 aPCC 浓缩物处理组。

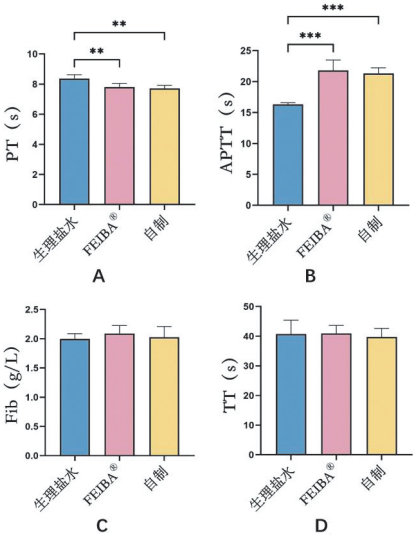
图 7　大鼠颈动脉血流灌注量变化的代表性图像

Figure 7　Representative images of changes in blood flow perfusion in the carotid arteries of rats

3　讨论

临床上，针对 HA 抑制物患者使用旁路药物治疗的有效性主要通过临床观察来验证，同时结合凝血四项检测、CAT、血栓弹力图、活 APTT、凝块波形

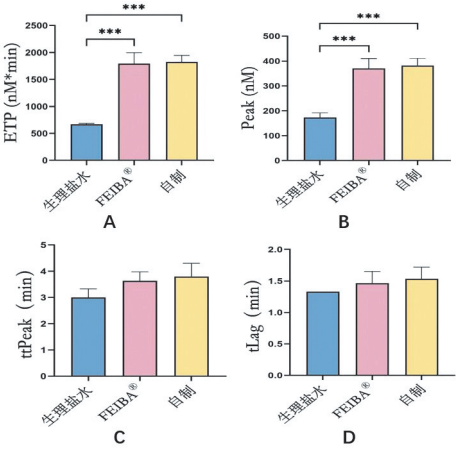
分析等系列检测手段,评估整体凝血功能,精准监测止血治疗的有效性[8]。其中,CAT 反映旁路药物中促凝、抗凝组分的综合作用效应,是评价药物凝血调控能力的核心检测方法。目前有多项研究通过体外 CAT,对 FEIBA®进行药效评价及作用机制研究[9-10]。



注:给药量:生理盐水 2 mL/kg,aPCC 50 IU/kg。FEIBA®:武田公司市售 aPCC 制品;自制:本研究制备 aPCC 浓缩物。(A)PT 检测结果;(B)APTT 检测结果;(C)Fib 含量检测结果;(D)TT 检测结果。**表示 $P<0.01$,***表示 $P<0.001$,$n=5$。

图 8 各实验组大鼠血浆凝血四项检测结果

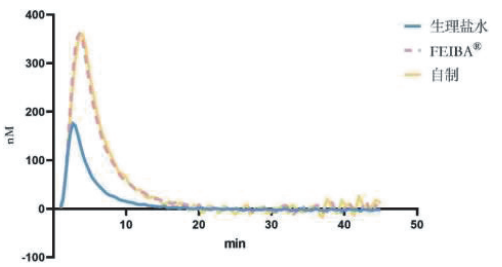
Figure 8 The results of the four blood coagulation tests in the plasma of the rats in each experimental group



注:给药量:生理盐水 2 mL/kg,aPCC 50 IU/kg。FEIBA®:武田公司市售 aPCC 制品;自制:本研究制备 aPCC 浓缩物。(A)ETP 检测结果;(B)Peak 检测结果;(C)ttPeak 检测结果;(D)tLag 检测结果。***表示 $P<0.001$,$n=5$。

图 9 各实验组大鼠血浆 CAT 各参数指标

Figure 9 The various parameters of CAT in the plasma of the rats in each experimental group



注:各组 $n=5$。

图 10 各实验组大鼠血浆凝血酶生成图

Figure 10 Plasma thrombin generation graphs of rats in each experimental group

在一项评估艾美赛珠单抗在伴抑制物的血友病 A 患者的预防性治疗的Ⅲ期临床试验(HAVEN 1)中,联合使用艾美赛珠单抗和 aPCC,治疗持续时间超过 24 h,有约 5%的受试者发生血栓性微血管病(TMA)或发生血栓性事件(TE)。而单独使用艾美赛珠单抗或与 rFⅦa 联用未出现血栓事件[11]。Hartmann 等在体外研究艾美珠单抗与旁路药物(aPCC 或 rFⅦa)联合使用对凝血酶生成和血栓形成的影响时发现,艾美珠单抗类似物与 aPCC 联合使用显著增加凝血酶的峰值水平,使其达到正常生理范围的数倍,呈现明显的凝血协同作用。这种过度的凝血酶生成在 aPCC 的较低剂量(0.25 IU/mL)和艾美珠单抗类似物(600 nM)联合使用时就已出现[12]。Kizilocak 等[13]的体外实验验证了两者联合使用的协同作用。值得注意的是,其团队后续开展的体内研究与体外实验结果存在显著差异。该研究对接受艾美珠单抗治疗的 HA 抑制物患者,输注(5~75)IU/kg 不同剂量 aPCC,结果发现绝大多数患者输注临床推荐最大剂量(75 IU/kg)aPCC 后,体内 ETP 仍未达到正常参考水平的 90%,而低于说明书推荐剂量的 aPCC 则难以实现有效止血。基于此,研究者提出,体外实验中 aPCC 与艾美珠单抗联用的过度凝血酶生成协同效应,在体内环境中存在明显高估的可能[14]。

根据说明书,FEIBA®的临床推荐使用剂量为 50~100 IU/kg。本研究以 FEIBA®为阳性对照,按照 50 IU/kg(对应血浆浓度 0.5 IU/mL)的临床常用剂量给药,通过体外凝血功能检测、CAT 检测评价自制 aPCC 促进凝血的有效性。肝素的存在对 APTT 检测产生极大干扰。由于自制 aPCC 中含有一定量的肝素,为消除肝素的影响,本研究添加鱼精蛋白中和自制 aPCC 中的肝素后,再开展各项凝血功能检测。本研究凝血四项结果显示,自制 aPCC 与 FEIBA®均可显著缩短抑制物血浆 PT 和

APTT,改善抑制物血浆的外源性和内源性凝血功能。在 50 IU/kg 剂量下,自制 aPCC 与 FEIBA®均无法将抑制物血浆的内源性凝血功能恢复至正常水平。而 CAT 实验显示抑制物血浆加入自制 aPCC 与 FEIBA®后凝血酶生成相关指标显著改善,在 50 IU/kg 剂量下,自制 aPCC 与 FEIBA®的 ETP 分别为 2 971 nM×min、2 948 nM×min,Peak 分别为 366 nM、336 nM,均显著高于正常血浆水平(ETP 1 699 nM×min、Peak252 nM)。此结果与 Kizilocak 报道的在患者血浆中加入 50 IU/kg 的 aPCC 后,凝血酶峰值达到 340 nM 的数据一致[13-14]。

血栓形成被认为是 aPCC 治疗血友病抑制物患者最严重的潜在并发症,包括弥散性血管内凝血(DIC)、心肌梗死(MI)、肺栓塞等[15]。FEIBA®的长期安全性监测数据显示,为期 10 年的临床监测中仅记录 16 起血栓不良事件,其中 MI 和 DIC 是最常见的血栓事件,血栓发生率为 4. 05 例/10 万次输注,整体不良反应发生率极低,且多数与临床超剂量用药直接相关[16]。目前国内外用于评价凝血因子类制品致血栓风险的动物模型主要包括静脉淤滞模型、兔/犬/猪非停滞血栓模型、大鼠非停滞模型等[17]。近年来,多项研究采用 $FeCl_3$ 诱导大鼠颈动脉血栓模型,以血栓形成情况、颈动脉血流灌注状态为量化指标,直观评估 aPCC、rFⅦa 等旁路止血药物的体内促血栓生成潜能[18]。本研究采用 $FeCl_3$ 诱导大鼠颈动脉血栓模型,通过在大鼠颈动脉表面放置浸润 $FeCl_3$ 溶液的滤纸建立血栓形成模型,基于该模型对比自制 aPCC、FEIBA®及生理盐水组的血栓形成率、血栓稳定性及血流恢复情况,以评估自制 aPCC 的潜在致血栓风险。本研究的激光散斑血流成像结果显示,自制 aPCC 与 FEIBA®的血栓形成率无差异,且均显著高于生理盐水组。自制 aPCC 处理组形成的血栓体积小、稳定性差,可发生自发性溶解,大鼠颈动脉血流灌注恢复效果良好,而 FEIBA®组形成的血栓体积较大、结构较稳定,未自溶。本研究的大鼠血浆凝血四项及 CAT 检测结果显示,相较于生理盐水组,自制 aPCC 与 FEIBA®处理组的 PT 值显著降低、ETP 及 Peak 显著升高,证实在该模型中 2 个 aPCC 处理组的外源性凝血途径更易被触发,凝血酶生成潜力大,与血栓形成率的实验结果相互印证。同时,本研究发现两个 aPCC 处理组的 APTT 值均显著高于生理盐水组,且实验过程中未观察到 Fib 消耗。

重复给药、超剂量用药引发的 FⅡ、FⅩ体内蓄积是 aPCC 诱导血栓形成的核心因素[19]。aPCC 中的抗凝组分可通过抑制已生成凝血酶的活性,拮抗促凝效应、降低血栓发生风险[20]。我们前期关于自制 aPCC 药效成分的研究显示,自制 aPCC 中 FⅡ、FⅩ活性略高于 FEIBA®,同时自制 aPCC 中抗凝成分含量亦高于 FEIBA®[21]。据此推测,两种制剂致血栓潜能的差异,可能与 2 组样品中促凝因子(FⅡ、FⅩ)及抗凝组分的活性配比差异相关。有研究报道,在兔静脉淤滞模型中输注 FEIBA®的实验组 APTT 延长并伴有 Fib 和血小板的消耗[22]。也有研究报道在美拉加群诱导大鼠抗凝模型中,输注 FEIBA®导致 APTT 呈剂量依赖性延长,并且未出现 Fib 和血小板的消耗[23]。但这 2 项研究均未解释导致 APTT 延长的作用机制。内源性凝血途径中,FⅨa-FⅧa 复合物介导的 FⅩ激活是限速核心步骤,而活化蛋白 C(APC)可特异性灭活 FⅧa,抑制 FⅨa 活性,进而阻断内源性凝血进程[24]。自制 aPCC 与 FEIBA®中均含有一定量的蛋白 C(PC)等抗凝组分。结合本研究结果,我们推测在该动物模型体系中,FEIBA®及自制 aPCC 中抗凝成分对内源性凝血途径的抑制效应,超过了其所含凝血因子的促凝效应,最终表现为 APTT 延长。

综上,本研究制备的自制 aPCC 浓缩物在体外可有效促进 FⅧ抑制物血浆凝血,凝血酶生成能力与市售 FEIBA®无显著差异,在大鼠体内模型中致血栓风险较低,具备良好的新药开发与临床转化潜力。

需要指出的是在本研究中还存在一些局限性:第一,实验采用 FⅧ抑制物模拟血浆与正常大鼠,未使用血友病抑制物模型动物或临床患者血浆,研究结果的临床转化证据强度有待进一步提升;第二,体内致血栓形成的安全性评价动物实验样本量有限,可能导致实验结果存在一定偏倚。第三,未开展不同剂量、重复给药及长期安全性评价,无法全面反映临床实际用药场景。后续研究将扩大实验样本量,结合血友病抑制物动物模型与临床患者血浆样本,完善自制 aPCC 的有效性和安全性评价数据,为国产 aPCC 的开发提供更多数据支持。

利益冲突说明/Conflict of Interests

所有作者均声明不存在利益冲突。

伦理批准及知情同意/Ethics Approval and Patient Consent

本研究实验方案的实施得到中国医药集团总公司四川抗菌素工业研究所实验动物福利伦理委员会的批准(批准号:SIIA20240913),实验过程遵循国家相关规定。

作者贡献/Authors' Contribution

潘旭：样品制备、文章撰写；黄雨薇：体外实验、动物实验；毛烈火：FEIBA®样品收集；孙盼：体外实验、样品检测；李长清：研究指导；杜晞：实验设计、作图、数据统计分析；马莉：实验设计、论文审阅。

[参考文献]

[1] SAHIN T K, ALADAG E, SETTERZADE E, et al. Spontaneous subepithelial hemorrhage of renal pelvis and ureter (Antopol-Goldman lesion) in hemophilia A patient with inhibitor: Case report and review of the literature [J]. Medicine (Baltimore), 2020, 99(26): e20851.

[2] MAHLANGU J, OLDENBURG J, PAZ-PRIEL I, et al. Emicizumab Prophylaxis in Patients Who Have Hemophilia A without Inhibitors [J]. N Engl J Med, 2018, 379(9): 811-822.

[3] YOUNG G, LIESNER R, CHANG T, et al. A multicenter, open-label phase 3 study of emicizumab prophylaxis in children with hemophilia A with inhibitors [J]. Blood, 2019, 134(24): 2127-2138.

[4] PIPE S W, SHIMA M, LEHLE M, et al. Efficacy, safety, and pharmacokinetics of emicizumab prophylaxis given every 4 weeks in people with haemophilia A (HAVEN 4): a multicentre, open-label, non-randomised phase 3 study [J]. Lancet Haematol, 2019, 6(6): e295-e305.

[5] TEITEL J M. Treatment and prevention of bleeding in congenital hemophilia A patients with inhibitors [J]. Transfus Apher Sci, 2018, 57(4): 466-471.

[6] KEMPTON C L, MEEKS S L. Toward optimal therapy for inhibitors in hemophilia [J]. Blood, 2014, 124(23): 3365-3372.

[7] TELLIER Z, ANDRé M H, POLACK B. Management of haemophilia A-inhibitor patients: clinical and regulatory perspectives [J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2009, 37(2): 125-134.

[8] HOFFMAN M, DARGAUD Y. Mechanisms and monitoring of bypassing agent therapy [J]. J Thromb Haemost, 2012, 10(8): 1478-1485.

[9] KJALKE M, MADS KJELGAARD-HANSEN, ANDERSEN S, et al. Thrombin generation potential in the presence of concizumab and rFVIIa, APCC, rFⅧ, or rFIX: In vitro and ex vivo analyses [J]. J Thromb Haemost, 2021, 19(7): 1687-1696.

[10] VARADI K, TANGADA S, LOESCHBERGER M, et al. Pro- and anticoagulant factors facilitate thrombin generation and balance the haemostatic response to FEIBA® in prophylactic therapy [J]. Haemophilia, 2016, 22(4): 615-624.

[11] OLDENBURG J, MAHLANGU J N, KIM B, et al. Emicizumab Prophylaxis in Hemophilia A with Inhibitors [J]. The New England journal of medicine, 2017, 377(9): 809-818.

[12] HARTMANN R. In vitro studies show synergistic effects of a procoagulant bispecific antibody and bypassing agents [J]. J Thromb Haemost, 2018, 16(8): 1580-1591.

[13] KIZILOCAK H, ELIZABETH M C, WEE C P, et al. Comparison of bypassing agents in patients on emicizumab using global hemostasis assays [J]. Haemophilia, 2021, 27(1): 164-172.

[14] KIZILOCAK H, ELIZABETH M C, MALVAR J, et al. Safety of FEIBA and emicizumab (SAFE): Dose escalation study evaluating the safety of in vivo administration of activated prothrombin complex concentrate in haemophilia A patients on emicizumab [J]. Haemophilia, 2023, 29(1): 100-105.

[15] CROMWELL C, ALEDORT L M. FEIBA: a prohemostatic agent [J]. Semin Thromb Hemost, 2012, 38(3): 265-267.

[16] EHRLICH H J, HENZL M J, GOMPERTS E D. Safety of factor Ⅷ inhibitor bypass activity (FEIBA): 10-year compilation of thrombotic adverse events [J]. Haemophilia, 2002, 8(2): 83-90.

[17] GROTTKE, O, BRAUNSCHWEIG T, SPRONK H M, et al. Increasing concentrations of prothrombin complex concentrate induce disseminated intravascular coagulation in a pig model of coagulopathy with blunt liver injury [J]. Blood, 2011, 118(7): 1943-1951.

[18] GHOSH, S, KREGE W, DOERR B, et al. Evaluation of the prothrombotic potential of four-factor prothrombin complex concentrate (4F-PCC) in animal models [J]. PLoS One, 2021, 16(10): e0258192.

[19] INGERSLEV J, SøRENSEN B. Parallel use of by-passing agents in haemophilia with inhibitors: a critical review [J]. Br J Haematol, 2011, 155(2): 256-262.

[20] BRIEN L. Anticoagulant Medications for the Prevention and Treatment of Thromboembolism [J]. AACN Adv Crit Care, 2019, 30(2): 126-138.

[21] 黄雨薇，赵娅菲，叶刚，等. 自制活化凝血酶原复合物的主要药效成分分析 [J]. 中国生物制品学杂志，2025, 38(3): 312-317.
HUANG Y W, ZHAO Y F, YE G, et al. Analysis of the primary active pharmaceutical ingredients in self-formulated activated prothrombin complex [J]. Chinese Journal of Biological Products, 2025, 38(3): 312-317.

（下转第 1025 页）

测模型的研究进展[J]. 中国优生与遗传杂志, 2023, 31(6):1302-1307.
FAN X, ZHANG G Y, CHEN L, et al. Postpartum hemorrhage:looking for"new" risk factors and better prediction models[J]. Chin J Birth Health Hered, 2023, 31(6):1302-1307.
[26] 林之韵, 程云章, 耿晓斌. 基于 XGBoost 的危重症患者住院时间分类预测模型和风险因素研究[J]. 生物医学工程研究, 2023, 42(1):36-42.
LIN Z Y, CHENG Y Z, GENG X B. Classification prediction length of stay for critically ill patients via XGBoost and exploring risks factors[J]. J Biomed Eng Res, 2023, 42(1):36-42.

(2026-07-06 收稿,08-20 修回,08-20 接收)
本文编辑:李宜蔓

(上接第 1011 页)

[22] DINESS V,BREGENGAARD C, ERHARDTSEN E, et al. Recombinant human factor VIIa (rFVIIa) in a rabbit stasis model[J]. Thromb Res, 1992, 67(2):233-241.
[23] ELG M, CARLSSON S, GUSTAFSSON D. Effect of activated prothrombin complex concentrate or recombinant factor VIIa on the bleeding time and thrombus formation during anticoagulation with a direct thrombin inhibitor [J]. Thromb Res, 2001, 101(3):145-157.
[24] MAJUMDER R. Not so fast, antithrombin! [J]. Blood, 2023, 141(16):1907-1908.

(2026-07-06 收稿,08-19 修回,08-21 接收)
本文编辑:李弘武