

НОВЫЙ ПОДХОД В ЛЕЧЕНИИ ГЕМОФИЛИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИСПЕЦИФИЧЕСКИХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ.

Мельник А.А., к.б.н.

Гемофилия - это сцепленное с X-хромосомой врожденное нарушение свертываемости крови, вызванное дефицитом или отсутствием фактора свертывания крови VIII (гемофилия А) или фактора IX (гемофилия В). Недостаток факторов является результатом мутации соответствующих генов факторов свертывания. На основании оценки ежегодных глобальных исследований количество людей с гемофилией в мире составляет приблизительно 400 000 (1). В Украине по статистическим данным за 2015 г. на диспансерном учете находилось 2456 пациентов с гемофилией и болезнью фон Виллебранда из которых 27% дети (2). Подавляющее большинство больных гемофилией - мужчины. Распространенность гемофилии в большинстве стран составляет 5,4 - 14,5 на 100 000 мужчин. Гемофилия А встречается чаще, чем гемофилия В (80-85% от общего числа случаев) и может вызвать спонтанное или длительное кровотечение в мышцах, суставах или внутренних органах, являющиеся угрожающими для жизни. Гемофилия А имеет частоту 1 на 5 000 новорожденных мальчиков. Более половины пациентов с гемофилией А имеют тяжелую форму гемофилии.

Степень тяжести нарушений свертывания крови и клинических проявлений при гемофилии зависит от уровня активности фактора VIII в крови. Классификация гемофилии по степени тяжести основана на определении активности FVIII (норма 50-150 %) представлена в табл.1. (3).

Степень тяжести	Уровень фактора свертывания крови, %	Гемофилии по степени тяжести (%)	Эпизоды кровотечения
Тяжелая	<1% от нормы или < 1 IU/дл (<0,01 IU/мл)	60 %	Спонтанные кровотечения в суставы или мышцы, преимущественно в отсутствие идентифицируемого гемостатического изменения.
Средняя	1-5% от нормы или 1-5 IU/дл (0,01-0,05 IU/мл)	15%	Возможны спонтанные кровотечения. Сильное кровотечение при травме или хирургическом вмешательстве.
Легкая	5 - < 40% от нормы или 5-40 IU/дл (0,05-0,40 IU/мл)	25%	Сильное кровотечение при серьезной травме или хирургической операции. Спонтанное кровотечение встречается редко.

Табл.1. Соотношение тяжести кровотечения и уровня фактора свертывания VIII при гемофилии А.

Легкая форма гемофилии.

Легкая гемофилия может никак не проявляться на протяжении всей жизни человека. Патологические кровотечения и кровоизлияния у пациентов с легкой формой гемофилии возникают вследствие значительных травм или операций. Поражение опорно-двигательного аппарата встречается чрезвычайно редко. У индивидуумов с легкой формой гемофилии отмечается кровотечение только после серьезных травм и хирургических вмешательств. Во многих случаях легкая форма гемофилии не диагностируется до тех пор, пока травма, хирургическая операция, удаление зуба не приведут к длительному кровотечению. Первый эпизод может произойти у человека во взрослой жизни. Для женщин с легкой

формой тромбофилии характерны меноррагии, тяжелые менструальные периоды, а также кровизлияния после родов.

Средняя форма гемофилии.

Индивидуумы с умеренной гемофилией, как правило, имеют кровотечения после травм. У них реже встречаются кровоизлияния в суставы, забрюшинные гематомы, гематурия. Наиболее типичными являются длительные кровотечения при травмах слизистых оболочек.

Тяжелая форма гемофилии.

Для больных тяжелой формой гемофилии характерно появление геморрагического синдрома на первом году жизни. Относительно редко тенденция к кровотечениям может стать очевидной уже в неонатальном периоде (кефалогематомы, гематомы мягких тканей, возникающие после инъекций или вследствие тяжелых родов, кровотечение из пупочного канатика, послеоперационные кровотечения). Как правило, первые экхимозы появляются у детей в возрасте до 6 месяцев (часто после массажа или гимнастики). Со второго полугодия жизни ведущими симптомами становятся межмышечные гематомы, тяжелые посттравматические кровотечения из слизистых полости рта и кровоизлияния в суставы. Поражаются в основном крупные суставы: коленные, голеностопные и локтевые. Кроме этого, у людей с тяжелой гемофилией бывают кровоизлияния в подвздошно-поясничную мышцу, гематурия, кровотечения из желудочно-кишечного тракта (особенно при наличии эрозий, язв, полипов, воспалительного процесса) и кровоизлияния в ЦНС, кровотечения и кровоизлияния при проведении инвазивных манипуляций (4).

Лекарственные препараты для лечения гемофилии.

Основным методом лечения гемофилии является заместительная терапия концентратами факторов свертываемости VIII (ф.VIII) или IX (ф.IX). Для этой цели получают рекомбинантные ф.VIII или ф.IX с использованием ДНК технологии, что исключает применение донорской плазмы человека.

Главными производителями таких лекарственных средств выступают всего лишь несколько компаний в мире (Табл.2).

Компания-производитель	Лекарственный препарат	Рекомбинантный фактор
Shire	Advante	Рекомбинантный фактор VIII
Bayer	Kogenate	Рекомбинантный фактор VIII
Pfizer	Xyntha	Рекомбинантный фактор VIII
CSL	Afstyla	Рекомбинантный фактор VIII
Bioverative/Swedish Orphan	Eloctate	Рекомбинантный фактор VIII
Novo Nordisk	NovoSeven	Рекомбинантный фактор VIIa
Bioverative/Swedish Orphan	Alprolix	Рекомбинантный фактор IX
Pfizer	BeneFIX	Рекомбинантный фактор IX
Shire	Adynovate	Рекомбинантный фактор VIII

Табл.2. Компании-производители лекарственных препаратов для лечения гемофилии на основе рекомбинантных факторов VIII и IX.

К сожалению, в ряде случаев отмечается недостаточная эффективность заместительной профилактической терапии, причинами которой могут быть появление ингибитора против фактора свертывания крови, назначение недостаточной дозы и (или) кратности введения, несоблюдение режима введения и дозировок пациентом и родителями, индивидуальные особенности пациента, требующие применения более высоких доз или более частого введения препарата. Для пациентов с тяжелой формой гемофилии требуется регулярная

профилактическая внутривенная инфузия фактора VIII (5,6). Однако из-за короткого периода полураспада фактора VIII (12 часов), требуется более 2-х инфузий в неделю. Это приводит к тому, что пациенты зависят от медицинского учреждения и, как следствие, не всегда придерживаются стратегии лечения (7).

Для предотвращения риска серьезных и жизнеугрожающих кровотечений при гемофилии А был разработан лекарственный препарат Emicizumab-kxwh (непатентованное название), который является первым в своем классе биспецифическим моноклональным антителом и предназначенный для связывания факторов крови IXa и X.

Биспецифические моноклональные антитела.

Обычное антитело IgG имеет два антигенсвязывающих сайта, которые связываются с одним и тем же антигеном. Напротив, биспецифическое антитело (BiAb) содержит два разных сайта связывания, состоящих из 2-х различных тяжелых цепей и 2-х легких цепей, связанных пептидными мостиками, которые могут связываться с двумя различными антигенами (Рис.1).

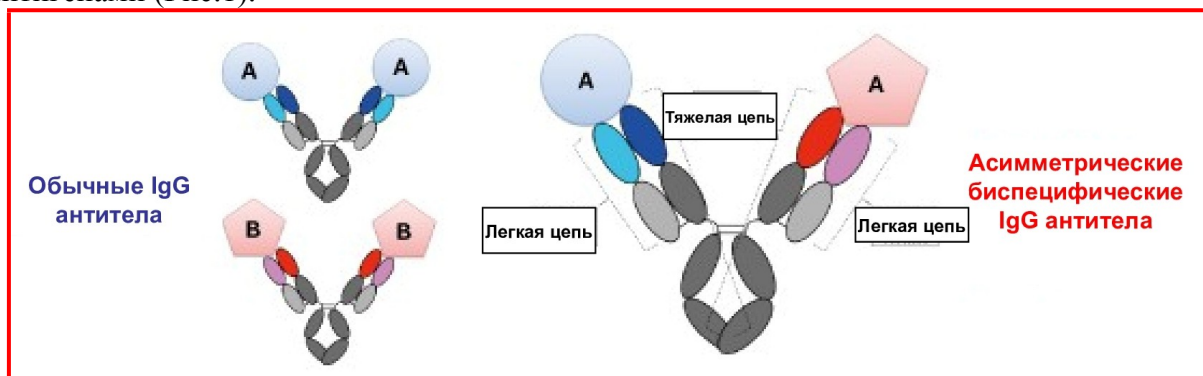


Рис.1. Различия между обычными антителами и биспецифическими.

Лекарственный препарат Emicizumab (эмицизумаб).

Emicizumab-kxwh (Hemibra[®], компания-производитель Genentech, США) представляет собой биспецифические гуманизированные моноклональные антитела на основе иммуноглобулина G4 (IgG4), продуцируемые клетками яичников китайского хомячка по технологии рекомбинантной ДНК. Эмицизумаб связывает активированный фактор IX с фактором X для имитации отсутствующего активированного фактора VIII, который необходим для успешного свертывания крови (Рис.2).

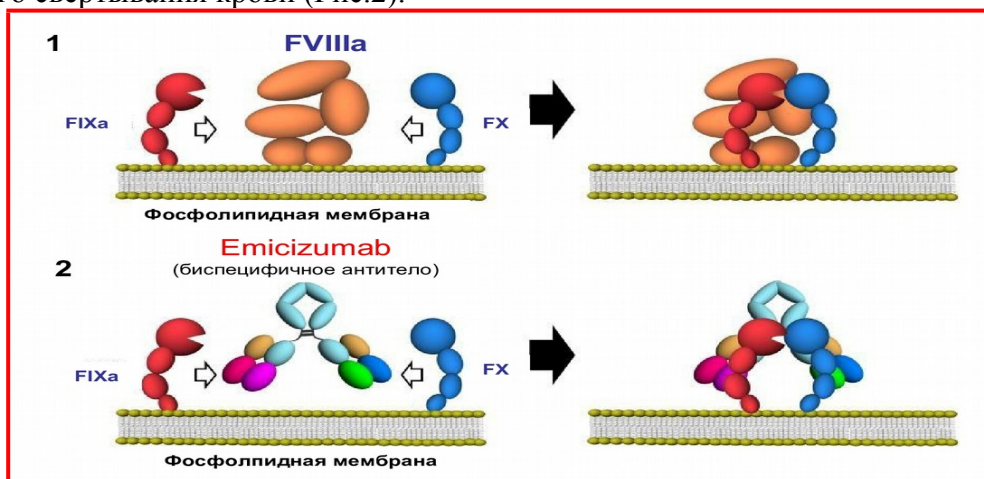


Рис.2. Механизм действия фактора VIII и эмицизумаба.

1. Фактор VIIIa образует комплекс на фосфолипидной мембране с активированным фактором IX и фактором X для образования активированного фактора Xa.
2. Эмицизумаб связывается с факторами IXa и X и проявляет миметическую активность фактора VIII.

16 ноября 2017 г эмицизумаб был одобрен FDA (Food and Drug Administration, США) для профилактики с целью предотвращения или снижения частоты кровотечений у взрослых и детей с гемофилией А с ингибиторами к фактору VIII (8,9).

Эмицизумаб не имеет структурного сходства или гомологичных последовательностей с фактором VIII, поэтому не индуцирует и не усиливает образование прямых ингибиторов FVIII. В клинических исследованиях методом иммуноферментного анализа (ИФА, ELISA) только у 2,1% пациентов были обнаружены антитела к эмицизумабу, не оказывавшие нейтрализующего действия.

Сайты связывания эмицизумаба с активированным фактором IX и фактором X представлены на рисунке 3 (10).

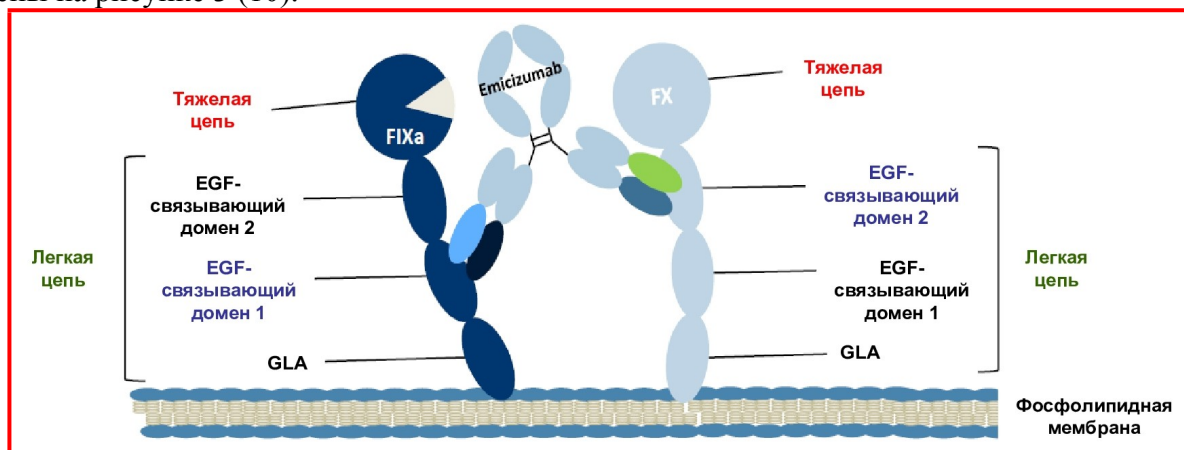


Рис.3. Эмицизумаб связывается с EGF-связанным доменом 1 на факторе IXa и EGF-связанным доменом 2 на факторе X (EGF – эндотелиальный фактор роста, GLA – гамма-карбокситглутаминовая кислота).

Форма выпуска эмицизумаба.

Эмицизумаб выпускается в виде раствора для подкожного введения в следующих формах: 30 мг/1мл, 60 мг/0,4 мл, 105 мг/0,7мл или 150 мг/1 мл во флаконе.

Фармакокинетика.

Средние минимальные концентрации эмицизумаба в плазме повышались в течение первых 4-х недель и достигали значений 54.6 ± 14.3 мкг/мл на 5-й неделе после подкожной инъекции препарата в дозе 3 мг/кг один раз в неделю пациентам с гемофилией А (Рис.4).

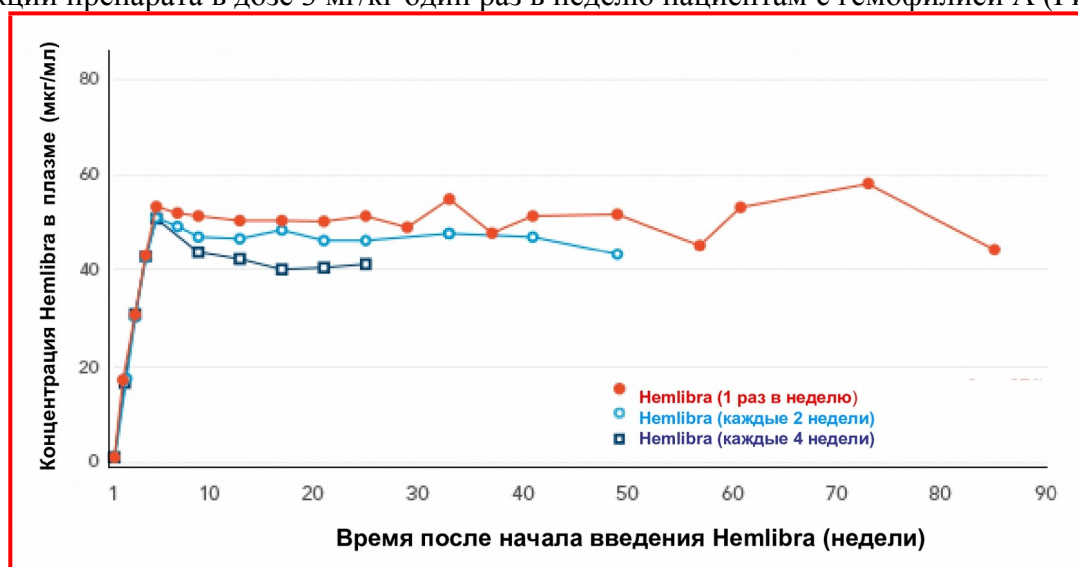


Рис.4. Средняя концентарция эмицизумаба в плазме крови после подкожной инъекции в дозе 3 мг/кг.

У здоровых добровольцев абсолютная биодоступность после подкожного введения препарата в дозе 1 мг/кг варьировала от 80,4% до 93,1% в зависимости от места введения.

Профили фармакокинетики после подкожного введения эмицизумаба в область живота, верхнюю часть наружной поверхности плеча и бедро были одинаковыми.

Метаболизм.

Метаболизм эмицизумаба не изучался. Антитела IgG преимущественно подвергаются катаболизму путем лизосомального протеолиза. Затем продукты распада антител (аминокислоты) выводятся или используются организмом.

Выведение.

После однократного подкожного введения здоровым добровольцам период полувыведения составлял примерно 4-5 недель.

Побочные действия.

При приеме эмицизумаба может отмечаться головная боль, тромботическая микроангиопатия, диарея, артралгия, миалгия, реакции в месте введения, пирексия.

Влияние эмицизумаба на лабораторные показатели свертываемости крови.

Эмицизумаб искажает результаты клоттинговых лабораторных анализов, основанных на внутреннем пути свертывания, в том числе результаты анализа на активированное время свертывания (АВС), активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) и все анализы, основанные на АЧТВ, в частности при одноэтапном анализе активности ф. VIII. Поэтому результаты клоттинговых лабораторных анализов, основанных на внутреннем пути свертывания, не следует использовать с целью мониторинга активности препарата эмицизумаба, определения дозы препаратов заместительной терапии, содержащих факторы свертывания или антикоагулянтных препаратов, а также измерения титров ингибиторов ф. VIII. Лабораторные анализы, на результаты которых применение эмицизумаба искажает результаты и не оказывает влияние приведены в табл.3.

Результаты, искажающиеся при применении Эмицизумаба	Результаты, не искажающиеся при применении Эмицизумаба
<ul style="list-style-type: none">- <i>Бетесда тесты (клоттинговый)</i> для определения титра ингибиторов ф. VIII;- АЧТВ;- Одноэтапные, основанные на АЧТВ, анализы одного из факторов свертывания крови (активность ф. VIII);- Основанный на АЧТВ анализ на устойчивость к действию активированного протеина С (APC-R);- Активированное время свертывания.	<ul style="list-style-type: none">- <i>Бетесда тесты (хромогенный)</i> для определения титра ингибиторов ф. VIII;- Тромбиновое время;- Одноэтапные, основанные на измерении протромбинового времени (ПВ), анализы одного из факторов свертывания крови;- Хромогенные анализы одного из факторов свертывания крови;- Иммуные анализы (ELISA, турбидиметрический метод);- Генетические анализы факторов свертывания (анализ фактора V Лейдена, протромбина 20210).

Табл.3. Анализы свертываемости крови, на результаты которых влияет или не влияет применение препарата эмицизумаба.

Методы определения ингибиторных антител при гемофилии.

Ингибиторами при гемофилии являются преимущественно антитела класса IgG (обычно субклассы IgG1 и IgG4), но могут встречаться и другие классы иммуноглобулинов. Ингибиторы фактора VIII направлены на ограниченные эпитопы большой молекулы ф. VIII, чаще всего против доменов A2, C1 и C2 (11). Разные ингибиторы имеют различную аффинность к ф. VIII и кинетику взаимодействия с ним (12). Они классифицируются как имеющие кинетику Тип1, если они могут быть полностью нейтрализованы добавлением ф. VIII или кинетику Тип2, если остаточная активность ф. VIII остается в присутствии больших количеств ингибитора. Различия в аффинности антител к

фактору VIII было показано в иммунологических исследованиях *in vitro*, поэтому не ясно как это происходит *in vivo*.

Первое проявление действия ингибиторов у пациента после инфузии ф. VIII при гемофилии А было описано в 1941 году (13). Антикоагулянтную активность определяли по ее способности пролонгировать время свертывания в смеси с нормальной плазмой. Первый количественный метод оценки ингибиторной активности или Oxford метод был предложен Biggs R. и Bidwell E. в 1959 г. (14). В новом Oxford методе, описанном Rizza C. и Biggs R. (15) ф. VIII добавлялся в избыточном количестве по сравнению с уровнем антител и увеличением инкубационного периода до 4-х часов. Позже Kasper C. и др. (16) описали метод Бетезда, который является более стандартизированным и в котором используется нормальная пулированная плазма как источник ф. VIII при разведении 1:1 с плазмой пациента и имидазальным буфером в качестве контроля. Одна Бетезда единица (БЕ) определяется как количество ингибитора, являющегося результатом 50% остаточной активности (ОА) ф. VIII в смеси. Расчет БЕ производится с использованием специальной формулы. Значение cut-off, применяемое для количественной оценки ингибитора обычно составляет $\geq 0,6$ БЕ/мл и является клинически значимым.

Функциональные методы для определения ингибиторов основаны на принципе сравнения остаточной активности в тестовой смеси, содержащей плазму пациента и источник ф. VIII с остаточной активностью в контрольной смеси при разведении.

1. Функциональные клоттинговые тесты.

В 1975 г. группа исследователей, собравшихся в г.Бетезда, штат Мэриленд, в США стандартизовала ингибиторный тест, в котором 1 Бетезда единица определяется как количество ингибитора в 1 мл плазмы пациента, которое снижало 50% активности ф. VIII в нормальной пулированной плазме в течение 2-х часов при 37° С. Для расчета Бетезда единиц используется $\log\%$ остаточной активности. Этот метод использовали до 1995 года, пока Verbruggen B. и др. не предложили свою модификацию (Рис.5) (17).



Рис.5. Сравнение классического Бетезда метода и модифицированного Неймегена (различия между двумя методами показаны в кружках).

Конвертирование остаточной активности в единицы Неймегена-Бетезда (НБЕ) осуществляется по формуле $\text{НБЕ} = (2 - \log\% \text{ ОА} / 0,301)$, которая рассчитывается с использованием кривой линейной регрессии, где 1 НБЕ = 50% ОА и 0 НБЕ = 100% ОА (Рис.6).

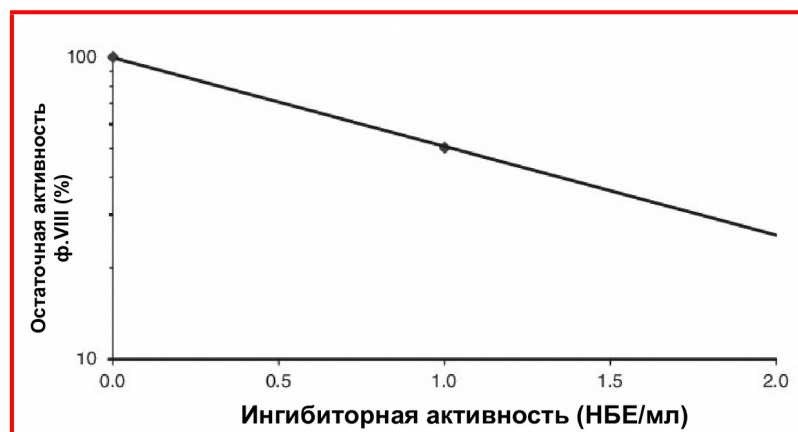


Рис.6. Калибровочная кривая для количественного определения ингибиторов.

Первоначально образцы тестируют не разбавленными. Если при этом % ОА получен ≥ 100 , то НБЕ = 0. Если % ОА получен $> 75\%$, то производят разведение. Если при первом разведении ОА $< 75\%$, то делают разведения 1:1, 1:2, 1:4 и 1:8 в параллелях. НБЕ рассчитывается по уравнению и результат умножается на коэффициент разведения. Метод Неймегена-Бетезды одобрен Международным Обществом по изучению тромбоза и гемостаза (ISTH) и стал «золотым стандартом» для тестирования ингибитора (18).

2. Функциональные хромогенные тесты.

Ингибиторные тесты, основанные на образовании сгустка имеют свои ограничения. Так, образование фибрина зависит от многих переменных и может ингибироваться нефракционированным гепарином, волчаночными антикоагулянтами, а также не специфическими ингибиторами у детей (19-21). Часто бывает трудно отличить такое ингибирование от истинного. Поэтому был предложен тест с хромогенным субстратом, который оказался более специфичными и обладающий повышенной точностью (22,23). Считается, что хромогенные тесты дороже, чем клоттинговые, тем не менее они могут уменьшить количество ложноположительных результатов и, следовательно, потребность в дополнительном тестировании и последующие наблюдения за пациентом.

3. Определение антител.

Методы, разработанные для обнаружения антител к ф. VIII включают в себя методы ELISA, иммунопреципитации, флуоресцентный иммуноанализ (24-29). Они гораздо более чувствительные, чем клоттинговый и хромогенный методы, а ELISA метод является коммерчески доступным.

Набор MNBA для анализа ингибиторов ф. VIII.

В июле 2018 г. компания Precision BioLogic Inc., (Канада) представила новый коммерческий набор модифицированного Nijmegen-Bethesda метода (MNBA) для тестирования ингибиторов ф. VIII у пациентов с гемофилией А. Этот набор является совместной разработкой с компаниями Roche и Genentech. В состав набора входят:

- 1. IB-PNP.** Нормальная пулированная плазма с имидазолом (pH=7,4, 100 ммоль имидазола, ф. VIII с активностью 95-100%);
- 2. IB-BSA.** Имидазол буферизованный альбумин бычьей сыворотки;
- 3. POS-Ctrl:** Положительный контроль ингибитора ф. VIII (~1 БЕ/мл; поликлональные человеческие антитела против ф. VIII);
- 4. NEG-Ctl:** Человеческая плазма без ингибитора ф. VIII (забуференная).

Все компоненты набора MNBA заморожены и хранятся при температуре $< -70^{\circ} \text{C}$ до их использования.

Точная диагностика ингибиторов ф. VIII имеет важное значение в лечении пациентов. Однако из-за использования различных методов и реагентов (например, источники плазмы, режимы температуры, буферы и т.д.) различия в определении титра ингибиторов

между лабораториями могут достигать 50%. Поэтому хромогенный набор MNBA будет способствовать стандартизации и улучшению определения ингибиторов ф. VIII.

Заключение

Эмицизумаб (Hemlibra®) является первым биспецифическим моноклональным антителом, одобренным FDA для лечения гемофилии А у взрослых и детей с гемофилией А с ингибиторами. Механизм действия эмицизумаба основан на связывании факторов свертывания крови IXa и X, что позволяет восстановить свертываемость крови у пациентов. Препарат предназначен для профилактического лечения и вводится подкожно только один раз в неделю.

Литература

1. Stonebraker JS, Bolton-Maggs PH, Soucie JM, Walker I, Brooker M. A study of variations in the reported haemophilia A prevalence around the world. *Haemophilia* 2010;16(1):20-32.
2. Ющенко П.В., Аверьянов Е.В. Семеняка В.И. Рыбаков А.Р. Современные принципы лечения пациентов с гемофилией А, осложненной гемартрозами крупных суставов. *Гематология. Трансфузиология. Восточная Европа*, 2016, том 2, № 4, 507-520.
3. White GC 2nd, Rosendaal F, Aledort LM, Lusher JM, Rothschild C, Ingerslev J. Definitions in hemophilia. Recommendation of the scientific subcommittee on factor VIII and factor IX of the scientific and standardization committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost* 2001;85(3):560.
4. Зозуля Н.И., Свирин П.В. Клинические рекомендации по диагностике и лечению гемофилии. Москва. - 2014. - 41 с.
5. Franchini M, Mannucci PM. Hemophilia A in the third millennium. *Blood Rev* 2013; 27: 179-84.
6. Kingdon HS, Lundblad RL. An adventure in biotechnology: the development of haemophilia A therapeutics — from whole-blood transfusion to recombinant DNA to gene therapy. *Biotechnol Appl Biochem* 2002; 35: 141-8.
7. Ljung R, Gretenkort Andersson N. The current status of prophylactic replacement therapy in children and adults with haemophilia. *Br J Haematol* 2015; 169: 777-86.
8. Oldenburg J, Mahlangu JN, Kim B et al. Emicizumab Prophylaxis in Haemophilia A with Inhibitors. *N Engl J Med*. 2017;377:809-8.
9. FDA Approves Emicizumab-Kxwh For Prevention And Reduction Of Bleeding In Patients With Hemophilia A With Factor VIII Inhibitors. U.S Food and Drugs Administration. Nov 16 2017. Available at <https://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm585650.htm>. Accessed on 6 December 2017.
10. 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. *Thromb Haemost*. 2017;117:1348-1357.
11. Kahle J, Orłowski A, Stichel D. Frequency and epitope specificity of anti-factor VIII C1 domain antibodies in acquired and congenital hemophilia A. *Blood*. 2017; 130:808–816.
12. Gawryl MS, Hoyer LW. Inactivation of factor VIII coagulant activity by two different types of human antibodies. *Blood*. 1982; 60:1103–1109.
13. Lawrence JS, Johnson JB. The presence of a circulating anti-coagulant in a male member of a hemophiliac family. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 1941;(57):223–231.
14. Biggs R, Bidwell E. A method for the study of antihemophilic globulin inhibitors with reference to six cases. *Br J Haematol*. 1959;5:379–395.
15. Rizza CR, Biggs R. The treatment of patients who have factor-VIII antibodies. *Br J Haematol*. 1973;24(1):65–82.

16. Kasper CK, Aledort L, Aronson D, et al. Proceedings: A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. *Thromb Diath Haemorrh*. 1975;34(2):612.
17. Verbruggen B, Novakova I, Wessels H, Boezeman J, van den Berg M, Mauser-Bunschoten E. The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII: C inhibitors: improved specificity and reliability. *Thromb Haemost*. 1995; 73:247–251.
18. Giles AR, Verbruggen B, Rivard GE, Teitel J, Walker I. A detailed comparison of the performance of the standard versus the Nijmegen modification of the Bethesda assay in detecting factor VIII: C inhibitors in the haemophilia A population of Canada. Association of Hemophilia Centre Directors of Canada. Factor VIII/IX Subcommittee of Scientific and Standardization Committee of International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost*. 1998; 79:872–875.
19. Manco-Johnson MJ, Nuss R, Jacobson LJ. Heparin neutralization is essential for accurate measurement of factor VIII activity and inhibitor assays in blood samples drawn from implanted venous access devices. *J Lab Clin Med*. 2000; 136:74–79.
20. Blanco AN, Cardozo MA, Candela M, Santarelli MT, Bianco RP, Lazzari MA. Anti-factor VIII inhibitors and lupus anticoagulants in haemophilia A patients. *Thromb Haemost*. 1997; 77:656–659.
21. Shaw PH, Reynolds S, Gunawardena S, Krishnamurti L, Ritchey AK. The prevalence of bleeding disorders among healthy pediatric patients with abnormal preprocedural coagulation studies. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2008; 30:135–141.
22. Blanco AN, Peirano AA, Grosso SH, Gennari LC, Pérez Bianco R, Lazzari MA. A chromogenic substrate method for detecting and titrating anti-factor VIII antibodies in the presence of lupus anticoagulant. *Haematologica*. 2002; 87:271–278.
23. Peyvandi F, Oldenburg J, Friedman KD. A critical appraisal of one-stage and chromogenic assays of factor VIII activity. *J Thromb Haemost*. 2016; 14:248–261.
24. Regnault V, Stoltz JF. Quantitation of factor VIII antibodies by an enzyme-linked immunoassay method. *Blood*. 1994; 83:1155–1156.
25. Gautier P, Sultan Y, Parquet-Gernez A, Meriane F, Guerois C, Derlon A. Detection and IgG subclass analysis of antibodies to factor VIII in multitransfused haemophiliacs and healthy individuals. *Haemophilia*. 1996; 2:88–94.
26. Sahud MA, Pratt KP, Zhukov O, Qu K, Thompson AR. ELISA system for detection of immune responses to FVIII: A study of 246 samples and correlation with the Bethesda assay. *Haemophilia*. 2007; 13:317–322.
27. Klinge J, Auerswald G, Budde U. Detection of all anti-factor VIII antibodies in haemophilia A patients by the Bethesda assay and a more sensitive immunoprecipitation assay. *Haemophilia*. 2001; 7:26–32.
28. Lavigne-Lissalde G, Tarrade C, Lapalud P. Simultaneous detection and epitope mapping of anti-factor VIII antibodies. *Thromb Haemost*. 2008; 99:1090–1096.
29. Krudysz-Amblo J, Parhami-Seren B, Butenas S. Quantitation of anti-factor VIII antibodies in human plasma. *Blood*. 2009; 113:2587–2594.