

Cuantificación plasmática de emicizumab

Emicizumab plasma quantification

Sueldo E, Annetta SE, Frontroth JP, Hepner M

Laboratorio de Hemostasia y Trombosis, Servicio de Hematología y Oncología del Hospital de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan" - Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

rsueldo@garrahan.gov.ar

Fecha recepción: 7/12/2022

Fecha aprobación: 15/12/2022



LABORATORIO

HEMATOLOGÍA

Volumen 26 n° 3: xx-xx

Septiembre - Diciembre 2022

Palabras claves: emicizumab,
FVIII coagulométrico en una etapa modificado,
hemofilia A.

Keywords: emicizumab,
modified one stage FVIII assay,
hemophilia A.

Resumen

El emicizumab (Hemlibra®, Roche) es un anticuerpo monoclonal IgG4 bi-específico, recombinante y humanizado, con afinidad por el FIXa y el FX, mimetizando la función del FVIIIa. Su administración por vía subcutánea es eficaz y segura en la prevención de hemorragias en pacientes con hemofilia A severa con o sin inhibidor. Si bien la administración de emicizumab ha sido aprobada con un régimen basado en el peso corporal (1.5 mg/kg por semana, 3 mg/kg cada 2 semanas, 6 mg/kg una vez por mes), la cuantificación plasmática de emicizumab puede ser útil en distintas circunstancias clínicas y de investigación⁽¹⁾. En Argentina el método ha sido validado utilizando calibradores y controles específicos de emicizumab preparados "in-house", debido a que aún no están disponibles comercialmente⁽²⁾.

Fundamento del ensayo

El efecto procoagulante de emicizumab y/o su concentración plasmática pueden ser evaluados mediante modificaciones del ensayo tradicional para determinar la actividad del FVIII medido por el método coagulométrico en una etapa, utilizando una pre dilución alta de la muestra, calibradores y controles específicos de emicizumab⁽³⁾.

Características pre-analíticas

La obtención de la muestra debe cumplir con las recomendaciones internacionales para los estudios de hemostasia: debe ser extraída en tubos de citrato de sodio 3.2% y con agujas de calibre preferentemente 21G. La aplicación del lazo no debe ser mayor a un minuto. Se debe respetar el enrase del tubo utilizado para mantener la relación anticoagulante/sangre

recomendada (1+9), que deberá ajustarse cuando el hematocrito del paciente sea mayor a 55%. Realizar una doble centrifugación a 3500 rpm durante 10 min para obtener un plasma pobre en plaquetas (<10000 plq/mm³) y procesar la muestra del paciente dentro de las 4 horas. Puede alicuotarse y ser almacenada, preferentemente a -70°C. Debe descongelarse 5 min a 37°C para su procesamiento.

Características analíticas

El método utilizado para medir la concentración plasmática de emicizumab se basa en un ensayo coagulométrico de FVIII en una etapa modificada (modOSA) utilizando una alta pre dilución de la muestra del paciente (1:80), con calibradores y controles específicos de emicizumab preparados "in-house". Realizamos la validación de modOSA en un coagulómetro mecánico STA-Compact Max2 (Diagnostica Stago S.A.S) con los reactivos y materiales detallados a continuación⁽²⁾. En caso de realizar modificaciones o utilizar otros sistemas reactivos/instrumento deberá ser nuevamente validado.

Reactivos y materiales

- Kit STA®-C.K. Prest®, Diagnostica Stago S.A.S:
 - Reactivo 1: liofilizado de cefalina (sustituto de plaquetas), preparado a partir de tejido de cerebro de conejo.
 - Reactivo 2: suspensión tamponada de caolín (5 mg/ml) presentado en vial de 5 ml. Se debe reconstituir el reactivo acorde a las especificaciones del fabricante.
- - Plasma deficiente en FVIII: STA®-ImmunoDef VIII, Diagnostica Stago S.A.S. Reactivo liofilizado, se reconstituye de acuerdo a las especificaciones del fabricante.
- STA®-CaCl₂ 0,025M, Diagnostica Stago S.A.S. Listo para usar.
- STA®-Buffer de Owren-Koller, Diagnostica Stago S.A.S. Listo para usar.
- Calibrador "in-house" CALEMI: adicionar emicizumab de 150 mg/ml a un plasma deficiente en FVIII en una dilución final 1/1000. No congelar.
- Controles "in-house": nivel 1=25 µg/mL de emicizumab (dilución 1/6 de CALEMI en plasma deficiente en FVIII), nivel 2=75 µg/mL de emicizumab (dilución 1/2 de CALEMI en plasma deficiente en FVIII). No congelar.

La muestra del paciente debe ser procesada por

duplicado y con una pre dilución 1:80 en buffer de Owren-Koller. Se debe programar la metodología en el STA-Compact Max2 para que el equipo realice la pre dilución requerida automáticamente.

Curva de calibración: abarca el rango de concentración de 5 a 150 µg/mL de emicizumab. Se configura la metodología para que el coagulómetro realice los siguientes puntos de la curva: 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32. El primer punto de la curva (1:1) se debe preparar pre diluyendo el CALEMI 1:80 con buffer de Owren-Koller de manera manual fuera del equipo. Cada punto de la curva de calibración se procesa por duplicado.

El método validado en este sistema instrumento/reactivo es lineal en un rango de concentración de 5 a 150 µg/mL de emicizumab, con un límite de detección (LoD) de: 3 µg/ml, y un límite de cuantificación (LoQ) de: 5 µg/ml de emicizumab. La imprecisión intra-laboratorio del método es de 5.7% en el nivel de 25 µg/mL y de 4.1% en el nivel de 75 µg/mL de emicizumab. El bias promedio fue de 4% estimado a partir de un programa de evaluación externa de calidad (UK NEQAS, United kingdom National External Quality Assessment Scheme).

Limitaciones e interferencias

La presencia de FVIII proveniente del tratamiento con concentrados de FVIII concomitante con emicizumab, interfiere con la cuantificación plasmática de emicizumab.

Los agentes *bypasseantes*, como FVII recombinante activado o concentrado de complejo protrombínico activado, no interfieren con modOSA.

Calidad analítica

En cada corrida analítica se deben preparar los calibradores y controles "in-house" y realizar la curva de calibración.

Se deben procesar los niveles 1 y 2 del control de calidad interno y participar de un programa de evaluación externa de la calidad, como por ejemplo UK NEQAS o ECAT Foundation.

Rango terapéutico

Según lo reportado en los ensayos clínicos HAVEN, el rango terapéutico es de aproximadamente entre 30 a 70 µg/mL de emicizumab. Actualmente está en revisión el nivel mínimo de concentración plasmática de emicizumab con el que se lograría un tratamiento

eficaz y seguro⁽³⁾.

Utilidad clínica

La medición de la concentración plasmática de emicizumab por modOSA es útil para valorar la adherencia al tratamiento, cambios de conducta clínica, ante la sospecha de la presencia de anticuerpos anti-drogas contra emicizumab, con fines de investigación y para personalizar el régimen de dosificación. Recientemente una revisión sistemática demostró una relación lineal dosis-concentración y una variabilidad interindividual moderada en la concentración de emicizumab medida. En esta revisión las hemorragias no mejoraron por encima de las con-

centraciones de emicizumab de 25-30 µg/mL, lo que podría permitir una dosificación más baja en una proporción sustancial de pacientes con hemofilia A. Estos autores proponen el tratamiento basado en una adecuación de la dosis por peso corporal ajustado con la cuantificación plasmática de emicizumab, permitiendo una dosificación más costo-efectiva⁽⁴⁾.

Conclusión

La medición de la concentración plasmática de emicizumab por el método modOSA, es simple, reproducible y de bajo costo, que podría ser requerida en determinadas circunstancias clínicas y de investigación⁽⁵⁾.

Conflictos de interés: Los autores declaran no poseer conflictos de interés.

Bibliografía

1. Tripodi A, Chantarangkul V, Novembrino C, Scalabrino E, Boscolo-Anzoletti M, Clerici M, Rossi F, Peyvandi F. Emicizumab, the factor VIII mimetic bi-specific monoclonal antibody and its measurement in plasma. *Clin Chem Lab Med.* 2020 4;59(2):365-371.
2. Sueldo E, Hepner M, Frontroth J, Annetta E, Cervio C, Bianco M, Sciuccati G. Validación de un Método para la Cuantificación Plasmática de Emicizumab. Libro de resúmenes, XV Congreso Argentino de Hemostasia y Trombosis. Volumen educacional; Archivo digital, Comunicaciones orales a premio. 2022: 323-324.
3. Müller J, Pekrul I, Pöttsch B, Berning B, Oldenburg J, Spannagl M. Laboratory Monitoring in Emicizumab-Treated Persons with Hemophilia A. *Thromb Haemost.* 2019;119(9):1384-1393.
4. Donners AAMT, Rademaker CMA, Bevers LAH, Huitema ADR, Schutgens REG, Egberts TCG, Fischer K. Pharmacokinetics and Associated Efficacy of Emicizumab in Humans: A Systematic Review. *Clin Pharmacokinet.* 2021;60(11):1395-1406.
5. Donners AAMT, Gerencsér L, van der Elst KCM, Egberts TCG, de Maat MPM, Huisman A, Urbanus RT, El Amrani M. Quantification of emicizumab by mass spectrometry in plasma of people with hemophilia A: A method validation study. *Res Pract Thromb Haemost.* 2022 8;6(4):e12725.



Atribución – No Comercial – Compartir Igual (by-nc-sa): No se permite un uso comercial de la obra original ni de las posibles obras derivadas, la distribución de las cuales se debe hacer con una licencia igual a la que regula la obra original. Esta licencia no es una licencia libre.