

SEGURANÇA TERAPÊUTICA NA HEMOFILIA A. INACTIVAÇÃO VIRAL DOS CONCENTRADOS DE FVIII:C

A. TAVARES, M. GALVÃO

Serviço Imuno.Hemoterapia. Hospital de Santa Maria. Lisboa

RESUMO

Os concentrados de factor VIII:C têm sido utilizados desde os anos sessenta no tratamento da Hemofilia A, inicialmente na forma de crioprecipitados e mais tarde na de concentrados liofilizados. A constatação do elevado risco de transmissão de doenças virais por estes concentrados, levou ao desenvolvimento de vários métodos de inactivação viral destes produtos. Referem-se os métodos actualmente existentes, considerando o grau de segurança que oferecem, discutindo-se as perspectivas actuais e futuras da terapêutica desta patologia.

RESUMO

Safety in hemophilia treatment/Virus inactivation with FVIII: C concentrates

In the last thirty years, factor VIII concentrates have been the mainstay of hemophilia treatment, first as wet cryoprecipitate and later as dry concentrates commercially available. The evidence of a high risk of blood-born virus transmission by these products provoked the development of new methods for virus inactivation. We report these methods with special attention to their safety, and mention the new perspectives of treatment with recombinant DNA FVIII:C and ultimately by gene insertion therapy.

INTRODUÇÃO

A Hemofilia é uma doença conhecida desde a Antiguidade, contudo só nos últimos 40 anos se evoluiu significativamente na sua terapêutica.

Em 1947 K. M. Brinkhous¹ descobre que a hemofilia é causada pela deficiência de uma proteína plasmática, facto que sugeriu a utilização terapêutica do plasma no tratamento desta doença. Este foi sem dúvida um passo importante que veio permitir um controlo efectivo de muitas situações, embora as reacções transfusionais graves, e a sobrecarga de volume, complicassem ou impossibilitassem muitas vezes uma terapia eficaz.

Em 1965 Judith Pool^{2,3} verificou que o plasma utilizado após congelação e descongelação era menos activo que o plasma fresco. Este facto conduziu-a a numerosos estudos, vindo a concluir que grande parte do Factor Anti-Hemofílico ficava na pequena porção de precipitado que se formava durante a descongelação. Esta técnica (crioprecipitação) veio permitir uma grande concentração de Factor VIII:C num pequeno volume, conseguindo-se uma melhoria dos resultados alcançados. Assim nos últimos anos da década de 60, o tratamento da hemofilia é já feito predominantemente com crioprecipitados obtidos a partir de plasma fresco congelado.

Concentrados de FVIII:C - A crioprecipitação é ainda hoje utilizada como primeiro passo na produção da maioria dos concentrados de FVIII:C⁴⁻⁶, mas desde o final dos anos sessenta, têm-se desenvolvido vários métodos com vista à obtenção de produtos cada vez mais puros e por consequência mais inócuos⁷⁻¹².

Mais recentemente, foram introduzidos no mercado, concentrados de FVIII:C em que se utilizam colunas de imunoadsorção específica, (com anticorpos monoclonais anti-factor de von Willebrand, ou anti-factor VIII:C) para purificação e concentração do factor a partir do crioprecipitado, obtendo-se um produto virtualmente puro¹¹.

Os diversos concentrados produzidos por técnicas *convencionais* podem ser divididos em 3 grupos, de acordo com a concen-

tração de FVIII:C, a actividade específica, e a razão FVIII:C/Fibrinógeno¹², podendo englobar-se num quarto grupo os produtos purificados com colunas de anticorpos monoclonais. (Quadro 1).

QUADRO 1

Crioprecipitados

Concentração	4-6 UI FVIII:C/ml
Activ. específica<	0,5 UI FVIII:C/mg Prot.
Razão FVII:C/Fib.<	0,8 UI FVIII:C/mg Fib.

Concentrados parcialmente purificados

Concentração	30-40 UI FVIII:C/ml
Activ. específica	0,5 - 10 UI FVIII:C/mg Prot.
Razão FVIII:C/Fib.	0,8 - 2 UI FVIII:C/mg Fib.

Concentrados altamente purificados

Concentração >	50 UI FVIII:C/ml
Activ. específica >	100 UI FVIII:C/mg Prot.
Razão FVIII:C/ Fib >	3 UI FVIII:C/mg Fib.

P. AC. Monoclonais

Concentração	50-150 vezes a concentração plasmática
Activ. específica	2500 UI FVIII:C/mg Prot.*
Razão FVIII:C/Fib	Sem fibrinógeno

* Antes da Junção de albumina

As diferenças relevantes entre os vários tipos de concentrados de FVIII:C são: O valor da actividade específica (Unidades de FVIII:C/mg de proteínas) e a razão FVIII:C/Fibriogénio sendo o valor elevado destes parâmetros que caracteriza os concentrados altamente purificados¹²⁻¹⁴.

Os concentrados de Factor VIII são habitualmente liofilizados após a sua preparação o que permite uma fácil conservação e administração. Este facto muito veio contribuir para o desenvolvimento da terapêutica domiciliária do doente hemofílico, com todas as vantagens que daí, advêm, sendo de realçar a melhoria significativa da qualidade de vida, devido ao rápido controlo das hemorragias, com consequente diminuição de sequelas, e maior assiduidade nos estudos ou no trabalho.

A utilização dos concentrados comerciais de FVIII:C tornou-se generalizada nos anos setenta. Contudo a sua preparação a partir de lotes com grande número de unidades de plasma de dadores diferentes, veio contribuir de um modo importante para a disseminação de doenças virais entre a população Hemofílica, com particular relevância para o Síndrome de Imunodeficiência Adquirida¹⁴.

O reconhecimento deste facto, fez despoletar em todo o Mundo numerosos estudos, com vista à descoberta de um método, que permitisse a inactivação dos vírus potencialmente presentes nos concentrados, sem contudo destruir significativamente os factores plasmáticos da coagulação¹⁵⁻¹⁷.

Vários têm sido os métodos utilizados, havendo hoje no mercado uma grande diversidade de produtos. Torna-se portanto, cada vez mais necessário conhecer as características dos vários concentrados, relativamente ao valor terapêutico e ao grau de segurança que cada um oferece. (Quadro 2).

QUADRO 2

	HIV	HBV	NANB
Calor Seco 60° C 30 h	N/S*	N/S	N/S
68° C 72 h	N/S*	N/S	N/S
80° C 72 h	S**	S	S
Vapor Quente 60° C 10 h 1190 mbar	S	N/S	S
Suspensão de N-Heptano 60° C 20g	S	N/S	N/S
Solvente/Detergente	S	S	S
Pasteurização	S	S	S
Purif. Ac. Monoclonais	S	S	S

*N/S - Não seguro (Existência de casos publicados de transmissão de doença em que os produtos foram implicados). ** S - Seguro (Existência de estudos que demonstraram ausência de sero-conversão. Nalguns casos o número de doentes seguidos poderá não ser suficientemente grande.

Assim entre os diversos processos de inactivação utilizados temos:

Aquecimento por calor seco - Processa-se por aquecimento dos concentrados já liofilizados na embalagem final.

Dos estudos efectuados em 1984 por J.S.Mc Dougal e outros a pedido da National Hemophilia Foundation Medical and Scientific Advisor Council mostraram a susceptibilidade do HTLV-III ao calor, quer nos concentrados liofilizados, embora neste caso o processo de inactivação fosse mais lento¹⁴.

A utilização deste método, embora útil na redução significativa da transmissão de doenças virais, não se revelou totalmente eficaz¹⁸⁻²⁰, tendo sido aumentados posteriormente quer a temperatura, quer o tempo de duração do processo.

Actualmente consideram-se seguros os produtos aquecidos a 80° C durante 72 horas²¹⁻²³.

Aquecimento em suspensão - A suspensão dos concentrados em N-Heptano permite uma melhor propagação do calor diminuindo o tempo e a temperatura necessários à inactivação viral. Neste processo utiliza-se habitualmente uma temperatura de 60° C durante 20 horas.

Este método é considerado seguro para o vírus da imunodeficiência dos vírus causadores de hepatite²³⁻²⁴.

Pasteurização - Este processo, (aquecimento em fase líquida durante 10 horas a 60° C) é utilizado na produção da Albumina, produto que se tem mostrado isento de transmissão de doenças virais, contudo os estabilizadores utilizados na produção da albumina, não são apropriados à produção de factores da coagulação.

Foi a utilização da glicina 2M e da sucrose a 60% como estabilizadores que veio permitir a pasteurização dos concentrados de FVIII:C. No entanto o rendimento deste processo é bastante baixo, o que torna caro²⁵.

Este método é considerado seguro quer para o HIV quer para os vírus da hepatite B e provavelmente para as formas de não A e não B11, ^{23,25,26}.

Aquecimento em vapor - O aquecimento do produto decorre em ambiente fechado, numa atmosfera desprovida de oxigénio e sob um gás protector. A pressão, a temperatura e o tempo variam de acordo com as proteínas em causa, sendo para o FVIII:C utilizada uma pressão de 1190 mbar e uma temperatura de 60° C durante 10 horas.

Este método parece ser eficaz na inactivação do HIV, mas apenas reduz a infecciosidade do HBV^{23,27,28}.

É um processo relativamente económico sendo o seu rendimento considerado bom.

Método solvente-detergente - Este método baseia-se na possibilidade de se destruir, com uma mistura solvente - detergente a cápsula lipídica que envolve a grande maioria dos vírus patogénicos para o homem, nomeadamente o HIV e o HBV²⁹.

Esta tecnologia desenvolvida por Horowitz, consiste em adicionar ao crioprecipitado um solvente, o TNBP (tri-n-butyl-phosphato) juntando-se como detergente quer o Tween 80, o Triton x-100 ou o Sodium cholate durante 6 h a 30° C²⁹.

Este processo é eficaz como inactivador viral e com óptimo rendimento, sendo por isso actualmente bastante utilizado. Contudo esta técnica não poderá inactivar virus desprovidos de cápsula lipídica, embora se pense não serem, na sua maioria, patogénicos para o homem.

Este método é considerado seguro em relação ao HIV e ao HBV e provavelmente para outros vírus causadores de hepatite^{11,23,29}.

Imunoadsorção (AC Monoclonais) - Nos últimos anos apareceram no mercado produtos que utilizam técnicas de produção completamente distintas das tradicionais e que introduziram melhorias significativas quer na pureza do produto quer na segurança que oferecem relativamente à transmissão de doenças virais^{11,23-31}.

Nestas técnicas de imunoadsorção¹¹ utilizam-se anticorpos anti-FVIII ou anti-factor von Willebrand, ligados a uma coluna sólida por onde passa o crioprecipitado. O FVIII:C é posteriormente libertado por eluição³¹.

A imunoadsorção é simultaneamente um método de concentração e purificação considerando-se também eficaz na remoção viral. No entanto qualquer dos produtos existentes no mercado utiliza adicionalmente outros métodos de inactivação viral como calor ou solvente-detergente¹¹.

Estes produtos consideram-se seguros relativamente à inactivação viral, sendo os concentrados assim obtidos quase desprovidos de proteínas estranhas, o que se presume ter influência

favorável pela menor estimulação do sistema imunitário dos doentes^{32,33,40-44}.

Factor FVIII:C recombinante - O FVIII:C é uma proteína de importância primordial na cascata da coagulação. Contudo a sua concentração plasmática é extremamente baixa, correspondendo apenas a 300 g, uma produção de 500 milhões de unidades³⁴.

Estas características tornam a molécula do FVIII:C um alvo importante para a sua produção pela tecnologia de DNA recombinante.

Em 1984, foi possível pela primeira vez a clonagem do gene do FVIII:C e a sua expressão *in vitro*³⁵⁻³⁷, abrindo assim novos horizontes na terapêutica da hemofilia, quer relativamente à perspectiva de produção de um produto isento de transmissão de doenças virais, quer à obtenção de uma fonte inesgotável do produto.

Os ensaios pré-licenciamento efectuados nos últimos anos com os vários produtos existentes, mostraram que o FVIII recombinante é uma alternativa segura e eficaz, relativamente aos concentrados tradicionais^{38,39}.

CONCLUSÃO

A opção terapêutica da hemofilia em 1992, não é tarefa fácil, já que para além dos padrões de segurança, não se podem ignorar outros como o custo/benefício e a eventual escassez de plasma.

Se fosse pretendido apenas eliminar o risco de transmissão do vírus da SIDA, qualquer dos produtos inactivados pelos processos descritos parece ser eficaz. Contudo, não devemos ignorar outros vírus, nomeadamente os causadores de hepatite para os quais os métodos de pasteurização, solvente-detergente e a imunoadsorção com colunas de anticorpos monoclonais se revelaram seguros.

O impacto negativo da contaminação proteica dos concentrados tradicionais no sistema imunitário do indivíduo é um facto comprovado, sendo por isso de admitir que num futuro próximo os concentrados de FVIII com actividade específica elevada, nomeadamente os que utilizam colunas de cromatografia na sua purificação, e os recombinantes, sejam os recomendados.

A terapêutica génica, e eventual cura da doença, é já hoje uma hipótese provável, sendo de admitir que na próxima década ela possa vir a ser uma realidade, tornando obsoleto este tipo de considerações.

BIBLIOGRAFIA

1. ALEDORT, L.M.: Current Concepts in Diagnosis and Management of Hemophilia. *Hospital Practice* 1982; 77-92.
2. POOL, J.G.; HERSGOLD, E.J. and APPENHAGEN, A.R.: High-Potency Anti-Hemophilic Factor Concentrate Prepared from Cryoglobulin Precipitate *Nature* 1964; 203-312.
3. POOL, J.G. and SHANNON, A.E.: Production of High-potency Concentrates of Anti-hemophilic Globulin in Closed-bag System. *Assay in vitro and in vivo*. *New Engl. J. Med* 1966; 273: 1443-7.
4. BRINKHOUS, KIM.; SHANBROME, E.; ROBERTS, H.R. et al: A New High-potency Glicine-precipitated Anti-hemophilic Factor Conc. Treatment of Classical Hemophilia and Hemophilia with inhibitors. *J. Am. Med. Ass.* 205 613 (1968).
5. JOHNSON, A.J.; KARPATKIN M.H.; and NEWMAN, J.: Treatment of Classical Haemophilia. *Lancet* i 724:725 (1967).
6. NEWMAN, J.; JOHNSON, A.J.; KARPATKIN, M.H.; PUSZKIN, S.: Methods for the Production of Clinically Effective Intermediate and High-purity Factor VIII Concentrates. *Br. J. Haemat* 21: 1-20 (1971).
7. JOHNSON, A.-J.; KARPATKIN M.H.; NEWMAN, J.: Preparation of and clinical experience with antihemophilic factor concentrate. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 35: suppl. 59 (1969).
8. SMITH, J.K.; EVANS, D.R.; STONE, V.; SNAPE, T.J.: A factor VIII concentrate of intermediate potency and higher purity. *Transfusion* 19: 299-306 (1979).
9. FOSTER P.R.; DICKSON, I.-H.; MACLEOD, A.J. BIER, M.: Zinc fractionation of cryoprecipitate. *Thromb. Haemostasis* 50: 117 (1983).
10. THORELL, L.; BLOMBACK, B.: Purification of the factor VIII complex. *Thromb. Res.* 35: 431-450 (1984).
11. BLANCHETTE, V.S.; VICK, S.; GAFNI, A.: Treatment of Hemophilia and von Willebrand's Disease: New Developments American Associate. of Blood Banks 1989; 19-43.
12. ALLAIN, J.P.; VERROUST, F. and SOULIER, J.P.: In vitro and in vivo characterization of factor VIII preparations. *Vox Sang* 38: 68-80 (1980).
13. HOEY, L.W.: Treatment of hemophilia and von Willebrand's Disease: New Developments American Associat. of Bloods Banks 1989; 89-103.
14. CENTERS FOR DISEASE CONTROL UPDATE: Acquired immune deficiency syndrome (AIDS) in persons with hemophilia. *Mortality Morb. Weekly Report* 33: 589-91 (1984).
15. McDOUGAL, J.S.; MARTIN L.S., CORT, S.P. et al: Thermal inactivation of the acquired immunodeficiency syndrome virus, human lymphotropic virus-III, with special reference to antihemophilic factor. *J. Clin. Invest* 76: 875-877 (1985).
16. HOROWITZ, B.; WIEBER, M.E.; LIPPIN, A.; STRYKER, M.H.: Inactivation of virus in labile blood derivatives. *Transfusion* 25: 6; 516-522 (1985).
17. HILFENHAUS, J.; HERRMANN, A.; MAULER, R.; PRINCE, A.M.: Inactivation of the AIDS causing retrovirus and other human viruses in anti-hemophilic plasma protein preparations by pasteurization *Vox Sang* 50: 208-211 (1986).
18. WHITE, G.C.; MATTHEUS, T.J.; WELNHOLD, K.H.: HTLV-III Sero-conversion associated with heat-treated FVIII concentrate. *Lancet* 11: 611-612 (1986).
19. VAN DEN DERG.; TEN CATE, J.W.; BREEDERVEL d C.; GOULD-SMIT, J.: Sero-conversion to HTLV-III in haemophilic given heat-treated factor concentrate. *Lancet* 1; 804-804 (1986).
20. MARIANI, G.; GHIRARDINI, A.; MANDELLI F. et al.: Heated clotting factors and seroconversion for human immunodeficiency virus in three hemophilic patients. *Ann Intern. Med.* 107:118 (1987)
21. Study Group of the UK Haemophilia Centre Directors on Surveillance of virus Transmission by Concentrates. Effect of dry heating of coagulation factor concentrate at 89 C for 72 horas on transmission of a non-A non-B hepatitis *Lancet* ii: 814-816 (1968).
22. PASI, K.J.; HILL, F.G.H.: Absence of hepatitis, HIV and low incidence of parvovirus antibodies in virgin haemophilic boys after treatment with British NHS heat treated F VIII concentrate (8Y) *Wid Fed. Hemoph. XVIII Int. Congr. Madrid* (1988).
23. BLOOM A.L.: Proceedings of the Internat. Symp. The Present and Future of Haemophilia cura. London U.K. 18-19 April (1988).
24. KERNOFF P.B.A.; MILLER E.J.; SAVIDGE G.F. MACHIN, S.J. PRESTON, F.E.: Wet heating for safer factors VIII concentrate? *Lancet* 2: 721 (1985).
25. SCHIMPF, K.; MANNUCCI, P.M.; KRUTEL, W. et al Absence of Hepatitis after treatment with a Pasteurized Factor VIII Concentin Patients with Haemophilia and no Previous Transfusion *N. England J. Med* 316: 918-922 (1987).
26. MOSSELER J; SCHIMPF K; AUERSWALD G. BAYER H; et al Inability of pasteurised factor VIII preparations to induce antibodies to HTLV-III after long-term treatment. *Lancet* 11: 1111 (1985).
27. MORFINI K.; CARNELLI V, MARIANI G. et al.: A prospective multicenter safety study of seam heated factor VIII concentrate *La Ricerca Clin. Lab.* 16: 244 (1986) abstract.
28. MANNUCCI P.M.: Proceeding of the International Symp. The Present and Fut. of Haemophilia Care London U.K. 1988.
29. HOROWITZ, B.; WIEBER, M.E.; LIPPIN A.; STRYKER, M.H.: Inactivation of viruses in labile blood derivatives. *Transfusion* 25: 6; 616-522 (1986).
30. SCHRELBER, A.R.: The preclinical characterization of Monoclate factor VIII. Anti-hemophilic factor (human). *Semin, Hematol*, 25 (Suppl 1) 27-30 (1988).
31. ZIMMERMAN, T.S.: Purification of factor VIII by monoclonal antibody affinity chromatography *Semin. Hematol.* 25: 2 (Suppl 1) 25-26 (1988).
32. BRETTLER, D.; FORSBERG A.; LEVIN P.; et al: Factor VIII:C purified from plasma via monoclonal antibodies: human studies *Thrombos and haemostas*, 58: 307 (1979).
33. LEVINE, P.H.; BRETTLER, D.B.: Treat. of Hemophilia and von Willebrand's Disease: New Developments American Associat. of Blood Banks 1989; 61-70.
34. KAHN R.A.; ALLEN R.: WBaldassarej alternate sources and substitutes for therapeutic blood components *Blood* 66:1 1985.
35. TOOLE J.J.; KNOPF J.L.; WOZNEY J.M.; SULZAM L.A.; BUECKER J.L.; PITTMAN D.; KAUFMAN R.J., BROWN E.; SHOEMAKER C.; ORR E.C.; AMPHLETG. W.L.; FOSTER W.B CPOE M.L.; KNUSTSON G.J. FASS D.N.; HEWICK R.M.: Molecular cloning of a cDNA

encoding human anti haemophilic factor. Nature 312:342 (1984).

36. GITSSCHIER J.; WOOD W.I.; GORALKA T.M.; WION K.L. CJEM E. Y.; EATON D.H.; VEVAR G.A.; CAPON D.J.; LAWN RW.: Characterization of the human factor VIII gene Nature 312: 326 1984.

37. WOOD W.I.; CAPON D.J., SIMONSEN C.C.; EATON D.L.; GITSSCHIER J. KEY B.; SEEBURG P.H.; SMITH D.H.; HOLLINGSEHAD P.; WION K.L.; DELWARD E. UDDENHAM E.G.D.; VEARG. A.; IAWN R.M.: Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clones Nature 312:330 1984.

38. ROBERTS H.R.; HIGH K.A.; WHITE G.C.; McMILLAN C.W.: Ultrapure factor VIII products: the impact for the future of hemophilia care. Presented at XVII Congress of World Federation of Hemophilia Madrid, Spain; May 26-30 (1987).

39. WHITEC. G.; McMILLANC. W.; KINGDONH. S.; SCHOEMAKERC. B.: Use of recombinant anti-hemophilic factor in the treatment of two patients with classic hemophilia. N. England J. of Medecine 320:3; 166-70 (1989).

40. CARR R. EDMUN E. PRESCOTT R.J. et al: Abnorbalities of circulat. lymphocyte subsets in haemophiliacs in an AIDS free population. Lancet 1: 1431-4 1984.

41. LUDLAM C.A.; TUCKER J. STEEL C.M. et al: Human T-lymphotropic virus type III (HTL-VIII) infection in seronegative haemophiliacs after transfusion of factor VIII. Lancet 2: 233-6 (1985).

42. BEDDALL A.C.; HILL F.G.H.; GEORGE R.H.; WILLIAMS M.D. AL-RUBEIK K.: Unusually high incidence of tuberculosis among boys with haemophilia during an outbreak of the disease in hospital. J. Clin Pathol 38: 1163-5 (1985).

43. BRETTLER D.B.; FORSBERG A.D.; BREWSTER F; SULLIVAN J.L; LEVINE P.H.: Delayed cutaneous hypersensitivty reactions in hemophilics subjects treated with factor concentrate. Am. J. Med. 81: 607-11 (1986).

44. UK Regional Haemophilia Centre Directors Committee. Recommendations on choice of herapeutic products for the treatment of patients with haemophilia A, haemophilia B and von Willebrand's disease. Blood Coagulat. and Fibrinolysis 3: 205-14 (1992).



ORDEM DOS MÉDICOS

Certificamos que

é Especialista e Membro Titular deste Colégio.

⊙ **Presidente do Colégio**

⊙ **Presidente da Ordem**