

SOUČASNOST A BUDOUCNOST LÉČBY U HEMOFILIKŮ

Palová M., Hluší A.

HEMOFILIE A,B

- Deficit koagulačního faktoru VIII (hemofilie A)
- Deficit koagulačního faktoru IX (hemofilie B)
- X- vázané recesivně dědičné onemocnění
- Prevalence hemofilie A 1/ 10 000
- Prevalence hemofilie B 1/ 60 000
- V ČR 750 pacientů s hemofilií A
- V ČR 120 pacientů s hemofilií B
- Celosvětově 400 000 nemocných

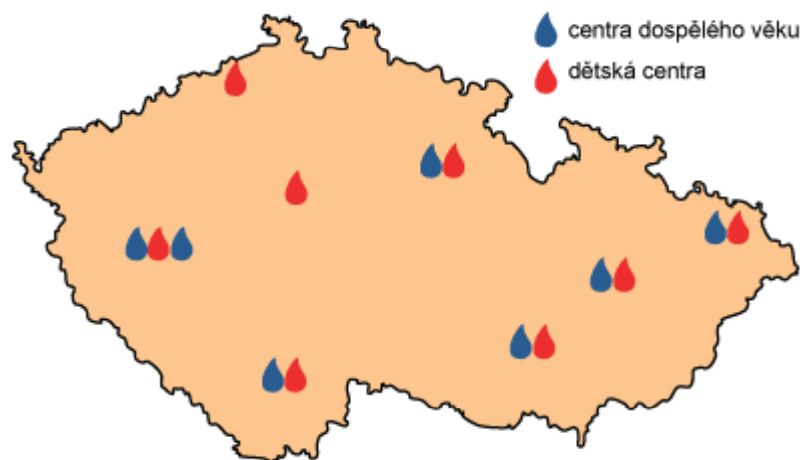


KLINICKÝ OBRAZ

- Těžká forma < 1%
- Středně těžká forma 1-5%
- Lehká forma > 5%



ORGANIZACE LÉČBY V ČR



Registr HemIS

Hemofilická centra: Praha, Plzeň, Brno,
Olomouc, Ostrava, Hradec Králové, České Budějovice,
Ústí nad Labem

CCC – Comprehensive care center: Praha, Brno
Pacienstké organizace: Český svaz hemofiliků,
Hemojunior



KOMPLEXNÍ PÉČE

- Hematolog
- Ortoped
- Fyzioterapeut
- Genetik
- Hepatolog, infektolog
- Psycholog, sociální pracovník



PRINCIPY TERAPIE

- Prevence a léčba krvácení – substituční terapie

Profylaxe

On demand

- Prevence a léčba komplikací

Artropatie

Inhibitor F VIII/IX



PROFYLAXE

- Cíl: udržet hladiny faktorů $> 1\%$, lépe $> 2\%$
- Primární profylaxe: započatá po 1. roce života, nejpozději do konce 2. roku života nebo po objevení se první krvácivé epizody
- Sekundární profylaxe: započatá později
- Krátkodobá profylaxe



PROFYLAXE

- Modely: švédský, holandský, kanadský
- Doporučené dávky: 25-40j/kg 2-3x týdně
(Dle kliniky lze použít i nižší dávkování.)
- „Tailored“ profylaxe: zahajuje se dávkou 50j/kg
1x týdně, dle efektu se upravuje frekvence a
dávka



TERAPIE KRVÁCENÍ

- Včasná aplikace faktorů (On demand terapie)
- 1j/kg F VIII zvýší hladinu o 2% (8-12h)
- 1j/kg F IX zvýší hladinu o 1% (18h)

- Mírné a středně těžké krvácení:
do kloubů, svalů, hematurie, epistaxe, z dásní

cílová hladina F VIII 40-60%, F IX 30-50%



TERAPIE KRVÁCENÍ

- Závažné krvácení: krvácení intrakraniální, do míchy, oblasti krku, hrudníku, GIT, musculus iliopsoas, fraktury s dislokací, poranění oka, masivní krvácení

cílová hladina

F VIII 80-100%, F IX 60 – 80%



PODPŮRNÁ LÉČBA

- Antifibrinolytika

Kyselina tranexanová (Pamba) 25mg/kg 7-10dnů

Kontraindikovaná při hematurii a při současné aplikaci aPCC!

- Analgetika

- Klid, chlazení, imobilizace a elevace končetiny



DOPORUČENÉ DÁVKOVÁNÍ

Lokalizace	F VIII:C	F IX:C	Délka substituce
klouby	40-60%	30-50%	1-2dny, dle efektu
svaly	40-60%	30-50%	2-3 dny, dle efektu
Musculus iliopsoas	80-100% 30-60%	60-80% 30-60%	1-2 dny dalších 5 dnů, krátkodobá profylaxe během rehabilitace
Hrdlo a krk	80-100% 50%	60-80% 30%	1.týden 2.týden
CNS	80-100% 50%	60-80% 30%	1.týden 2.-3.týden, poté 3-6měsíců profylaxe
GIT	80-10% 50%	60-80% 30%	1.týden 2.týden
hematurie	50%	40%	3-5dnů
fraktury kostí	50% 30-50%	50% 20-40%	3-5dnů do 2.týdne
operace	80-100% 60-80% 40-60% 30-50%	60-80% 40-60% 30-50% 20-40%	v den zákroku do 3. dne do 6. dne do úplného zhojení
zubní extrakce komplikované nekomplikované	50-100% 30-50% Pamba	50-80% 30% Pamba	v den zákroku další týden 7-10 dnů
tržné rány	50%	40%	1.týden

KONCENTRÁTY KOAGULAČNÍCH FAKTORŮ

- poč. 20. st. - transfúze plazmy, kryoprecipitát
- 50. léta 20 st. - první koncentráty koagulačních faktorů z velkých poolů plazmy, protivirově neošetřeny
- Riziko přenosu virových infekcí !
80. léta 20. st. - „epidemie“ HIV, HCV



KONCENTRÁTY KOAGULAČNÍCH FAKTORŮ

- Výběr dárců
- Testování plazmy: serologické: HIV-1, HIV-2, HBsAg, anti HCV, p24 antigen, HTLV 1,2, HBcAg, anti HBc, Parvovirus B19; PCR
- Skladování odebrané plazmy v karanténě
- Virová inaktivace
- „Registry of Clotting Factor Concentrates“



KONCENTRÁTY KOAGULAČNÍCH FAKTORŮ

PURIFIKACE

- Vysoce čištěné koncentráty F VIII (high purity)

Specifická aktivita: množství daného faktoru na 1mg celkové bílkoviny

- V ČR 2. generace preparátů

Purifikace na iontoměničích, chromatograficky, gelovou ultrafiltrací (Fandhi, Immunate, Octanate)

Imunoafinitní chromatografie s monoklonální protilátkou



KONCENTRÁTY KOAGULAČNÍCH FAKTORŮ

VIROVÁ INAKTIVACE

- solvent-detergent (inaktivuje viry s lipidovým obalem HIV, HCV, HBV)
- suché teplo 60°C 72h, 100°C 2h
(inaktivuje i neobalené viry HAV)
- nanofiltrace 15nm, 35nm membrána
(obalené i neobalené viry, parvovirus B 19)

Riziko přenosu prionových infekcí, parvovirů, hepatitidy G, circovirů, West-Nile viru, viru Ebola, SARS a dosud neznámých infekčních agens.



KONCENTRÁTY FAKTORU VIII

BRAND	COMPANY	SITE OF MANUFACTURE	PLASMA SOURCE	EXPORT/ DOMESTIC	FRACTIONATION	VIRAL INACTIVATION	SA s alb FVIII IU/mg ¹	COMMENT
Factor 8 Y	BioProducts Lab.	Elstree, England	United States: paid apheresis	Both	Heparin/glycine ppt	Dry heat, 80° C, 72 hr	2.5 - 4	Contains VWF
Haemosolvate Factor VIII	National Bioproducts	Durban, South Africa	South Africa & United States: unpaid	Both	Heparin/glycine ppt	TNBP/ polysorbate 80	4-11	No albumin added; contains VWF
HEMORAAS SD plus H	Shanghai RAAS	Shanghai, China	China: paid and unpaid apheresis	Both	PEG/ glycine ppt	S/D, dry heat 100° C, 30 min	< 30	No albumin added, contains VWF
Haemate P (= Haemate HS)	CSL Behring	Marburg, Germany	United States, Germany, Austria: paid & unpaid	Both	Multiple precipitation	Pasteurization, 60° C, 10 hr	38	Albumin added, contains VWF, ratio vWF/FVIII > 2.2
Humate P	CSL Behring	Marburg, Germany	United States: paid apheresis	To USA and Canada	Multiple precipitation	Pasteurization, 60° C, 10 hr	38	Same as above
Conco-eight-HT	Benesis	Osaka, Japan	Japan: unpaid	Domestic	Glycine precipitation, gel filtration	TNBP/ polysorbate 80 & dry heat, 60° C, 72 hr	50	Albumin added
Koate DVI	Talecris	Clayton, NC, USA	United States: paid apheresis	Both	Multiple precipitation and size exclusion chromatography	TNBP/ polysorbate 80 & dry heat, 80° C, 72 hr	>20	Albumin added, contains VWF
BIOSTATE	CSL Bioplasma	Melbourne, Australia	Australia, New Zealand, Malaysia, Singapore, Hong Kong: unpaid; USA: paid	Both	Heparin/ glycine ppt, gel filtration chromatography	TNBP/ polysorbate 80 & dry heat, 80° C, 72 hr	50	Albumin added, contains VWF; SA without albumin & VWF = 180
HEMORAAS-IP, SD plus H	Shanghai RAAS	Shanghai, China	China: paid and unpaid apheresis	Both	PEG ppt & ion exchange chromatography	S/D; dry heat, 100° C, 30 min	< 100	No albumin added
HEMORAAS-HP, SD plus H	Shanghai RAAS	Shanghai, China	China: paid and unpaid apheresis	Both	PEG ppt & ion exchange chromatography	S/D; dry heat, 100° C, 30 min	> 100	No albumin added
GreenEight	GreenCross	Seoul, Korea	Korea: unpaid; United States: paid apheresis	Both	Ion exchange chromatography	TNBP/Triton X 100; Dry heat 100° C, 30 min	100+	No albumin added, contains VWF
Confact F	Kaketsuken	Kumamoto, Japan	Japan: unpaid	Domestic	Ion exchange chromatography	Dry heat, 65° C, 96 hr; 19 nm nanofiltration	50	Albumin added
Immunate	Baxter BioScience	Vienna, Austria	United States, Austria, Czech Republic, Germany, Sweden: mostly paid apheresis	Both	Ion exchange chromatography	Solvent-detergent; vapor-heat, 60° C, 10 hr at 190 mbar	Mean 70, SD 30	Albumin added, contains VWF
Emoclot D.I.	Kedrion	Barga, Italy	Europe and United States: paid & unpaid	Both	Ion exchange chromatography	TNBP/polysorbate 80 & dry heat, 100° C, 30 min	> 80	No albumin added, contains 0.4 IU VWF:RCo per IU FVIII
Haemoctin SDH	Biotest	Dreieich, Germany	USA, Austria, Belgium, Germany: paid & unpaid	Both	Anion exchange chromatography	TNBP/polysorbate 80 & dry heat, 100° C, 30 min	100	No albumin added
Faktor VIII SDH Intersero	Intersero	Biotest, Dreieich, Germany	USA, Austria, Belgium, Germany: paid & unpaid	Domestic	Anion exchange chromatography	TNBP/polysorbate 80 & dry heat, 100° C, 30 min	100	No albumin added
Octanate	Octapharma	Vienna, Austria, Stockholm, Sweden & Lingolsheim, France	Sweden, Austria, Germany, United States	Both	Precipitations, ion exchange chromatography	TNBP/polysorbate 80 & Terminal dry heat, 100° C, 30 min at controlled residual moisture	> 100	No albumin added, contains VWF
Wilate	Octapharma	Vienna, Austria	Sweden, Austria, Germany, United States	Both	Precipitations, ion exchange and size exclusion chromatography	TNBP/Triton X 100, & terminal dry heat, 100° C, 120 min, at controlled residual moisture	>100	No albumin added; contains VWF and FVIII in the physiological ratio
FACTANE	LFB	France	Western European unpaid	Both	Adsorption on aluminium hydroxide gel Ion exchange chromatography	TNBP/ polysorbate 80 & 35-15 nm nanofiltration	> 100	No albumin added, contains VWF
Beriate P	CSL Behring	Marburg, Germany	USA, Austria, Denmark, Germany: paid & unpaid	Both	Ion exchange chromatography	Pasteurization, 60° C, 10 hr	170	No albumin, stabilized in amino acids & sucrose
Optivate	Bio Products Laboratory	Elstree, England	United States paid apheresis	Both	Cryoprecipitation, heparin and glycine precipitation, MPHS chromatography	Solvent-detergent and dry heat, 80°, 72 hr	800	Contains VWF

KONCENTRÁTY FAKTORU VIII

BRAND	COMPANY	SITE OF MANUFACTURE	PLASMA SOURCE	EXPORT/ DOMESTIC	FRACTIONATION	VIRAL INACTIVATION	SA s alb FVIII IU/mg ¹	COMMENTS
Alphanate	Grifols	Los Angeles, CA, USA	United States: paid apheresis	Both	Heparin ligand chromatography	TNBP/polysorbate 80 & dry heat, 80° C, 72 hr	≥100	Albumin added, contains VWF; SA w/o alb & VWF = 1000-3000
Fanbidi	Grifols	Barcelona, Spain	1. USA: paid apheresis 2. Spain: unpaid recovered & apheresis 3. Czech Republic: recovered & apheresis 4. Slovakia: recovered & apheresis	1. Both 2. Domestic only 3. to Czech Republic 4. to Slovakia	Same as above	Same as above	≥100	Same as above
Monoclate P	CSL Behring	Kankakee, IL, USA	United States: paid apheresis	Both	Monoclonal Ab affinity chromatography	Pasteurization at 60° C, 10 hr	> 3000	Albumin added, no VWF
Hemofil M AHF	Baxter BioScience	Los Angeles, CA, USA	United States: paid apheresis	Both	Monoclonal Ab affinity & ion exchange chromatography	TNBP/ Octoxynol 9	Approx. 2000	Albumin added, no functional VWF
Replenate	Bio Products Laboratory	Elstree, England, UK	United States: paid apheresis	Domestic	Monoclonal Ab affinity & ion exchange chromatography	TNBP/ Triton X 100	> 2000	As above
Amofil	Sanquin OY	Sanquin, Amsterdam	Finland: unpaid recovered	To Finland	Same as above	Same as above	> 2000	As above
Octanativ-M	Octapharma	Stockholm, Sweden	Swedish unpaid recovered & apheresis	Both	Same as above	Same as above	>2000	As above
Aafact	Sanquin	Amsterdam, Netherlands	Netherlands: unpaid	Domestic	Same as above	Same as above	> 2000	As above
GreenMono	Greencross Corp	Seoul, Korea	Korea: unpaid	Domestic	Same as above	TNBP/ Triton X 100	> 2000	As above
Cross Eight M	Japanese Red Cross	Chitose City, Japan	Japan: unpaid	Domestic	Same as above	TNBP/ Triton X 100 & nanofiltration	> 2000	As above

Registry of Clotting Factor Concentrate, April 2008

TABLE 6: HIGHLY PURIFIED FACTOR IX CONCENTRATES

BRAND	COMPANY	SITE OF MANUFACTURE	PLASMA SOURCE	EXPORT/DOMESTIC	FRACTIONATION	VIRAL INACTIVATION	SA s alb FIX IU/mg ¹	COMMENTS
Berinin-P = Berinin HS	CSL Behring	Marburg, Germany	United States, Austria, Germany: paid & unpaid	Both	DEAE-sephadex, heparin affinity chromatography	Pasteurization at 60° C, 10 hr	146	Anti-thrombin III & heparin added; no albumin added
Immunine	Baxter BioScience	Vienna, Austria	United States, Austria, Czech Republic, Germany, Sweden: mostly paid apheresis	Both	Ion exchange & hydrophobic interaction chromatography	Polysorbate 80 & vapor heat, 60° C, 10 hrs, 190 mbar then 80° C, 1 hr, 375 mbar	Approx. 100	
Hemo-B- RAAS	Shanghai RAAS	Shanghai, China	China: unpaid & paid apheresis	Both	Ion exchange & affinity chromatography	Solvent/ detergent, dry heat & nanofiltration	> 50	No albumin added
Octanine F	Octapharma	Vienna, Austria & Lingolsheim, France	Sweden, Austria, Germany & United States	Both	Ion exchange & affinity chromatographies	TNBP/ polysorbate 80 & nanofiltration	> 120	No albumin added
Nanotiv	Octapharma	Stockholm, Sweden	Sweden: Recovered & apheresis	Both	Ion exchange & affinity chromatographies	TNBP/ Triton X 100 & nanofiltration	150	No albumin added
MonoFIX-VF	CSL Bioplasma	Melbourne, Australia	Australia, New Zealand, Singapore, Hong Kong: Unpaid	Both	Ion exchange & heparin affinity chromatography	TNBP/ polysorbate 80 & nanofiltration	>50	Anti-thrombin III & heparin added, no albumin added
Christmassin -M	Benesis	Osaka, Japan	Japan: unpaid	Domestic	Ion exchange & immunoaffinity chromatography	TNBP/ polysorbate 80; dry heat, 60° C, 72 hr; 15 nm nanofiltration	Approx 170	Albumin added
Aimax	Kedron	Italy	Europe & United States: paid & unpaid	Both	Anion exchange, DEAE sephadex/sepharose & heparin affinity chromatography	TNBP polysorbate 80; dry heat 100° C, 30 min; nanofiltration 35 + 15 nm (registration pending for nanofiltration)	> 100	Anti-thrombin III & heparin added, no albumin added
BETAFACT	LFB	France	Western Europe, unpaid	Both	Ion exchange chromatography and affinity chromatography	TNBP/ polysorbate 80, 15 nm nanofiltration	110	No albumin added
Faktor IX SDN	Biotest	LFB, France	Western Europe, unpaid	Austria & Germany	As above	As above	110	No albumin added
Factor IX Grifols	Grifols	Barcelona, Spain	1. United States paid 2. Spain recovered and apheresis, unpaid	1. Both 2. Domestic	Precipitation & multiple chromatography (including metal chelate affinity)	Solvent detergent, 15 nm nanofiltration	> 150	No albumin added
AlphaNine SD	Grifols	Los Angeles, CA, USA	United States: paid apheresis	Both	Ion exchange and dual polysaccharide ligand chromatography	Solvent/detergent, nanofiltration	210	No albumin added
Mononine	CSL Behring	Kankakee, IL, USA	United States: apheresis paid	Both	Immunoaffinity chromatography	Sodium thiocyanate & ultrafiltration	> 190	No albumin added
Nonafact	Sanquin	Amsterdam, The Netherlands	The Netherlands: unpaid	Both	Immunoaffinity & hydrophobic interaction chromatography	TNBP/ polysorbate 80; 15 nm nanofiltration	200 or more	No albumin added
Novact M	Kaketsuken	Kumamoto, Japan	Japan: unpaid	Domestic	Immunoaffinity chromatography	Dry heat, 65° C, 96 hr; 15 nm nanofiltration	Approx 200	Albumin added
Replene - VF	BioProducts Lab.	Elstree, England, UK	United States: paid apheresis	Both	Metal chelate chromatography	Solvent-detergent; 15 nm nanofiltration	200	No albumin added

CREUTZFELDT-JAKOBOVA NEMOC

- vCJD – nová forma lidského prionového onemocnění
- 3 případy přenosu vCJD krevní transfúzí infikovaných dárců ve VB
- 1 případ asymptomatické infekce vCJD u hemofilika ve VB

Není evidován žádný případ prionové nákazy plazmatickými koncentráty faktorů.

Cave: dlouhá inkubační doba



REKOMBINANTNÍ PREPARÁTY

- Od počátku 90. let 20. st.
- Produkce na tkáňových kulturách
- Vyšší imunogenicitu? Studie SIPPET
- 1. generace F VIII (Recombinate)

Obsah plazmatických bílkovin v mediu buněčné kultury i ve finálním produktu.

- 2. generace F VIII (Kogenate, ReFacto)

Obsah proteinů v buněčném mediu, ne ve finálním produktu



REKOMBINANTNÍ PREPARÁTY

- V roce 2004 3. generace F VIII (Advate)
Neobsahuje žádné plazmatické bílkoviny v buněčném mediu ani ve finální produktu
- Buněčná linie vysoce rezistentní proti infekci řadou lidských virů (u produktů této linie nebyl po více než 100mil. aplikací zaznamenán jediný přenos viru).
- Purifikace: imunoafinitní chromatografie s monoklonální protilátkou; virová inaktivace: solvent-detergent
- 3. generace F IX (BeneFIX)



REKOMBINANTNÍ PREPARÁTY

Indikace

- Nově narození těžcí hemofilici A (3pacienti/rok)
- Krátkodobá profylaxe dětí s lehkou formou (dosud neléčení plazmatickými preparáty)
- Přenašečky hemofilie A, u kterých bude nutno podávat F VIII v průběhu porodu (dosud neléčených plazmatickými preparáty)



LÉČBA BUDOUCNOSTI

- Širší zavádění rekombinantních produktů v praxi
- Pegylované formy
- Genová terapie



PEGYLOVANÉ FORMY

- Specifická nekovalentní vazba PEGylovaného liposomu (liposom s navázaným polyetylen glycolem) k proteinu F VIII.
- Nedochází ke změně struktury ani funkce F VIII
- Preklinické studie na zvířecích modelech s PEGLip-F VIII prokázaly prodloužení plazmatického poločasu



PEGYLOVANÉ FORMY

- 5 klinických studií fáze I a II prokázaly delší hemostatickou účinnost PEGLip-F VIII/F VII
- Nepotvrdily rozdíl ve farmakokinetice mezi standardními a pegylovanými formami F VIII
- Existence jiných mechanismů účinku zlepšující hemostatickou účinnost (vazba na neaktivované trombocyty, vytvoření komplexu trombocyt-PEGLip- F VIII/F VII)
- Dobře tolerované, nezvyšují výskyt inhibitoru

Yatuv R., Robinson M., Dayan I., Baru M. The use of PEGylated liposomes in the development of drug delivery applications for the treatment of hemophilia. Int J Nanomedicine. 2010; 5: 581–591.



GENOVÁ TERAPIE



- Transdukce – přenos cizorodého genetického materiálu pomocí virů
- Transgen – cizorodý gen vnesený do DNA za účelem dosažení změny fenotypu
- Virové vektory

Vector	Transdukce	Nevýhody
Retroviry RNA	dělící se buňky limitovaná velikost DNA genomická integrace	mutageneze
Adenoviry DNA	velké fragmenty DNA transdukce i nedělících se buněk episomálně	přítomnost protilátek imunitní odpověď na virové proteiny
Adeno-asociované viry DNA	transdukce i nedělících se buněk limitovaná velikost DNA parciální integrace	mutageneze

GENOVÁ TERAPIE



Klinické studie genové terapie pacientů s hemofilií A

Vector	Cílový orgán	Přenos	Počet	Výsledek	
Ne-virový Elektroporace fibroblastů	omentum	kultivace autologních fibroblastů injekce do omentálního tuku	12	bez trvalé odpovědi	Roth et al, 2001
Retroviry	játra	i.v. 3dny	13	bez trvalé odpovědi	Powell et al, 2003
Adenoviry	játra	i.v.	1	bez trvalé odpovědi (NÚ:trombocytopenie hepatopatie)	White et al, 2003

GENOVÁ TERAPIE

Klinické studie genové terapie pacientů s hemofilií B

Vektor	Cílový orgán	Přenos	Počet	Výsledek	
AAV virus	sval	intramuskulárně	8	bez trvalé odpovědi perzistence vektoru	Manno et al, 2003
AAV virus	játra	hepatální arterie	7	bez trvalé odpovědi Transientní F IX >12%	High et al, 2004 Manno et al, 2006



GENOVÁ TERAPIE

- Nové strategie genové terapie

Intraartikulární genová terapie

Autologní transplantace
modifikovaných HSC

Exprese F IX v trombocytech



Děkuji za pozornost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

