

# CONCENTRADO DE FACTOR VIII DE PUREZA INTERMEDIA, OBTENIDO A PARTIR DEL TRATAMIENTO TÉRMICO DE PEQUEÑOS LOTES (*POOLS*)

Edición revisada

**I.P. Petersen**

**A.R. Bird**

Servicio de Transfusión Sanguínea de la  
Provincia Occidental de Sudáfrica

Publicado por la Federación Mundial de Hemofilia (FMH), 1997; revisado, 2004.

© World Federation of Hemophilia, 2004

La FMH alienta la redistribución de sus publicaciones por organizaciones de hemofilia sin fines de lucro con propósitos educativos. Para obtener la autorización de reimprimir, redistribuir o traducir esta publicación, por favor comuníquese con el Departamento de Comunicación a la dirección indicada abajo.

Esta publicación se encuentra disponible en la página Internet de la Federación Mundial de Hemofilia, **www.wfh.org**. También pueden solicitarse copias adicionales a:

Federación Mundial de Hemofilia  
1425 René Lévesque Boulevard West, Suite 1010  
Montréal, Québec H3G 1T7  
CANADA  
Tel.: (514) 875-7944  
Fax: (514) 875-8916  
Correo-e: [wfh@wfh.org](mailto:wfh@wfh.org)  
Internet: [www.wfh.org](http://www.wfh.org)

El propósito de la serie *Hechos y Cifras* es brindar información general sobre los productos de reemplazo de factor y la administración de la atención para la hemofilia. La Federación Mundial de Hemofilia no se involucra en el ejercicio de la medicina y bajo ninguna circunstancia recomienda un tratamiento en particular para individuos específicos. Las dosis recomendadas y otros regímenes de tratamiento son revisados continuamente, conforme se reconocen nuevos efectos secundarios. La FMH no reconoce, de modo explícito o implícito alguno, que las dosis de medicamentos u otras recomendaciones de tratamiento en esta publicación sean las adecuadas. Debido a lo anterior, se recomienda enfáticamente al lector buscar la asesoría de un consejero médico y/o consultar las instrucciones impresas que proporciona la compañía farmacéutica, antes de administrar cualquiera de los medicamentos a los que se hace referencia en esta monografía.

Las afirmaciones y las opiniones aquí expresadas no necesariamente representan las opiniones, políticas o recomendaciones de la Federación Mundial de Hemofilia, de su Comité Ejecutivo, o de su personal

## Índice

Introducción .....	1
Pureza vs. seguridad .....	1
Materiales y métodos .....	1
Equipo esencial .....	2
Sustancias químicas.....	2
Material auxiliar .....	2
Ensayos .....	2
Producción/procesamiento .....	2
Paso 1 - Producción de crioprecipitado .....	2
Paso 2 - Extracción de crioprecipitado .....	2
Paso 3 - Precipitación de fibrinógeno.....	3
Paso 4 - Precipitación de factor VIII .....	3
Paso 5 - Reconstitución del precipitado de factor VIII.....	3
Paso 6 - Llenado y liofilizado .....	3
Paso 7 - Inactivación viral.....	3
Paso 8 - Liberación del producto .....	3
Estudios farmacocinéticos .....	3
Resultados .....	4
Discusión .....	4
Referencias.....	5
Agradecimientos.....	5



---

# Concentrado de factor VIII de pureza intermedia, obtenido a partir del tratamiento térmico de pequeños lotes (*pools*)

---

I. P. Petersen y A. R. Bird

---

## Introducción

La atención de la hemofilia en las naciones no desarrolladas y en vías de desarrollo es sumamente inadecuada y, en algunos casos, completamente inexistente. De hecho, la mayoría de las personas con hemofilia en el mundo prácticamente no recibe tratamiento. En el año 2000, el consumo total de concentrados de factor a escala mundial fue del orden de 3.7 mil millones de unidades internacionales (UI). En ese año, Europa y Norteamérica (18.8% de la población mundial) consumieron 74% del abastecimiento mundial de todos los concentrados de factor. Todas las demás regiones del mundo (80% de la población mundial) usaron sólo 26% del abastecimiento de factor. En Alemania, por ejemplo, el uso per cápita de factor VIII fue de 5.5 UI, mientras que en Bangladesh fue de 0.004 UI. Esta enorme diferencia en el consumo no sólo es resultado de la variación de recursos económicos y su disponibilidad, sino también de la falta de diagnóstico en el mundo en desarrollo. Se calcula que, en el 2004, el 75% de las personas con hemofilia en todo el mundo todavía no habían sido diagnosticadas. La mayoría vive en países en vías de desarrollo y no sobrevivirá más allá de la niñez con la actual tasa de diagnóstico y tratamiento inadecuados [1].

Los tipos de productos disponibles varían desde crioprecipitado (cuya inactivación viral es más difícil), concentrados de pureza intermedia tratados con calor o con métodos de solvente-detergente, concentrados de alta pureza tratados con calor o con métodos de solvente-detergente, hasta productos recombinantes. Realísticamente, los únicos productos potenciales para las naciones en desarrollo son el crioprecipitado o la compra de concentrados comerciales de pureza intermedia. No obstante, en muchas naciones en desarrollo, la prevalencia de virus transmitidos por medio de transfusiones es alta en la población de donantes y, por ende, el riesgo de infección permanece. En el 2002, el precio promedio por UI de concentrado de factor VIII

de pureza intermedia fue de +/- US \$0.20-\$0.55 en circunstancias normales [2]. Muchos países no pueden pagar estos precios, tomando en cuenta que la terapia de reemplazo sobre pedido mínima requiere de 30 000 UI por paciente, por año (equivalente a US \$6 000 por año, al extremo inferior del rango de precio) [1].

Presentamos nuestra experiencia con la fabricación de concentrados de pureza intermedia, tratados con calor y elaborados a partir de un pequeño lote de plasma, lo que podría ser adecuado y rentable para algunas naciones que pretenden lograr la autosuficiencia pero no pueden pagar productos de alta pureza. El método es esencialmente el descrito por Knevelman et al [3], en Holanda.

## Pureza vs. seguridad

La pureza se refiere al porcentaje del ingrediente deseado (por ejemplo, factor VIII) en los concentrados, en relación con otros ingredientes presentes. La pureza de los concentrados disponibles comercialmente varía considerablemente. Generalmente, los productos de alta pureza tienden a estar relacionados con bajos rendimientos de fabricación, debido a una menor cantidad de factor Von Willebrand (la proteína natural transportadora del factor VIII), y son, por lo tanto, más costosos. No se ha demostrado de manera convincente que la pureza de los concentrados de factor VIII mejore la seguridad de estos productos, siempre que se hayan establecido medidas adecuadas de inactivación viral [4].

## Materiales y métodos

### Equipo esencial

Centrífuga  
(*Beckman J-6B, J-6-HC*, Beckman Instruments Inc., California, EE. UU.).

Estación de trabajo de flujo laminar estéril

(Fibatron modelo 6FS WHB6, Fibatron, Ciudad del Cabo, Sudáfrica).

Liofilizador esterilizable  
(VirtTis SRC 50/51, The Virtis Company, Nueva York, EE. UU.).

Sellador dieléctrico  
(Terumo Corporation, Tokio, Japón).

Bomba peristáltica  
(Dune Engineering, Subset Beach, Sudáfrica).

Baños María con temperatura controlada.

### Sustancias químicas

Todos los componentes de los tampones (*buffers*) son de calidad farmacéutica; se preparan a granel, se filtran esterilizados y se prueban antes de colocarlos en el mercado.

*Buffer A* 0.02 M tris - HCl pH 7.0

*Buffer B* 2.8 M glicina; 0.3 M NaCl;  
0.025 M tris HCl pH 6.8

*Buffer C* 26.7% NaCl; 1.0 M glicina

*Buffer D* 0.01 M Na citrato; 0.00125 M  
CaCl<sub>2</sub>;  
0.01 M glicina; 0.03 M CaCl<sub>2</sub>;

1.0% sucrosa

### Material auxiliar

Paquetes de transferencia  
*Fenwal código # AFR 1614*  
(Baxter Healthcare, Illinois, EE. UU.).

Juegos de transferencia  
FP-0002P  
(Capricorn Biologics, Johannesburgo, Sudáfrica).

Filtros estériles  
*Millipak # 40*  
(Millipore, Francia).

Frasco para inyección, de vidrio transparente,  
125 ml  
(LSL, Rochdale, Reino Unido).

### Ensayos

El factor VIII fue medido tanto por un ensayo manual de coagulación de una etapa como por un método cromogénico (Chromogenix AB Mölndal, Suecia). El fibrinógeno fue medido por un método manual, de acuerdo con Clauss [5]. La proteína total fue analizada por la técnica Biuret estándar. La osmolaridad fue medida en un *Slamed Osmometer* (E.S.I., Ciudad del Cabo) y los ensayos electrolíticos fueron realizados en un *Monarch 2000 Automatic Analyser* (Instrumentation Laboratory, Maryland, EE. UU.).

### Producción/procesamiento

Todo el proceso de purificación se lleva a cabo dentro de las bolsas selladas de sangre. Todos los pasos en donde las bolsas o los frascos se abren se llevan a cabo en una estación de trabajo clase 100 con hepafiltro de flujo laminar. Las bolsas/frascos se sellan antes de retirarlos de la estación de trabajo al concluir cada paso de procesamiento. En todo momento se utiliza una técnica aséptica.

### Paso 1 – Producción de crioprecipitado

El crioprecipitado se produce usando un proceso estándar de etanol/hielo seco para un congelamiento instantáneo y se extrae al descongelar a 4° C en baño María. Todos estos procedimientos se llevan a cabo en un sistema de bolsas cerradas.

### Paso 2 – Extracción de crioprecipitado

El factor antihemofílico (FAH) se extrae del crioprecipitado con 6 ml de *buffer A* por bolsa de crioprecipitado. La adición del *buffer* se hace en las bolsas originales descongeladas. Después de la adición del *buffer* de extracción, las bolsas se sellan con un sellador dieléctrico. El contenido de la bolsa se mezcla y se incuba en baño María a 30° C durante al menos diez minutos. Se agrupan de cinco a doce bolsas de crioprecipitado (cada bolsa contiene el crioprecipitado de una donación y por lo tanto cada bolsa representa un solo donante), de manera que la dosis requerida (500 UI de factor VIII por ampollita) pueda alcanzarse en el producto final. Desde que iniciamos la producción, hemos usado un promedio de siete a ocho bolsas para satisfacer este requisito. Asignamos un número a cada grupo para poder

rastrear las donaciones originales. Este grupo se procesa junto como una entidad (sublote) durante todo el proceso, y el número del grupo se convierte también en el número final del frasco.

### **Paso 3 – Precipitación de fibrinógeno**

El fibrinógeno se precipita por la adición de 25 ml de *buffer* B, precalentado a 30° C, a cada bolsa de crioprecipitado. La suspensión se mezcla e incuba aproximadamente a 30° C durante al menos treinta minutos, y después se centrifuga a 4000 rpm durante al menos veinte minutos a 20° C. Después de la centrifugación, las bolsas se cuelgan en posición invertida en la unidad de flujo laminar. Los sobrenadantes de cada grupo de crioprecipitado se drenan por separado en paquetes de transferencia de 600 ml, marcados con el número apropiado de sublote. Este sobrenadante contiene una alta concentración de factor VIII. El precipitado, principalmente fibrinógeno, se descarta.

### **Paso 4 – Precipitación de factor VIII**

La precipitación de factor VIII del sobrenadante desprovisto de fibrinógeno se logra mediante la adición aséptica del *buffer* C, precalentado a 30° C. La suspensión se mezcla e incuba a 30° C durante al menos treinta minutos. Después de la incubación, las bolsas se dejan durante la noche a temperatura ambiente. El factor VIII precipitado se aísla por centrifugación a 4000 rpm durante al menos treinta minutos a 4° C. El sobrenadante se descarta.

### **Paso 5 - Reconstitución del precipitado de factor VIII**

El precipitado de factor VIII sedimentado se reconstituye agregando 50 ml de *buffer* D, precalentado a 30° C, a cada paquete de transferencia de 600 ml numerado. El *buffer* se bombea a la bolsa por medio de un filtro bacteriano con una bomba peristáltica. La bolsa se sella y la suspensión de FAH se incuba a 30° C durante al menos treinta minutos, con giros periódicos o hasta que todo el precipitado se haya disuelto.

### **Paso 6 – Llenado y liofilizado**

Los paquetes de transferencia se cuelgan invertidos en la unidad de flujo laminar. Se tienen preparados frascos de 125 ml que se

etiquetarán con las mismas series de números que los paquetes de transferencia. El contenido de los paquetes de transferencia se transfiere a los frascos numerados correspondientes, por medio de los juegos de transferencia. El diez por ciento de cada frasco se inocula en un caldo de tioglicolato. Los frascos que muestren contaminación microbiológica se retiran del lote y se descartan.

Los frascos que contienen la preparación líquida de factor VIII se congelan en un baño de hielo seco/etanol y se colocan directamente en el liofilizador o se almacenan en una congeladora a -40° C. Para la liofilización, en la estación de trabajo clase 100 se retiran los tapones de hule de los frascos y se reemplazan con tapones esterilizados. Enseguida, los frascos se colocan en la liofilizadora, en estantes previamente enfriados, con una temperatura de condensador de por lo menos -50° C.

El liofilizado se realiza en un vacío constante de aproximadamente 50 mTorr, las temperaturas se incrementan por pasos a -30° C, 0° C, +30° C, +40° C y +50° C durante un periodo de noventa horas aproximadamente, y se sella al vacío.

### **Paso 7 - Inactivación viral**

Los frascos sellados de FAH en polvo se transfieren a un baño María con temperatura controlada y se incuban a 80-83° C durante setenta y dos horas.

### **Paso 8 – Liberación del producto**

Se toman muestras aleatorias del lote de producto y se someten a pruebas de actividad de coagulación del factor VIII, concentración de electrolitos, pirogenicidad, esterilidad y toxicidad. Si cumplen con todos los parámetros para su liberación, se etiquetan con número de lote y número de frasco antes de entregarse para su uso.

### **Estudios farmacocinéticos**

A tres personas con hemofilia severa se les infundieron un promedio de 2000 UI de factor VIII; se tomaron muestras antes de la infusión y a intervalos regulares durante veinticuatro horas después de la infusión.

## Resultados

Desde 1992 hasta la fecha, más de 25 000 frascos de 500 UI de factor VIII (FVIII) por frasco han sido preparados usando este método. Los valores medios para los diferentes parámetros durante este período fueron los siguientes:

Factor VIII:c	564 ± 128 UI por frasco
Rendimiento	287 ± 65 UI por litro de plasma
Proteína Total	3.2 ± 1.26 mg/ml
Fibrinógeno	25% ± 14.64% de la proteína total
pH	6.9 - 0.09
Osmolaridad	394 ± 8l mOsmoles/kg
Sodio	163 ± 31.7 mMole/litro
Cloro	134 ± 28.8 mMole/litro
Potasio	0.8 ± 0.58 mMole/litro
Calcio	1.0 ± 0.30 mMole/litro
Actividad específica	4.2 ± 2.94 UI/mg TP

### Estudios clínicos:

Recuperación media	94%
Semivida promedio	8.3 horas (ensayo cromogénico)
	13.4 horas (ensayo de coagulación de una etapa)

## Discusión

Como mencionamos anteriormente, en el año 2002, el precio promedio por unidad de factor VIII de pureza intermedia fue de US \$0.20-0.55. Nuestro producto local se vende al extremo inferior de este espectro, a un precio equivalente a +/- US \$0.20.

Para mantener la producción necesitamos cuatro personas. Se necesitan tres para trabajar en la mesa (es decir, en la unidad de flujo laminar) y las hemos capacitado a nivel de técnicos. Un miembro del personal funge como supervisor y debe poseer una capacitación científica más avanzada. Con este personal y equipo podemos producir un rendimiento de aproximadamente sesenta frascos de factor VIII por cada turno de ocho horas.

Hemos estado fabricando este producto en la región del Cabo Occidental en Sudáfrica durante los últimos doce años y, aunque se ha producido dentro de una planta acreditada para el fraccionamiento de plasma, no se requieren instalaciones con este grado de sofisticación farmacéutica. El proceso depende de la existencia de un servicio de transfusión sanguínea organizado, capaz de producir crioprecipitado, y requiere cierta inversión de capital en el equipo antes citado.

El único pequeño inconveniente del producto actual es que no está desalinizado ni concentrado; por ende, requiere 50 ml de agua esterilizada para su reconstitución y se administra con un equipo estándar de transfusión sanguínea. El principal motivo de esto es económico, pero actualmente investigamos un enfoque rentable para superarlo. El tiempo promedio para la reconstitución es de dos a tres minutos.

No tenemos suficientes pacientes que no hayan recibido tratamiento previo a fin de acumular datos que aporten pruebas incontrovertibles respecto a la seguridad del proceso; no obstante, el proceso de calentamiento usado tiene un buen récord clínico, ha sido validado en un sistema similar [3], y ha sido eficaz con otros productos de factor VIII. No hemos tenido ninguna seroconversión al VIH o a hepatitis en nuestros pacientes desde el inicio de este programa. La recuperación clínica y semivida están dentro de los límites aceptables, aunque no podemos explicar los diferentes resultados obtenidos en los estudios de semivida con los ensayos cromogénicos y de coagulación.

Este producto es adecuado para el tratamiento de la enfermedad von Willebrand puesto que contiene suficientes múltmeros de alto peso molecular de factor von Willebrand [6]. Lo anterior concuerda con los descubrimientos de Rodegheiro et al [7],

quienes demostraron que algunos productos de pureza intermedia retienen suficientes multímeros de alto peso molecular para ser eficaces cuando se usan como terapia de reemplazo en la EvW.

## Referencias

1. Fulop M., Robert P., Chit A., Bult J. Assuring access to care: Global perspective. Plasma Forum Speakers Papers. Washington DC, USA: Plasma Protein Therapeutics Association 2004.
2. Informe del Sondeo Anual Mundial 2003. Montreal: Federación Mundial de Hemofilia 2004: 2.
3. Knevelman A., de Wit H.J.C., Potstra P., vd Does J.A. Development and Small Scale Production of a Severely Heated Factor VIII Concentrate. *Vox Sang* 1994; 66: 89-95.
4. Farrugia A. Guía para la evaluación de concentrados de factor de coagulación para el tratamiento de la hemofilia. Montreal: Federación Mundial de Hemofilia, 2003: 9.

5. Clauss A. Rapid physiological coagulation method in determination of fibrinogen. *Acta haematologica* (Basel) 1957; 17: 237.
6. Bird A., Shuttleworth M., Anderson C., Karabus C. von Willebrand's Disease in the Western Cape. *South African Medical Journal* 1996; 86: 259-261.
7. Rodegheiro F., Casaman G., Meyer D., Mannucci P. Replacement Therapy with Virus-inactivated Plasma Concentrates in von Willebrand Disease. *Vox Sang* 1992; 62: 193-199.

## Agradecimientos

Deseamos agradecer al señor Tommy Scanes del Servicio Sudafricano de Transfusión Sanguínea (SSTS) en Johannesburgo por haber compartido con nosotros información de laboratorio del SSTS sobre este proceso.