Produção Nacional de Fator VIII da Coagulação

Dimas Tadeu Covas

Professor Titular da FMRP-USP

ANEXO 2

2012

Confidencial

Ribeirao Preto, Sao Paulo

Fator VIII da Coagulação

Introdução

Hemofilia A e B

As hemofilias A e B são doenças genéticas hereditárias ou adquiridas caracterizadas pela deficiência de fatores da coagulação, respectivamente do fator VIII e do fator IX. Os genes correspondentes localizam-se no cromossomo X e a sua alteração determina ausência ou diminuição dos fatores circulantes o que leva a uma doença hemorrágica de gravidade variável na dependência das concentrações remanescentes dos fatores. A doença se manifesta em homens, sendo as mulheres as portadoras do gene defeituoso e responsáveis pela transmissão hereditária. A doença afeta 1 a cada 5.000 a 10.000 crianças masculinas nascidas. Indivíduos com menos de 1% de atividade do fator em circulação apresentam doença grave caracterizada por sangramentos espontâneos recorrentes, principalmente nas articulações dos membros e músculos. Indivíduos com concentrações de fatores que correspondem à atividade entre 2 e 6% apresentam doença moderada com manifestações hemorrágicas menos frequentes e geralmente associadas a traumas. Indivíduos com atividades de fatores entre 6 e 30% apresentam doença leve e raramente sangram.

A Hemofilia A no Mundo e no Brasil

ANEXO 2

A Organização Mundial de Saúde estima a existência de 350.000 hemofílicos no mundo (80% hemofilia A e 20% hemofilia B). A Federação Mundial de Hemofilia, no seu mais recente levantamento de 2008, registrou a existência de 130.363 hemofílicos (108.402 A e 21.961 B) em 108 países (91% da população mundial). No Brasil, um levantamento realizado pelo Ministério da Saúde em 2010 indicava a existência de 8.795 hemofílicos A e 1.669 hemofílicos B.

O Tratamento da Hemofilia A

Independente da gravidade da doença, o tratamento é feito pela reposição de concentrados de fatores da coagulação. Existem, entretanto, modalidades diferentes de tratamento com objetivos terapêuticos distintos, como pode ser verificado na tabela 1. No ano de 2010, o Brasil usou 255.328.250 UI de concentrados de fator VIII para tratar os pacientes com hemofilia A. A população do Brasil, em 2010, era de 190.732.694 habitantes o que resultou na quantidade de 1,34 UI de FVIII/habitante. Como pode ser observado na tabela 1, essa quantidade de fator VIII per capita permite classificar o tipo de tratamento oferecido aos pacientes hemofílicos A brasileiros como sendo de sobrevivência. Na figura 1, observa-se a posição do Brasil, em comparação a outros países, em relação à quantidade de fator VIII/per capita oferecida para o tratamento dos hemofílicos A. Outra forma de se analisar a disponibilidade de fator VIII é calcular a quantidade de fator disponível por hemofílico. No Brasil essa quantidade, em 2010, foi de 30.000 UI/paciente, sendo que uma boa assistência

recomenda uma dose de pelo menos 50.000UI/paciente/ano. No conjunto, esses dados indicam claramente que o tratamento dos hemofílicos A brasileiros necessita ser melhorado no que diz respeitos à disponibilidade de concentrado de fator VIII. Seria razoável o aumento imediato da disponibilidade de fator VIII para o nível de 3 UI FVIII/per capita para que o esquema terapêutico evoluísse para o estágio II de independência funcional e no médio prazo, a evolução para níveis de 4 a 6 UI/per capita para permitir a plena integração social destes pacientes com a instituição da profilaxia primária contínua.

Tabela 1. Modalidades de tratamento da hemofilia A

Resultado Desejado	Tipo de Tratamento	FVIII per capita requerido
Sobrevivência	Sob demanda	1,0 UI per capita
Independência Funcional	Sob demanda domiciliar com profilaxia intermitente	3,0 UI per capita
Plena integração à sociedade	Profilaxia intermitente e profilaxia primária contínua	Acima de 3,0 UI per capita

ANEXO 2

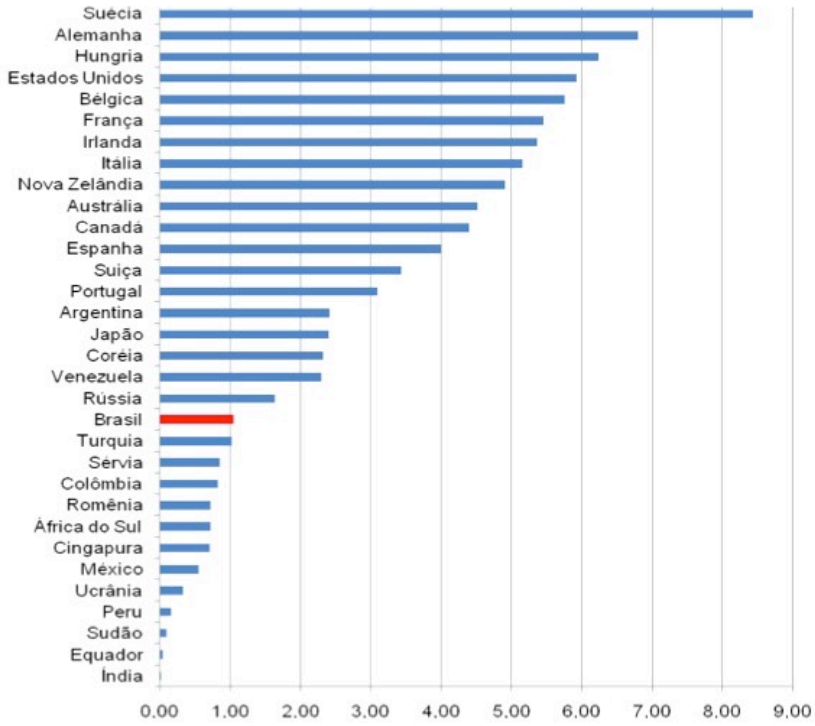


Figura 1. Quantitativo de concentrado de fator VIII/per capita usado no Brasil em relação a outros países (*fonte TCU 2009)*

Essa evolução terapêutica implicaria no aumento da quantidade anual de fator VIII dos 255 milhões de UI usados em 2010 para 600 milhões de UI no curto prazo e para um mínimo de 800 milhões com perspectivas de chegar a 1,2 bilhão de UI de fator VIII no médio e longo prazo. Em termos de custos, isto significaria triplicar o dispêndio imediatamente e sextuplicá-lo no médio e longo prazo.[1]

Concentrados de Fator VIII da Coagulação

O fator VIII da coagulação usado no tratamento da hemofilia A pode ser, atualmente, obtido por dois métodos diferentes: a partir do plasma humano ou por engenharia genética.

Fator VIII Derivado do Plasma (FVIIIDP)

Até o início da década de 1960, não havia tratamento efetivo para a hemofilia. Os pacientes, de forma geral, eram negligenciados e, quando possível, tratados com transfusões de sangue total. Este panorama começou a mudar com a demonstração, em 1964, de que a fração crioprecipitada do plasma era rica em fator VIII e permitia a reposição efetiva do fator VIII nos hemofílicos A. No início da década de 1970, apareceram as primeiras companhias (Hyland, Immuno e Cutter) que produziam concentrados liofilizados de fator VIII. A disponibilidade desses produtos derivados do plasma, em grande quantidade, mudou a história natural da hemofilia A, com os pacientes sobrevivendo mais e com menor morbidade associada.

ANEXO 2

Entretanto, vários problemas caracterizam esses produtos, incluindo a complexa logística para a sua obtenção, a sua segurança em relação à transmissão de agentes infecciosos e a sua obsolescência em termos moleculares.

Problemas Relacionados à Matéria Prima

O plasma humano, em termos absolutos, é uma fonte pobre em fatores da coagulação para fins industriais. Como pode ser observado na figura 2, mais de 90% do plasma é composto por água. As proteínas representam apenas 7% do plasma e, desse total, menos de 1% é constituído por todos os fatores da coagulação.

[1] *O Brasil gastou R$ 299.528.871,00 com a compra de hemoderivados no ano de 2009 (CGPO/SIAFI).*

Água	90%
Proteínas	7%
Outros	3%

Albumina	60%
Outras	24%
Imunoglobulinas	15%
F. Coagulação	< 1%

Figura 2. Composição percentual do plasma humano.

Por convenção, cada mL do plasma circulante contem 1 unidade internacional de cada um dos fatores da coagulação. Portanto, 1 L de plasma circulante de um indivíduo normal contém, por definição, 1000 UI de fator VIII. Entretanto, o fator VIII é uma molécula termolábil e à medida que decorre o tempo aoós processo de coleta e durante o armazenamento para posterior purificação e produção dos concentrados de fator VIII, ocorre também degradação de moléculas funcionais. Para amenizar essa perda, o plasma que será destinado à produção de Concentrado de Fator VIII (CFVIII) deve ser congelado à temperatura de menos 18 graus centígrados em até 8 horas após a coleta. Esse plasma recebe o nome de plasma fresco congelado (PFC), possui volume em torno de 200 mL e deve conter pelo menos 40% da concentração inicial de fator VIII, ou seja, pelo menos 80UI de FVIII. Em um litro de PFC, devemos encontrar pelo menos 400 UI de FVIII. Nos processos industriais de fracionamento atualmente existentes, destas 400 UI é possível recuperar-se 50%, ou seja, em torno de 200 UI, o que representa apenas 20% da quantidade de fator VIII presente no plasma circulante.

ANEXO 2

Além desta ineficiência no processo de fracionamento, alguns outros fatores caracterizam esta cadeia produtiva: dificuldades logísticas tanto na obtenção como na conservação da matéria prima e a presença de riscos infecciosos elevados o que obriga o uso de etapas adicionais de inativação viral por técnicas que redundam na redução adicional da concentração final de fator VIII e leva ao encarecimento do produto e às dificuldades de abastecimento.

Para se ter uma ideia aproximada da complexidade envolvida na produção de concentrado de fator VIII a partir do plasma, podemos fazer uma pequena simulação. Para atendermos a demanda atual de 260 milhões de UI de FVIII do Brasil seria necessário o fracionamento de 1,3 milhão de litros de plasma fresco congelado (considerando o rendimentos de 200 UI/litro de PFC[2]). A obtenção de 1,3 milhão de litros de plasma, por sua vez, implicaria na coleta mínima de 6,5 milhões de doações de sangue total em condições ideais para o fracionamento. Para o processamento desta quantidade de plasma, o Brasil teria a necessidade de possuir 3 plantas de fracionamento iguais à que está sendo construída pela

[2] *Estimativa otimista. O plasma brasileiro já fracionado apresentou rendimento de 150 UI/litro de PFC*

Hemobras, com capacidade de processamento industrial de 500 mil litros de plasma/ano e ao custo estimado de US$ 600 milhões/unidade.

Atualmente, o Brasil colhe em torno de 4 milhões de bolsas de sangue total, mas apenas cerca de 200 mil bolsas de plasma fresco congelado, com qualidade para fracionamento industrial, são geradas. O processamento destas bolsas produziria cerca de 6 milhões de UI de FVIII (rendimento do plasma brasileiro é de 150 UIFVIII/L plasma) o que representa apenas 2,3% da demanda atual. A evolução terapêutica necessária para o nível de independência funcional (3 UI per capita – 600 milhões de UI/ano) elevaria a necessidade de fracionamento para 3 milhões de litros (15 milhões de doações de sangue total ou 7 milhões de coletas de plasma por equipamentos de aféreses) e, para o estágio de plena integração (acima de 3 UI per capita – 800 milhões a 1,2 bilhão de UI/ano), elevaria a necessidade de fracionamento para mais de 5,5 milhões de litros de PFC (mais de 22 milhões de doações de sangue total ou 11 milhões de coletas de plasma por aférese). Estes números indicam que a autossuficiência nacional em FVIII derivado do plasma para o tratamento dos hemofílicos brasileiros é um objetivo irreal, tamanhas as dificuldades que se apresentam, tanto logísticas, como financeiras.

Neste contexto, a contribuição das plantas de fracionamento em processo de instalação no Brasil é muito pequena. Considerando que a capacidade nominal dessas plantas é de 650 mil litros de plasma/ano e admitindo-se a recuperação de 50% do fator VIII presente no PFC, ou seja, 200 UI FVIII/L de plasma, essas plantas, quando em operação máxima, gerarão no máximo 98 milhões de UI de fator VIII/ano ou 38% das necessidades atuais ou 16% da demanda de médio prazo. Ressalte-se que o plasma fresco congelado para fracionamento produzido atualmente no Brasil (cerca de 50.000 L) e o plasma previsto para ser gerado em 2012 (500.000 L) é insuficiente para atender à demanda de matéria prima das duas plantas de fracionamento em processo de instalação (Hemobras – 500.000 L; Instituto Butantan – 150.000 L).

ANEXO 2

A quantidade total de plasma fresco congelado para operar estas duas plantas (650.000 L de plasma/ano) exigiria a coleta de 3.250.000 bolsas de sangue total cujo plasma correspondente seria integralmente destinado ao fracionamento. Em tese, a coleta deste montante de plasma não representaria nenhum absurdo visto que o país já colhe cerca de 4 milhões de bolsas de sangue total ao ano. Entretanto, apenas 5% do plasma nacional coletado possui a qualidade necessária para permitir o processamento industrial

Conclui-se, diante do exposto, que a produção de fator VIII da coagulação a partir do fracionamento plasmático não representa solução para a autossuficiência nacional neste insumo. Pelo contrário, representa um investimento elevado (custo estimado em US$ 600 milhões/planta) na compra de uma tecnologia ineficiente e que vem se tornando rapidamente obsoleta. Ressalte-se, por outro lado, que a manutenção dessa tecnologia no presente é

apenas questão comercial e baseia-se inteiramente no fato de que o mercado mundial é dominado por grandes companhias multinacionais que possuem tanto plantas de fracionamento plasmático como de produção de fatores recombinantes e realizam o jogo de acordo com os seus interesses. A companhia Baxter, por exemplo, que domina 30% do mercado mundial de fator VIII produz tanto FVIII derivado do plasma como recombinante. Somente a sua planta de produção de recombinantes situada em Neuchatel, na Suiça, possui capacidade de produção de 4 bilhões de UI de fator rhFVIII/ano o que representa cerca de 50% de demanda mundial atual de fator VIII. Obviamente que o aumento na produção de rhFVIII significaria criar competição com o seu FVIIIDP o que não interessa enquanto houver demanda para esse produto.

O mercado mundial de fator VIII deve atingir 8,1 bilhões de UI em 2012, sendo que o fator recombinante responde por 58% deste total (Figura 3). Em termos financeiros esse mercado representa cerca de 3,5 bilhões de dólares. Mantidas as condições atuais o mercado ainda comportará o fator VIII derivado do plasma que, no entando, depende do retardo na evolução tecnológica do rhFVIII e da aceitação dos pacientes para permanecer viável economicamente.

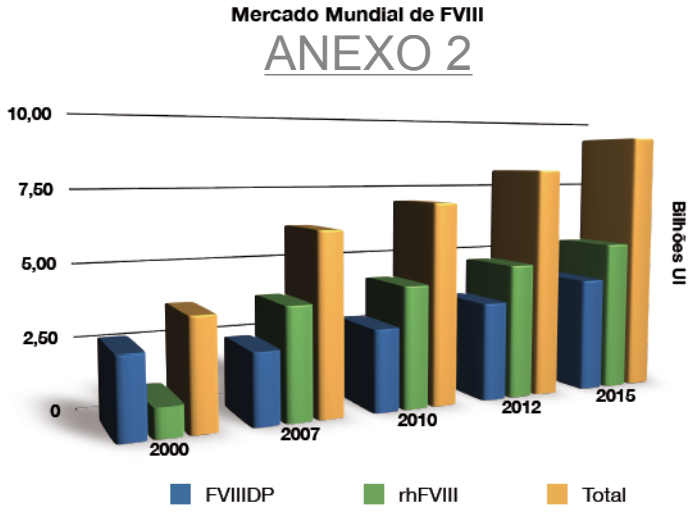


Figura 3. Mercado mundial de fator VIII derivado do plasma e recombinante em bilhões de UI.

As comunidades de pacientes e de médicos têm exercido papel importante neste processo. Assim, por exemplo, o Conselho Científico da Fundação Nacional de Hemofilia dos Estados Unidos da América e a Sociedade Canadense de Hemofilia indicam que o tratamento de escolha para a hemofilia A é a reposição com concentrados de fator VIII recombinantes. Em linha com esta recomendação, observa-se que nos países desenvolvidos o tratamento é feito

predominantemente com fator VIII recombinante, enquanto nos países em desenvolvimento o tratamento é feito com fator VIII derivado do plasma (Figura 4). A recomendação do uso de fator VIII recombinante como primeira escolha terapêutica para a hemofilia A tem sido aceita de forma entusiástica pela comunidade mundial de pacientes hemofílicos que conhece, como ninguém mais, os riscos envolvidos no uso do FVIIIDP.

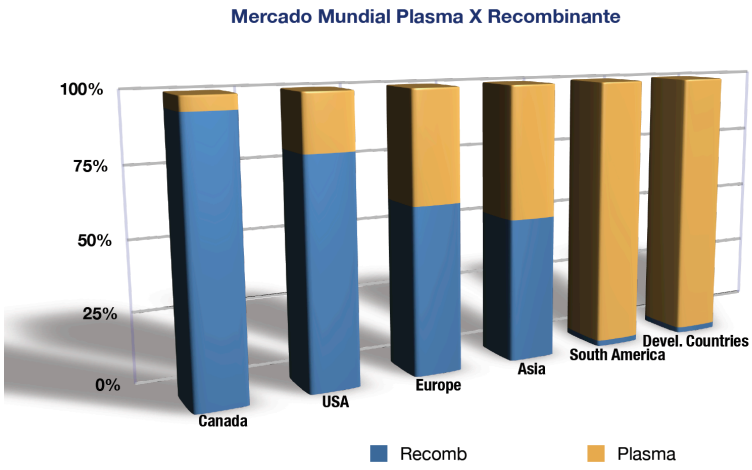


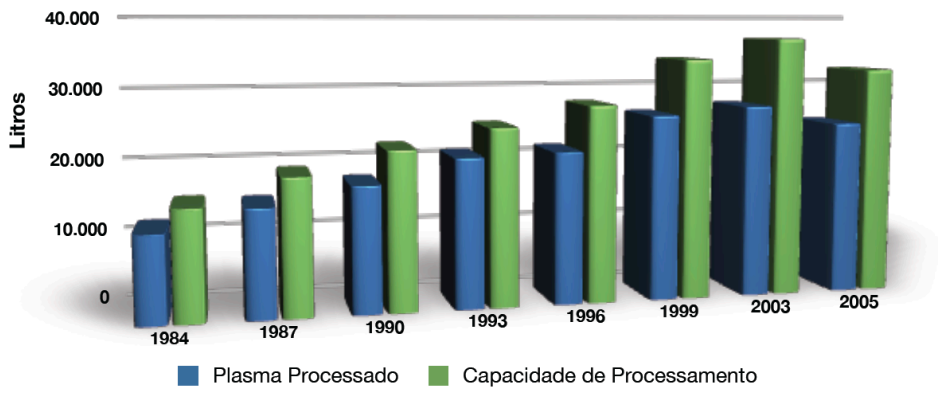
Figura 4. Mercado mundial de fatores de coagulação obtidos do plasma e recombinantes em termos percentuais.

ANEXO 2

O Futuro da Indústria de Fracionamento de Plasma

O ponto mais importante que definiu o perfil atual e o futuro próximo da indústria de proteínas terapêuticas derivadas do plasma foi a introdução no mercado do Fator VIII recombinante (rhFVIII). Até meados da década de 90, a demanda mundial de FVIII dirigia o planejamento da indústria de fracionamento plasmático. Com a introdução do rhFVIII, a indústria sofreu um revés de expectativas e, apesar do aumento da demanda observado em todo o mundo, a indústria diminui paulatinamente a quantidade de plasma processado (figura 5), embora a quantidade anual de FVIIIDP produzida tivesse praticamente se mantido no mesmo patamar. Na década de 2000, a indústria de derivados de plasma passou a ser orientada pela demanda mundial de imunoglobulinas endovenosas que vem aumentado cerca de 7%/ano. Para o ano de 2012, projeta-se a necessidade mundial de 107 toneladas de IgEV. O atendimento a esta demanda somente será possível aumentando-se a quantidade de plasma disponível para o fracionamento que idealmente deveria atingir o patamar de 31 milhões de litros em 2012. Neste novo contexto, a produção de FVIIIDP é considerada apenas como subproduto da purificação de Igs e poderá ou não ser mantida como negócio pela grande indústria de fracionamento na dependência de aspectos comerciais. Considerando a evolução tecnológica dos produtos recombinantes disponíveis atualmente, parece que a tendência atual é o tratamento integral dos hemofílicos com fatores recombinantes; confirmada esta tendência, o FVIIIDP se converterá em um produto sem mercado.

Entretanto, qualquer que seja o cenário mundial, as indústrias de fracionamento plasmático, em instalação no Brasil, não resolverão o problema da demanda nacional de fator VIII. No cenário mais favorável em que ambas as unidades operassem com matéria prima de boa qualidade à plena capacidade, seriam produzidos 98 milhões de UI FVIII, o que seria apenas 16% da necessidades integrais dos pacientes hemofílicos existentes hoje. Em cinco anos, prazo considerado razoável para estas unidades estarem em operação, a população de pacientes hemofílicos e a demanda de fator VIII também serão maiores e a capacidade de atendimento destas unidades será proporcionalmente menor.



ANEXO 2

Figura 5. Capacidade instalada e quantidade processada de plasma pela indústria fracionadora mundial.

No pior cenário para a nascente indústria nacional de processamento plasmático, o FVIIIDP não mais será usado no tratamento da hemofilia A. Isso acontecerá caso ocorra a introdução no mercado de novas moléculas de FVIII recombinates com características moleculares aperfeiçoadas (rhFVIII peguilado, rhFVIII de longa duração, etc.). Nesse caso, o planejamento e os investimentos feitos até agora para a produção nacional de FVIIIDP serão atropelados pela evolução tecnológica e o produto desejado se tornará obsoleto antes mesmo de ser produzido no Brasil.

Esse cenário já se encontra em processo de construção nos países desenvolvidos e o seu embrião já se dissemina pelo mundo todo. A sua adoção é uma questão de tempo e de mercado. Existem aqueles que acreditam que o futuro no tratamento dos hemofílicos será nitidamente distinto entre os países ricos que usarão o rhFVIII e os países pobres que usarão FVIIIDP. Esta estratégia poderá ser mantida por algum tempo pela grande indústria fracionadora que, no momento, possui e controla tanto a produção de FVIIIDP como a de rhFVIII. No médio prazo, no entanto, produtores de rhFVIII independentes ou de produtos tecnologicamente superiores como o rhFVIII peguilhado ou o rhFVIII de longa duração, poderão romper este equilíbrio e colocar na prateleira da história o FVIIIDP. O planejamento

para a produção nacional de FVIIIDP, na minha opinião, deveria ser revisto rapidamente para que o país não corra os riscos apontados acima.

Fator VIII Recombinante

A era do DNA recombinante começou na década de 1970 com a descrição do primeiro plasmídio recombinante funcional. Em 1976, foi fundada, em São Francisco – USA, a Genentech, empresa que produziu a primeira proteína humana recombinante. Em 1982, a insulina foi a primeira proteína humana recombinante a ser comercializada. A corrida pela clonagem e produção do fator VIII humano se iniciou em 1981, com a fundação da companhia Genetics Institute. A clonagem e expressão do gene do FVIII humano ocorreu em 1983 e 1984 e a primeira infusão de rhFVIII em pacientes foi feita em 1987 e descrita na literatura em 1989.

O entendimento do estágio atual da produção de rhFVIII necessita do conhecimento da estrutura básica do gene e da molécula do FVIII. O gene do fator VIII está localizado próximo à extremidade do braço longo do cromossomo X, possui extensão de 186 kb, sendo um dos maiores genes conhecidos; sua estrutura compreende 26 exons que variam em tamanho de 60 pb a 3106 pb e íntrons que chegam a possuir 32.4 kb. O gene do FVIII é transcrito em um mRNA de cerca de 9.000 pb que, por sua vez, sintetiza uma proteína de cadeia única de 2351 aa que é secretada após sofrer glicosilação e processamento N-terminal. A proteína madura possui 2332 aa organizados em 6 domínios denominados A1, A2, B, A3, C1 e C2 (Figura 6). Subsequentemente, esta proteína é processada para originar a forma ativa que é composta por duas cadeias: a cadeia pesada com PM entre 90 e 210 kD e a cadeia leve com 80 kD. O domínio B não participa da molécula funcional. Em circulação este complexo se liga ao fator de von Willebrand que é responsável pela sua estabilização e meia vida circulante de 12 horas. O FVIII é produzido principalmente nos hepatócitos e em células endoteliais.

ANEXO 2

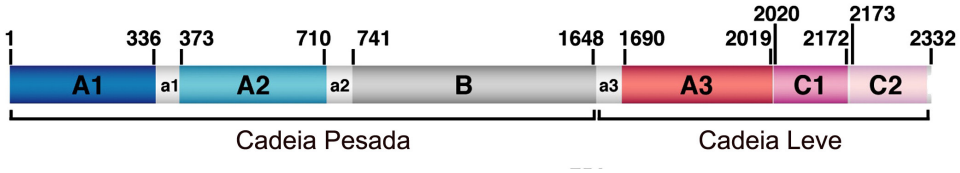


Figura 6. Estrutura da proteína primária do FVIII e os seus diversos domínios.

Em decorrência do tamanho da molécula e da complexidade das modificações pós-traducionais requeridas para a geração de moléculas funcionais, a produção de rhFVIII somente foi possível, até o momento, em sistemas celulares de mamíferos. Dois sistemas celulares foram e são extensivamente usados para este fim: células CHO (Chinese Hamster Ovary cells) e células BHK (Baby Hamster Kidney).

Estes dois tipos celulares são capazes de expressão elevada, produzem modificações pós-traducionais similares às que ocorrem em células humanas e são passíveis de escalonamento em biorreatores de grande volume.

Os concentrados de rhFVIII disponíveis no mercado são habitualmente classificados em gerações. A primeira geração de produtos compreende as moléculas recombinantes integrais do FVIII produzidas em sistemas celulares que empregam soro bovino fetal no cultivo e a albumina humana como estabilizador na formulação final. A segunda geração compreende os produtos que contêm moléculas integrais ou moléculas com o domínio B deletado que foram produzidos em culturas com albumina humana ou outra proteína derivada do plasma, mas cujo produto final é estabilizado por sacarose e não contém proteínas plasmáticas humanas. A terceira geração compreende os produtos com moléculas integrais ou B-deletadas que foram expressos em sistemas de cultivo livres de soro seja animal ou humano e não contém estes produtos na formulação final. Recentemente apareceu a quarta geração que compreende produtos que atendem aos requisitos da terceira geração mas que são produzidos em sistemas celulares humanos. Na tabela 2, encontramos um resumo dos rhFVIII aprovados para comercialização até o momento ou em desenvolvimento.

Tabela 2. Concentrados de rhFVIII disponíveis no mercado ou em desenvolvimento.

Geração	Molécula/célula	Produto	Fabricante	Estabilizador	Produto animal ou humano
1ª.	Íntegra	Recombinate	Baxter	Albumina	SBF/Albumina
2ª.	Íntegra	Helixate Kogenate FS	Bayer Bayer	Sacarose Sacarose	Proteínas Plasma Proteínas Plasma
	B-deletado	ReFacto	Wyeth	Sacarose	Albumina
3ª.	Íntegra	Advate	Baxter	Trealose e Manitol	Isento
	B-deletado	Xyntha	Wyeth	Sacarose	Isento
4ª.*	Integra/células humanas	Human-cl-rhFVIII	Octapharma	?	Isento

* - Produto em estudo clínico fase II.

ANEXO 2

A Produção de rhFVIII

O processo de produção de rhFVIII tem mais de 20 anos de otimização. Os princípios básicos de produção são os mesmos entre as diversas plantas industriais e envolve seis passos principais:

1. Otimização do Sistema de Expressão – tipo de construção, molécula íntegra ou B-deletada; tipo celular a ser usado, etc.
2. Formação do Banco Mestre de Células ou Arquivo Mestre – compreende o armazenamento de um lote de células modificadas geneticamente e que serão usadas como Banco original do qual todos os demais Bancos de Células serão derivados. O Arquivo Mestre não deve ser manipulado a não ser para recuperação da linhagem original e para futuros controles.
3. Formação dos Bancos de Trabalho – culturas celulares derivadas do Mestre e que são expandidas lentamente até atingir as concentrações ideais para inóculo nos biorreatores de grande volume (1.000 L ou mais).
4. Otimização do meio de cultivo – meio livre de soro animal ou humano.
5. Sistema de Cultivo – tipo de biorreator e modo de operação que será usado (batelada, batelada-alimentada, perfusão)
6. Purificação, concentração do produto, inativação viral e formulação final – o produto é purificado e concentrado para sofrer o processo final de formulação. Nesta fase pode ocorrer, por exemplo, a concentração de 7 L de sobrenadante celular para cerca de 1 L. Neste volume final, são aplicadas as etapas de inativação viral e envase.

Vantagens do rhFVIII

ANEXO 2

As principais vantagens do rhFVIII em relação ao FVIIIDP são:

1. Elevada Capacidade Produtiva

   As células geneticamente modificadas para expressar o rhFVIII são capazes de expressar grandes quantidades de FVIII em pequenos volumes. Assim, por exemplo, uma linhagem celular capaz de produzir 1 UIFVIII/mL (produção considerada baixa em termos de proteínas recombinantes) geraria 1 L de sobrenadante celular contendo 1000 UIFVIII que é a mesma concentração observada no sangue circulante contendo 60% a mais de FVIII em relação ao plasma fresco congelado (PFC). Admitindo-se recuperação mínima de 50% no processo de purificação obteríamos 500 UI FVIII/L o que é três vezes mais do que se tem obtido com o plasma.

   No processo de escalonamento, se usássemos um biorreator operado em perfusão de 20L com capacidade de gerar 5 volumes de reator/dia, ou seja, 100 L/dia e considerando que a produção neste sistema, em função da alta concentração celular passaria a ser 3 UI/mL, obteríamos 300.000 UIFVIII a cada 24 h. Considerando um ciclo de operação de 60 dias, obteríamos no final do período 18.000.000 UIFVIII e 9.000.000 UIFVIII purificadas. Esta quantidade seria suficiente para atender cerca de 180 pacientes/ano na dose de 50.000

UI/paciente/ano. Passando para uma escala comercial, se usássemos um biorreator de 100L com geração de 10 volumes reator/dia e 4 ciclos anuais de 80 dias cada, produziríamos 480.000.000 UIFVIII purificadas. Esta quantidade seria 6,4 vezes maior do que a produção anual da planta de fracionamento da Hemobras (75.000.000 UIFVIII/ano), custaria menos de 1/10 do investimento previsto, e atenderia 100% da necessidade nacional na demanda de 2UI per capita.

2. Segurança

A segurança, com relação a agentes infecciosos, dos produtos recombinantes é muito maior em comparação com o FVIIIDP. Considerando que o rhFVIII é produzido *in vitro*, em linhagens celulares livres de qualquer contaminante, seja viral ou bacteriano, a sua segurança é máxima. O risco de transmissão de HIV, HCV, HBV, HAV, Parvovírus B19, Vírus da Dengue, Vírus do Oeste do Nilo, príons, etc. para os recombinantes de 3ª. e 4ª. geração é praticamente zero. A segurança é monitorizada a cada passo da produção. Ao contrário do FVIIIDP, que parte de "pools" de plasma de milhares de doadores, e que deve, a rigor, ser considerado contaminado por doadores em período de janela imunológica ou por agentes infecciosos que não são testados, o rhFVIII parte de inóculos celulares e de meios de cultura isentos de agentes infecciosos contaminantes. Não bastasse esta diferença fundamental, o rhFVIII ainda sofre processo de inativação viral e filtração que tornam o produto recombinante redundantemente seguro.

ANEXO 2

3. Evolução Molecular

O rhFVIII é uma molécula projetada e neste sentido pode evoluir e incorporar modificações na sua estrutura para tornar-se terapeuticamente mais efetiva. Esta é, sem dúvida, a grande vantagem competitiva que tornará obsoleto o uso do FVIIIDP. Inúmeros são os desenvolvimentos em andamento no momento e descreverei apenas os mais importantes e que tenham impacto na evolução do tratamento para a hemofilia A. Atualmente, os esforços de aperfeiçoamento molecular do FVIII se concentram em três objetivos:

a) Aumentar a meia-vida do FVIII em circulação;
b) Diminuir a imunogenicidade;
c) Aumentar a atividade pró-coagulante por unidade de massa.

3.1 Aumentar a meia-vida do FVIII em circulação

O prolongamento da meia-vida do FVIII poderá reduzir a dose e a frequência das administrações o que permitirá a melhoria da eficácia e da aderência ao tratamento com consequente melhora da qualidade de vida dos pacientes.

As estratégias mais promissoras que estão sendo testadas incluem a peguilação, a adição de ácidos polisiálicos e a produção de proteínas fundidas.

Peguilação

O polietileno glicol (PEG), quando ligado à proteína, produz a incorporação de moléculas de água levando ao aumento do tamanho da molécula que se torna mais resistente aos mecanismos de eliminação e consequentemente permanece mais tempo em circulação. Várias drogas peguiladas são de uso clínico rotineiro.

A peguilação como modificação capaz de estender a meia-vida do FVIII é assunto de grande interesse científico e comercial. A peguilação habitual de resíduos lisina ou da amina N-terminal, no entanto, não tem sido satisfatória em relação ao FVIII, visto que diminui a atividade específica e interfere com a ligação da molécula com o fator de von Willebrand. A estratégia mais promissora compreende a criação de sítios específicos de peguilação na superfície da molécula de FVIII o que determina aumento da meia-vida sem interferir na função da proteína. Moléculas com esta configuração estão sendo avaliadas em estudos clínicos.

ANEXO 2

Polisialização

A adição de ácido polisiálico (PSA) também promove aumento do tamanho da proteína e é alternativa interessante ao processo de peguilação. A vantagem da polisialização é que se trata de mecanismo natural que ocorre em abundância na superfície de células e em proteínas e portanto sem consequências biológicas adversas.

Geração de Proteínas Híbridas

A estratégia aqui envolve a fusão da molécula do FVIII com a albumina ou com o fragmento Fc de imunoglobulinas. O objetivo é aumentar a meia-vida aproveitando-se da resistência da albumina e do Fc em circulação onde apresentam meia-vida em torno de 25 dias. Proteínas fundidas FVIII-FcIg estão sendo submetidas a ensaios clínicos.

3.2 Diminuição da Imunogenicidade do FVIII

Uma das complicações mais frequentes e importantes do tratamento da hemofilia A é o aparecimento de inibidores, ou seja, de anticorpos autólogos dirigidos contra epítopos da molécula de FVIII. Cerca de 25% dos pacientes com hemofilia A submetidos a

tratamento desenvolvem inibidores e, como consequência, ocorre redução da eficácia do tratamento de reposição do fator VIII.

A maior parte dos inibidores tem como alvos epítopos situados nos domínios A2 e C2 da molécula de Fator VIII. Estes inibidores não reagem com o Fator VIII porcino que aparentemente não é imunogênico para o homem. Esta última observação tem levado ao desenvolvimento de moléculas híbridas humanas-porcinas de fator VIII, ou mesmo ao desenvolvimento de moléculas recombinantes porcinas com o objetivo de tratar os pacientes com inibidores em altos títulos.

3.3 Aumentar a Atividade Pró-coagulante do FVIII

O aumento da atividade pró-coagulante pode ser obtido aumentando-se a eficiência da ativação ou modificando a molécula de fator VIII de forma a torná-la resistente à inativação. Estas duas estratégias têm sido testadas promovendo-se mutações sítio-dirigidas nos locais onde ocorre a atuação das enzimas proteolíticas responsáveis pela ativação e pela inativação do fator VIII.

Todos estes desenvolvimentos estão na ordem do dia das empresas produtoras de rhFVIII e muitos já se encontram em fase de estudos clínicos (Tabela 3). É questão de tempo para que estas moléculas aperfeiçoadas de FVIII venham a substituir integralmente os tratamentos disponíveis hoje para a hemofilia A, principalmente o FVIIIDP.

ANEXO 2

Tabela 3. Produtos em desenvolvimento para o tratamento da hemofilia A

Companhia	Estratégia	Fase do Desenvolvimento
Bayer/Zilip pharma	FVIII com lipossomo peguilado	Fase II
Bayer	FVIII-BD peguilhado e mutante Cys	Pré-clínica
Baxter/Nektar	Peguilação ao acaso	Pré-clínica
Baxter/Nektar	Peguilação transiente	Pré-clínica
Baxter/Lipoxen	FVIII polisializado	Pré-clínca
Baxter/Flamel	FVIII formulado com polímero de ácido glutâmico	Desenvolvimento
Biogen-IDEC/Biovitrum	FVIII:Fc fusionadas	Pré-clínico
Biogen-IDEC/Biovitrum	FIX:Fc fusionadas	Fase I
CSL-Behring	FVIII com domínio B substituído por albumina	Pré-clínico
Novo Nordisk	FVIIa glico-peguilado	Fase I
Novi Nordisk	FIX glico-peguilado	Fase I
Novo Nordisk	FVIII peguilado	Pré-clínico
Octapharma	rhFVIII de quarta geração	Fase I e II

Fator VIII da Coagulação

Desenvolvimento da Indústria Nacional de Biofármacos e a Produção de rhFVIII

Nos últimos anos, mais de 100 drogas produzidas por biotecnologia foram aprovadas para uso clínico, o que gerou um mercado de 50 bilhões de dólares em 2005. Estima-se a existência mundial de mais de 4.000 companhias de biotecnologia e de mais de 400 novas drogas biotecnológicas em fase de estudos clínicos.

A indústria de biofármacos nacional é incipiente. Embora identificada como área estratégica a ser apoiada, não existe nenhuma iniciativa de grande porte no sentido de instalar uma indústria nacional forte e competitiva na área de biotecnologia voltada para a saúde humana. Iniciativas isoladas, localizadas nas Universidades e nos Institutos de Pesquisa, existem há mais de uma década, mas não se tem notícia de que alguma foi efetivamente bem-sucedida e transferida para o setor produtivo.

Com relação ao desenvolvimento de rhFVIII, o cenário não é diferente.

Experiência do Hemocentro de Ribeirão Preto no desenvolvimento de um fator VIII recombinante

O Hemocentro de Ribeirão Preto, ligado ao Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, possui, desde 1998, uma linha de P&D voltada especificamente para o desenvolvimento de fatores da coagulação humana produzidos por técnicas do DNA recombinante.

ANEXO 2

O ciclo tecnológico completo para a produção de uma proteína recombinante envolve, de maneira geral, 4 etapas:

1. Clonagem e construção de molécula recombinante;
2. Geração de linhagens celulares geneticamente modificadas para expressar a proteína de interesse em níveis elevados;
3. Adaptação das linhagens geradas para o cultivo em biorreatores de perfil industrial;
4. Purificação e formulação das proteínas produzidas para o uso desejado.

Destas quatro etapas, o Hemocentro de Ribeirão Preto completou integralmente as três primeiras e, no momento, procura parceiros qualificados para o desenvolvimento da etapa de número quatro. Segue um breve relato dos objetivos alcançados pelo Hemocentro em cada uma das etapas apontadas.

Etapa 1 – Construção das moléculas de DNA recombinante contendo os genes dos fatores VIII e IX.

Até o momento foram geradas mais de duas dezenas de moléculas de DNA recombinante contendo genes íntegros ou modificados dos fatores VIII e IX da coagulação. Estas moléculas foram inseridas em vetores apropriados (virais e não-virais) que, na sequência, foram usados para transfectar células de mamíferos (humanos e não-humanos) para se testar a efetividade da expressão proteica dos respectivos fatores.

Etapa 2 – Geração de linhagens celulares produtoras dos fatores recombinantes da coagulação

Nesta etapa, células de mamíferos não-humanos (CHO) e humanos (HepG2, SkHep, HEK293, HEK293T e Hepa1-6) foram transfectadas com os vetores produzidos na etapa 1 para a geração de linhagens celulares recombinantes produtoras dos fatores VIII e IX da coagulação.

Foram geradas mais de 40 linhagens celulares que foram avaliadas quanto à capacidade produtiva dos fatores VIII e IX. As linhagens mais produtivas foram selecionadas para a fase 3. Para o fator VIII, a linhagem mais produtiva foi uma SkHep modificada com um cassete de expressão que continha o gene do fator VIII sem o domínio B e sob o controle de um promotor do citomegalovírus (SkHepCMVFVIIIBdel).

Etapa 3 – Adaptação da linhagem SkHepFVIIIBdel para o crescimento em biorreatores de 2 litros

ANEXO 2

A linhagem SkHepCMVFVIIIBdel, selecionada por apresentar elevada expressão do FVIII em cultivo estático (garrafas de cultura) e em aderência ao plástico, foi submetida ao processo de adaptação para crescimento em suspensão em biorreatores com capacidade de 2 litros. No final do processo, obteve-se uma linhagem adaptada com capacidade de produção de 2,5 UIFVIII/10E6/24horas. Este fator foi parcialmente purificado, caracterizado funcionalmente e testado em termos de efetividade em camundongos hemofílicos A, mostrando-se tão efetivo quanto o FVIII derivado do plasma no controle dos sangramentos induzidos nestes animais. Na figura 6, podemos observar dois tipos de biorreatores que estão sendo usados para a produção dos fatores recombinantes VIII e IX da coagulação.

Biorreator Celligen 2L
Marca New Brunswick

Biorreator tipo Spinner 500mL
Marca Wheaton

Figura 6. Biorreatores usados no Hemocentro de RP para a produção dos fatores recombinantes VIII e IX.

Etapa 4 – Purificação e formulação do FVIII recombinante produzido

No momento, possuímos capacidade de produção de 5 a 10 litros de perfusato de cultivo contendo FVIII recombinante na concentração de 2500 UI/L. A próxima etapa envolve a purificação deste produto em condições GMP para a geração de lotes que possam ser empregados em estudos clínicos de fase I. O parceiro ideal para esta empreitada seria o Instituto Butantan que possuí experiência na formulação de proteínas para uso terapêutico.

Avaliação Crítica do Processo e do Produto gerado

O fator VIII recombinante produzido no Hemocentro de Ribeirão Preto apresenta vantagens competitivas em relação aos produtos similares disponíveis no mercado:

1. É produzido em células humanas ao contrário dos demais que são produzidos em células de Hamster.
   O padrão de glicosilação e de processamento da proteína gerada em células humanas é semelhante à sofrida pela proteína nativa o que não ocorre com as proteínas produzidas em células CHO e BHK.

ANEXO 2

2. As células humanas usadas na produção (SkHep) também produzem o fator de von Willebrand que é o fator estabilizador natural do FVIII em circulação. Esta característica confere ao rhFVIII produzido no Hemocentro maior estabilidade durante o processo produtivo.

3. A quantidade de fator VIII recombinante obtido por mL/10E6 células/24h é elevada (2,5 UI) em relação ao descrito na literatura. Esta produtividade elevada permitirá otimização do processo produtivo com economia e maior rendimento. À guisa de exemplo, com um biorreator de com capacidade de produção de 1.000 L de sobrenadante/dia operando em ciclos de 80 dias (3 ciclos ao ano) poderia ser produzido 200 milhões de UI FVIII por ciclo ou 600 milhões de UI FVIII por ano, o que significaria que um único biorreator de 1.000 litros com capacidade de produzir 1000L de sobrenadante/dia (considerando um biorreator pequeno) produziria o montante de fator VIII suficiente para atender todos os hemofílicos A brasileiros no nível de 3 UI per capita (vide tabela 1), ou seja, no nível capaz de produzir independência funcional.

O investimento necessário para colocar uma unidade produtora de recombinantes de grande porte (Biorreatores de 6.000 a 10.000 L) em funcionamento situa-se em torno de 60 milhões de dólares o que representa apenas 10% do que está sendo investido na fábrica da

Hemobras. Uma planta desse porte atenderia toda a demanda nacional e transformaria o país em exportador de fator VIII de quarta geração com nítida vantagem competitiva sobre os concorrentes multinacionais.

Em conclusão, este relatório confidencial apresenta informações críticas a respeito da situação atual e futura da produção de fator VIII da coagulação no Brasil. Nele são apontadas claramente as deficiências do planejamento atual e as possíveis rotas de equacionamento do problema no médio e longo prazo. O Hemocentro de Ribeirão Preto desenvolveu e domina parte crítica da tecnologia de produção de fatores recombinantes da coagulação. Este desenvolvimento tecnológico está disponível para o Governo do Brasil que poderá apoiá-lo e iniciar o desenvolvimento de um polo pioneiro para produção de biofármacos que terão papel central na saúde do século XXI.

Dimas Tadeu Covas, M.D., PhD.
Professor Titular em Hematologia e Hemoterapia
Universidade de São Paulo
dimas@fmrp.usp.br

ANEXO 2