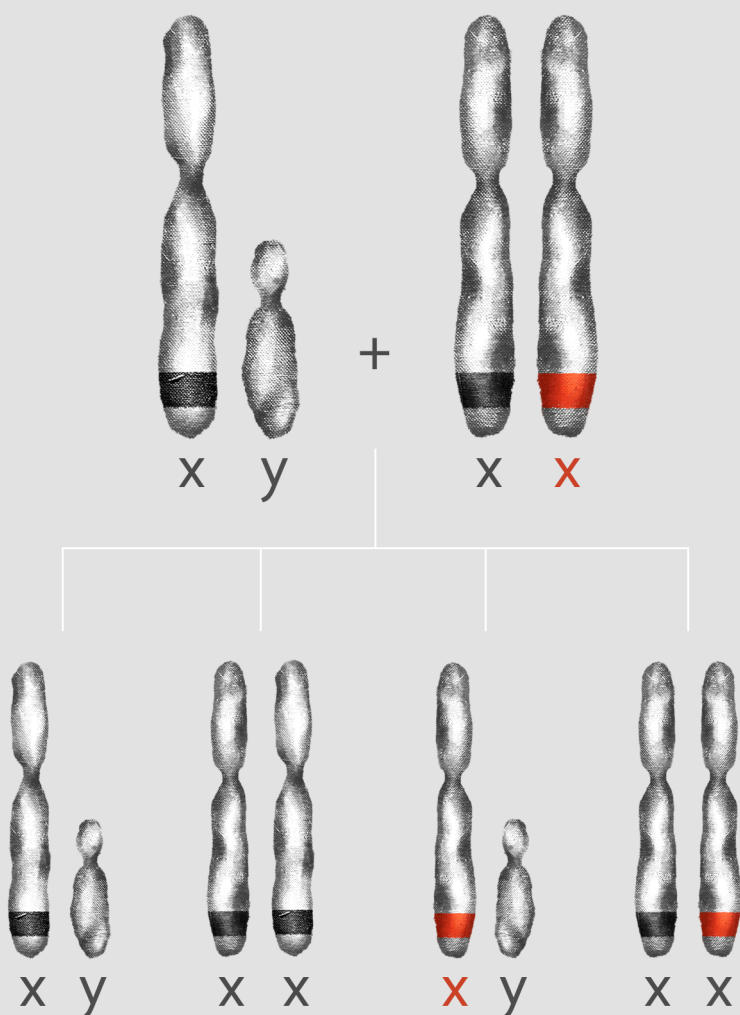


GUÍA BÁSICA *de* HEMOFILIA

Manifestaciones clínicas,
diagnóstico y tratamiento



ANTONIO LIRAS

Doctor en Farmacia y Licenciado en Ciencias Químicas por la Universidad Complutense de Madrid, Antonio Liras (Segovia, 1955) ha dedicado más de treinta años a la docencia universitaria y a la investigación. El largo camino que le ha traído hasta aquí tiene su punto de partida en el Instituto Neurológico Carlo Besta de Milán (Italia) donde se inició en protocolos de Terapia Génica.

Actualmente es Coordinador del Grupo UCM de Terapias Avanzadas génica y celular, es miembro de distintas sociedades y comités científicos nacionales e internacionales, pertenece al Comité Asesor Médico de la Federación Española de Enfermedades Raras y es Patrono de la Real Fundación Victoria Eugenia, de cuya Comisión Científica fue Presidente. Su labor se ha traducido en la organización de cursos de especialización y postgrado, en el desarrollo de varios proyectos de investigación financiados a nivel nacional e internacional, dirección de varias tesis doctorales, y en la publicación de más de 50 artículos en revistas con índice de impacto internacional, varios libros científicos y multitud de ponencias en congresos científicos. Ha recibido también varios premios científicos de investigación.

El Dr. Liras colabora desde hace unos años con la Asociación Andaluza de Hemofilia de la cual es socio colaborador. Asanhemo siempre ha destacado y valorado en él su interés, sensibilidad y apoyo no solo a asociaciones sino de forma muy especial a personas que padecen hemofilia u otras coagulopatías congénitas.

GUÍA BÁSICA
de
HEMOFILIA

Manifestaciones clínicas,
diagnóstico y tratamiento

Primera edición en abril de 2015

Autor: Dr. Antonio Liras
Profesor de Fisiología, Universidad Complutense de Madrid, Spain

Traducción: Alejandro Caffarini
AC Intérprete de Conferencias, S.L.

Diseño e ilustración: *Daniel Belchí* (danielbelchi.es)

Impresión: *Imprenta Pruna S. C.*

© 2015 ASANHEMO (Asociación Andaluza de Hemofilia)
C/ Castillo Alcalá de Guadaíra, 7 – 4º A, 41013 – Sevilla

ISBN: 978-84-606-7268-5

ÍNDICE

Prefacio	4
La sangre y su función	5
¿Qué es la hemofilia? Causas, tipos, síntomas clínicos y transmisión hereditaria	9
Hemofilia adquirida	16
Tratamiento de la hemofilia	18
Efectos adversos del tratamiento en hemofilia	26
Inhibidores en hemofilia	26
Protocolos para el “borrado” de inhibidores. Inducción de inmunotolerancia	30
Efectos secundarios del tratamiento de la hemofilia: Infecciones virales y emergentes	31
Tratamientos biotecnológicos y Terapias Avanzadas	36
Factores recombinantes ¿El tratamiento más seguro?	36
Nuevos factores recombinantes	40
Terapias Avanzadas en hemofilia	40
Para más información	46

PREFACIO

A pacientes con hemofilia, sus familias y a su entorno, a todos ellos, va destinada esta guía que persigue un objetivo educativo y de información fundamental: ofrecer unos conceptos básicos que ayuden a entender poco a poco avanzando en su lectura y con sus ilustraciones, las funciones de la sangre, del sistema que la pone en circulación por nuestro cuerpo y de lo que sucede cuando algo falla.

La guía se estructura en cuatro partes. Una primera dedicada a conceptos elementales que ayudan a entender qué es la sangre y cuál su función. Este inicio de la guía está pensado y escrito como base para una mejor comprensión de todo lo que se irá encontrando el lector a lo largo de ella. Una segunda parte se detiene en abordar qué es la hemofilia, sus causas, tipos, síntomas clínicos y su transmisión hereditaria. Tras este bloque se llega al tratamiento de la enfermedad, los posibles efectos adversos del tratamiento, inhibidores y efectos secundarios del tratamiento de la hemofilia como son las infecciones virales y emergentes. Por último, la parte más actual, prometedora y esperanzadora para cualquier paciente crónico que depende de un tratamiento, la puesta al día de los tratamientos biotecnológicos y terapias avanzadas.

Con el fin de ayudar e incrementar su difusión y carácter internacional casi sin fronteras, la guía se edita en formato de impresión reversa, en dos idiomas conjuntamente, castellano e inglés.

Ha sido editada y promovida por la Asociación Andaluza de Hemofilia en su interés por la labor formativa, con el consenso de un equipo de personas que, de forma altruista, dedica su ilusión, ánimo y parte de su tiempo a la mejora del colectivo de personas que padece hemofilia

Lola Camero

Presidenta de la Asociación Andaluza de Hemofilia

LA SANGRE Y SU FUNCIÓN

La sangre es un tejido líquido que recorre, por la fuerza impulsora del corazón, el organismo a través de los vasos sanguíneos y gracias a ella funcionan todos los órganos del cuerpo. Se impulsa a través de grandes vasos que son las arterias que van ramificándose para formar un árbol de vasos sanguíneos progresivamente más pequeños hasta llegar a cientos de millones de capilares que irrigan todas las células vivas del organismo, y de aquí retorna de nuevo a través de las venas hacia el corazón.

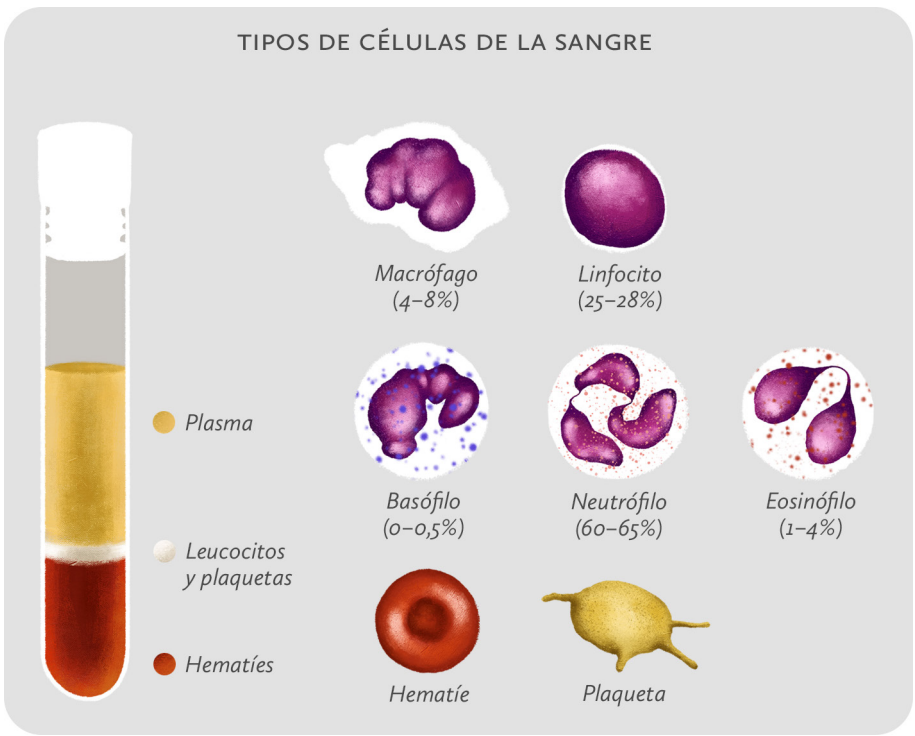
Pero, ¿para qué sirve la sangre? Es un fluido que permite la comunicación dentro de un ser vivo; así, sustancias vitales fabricadas en algún órgano en concreto viajan por la sangre hasta las distintas células para que éstas puedan nutrirse y reconocer una determinada situación fisiológica y lo que necesita nuestro organismo en un momento determinado. Por ejemplo, tras la digestión de una comida, los vasos que irrigan el aparato digestivo absorben los nutrientes obtenidos de los alimentos. De la misma manera, en los pulmones, los glóbulos rojos se llenan de oxígeno mediante un intercambio de gases, y esta sangre rica en oxígeno y nutrientes es distribuida a todos los puntos del organismo, es decir, a todas las células que componen cada tejido, a todos los tejidos que componen los órganos y a todos los órganos que componen cada sistema. Los nutrientes y el oxígeno son todo lo que necesitan las células para vivir, crear energía y mantener en equilibrio todas las funciones vitales. Este proceso, llamado metabolismo celular, crea desechos que los recoge la sangre y los transporta al hígado para depurarlos o bien directamente al riñón para eliminarlos.

La sangre está formada por una parte líquida que es el plasma y otra sólida que son las células sanguíneas. En la parte celular, se encuentran los eritrocitos o glóbulos rojos, los leucocitos o glóbulos blancos y las plaquetas o trombocitos. Los eritrocitos son los más numerosos con diferencia. Poseen millones de moléculas de hemoglobina que confiere el color rojo a la sangre. Debido a su estructura es capaz de combinarse con el oxígeno, capacitando al eritrocito para transportar oxígeno a los tejidos de todos los órganos, función primordial de la sangre.

Por otro lado, existen varias clases de leucocitos, muchos ellos implicados en la defensa inmunitaria para superar las infecciones, siendo los más abundantes los neutrófilos seguidos de los linfocitos.

Los neutrófilos son células fagocíticas, es decir, poseen la capacidad de fagocitar o ingerir moléculas extrañas, tales como microorganismos patógenos o no patógenos, de tal forma que los destruyen por digestión. Esta capacidad está presente desde el nacimiento de un ser vivo mientras que los linfocitos, tras una primera exposición previa a patógenos específicos, confieren al individuo la capacidad de defensa frente al mismo, creando anticuerpos. Esta doble protección inmunitaria, la innata (con la que nacemos) y la adquirida (cuando nos infectamos), actúan de forma coordinada para combatir cualquier infección.

La última fracción celular es la compuesta por las plaquetas o trombocitos, que como bien indica su nombre, participan en la coagulación sanguínea produciendo trombos o coágulos. Son muy pequeñas, ya que en realidad son fragmentos celulares procedentes del citoplasma de una célula madre y constituyen la mayor parte del coagulo que se forma para evitar las pérdidas de sangre en caso de una lesión vascular por heridas tanto externas como internas.



Las células sanguíneas necesitan renovarse constantemente ya que después de días o meses, envejecen y son destruidas, por lo que existe una formación continua de éstas en la médula ósea a través del proceso llamado hematopoyesis. En la médula de los huesos es donde se encuentran las células madre de cada uno de los tres tipos celulares mencionados, y que sufren un proceso de diferenciación hasta dar lugar a células funcionales para después liberarlas al torrente sanguíneo.

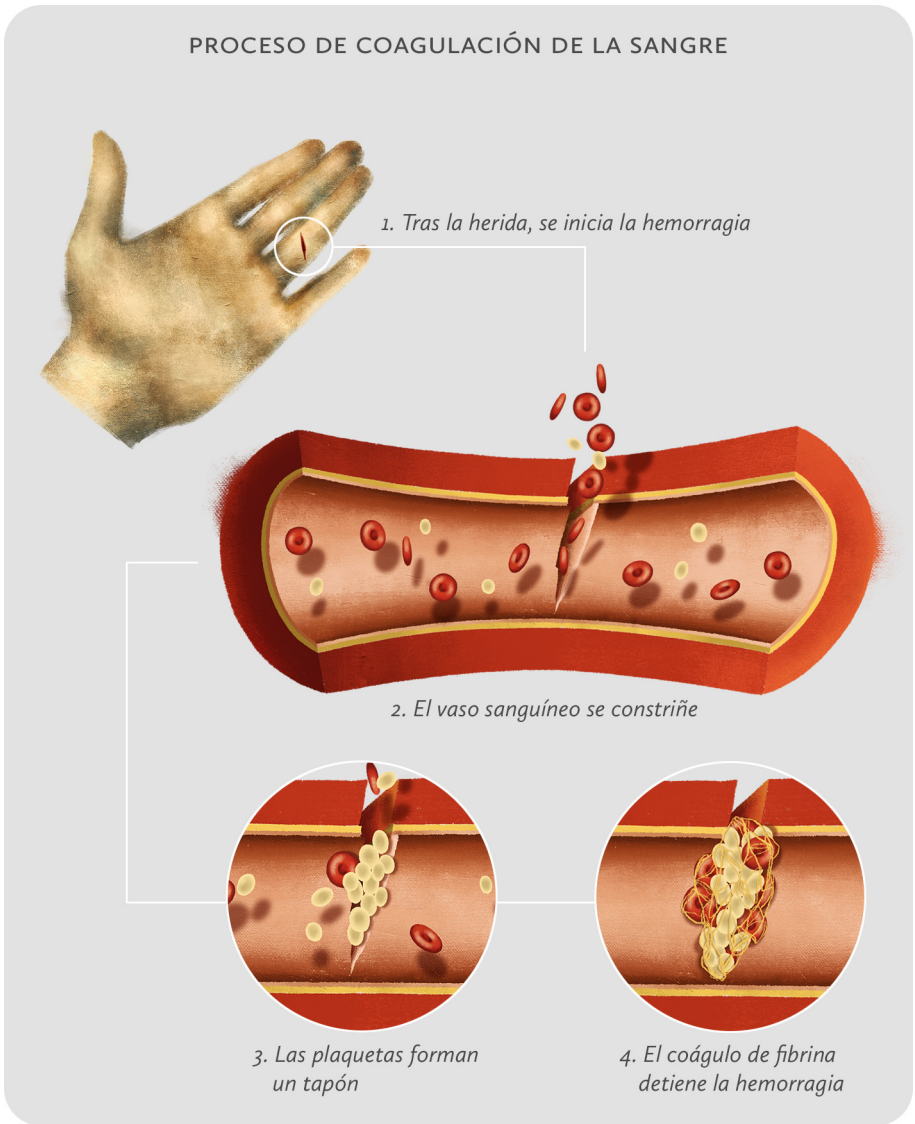
Por otro lado, el plasma o la fracción líquida de la sangre contiene diferentes tipos de proteínas y muchas moléculas solubles en agua como azúcares, hormonas, enzimas, anticuerpos y otras proteínas como la albúmina, las globulinas y el fibrinógeno.

Cuando se produce la pérdida de este preciado líquido que es la sangre desde los conductos o vasos sanguíneos hacia el exterior se dice que hay una hemorragia. La falta de sangre circulante determinará una mala circulación y provocará una insuficiencia del aporte de oxígeno a los tejidos (anoxia) apareciendo los síntomas característicos como la palidez, sudoración general, náuseas, vómitos, desvanecimiento, calambres, etc. Los tejidos pueden llegar a lesionarse y sufrir secuelas irreversibles, e incluso llegar a la muerte. De aquí la gran importancia de las transfusiones sanguíneas.

Cuando se lesiona un vaso sanguíneo, se activan determinados mecanismos fisiológicos que intentan detener la hemorragia y es lo que se denomina, en general, hemostasia. La rotura del vaso deja expuestas proteínas de colágeno como componente que es de las paredes vasculares, marcando este hecho el inicio de tres mecanismos hemostáticos independientes pero superpuestos: la vasoconstricción, la formación del tapón plaquetario, y la coagulación de la sangre mediante la producción de una malla de fibrina (trombo rojo) que envuelve al tapón plaquetario. En ausencia de daño vascular (revestimiento intacto de los vasos), las plaquetas se repelen entre sí pero con la lesión vascular el colágeno de las paredes del vaso queda expuesto y las plaquetas se unen a él. Las plaquetas contienen unos gránulos en su interior que se liberan cuando éstas se adhieren al colágeno, secretando así sus productos que, por un lado, estimularán la vasoconstricción (estrechamiento) del vaso dañado que ayuda a disminuir el sangrado y, además, atraerán, al volverse pegajosas, a otras plaquetas que se adherirán a su vez a las que ya estaban pegadas al colágeno. Estas últimas al adherirse liberarán más gránulos y, así sucesivamente. Esto produce un tapón plaquetario (trombo blanco) en el vaso lesionado, que resulta fortalecido por una malla o red de fibras de una proteína insoluble que es la fibrina y que se produce a partir del fibrinógeno. Así, los coágulos sanguíneos contienen plaquetas y fibrina, y habitualmente también glóbulos rojos atrapados que confieren al coágulo su color rojo. Finalmente, la contracción de la masa plaquetaria forma un tapón más compacto y eficaz que, si la hemorragia es leve, evitará el sangrado.

¿Cómo consigue el fibrinógeno convertirse en fibrina? Aquí entran

en juego los factores de la coagulación que circulan por la sangre. El propio fibrinógeno es un factor más de la coagulación pero necesita de otros doce factores para transformarse en fibrina. En la lesión vascular, los fosfolípidos de la pared vascular dañada que se liberan junto con el colágeno, activan a un primer factor de la coagulación. Éste activa a un segundo factor de la coagulación que a su vez activa a un tercero, y así sucesivamente, estableciéndose una cadena en cascada de activaciones sucesivas que culmina con la activación del fibrinógeno para formar fibrina.



La ausencia o disminución de cualquiera de estos factores, como ocurre en la hemofilia, rompe la cadena de reacciones, imposibilitando la producción de fibrina que es necesaria para estabilizar un coágulo. Por el contrario, un aumento excesivo de factores de la coagulación provocaría que la sangre perdiese su fluidez y no pudiese circular adecuadamente, con el riesgo muy grave de que un trombo no estabilizado pudiera arrastrarse por el torrente circulatorio y pudiera ocluir la luz de un vaso produciendo una embolia.

Sin embargo, existen anticoagulantes endógenos y naturales que proporcionan fluidez y evitan que la sangre coagule cuando no es necesario, de tal forma que cuando los vasos sanguíneos ya se han “reparado” otra proteína sanguínea llamada plasminógeno se activa a plasmina que degrada a la fibrina promoviendo así la disolución del coágulo que ya no se necesita.

La hemostasia, por tanto, se trata de un equilibrio, finamente regulado, entre el mecanismo de la síntesis de fibrina mediante la activación en cascada de los distintos factores de la coagulación y el mecanismo de la fibrinólisis o ruptura de las fibras de fibrina.

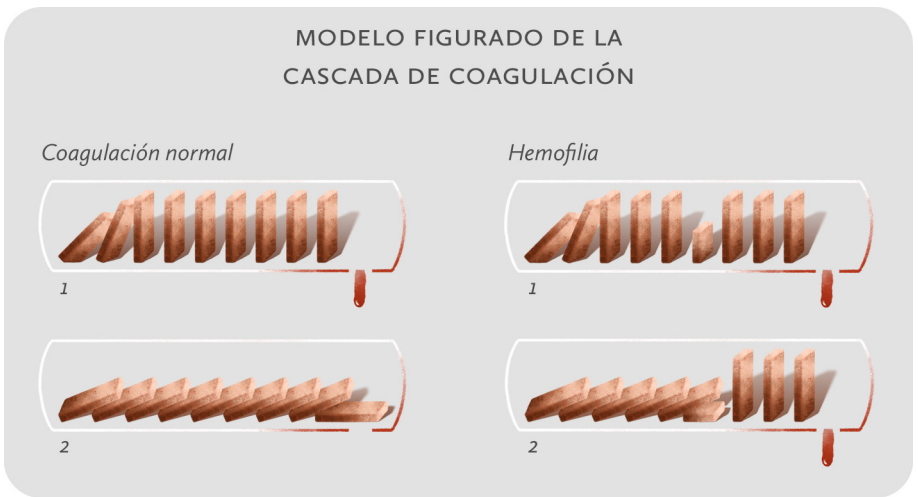
¿QUÉ ES LA HEMOFILIA? CAUSAS, TIPOS, SÍNTOMAS CLÍNICOS Y TRANSMISIÓN HEREDITARIA

La hemofilia es una enfermedad que afecta a la coagulación de la sangre ya que se caracteriza por un defecto en alguno de los elementos, llamados factores, que se necesitan para que la sangre coagule. Así, en la hemofilia A no existe o no es del todo funcional el factor VIII y en la hemofilia B el defectuoso es el factor IX. Esto puede ser porque no hay nada de factor o bien porque el que hay no funciona adecuadamente. La frecuencia de esta enfermedad es baja por lo que la hemofilia entra dentro de las enfermedades raras ya que, por ejemplo, la hemofilia A se produce en 1 de cada 6.000 nacidos vivos y la hemofilia B en 1 de cada 30.000.

La historia de la hemofilia comienza con las primeras descripciones en el Talmud Babilónico Judío del s.V dC en que se habla de la predisposición de determinados varones de ciertas familias, a veces relacionadas entre sí, para sufrir graves problemas hemorrágicos en el acto de la circuncisión, de tal manera que se llegaron a modificar las leyes para eximir a éstos de tal práctica. El final de la historia la tenemos en nuestros días, en nuestro s.XXI, en que sabemos que determinadas moléculas que son defectuosas en algunas personas y que no funcionan correctamente dan lugar a la hemofilia. Desde aquellos principios hasta nuestros días, dos hechos marcaron las diferencias, uno el descubrimiento por Patek en 1937 de alguna de esas proteínas que participan en la coagulación, y otro el descubrimiento de la estructura del ácido desoxirribonucleico o ADN por Watson y Crick en 1953. En tan solo unos 80 años desde que la hemofilia conviviera con la monarquía española de Alfonso XIII han cambiado cosas como que ahora sabemos que la causa no era un daño del endotelio de los

vasos por una infección de sífilis; que no se muere por hemofilia a una temprana edad o que la clara de huevo, la harina del cacahuete y el veneno de serpiente no son la solución.

La coagulación de la sangre es de forma gráfica, como una hilera, una fila de fichas de dominó que situamos una detrás de otra y que, como cuando éramos niños, empujamos la primera, ésta hace caer sucesivamente a todas las demás. Si esto lo hubiéramos hecho dentro de un tubo en el que hubiera un orificio que fuera tapado por la última ficha habríamos conseguido que el líquido que pasara por ese tubo no se perdiera. La hemofilia sería esa situación en que una de las fichas intermedias es más corta, defectuosa, que no es capaz de empujar a su siguiente en la fila con lo que el orificio no se tapa y la sangre se pierde. Esto explicado de esta forma tan sencilla es la cascada de la coagulación en que las fichas son los factores y en que la última ficha es el coagulo de fibrina.



Existen dos tipos principales de hemofilia que se caracterizan ambas por presentar manifestaciones de episodios hemorrágicos y daño articular, pero que se diferencian en la ficha que es defectuosa. Así, en la hemofilia de tipo A el defecto está en la ficha de factor VIII y en la hemofilia B en la ficha de Factor IX. Dentro de las hemofilias existen personas que tienen algo de factor y otras nada. Esto dicho de otra forma es que la hemofilia se puede presentar en distintos fenotipos o grados en función de su gravedad. Así, hay pacientes que presentan un fenotipo leve (enfermos leves) que significa que presentan entre un 5 y un 40% de factor si se compara con una persona sana; otros presentan un fenotipo moderado (enfermos moderados) ya que sus niveles de factor están entre el 1 y el 5% del valor normal y, por último, están los pacientes graves que presentan menos del 1% del nivel normal o incluso y, no es tan raro, un 0% de factor.

La hemofilia es una enfermedad que se hereda, se transmite de padres a hijos y sucesivas generaciones. Es, por tanto, una enfermedad hereditaria cuyo defecto se encuentra en el cromosoma X, es decir, el cromosoma que se relaciona con el sexo por lo que es una enfermedad hereditaria pero además ligada al sexo lo que significa que en el caso concreto de la hemofilia la transmiten las mujeres (portadoras) y la padecen los hombres debido a la dotación de dos cromosomas X (XX) de la mujer y una dotación XY en el hombre. La transmisión de la hemofilia se dice que es recesiva y no dominante ya que puede que no aparezca en una generación siguiente (salto de generación) por la simple razón de que se den portadoras o varones sanos, y sí aparezca en otra generación posterior.

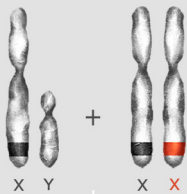
PATRÓN DE HERENCIA EN LA HEMOFILIA

Cromosoma X

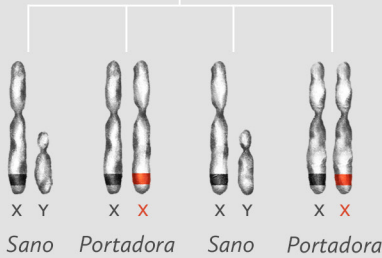
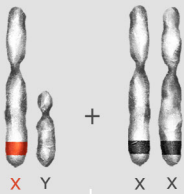


Hemofilia B
Hemofilia A

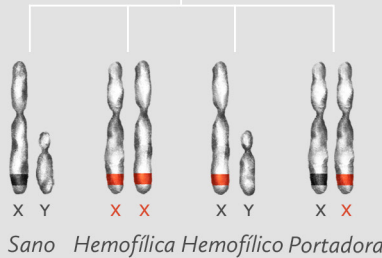
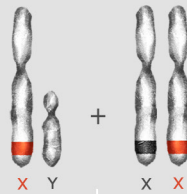
Hombre sano y mujer portadora



Hombre hemofílico y mujer sana



Hombre hemofílico y mujer portadora



La causa de que un factor no funcione es que el organismo lo sintetice defectuoso y como se trata de una enfermedad hereditaria esto significa que el defecto se encuentra en una región del ADN (gen) que da lugar a una proteína que es el factor. En cualquier caso el factor defectuoso es así porque antes se han producido cambios en ese gen que es como un libro formado por una gran inmensidad de palabras en que un defecto sería equivalente a cambiar una letra, una palabra, un párrafo o incluso arrancar una página de ese libro.

Esto daría lugar a que en algunos casos los cambios fueran muy pequeños pero que en otros fueran muy grandes, explicándose así las diferencias en la funcionalidad, de leve a grave, de los factores en los distintos pacientes. En el caso de la hemofilia A el defecto más habitual es un gran cambio, llamado inversión del intrón 22, en el que para entendernos pondríamos las páginas de la segunda mitad del libro al principio de dicho libro. Pero el defecto se puede deber también a pequeños cambios de una letra (mutaciones puntuales), a eliminar algunas frases (deleciones) o a meter frases o palabras al azar dentro de una página (inserciones). En el caso de la hemofilia B los errores se deben también a mutaciones puntuales, deleciones o inserciones pero también a la eliminación de unas cuantas páginas del libro o al intercambio de páginas de un libro por las de otro que nada tiene que ver con el primero.

La hemofilia, en general, ya sea del tipo A o del tipo B, se caracteriza por manifestaciones hemorrágicas espontáneas o bien por un sangrado excesivo cuando se produce algún tipo de traumatismo. Así, se deben distinguir las hemorragias articulares, las musculares y las de otra índole que, en ocasiones, pueden ser graves.

Para entender mejor lo que significan y la trascendencia que presentan las hemorragias en las articulaciones de un paciente hemofílico, se deben entender algunos conceptos básicos sobre esta localización anatómica. Los huesos se encuentran parcialmente unidos por una cápsula articular que presenta a su vez un revestimiento que se llama membrana sinovial, con muchos capilares (pequeños vasos sanguíneos). Produce un fluido aceitoso que ayuda a la articulación a moverse con facilidad y que evita el roce entre los huesos que la forman. Se trata pues de un lubricante como el que precisan las bielas de un motor. Si los capilares de la membrana sinovial se lesionan sangrarán pero, otras veces, de forma espontánea y natural sin ninguna lesión, también pueden sangrar debido al rozamiento propio y natural de la articulación. En una persona que no padece

hemofilia, el mecanismo de la coagulación detiene la hemorragia rápidamente pero en personas con hemofilia la hemorragia continua. Esto ocasiona que la articulación se inflame y aparezca el dolor característico. Los comienzos de una hemorragia articular, también llamada hemartro, se caracterizan por un hormigueo y una sensación de calor en la articulación. Al irse llenando la cápsula de sangre, la articulación se inflama todavía más y el dolor es mayor hasta que se pierde casi la totalidad de la movilidad. Sin un tratamiento adecuado y tras repetidas hemorragias en una misma articulación la membrana sinovial sangrará más fácilmente cada vez y los restos de sangre que se van depositando en la articulación van dañando los tejidos, se deja de producir el líquido sinovial y el roce de los huesos ocasiona el deterioro parcial o total de la articulación. Esta situación que puede llegar a una discapacidad de mayor o menor grado de severidad se conoce como artrosis o artropatía hemofílica, que puede llegar a ser invalidante. La articulación se torna rígida, dolorosa al moverla e inestable. Se vuelve todavía más inestable a medida que los músculos que la rodean se debilitan. Estas hemorragias se producen, fundamentalmente, en rodilla en un 44%, en codo en un 25%, en tobillo en un 15%, en hombro en un 8%, en cadera en un 5% y en otras localizaciones en el 3% de los casos.

SÍNTOMAS GENERALES DE EVOLUCIÓN DE UNA HEMORRAGIA ARTICULAR O HEMARTRO



- Sensación de burbujeo
- Hormigueo
- Calor



- Inflamación
- Dolor
- Calor



- Sensación viscosa y de gelificación al tacto
- Inflamación
- Debilitamiento muscular
- Rigidez matinal
- Dolor crónico
- Movimiento limitado

Hoy en día, el paciente con hemofilia no muere de una simple o moderada ni siquiera grave hemorragia si es tratado adecuadamente; el problema clínico sanitario es la artropatía hemofílica.

Por su parte, las hemorragias musculares ocurren cuando los capilares de los músculos se lesionan. Algunas veces, la causa es

conocida, pero en otras ocasiones ocurren sin motivo aparente. En una hemorragia muscular el músculo se torna rígido y dolorido. Se produce inflamación, calor y dolor al tacto, apareciendo moretones si es muy superficial y si por el contrario es muy profunda podría producirse presión sobre nervios o arterias causando hormigueo y adormecimiento. El resultado final suele ser un espasmo muscular que consiste en que el músculo para protegerse a sí mismo se contrae y las articulaciones que se deben mover gracias a ese músculo se ven afectadas. Las hemorragias musculares suelen ocurrir en pantorrillas, muslos y parte superior de los brazos.

ARTROPATÍA HEMOFÍLICA



Si la hemorragia ocurriese en el músculo psoas (en la parte frontal de la cadera) o en los músculos del antebrazo, que a veces también son frecuentes, se pueden ver afectados nervios y arterias lo que podría ocasionar daños permanentes e irreversibles.

Otras hemorragias graves son las de la cabeza (por lo general resultado de una lesión) y pueden representar causa de muerte, especialmente en niños. Estas hemorragias pueden ocasionar dolor, náuseas, vómitos, somnolencia, confusión, torpeza, debilidad, convulsiones y pérdida de

la conciencia. Las hemorragias en la garganta pueden ser el resultado de algunas infecciones, lesiones, inyecciones dentales o cirugía, y pueden ocasionar inflamación, así como dificultad para tragar y respirar. Otras hemorragias, aunque generalmente no ponen en peligro la vida del paciente, sí podrían resultar muy serias como, por ejemplo, las hemorragias en ojos, espina dorsal o en el músculo psoas. La hematuria, o sangre en la orina, es común en hemofilia severa, aunque pocas veces es peligrosa.

Hoy en día la hemofilia se trata mediante la administración por vía intravenosa del factor deficiente VIII o IX a la dosis adecuada en función de la edad y grado de severidad del episodio hemorrágico. Los concentrados utilizados de factores pueden ser plasmáticos o recombinantes, ambos sometidos a procesos de inactivación viral. A pesar de que este tratamiento es el adecuado algunos pacientes producen una respuesta inmune contra el factor exógeno administrado, respuesta que será tanto mayor cuanto mayor sea la porción de factor defectuosa. Estos pacientes que desarrollan de esta manera los llamados “inhibidores”, se tratan con concentrados de mezclas de factores de la coagulación o con Factor VII activado.

La ventaja hoy día del tratamiento de la hemofilia es que se puede llevar a cabo en el propio domicilio mediante protocolos de autotratamiento por parte del propio paciente, adiestrado convenientemente por profesionales sanitarios para que, así, logren la mayor autonomía personal posible.

En la actualidad la hemofilia se puede diagnosticar mediante un diagnóstico prenatal en el estadio fetal mediante el análisis de líquido amniótico por punción (amniocentesis), en microvellosidades coriónicas o mediante el estudio del ADN fetal en la sangre materna por una simple extracción de sangre de la madre; también de forma postnatal valorando, o bien la mutación, o bien los niveles de factor coagulante y, mediante el diagnóstico genético preimplantacional, que se lleva a cabo en embriones analizando la mutación en una sola de sus células y seleccionando el embrión sano para después reimplantarlo en el útero materno. Estas posibilidades de diagnóstico llevan a ofrecer un consejo genético a las parejas en edad de procrear y así poder decidir o no un embarazo.

En definitiva, hoy en día, en hemofilia, sin obviar los riesgos que conlleva siempre un defecto en la coagulación sanguínea, si el tratamiento es el adecuado en cuanto a seguridad y eficacia y, en especial, si éste es en régimen de profilaxis, se puede asegurar una muy buena calidad de vida y una casi normalizada esperanza de vida para los pacientes con hemofilia.

HEMOFILIA ADQUIRIDA

La hemofilia adquirida es un desorden hemorrágico que se da raramente pero que potencialmente puede poner en riesgo la vida del paciente. Se producen entre 0,2 y 1,9 casos por cada 1.000.000 de habitantes cada año.

La causa es la producción de autoanticuerpos (inhibidores) en personas que no padecen hemofilia hereditaria clásica ni tienen antecedentes familiares. Estos anticuerpos se producen generalmente contra el factor VIII en adultos tanto en mujeres como en hombres. Se han visto casos todavía más raros de autoanticuerpos contra el factor IX. Por tanto, la gran diferencia de la hemofilia adquirida con relación a la hemofilia clásica es que no se transmite de padres a hijos, aunque sí es posible que se transmita la predisposición a formar los autoanticuerpos.

Aunque las manifestaciones clínicas de la enfermedad son muy variables entre pacientes, los síntomas en general se relacionan con sangrado espontáneo en el 80% de los pacientes, en piel, músculos, tejidos blandos y mucosas, y rara vez se producen los típicos hemartros como sucede en la hemofilia hereditaria. Aun así, a veces las hemorragias pueden ser graves como es el caso de los hematomas retroperitoneales y los intramusculares así como las hemorragias cerebrales. Otras manifestaciones son el sangrado prolongado después de un parto o después de un accidente grave o tras una operación quirúrgica. La estadística demuestra que en el 50% de los casos la enfermedad, si no se toman las medidas terapéuticas adecuadas, puede ser mortal.

El título de inhibidores en el 14 al 35% de los casos es transitorio en 20 meses. Con respecto a las causas, el 54% de los casos se deben a determinadas condiciones prenatales y de postparto, a desórdenes inmunológicos (enfermedades autoinmunes), a ciertas infecciones, a algunas interacciones farmacológicas, a neoplasias o al consumo de drogas; mientras que para el 46% de los casos restantes no se conoce la causa (origen idiopático).

El diagnóstico de la enfermedad es sencillo ya que se detectan descompensados los típicos parámetros de la coagulación como son el incremento en el tiempo de sangrado o de coagulación, la disminución en el número de plaquetas, el aumento en el tiempo de protrombina y un prolongado tiempo parcial de tromboplastina activada.

En cuanto al tratamiento, éste se puede abordar de dos formas. Una es la eliminación de los anticuerpos (inhibidores) y la otra el control de las hemorragias.

Para eliminar los inhibidores se utilizan fármacos inmunosupresores que disminuyen la respuesta inmunitaria del organismo, como la prednisona y la ciclofosfamida. También se pueden usar los llamados inmunomoduladores como las inmunoglobulinas a altas dosis. Más recientemente, se utiliza el Rituximab que se trata de un anticuerpo que interacciona con los componentes CD20 de la membrana de los linfocitos B que participan en la formación de los inhibidores. Este fármaco es el que se utiliza también para aquellos pacientes con hemofilia clásica que presentan inhibidores.

El tratamiento de los episodios hemorrágicos depende del título (cantidad) de anticuerpos que presenta el paciente. Por debajo de 5 unidades Bethesda (es decir muy pocos) se pueden utilizar dosis altas de factor VIII intravenoso, o bien altas dosis de inmunoglobulinas G o desmopresina. Si la cantidad de inhibidores es mayor de 10 unidades se administra factor VIII porcino o complejos activados de protrombina. Por supuesto aunque se trata de una alternativa mucho más costosa es de gran utilidad el factor VII recombinante activado. En aquellos pacientes con un título muy alto de anticuerpos contra el factor VIII y que no desaparecen después de 20 meses con inmunotolerancia, se aconseja la plasmaféresis que consiste en extraer toda la sangre del paciente y separar de ella los anticuerpos para después reperfundírsela de nuevo. La plasmaféresis es un remedio transitorio ya que al cabo de un tiempo se vuelven a generar y acumular los autoanticuerpos en sangre.

En conclusión, aunque todo parezca muy similar a un caso de hemofilia clásica con presencia de inhibidores, la hemofilia adquirida es una entidad clínica diferente ya que se produce por una causa autoinmune, es decir, que el propio organismo produce anticuerpos contra su propio factor de la coagulación que es normal y funciona de forma adecuada. Las consecuencias hemorrágicas evidentemente pueden ser parecidas en algunos casos y solapar, y el tratamiento puede ser similar pero, una y otra enfermedad nunca se han de confundir, especialmente en lo que se refiere a su transmisión hereditaria o no.

TRATAMIENTO DE LA HEMOFILIA

La idea fundamental, en el tratamiento de la hemofilia, es que se debe reemplazar o suplementar con el factor de la coagulación normal para paliar su deficiencia en el paciente, con el fin de prevenir o solventar un episodio de sangrado agudo. La forma de administrar los factores exógenos es por vía intravenosa y siempre con las medidas de limpieza y desinfección adecuadas.

ELEMENTOS PARA UNA ÓPTIMA ADMINISTRACIÓN DE FACTOR



Alcohol 96°



Algodón



Vial de factor de coagulación



Compresor



Jeringuilla



Palomilla

Los concentrados de factores antihemofílicos pueden clasificarse en dos grandes grupos según su fuente de obtención. Aquellos que se obtienen de plasma humano —los factores antihemofílicos plasmáticos— y aquellos cuya obtención se realiza por técnicas de ingeniería genética en células en cultivo y que son los denominados factores recombinantes.

Además, los factores antihemofílicos se pueden clasificar por otras características que presentan como son su pureza, es decir, la actividad coagulante por miligramo de proteína total en el producto final; por el grado de inactivación de patógenos virales; por su estabilidad durante

el proceso de preparación; por la presencia o ausencia de proteínas animales o humanas en el medio de cultivo (en el caso de factores recombinantes solamente) y por la presencia o ausencia de dichas proteínas para la estabilización del producto final.

Los criterios fundamentales por los que se selecciona un determinado factor antihemofílico para el tratamiento de cada paciente son: la seguridad del producto con relación a la capacidad de transmisión de patógenos virales o de otro tipo y la capacidad para inducir el desarrollo de inhibidores en el paciente. Además, existen otros criterios como son las condiciones clínicas analíticas del individuo, la disponibilidad del producto, la comodidad de preparación y administración del producto, su coste y el laboratorio fabricante.

Una característica relevante en favor de los factores recombinantes, a diferencia de los factores plasmáticos, es su capacidad de ser mejorados. Es, precisamente, por esta circunstancia que los factores recombinantes representan el futuro del tratamiento de la hemofilia ya que se podrán mejorar todavía más en su seguridad, en su eficacia, en su menor capacidad para producir inhibidores e incluso en hacerlos más cómodos de administrar. En cuanto a la seguridad cada vez se están preparando factores recombinantes más seguros ya que se consigue reducir muy significativamente la cantidad de proteínas humanas y animales presentes en el producto final o durante su proceso de fabricación para su estabilización, y de hecho ya no se utilizan estas proteínas en los de últimas generaciones. Por otra parte, y en relación a su eficacia, se están ensayando productos recombinantes de mayor vida media mediante la utilización del pegilado, liposomas o proteínas de fusión, y la eliminación de sitios de ruptura de las moléculas de factor o de unión a hepatocitos o a proteínas de colágeno que lo inactivan. Esto se traducirá en la necesidad de un menor número de administraciones de factor para tratar cada episodio hemorrágico a demanda o en el tratamiento profiláctico. También, la inducción de inhibidores se verá disminuida más si cabe con los factores recombinantes del futuro ya que se podrán modificar esos sitios que precisamente el organismo los reconoce como muy extraños y por los que se generan los inhibidores o anticuerpos. Y, por último, serán mucho más cómodos por su mayor estabilidad a temperatura ambiente y por poderse disolver en muy poco volumen de agua por tener muchas menos proteínas. Esto hará que sean más fáciles de transportar y más cómodos de preparar y administrar incluso en perfusión continua.

CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN DE LOS CONCENTRADOS DE FACTORES ANTIHEMOFÍLICOS

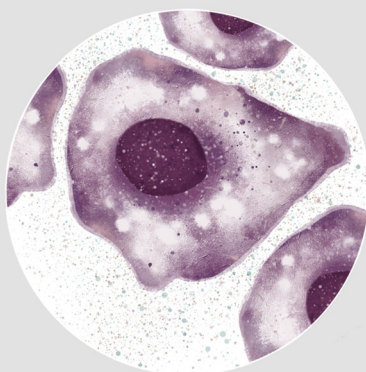
- Derivados de plasma humano
- Derivados de células de mamífero o humanas por técnicas de ingeniería genética
- Grado de pureza (cantidad de proteínas contaminantes)
- Inactivación de patógenos virales
- Estabilidad durante el proceso de preparación
- Presencia o ausencia de proteínas animales o humanas en el medio de cultivo
- Presencia o ausencia de proteínas animales o humanas como estabilizantes
- Vida media en el organismo

Para la obtención de los factores plasmáticos es necesaria la utilización de sangre humana obtenida a partir de la donación que realizan un gran número de donantes. Hacen falta, aproximadamente, 150 donantes para obtener 1000 unidades de factor VIII, lo que determina en sí mismo que la fuente de obtención sea muy heterogénea. Por el contrario, la obtención de los factores recombinantes se realiza a partir de células de mamífero seleccionadas y manipuladas genéticamente (se les introduce el gen humano del factor VIII o IX), que son cultivadas en el laboratorio, lo cual constituye una fuente de obtención indudablemente más homogénea, controlada y segura.

TIPOS DE FACTOR



FACTOR PLASMÁTICO
Plasma humano de miles de donantes



FACTOR RECOMBINANTE
Células de mamífero o humanas

La mayor o menor cantidad de proteínas presentes en los concentrados de factor, indica el mayor o menor riesgo de esos productos. A más proteínas contaminantes, que no son factor, más riesgo de efectos indeseables. Así, el contenido de proteínas extrañas en los factores plasmáticos es mucho mayor que en los recombinantes y dentro de los recombinantes, los de segunda generación presentan más que los de tercera y cuarta. Dicha cantidad de proteínas presentes en el producto final, los métodos de inactivación viral y la fuente de obtención inicial es lo que nos indica el grado de seguridad de cada producto frente a infecciones por patógenos virales o de otro tipo.

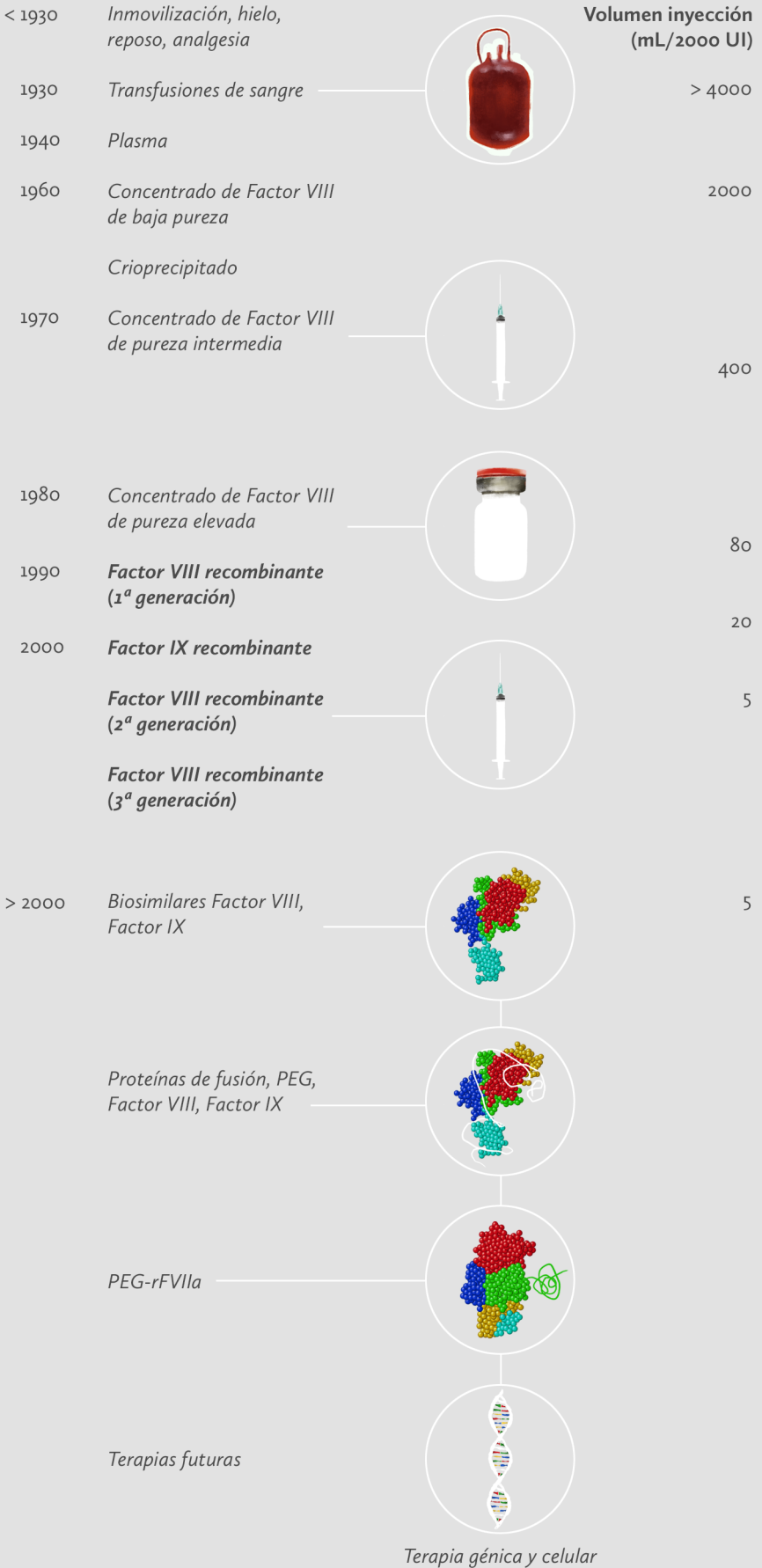
Los métodos de inactivación viral utilizados durante la producción de factores plasmáticos y recombinantes eliminan los virus que tienen envoltura lipídica (grasa) que los envuelve como es el caso del VIH (virus de la inmunodeficiencia humana), el VHC (virus de la hepatitis C), el VHB (virus de la hepatitis B), el virus del Nilo, el virus causante del SARS (Síndrome agudo respiratorio severo) o el virus de la gripe aviar u otros. Sin embargo, si consideramos la seguridad de los factores frente a virus sin lípidos como el Parvovirus B19, el VHA (virus de la hepatitis A) y otros que pueden aparecer en cualquier momento sin cubierta, o frente a otro tipo de patógenos como son los priones causantes de la vCJD (Variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob o mal de las “vacas locas” en humanos), los factores plasmáticos pueden ser productos de una potencial menor seguridad.

INCIDENCIA DE INFECCIONES CON FACTORES EN LOS ÚLTIMOS 24 AÑOS

- Factores plasmáticos: VIH/VHC/VHB/VHA/PV B19/
Priones
- Factores recombinantes: no se han dado infecciones

A lo largo de la historia, la hemofilia ha sido tratada tanto con factores plasmáticos como recombinantes. Hacia 1970 aparecieron en el mercado los primeros factores antihemofílicos plasmáticos. Estos factores, durante los primeros 11 años de uso, fueron los responsables de la infección de la población hemofílica por VIH, VHC, Parvovirus B19 y VHA originando las ya conocidas pandemias. A principios de los años 90 aparecieron los primeros factores recombinantes y su uso ha ido reemplazando al de los factores plasmáticos.

EVOLUCIÓN EN EL TRATAMIENTO DE LA HEMOFILIA



RAZONES PARA LA UTILIZACIÓN DE FACTORES PLASMÁTICOS

- Deseo personal y particular del propio paciente
- Historia anterior de formación de inhibidores
- Borrado de inhibidor
- Desabastecimiento de factores recombinantes
- Países en desarrollo
- Menor coste
- Intereses particulares del médico que prescribe

Sin embargo los factores antihemofílicos recombinantes no son las únicas proteínas recombinantes utilizadas para el tratamiento de enfermedades.

Otros ejemplos son la insulina, el interferón alfa y las vacunas. Estas proteínas se utilizan de forma masiva y generalizada en la medicina moderna desde hace también muchos años. La seguridad de los factores recombinantes está ampliamente avalada por los ya 24 años que se llevan utilizando para el tratamiento de la hemofilia sin que se haya producido ningún tipo de efecto adverso.

A pesar de todas las evidencias clínicas y científicas de la conveniencia de los factores recombinantes como los fármacos de elección para el tratamiento de los pacientes hemofílicos, su utilización es desigual a escala mundial.

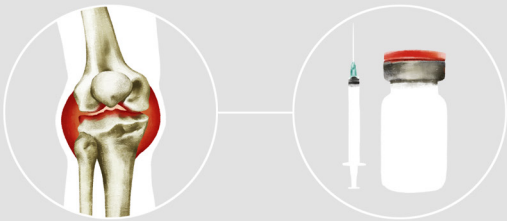
Mientras que en países como Canadá, Estados Unidos o Australia su uso alcanza a la totalidad de los pacientes, en Europa su uso se ha extendido al 75% de los pacientes hemofílicos, y en algunos países asiáticos como Japón y Corea al 50%. Sin embargo en el resto de países del mundo con mayores limitaciones económicas su uso apenas alcanza el 10%.

El uso de factores recombinantes como tratamiento de primera elección para la población hemofílica se encuentra avalado en la actualidad por diversas organizaciones mundialmente reconocidas como la Fundación Nacional de Hemofilia de Estados Unidos, la Sociedad Canadiense de Hemofilia, la Sociedad Australiana de Hemofilia, la Organización de Directores de Centros de Hemofilia del Reino Unido y la Comisión Científica de la Real Fundación “Victoria Eugenia”.

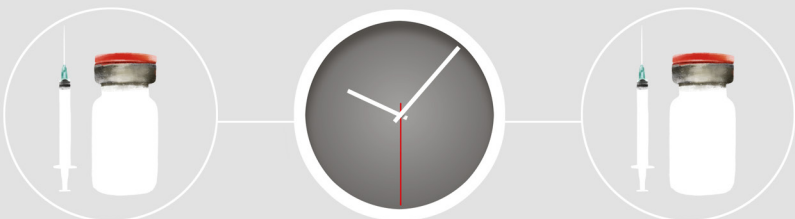
PAUTAS DE TRATAMIENTO DE LA HEMOFILIA

TRATAMIENTO A DEMANDA

1. Se lleva a cabo cuando se ha producido la hemorragia.



2. El factor se administra cada 12 o 48 horas.



TRATAMIENTO DE PROFILAXIS

1. Se suele administrar 2 o 3 veces por semana.



Uno de los principales argumentos para la utilización de factores plasmáticos en lugar de recombinantes para el tratamiento de la hemofilia es la diferencia en el coste económico. Sin embargo, no se deben olvidar otros gastos sanitarios derivados de la utilización de productos plasmáticos que no han ofrecido una máxima seguridad. Dichos costes son los relacionados con los tratamientos anti VIH, VHC, VHB, tratamientos psicológicos para las personas afectadas por estas enfermedades y para su entorno familiar, tratamientos reproductivos en parejas serodiscordantes (para evitar contagios y transmisión a la descendencia), tratamientos de las secuelas de las infecciones por VIH y VHC, indemnizaciones, absentismo laboral y un largo etc. Pero fundamentalmente no se debe olvidar el coste en términos de vidas humanas, ya que muchas de estas infecciones han sido y serán todavía fatales.

Aun así, existen razones médico-clínicas que pueden aconsejar, en determinadas ocasiones, la utilización de factores plasmáticos, por ejemplo el deseo personal y particular del propio paciente; que el paciente tenga una historia anterior de formación de inhibidores tras el uso de factores plasmáticos o recombinantes; la necesidad de borrar un inhibidor (tratamiento por inmunotolerancia) o el desabastecimiento de factores recombinantes. En países en desarrollo como pueden ser los de África y Latinoamérica, persiste el uso justificado de factores plasmáticos debido a la escasez de recursos.

CRITERIOS DE SELECCIÓN DEL FACTOR PARA EL TRATAMIENTO DEL PACIENTE CON HEMOFILIA

- Seguridad respecto a la transmisión de patógenos virales o de otra naturaleza
- Capacidad para desarrollar inhibidores
- Condiciones clínicas analíticas del paciente
- Disponibilidad del producto
- Comodidad de preparación y administración
- Coste
- Marca comercial (laboratorio)

El tratamiento de la hemofilia independientemente del tipo de factor utilizado se puede abordar de dos formas. Uno es el tratamiento a demanda, es decir, aquel en el que se administra factor cuando se produce un determinado episodio hemorrágico hasta que se resuelve con las dosis adecuadas. El otro tipo de tratamiento es el de profilaxis en el que se administra el factor dos o tres veces a la semana de forma preventiva aunque no exista un episodio hemorrágico.

EFFECTOS ADVERSOS DEL TRATAMIENTO EN HEMOFILIA

INHIBIDORES EN HEMOFILIA

Los actuales tratamientos para la hemofilia, si bien son muy eficaces y seguros, presentan alguna complicación como es la posible aparición de los llamados inhibidores de los factores de la coagulación. Esto significa que un determinado porcentaje de los pacientes que son tratados con concentrados de factores antihemofílicos, ya sean plasmáticos o recombinantes, desarrolla inhibidores, que no son otra cosa que anticuerpos que neutralizan o “inhiben” la función de los factores en la cascada de la coagulación.

El desarrollo de estos anticuerpos, por un lado, condiciona la calidad de vida de los pacientes ya que el tratamiento disponible para la enfermedad resulta ineficaz. Por otra parte, también tiene importantes consecuencias socio-económicas, ya que aumenta de forma sustancial el coste del tratamiento antihemofílico por ser necesaria mucha más cantidad de factor o el uso de otros productos, para tratar cada episodio hemorrágico.

La probabilidad con la que aparecen los inhibidores depende de múltiples factores, entre ellos que el paciente haya recibido tratamiento antihemofílico con anterioridad o no; el cambio de un tipo de factor o fabricante por otro (este aspecto cada vez se demuestra más que podría influir poco); el grado de severidad de la enfermedad o el tipo de hemofilia (hemofilia A hasta el 30% y en hemofilia B hasta el 8%); la etapa de vida del individuo (los inhibidores tienden a aparecer tras las primeras administraciones de concentrados de factor VIII o IX, que suele coincidir, en los pacientes moderados y graves, con sus primeros años de vida); predisposición genética (factores raciales), etc. Pero además de la frecuencia de aparición de los inhibidores, es importante también conocer su título, es decir la cantidad de inhibidores que cada persona tiene en su sangre. De esta manera, cuando los inhibidores tienen un título bajo, su presencia suele ser transitoria y terminan por desaparecer tras el tratamiento continuado con factores de la coagulación o tras el tratamiento con cantidades crecientes del mismo concentrado del factor que ha provocado la generación de estos inhibidores. Sin embargo, si su título es muy alto suelen ser anticuerpos con una gran actividad que neutralizan el efecto de los factores que se administran.

En los últimos años se ha especulado mucho sobre cuáles son las causas que condicionan la aparición de anticuerpos inhibidores. Parece ser que pudieran estar implicados factores genéticos, fundamentalmente los relacionados con el tipo de alteración genética que da lugar a la hemofilia. Así, por ejemplo, en la hemofilia A, los pacientes con mutaciones que afectan a una porción muy importante del gen del factor VIII, desarrollan inhibidores con mayor frecuencia (alrededor de un 35%) frente al 5% de aquellos pacientes en los que el defecto genético del gen del factor se debe a pequeñas mutaciones.

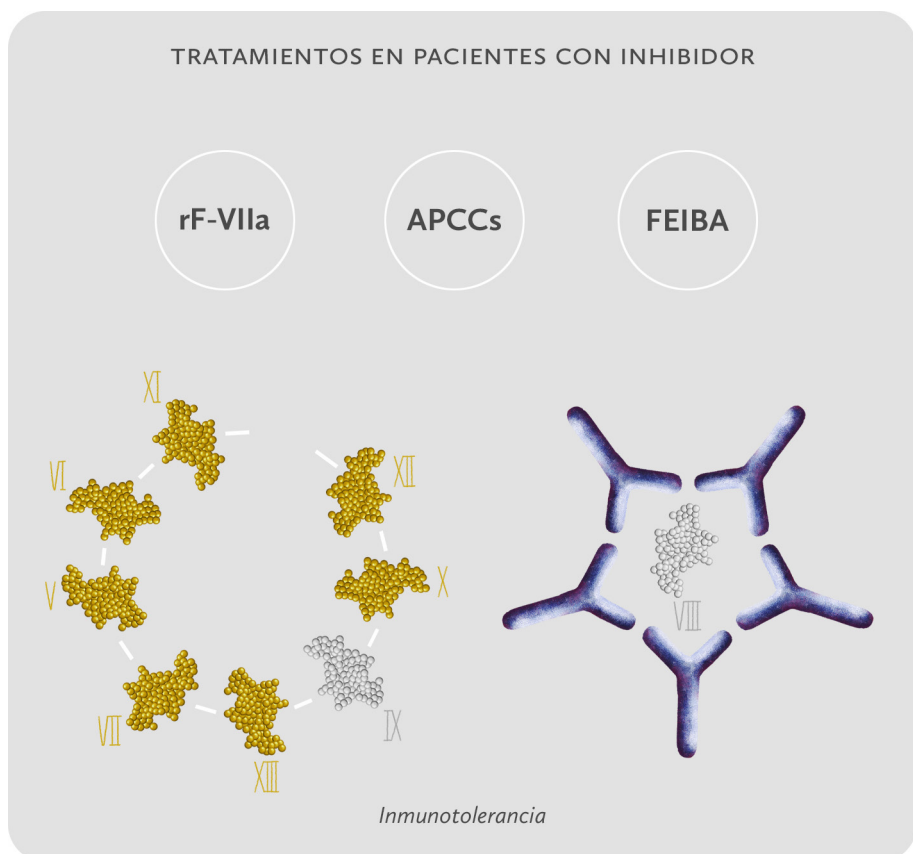
En el caso de la hemofilia B, los pacientes con mutaciones que afectan a una porción muy importante del gen del factor IX tienen una probabilidad del 50% de desarrollar inhibidores, mientras que ésta disminuye hasta el 20% cuando las mutaciones se producen por alteraciones menos importantes en este gen. Además, se ha comprobado que el mayor riesgo se correlaciona con el parentesco entre pacientes hemofílicos de primer y segundo grado y que podría influir también el genotipo HLA o complejo mayor de histocompatibilidad general.

Los inhibidores se producen como respuesta inmunitaria ante la presencia de un factor antihemofílico exógeno —que es ajeno al paciente—, al igual que ocurre con cualquier otra molécula extraña al organismo. En esta respuesta inmune intervienen células sanguíneas, como son los linfocitos B y T.

Un mismo paciente puede presentar más de un tipo de inhibidor. Generalmente, son anticuerpos de clase IgG y la mayoría de ellos van dirigidos hacia regiones determinadas de la molécula de factor. Por ejemplo, en el caso del factor VIII los inhibidores interaccionan con la región de unión al factor X; con la de unión al factor IXa; con la de unión al factor IX; o con la de unión al FvW (Factor von Willebrand) y al factor Xa. Los inhibidores también se pueden dirigir, simultáneamente, contra varias zonas de la molécula del factor. Esta interacción con las regiones de unión a otros factores determina que se interrumpa la cascada de la coagulación y que por ello el tratamiento con factor antihemofílico resulte ineficaz.

La presencia de inhibidores se confirma, normalmente, mediante el ensayo de Bethesda en que se valora la cantidad de anticuerpos, expresada en unidades Bethesda, presentes en la sangre del paciente. En función de esto, los pacientes pueden presentar una respuesta baja (con un título de inhibidores bajo) o alta (con un título alto) según sea

la respuesta del sistema inmunitario ante el factor exógeno. Así, si el sistema inmunitario reacciona de forma rápida e intensa, la cantidad de inhibidor puede elevarse por encima de las 5 unidades Bethesda. Cuando tiene estas características, el inhibidor se clasifica como de alta respuesta. Sin embargo, puede ocurrir que el sistema inmunitario presente una respuesta más lenta y débil, de modo que la cantidad de inhibidor se mantenga por debajo de las 5 unidades Bethesda, en cuyo caso se habla de inhibidores de baja respuesta.



Los pacientes que presentan inhibidores de baja respuesta pueden someterse a protocolos de inmunotolerancia —altas dosis de factor y alta frecuencia de tratamiento— tanto en hemofilia A como en hemofilia B. Por otra parte, en los casos en los que existe un título elevado de anticuerpos puede llevarse a cabo la plasmaféresis (recambio de toda la sangre del paciente, tras un proceso de inmunoadsorción para reducir los niveles de inhibidor) y a continuación tratar al paciente con factor antihemofílico. Sin embargo, este tratamiento de plasmaféresis es sólo una solución temporal, ya que una nueva inyección de factor volverá a estimular la aparición de inhibidores.

En general, para el tratamiento de aquellos pacientes hemofílicos que presentan inhibidor de alta respuesta, se utilizan, en la actualidad, varias estrategias más o menos convencionales y con más o menos

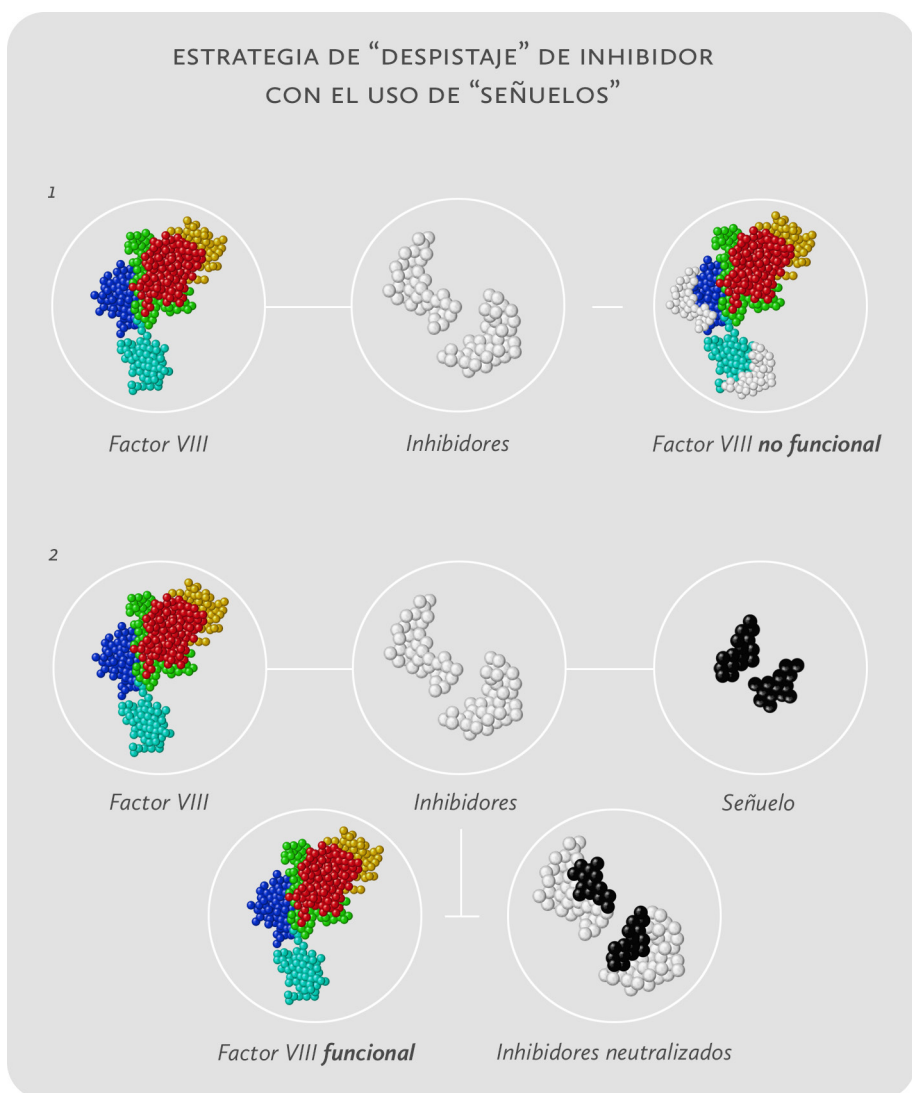
eficacia según los casos concretos. Los mejores resultados se obtienen con el factor VII activado recombinante y con algo menos eficacia con los complejos activados de protrombina o APCCs. Son igualmente efectivas —y mucho más económicas— algunas combinaciones terapéuticas como el factor VII activado recombinante con los APCCs o con antifibrinolíticos —fármacos que dificultan la destrucción de los filamentos de fibrina— o con FEIBA® que es un complejo de varios factores de la coagulación.

Desafortunadamente, estos tratamientos aunque palían en parte los problemas graves de sangrado en los pacientes con inhibidor, presentan todos ellos, en general, dos características comunes: la baja eficacia coagulante comparada con los concentrados de factor VIII o IX y que los resultados que se obtienen entre distintos pacientes son muy variables.

En los últimos años se está afianzando la idea —ya planteada para la diabetes mellitus y la miastenia grave— de derivar o de “despistar o entretener” a las células inmunitarias en su respuesta inmune. La idea se basa en utilizar anticuerpos contra los linfocitos que participan en el proceso de generación de inhibidores o bien en el “secuestro” de los propios inhibidores mediante otras moléculas. Así, se han desarrollado anticuerpos contra los receptores de los linfocitos TCD4. La administración simultánea, en ratones, de este tipo de anticuerpos junto con el factor antihemofílico, ha demostrado una disminución significativa en la generación de inhibidores. Sin embargo, esta estrategia es inespecífica, ya que se afecta de forma global a los linfocitos y podría provocar en el paciente una disminución poco recomendable de linfocitos TCD4.

Los estudios más esperanzadores consisten en estrategias específicas para el problema de la aparición de inhibidores. Estas estrategias se basan en la utilización de unas moléculas similares a los sitios de la molécula de factor que hacen generar los inhibidores. Estas moléculas “señuelo” se unen a los inhibidores de tal forma que se produce el “secuestro” de los mismos lo que hace que no se unan al factor. Al disminuir de forma muy importante la cantidad de inhibidores libres, el factor queda disponible para desarrollar su función coagulante. Este tratamiento sería altamente específico ya que iría dirigido solamente contra los propios inhibidores y no alteraría los mecanismos generales inmunológicos, que en el paciente hemofílico, en muchos casos, ya están muy seriamente alterados, especialmente por los estados de inmunodeficiencia producidos por la infección VIH/SIDA. Más

recientemente se están ensayando nuevos factores recombinantes modificados en esos sitios altamente inmunogénicos que inducen la aparición de inhibidores y por otro lado se encuentra ya en fase de ensayo clínico un nuevo factor recombinante de origen humano que es mucho menos inmunogénico.



PROTOSCOLOS PARA EL “BORRADO” DE INHIBIDORES. INDUCCIÓN DE INMUNOTOLERANCIA

La inducción mediante inmunotolerancia es un procedimiento que puede resultar de utilidad para eliminar un inhibidor. De forma habitual se administran factores FVIII o FIX hasta que los niveles de inhibidor no se detecten por el método de Bethesda y se recupere la vida media del factor coagulante en plasma. Los complejos de protrombina y el factor VII se deberán utilizar para resolver o prevenir los episodios de sangrado agudo así como sus complicaciones en el caso de que la inmunotolerancia fracase. A veces se aconseja la administración complementaria de fármacos inmunosupresores y/o plasmaféresis

extracorpórea. El éxito de la inducción de inmunotolerancia es del 90% en un periodo de entre 6 y 12 meses para inhibidores contra factor VIII. Este éxito depende de varias variables como el momento del inicio que debe ser lo más precoz posible después de la detección de los inhibidores; la utilización de inmunosupresores, o una baja respuesta del inhibidor por debajo de 5 unidades Bethesda. Los protocolos varían, unos utilizan altas dosis (200 UI/kg/día) de factor VIII derivado de plasma y rico en factor von Willebrand; otros dosis muy bajas (25 IU/kg/día) cuando los niveles de inhibidor son muy bajos. En cualquier caso, es recomendable una vez logrado el “borrado” del inhibidor mantener un tiempo prolongado de profilaxis administrando factor tres veces a la semana.

Los protocolos para “borrar” los inhibidores contra el factor IX son menos exitosos y pueden provocar, además, síndromes severos de anafilaxia o nefróticos. Estos casos se producen cuando el gen defectuoso de factor IX presenta grandes deleciones requiriéndose, además, el tratamiento de los episodios agudos de sangrado con factor VII activado recombinante para evitar una sobre-exposición a factor IX.

EFFECTOS SECUNDARIOS DEL TRATAMIENTO DE LA HEMOFILIA: INFECCIONES VIRALES Y EMERGENTES

Cuando hablamos de los efectos secundarios del tratamiento de la hemofilia no nos referimos, por ejemplo, a la aparición de inhibidores ya que esto se considera una consecuencia natural de rechazo frente a determinadas moléculas extrañas como son los factores VIII o IX perfundidos de forma exógena. Esto no quita que sea un grave problema para la eficacia del tratamiento como ya se comentó más arriba.

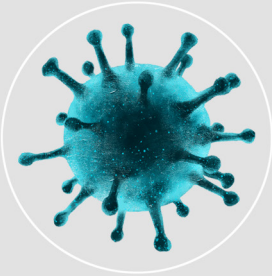


Nos referimos, de una parte a las reacciones anafilácticas como reacción natural contra los factores pero este aspecto por ser, hoy día, irrelevante gracias a la mayor pureza de los concentrados, no merece que se insista en él. De otra parte, y de mucha mayor trascendencia, sin lugar a dudas, es la amenaza de las infecciones por agentes patógenos en general y de forma particular por virus y priones.

La posibilidad de infección hoy día se puede considerar, fundamentalmente, respecto a los llamados patógenos emergentes o bien por patógenos que se han hecho resistentes a determinados

fármacos generalmente antibióticos o antivirales. Las razones actuales de esta situación se relacionan con la adaptación de los microorganismos y con el espectacular incremento de los movimientos demográficos de la población humana que diseminan, como nunca se había conocido antes, enfermedades que previamente se circunscribían a regiones muy concretas del planeta.

En general, cuando nos referimos a agentes patógenos queremos decir virus, bacterias y más recientemente también a proteínas (priones).

**AGENTES PATÓGENOS POTENCIALES
Y SUS POSIBILIDADES DE INACTIVACIÓN**

 <p>VIRUS CON CUBIERTA</p> <ul style="list-style-type: none"> • VIH • VHC • VHB • Virus del Nilo • SARS • Virus de la gripe aviar <p><i>INACTIVACIÓN</i> Solventes-Detergentes 60-80 °C/10-72 horas 138 °C/2 segundos</p>	 <p>VIRUS DESNUDOS</p> <ul style="list-style-type: none"> • VHA • Parvovirus B19 • ¿Otros? 	 <p>PROTEÍNAS</p> <ul style="list-style-type: none"> • Priones <p><i>INACTIVACIÓN</i> 134 °C/18 minutos 121 °C/30 minutos Sosa cáustica 1N 15 minutos</p>
--	---	--

Evidentemente y esto ya se ha explicado anteriormente, las posibilidades de infección están íntimamente relacionadas con la fuente de obtención de los distintos concentrados de factor. Así, es obvio que los factores que se preparen a partir de plasma humano siempre tendrán de forma inherente más posibilidades de portar una infección. No sucede, hoy por hoy y por los conocimientos actuales, con los factores recombinantes que se obtienen a partir de células animales o humanas en un laboratorio.

Lo más conveniente hoy día para definir lo que es una enfermedad emergente es ceñirse a la definición aceptada y propuesta por el Instituto Americano de Medicina. Así, dice que una enfermedad emergente es aquella que es nueva, o que reemerge o la que se da

por resistencia a fármacos, y cuya incidencia aparece en humanos o ha aumentado en las dos últimas décadas, o que su incidencia se prevé que aumente en un futuro próximo. Como ya se ha apuntado anteriormente una de las causas fundamentales para que esto se dé es la gran capacidad de movimiento del ser humano hoy día. Sirvan como ejemplo dos datos: año 1850, se precisaban más de 350 días para dar la vuelta al mundo y la población mundial era de 1240 millones de personas; año 2014, bastan unas horas para dar la vuelta al globo y la población es de más de 7 billones de personas.

Son ya muchas las enfermedades que cumplen con la definición pero por no ser muy extenso sólo se citarán algunas: VIH-Sida, tuberculosis, síndrome agudo respiratorio severo, poliomielitis, parvovirus B19, hepatitis C, nueva variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vCJD), gripe aviar, virus del Nilo, el virus Ebola... y un largo etc. hasta casi un centenar.

Las posibilidades de infección por virus, a través de productos plasmáticos, hoy día se han reducido drásticamente gracias a los actuales métodos de inactivación viral. Sin embargo, como bien es sabido la fiabilidad de estos métodos no es del 100%. ¿Por qué decimos que los métodos de inactivación no son del todo eficaces? La primera razón es que todos los virus no son iguales en su estructura y función. Así, existen virus con una cubierta de grasa mientras que otros no la presentan. Esta simple característica diferencial hace que los virus con cubierta sean más sensibles a la inactivación por calor y detergentes mientras que los que no presentan esta cubierta son capaces de resistir. Entre los virus con cubierta podemos citar el VIH, el virus de la hepatitis C, el de la hepatitis B, el virus del Nilo, el virus del SARS o el virus de la gripe aviar; entre los virus desnudos están el VHA, los parvovirus B19... y otros que hoy día podemos desconocer porque no hayan emergido todavía. La situación pues está claramente controlada respecto a los virus con cubierta.

La cuestión es, por tanto, que virus emergentes que desconocemos o virus que ya conocemos sin cubierta son capaces de pasar el filtro de la inactivación. Un ejemplo de ellos es el parvovirus B19 que aun no siendo mortal a corto plazo sí puede producir la aparición de enfermedades autoinmunes que cursan con el desarrollo de autoanticuerpos dirigidos contra partes o moléculas del propio cuerpo lo que se traduce en posibles efectos graves a largo plazo o incluso en procesos poliartriticos autoinmunes que agravan más, si cabe, muchas de las artropatías graves hemofílicas.

La amenaza de las proteínas como agentes infecciosos era algo impensable hasta hace poco tiempo sobre los postulados de la microbiología y las teorías clásicas de la infección, porque las infecciones siempre se han producido por virus y bacterias y ahora, rompiendo todos los esquemas, una infección puede cursar por proteínas que en realidad no son organismos vivos sino tan solo moléculas. Este cambio de esquema se refiere a que moléculas aisladas pueden transmitirse y provocar una enfermedad fatal porque, como los priones, son capaces de agregarse y precipitar en órganos tan vitales como el cerebro.

Los priones como agentes causantes de la enfermedad de las “vacas locas” en el ganado y de la variante en humanos (vCJD) son proteínas que se transmiten por la dieta rica en carne de animales infectados y por la sangre, pegadas a los linfocitos; además, no se inactivan por los métodos antivirales utilizados. Los priones son difíciles de filtrar y de separar y la pasteurización convencional no sirve ya que se precisan 134°C durante 18 minutos o 121°C durante 30 minutos para inactivarlos, condiciones éstas que romperían la estructura de los factores de la coagulación y les haría no funcionales; además, son endógenos (los tenemos en nuestro organismo con una estructura muy similar) por lo que no los reconocemos como extraños y no generamos una respuesta inmune de defensa contra ellos. Otras características de los priones que agravan el problema es que el periodo asintomático de la enfermedad puede ser tan largo como de 40 años y no existe un método para detectarlos en sangre, lo que supone un riesgo de Salud Pública en la utilización de plasma humano por la imposibilidad de llevar a cabo un control preventivo adecuado.

De hecho, plasmas contaminados con priones ya se han utilizado en muchos países del mundo para la preparación de factores de la coagulación, incluyendo España. Aunque se ha estimado que el riesgo de contraer la enfermedad por priones a través de concentrados derivados de plasma es muy bajo, hoy por hoy no se puede decir que estos productos estén exentos de riesgo porque existen muchas incertidumbres e interrogantes respecto a los priones. No se conocen los mecanismos de actuación ni los factores que desencadenan la enfermedad y no se sabe si una muy pequeña cantidad de priones son suficientes para desarrollarla, aunque parece ser dosis dependiente. La pregunta es cómo afrontar las amenazas de los patógenos emergentes. La respuesta es fácil como concepto pero no para su desarrollo práctico. Es admitido internacionalmente que para evitar las infecciones virales conocidas la solución pasa por la utilización de

factores lo más seguros posible algo que se logra aplicando los métodos de inactivación más eficaces sobre los productos derivados del plasma o bien utilizando factores recombinantes para evitar cualquier tipo de infección incluyendo a los priones. Esta situación parece sencilla pero hay varios inconvenientes para llevarlo a la práctica. Uno es que las posibilidades de muchos países en desarrollo son muy escasas para afrontar el coste de este tipo de factores; una segunda razón es que existen circunstancias clínicas en determinados pacientes que aun pudiendo disponer de factores recombinantes no pueden beneficiarse de ellos, ya sea porque no existe un producto recombinante para su tratamiento (enfermedad de von Willebrand), ya sea por su historia clínica pasada de desarrollo de inhibidores.

Respecto a la infección por priones, la mejor alternativa de seguridad (al menos hasta que esté disponible una prueba que detecte los priones en la sangre de los donantes) es la utilización de productos de origen recombinante.

Aunque, en un principio, no se confiaba en los primeros fármacos recombinantes, ahora, en la segunda década del siglo XXI, su gran disponibilidad, su alta eficacia y, sobre todo, su máxima seguridad, han hecho de estos productos una terapia de elección.

Pero volviendo al “tratamiento para todos” que postula la Federación Mundial de Hemofilia se deberá paliar la posibilidad de infección por priones mediante estrategias y planes dirigidos a la selección de los donantes por sus características personales y regionales (hay zonas geográficas de mayor incidencia de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob) y la selección de los plasmas. Otras alternativas son la leucodepleción, es decir, la eliminación de los leucocitos que llevan pegados los priones o la aplicación de sofisticadas técnicas para separar los priones del plasma, aunque como es fácil comprender la aplicación de estas técnicas podría suponer un incremento tal del coste de los productos derivados del plasma que los igualaría al de los productos recombinantes.

Como conclusiones podemos decir que el riesgo de infección potencial (no real) por patógenos emergentes es un hecho ineludible en el tratamiento de la hemofilia con productos derivados del plasma. Además, se debe procurar anteponerse a los riesgos potenciales de los patógenos emergentes, mediante medidas generales de Salud

Hoy en día muchas proteínas recombinantes ya forman parte de la rutina terapéutica, algunas con más de veinte años de utilización en clínica como los factores recombinantes, y con una máxima seguridad y una alta eficacia claramente demostradas.

Pública y particulares de inactivación y purificación de productos farmacéuticos derivados del plasma. Este problema se debe abordar desde un punto de vista tanto médico como socio-político, y los profesionales de la medicina deben conocer los riesgos potenciales de cada tipo de producto e informar adecuadamente y de forma objetiva a los pacientes.

TRATAMIENTOS BIOTECNOLÓGICOS Y TERAPIAS AVANZADAS

FACTORES RECOMBINANTES ¿EL TRATAMIENTO MÁS SEGURO?

El descubrimiento del ADN hizo posible lo que hoy conocemos como la biotecnología “moderna”, que permite introducir una porción de ADN en una célula bacteriana o eucariota (animal, humana o vegetal) y, a partir de ahí obtener una determinada proteína que se denomina recombinante y que además puede ser funcional. Esto ha supuesto, nada más y nada menos, que algunas proteínas como la insulina, la hormona del crecimiento o el activador del plasminógeno, se preparen de esta forma para su uso terapéutico en clínica. Hoy, en la segunda década del siglo XXI, ya son cientos de proteínas terapéuticas las que se han producido de forma recombinante.

FACTORES RECOMBINANTES. EL FUTURO DEL TRATAMIENTO DE LA HEMOFILIA

- Mayor seguridad
- Mayor eficacia
- Menos inhibidores
- Más cómodos de utilizar
- Posibilidad de mejorar sus propiedades

Pero, antes de esta realidad terapéutica, se han tenido que asumir algunas dramáticas consecuencias iatrogénicas como ha sido la aparición, pasados muchos años, de algunos casos de la Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob en aquellos niños que fueron tratados con la hormona del crecimiento que se obtenía de las glándulas hipofisarias de personas fallecidas. También, en los años '80 con la infección masiva y fatal por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), causante del SIDA, y por el virus de la hepatitis C (VHC) en los '90, en pacientes con hemofilia que fueron tratados con factores plasmáticos.

Dejando de lado el pasado y no invirtiendo más tiempo en ello del necesario para impartir una somera lección de cautela, el presente y más el futuro está y estará en las “medicinas recombinantes”. Estos productos por su característico procedimiento de obtención que se basa en expresar un gen “terapéutico”, a partir de un fragmento de ADN, en una célula para producir una proteína funcional y exenta de cualquier componente humano o animal, son especialmente “limpios”, y por ello de elección para muchas patologías actuales. Pero esta idea tan simple, que todavía está sedimentando en los facultativos más conservadores, no se estableció de forma sistemática sino que más bien al contrario las primeras proteínas recombinantes que se utilizaron en la clínica, como la somatostatina en 1976, la insulina en 1982, la eritropoyetina en 1986, el activador tisular del plasminógeno en 1987 o los factores antihemofílicos en 1990, suscitaron un gran escepticismo que se derivaba del temor a lo enormemente desconocido para un clínico, como era la Biología Molecular y la Ingeniería Genética.

A pesar de ello, se crearon un gran número de empresas de biotecnología hasta el punto que surgió un nuevo concepto de la empresa farmacéutica, la empresa biotecnológica, reorganizándose incluso las empresas farmacéuticas tradicionales hacia la farmacología genética. La inversión sigue aumentando y se estima que a medio o largo plazo más de un 30% del mercado farmacéutico mundial se abastezca de estos medicamentos.

Hoy en día muchas proteínas recombinantes ya forman parte de la rutina terapéutica, algunas con más de veinte años de utilización en clínica y con una máxima seguridad y una alta eficacia claramente demostradas. Otras se encuentran en una primera fase de estudio como las que pueden tener utilidad, por ejemplo, para algunas enfermedades como la enfermedad de Graves, la esclerosis múltiple, la miastenia grave, la esclerodermia, la fenilcetonuria, las galactosemias, las hemoglobinopatías... y otras.

Las vacunas, ya todas recombinantes, que se utilizan en la población en general pero también en niños, ancianos y personas inmunodeprimidas se muestran, sin lugar a dudas, altamente seguras. Por supuesto los interferones recombinantes para el tratamiento de larga e intensiva dosificación, por ejemplo, para la hepatitis C, son todavía muy eficaces. Pero no solo en la terapéutica sino también en la nutrición como suplementos de la dieta o en la cosmética en donde se utilizan péptidos recombinantes.

Estamos inmersos, sin casi darnos cuenta, en la era de lo recombinante en que incluso somos capaces de preparar, de esta forma y libre de virus y priones, nuestra propia y más abundante proteína que es la albúmina, que hasta ahora se obtenía a partir de plasma humano.

Si comparamos, en base al criterio de eficacia farmacológica, los productos derivados del plasma o de tejidos humanos o animales y los productos recombinantes, ambos no muestran diferencias significativas. Cuando el criterio es la seguridad para el paciente la situación es claramente diferente. Si pensamos, por ejemplo, en el tratamiento de la hemofilia, los productos recombinantes en sus 24 años de uso clínico en estos pacientes (1990-2014) no han producido ningún acontecimiento adverso grave ni siquiera leve, y menos cabe esperarlos con los nuevos productos recombinantes de tercera y cuarta generación que están exentos totalmente de proteínas humanas o animales.

Por el contrario, los hemoderivados plasmáticos, aunque ahora son ya más seguros, han ocasionados miles de fallecimientos de pacientes hemofílicos en todo el mundo a causa de la infección por el VIH y el VHC. Aún en un futuro condicionarán la calidad de vida de muchos pacientes a causa de los efectos secundarios de los fármacos anti-VIH, especialmente cardiopatías y daño renal y psiquiátrico, o debido a cirrosis y cáncer de hígado por la infección por el VHC.

Los productos plasmáticos o de origen humano en general, que aun siendo altamente seguros, pero solamente para los virus con cubierta lipídica como el VIH, VHC y VHB, no están exentos, sin embargo, de los riesgos que ya se comienzan a demostrar, debido a los cambios sociales profundos que acontecen en el Mundo y que a nadie se le escapa, referidos a la transmisión de enfermedades nuevas entre las que destacan las enfermedades priónicas, como la Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD) o “mal de las vacas locas” y que se transmite por la sangre. También el riesgo de transmisión de las llamadas

enfermedades emergentes en que aun conociendo el agente causal se han convertido, traspasando la barrera “ínter especie”, en epidemias y pandemias en poblaciones en que antes no lo eran, como fue el caso del VIH y otros virus que puedan ser resistentes a los procesos de inactivación viral.

Por esta razón, es casi de consenso mundial el recomendar la utilización de productos recombinantes y así Europa con sus “Guías Europeas para las Terapias Recombinantes” y varios países como el Reino Unido, Australia e incluso en España como fue a través de la Comisión Científica de la Real Fundación Victoria Eugenia, abogan por ello.

La pregunta inmediata es ¿por qué no está más extendida la utilización de los productos recombinantes teniendo en cuenta su alta eficacia y máxima seguridad? Es difícil responder a esta pregunta sin ir más allá de lo que la medicina hipocrática nos ha enseñado. Se puede pensar en razones de conservacionismo derivadas del temor a lo desconocido, pero, también, podemos indagar sobre razones meramente económicas y de “solidaridad” para con el reparto del gasto de los tratamientos. Porque hay que tener en cuenta que la tecnología recombinante representa un alto coste tanto del propio tratamiento en sí como de la inversión para las empresas farmacéuticas o para las administraciones públicas que intentan desarrollar sus políticas sanitarias intentando un reparto equitativo de presupuestos, aunque en ocasiones no se sintonice con algunos facultativos o con los propios pacientes. Por último, no podemos descartar, por supuesto, la existencia de posibles conflictos de intereses por determinados productos de ciertas casas comerciales en connivencia con los propios médicos que prescriben.

En cualquier caso, la práctica clínica, que siempre ha sido una “acción de riesgo”, se hace ahora más complicada cuando existen productos más seguros y eficaces pero también más costosos. En este escenario el clínico, que trata e intenta curar al paciente, se encuentra en la tesitura de prescribir, con un margen a veces muy estrecho de actuación, el producto farmacológico más seguro, más eficaz y con la mejor relación seguridad/eficacia/coste.

En definitiva, nos encontramos ante una interesante paradoja de la farmacología —evitable para algunos, irresoluble para otros— de que el mayor avance en los procedimientos terapéuticos no siempre se relaciona con una mayor aplicación de esos recursos que son

más seguros, por la simple razón de ser más costosos. ¿Estaremos olvidando que la seguridad del paciente debe primar sobre el coste?

NUEVOS FACTORES RECOMBINANTES

El futuro a corto o medio plazo del tratamiento de la hemofilia pasa por la utilización de factores recombinantes modificados, mientras que a largo plazo se puede hablar más bien de estrategias relacionadas con la Terapia Celular y la Terapia Génica. Los factores recombinantes están siendo modificados para conseguir mejoras en tres sentidos: uno, reducir la capacidad de formación de inhibidores; dos, potenciar la eficacia del factor incrementando su vida media y, en tercer lugar, alcanzar niveles superiores de seguridad mediante la eliminación de proteínas animales o humanas contaminantes.

La estrategia actual encaminada a disminuir la formación de inhibidores es el “despistaje” del sistema inmune. El objetivo es que los inhibidores reconozcan moléculas “señuelo” de estructura similar al factor de la coagulación en lugar de a éste y así evitar su inactivación. Del mismo modo, también se están introduciendo modificaciones en la estructura tridimensional del factor para reducir la aparición de inhibidores y conseguir que sea más estable y menos inmunogénico.

Respecto a la obtención de moléculas de factor VIII de acción más prolongada, las vías más estudiadas son la utilización de liposomas pegilados, de polímeros de ácidos polisiálicos y el bloqueo del catabolismo del factor en el organismo. Más recientemente la tecnología de las proteínas de fusión es la que está dando los mejores resultados, en especial con un nuevo factor IX para hemofilia B que ya se comercializa en Estados Unidos (ALPROLIX® de Biogen Idec) y que tiene una vida media de hasta 5 veces mayor que el actual. El factor VIII de Baxter (Advate®) y el IX de Pfizer (Benefix®), ambos de tercera generación, y el factor VIII de Pfizer (ReFacto® AF), también de tercera generación y que no presenta trazas de proteínas animales ni anticuerpos monoclonales de ratón, son los factores recombinantes más seguros en la actualidad. Además, de próximo lanzamiento en España, está el nuevo factor recombinante de origen humano de Octapharma (Nuwiq®), que disminuirá la incidencia de inhibidores en los pacientes.

Los futuros productos terapéuticos basados en las terapias avanzadas, terapia génica y terapia celular, pueden ofrecer innumerables aplicaciones clínicas potenciales en el tratamiento de diversos desórdenes monogénicos, como es el caso de la hemofilia. Aunque la hemofilia es una óptima patología para ser tratada por estas técnicas debido a su carácter monogénico y a sus menores exigencias por ser suficiente un fenotipo moderado o leve, en relación a los niveles de los factores de la coagulación, la investigación en esta dirección se encuentra en sus fases iniciales y se tienen que solventar todavía algunos aspectos relacionados con su seguridad en esta población de pacientes que presenta unas peculiares características clínicas. Se deberá optar por el optimismo, pero actuar con prudencia para no crear falsas expectativas en los pacientes.

El desarrollo biotecnológico ha promovido nuevas terapias que cambiarán la práctica médica. Las terapias avanzadas que utilizan medicamentos cuya base son los genes, las células o los tejidos (terapia génica, terapia celular y medicina regenerativa), representan nuevas estrategias para el tratamiento de algunas enfermedades. Su finalidad será la regeneración de tejidos o la recuperación de una función. La terapia celular se basa en el trasplante de células vivas en un organismo con el objeto de reparar un tejido o de restaurar una función perdida o defectuosa, y la terapia génica en el trasplante de células modificadas genéticamente para que produzcan una proteína funcional que se encuentra defectuosa.

Las células son útiles en este tipo de terapias por su capacidad de diferenciarse en líneas específicas celulares que se precisan para la reparación de un determinado tejido. Sin embargo, solo un 20% de los artículos publicados relacionados con células madre representan un avance en el conocimiento científico. Las razones de esto son el alto coste de este tipo de investigaciones y las todavía múltiples cuestiones por resolver como el desarrollo de nuevos métodos de Buenas Prácticas de Manipulación de los cultivos celulares y de los procedimientos de trasplante, garantizar la estabilidad genética de las células madre antes y después de su trasplante, su calidad y cantidad en un tratamiento, y asegurar su seguridad fundamentalmente respecto a la ausencia de teratogenicidad (formación de tumores).

La mayor parte de los ensayos clínicos y preclínicos desarrollados hasta ahora en hemofilia mediante terapia celular y terapia génica

tanto mediante vectores virales como no virales, no han demostrado efectos adversos, aunque la respuesta inmune contra las cubiertas virales de los vectores así como contra los transgenes expresados, y la hepatotoxicidad, representan, hoy por hoy, el límite de su aplicación en clínica.

Las estrategias de terapia génica para hemofilia se han basado en la utilización de vectores virales fundamentalmente lentivirales y adenoasociados utilizando células madre adultas y fibroblastos autólogos del propio paciente, plaquetas o células madre hematopoyéticas. También mediante transferencia génica no viral o mediante reparación de la mutación con oligonucleótidos quimera. Los estudios de terapia celular para hemofilia se han basado en el trasplante de células sanas para reparar o suplir una función perdida, por ejemplo, el trasplante de células sinusoidales hepáticas o de progenitores endoteliales derivados de las iPSCs.

Una interesante novedad en terapias avanzadas son los resultados obtenidos por el grupo de High et al. que, mediante la utilización de nucleasas de dedos de zinc y vectores adenoasociados, han logrado la corrección de mutaciones en hemofilia B por re-edición de las secuencias mutadas en el ADN. Aunque en este caso la expresión de factor IX es solo del 5% respecto al nivel normal, su ventaja es que mediante esta estrategia se controla perfectamente la inserción de las secuencias normales en el ADN y se evita así la aparición de tumores por mutagénesis insercional.

Hasta ahora los problemas más importantes que se han de solucionar se refieren a la eficacia en cuanto a los niveles y su mantenimiento a largo plazo, y a la respuesta inmune contra los vectores y los transgenes.

El grupo de Nathwani ha desarrollado un interesante ensayo clínico en pacientes de hemofilia B. En este ensayo han participado pacientes de hemofilia B grave (<1% factor IX) a los que se les inyectó un vector adenoasociado especial que expresaba factor IX y que era capaz de transducir (infectar) fácilmente hepatocitos. Este vector es más eficiente y los resultados mostraron que los pacientes expresaban entre un 3% y un 11% de los niveles normales de factor IX. Otro resultado esperanzador es que no se detectaron inhibidores (anticuerpos anti factor IX). Los resultados hay que considerarlos teniendo en cuenta primero que la expresión de factor IX se corresponde con un fenotipo moderado-leve de la enfermedad, y segundo que se precisa una

terapia concomitante con glucocorticoides con el objeto de prevenir el rechazo inmunológico y la elevación de los niveles de transaminasas hepáticas.

En general, los resultados obtenidos hasta el momento, representan el comienzo de la aplicación futura de las terapias avanzadas para el tratamiento de la hemofilia. Hasta ahora en todos los ensayos clínicos desarrollados en terapias avanzadas en hemofilia, incluyendo el de Nathwani, el número de pacientes ha sido muy pequeño observándose además una alta variabilidad en los resultados. En este último ensayo aunque es la primera vez que se observa una expresión sustancial de factor IX en humanos, la respuesta inmune contra el vector y la hepatotoxicidad deben ser reevaluadas.

Hace ya casi dos décadas que se comenzó a hablar de los posibles beneficios de la terapia génica para el tratamiento de la hemofilia y se decía, por prestigiosos expertos, que para la primera década del siglo XXI podría ser toda una realidad la curación de esta enfermedad. Los pacientes y médicos que trataban hemofilia tomaron estas aseveraciones como una esperanza... pero esto no ha sido así. Muchos han sido los problemas surgidos, especialmente desde el punto de vista de la bioseguridad desde los años 90 en que se iniciaron los primeros ensayos clínicos en terapia génica y en el momento presente aunque se ha avanzado mucho especialmente en el diseño de los vectores de transferencia, todavía no se han solucionado plenamente algunos de los inconvenientes que se plantean con estas estrategias (respuesta inmune, mutagénesis insercional, eficacia y tiempo de expresión de los factores, el reclutamiento de los pacientes para los ensayos clínicos y la producción de los vectores a gran escala).

La primera cuestión que se plantea es si se justifica la inversión en tiempo y costes económicos para establecer protocolos de terapias avanzadas aplicables al tratamiento futuro de esta patología. Aunque hay que admitir que el tratamiento actual de la hemofilia es óptimo, la respuesta es afirmativa ya que se trata de una patología crónica y el tratamiento actual de alta periodicidad especialmente en tratamientos profilácticos, puede conllevar riesgos fatales por infecciones por patógenos y además es muy costoso. La segunda cuestión es si es factible. En este sentido, la hemofilia se considera una muy óptima candidata ya que es una enfermedad monogénica; la expresión de bajos niveles (1-5%) representa un fenotipo moderado; se dispone de una gran variedad de células diana para los estudios; no se precisa de regulación de la expresión de los genes y se dispone de un gran

número de modelos animales para la experimentación.

Otras cuestiones más de carácter general pero no por eso triviales, son por ejemplo, si será fácil la extrapolación de los resultados en cuanto a la seguridad y los niveles de expresión desde pequeños modelos animales al hombre; si será la combinación terapia celular/ terapia génica y la utilización de células madre mesenquimales las herramientas con mejores posibilidades y si se tendrán que restringir los protocolos a los vectores adenoasociados y a los vectores no virales.

Los problemas a solucionar serán la inmunogenicidad y la bioseguridad, y el mantenimiento de los niveles y tiempos de expresión de los factores, y aunque la mayor parte de los grupos de investigación se centran en vectores virales también los métodos no virales deberán ser tenidos en cuenta.

El criterio fundamental, en cualquier caso, deberá ser la razón entre eficacia y seguridad, en base a la alta sensibilización en los pacientes y los médicos, debido a las consecuencias fatales acaecidas en la población hemofílica por las infecciones virales en el pasado (HIV/ VHC), así como por las condiciones inmunológicas especiales de estos pacientes. En este sentido es muy posible que se deba renunciar a unos requerimientos de expresión muy exigentes (menores niveles de factor) a cambio de una mayor seguridad. Un segundo aspecto importante es que se deberá ser prudente a la hora de difundir las conclusiones de los resultados que se vayan obteniendo, de tal forma que se deberán evitar, ante todo, las falsas expectativas en los pacientes con respecto a las terapias avanzadas, que se encuentran ahora mismo sólo en las fases iniciales como potenciales estrategias terapéuticas muy prometedoras. A más largo plazo, después de superar los retos antes mencionados, este tipo de terapias pueden convertirse en una alternativa plausible. En definitiva, se deberá ser optimista pero no caer nunca en la fantasía.

ESTRATEGIAS DE FUTURAS TERAPIAS AVANZADAS EN HEMOFILIA

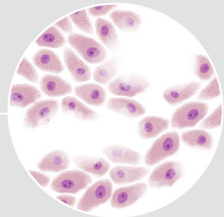


TERAPIA GÉNICA

- Vectores lentivirales
- Vectores adenoasociados
- Vectores no virales



Individuo sano

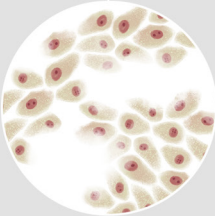


TERAPIA CELULAR

- Células madre adultas
- Células madre fetales
- Células madre embrionarias
- iPSCs o células madre pluripotentes inducidas



Trasplante
Eficacia, seguridad



Células terapéuticas
transfectadas o
diferenciadas



Paciente con hemofilia

- Enfermedad rara
- Enfermedad monogénica
- Grado leve (5–40% de factor)
- La expresión del gen no precisa regulación
- Muchos modelos animales para la experimentación

- Expresión de factor VIII o IX
- Corrección del desorden en la coagulación

PARA MÁS INFORMACIÓN...

- ***Textbook of Hemophilia, 3rd Edition, 2014. Ed. Wiley – Blackwell.***

Lee CA, Berntorp EE, Hoots WK.

Disponible en: <http://eu.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-1118398246.html>

- ***Guía sobre Hemofilia. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e igualdad. 2012.***

Disponible en: http://www.msssi.gob.es/profesionales/saludPublica/medicinaTransfusional/publicaciones/docs/Hemofilia_AspectosOrganizativos.pdf

- ***La hemofilia en imágenes. Federación Mundial de Hemofilia. 2004.***

Disponible en: <http://www1.wfh.org/sp/index.html>

- ***La Hemofilia. Conceptos básicos. Wyeth, 2005.***

- ***Factor VIII therapy for hemophilia A: current and future issues.***

Aledort L, Ljung R, Mann K, Pipe S. Expert Rev Hematol, 2014; 7(3): 373–385.

Disponible en: <http://informahealthcare.com/doi/pdf/10.1586/17474086.2014.899896>

- ***Current management of hemophilia B: recommendations, complications and emerging issues.***

Franchini M. Expert Rev Hematol, 2014; Early on line, 1–9.

Disponible en: <http://informahealthcare.com/doi/pdf/10.1586/17474086.2014.947955>

- ***Treatment for hemophilia: recombinant versus plasma-derived coagulation factors – controversy and debate forever? An ethical medical challenge?***

Liras A, García-Trenchard R. Expert Rev Hematol, 2013; 6: 489–92.

Disponible en: <http://informahealthcare.com/doi/pdf/10.1586/17474086.2013.834798>

- ***Advanced therapies for hemophilia: reality or fantasy?***

Liras A. Expert Rev Hematol, 2012; 5: 245–7.

Disponible en: <http://informahealthcare.com/doi/pdfplus/10.1586/ehm.12.25>

- ***Advanced therapies for the treatment of hemophilia: future perspectives.***

Liras A, Segovia C, Gaban SA. Orphanet J Rare Dis, 2012; 7: 97.

Disponibile en: <http://www.ojrd.com/content/pdf/1750-1172-7-97.pdf>

- ***Future research and therapeutic applications of human stem cells: general, regulatory, and bioethical aspects.***

Liras A. J Translational Medicine 2010; 8: 131.

Disponibile en: <http://www.translational-medicine.com/content/pdf/1479-5876-8-131.pdf>

ASANHEMO

La Asociación Andaluza de Hemofilia (asanhemo) se constituyó de forma legal en el año 1990 como entidad no gubernamental sin ánimo de lucro. Pasó a ser declarada de utilidad pública en el 2009, según Orden del Ministerio del Interior de fecha 28/09/09. Este reconocimiento oficial a la labor realizada asegura, entre otros, que nuestro fin más importante es promover el interés general e intentar garantizar el cumplimiento de nuestros fines estatutarios. Además nuestra actividad no se restringe al beneficio de nuestros asociados y asociadas, sino que es abierta a cualquier otra posible persona beneficiaria que reúna las condiciones exigidas por la índole de los fines que contemplan nuestros estatutos.

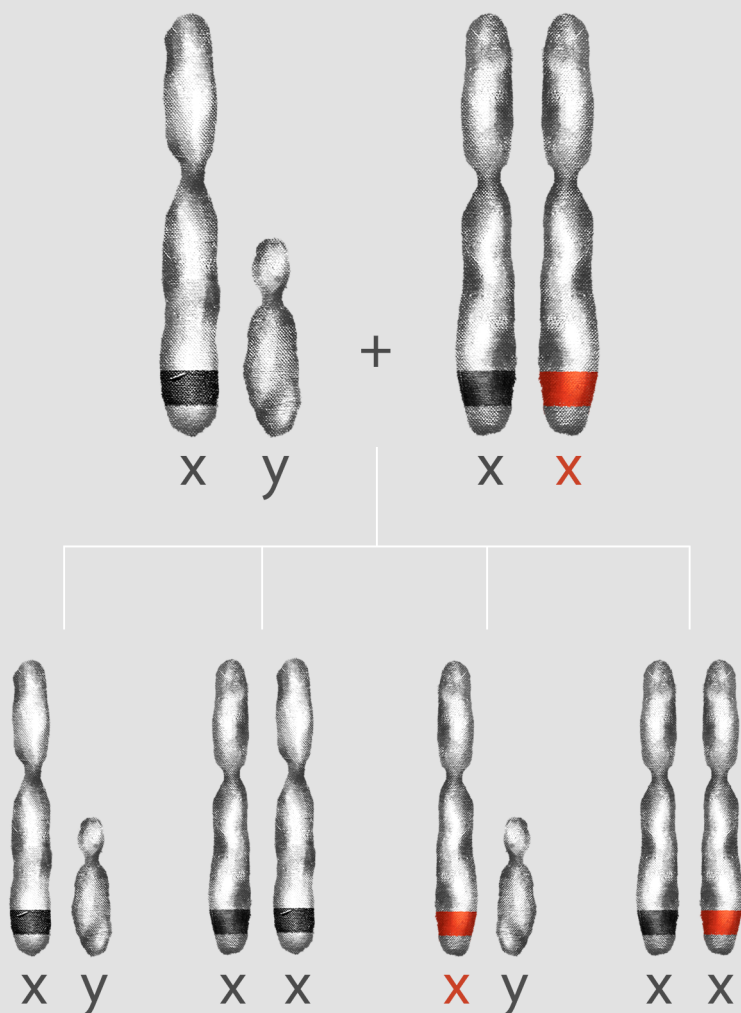
Este año asanhemo celebra su 25 aniversario de la mejor manera que podía ser, cumpliendo de forma rigurosa al publicar esta guía básica de hemofilia. manifestaciones clínicas, diagnóstico y tratamiento, dos de sus fines, como son velar por la adecuada educación de las personas portadoras, pacientes y entorno, así como realizar acciones para la divulgación de información sobre la hemofilia dirigidas a toda la sociedad.



asanhemo
ASOCIACIÓN ANDALUZA DE HEMOFILIA

BASIC GUIDE *of* HEMOPHILIA

Clinical manifestations,
diagnosis and treatment



ANTONIO LIRAS

Antonio Liras (Segovia, Spain, 1955) holds a PhD in Pharmacy and a graduate degree in Chemical Science from Madrid's Complutense University (UCM). Dr Liras has devoted over thirty years of his life to university teaching and research. The long path that has brought him hither started in Milan, at the Carlo Besta Neurological Institute, where he cut his teeth in the gene therapy arena.

He is currently the coordinator of UCM's Advanced Gene and Cell Therapy Group as well as a member of different Spanish and international scientific societies and committees. He also belongs to the Medical Advisory Board of the Spanish Federation of Rare Diseases and is a trustee at the Victoria Eugenia Royal Hemophilia Foundation, whose Scientific Committee he chaired. His work has included the organization of specialization and postgraduate courses, the development of several research projects that have benefited from both Spanish and international funding, the supervision of several PhD theses, and the publication of over 50 articles in international impact factor journals and numerous scientific books. He has also delivered a myriad of lectures at scientific conferences and has received several scientific awards for his research.

Dr. Liras has for many years now cooperated with the Andalusian Hemophilia Association, of which he is a collaborating member. Asanhemo has always highly valued his interest, sensitivity and support not only for the Association but particularly for patients living with hemophilia or other congenital coagulopathies.

BASIC GUIDE
of
HEMOPHILIA

Clinical manifestations,
diagnosis and treatment

First edition in April 2015

Author: Dr. Antonio Liras
Professor of Physiology, Universidad Complutense of Madrid, Spain

English translation: Alejandro Caffarini
AC Intérprete de Conferencias, S.L.

Illustrations and design: *Daniel Belchí* (danielbelchi.es)

Printing: *Imprenta Pruna S. C.*

© 2015 ASANHEMO (Andalusian Hemophilia Association)
C/ Castillo Alcalá de Guadaíra, 7 – 4º A, 41013 – Sevilla

ISBN: 978-84-606-7268-5

INDEX

Preface	4
Blood and its function	5
What is hemophilia? Causes, types, symptoms and hereditary transmission	9
Acquired hemophilia	15
Treatment of hemophilia	17
Adverse effects of hemophilia treatment	24
Inhibitors in hemophilia	24
Inhibitor deletion protocols. Immune Tolerance Induction	29
Side effects of hemophilia treatment: Viral and emerging infections	29
Biotechnological treatments and Advanced Therapies	34
Recombinant factors: the safest treatment?	34
New recombinant factors	37
Advanced Therapies in hemophilia	38
For more information	43

PREFACE

This guide is dedicated to patients with hemophilia and well as their families and friends. It is aimed at a fundamental educational and informational goal, which is no other than providing a series of basic concepts and illustrations that may contribute to a better understanding of the nature of blood, the system that makes it circulate throughout our body and the things that happen when something goes wrong.

The guide is made up of four parts. The first one introduces some fundamental concepts that provide the reader with a basic understanding of blood and its functions. The purpose of this initial section is to lay the foundations needed for making sense of what follows in the subsequent chapters. The second part covers hemophilia, its causes, types, clinical symptoms and hereditary transmission. This is followed by a discussion on the treatment of the disease, the development of inhibitors and the potential side effects of treatment such as viral infections and emerging pathogens. The last section is the most promising and hopeful for any chronic patient that is under treatment as it provides an update on the new advanced therapies and biotechnological treatments.

In order to promote and increase the guide's impact and international reach, it is published in a bilingual (Spanish/English) flip format.

The book, published and promoted thanks to the Andalusian Hemophilia Association's commitment with education, would not have been possible without the contribution of a devoted team of individuals who selflessly dedicate their time and efforts to improving the quality of life of people with hemophilia.

Lola Camero

President of the Andalusian Hemophilia Association

BLOOD AND ITS FUNCTION

Blood is a fluid tissue that circulates throughout the body forced by the constant pumping of the heart. As it flows through an intricate network of blood vessels, this precious resource brings life to all the different organs in the body. The heart delivers the blood to large vessels called arteries, which branch out into a tree of progressively smaller vessels until it is fed into the hundreds of millions of capillaries that irrigate all the cells of the body, from where it makes its way back to the heart through the veins.

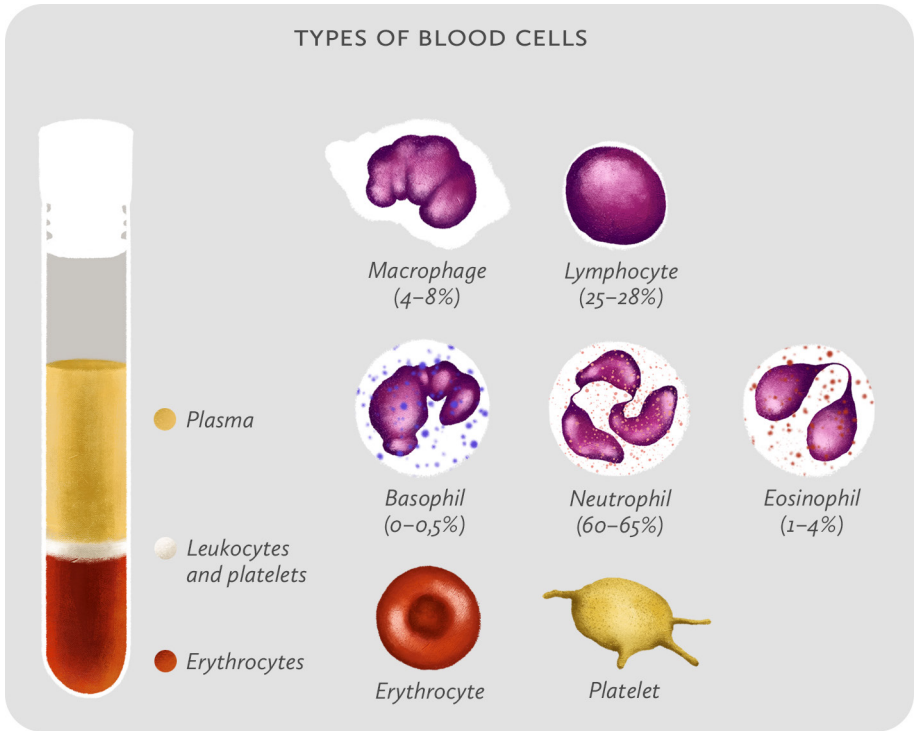
But, what purpose does the blood serve? Blood is a fluid that allows communication within a living being. Thus, the life-sustaining substances manufactured by different organs travel in the blood and are delivered to the cells providing them with nutrients they require, enabling them to recognize certain physiological situations and constantly informing them about the needs of our body. For example, after digesting a meal, the vessels that irrigate the digestive system absorb the nutrients obtained from the food consumed. In the same way, the red blood cells in the lungs fill with oxygen through a gas exchange mechanism and the oxygen- and the nutrient- rich blood is distributed throughout the body, i.e. to all the cells that make up the different tissues, to all the tissues that make up the different organs and to all the organs that make up each system. The nutrients and the oxygen are all that the cells need to live, create energy and maintain the balance of all vital functions. This process, called cell metabolism, creates waste products that are taken up by the blood and transported to the liver for detoxification or directly to the kidneys for elimination.

Blood is formed by a fluid part called plasma and a solid component, the blood cells. The cell component comprises erythrocytes or red blood cells, leukocytes or white blood cells and platelets or thrombocytes. Erythrocytes are by far the most numerous. They possess millions of hemoglobin molecules, which give blood its red color. Because of their structure, erythrocytes can combine with oxygen, which they transport to the tissues of all organs, thus fulfilling their most important function: oxygenating the body.

As regards leukocytes, these blood cells are responsible for providing immunity against infection. The most numerous leukocytes are the neutrophils, followed by lymphocytes. Neutrophils are phagocytic cells, that is, they are capable of phagocytosing or ingesting strange molecules, such as pathogenic microorganisms, and kill them with

lethal digestive enzymes before the occurrence of disease. These immune responses are present from birth. Lymphocytes, on the other hand, act when infection has occurred. They learn the best way to attack each pathogen, develop a memory of the foreign substance and produce antibodies in case future attacks. This dual immune protection, innate immunity (present at birth) and acquired immunity (developed in response to a specific pathogen) act in a coordinated manner to fight any infection.

Finally, platelets or thrombocytes, as their name implies, are blood cells whose function is to promote blood coagulation by producing thrombi or clots. Platelets are very small as they are really fragments originated in the cytoplasm of a stem cell, and they make up the largest part of the clots that are formed by the body to prevent blood loss following a vascular lesion.



The renewal of blood cells is essential as these cells gradually age and are destroyed. Such renewal takes place in the bone marrow through a process called hematopoiesis. The bone marrow contains the progenitor cells of each of the cell types mentioned, which differentiate to functional cells and are subsequently released into the bloodstream.

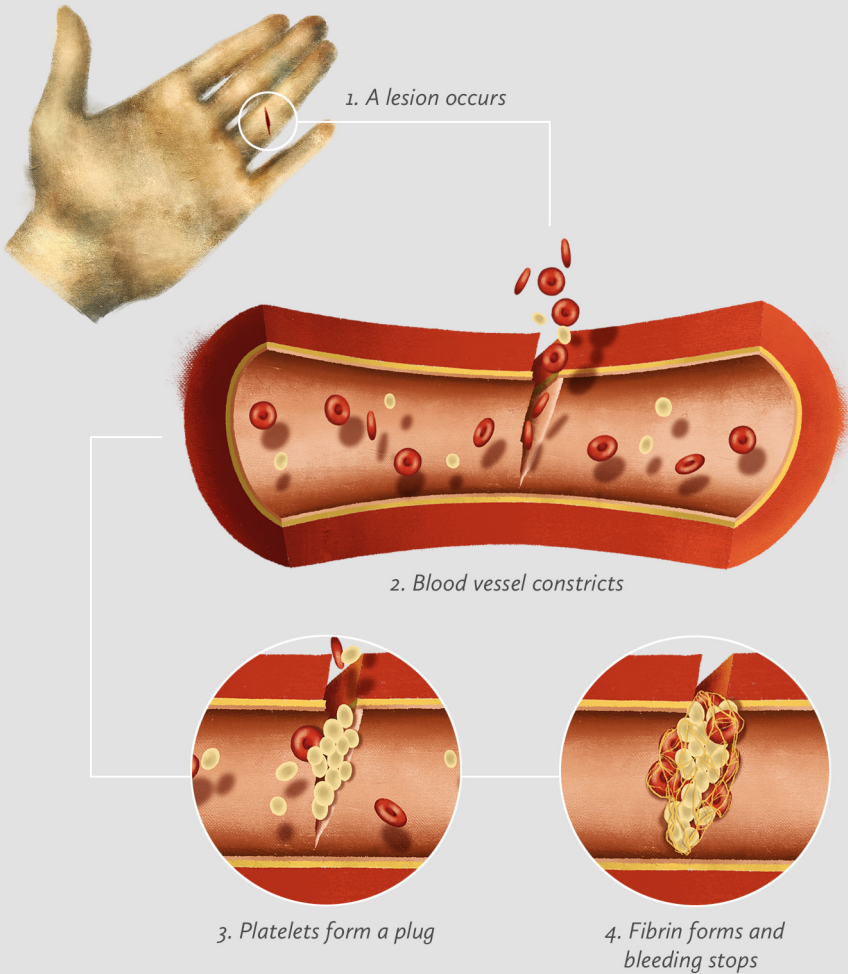
On the other hand, plasma, i.e. the fluid portion of blood, contains different types of proteins and many water soluble molecules such as sugars, hormones, enzymes, antibodies and other proteins such as albumin, globulins and fibrinogen.

A hemorrhage occurs when blood leaks out of the blood vessels. The lack of blood will impair circulation and result in decreased oxygen supply to tissue (anoxia), with symptoms such as pallor, sweating, nausea, vomiting, faintness, cramps, etc. Tissues may become damaged and suffer irreversible sequelae; even death may ensue. Hence the vital importance of blood transfusions.

Damage of a blood vessel triggers the activation of certain physiological mechanisms aimed at stemming the hemorrhage; this is what is called hemostasis. When the lining of a vessel breaks, the collagen proteins in the vessel wall are revealed (collagen is an important constituent of the vessel wall), which unleashes three independent but overlapping hemostatic mechanisms: vasoconstriction, platelet plug formation, and coagulation of blood through the creation of a fibrin mesh (red thrombus) that entraps the platelet plug. In the absence of vascular damage, i.e. when the vessel lining is intact, platelets repel each other, but when a vascular lesion occurs the collagen in the vessel walls becomes exposed, and the platelets bind to it. When this binding occurs, platelets become activated and release a series of granules. These granules in turn release substances that stimulate constriction (narrowing) of the damaged vessel (thus decreasing the bleeding) and, at the same time, attract other platelets that will bind to the ones already adhered to the collagen. These platelets will release further granules, and the process continues through successive iterations. A platelet plug (white thrombus) is thus created in the damaged vessel, which is reinforced by fibrin, an insoluble protein derived from fibrinogen that creates a network of tough fibrin fibers that form a stable hemostatic clot. Thus, blood clots contain platelets and fibrin, and often entrapped red blood cells that give the clot its red color. Finally, contraction of the platelet mass forms a more compact and efficient plug that will prevent bleeding in the event of a mild hemorrhage.

How does fibrinogen turn into fibrin? This is where the coagulation factors circulating in the blood come into play. Fibrinogen itself is one of those coagulation factors, but it needs the help of another twelve clotting factors in order to turn into fibrin. In a vascular lesion the phospholipids of the damaged vessel wall, which are released together with the collagen, activate a first coagulation factor. This factor activates a second clotting factor, which in turn activates a third one, and so forth. This activation cascade ends with the activation of fibrinogen to form fibrin.

PROCESS OF BLOOD COAGULATION



The absence or deficiency of any of these coagulation factors – which is what happens in hemophilia – disrupts the aforementioned chain of reactions, inhibiting the production of fibrin and thereby making it impossible to stabilize the clot. Conversely, an excessive increase in the plasma levels of coagulation factors would lead to a decrease in blood fluidity, hampering normal circulation and raising the serious risk that an unstabilized thrombus may steal into the bloodstream and occlude a vessel causing an embolism. Nonetheless, there are natural endogenous anticoagulants that promote blood flow and prevent blood from coagulating when this is not required. This means that when blood vessels have been “repaired,” another blood protein called plasminogen activates to plasmin, which degrades fibrin promoting the dissolution of clots that are no longer required.

Therefore hemostasis is all about striking a very delicate balance between the mechanism of fibrin formation through the successive activation of the different coagulation factors and the fibrinolysis process whereby fibrin fibers are degraded.

WHAT IS HEMOPHILIA? CAUSES, TYPES, SYMPTOMS AND HEREDITARY TRANSMISSION

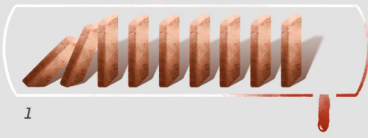
Hemophilia is a disease that affects the clotting of blood. It is characterized by the absence or deficiency of one of the elements, called factors, required for blood coagulation. In hemophilia A it is factor VIII that is nonexistent or deficient, whereas in hemophilia B the absent or insufficient factor is factor IX. As the number of patients with hemophilia is low, it is considered a rare disease (hemophilia A occurs in 1 in every 6,000 live births whereas hemophilia B in 1 in every 30,000).

The first mention to hemophilia dates to the Babylonian Talmud of the 2nd century AD, which discusses the predisposition of males in certain families, sometimes connected with one another, to profuse bleeding following circumcision. Such was the concern that the laws were changed to exempt these young men from the ritual. In the 21st century we have learnt that some persons are born with certain malfunctioning molecules that predispose them to hemophilia. The history of the disease has been marked by two fundamental milestones. One of them was the discovery by Patek in 1937 of some of the proteins that participate in blood clotting; the other was the discovery of the structure of deoxyribonucleic acid (DNA) by Watson and Crick in 1953. From the times of King Alfonso XIII of Spain whose eldest son was born a hemophiliac just over 100 years ago, things have changed so much that today we know that the disease is not caused by damage by syphilis bacteria to the endothelium of blood vessels; that people with hemophilia no longer die young; and that egg-whites, peanut flour and snake poison do not cure the disease.

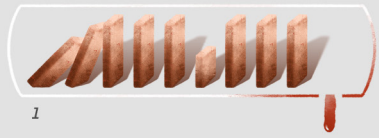
Blood clotting can be conceived of as a row of domino tiles one after another. If you flick your finger against the first domino, all the others will fall. If we did this inside a tube with a hole that was plugged by the last tile, we would have succeeded in preventing the fluid going through the tube from leaking out. Hemophilia constitutes the situation where one of the tiles in the middle is shorter than the others and is not capable of pushing the following dominoes in the row. Thus the hole stays open and the blood leaks out. This is a crude description of the coagulation cascade, the dominoes standing for the clotting factors and the last tile for the fibrin clot.

FIGURATIVE COAGULATION CASCADE MODEL

Normal coagulation



Hemophilia

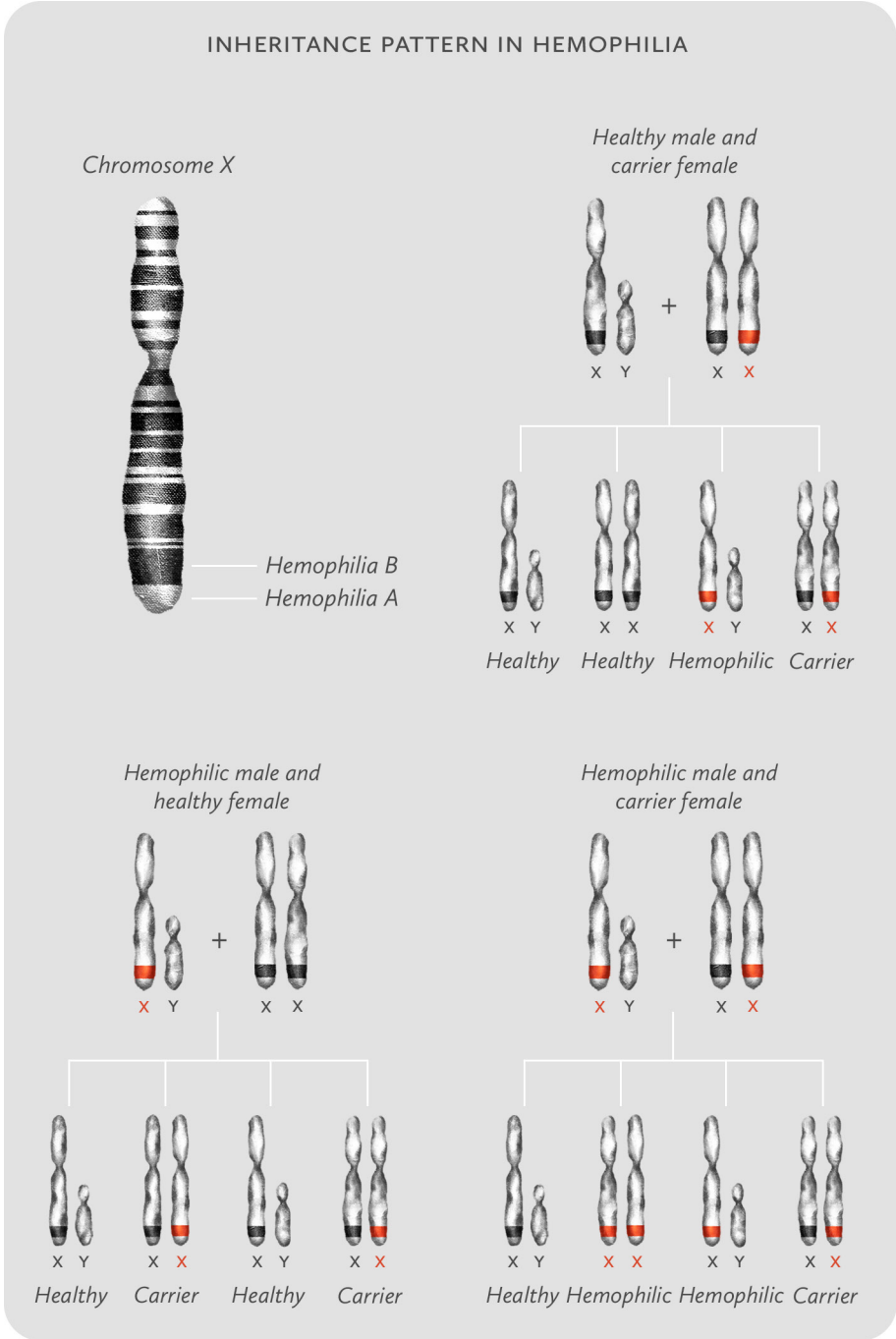


Both types of hemophilia are characterized by bleeding episodes and both result in joint damage. What sets them apart is the tile that is defective in each of them. Thus, in hemophilia A the deficiency is in the factor VIII tile whereas in hemophilia B it is in the factor IX one. Some hemophiliacs have a certain quantity of their affected coagulation factor, while in others the clotting factor is altogether absent. In other words, hemophilia can occur in different phenotypes or degrees of severity. Thus, some patients present with a mild phenotype of the disease, i.e. they have 5-40% of normal levels of clotting factor; others present with a moderate phenotype, i.e. their factor levels are 1-5% of normal; and the last group present with a severe phenotype with less than 1% of normal levels. The last group includes a not-so-unusual group of patients with no clotting factor at all.

Hemophilia is a hereditary disease that is transmitted from parents to their children and to successive generations. It is caused by a faulty gene located on the x chromosome. This chromosome is a sex-determining chromosome, which means that it is transmitted by females, who themselves have no symptoms, and suffered by males. Females have two x chromosomes whereas males have one x and one y chromosome. Transmission of hemophilia is said to be recessive and non-dominant since the disease may not appear in the next generation (generation skipping). Indeed, all daughters born to a man with hemophilia will be carriers but none of his sons will have hemophilia. In effect, hemophilia only becomes an issue when the daughters are considering starting a family.

Abnormalities in coagulation factors arise as a result of defective synthesis of such clotting factors by the human body. Hemophilia being a hereditary condition, the defect is located in the gene that

produces the clotting factor. A coagulation factor is defective as a result of changes in the gene that coded for that factor. The gene, which is actually a fragment of DNA, is like a book made up of a huge amount of words, where a defect would be equivalent to changing one letter, one paragraph or tearing off a whole page from the book. The result of these changes is the development of abnormalities that can range from very minor to extremely serious, depending on the different degrees of factor deficiency (mild, moderate, severe) described above. In the case of hemophilia A the most common factor viii defect is intron 22 inversion, which in our example would be equivalent to moving the pages in the second half of the book to the beginning. But the defect may also be due to changes in a single

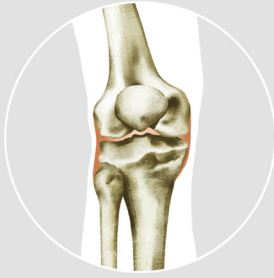


letter (point mutations), the removal of a few sentences (deletions) or the introduction of random words or phrases into a page (insertions). In the case of hemophilia B, errors are also due to point mutations, deletions and insertions, but also to the tearing of a few pages off the book, or the exchange of pages of one book for those of another one that bears no relationship with the former.

Hemophilia, whether type A or type B, is characterized by either spontaneous hemorrhagic manifestations or profuse bleeding following some kind of trauma. It is also important to distinguish between joint, muscle and other bleeding episodes which, on some occasions, can be severe.

To better understand the meaning and significance of joint bleeding for a hemophilic patient, a few basic concepts must be considered about these anatomical structures. Bones are partially held together by a joint capsule that is in turn lined by the so-called synovial membrane with its vast network of capillaries (small blood vessels). The synovial membrane produces a viscous fluid that facilitates smooth joint movements and prevents rubbing between the articulating bones. It acts like a lubricant that reduces friction at the connecting rod in an engine. Injury to the capillaries in the synovial membrane will cause bleeding. But bleeding can also occur spontaneously from an uninjured capillary as a result of the natural movements of a joint. In a person without hemophilia, the clotting mechanism instantly stems the hemorrhage; but in hemophiliacs the bleeding persists. This causes joint swelling and pain. The onset of joint bleeding, also known as hemarthrosis, is characterized by tingling and a burning sensation in the involved articulation. As the capsule fills with blood, the joint will appear swollen and the pain will intensify until all mobility is virtually lost. Without appropriate treatment, repeated bleeding into the same joint causes the synovium to swell and bleed more easily, the blood accumulating in the joint results in progressive tissue damage, production of synovial fluid decreases and friction between the bones leads to partial or total destruction of the joint. This situation, which causes varying degrees of joint deterioration, is known as osteoarthritis or hemophilic arthropathy and may be highly disabling. The joint becomes stiff, painful on movement and unstable. And it becomes even more unstable as the muscles around it start weakening. These hemorrhages occur chiefly in the knee (44% of cases), the elbow (25%), the ankle (15%), the shoulder (8%), the hip (5%), with other locations accounting for only 3% of cases.

GENERAL SYMPTOMS OF EVOLUTION OF AN
ARTICULAR BLEEDING OR HEMARTRO



- *Creaking*
- *Tingling*
- *Burning sensation*



- *Inflammation*
- *Pain*
- *Burning sensation*



- *Viscous sensation and gelling touch*
- *Inflammation*
- *Muscle weakening*
- *Morning stiffness*
- *Chronic pain*
- *Limited movement*

Nowadays, –if treated appropriately– patients with hemophilia do not die of a mild, moderate or even severe bleed. The real problem, from a clinical and health policy perspective, is hemophilic arthropathy.

Muscle bleeding, for its part, occurs following a lesion to the muscle capillaries. Sometimes the cause of such lesions is known, but at other times no apparent reason can be identified. Further to the bleeding, the muscle becomes stiff and painful. It then becomes swollen, hot on palpation and painful. Bruises develop if bleeding is superficial, but if the hemorrhage occurs in the deeper muscle layers, pressure could be exerted on nerves and/or arteries resulting in tingling and numbness. The final result is usually muscle spasm, a protective muscle contraction that affects the joints pulled by that muscle. Muscle bleeding often occurs in the calves, thighs and the upper portion of the arms.

Bleeding into the psoas muscle (in the front of the hip) or into the muscles of the forearm (both of them fairly frequent occurrences) may affect nerves and arteries and therefore cause irreversible and permanent damage.

Other severe bleeding episodes are those affecting the head, which generally result from injury and may lead to death, especially in children. These hemorrhages may cause pain, nausea, vomiting, drowsiness, confusion, clumsiness, weakness, convulsions and loss of conscience. Hemorrhage from the throat may result from some infections, injuries, dental injections or surgery, and they may cause inflammation as well as swallowing and breathing difficulties. Other potentially very serious hemorrhages, although they do not generally

pose a threat to the patient's life, include hemorrhages in the eyes, the dorsal spine and in the psoas muscle. Hematuria, or blood in the urine, although seldom dangerous, is common in severe hemophilia.

HEMOPHILIC ARTHROPATHY



Nowadays, hemophilia is treated by means of intravenous administration of the deficient factor, VIII or IX, at the appropriate dose depending on age and degree of severity of the bleeding episode. Factor concentrates may be plasma-derived or recombinant. Both are subject to viral inactivation procedures. Although factor administration is the standard of care, some patients develop an immune response against the administered exogenous coagulation factor. The greater the clotting factor deficiency, the stronger the immune response. Patients who develop the so-called

“inhibitors” are treated with combined clotting factor concentrates or with activated factor VII.

Nowadays, treatment of hemophilia has come a long way, and patients can treat themselves at home and achieve a high degree of autonomy. Self-treatment requires training by healthcare professionals.

Hemophilia can currently be diagnosed by prenatal screening during the fetal stage. Prenatal tests include amniocentesis (taking a sample of amniotic fluid by a needle inserted into the abdomen); chorionic villus sampling; and cell-free fetal DNA analysis, which involves taking a blood sample from the mother. In the case of assisted reproduction, parents may opt for preimplantation genetic diagnosis whereby embryos created in vitro are screened for inherited diseases. These diagnostic tests provide couples of childbearing age genetic advice as

to whether to embark on a pregnancy or not. Post-natal tests include mutation analysis and determination of clotting factor concentrations.

In summary, notwithstanding the risks inherent in deficient blood coagulation, it can be said that nowadays if the right treatment is administered (both in terms of safety and efficacy) and particularly if such treatment is a prophylactic one, patients with hemophilia can enjoy a very good quality of life and a close-to-normal life expectancy

ACQUIRED HEMOPHILIA

Acquired hemophilia is a bleeding disorder which, although rare, may place the patient's life at risk. Between 0.2 and 1.9 cases are reported for every 1,000,000 inhabitants every year.

This type of hemophilia results from the development of autoantibodies (inhibitors) in persons without hereditary hemophilia or a family history of the disease. These antibodies are normally directed against factor VIII in both adult men and women. Rare cases of autoantibodies against factor IX have also been identified. Therefore the main difference between acquired and congenital hemophilia is that the former is not transmitted from parents to their children, although transmission of a predisposition to form autoantibodies is a possibility.

Although the clinical manifestations of the disease are highly variable across the patient population, symptoms are related, in 80% of subjects, with spontaneous bleeding into the skin, muscles, soft tissue and the mucosae. Hemarthrosis, which is so common in hereditary hemophilia, is very rare in patients with acquired hemophilia. All in all, bleeding episodes can at times be severe, as in the case of retroperitoneal and intramuscular hematomas and of brain hemorrhage. Another manifestation is prolonged bleeding following childbirth, a serious accident or a surgical procedure. Statistics show that in 50% of cases, the disease can be lethal if the appropriate therapeutic measures are not adopted.

The presence of inhibitors is transient in 14 to 35% of cases and disappears without treatment within 20 months. In 54% of cases these result from prenatal and postpartum conditions, immune disorders (autoimmune diseases), certain infections, some drug-to-drug interactions, presence of neoplasms or to drug consumption. The remaining 46% of cases are of idiopathic origin, i.e. the cause is

unknown.

Diagnosis of the disease is simple as it is based on detection of abnormalities in typical coagulation parameters such as an increase in bleeding and coagulation time, a decrease in the number of platelets, longer prothrombin time and longer activated partial thromboplastin time (APPT).

There are two possible kinds of treatment. One aims at getting rid of the antibodies (inhibitors); the other focuses on stopping the bleeding.

Inhibitor eradication is achieved through the use of immunosuppressive drugs such as prednisone and cyclophosphamide aimed at dampening the immunity response of the body. The so-called immunomodulators, such as immunoglobulins, have also shown themselves to be effective at high doses. More recently, a new drug called rituximab has been introduced. It is a monoclonal antibody directed against the CD20 antigen located on the membrane of B lymphocytes, which play a key role in the formation of inhibitors. This drug is also used in patients with congenital hemophilia and inhibitors.

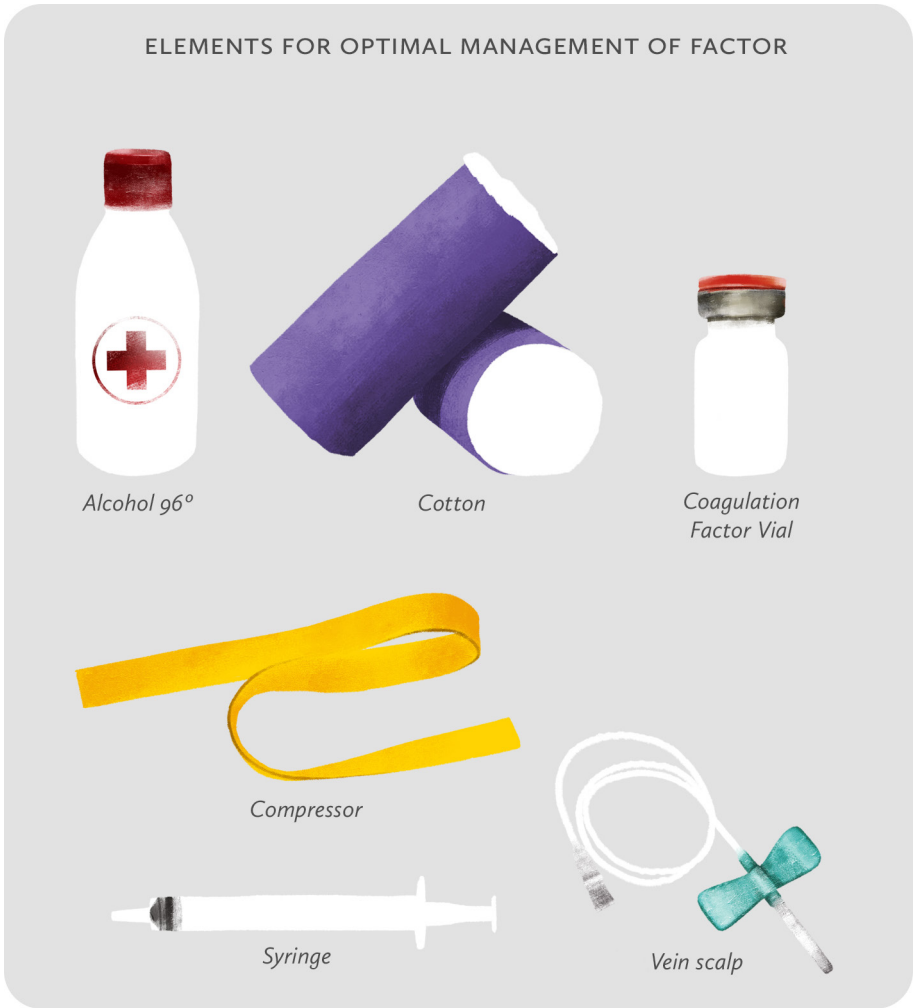
Treatment of bleeding episodes depends on the titer (amount) of antibodies in the patient's plasma. If the titer very low, i.e. below 5 Bethesda units, very high doses of intravenous factor VIII or high doses of immunoglobulin G or desmopressin must be used. If the inhibitor titer is higher than 10 units, porcine factor VIII or activated prothrombin complex can be administered. Although a much more costly alternative, recombinant activated factor VII is also extremely effective. In patients with a very high titer of anti-factor VIII antibodies that have been refractory to immune tolerance induction treatment for 20 months, plasmapheresis therapy is recommended. Plasmapheresis consists in withdrawing the patient's blood, filtering out the antibodies and finally reinfusing the blood back into the patient's bloodstream. However, plasmapheresis is a transient remedy as it is usually not long before autoantibodies start accumulating again.

To conclude, although the circumstances surrounding acquired hemophilia seem very similar to those observed in cases of congenital hemophilia with inhibitors, the former is a distinct clinical entity as it is brought about by autoimmune antibodies, i.e. the body itself produces antibodies against its own normal and properly-functioning coagulation factor. Both conditions may have similar, and sometimes overlapping, consequences in terms of the bleeding they originate,

and the treatment protocols for both may also coincide, but the two must never be confused, especially as regards the hereditary component of congenital hemophilia.

TREATMENT OF HEMOPHILIA

The main goal of hemophilia treatment is to replace or supplement the patient's deficient coagulation factor with normal coagulation factor in order to prevent or address an acute bleeding episode. Exogenous coagulation factors are always administered intravenously, abiding by strict cleaning and disinfection procedures.



Antihemophilic factor concentrates may be classified into two large groups according to their source. Those obtained from human plasma —plasma-derived antihemophilic factors— and those obtained by means of genetic engineering techniques in cultured cells - recombinant factors.

Antihemophilic factors can also be classified in terms of other criteria such as their purity, i.e. clotting activity per milligram of total protein in the final product; the degree of inactivation of viral pathogens; their stability during the preparation process; the presence or absence of animal or human proteins in the culture medium (only in the case of recombinant factors); and the presence or absence of such proteins in the final stabilization of the product.

The fundamental criteria that govern the choice of a certain antihemophilic factor rather than another for treating a patient include the safety of the product as determined by its capacity of preventing the transmission of viral or other pathogens and the ability not to induce the development of inhibitors. Other criteria have been cited such as the clinical/analytical condition of the patient, availability of the product, ease of preparation and administration, cost and the manufacturing laboratory.

**CRITERIA FOLLOWED TO CLASSIFY ANTIHEMOPHILIC
FACTOR CONCENTRATES**


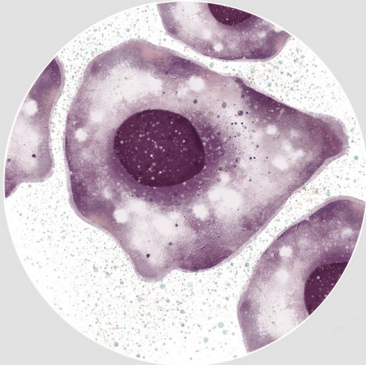
- Derived from human plasma
- Derived from mammalian or human cells through genetic engineering techniques
- Degree of purity (amount of contaminating proteins)
- Inactivation of viral pathogens
- Stability during the preparation process
- Presence or absence of animal or human proteins in the culture medium
- Presence or absence of animal or human proteins as stabilizers
- Half-life

An important advantage of recombinant factors is that, unlike plasma-derived factors, they are susceptible of improvement. It is precisely for this reason that recombinant factors hold so much promise for the future of hemophilia treatment. In fact, it is still possible to further improve their safety, efficacy, their (already low) capacity to produce inhibitors, and their ease of administration. In terms of safety, recombinant factors are growing safer and safer as the amount of human and animal proteins used to stabilize them during their manufacturing process and those present in the final

product are being significantly reduced. Actually, these proteins are no longer used in the new recombinant factors. As regards efficacy, longer half-life recombinant products are being tested through the use of pegylation, liposomes and fusion proteins, as well as other methods such as the alteration of the cleavage sites in the factor molecules or the binding sites of these molecules to hepatocytes or collagen proteins, which inactivate them. This will decrease the amount of factor concentrates needed to treat each bleeding episode, both on demand and prophylactically. Induction of inhibitors will be further diminished with the recombinant factors of the future as this technology will make it possible to modify the sites in the exogenous factor molecule that the body perceives as extraneous and accordingly sets out to attack by getting the immune system to generate inhibitors. Lastly, the new recombinant factors will be much more convenient as a result of their greater stability at room temperature and their potential to be dissolved in a small amount of water given their lower protein content. This will make them easier to transport and easier to prepare and administer, even in continuous perfusion regimens.

Manufacturing plasma-derived factors requires the use of human blood obtained from a large number of donors. Approximately 150 donors are required to obtain 1000 units of factor VIII, which means that the blood comes from a very heterogeneous source. Conversely, recombinant factors are obtained from selected and generically manipulated mammalian cells (infused with the human factor VIII or IX gene) that are cultured in the lab. This type of factor is thus obtained from a much more homogeneous, controlled and safe source.

FACTOR TYPES

	
<p>PLASMA-DERIVED FACTOR <i>Human plasma from thousands donors</i></p>	<p>RECOMBINANT FACTOR <i>Mammalian cells or human</i></p>

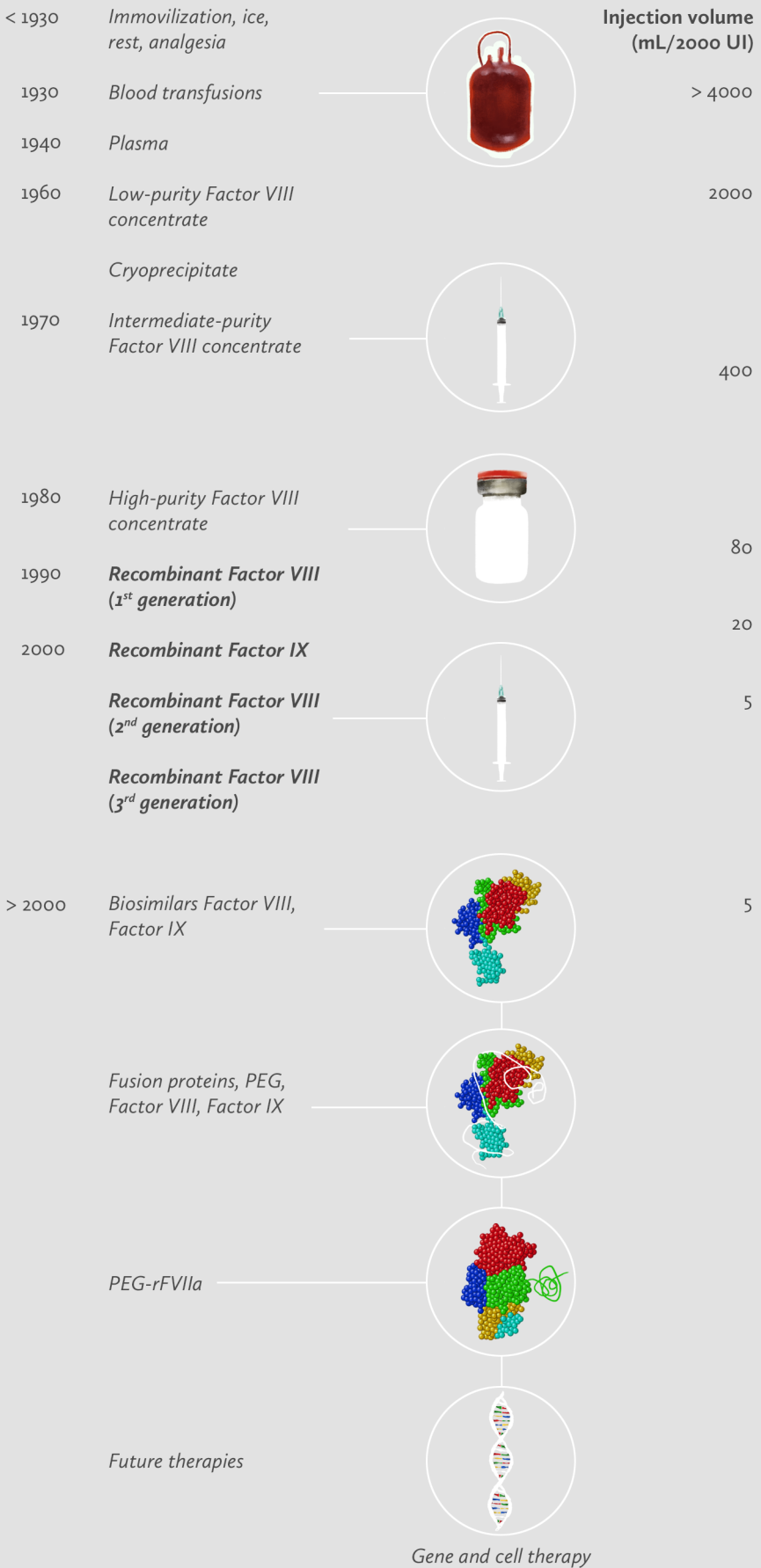
The higher or lower amount of proteins present in factor concentrates indicates the higher or lower risk posed by such products. Specifically, the more contaminating proteins, which are not factor proteins, the higher the risk to suffer undesirable effects. The content of extraneous proteins in plasma-derived factors is much higher than in recombinant factors, and within the group of recombinant factors, second generation factors contain more of these proteins than third and fourth generation ones. The amount of extraneous proteins present in the final product, the viral inactivation method used and the source where the factor was initially obtained are what determines the level of safety of each product with respect to infections caused by viral or other pathogens.

**HISTORY OF INFECTIONS
IN THE LAST 24 YEARS**

- Plasma-derived factors: HIV/HCV/HBV/VHA/PV B19/ Prions
- Recombinant factors: have been no infections

The viral inactivation methods used in the manufacturing process of both plasma-derived and recombinant factors eliminate viruses with a lipid (fatty) envelope around them such as HIV (human immunodeficiency virus), HCV (hepatitis C virus), HBV (hepatitis B virus), the West Nile virus, the virus causing SARS (severe acute respiratory syndrome) and the avian influenza virus, among others. However, if we consider protection against non-lipid enveloped viruses such as parvovirus B19, HAV (hepatitis A virus) and other viruses without an envelope, or against other types of pathogens such as the prions causing vCJD (variant Creutzfeldt-Jakob disease, or “mad cow” disease in humans), plasma-derived the degree of safety provided by plasma-derived factors could be lower.

EVOLUTION IN THE TREATMENT OF HEMOPHILIA



Throughout the medical history of the disease, hemophilia has been treated with both plasma-derived and recombinant factors. Around 1970 the first plasma-derived antihemophilic factors became available. In their first 11 years of existence, these factors were responsible for the infection of the hemophilic population with HIV, HCV, Parvovirus B19 and HAV giving rise to the a notorious pandemic. At the beginning of the 90's, the first recombinant factors appeared, and their use has been gradually replacing that of plasma-derived factors. Nonetheless, recombinant antihemophilic factors are not the only recombinant proteins use for the treatment of disease.

**REASONS FOR USING
PLASMA-DERIVED FACTORS**

- Patients' individual and personal wish
- Previous history of inhibitor formation
- Inhibitor deletion
- Unavailability of recombinant factors
- Developing countries
- Lower cost
- Personal interests of prescribing physician

Other examples are insulin, interferon alpha and vaccines. These proteins have also been widely used in modern medicine for many years. The safety of recombinant factors is amply supported by the 24 years during which they have been used for treating hemophilia without resulting in one single adverse effect.

In spite of all the clinical and scientific evidence in favor of the use of recombinant factors as the treatment of choice for hemophilic patients, they are not used to the same degree in every country.

While in countries like Canada, the United States and Australia they are available to every patient, in Europe they are used by 75% of hemophilic patients, and in some Asian countries like Japan and Korea 50% of patients benefit from treatment with those products. Nonetheless, in less prosperous regions their use barely hits the 10% mark.

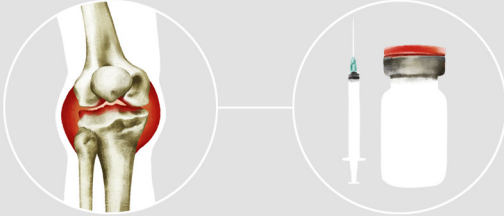
Use of recombinant factors as first choice treatment for the hemophilic population is currently supported by several internationally recognized organizations such as the US National Hemophilia Foundation, the

Canadian Hemophilia Society, Hemophilia Foundation Australia, the United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organization and the Scientific Commission of the Victoria Eugenia Royal Hemophilia Foundation (Spain).

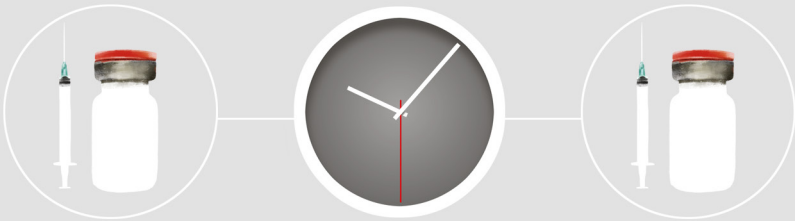
GUIDELINES FOR TREATMENT OF HEMOPHILIA

ON-DEMAND TREATMENT

1. Treatment is applied once the bleeding has occurred



2. Coagulation factors are perfused every 12 or 24 hours



PROPHYLACTIC TREATMENT

1. Treatment is usually administered 2 or 3 times a week



Those who advocate the use of plasma-derived rather than recombinant factors for treating hemophilia claim that these products are less expensive. However, it should not be forgotten that plasma-derived products can lead to other healthcare expenses as a result of the fact that their level of safety is not always very high. Such expenses are related with anti-HIV, HCV or HBV, treatment, psychological treatment for patients and their families, reproductive treatments for serodiscordant couples (to prevent contagion and transmission to descendants), treatment of the sequelae of HIV and HCV infection, economic compensation, work absenteeism, etc. But, more importantly, there is a high cost in terms of human lives as many of these infections have been, and still are, fatal.

CRITERIA USED TO DECIDE WHICH KIND OF FACTOR TO USE IN PATIENTS WITH HEMOPHILIA

- Safety regarding transmission of viral or other kinds of pathogens
- Capacity to prevent the development of inhibitors
- Clinical/analytical conditions of the patient
- Product availability
- Ease of preparation and administration
- Cost
- Brand (manufacturer)

Despite the above, some medical/clinical circumstances may on some occasions justify the use of plasma-derived factors. For example, a personal wish of the patient; a previous history of inhibitor formation following use of plasma-derived or recombinant factors; the need to delete an inhibitor (immune tolerance induction) or the unavailability of recombinant factors. In developing countries such as those in Africa and Latin America, the use of plasma-derived factors is justified because of the scarcity of resources affecting these countries.

Regardless of the type of factor used, treatment of hemophilia can be approached in two ways. First of all, there is treatment on demand, which involves administration of the deficient coagulation factor when a bleeding episode occurs. The other type of treatment is prophylaxis, whereby the clotting factor is preventively administered two or three times even if no bleeding occurs.

ADVERSE EFFECTS OF HEMOPHILIA TREATMENT

INHIBITORS IN HEMOPHILIA

Although currently available treatments for hemophilia are very safe and efficient, they are associated with a few complications such as the potential development of the so-called inhibitors of coagulation factors. This means that a certain percentage of patients treated with (plasma-derived or recombinant) antihemophilic factor concentrates will develop inhibitors. These are antibodies that neutralize or “inhibit” the function of factors in the coagulation cascade.

Development of these antibodies impairs patients' quality of life as the treatment available for inhibitor eradication is unsatisfactory. In addition, it is associated with significant socio-economic consequences as it substantially increases the cost of antihemophilic treatment as much higher amounts of clotting factor, or the use of other products, may be required to treat each bleeding episode.

The likelihood that a patient may develop inhibitors depends on multiple factors, among them whether the patient has received previous antihemophilic treatment; whether there has been a change in the type of factor administered or in the manufacturer of such a factor (although this aspect has been shown to exert a decreasing influence); the severity of the disease; the type of hemophilia suffered (up to 30% for hemophilia A and up to 8% for hemophilia B); the patient's age (inhibitors usually appear following the first few factor VIII or IX concentrate infusions, which generally coincides, in moderate and severe cases, with the first few years of life); a genetic predisposition (race-related factors), etc. But apart from the frequency of inhibitor development, it is also important to know the inhibitor titer, that is, the amount of inhibitors in the bloodstream of each patient. Thus when the inhibitor titer is low, their presence is usually transient and they disappear after continued treatment with coagulation factors or following treatment with increasing infusions of the factor that led to their development. Nonetheless, if the inhibitor titer is very high the antibodies tend to display such a high level of activity that they neutralize the effect of the administered factors.

It the last few years there has been a lot of speculation as to the causes behind the development of inhibiting antibodies. It seems that genetic factors could be at play, chiefly those related with the type of genetic alteration that gives rise to hemophilia. Thus, for example, in hemophilia A, patients with mutations affecting a significant portion of the factor VIII gene develop inhibitors more frequently (around 35% incidence) than patients where the genetic deficiency in the factor is due to small mutations (around 5% incidence).

As regards hemophilia B, patients with mutations affecting a significant portion of the factor IX gene have a 50% chance of developing inhibitors. This probability decreases to 20% when mutations arise from less significant alterations in the gene. Furthermore, a higher risk of developing inhibitors is related with being a first or second degree relative of a patient with inhibitors and with the major histocompatibility complex.

In the same way as it reacts against any extraneous molecule, our immune system also launches a response to the presence of an exogenous antihemophilic factor (from outside the patient's body) by creating inhibitors against that factor. This immune response is mediated by blood cells such as B and T lymphocytes.

The same patient may present with more than one kind of inhibitor. The most common are IgG class inhibitors, most of them targeted against specific sites in the factor molecule. For example, anti-factor VIII inhibitors bind to the sites required by factor X; factor IXa; factor IX, or by vWF (von Willebrand factor) and factor Xa. They may target just one of these sites or many of them simultaneously. Interaction of inhibitors with the binding sites for other factors leads to a disruption of the coagulation cascade, such that treatment with an antihemophilic factor becomes ineffective.

The presence of inhibitors is generally confirmed by a so-called Bethesda assay, which quantifies the amount of antibodies found in the patient's blood, expressed in Bethesda units. According to this assay, patients may display a low immune response (with a low inhibitor titer) or a high immune response (with a high inhibitor titer) to the exogenous factor. Thus, if their immune system reacts rapidly and intensely, the inhibitor titer may rise above 5 Bethesda units. Such inhibitors are classified as high-responding inhibitor. However, the immune system may produce a slower and weaker response, with the inhibitor titer staying below the 5 Bethesda unit mark. These inhibitors are known as low-responding inhibitors.

Patients presenting with low-responding inhibitors can benefit from immune tolerance protocols (frequent infusions of high doses of clotting factor), whether they have hemophilia A or hemophilia B. Moreover, patients with high antibody titers are usually subjected to plasmapheresis (exchange of all of the patient's blood, following an immune adsorption procedure to lower the inhibitor titer) before receiving antihemophilic factor treatment. Nevertheless, plasmapheresis therapy is just a temporary solution as a new factor infusion will again stimulate the development of inhibitors.

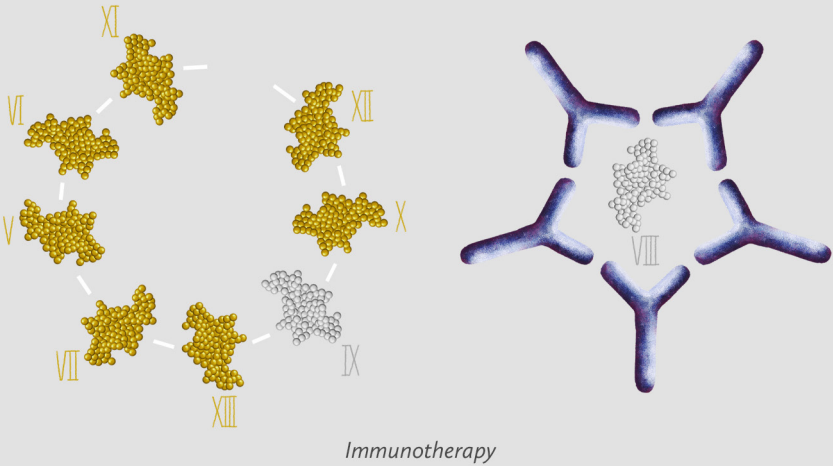
At present, several more or less conventional —and more or less effective— strategies are used to treat hemophilic patients with high-responding inhibitors. The best results have been obtained with recombinant activated factor VII and with activated prothrombin complex concentrates (APCCs), albeit effectiveness of the latter

TREATMENT IN PATIENTS WITH INHIBITOR

rF-VIIa

APCCs

FEIBA

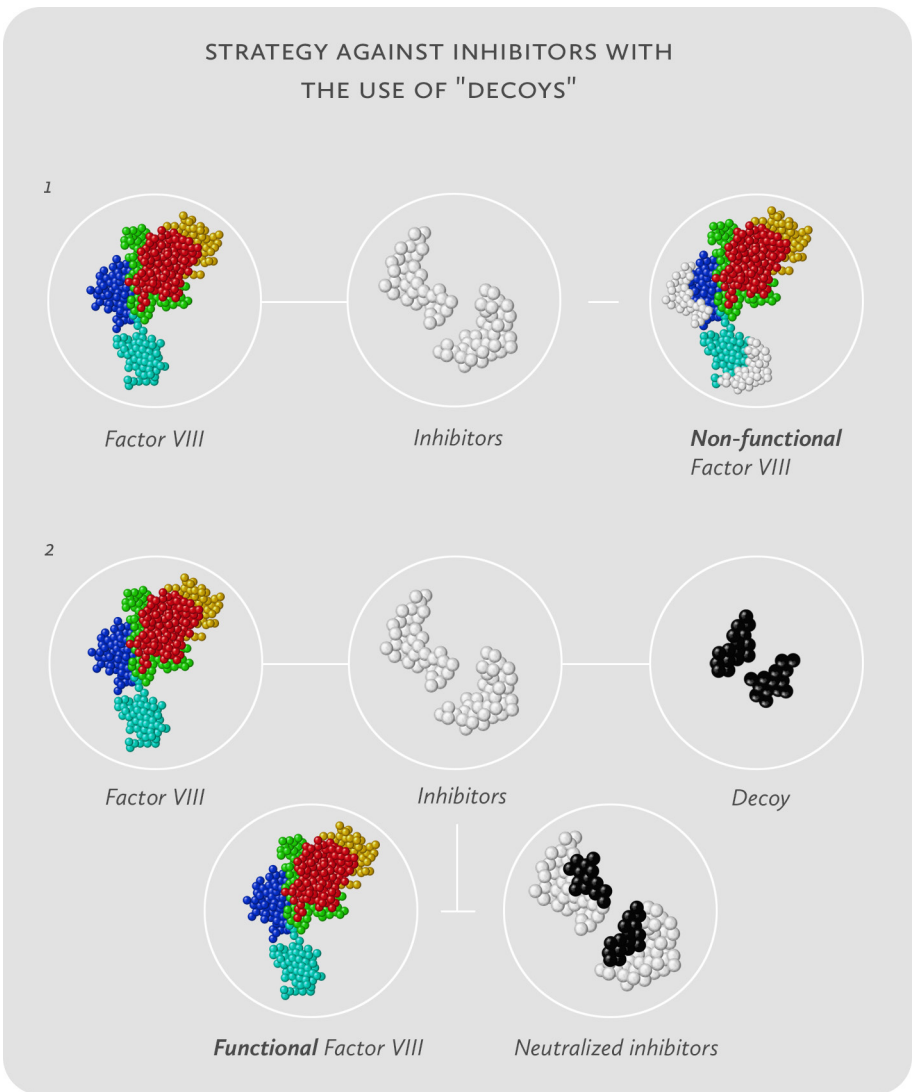


is slightly lower. Therapeutic combinations such as recombinant activated factor VII with APCCs or with antifibrinolytics (compounds that prevent the destruction of fibrin); and FEIBA[®], a complex that combines several coagulation factors, have shown themselves to be equally effective—and much less costly. However, even if these treatments do partly address the severe bleeding experienced by patients with inhibitors, all of them are plagued by two shared issues: their low coagulating efficacy as compared with factor VIII or IX concentrates and the fact that the results obtained across patients are highly variable.

In the last few years, the possibility to “hoodwink” immune cells getting them to alter their immune response has gained ground. This idea, first introduced for diabetes mellitus and myasthenia gravis, is based on using antibodies against the lymphocytes that participate in the inhibitor production process or in using specific molecules to “kidnap” the inhibitors themselves. Thus specific antibodies against the CD4 T-lymphocyte receptors have been developed. In mice, simultaneous administration of such antibodies, together with the antihemophilic factor, has resulted in a significant decrease in the generation of inhibitors. However, this strategy is unspecific as it affects all lymphocytes globally and could lead to a dangerous reduction of CD4 T-lymphocytes in the patient’s plasma.

The most promising studies focus on strategies specifically targeted to curbing the development of inhibitors. These strategies are based on infusing a series of molecules containing sequences similar to the sites in the factor molecule that produce inhibitors. Inhibitors bind to these “decoy” molecules (are “kidnapped” by them) leaving the actual factor undisturbed. As the amount of unbound inhibitors decreases significantly, the coagulation factor is now available to perform its coagulating function.

This treatment would be highly specific as it would be targeted exclusively to inhibitors and would not alter general immunologic mechanisms, which are often seriously impaired in hemophilic patients, especially given the high levels of HIV/AIDS-induced immunosuppression in those patients. More recently, tests are being conducted with new recombinant factors containing modifications at those highly immunogenic sites that induce the development of inhibitors. Also, clinical trials are already under way on a new much less immunogenic recombinant factor of human origin.



INHIBITOR DELETION PROTOCOLS. IMMUNE TOLERANCE INDUCTION

Immune tolerance induction is a valuable procedure to eradicate inhibitors. It involves administration of factors FVIII or FIX until inhibitor levels cannot be detected by the Bethesda assay and the half-life of the coagulation factor in plasma goes back to normal. Prothrombin complex concentrates and factor VII must be used to resolve or prevent acute bleeding episodes and their complications in case immune tolerance fails. Sometimes supplementary administration of immunosuppressive drugs and/or extracorporeal plasmapheresis is recommended. The success rate of immune tolerance is 90% at 6 to 12 months for inhibitors against factor VIII. Success of ITI depends on such variables as time of treatment initiation, which should be as soon as possible following inhibitor detection; use of immunosuppressors; a low response of the inhibitor below 5 Bethesda units. ITI protocols are variable, some using high doses (200 IU/kg/day) of von Willebrand factor-rich plasma-derived factor VIII while others use very low doses (25 IU/kg/day) when inhibitor levels are very low. In any event, once inhibitors have disappeared long-term prophylactic treatment is recommended with regular factor administration (three times a week).

Protocols aimed at deleting inhibitors against factor IX have been less successful and can, in addition, result in severe anaphylactic or nephrotic syndromes. These may occur when the defective factor IX gene contains large deletions, with treatment of acute bleeding episodes with recombinant activated factor VII being usually required to avoid overexposure to factor IX.

SIDE EFFECTS OF HEMOPHILIA TREATMENT: VIRAL AND EMERGING INFECTIONS

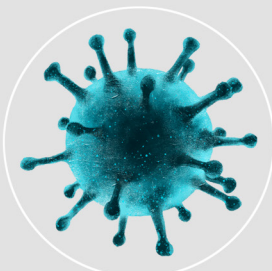
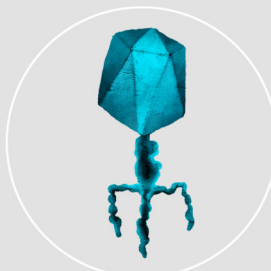

The side effects of hemophilia treatment include, first of all, anaphylactic reactions against coagulation factors. This side effect is nevertheless negligible nowadays thanks to the availability of high-purity concentrates. Of much greater concern is the risk of infection by pathogenic agents, particularly by viruses and prions. The development of inhibitors against exogenously infused factors VIII or IX is not, strictly speaking, a side effect of hemophilia treatment, as such antibodies are considered a natural rejection of extraneous molecules by the body. However, as mentioned above this does not make inhibitors any less of a problem for the efficacy of antihemophilic

treatment.

Nowadays, infections in hemophilic patients are caused chiefly by the so-called emerging pathogens or pathogens that have become resistant to certain (generally antibiotic or antiviral) drugs. The reasons for this are related with adaptation of microorganisms and the dramatic increase in demographic movements. Indeed, when people move from one place to another they disseminate diseases that until then had been circumscribed to specific regions of the planet. By pathogens, we refer chiefly to viruses, bacteria and, more recently, also to proteins (prions).

As explained above, the possibility of a hemophilic patient to

**POTENTIAL PATHOGENS
AND POSSIBILITIES OF INACTIVATION**

 <p>ENVELOPED VIRUS</p> <ul style="list-style-type: none">• HIV• HCV• HSB• West Nile virus• SARS• Avian flu virus <p><i>INACTIVATION</i> Solvents-Detergents 60-80 °C/10-72 hours 138 °C/2 seconds</p>	 <p>NAKED VIRUS</p> <ul style="list-style-type: none">• HAV• Parvovirus B19• Others?	 <p>PROTEINS</p> <ul style="list-style-type: none">• Prions <p><i>INACTIVATION</i> 134 °C/18 minutes 121 °C/30 minutes Caustic soda 1N 15 minutes</p>
---	---	--

become infected is closely connected with the source where the different factor concentrates are obtained. Thus, factors prepared from human plasma will always pose a higher risk of infection whereas recombinant factors are free from the risk of infection as they are obtained from animal or human cells in a laboratory.

One of the most accurate definitions of emerging disease has been proposed by the US Institute of Medicine. According to that definition, an emerging disease is a new disease, a reemerging old disease or a disease caused by drug resistance, whose incidence in humans has increased in the last two decades, or threatens to increase in the near

future. As mentioned above, one of the main factors behind disease emergence is the great ease with which human beings can nowadays move from one place of the globe to another. Indeed, in 1850, over 350 days were needed to travel round the world and the world population was 24 million people; today (2014), it takes just a few hours to travel round the world and the world population exceeds 7 billion people.

There are already almost one-hundred diseases that fit the definition above. Some of these are HIV-AIDS, tuberculosis, severe acute respiratory syndrome, poliomyelitis, parvovirus B19, hepatitis C, new variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD), avian influenza, West Nile Virus, the Ebola virus, etc.

The possibility of viral infection through plasma-derived products has been drastically reduced thanks to the modern viral inactivation methods. Nonetheless, it is well known that these methods are not 100% reliable. But why is it that viral inactivation methods are not 100% effective? The first reason is that not all viruses are the same in terms of structure and function. Thus, some viruses are covered with a lipid envelope, whereas others are not. Naked viruses are sensitive to heat and detergent inactivation treatments while those not equipped with an envelope are heat-resistant. Enveloped viruses include HIV, the hepatitis C virus, the hepatitis B virus, the West Nile virus, the SARS virus and the avian influenza virus; naked viruses include HAV, parvovirus B19 and probably others we are not aware of because they have not yet emerged. These viruses are all highly resistant.

The question is then what as-yet unknown emerging viruses, or which known non-enveloped viruses are amenable to successful inactivation. One example is parvovirus B19 which although it is not deadly in the short term may result in the development of autoimmune diseases that produce autoantibodies against molecules of the subject's own body, which can cause serious long-term effects or even autoimmune polyarthritic processes that usually further intensify severe hemophilic arthropathies.

Until a few years ago, the idea that proteins could be infectious agents was unthinkable for microbiology and for the classical theories of infection, as infections had always been held to be caused by viruses and bacteria. But today, we have come to the groundbreaking realization that an infection can be produced by proteins, which are not really living organisms but mere molecules. This conceptual change implies that it is possible to transmit isolated molecules and

provoke a deadly disease because these molecules (eg. prions) are capable of aggregating and precipitating in vital organs like the brain.

Prions are the proteins that cause the “mad cow” disease in cattle as well as its human version (variant Creutzfeldt-Jakob disease [vCJD]). They are transmitted by ingestion of infected-meat and by blood transfusion. Prion-induced disease affects the structure of the brain and bind to the lymphocytes in the blood. Prions pose a major public health risk in connection with the use of plasma-derived coagulation factors as they are currently impossible to detect by means of blood tests. Moreover, prions cannot be inactivated using standard antiviral methods; they are difficult to filter and to separate; and cannot be destroyed by conventional pasteurization as they have to be heated at 134°C for 18 minutes or at 121°C for 30 minutes for successful inactivation. These conditions would break up the structure of the coagulation factors and make them non-functional. Also, prions are endogenous (they exist in our body with a very similar structure) so we do not recognize them as extraneous and we do not generate an immune response to fight them. Finally, prion-induced disease may remain asymptomatic for as long as 40 years.

The fact is that prion-contaminated plasma has been used in many countries in the world, including Spain, to prepare coagulation factors. Although it has been estimated that the risk of contracting a prion-induced disease through plasma-derived concentrates is very low, we cannot today say that these products are risk free as many uncertainties and unknowns remain with respect to prions. Neither the mechanisms of action nor the factors that produce prion-induced disease are known. Nor has it been established whether a very small amount of prions is enough to develop the disease, although it seems to be dose-dependent.

Although at the beginning, not many people had confidence in the first generation of recombinant drugs, today, in the second decade of the 21st century, their wide availability, high efficacy and, above all, their excellent safety profile have turned these products into the treatment of choice.

The question is then how to tackle the threat posed by emerging pathogens. The answer is conceptually easy but complicated in practice. It is internationally known that prevention of known viral infections requires the use of the safest factors possible, which is achieved by applying highly effective inactivation methods to plasma-derived products or using recombinant factors to prevent any kind of infection, including prion-induced infections. Although this seems easy enough to do, many practical difficulties stand in the way. One of these difficulties has to do with the fact that many developing countries cannot afford the inactivation methods or the recombinant factors; also, there are patients that could avail themselves of recombinant factors but do not use them either because there is currently no recombinant product to treat their condition (von Willebrand disease), or because they have a history of inhibitor development.

As regards prion-induced infection, the best alternative from a safety perspective (at least until a test is developed to detect prions in the donors' blood) is the use of recombinant products.

Nowadays, many recombinant proteins have become part of our therapeutic arsenal. Some of them, like recombinant factors, have shown, over their 20+ years of clinical history, an excellent safety profile and a high level of efficacy.

For the effective implementation of the World Hemophilia Federation's "treatment for all" principle, prion-induced infection must be addressed through the development of strategies targeted at carefully selecting both donors (on the basis of their personal characteristics and their region of origin [there are geographical areas with a higher incidence of Creutzfeldt-Jakob disease]) and the plasma used. Other alternatives include leukodepletion, i.e. removing leukocytes with prions attached to them, and sophisticated new techniques to separate prions from plasma, although application of such techniques would increase in the cost of plasma-derived products to such an extent that they would become as costly as recombinant products.

To conclude it can be said that the potential of becoming infected by emerging pathogens is an inescapable fact in the treatment of hemophilia with plasma-derived products. Moreover, an effort should be made to address the problem of emerging pathogens by public

health measures and, specifically, through inactivation and purification of plasma-derived pharmaceutical products. This issue must be tackled both from a medical and a socio-political perspective, and medical practitioners should understand the potential risks of each type of product and inform patients in an appropriate and effective way.

BIOTECHNOLOGICAL TREATMENTS AND ADVANCED THERAPIES

RECOMBINANT FACTORS: THE SAFEST TREATMENT?

Discovery of DNA made possible what is nowadays known as “modern” biotechnology. Indeed, these days it is possible to introduce a portion of ADN into an animal, human or plant-derived bacterial or eukaryotic cell and obtain a certain, so-called recombinant, protein that has functional activity. This means nothing less than that it is now possible to create proteins such as insulin, the growth hormone and plasminogen activator to be used therapeutically in the clinical setting. Today, in the second decade of the 21st century, hundreds of therapeutic proteins have already been produced by means of recombinant technology.

RECOMBINANT FACTORS. THE FUTURE OF HEMOPHILIA TREATMENT

- Greater safety
- Higher efficacy
- Fewer inhibitors
- More convenient
- Open to improvement

But before these advances became a reality, humanity suffered some devastating iatrogenic events such as the appearance of Creutzfeldt-Jakob disease in children treated years before with growth hormone obtained from the pituitary glands of deceased persons; and the massive and lethal human immunodeficiency virus (HIV) and hepatitis C virus (HCV) infections, in the 1980’s and 1990’s respectively, in hemophiliacs treated with plasma-derived factors.

Important as it is to learn from the lessons of the past, there is no doubt today that “recombinant medicine” holds high hopes for the future. Recombinant products, given their peculiar manufacturing procedure based the expression of a “therapeutic” gene from a fragment of DNA in a cell in order to produce a functional protein that is free from any human or animal component, are particularly “clean”. For that reason, they are the therapy of choice to treat many of today’s diseases. But recombinant therapy has not yet gained unanimous support, especially among the more conservative physicians. Far from that, the first recombinant proteins used in clinical practice, such as somatostatin in 1976, insulin in 1982, erythropoietin in 1986, tissue plasminogen activator in 1987, and antihemophilic factors in 1990, aroused significant skepticism among clinicians due to their fear of as-yet unknown disciplines such as Molecular Biology and Genetic Engineering.

In spite of that, a large number of biotechnology companies were created. To the extent that a new kind of pharmaceutical company came into scene: the biotechnological company. Even some traditional pharmaceutical companies started gearing their activities toward genetic pharmacology. Investments in this sector are ongoing and expert estimations indicate that in the medium and long term over 30% of the world pharmaceutical market will be made up of these products.

Nowadays, many recombinant proteins have become part of our therapeutic arsenal, some of them with a history of over 20 years of clinical use, an excellent safety profile and proven efficacy. Others are at an initial phase of development, such as those that may be useful to treat conditions such as Graves’ disease, multiple sclerosis, myasthenia gravis, scleroderma, phenylketonuria, galactosemia, hemoglobinopathy, etc.

Vaccines, all of which are now recombinant, are used in the general population but also in children, the elderly and immunodepressed individuals because of their excellent safety profile. Of course recombinant interferon for long-term dose-intensive treatment of hepatitis C, for example, is still highly effective. But recombinant products are not only therapeutic, they are also used in the spheres of nutrition, dietary supplements and cosmetics, where recombinant peptides are common.

Without realizing it, we have entered the era of recombinant solutions where man is capable of manufacturing virus and prion-free albumin, the most abundant protein in blood, which could up to now only be obtained from human plasma.

If we compare plasma-derived and human and animal tissue-derived products with recombinant products in terms of their pharmacological efficacy, no significant differences are observed. But when the comparison is made with respect to patient safety the situation is clearly different. In hemophilia treatment, for example, recombinant products have never in their 24 years' history (1990-2014) of clinical use produced one single severe or even mild adverse event, and these are naturally not expected to occur with third and fourth generation recombinant products, which are completely free from human or animal proteins. On the other hand, plasma-derived products, even if their safety profile has improved, have caused thousands of deaths of hemophilic patients throughout the world as a result of HIV and HCV infections. In the years to come these products will continue to compromise the quality of life of many patients as a result of the side effects of anti-HIV drugs, particularly heart disease and renal and psychiatric damage, or of diseases like cirrhosis and cancer of the liver resulting from HCV infection.

Plasma-derived products, and in general all products of human origin, have a good safety profile, albeit only with respect to lipid-enveloped viruses such as HIV, HCV and HBV. Nevertheless, they are not exempt from the growing risks resulting from the well-known profound social changes taking place at a global scale related to the transmission of new diseases including prion diseases, such as Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) or "mad cow" disease, which is transmitted through the blood. They are also exposed to the risk of transmitting the so-called emerging diseases, whose causative agents are known but which have nevertheless crossed the "inter species barrier" to become epidemics and even pandemics in areas where they were unknown. This was the case of HIV and other viruses that may be resistant to viral inactivation.

There is therefore an almost universal consensus in favor of recombinant products. Thus, in Europe their use is recommended in the "European Guidelines for Recombinant Therapies" and several countries, such as the United Kingdom, Australia and even Spain (through the Scientific Commission of the Victoria Eugenia Royal Hemophilia Foundation) advocate their use.

The question that comes to mind is “why aren’t recombinant products used more widely taking into account their high efficacy and excellent safety profile?” It is difficult to answer this question without going beyond the teachings of Hippocratic medicine. One could say that the problem, at least partly, is a fear of the unknown, but there are also purely economic reasons that result in a lack of solidarity in the distribution of healthcare expenditure. It must be acknowledged that recombinant technology entails high costs both regarding the treatment itself and the investment made by pharmaceutical companies and by governments, whose efforts to produce equitable healthcare budgets often fail to satisfy physicians and even patients themselves. Finally, we cannot rule out potential conflicts of interest in physicians prescribing the products of manufacturers they may have financial ties with.

In any event, although clinical practice has always been a high risk endeavor, now that safer and more effective products exist that are at the same more costly, the picture has complicated even further. In this situation, treating clinicians have the herculean task of prescribing the safest, most efficient and most cost-effective product within a very narrow scope of practice.

In short, we are faced with an interesting pharmacological paradox—avoidable for some, irresolvable for others, namely that the greatest advances in therapeutic medicine – even if often safer - are not always wholeheartedly embraced for the simple reason that they tend to be more costly. Have we forgotten that patient safety should prevail over any cost consideration?

NEW RECOMBINANT FACTORS

The short- and medium-term future of hemophilia treatment will be based on the use of modified recombinant factors, whereas longer term it will be characterized by the use of cell therapy and gene therapy strategies. Recombinant factors are now being modified to achieve three kinds of improvements. Firstly, reduce the capacity to form inhibitors; secondly, promote the efficacy of infused factors by increasing their half-life and, thirdly, achieve higher levels of safety by eliminating contaminating animal and human proteins.

The current strategy to minimize inhibitor formation is immune system screening. The idea is that inhibitors should recognize “decoy”

molecules, whose structure is similar to that of the clotting factor, and target these instead of the infused factor itself, thus preventing factor inactivation. Also, some modifications are being introduced into the tridimensional structure of the factor in order to reduce the development of inhibitors, making it more stable and less immunogenic.

With respect to obtaining longer-acting factor VIII molecules, strategies such as the use of pegylated liposomes and polysialic acid polymers, and the inhibition of factor catabolism in the body are being developed. More recently, fusion protein technology has shown much promise, owing specifically to the development of a new type of factor IX for hemophilia B, already marketed in the United States (ALPROLIX® de Biogen Idec), with a half-life up to 5 times higher than the currently available product. The factor VIII product manufactured by Baxter (Advate®) and Pfizer's factor IX (Benefix®), both third generation factors, as well as Pfizer's factor VIII (ReFacto® AF), also of third generation, which has no traces of animal proteins or mouse monoclonal antibodies, are all recombinant and boast excellent safety profiles. In addition, the upcoming launch in Spain, is the new recombinant factor of human origin of Octapharma (Nuwiq®), which will decrease the incidence of inhibitors in patients.

ADVANCED THERAPIES IN HEMOPHILIA

Future therapeutic products based on advanced therapies such as gene therapy and cell therapy may offer myriad potential clinical applications for the treatment of various monogenic disorders including hemophilia. Although hemophilia is particularly amenable to treatment with these techniques given its monogenic nature and the low levels of deficient coagulation factor required to achieve a moderate or even phenotype, research in the field is still in its infancy and more work must be undertaken to determine whether advanced therapies can be safely applied to this patient population, which presents with specific clinical characteristics. There is much reason for optimism, but caution is imperative in order not to raise false expectations in our patients.

The development of biotechnology has resulted in the emergence of new therapies bound to change medical practice. Advanced gene-, cell-, and tissue-based therapies (gene therapy, cell therapy and regenerative medicine) constitute new strategies for the treatment of

some conditions. Their purpose is either the regeneration of tissue or the restoration of function. Cell therapy is based on transplantation of living cells into an organism in order to repair tissue or restore a lost or a deficient function; gene therapy, in turn, involves the transplantation of genetically modified cells.

Cells are useful for these therapies because of their ability to differentiate into the specific lineages required for repairing a given type of tissue. However, only 20% of stem-cell-related studies in the literature constitute a genuine advancement in scientific knowledge. This can be attributed to the high cost of this kind of research and the multiplicity of issues that remain to be solved such as the need to develop new best practice guidelines for the management of cell cultures and transplant procedures; and guarantee the genetic stability of stem cells before and after transplantation, their quantity and quality when used therapeutically, as well as their safety, specifically regarding teratogenicity (tumor formation).

Most clinical and pre-clinical trials conducted to date on the effects of cell therapy and gene therapy on hemophilia, using both viral and non-viral vectors, have shown no adverse effects, although the immune response against vectors' viral envelopes, the transgenes encoded and hepatotoxicity represents the limit to the clinical application of these therapies.

Gene therapy strategies for hemophilia have been based on the use of (chiefly) lentiviral and adeno-associated virus vectors based on adult stem cells and autologous fibroblasts from the same patient, as well as platelets and hematopoietic stem cells. Non-viral gene transfer and chimeric oligonucleotide-based mutation repair have also been used. Studies on cell therapy for hemophilia have used transplanted healthy cells, such as hepatic sinusoidal cells or iPSC-derived endothelial progenitor cells, to repair or substitute for deficient function.

Of particular interest for the development of advanced therapies are the results obtained by High et al., who used zinc finger nucleases and adeno-associated vectors to correct hemophilia B mutations by "editing" B mutated DNA sequences. Although in this case factor IX expression is only 5% of normal levels, the advantage of the strategy is that it allows strict control of the integration of normal sequences into DNA, thus preventing the development of tumors induced by insertional mutagenesis.

The most significant problems that remain are related to the increasing the efficacy of factor expression levels and maintaining them constant in the long term, and controlling the immune response against vectors and transgenes.

Nathwani et al., completed an interesting clinical trial in patients with hemophilia B. The trial included patients with severe hemophilia B (<1% factor IX) who were injected with a special adeno-associated vector that expressed factor IX and was capable of easily transducing (infecting) hepatocytes. Results showed that this is a more efficient vector and that patients expressed between 3% and 11% of the normal factor IX levels. Another encouraging finding was that no inhibitors (anti factor IX antibodies) were detected. These results must be considered taking into account, first of all, that the expression of factor IX corresponds to a mild-to-moderate phenotype of the disease and, secondly, that concomitant glucocorticoid therapy is required in order to prevent immune rejection and elevation of liver transaminase levels

Generally speaking, the results obtained to date constitute the foundations of the future application of advanced therapies to the treatment of hemophilia. The number of patients included in the clinical trials on advanced therapies in hemophilia conducted so far, including the one by Nathwani, has been very low. In addition, results have been highly variable. Although Nathwani's study is the first one to show a substantial expression of factor IX in humans, it does not clarify whether there is a relationship between liver toxicity and the immune response it generates.

Almost two decades ago, discussions began on the potential benefits of gene therapy for the treatment of hemophilia. At the time, prominent experts envisioned that the cure of the disease would be possible by the first decade of the 21st century. These predictions fueled the hopes of both hemophilic patients and the physicians treating them. But unfortunately those hopes were not fulfilled. Although significant advances have been achieved since the first clinical trials on gene therapy began in the 1990's, especially regarding the design of transfer vectors, researchers came across many problems, especially with respect to biosafety. To date, many of the problems posed by these strategies (immune response, insertional mutagenesis, efficacy and length of gene expression, patient recruitment for clinical trials and large-scale vector production) have not been resolved.

The first question what must be asked is whether the time and financial investment required to establish advanced therapy protocols that may in the future be applicable to the treatment of hemophilia is at all warranted. Although current treatment of hemophilia is optimal, the answer is clearly in the affirmative since hemophilia is a chronic condition and current high-frequency treatment —especially in prophylaxis regimens—. The second question is whether advanced therapies are at all feasible. In this regard, hemophilia is considered an optimal candidate for such treatments as it is a monogenic disease; achieving relatively low levels (1-5%) of coagulation factor already places patients in the moderate phenotype category; a large amount of target cells are available for study; there is no need to regulate gene expression; and a large amount of animal models are available for experimentation.

Other more general —though no less important— questions include, for example, whether it will be possible to extrapolate the safety- and expression level-related outcomes obtained in small-scale animal models to human beings; whether the combination of cell therapy/ gene therapy with the use of mesenchymal stem cells will be the most efficient tool; and whether protocols will have to be restricted to adeno-associated and non-viral vectors.

The problems to be addressed will be the immunogenicity and biosafety of the therapies, as well as the maintenance of factor levels and length of expression. Also, even if most research is currently focused on viral vectors non-viral methods should also be taken into consideration.

In any event, the main criterion to be considered, should be the ratio between efficacy and safety, taking into account that these are highly sensitive issues for both patients and physicians, especially in the face of the lethal consequences of viral infections of the past (HIV/ HCV) on the hemophilic population; and the special immunologic conditions of these patients. In this respect, we may have to settle for less stringent expression requirements (lower coagulation factor levels) in return for greater safety.

Furthermore, caution must be exercised when bringing to light the results of the studies on this issue in order to avoid raising any false expectations in the patient population with respect to advanced therapies, which in spite of the promise they hold as potential therapeutic strategies are only at an initial stage of development. In

the longer term, after overcoming the challenges mentioned above, advanced gene- and cell-based therapies may become a plausible alternative for patients with hemophilia; in short, optimism is in order, but fantasy is best avoided.

ADVANCED FUTURE THERAPIES STRATEGIES IN HEMOPHILIA

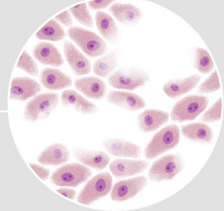


GENE THERAPY

- *Lentiviral vectors*
- *Adenoassociated vectors*
- *Non-viral vectors*



Healthy individual

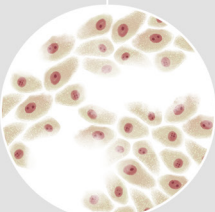


CELL THERAPY

- *Adult stem cells*
- *Fetal stem cells*
- *Embryonic stem cells*
- *iPSCs (induced pluripotent stem cells)*



Transplant
Effectiveness, safety



Transfected or
differentiated
therapeutic cells



Hemophilic patient

- *Rare disease*
- *Monogenic disease*
- *Mild phenotype (5–40% factor)*
- *Gene expression does not require regulation*
- *Many experimental animal models*

- *Factor VIII or IX expression*
- *Correction of coagulation disorder*

FOR MORE INFORMATION...

- ***Textbook of Hemophilia, 3rd Edition, 2014. Ed. Wiley – Blackwell.***

Lee CA, Berntorp EE, Hoots WK.

Available in: <http://eu.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-1118398246.html>

- ***Guía sobre Hemofilia. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e igualdad. 2012.***

Available in: http://www.msssi.gob.es/profesionales/saludPublica/medicinaTransfusional/publicaciones/docs/Hemofilia_AspectosOrganizativos.pdf

- ***La hemofilia en imágenes. Federación Mundial de Hemofilia. 2004.***

Available in: <http://www1.wfh.org/sp/index.html>

- ***La Hemofilia. Conceptos básicos. Wyeth, 2005.***

- ***Factor VIII therapy for hemophilia A: current and future issues.***

Aledort L, Ljung R, Mann K, Pipe S. Expert Rev Hematol, 2014; 7(3): 373–385.

Available in: <http://informahealthcare.com/doi/pdf/10.1586/17474086.2014.899896>

- ***Current management of hemophilia B: recommendations, complications and emerging issues.***

Franchini M. Expert Rev Hematol, 2014; Early on line, 1–9.

Available in: <http://informahealthcare.com/doi/pdf/10.1586/17474086.2014.947955>

- ***Treatment for hemophilia: recombinant versus plasma-derived coagulation factors – controversy and debate forever? An ethical medical challenge?***

Liras A, García-Trenchard R. Expert Rev Hematol, 2013; 6: 489–92.

Available in: <http://informahealthcare.com/doi/pdf/10.1586/17474086.2013.834798>

- ***Advanced therapies for hemophilia: reality or fantasy?***

Liras A. Expert Rev Hematol, 2012; 5: 245–7.

Available in: <http://informahealthcare.com/doi/pdfplus/10.1586/ehm.12.25>

- ***Advanced therapies for the treatment of hemophilia: future perspectives.***

Liras A, Segovia C, Gaban SA. Orphanet J Rare Dis, 2012; 7: 97.

Available in: <http://www.ojrd.com/content/pdf/1750-1172-7-97.pdf>

- ***Future research and therapeutic applications of human stem cells: general, regulatory, and bioethical aspects.***

Liras A. J Translational Medicine 2010; 8: 131.

Available in: <http://www.translational-medicine.com/content/pdf/1479-5876-8-131.pdf>

ASANHEMO

The Andalusian Hemophilia Association was legally established in 1990 as a not-for-profit governmental entity. In 2009 it was declared a public utility institution by the Spanish Ministry of the Interior. Such official recognition of the work carried out by the Association was granted in view of the fact that Asanhemo's overarching goal is to promote the public interest and achieve the goals set forth in its bylaws. It should be mentioned that the Association's activities are not aimed at benefiting only its members but the whole hemophilic community.

To celebrate its 25th birthday, Asenhemo is publishing this Basic Guide to Hemophilia, clinical manifestations, diagnosis and treatment. And we believe we could not do it in a more auspicious way than by rigorously complying with two of our paramount goals: facilitate the education of carriers, patients and their friends and families, and disseminate information on hemophilia among society at large.



asanhemo
ASOCIACIÓN ANDALUZA DE HEMOFILIA