



УДК 612.151-083:616.151-056.7

ПРЕПАРАТИ ФАКТОРА ЗГОРТАННЯ КРОВІ VIII ТА СПОСОБИ ЇХ ОТРИМАННЯ

Н. О. Шурко, М. І. Вороняк, Т. В. Даниш

*ДУ “Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України”
вул. Ген. Чупринки, 45, Львів 79044, Україна
e-mail: natalia_shurko@ukr.net*

З метою корекції дефіциту фактора або для запобігання кровотеч у пацієнтів з гемофілією А проводять замісну терапію, яка полягає у введенні плазмових або рекомбінантних препаратів фактора VIII. Для лікування гемофілії в Україні використовують низку препаратів фактора, як плазмового так і рекомбінантного походження. Залежно від ступеня очищення, відрізняють плазмові препарати проміжного ступеня очищення, отримані за допомогою традиційних методів осадження/адсорбції, та високоочищені препарати, виділені методами іонообмінної або афінної хроматографії. З кінця 1980-х років у клінічній практиці почали використовувати рекомбінантні препарати фактора. Вони одержані методами генної інженерії з лінії клітин яєчника китайського хом'яка або нирки новонародженого хом'яка. Рекомбінантні фактори поділяють на покоління залежно від вмісту домішкового білка людини чи тварини в кінцевому продукті. У статті проведено аналіз основних плазмових і рекомбінантних препаратів фактора VIII, зареєстрованих в Україні. Описані їх основні властивості, способи отримання та методи вірусної інактивації. Узагальнено переваги та недоліки плазмових і рекомбінантних препаратів фактора згортання крові.

Ключові слова: згортання крові, плазмові та рекомбінантні препарати фактора VIII, хроматографія, вірусна безпека.

ВСТУП

Лікування хворих на гемофілію полягає у введенні компенсаторної кількості дефіцитного фактора згортання крові, зокрема, при гемофілії А – фактора VIII (FVIII). Проте слід зауважити, що є певна відмінність між лікуванням хворих із геморагічними ускладненнями та проведенням профілактичного введення FVIII. Тому на даний момент існує два види терапії: так звана “терапія на вимогу” та профілактична [9].

Наприклад, “терапія на вимогу” проводиться під час геморагічних ускладнень і потребує негайного реагування шляхом введення препарату FVIII. Профілактичне лікування полягає у періодичному введенні фактора та може бути розділене на первинне і вторинне. Первинна профілактика досягається довготривалим введенням

фактора (не менше 46 тижнів на рік) після першого епізоду кровотечі у віці до двох років. Вторинна профілактика – це довготривале введення фактора після двох чи більше випадків кровотечі у віці понад два роки [9].

Профілактичне лікування проводять також перед операційним втручанням для запобігання геморагічних ускладнень. Нарешті, короткострокове профілактичне лікування проводять у разі частих повторних крововиливів у суглоби. Воно полягає у 4–8-тижневому введенні препарату недостатнього фактора.

На даний момент при замісній терапії використовують комерційні препарати факторів згортання, як плазмові, так і рекомбінантні, які мають високий ступінь безпеки щодо вірусних захворювань.

Поряд із проблемою вірусної безпеки існує інше клінічне ускладнення замісної терапії – це виникнення інгібіторних антитіл до FVIII [8, 14, 17–19], що можуть розвинутиися при лікуванні кріопреципітатом або препаратами факторів як плазмового, так і рекомбінантного походження. Їх наявність може спричинити неефективність замісної терапії. На сьогоднішній день розроблені цілі схеми, які забезпечують ефективність лікування у таких хворих.

Плазмові препарати FVIII і методи їх отримання

Плазмові препарати FVIII отримують із плазми крові людини. Плазмові продукти, такі як свіжозаморожена плазма та кріопреципітат, що використовувалися на ранніх етапах лікування хворих гемофілією з низькою питомою активністю FVIII, втрачають актуальність на даний час [9]. У роботі ми зосереджуємо нашу увагу на препаратах факторів, які зареєстровані й використовуються під час лікування хворих в Україні та є продуктами переробки свіжозамороженої плазми і кріопреципітату.

Плазмові препарати факторів згортання отримують із пулу плазми донорів, використовуючи різні методи фракціонування й очищення. Препарат FVIII на початкових етапах відділяють від більшості білків плазми крові методом кріопреципітації з подальшим використанням додаткових методик очищення. Залежно від застосування методик очищення, виділяють три групи плазмових препаратів FVIII [9]:

- препарати фактора проміжного очищення, отримані методом преципітації-адсорбції (питома активність до 20 МО/мг білка);
- препарати фактора, отримані методом хроматографії (20–50 МО/мг білка);
- препарати фактора, отримані за допомогою моноклональних антитіл (понад 100 МО/мг білка).

ПЛАЗМОВІ ПРЕПАРАТИ FVIII І МЕТОДИ ЇХ ОТРИМАННЯ

Препарати FVIII, які використовують в Україні, наведені в табл. 1. FVIII різної чистоти одержують під час застосування різноманітних методів: ізоелектричного осадження, висолювання, фракціонування органічними розчинниками та кріопреципітації. За допомогою класичних методів фракціонування плазми крові одержують фактор, що додатково містить фактор фон-Віллебранда і фібриноген [2].

FVIII є лабільним білком. Нековалентний зв'язок з фактором фон-Віллебранда захищає його від деградації. Преципітат, одержаний у разі розмороження плазми, містить 40–70 % від вихідної сумарної активності FVIII у плазмі. Методи спиртового осадження та кріопреципітації все ще використовуються для одержання концентратів даного білка при лікуванні хворих на гемофілію [2]. Останнім часом ці методи комбінують із різноманітними хроматографічними методами [4, 5, 11–13, 15, 16].

Таблиця 1. Плазмові препарати FVIII, зареєстровані в Україні [1]

Table 1. Plasma-derived concentrates of factor FVIII registered in Ukraine [1]

Препарат	Виробник, країна	Методи отримання	Вірусна інактивація	Наявність інших білків
GreenEaght, GreenGen	GreenCross, Південна Корея	Іонообмінна хроматографія	TNBP/Triton 100, сухе нагрівання (100°C, 30 хв)	Альбумін, фактор фон-Віллебранда
Immunate	Baxter BioScience, Австрія	Іонообмінна хроматографія	Сольвент-детергентний метод, сухе нагрівання–тиск (60°C, тиск 190 мбар, 10 год)	Альбумін, фактор фон-Віллебранда
Emoclot D.I.	Kedrion, Італія	Іонообмінна хроматографія	TNBP/polysorbate, сухе нагрівання (100°C, 30 хв)	Альбумін, фактор фон-Віллебранда
Octanate	Octapharma, Австрія, Швеція, Франція	Преципітація, іонообмінна хроматографія	TNBP/polysorbate, сухе нагрівання (100°C, 30 хв)	Альбумін, фактор фон-Віллебранда
Wilate	Octapharma, Австрія	Преципітація, іонообмінна хроматографія, гель-фільтрація	TNBP/polysorbate, сухе нагрівання (100°C, 120 хв)	Альбумін, фактор фон-Віллебранда
Fanhdi	Grifols, Іспанія	Гепарин-афінна хроматографія	Сольвент-детергентний метод, сухе нагрівання	Альбумін, фактор фон-Віллебранда
Beriate	ЦСЛ Берлін ГмбХ/ CSL Behring GmbH, Німеччина	Преципітація, іонообмінна хроматографія	Сольвент-детергентний метод, сухе нагрівання (60°C, 10 год)	Альбумін, фактор фон-Віллебранда
Біоклот А	ПрАТ "БІОФАРМА", Україна	Іонообмінна хроматографія	Сольвент-детергентний метод, сухе нагрівання	Альбумін, фактор фон-Віллебранда

Для очищення FVIII методом іонообмінної хроматографії найчастіше використовують ДЕАЕ-, КМ-, ТМАЕ-похідні, а також Q-сорбенти на різноманітних носіях (целюлоза, агароза, сефароза, Тоуорепал та ін.). Сорбцію FVIII здійснюють із розчиненого кріопреципітату чи безпосередньо з плазми. Елюцію проводять 0,2–0,5 М розчином натрію хлориду. Застосування градієнтної елюції розчинами 0,05М-1М NaCl дає змогу отримувати концентрати фактора з вищою питомою активністю.

Серед афінних для виділення FVIII найпоширенішими є сорбенти з гепарином, декстран-сульфатом чи желатином як лігандами. Застосування іммобілізованих пептидів чи моноклональних антитіл проти FVIII – сучасні методи для одержання препарату [6, 7].

У нашій лабораторії розроблено спосіб очищення FVIII методом негативної афінної хроматографії на кремнеземних носіях, ковалентно модифікованих лігандами – активними тріазиновими барвниками [3]. Наприклад, за допомогою сорбенту Діасорб-Procion Blue HB із розміром пор 500–750 Е за один етап хроматографічного очищення кріопреципітату плазми крові вдалося одержати препарат FVIII з питомою активністю, на порядок вищою за вихідну. Застосування даної технології легко поєднується з методами хімічної інактивації вірусів.

Дослідження, проведені з плазмовими препаратами FVIII, показали, що вже на перших етапах кріопреципітації відбувається процес вірусної інактивації [6, 7]. Наступні стадії одержання фактора, які включають етапи хроматографічного очищення, забезпечують елімінацію не лише домішкових речовин, але і багатьох вірусів. Наприклад, у разі використання методу афінної хроматографії з іммобілізованими моноклональними антитілами до FVIII можна позбутися не лише додаткових білків, а й також деяких неболонкових вірусів, наприклад, вірусу поліомієліту [6, 7].

Інкубація препаратів зі сольвент-детергентом (наприклад, три(н-бутил)фосфат/Тритон X-100) забезпечує інактивацію капсульних (оболонкових) вірусів (ВІЛ, гепатитів В та С). Додаткова обробка ліофілізованого фактора сухим теплом при 60–100°C протягом тривалого часу застосовується для інактивації безоболонкових вірусів (гепатиту А та парвовірусу В19) [7, 9].

Очевидно, що на сьогоднішній час препарати FVIII отримані методами афінної хроматографії є значно більш вірусобезпечні, порівняно з препаратами, одержаними класичними методами. Однак, за останніми даними, існує велика кількість вірусів, стійких до певних процедур вірусної інактивації (наприклад, Парвовірус 4 та Парвовірус В19). Тому не можна гарантувати, що ці препарати є повністю вірусобезпечні [7, 9, 11]. Використання плазми як вихідної сировини для отримання препаратів фактора не гарантує абсолютного виключення можливого зараження пацієнтів вірусною інфекцією. Відомі також випадки зараження вірусними патогенами, які проявляються не відразу, а через певний проміжок часу, так званий латентний період, який може тривати кілька років [9]. Не можна також стверджувати про абсолютну безпечність препаратів щодо пріонної інфекції, про що свідчить рідкісний випадок при трансфузії цільної крові та концентратів еритроцитів у Великобританії [9].

Для вирішення цих проблем поряд із плазмовими препаратами фактора почали використовувати рекомбінантні, які з точки зору вірусної безпеки є більш надійними, проте мають також свої переваги та недоліки.

РЕКОМБІНАНТНІ ПРЕПАРАТИ FVIII

Рекомбінантні фактори (rFVIII) за етапами технологічного одержання поділяють на три покоління. Цей розподіл був запропонований медичною науково-консультативною радою (МНКР) [18, 19]:

- до першого покоління факторів належать препарати, що додатково містять білки людини чи тварин, як у культуральному середовищі, так і в кінцевому продукті;
- до другого покоління належать ті, що містять білок лише в культуральному середовищі, але не в кінцевому продукті;
- до третього покоління належать ті, що повністю позбавлені білка як у культурі, так і в кінцевому продукті.

У табл. 2 наведено рекомбінантні препарати rFVIII, зареєстровані в Україні.

Рекомбінантні препарати першого покоління (Recombinate®; Baxter Healthcare, Westlake Village, CA) почали використовуватись у клінічній практиці з 1980-х років. Під час їх виготовлення застосовують клітинну культуру, що додатково містить білки тварин чи людини. Кінцевий продукт включає слідові кількості цих білків, а також альбумін людини (АЛ), який додається як стабілізатор [19].

Таблиця 2. Рекombінантні препарати фактора VIII, зареєстровані в Україні [1]

Table 2. Recombinant concentrates of factor VIII registered in Ukraine [1]

Препарат	Виробник, країна	Методи отримання	Вірусна інактивація	Наявність інших білків
Recombinate rAHF	Baxter BioScience, США	Рекombінант, іонообмінна, імуноафінна хроматографія	Сольвент-детергентний метод	Альбумін людини
KogenateFS	Bayer, США	Рекombінант, іонообмінна, імуноафінна хроматографія	TNBP/polysorbate, сольвент-детергентний метод, ультрафільтрація	–
Xyntha/ReFactor AF	Pfizer, Швеція	Рекombінант, іонообмінна, імуноафінна хроматографія	TNBP/Triton 100, нанофільтрація	–

Рекombінантні препарати одержують шляхом введення генів FVIII людини в геном клітин яєчника китайського хом'яка (Chinese hamster ovary [CHO]) або в клітини нирки новонародженого хом'яка (baby hamster kidney [BHK]). Клітинна лінія секретує rFVIII у культуральне середовище, з якого фактор піддається низці процесів очищення, зокрема процесам хроматографії, що являють собою комбінацію іонообмінної, гель-проникної та афінної (імуноафінної) хроматографії. Синтезовані rFVIII за структурою ідентичні до плазмового [11].

Рекombінантні препарати другого покоління (Kogenate® Bayer) містять як стабілізатора сахарозу гліцин, гістидин і кальцій (на противагу АЛ) та в процесі їх одержання використовують сольвент-детергентний метод вірусної інактивації. Середовище росту містить клітини BHK, АЛ і рекombінантний інсулін [9].

Рекombінантні препарати третього покоління (наприклад, ReFacto AF®) не містять АЛ чи інших білків плазми крові на будь-якому етапі виробництва. Синтезуються клітинною лінією CHO, повністю виключений альбумін у процесі виробництва, моноклональні антитіла були замінені на синтетичні пептиди та введено додатковий етап вірусної інактивації нанофільтрацію (фільтри з розміром пор 15–25 нм), що дає змогу позбутися ретровірусів [9, 18, 19].

Поряд із проблемою вірусної безпеки існує інше клінічне ускладнення замісної терапії – виникнення інгібіторних антитіл проти FVIII, що може повністю нейтралізувати терапевтичний ефект лікування.

Відомості про поширеність анти-FVIII інгібіторів змінюються у літературних джерелах при легких формах гемофілії від 5 до 7 %, а у разі тяжкої та середньої форми захворювання ці величини можуть досягати значень у діапазоні від 7 до 18 % (в окремих випадках до 30 %) [9, 10].

Розвиток інгібіторних антитіл залежить від попереднього лікування, важкості захворювання і типу вибраного препарату. Наприклад, за даними [10], ризик розвитку інгібіторних антитіл проти FVIII рекombінантного типу був майже у два рази вищий (27,4 %), ніж для плазмового препарату високої чистоти (14,3 %).

ВИСНОВКИ

Лікування хворих на гемофілію полягає у введенні недостатнього фактора згортання крові, зокрема при гемофілії А – антигемофільного FVIII.

Для отримання препаратів FVIII використовують низку методів очищення й антивірусної обробки. Препарати, одержані з плазми крові методами переосадження, практично втратили свою актуальність. Застосування методів біоспецифічної хроматографії та сучасних вірусінактивуючих методик дає змогу одержувати FVIII з високою питомою активністю (понад 100 МО/мг білка) з високим рівнем безпеки щодо відомих вірусів.

За джерелом отримання всі препарати поділяють на плазмові та рекомбінантні. Плазмові значно дешевші порівняно з рекомбінантними, містять фактор фон-Віллебранда, проте не можуть гарантувати абсолютну вірусну безпеку. Рекомбінантні в питанні вірусної безпеки більш безпечні.

На даний момент гостро стоїть питання про недостатність забезпечення плазмою світового ринку, що є передусім великою перешкодою у виробництві плазмових препаратів. На цьому етапі альтернативним способом отримання препаратів є рекомбінантні технології.

Залишається відкритим питання розвитку інгібіторних антитіл у разі застосування плазмових чи рекомбінантних препаратів.

1. **Державний реєстр лікарських засобів України.** On-line версія на веб-сайті www.drlez.kiev.ua
2. *Зубаиров Д.М. Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования.* Казань: Фен, 2000. 364 с.
3. Патент на винахід № 94299, Україна, МПК C07 1/22, C07K 14/755. **Спосіб очищення фактора VIII згортання.** Шурко Н.О., Даниш Т.В., Новак В.Л. Заявка № 2906990; Заявл. 03.07.2009 р.; Опубл 26.04.2011, Бюл. № 8. від 26.04.2011 р.
4. Патент на изобретение № (11)2445947, Россия, МПК C2(13), A61K38/37, A61K35/16. **Способ получения концентрата фактора VIII из плазмы крови человека.** Воробьев А.И., Берковский А.Л., Юрьев А.С. Заявка № 2010116125/15; Заявл. 26.04.2010; Опубл. 10.11.2010.
5. *Ямкин А.В., Стронин О.В., Никитина Л.Н.* Способ получения и свойства препарата VIII фактора свертывания плазмы крови человека. **Сибирский медицинский журнал**, 2009; 2(2): 17–20.
6. *Calizzani G., Profili S., Candura F. et al.* The demand for factor VIII and for factor IX and the toll fractionation product surplus management. **Blood Transfus**, 2013; 11(4): 46–76.
7. *Chandra S., Groener A., Feldman F.* Effectiveness of alternative treatments for reducing potential viral contaminants from plasma-derived products. **Thromb. Research**, 2002; 105(5): 391–400.
8. *Chtourou S., Porte P., Nogra M.* A solvent/detergent treated and 15 nm filtered factor VIII: a new safety standard for pharma-derived coagulation factor concentrates. **Vox Sang**, 2007; 92 (4): 327–337.
9. *De Waure C., Cadeddu C., Gualano M.-R.* Gestione terapeutica dell'emofilia A. **IJPH**, 2011; 8(2): 17–30.
10. *Iorio A., Halimeh S., Holzhauser S.* Rate of inhibitor development in previously untreated hemophilia A patients treated with plasma-derived or recombinant factor VIII concentrates: a systematic review. **Thromb. Haemost**, 2010; 8(6):1256–1265.

11. *Josephson C.D., Abshire T.* The new albumin free recombinant factor VIII concentrates for treatment of hemophilia: do they represent an actual incremental improvement. **Clin. Adv. Hematol. Oncol**, 2004; 2(7): 441–446.
12. *Kim In Seop, Yong Woon Choi.* Dry-heat treatment process for enhancing viral safety of an antihemophilic factor VIII concentrate prepared from human plasma. **J. Microbiol. Biotechnol**, 2008; 18(5): 997–1003.
13. *Larsson P.-O.* High-performance liquid affinity chromatography. **Meth. Enzymol**, 1984; 104: 213–223.
14. *Mannucci P., Franchini M.* Present and future challenges in the treatment of haemophilia: a clinician's perspective. **Blood Transfus**, 2013; 11 (4): 77–81.
15. *Marcel P.W.M. Te Booy, Anita Faber, Jan Over, Boudewijn W. Konig.* Large scale purification of factor VIII by affinity chromatography: optimization of process parameters. **J. Chromatogr**, 1990; 8(2): 103–114.
16. *Morfino M., Coppola A., Franchini M., Di Minno G.* Clinical use of factor VIII and factor IX concentrates. **Blood Transfus**, 2013; 11(4): 55–63.
17. Pat. 6953837US. **Factor VIII/vWF complexes and compositions.** *M. Fischer, B. Schonberger, Thomas-Urban, K. Dornier, F. Eibl* – Appl. № 10/003.621; Filed: 02.11. 2001; Publ. 11.10.2005.
18. Pat. 7166709US. **Haemostatically active preparation containing vWF and method for the production thereof.** *Josic Stadler, Monika Gruber* – Appl. № 10/257.375; Filed: April 04.04. 2001; Publ. 23.01.2007.
19. *Pipe S.W.* Recombinant clotting factor. **Thromb. Haemost**, 2008; 99(5): 840–850.

FACTOR VIII AND METHODS OF PREPARATION OF ITS CONCENTRATES

N. O. Shurko, M. I. Vroniak, T. V. Danysh

*SI "Institute of Blood Pathology and Transfusion Medicine NAMS of Ukraine"
45, Gen. Chuprynka St., Lviv 79044, Ukraine
e-mail: natalia_shurko@ukr.net*

To correct factor deficiency or prevent bleeding in patients with hemophilia A, the replacement therapy is carried out. This therapy involves administering plasma or recombinant preparations of factor VIII. A variety of plasma- and recombinant-derived factor preparations are used for haemophilia treatment in Ukraine. Depending on purification level, the following types of plasma-derived concentrates are defined: intermediate purity products obtained through classic techniques of precipitation/adsorption, and high-purity concentrates purified through ion exchange or affinity chromatography. Since the late 1980s, recombinant factor drugs were brought into use in medical practice. They are synthesised by a genetically engineered Chinese hamster ovary cell line or baby hamster kidney. Recombinant factors are classified in generations according to the additional content of impurity human or animal proteins in a final product. The article provides an analysis of the main plasma-derived and recombinant factor VIII preparations registered in Ukraine. Basic properties, methods of preparation and methods of viral inactivation are described. The advantages and disadvantages of plasma-derived and recombinant products are generalized.

Keywords: blood coagulation, plasma and recombinant concentrate of factor VIII, chromatography, viral safety.

ПРЕПАРАТЫ ФАКТОРА VIII И МЕТОДЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ

Н. О. Шурко, М. І. Вороняк, Т. В. Даниш

*ГУ "Институт патологии крови и трансфузионной медицины НАМН Украины"
ул. Ген. Чупринки, 45, Львов 79044, Украина
e-mail: natalia_shurko@ukr.net*

С целью коррекции дефицита фактора или предотвращения кровотечений у пациентов с гемофилией А проводят заместительную терапию, которая заключается во введении плазменных или рекомбинантных препаратов фактора VIII. Для лечения гемофилии в Украине используют ряд препаратов фактора, как выделенных из плазмы, так и рекомбинантного происхождения. В зависимости от глубины очистки различают плазменные препараты промежуточной степени очистки, полученные с помощью традиционных методов осаждения/адсорбции, и высокоочищенные препараты, выделенные методами ионообменной или аффинной хроматографии. С конца 1980-х годов в клинической практике начали использовать рекомбинантные препараты фактора. Они получены методами генной инженерии, с использованием линии клеток яичника китайского хомяка или почки новорожденного хомяка. Рекомбинантные факторы разделяют на поколения в зависимости от содержания примесей человеческого или животного белка в конечном продукте. Проведен анализ препаратов фактора VIII, зарегистрированных в Украине; описаны их свойства, методы получения и вирусной инактивации; обобщены преимущества и недостатки плазменных и рекомбинантных факторов свертывания крови.

Ключевые слова: свертывание крови, плазменные и рекомбинантные препараты фактора VIII, хроматография, вирусная безопасность.

Одержано: 27.11.2013