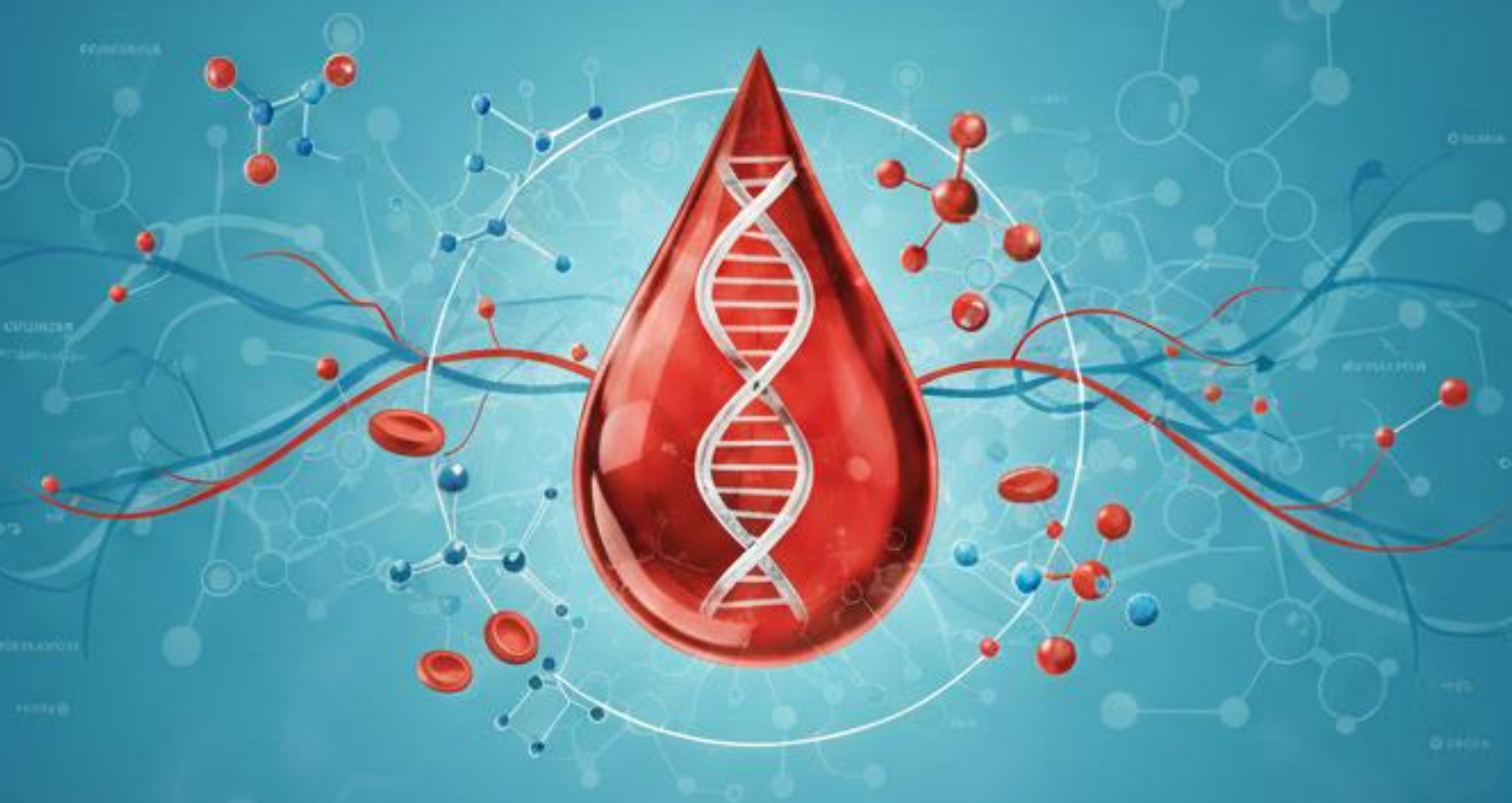


Охапкина Т. А., Кузнецов А. И.



Биопрепараты для лечения гемофилии

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет»
Институт естественных наук
Кафедра физиологии, клеточной биологии и биотехнологии

Охапкина Т. А., Кузнецов А. И.

БИОПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ГЕМОФИЛИИ

Учебно-методическое пособие



Ижевск

2026

УДК 604:615.22:612.115.4(075.8)

ББК 35.667р30

О-92

Рекомендовано к изданию Учебно-методическим советом УдГУ

Рецензент: д-р мед. наук, профессор ФГБОУ ВО «Ижевский государственный медицинский университет» **Л. С. Исакова**

Охапкина Т. А., Кузнецов А. И.

О-92 Биопрепараты для лечения гемофилии : учеб.-метод. пособие / Т. А. Охапкина, А. И. Кузнецов. – Ижевск : Удмуртский университет, 2026. – 2,5 Мб. – Текст : электронный.

Учебно-методическое пособие соответствует разделам дисциплин: «Биохимические основы технологии производства гемостатических, альбуминовых и ферментных препаратов», «Методы контроля и сертификации биотехнологических продуктов», «Техническая биохимия».

Рассматриваются заболевания, связанные с нарушением системы гемостаза и механизм их наследования. Описаны принципы работы системы свертывания крови, методы выделения и очистки белков плазмы крови с целью получения биопрепаратов для лечения гемофилии. Рассмотрены характеристики фармбиопрепаратов, вопросы обеспечения инфекционной безопасности препаратов в процессе производства и проблематика их применения при лечении гемофилии.

Пособие предназначено для студентов старших курсов бакалавриата, обучающихся по направлению подготовки «Биотехнология».

Минимальные системные требования:

Celeron 1600 Mhz; 128 Мб RAM; Windows XP/7/8 и выше, 8x DVD-ROM
разрешение экрана 1024×768 или выше; программа для просмотра pdf.

© Охапкина Т. А., Кузнецов А. И., 2026

© ФГБОУ ВО «Удмуртский

государственный университет», 2026

Охапкина Татьяна Андреевна, Кузнецов Александр Иванович

Биопрепараты для лечения гемофилии

Учебно-методическое пособие

Подписано к использованию 15.05.2026

Объем электронного издания 2,5 Мб

Издательский центр «Удмуртский университет»

426034, г. Ижевск, ул. Ломоносова, д. 4Б, каб. 021

Тел. : +7(3412) 263-751 E-mail: editorial@udsu.ru

ВВЕДЕНИЕ

Гемофилия является наследственным заболеванием, которое характеризуется нарушением свертываемости крови и приводит к частым и опасным кровотечениям. Согласно современным данным ВОЗ, число пациентов с гемофилией в мире превышает 400 тысяч человек, что делает это заболевание одной из наиболее распространенных наследственных геморрагических болезней.

В России количество заболевших составляет около 12 тысяч человек, и эта цифра ежегодно остается стабильной, несмотря на развитие медицинских технологий. Именно поэтому в современном мире это заболевание требует внимательного и систематического подхода к диагностике, лечению и реабилитации пациентов.

Актуальность решения проблем, связанных с лечением гемофилии, обусловлена высокой степенью ухудшения качества жизни пациентов, риском развития серьезных осложнений и необходимости сложной терапии. Современные методы заместительной терапии с использованием факторов свертывания и генетические подходы значительно повышают шансы на успешную коррекцию заболевания и снижение риска кровотечений.

Данное методическое пособие предназначено для студентов, а также всех, кто заинтересован в изучении особенностей гемофилии и способов ее лечения. В нем подробно рассмотрены различные виды заболевания, современные подходы к лечению и профилактике, а также механизмы функционирования факторов свертывания крови.

Цель пособия – обеспечить читателя актуальной и структурированной информацией, способной помочь в повышении уровня знаний и их укреплении по данной теме. Мы надеемся, что представленная информация станет полезным инструментом для повышения профессиональной компетентности обучающегося.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- БТЛП – биотехнологические лекарственные препараты
ГБК – главный банк клеток
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
КП – криопреципитат
КСП – криосупернатантная плазма
РБК – рабочий банк клеток
РФСК – рекомбинатные факторы свертывания крови
СЗП – свежзамороженная плазма
ЦНС – центральная нервная система
ЧСА – человеческий сывороточный альбумин
AAV – аденоассоциированный вирус
APC (activated protein C) – активированный протеин C
BDD (B-domain deleted) – фактор VIII с удаленным B-доменом
ВНК (Baby hamster kidney) – клетки почки новорожденного хомяка
СНО (Chinese hamster ovary) – клетки яичника китайского хомячка
FIX – фактор свертывания крови IX
FVIII – фактор свертывания крови VIII
НЕК (human embryonic kidney) – эмбриональные клетки почки человека
pd (plasma derived) – препарат, произведенный из плазмы крови
rFVIII – рекомбинантный фактор VIII
ТнВР – три-н-бутилфосфат
TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor) – природный ингибитор внешнего пути свертывания крови
vWF – фактор Виллербранда

ГЛАВА 1. ГЕМОРРАГИЧЕСКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

1.1. Определение гемофилии

Геморрагические заболевания – группа болезней, при которых нарушается процесс свертывания крови. Эти нарушения могут быть связаны с дефектами в системе свертывания крови, тромбоцитарной системе или сосудистых стенках.

Среди геморрагических заболеваний выделяют гемофилию, болезнь фон Виллебранда, тромбоцитарные патологии и ряд других редких заболеваний, проявляющихся в различной степени тяжести.

В данном пособии подробно будет рассмотрено такое заболевание, как гемофилия.

Гемофилия – это наследственное заболевание, связанное с нарушением свертывания крови из-за отсутствия или снижения активности факторов свертывания.

Гемофилией страдают преимущественно лица мужского пола, так как гены, кодирующие факторы свертывания крови, локализованы в пораженной X-хромосоме, которую сыновья наследуют от матери. Именно поэтому болезнь является рецессивной, то есть проявляется не во всех поколениях.

Тот факт, что гемофилия встречается чаще у мужчин объясняется тем, что у них есть только одна X-хромосома, которую они наследуют от матери (мужской набор хромосом – XY). И, если нужный ген в ней поврежден, шанса компенсировать такую поломку у организма нет.

Женщины, наследуя такую мутацию, обычно становятся ее носителями, так как у них две X-хромосомы (женский набор хромосом – XX). Если одна из них имеет дефектный ген, другая может компенсировать его работу и болезнь обычно никак не проявляется. В редких случаях у женщин могут появляться симптомы легкой формы гемофилии, например, склонность к кровоточивости. Это возможно, если здоровая X-хромосома недостаточно активна.

В настоящее время зафиксировано менее сотни случаев заболевания гемофилией женщин во всем мире, в то время как приблизительно у одного из пяти тысяч мужчин выявляются симптомы гемофилии А, а у одного из двадцати тысяч – симптомы гемофилии В.

1.2. Механизмы наследования гемофилии

Существует несколько вариантов наследования болезни.

Наиболее частый случай представлен на рис. 1. В этой ситуации отец является полностью здоровым по признаку гемофилии (XY), а мать – носительница заболевания (XX). На схеме видно, что если ребенок получит поврежденную X-хромосому от матери и Y-хромосому от отца, то родившийся мальчик будет

болеть болен гемофилией (XУ). А если ребенок получит поврежденную X-хромосому от матери и здоровую от отца, то родившаяся девочка станет, носителем гемофилии (XX), но болезнь у нее не проявится. В остальных случаях дети (как мальчики, так и девочки) родятся полностью здоровыми.

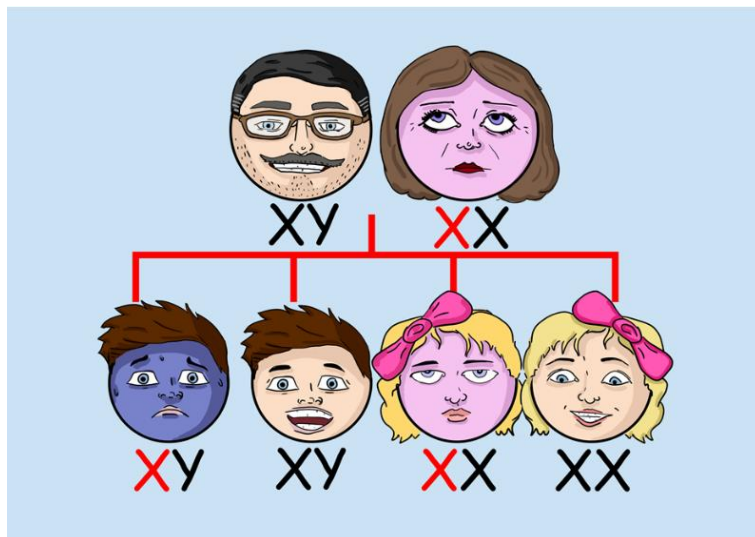


Рис. 1. Схема наследования гемофилии, когда отец здоров, а мать – носительница заболевания

Авторство: <https://genescells.ru/2313-1829/announcement/view/824>

Во втором случае (рис. 2) отец болен гемофилией (XУ), а мать полностью здорова (XX). В этой ситуации ген гемофилии детям передаст отец. На схеме видно, что все родившиеся мальчики будут здоровы (XУ), а девочки станут носителями заболевания (XX), так как получают поврежденную X-хромосому от отца.

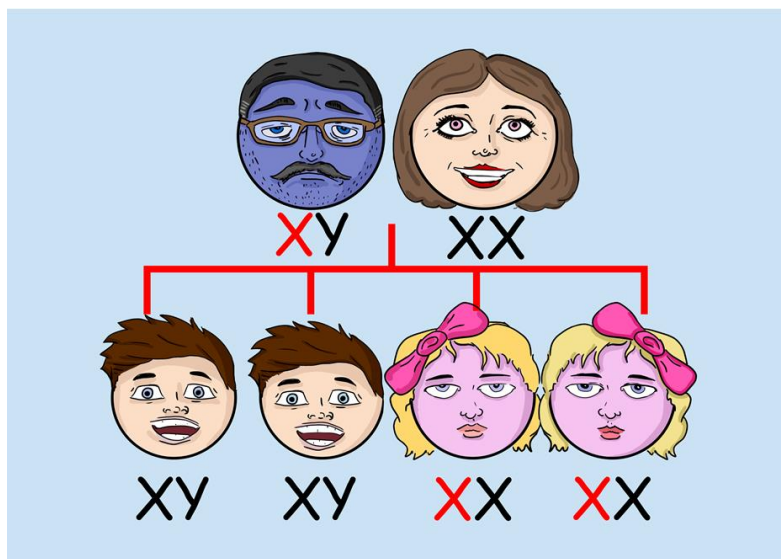


Рис. 2. Схема наследования гемофилии, когда отец болен, а мать – здорова

Авторство: <https://genescells.ru/2313-1829/announcement/view/824>

Третий случай (рис. 3), при котором отец болен гемофилией (XY), а мать – носительница заболевания (XX) наиболее редок. В такой ситуации теоретически с 50% вероятностью больными могут родиться как мальчики (XY), так и девочки (XX), так как поврежденная X-хромосома есть в генотипе и у отца, и у матери.

Но на практике в большинстве случаев происходит так, что на четвертой неделе беременности больной девочкой, когда у плода начинает формироваться кровь, происходит выкидыш из-за его нежизнеспособности. В мире известно всего несколько десятков случаев женщин, болеющих гемофилией.

Также в этой семье с 25% вероятностью может родиться здоровый мальчик, получивший от родителей неповрежденные хромосомы (XY). К сожалению, полностью здоровые девочки в такой семье родиться не могут. Девочка, получившая одну здоровую и одну поврежденную X-хромосомы от родителей (XX), будет носителем гемофилии.

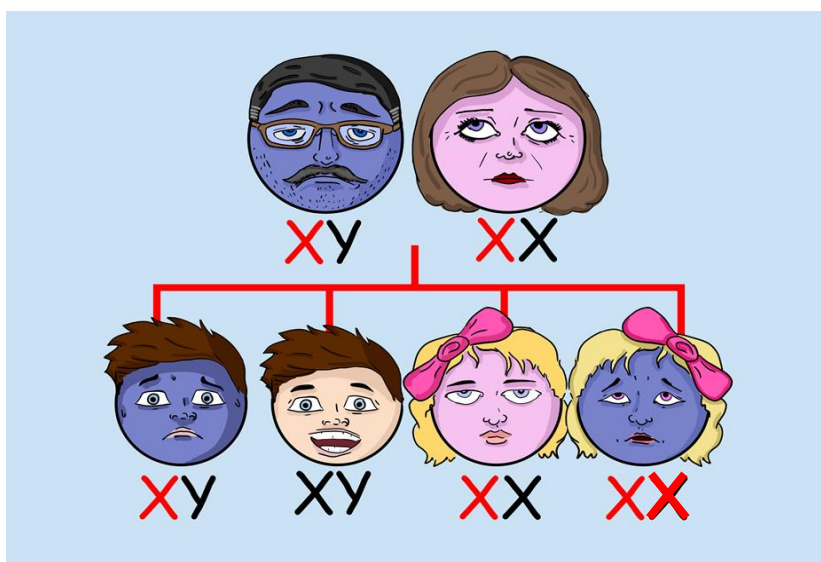


Рис. 3. Схема наследования гемофилии, когда отец болен, а мать – носительница гемофилии
Авторство: <https://genescells.ru/2313-1829/announcement/view/824>

1.3. Типы гемофилии

В зависимости от того, дефицит какого фактора наблюдается в организме, различают разные типы гемофилии: гемофилия А, гемофилия В (болезнь Крист-маса) и гемофилия С.

Гемофилия А обусловлена дефицитом фактора VIII, который действует как кофактор фактора IX. Из-за этого комплекс фактора VIII и фактора IX не работает или работает плохо. Следовательно, не происходит активация фактора X, который вместе с фактором V отвечает за активацию тромбина. Вместе с этим

замедляется превращение фибриногена в фибрин, и, следовательно, остановка кровотечения (рис. 4).

Такая гемофилия считается классической, встречается у 80–90 % больных гемофилией.

Примерно в 90% случаев гемофилии А в крови больных фактор VIII отсутствует или его недостаточно (количественный дефицит). В 10 % случаев фактор VIII находится в функционально неполноценной форме, которая не может принимать участия в свертывании крови (качественная недостаточность).

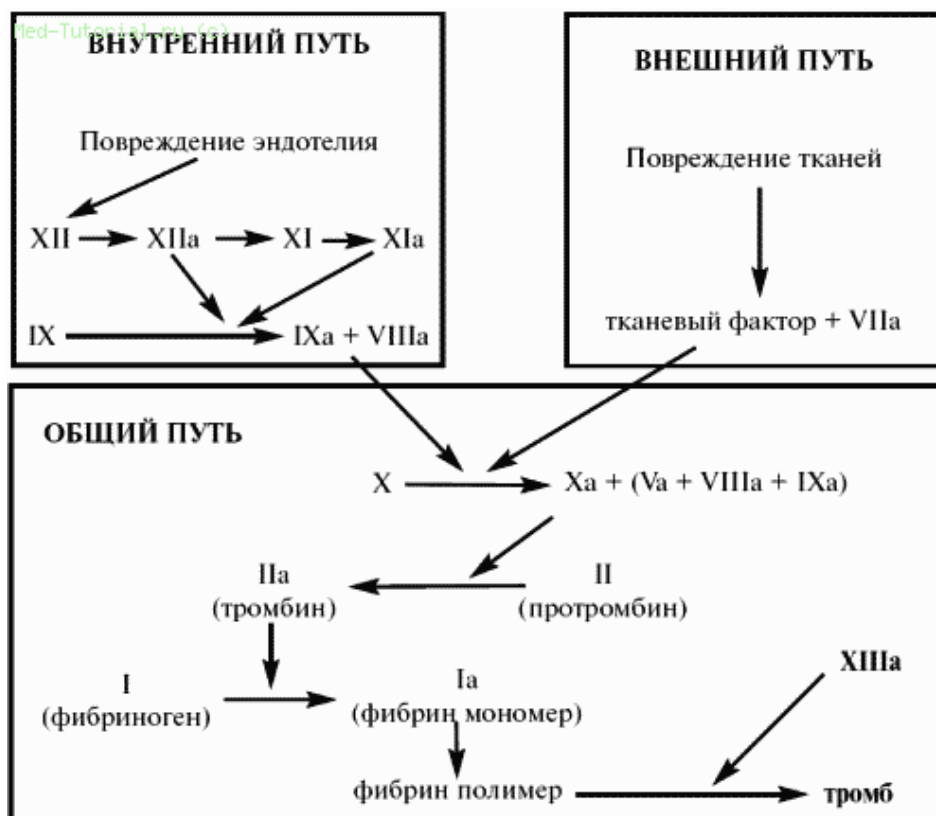


Рис. 4. Схема свертывания крови
Авторство: <https://studfile.net/preview/4081741/page:7/>

Гемофилия В (болезнь Кристмаса) вызвана дефицитом фактора IX в организме. Встречается у 15–20 % больных.

Основным симптомом гемофилии А и гемофилии В являются частые и длительные кровотечения. В детстве даже небольшие ранки и царапины могут стать причиной большой кровопотери. Но иногда симптомы гемофилии остаются незамеченными до полового созревания или подросткового возраста.

Могут наблюдаться гематомы на теле, кровотечения в суставах, приводящие к боли и отеку в этих областях. Относительно обычным явлением становятся частые носовые кровотечения, кровоточивость десен, кровотечения из ЖКТ. Так же простые процедуры, например, удаление зубов, могут привести к чрезмерной кровопотере.

Гемофилия С обусловлена недостатком фактора XI. Данный вид гемофилии описывается лишь в 5 % случаев.

С одинаковой частотой встречается как у мужчин, так и у женщин, так как гемофилия С связана не с половой X-хромосомой, а с так называемой «клеткой тела» – аутосомой. Чаще всего болезнь протекает бессимптомно. В большинстве случаев не требует лечения.

Степень тяжести заболевания определяют в зависимости от уровня активности фактора свертывания VIII или IX в крови (норма 50–150 %):

1. **При легкой степени** гемофилии уровень активности фактора варьируется от 5 до 40 % от нормы. После операции или удаления зуба может возникнуть обильное кровотечение.

2. **При средней степени** гемофилии уровни активности факторов от 1 до 5 % от нормы. Кровотечение обычно возникает после минимальной травмы.

3. **При тяжелой степени** гемофилии уровень активности менее 1 % от нормы. При такой степени тяжести могут возникать тяжелые кровотечения в течение жизни, начиная с самого рождения (например, гематома волосистой части головы после родов или чрезмерное кровотечение после обрезания).

Возмещение фактора свертывания обеспечивает сохранение жизни и трудоспособности пациентов.

Контрольные вопросы

1. Что такое геморрагические заболевания и какие системы организма они затрагивают?
2. Какие основные заболеваний входят в группу геморрагических болезней?
3. Почему гемофилия преимущественно встречается у мужчин?
4. Почему у женщин редко проявляется симптоматика гемофилии, несмотря на наличие мутации?
5. Опишите различные варианты наследования гемофилии.
6. Какие типы гемофилии существуют и чем они отличаются?
7. Какие симптомы характерны для гемофилии?
8. Какое главное отличие гемофилии С от других типов гемофилии?
9. Как определяют степень тяжести гемофилии и как проявляется гемофилия при различных степенях тяжести?

ГЛАВА 2. ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ ЗНАНИЙ О ГЕМОФИЛИИ

Гемофилия известна человечеству более двух тысячелетий.

Самые ранние упоминания о заболевании можно найти в еврейском религиозном труде – Талмуд. В нем описаны случаи смертельных кровотечений у мальчиков после ритуального обрезания, также были описаны рекомендации: «...если она сделает обрезание своему первому ребенку, и он умрет (от кровотечения во время операции) и второй тоже умрет, то она не должна делать обрезание своему третьему ребенку».

О наследственном нарушении процесса свертывания крови, которое затрагивает преимущественно мужчин, упоминалось в летописи II века. В X веке, мавританский хирург К. Аббас (K. Abbas) описал деревню, где многие мужчины страдали от кровотечений даже при незначительных травмах. Проявления гемофилии отмечаются и в медицинских рукописях позднего Средневековья и эпохи Возрождения.

В 1803 году американский врач Джон Отто (J. Otto) начал подробное изучение гемофилии как отдельное заболевание. В своих «Отчетах о геморрагической предрасположенности в некоторых семьях» (An Account of an Hemorrhagic Disposition in certain Families) он опубликовал исследование о течении гемофилии у нескольких поколений двух женщин. Дж. Отто выявил, что это заболевание является врожденным, передается здоровыми женщинами и проявляется только у мужчин.

В 1813 году другой американский врач Джон Хей (J. Hay) опубликовал в Медицинском журнале Новой Англии (The New England Journal of Medicine) аналогичное исследование семейной генеалогии больного. Он подтвердил наследственный характер заболевания, выявленный доктором Дж. Отто.

В 1820 году Христиан Нассе (Ch. Nasse) сформулировал закон, описанный в статье «О наследственной склонности к смертельным кровотечениям» (Vone inererblichen Neigungzutodlichen Blutungen), согласно которому: «Заболевание передается от деда к внуку через внешне здоровую мать-кондуктора».

Изначально в Германии гемофилию называли «геморрафилия» из-за склонности к кровотечениям. Однако в 1828 году Фридрих Хопф (F. Hopff) предложил термин «гемофилия», который и закрепился в медицинской практике.

Гемофилия относится к наследственным заболеваниям, связанным с половой X-хромосомой. Поражает преимущественно мужчин, но проявляется болезнь не во всех поколениях.

Около 70 % больных наследуют гемофилию от родителей. Оставшиеся 30 % случаев связаны со спорадическими (случайными) мутациями в генах больного. Болезнь появляется у людей, в анамнезе которых нет случаев гемофилии. Гемофилия, возникающая в таких случаях, называется спорадической.

Первым известным носителем гемофилии, в генотипе которого возникла спорадическая мутация, принято считать английскую королеву Викторию (годы жизни 1819–1901, годы правления 1837–1901). Ген гемофилии королевы передан не от родителей, а возник *de novo* (впервые).

Именно через королеву Викторию гемофилия получила распространение в королевских семьях Германии, Испании и России. Известнейшим представителем страдающим гемофилией стал цесаревич Алексей – сын Николая II. Схема наследования гемофилии в семье королевы Виктории представлена на рис. 5.

Из-за связи с королевскими семьями гемофилию иногда называют «викторианской» или «царской» болезнью.

В 2009 году ученые подтвердили наличие генетических маркеров гемофилии В в генном материале, полученном из костей расстрелянных членов семьи Романовых.

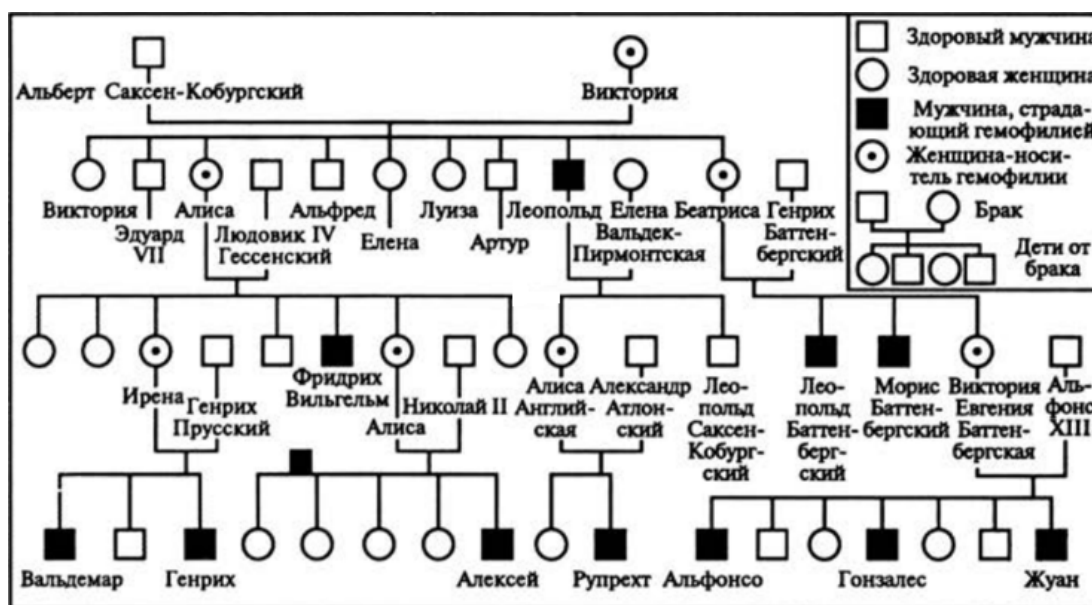


Рис. 5. Схема наследования гемофилии в семье королевы Виктории
Авторство: <https://thecrowns.ru/korolevskaya-semya/gemofiliya-v-sovremennoj-britanskoj-korolevskoj-seme.html>

Основоположником современных представлений о свертывании крови стал Александр Александрович Шмидт, который доказал ферментативный характер процесса свертывания крови. В 1892 году он написал фундаментальный труд «К учению о крови», закрепивший за ним звание «отца свертывания крови».

В 1893 году А. Райт (A. Wright) впервые провел лабораторную демонстрацию нарушения свертывания крови у больных гемофилией – в стеклянном капилляре замедлялось образование сгустка.

Ранее считалось, что причиной нарушения свертывания крови служит дефицит кальция. Однако в 1905 году Пауль Моравиц (P. Morawitz) опроверг эту гипотезу и предложил более точную схему свертывания крови, представленную на рис. 6. По его теории она включала только четыре компонента: тканевый тромбопластин (тромбокиназа), протромбин, кальций и фибриноген крови. Предполагалось, что нарушение гемостаза связано с тканевым фактором. Однако эта теория не могла объяснить случаи кровотечений у больных, у которых уровни этих факторов были в пределах нормы.

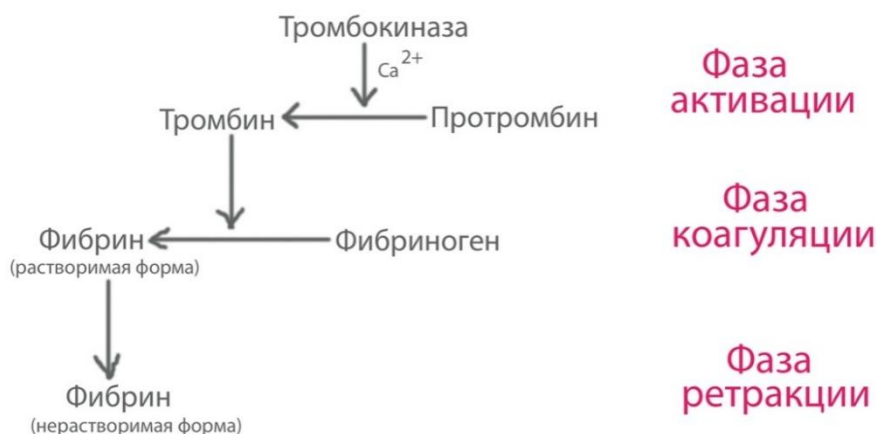


Рис. 6. Схема свертывания крови по Моравицу
 Авторство: Юрий Педаченко. Собственная работа, CC BY-SA 3.0,
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=14834866>

Изначально гемофилия представлялась однородным заболеванием, но позже А. Павловски (A. Pavlovsky) опроверг эту теорию. Он выяснил, что нарушение свертываемости крови у одного больного гемофилией можно исправить при помощи переливания крови от другого больного, также страдающего гемофилией. Это подтолкнуло к мысли о том, что существуют различные виды гемофилии.

В 1937 году ученые впервые обнаружили и описали фактор, отсутствующий у больных гемофилией. Его назвали антигемофильным фактором, поскольку он мог восстанавливать нарушения свертывания крови у больных гемофилией, которую позже назвали гемофилией А.

К 1952 году было обнаружено, что у некоторых больных гемофилией уровень антигемофильного фактора в норме, но отсутствует другой важный фактор свертывания. Это привело к открытию нового типа гемофилии, которое назвали гемофилией В, а недостающему фактору получил имя одного из первых больных пациентов – фактор Кристмаса.

В 1962 году для упрощения научных и клинических коммуникаций Международный комитет ввел нумерацию факторов свертывания и присвоил антигемофильному фактору римскую цифру VIII, а фактору Кристмаса – IX.

В 1964 году Э.У. Дэви (E. Davie), О. Ратнофф (O. Ratnoff) и Р.Г. Макфарлейн (R. Macfarlane) предложили каскадную модель свертывания крови. Эта гипотеза стала важным шагом вперед, однако с развитием науки и пониманием особенностей гемостаза при различных заболеваниях она была существенно доработана и дополнена.

Каскадная модель свертывания крови объясняла этапы свертывания крови *in vitro*, но не могла отразить процесс остановки кровотечения *in vivo*. В 2001 году М. Хоффман (M. Hoffman) и Д. Монро (D.M. Monroe) предложили клеточную теорию свертывания крови, дающую более полное описание клеток и факторов в живом организме.

Исторически существовали различные взгляды на лечение гемофилии. В 1894 году врач Уильям Ослер (W. Osler) полагал, что кровопускание лечит гемофилию. Однако уже через три года Сэмюэль Армстронг Лейн (S.A. Lane) опроверг это заблуждение и предложил переливание крови. Однако этот метод не всегда был успешным, так как в то время ученые не имели представления о несовместимости групп крови.

В 1930-х годах исследовалось кровоостанавливающее действие яда гадюки Рассела как способ стимулировать свертывание крови при местном применении. Но из-за риска осложнений этот метод не получил широкого применения.

В течение долгого времени основным методом лечения гемофилии было использование свежезамороженной плазмы (СЗП). Но этот подход не всегда давал нужный эффект из-за неспособности поддерживать полноценный гемостаз. Кроме того, из-за отсутствия должной обработки донорской плазмы в 1970-х годах многие больные гемофилией, получавшие заместительную терапию, заразились ВИЧ и умерли от СПИДа задолго до появления эффективных антиретровирусных препаратов.

В 1966 году после создания метода криопреципитации был зарегистрирован первый концентрат фактора VIII из донорской плазмы. Это значительно повысило качество и продолжительность жизни больных гемофилией. Однако первое время наблюдался острый недостаток таких препаратов и в США их раздавали по принципу лотереи.

В настоящее время перспективным направлением считается генная терапия, которая позволяет восстановить синтез недостающих факторов в клетках организма. Разработка генной терапии стала возможна в 1980 годах после клонирования генов, ответственных за синтез дефицитных факторов свертывания при гемофилии А и В.

Контрольные вопросы

1. Кто впервые описал гемофилию как отдельное заболевание и в каком году?
2. Как звучит закон о наследственной передаче гемофилии, сформулированный Христианом Нассе?
3. Что такое спорадическая гемофилия и почему она возникает?
4. Почему гемофилия получила названия «викторианская болезнь» или «царская болезнь»?
5. В каком году был открыт антигемофильный фактор?
6. В каком году и с какой целью была введена нумерация факторов свертывания римскими цифрами?
7. Чем отличается клеточная теория свертывания крови от каскадной модели?
8. Какие риски были связаны с использованием донорской плазмы для заместительной терапии в прошлом?

ГЛАВА 3. МЕХАНИЗМ РАБОТЫ СИСТЕМЫ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ

3.1. Определение гемостаза

Кровь – подвижная соединительная ткань организма человека, которая благодаря своему жидкому состоянию выполняет важные функции. Она состоит из двух основных компонентов: плазмы (около 60 % от объема) и взвешенных форменных частиц – эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов (примерно 40 % от объема).

Поддержание жидкого состояния крови в сосудах обеспечивается **системой гемостаза (системой свертывания крови)**. При повреждении сосуда эта система останавливает кровотечение, образуя тромбы (коагуляция), а затем растворяет их после выполнения своих функций (антикоагуляция).

То есть термином гемостаз можно назвать комплекс реакций организма, направленных на сохранение крови в сосудах в жидком состоянии, быстрое купирование кровотечения и восстановление кровотока при закупорке сосуда тромбом.

Из этого понятно, что система гемостаза находится в постоянном равновесии, сохраняя баланс между свертывающими и противосвертывающими механизмами и поддерживая кровь в жидком состоянии. Нарушение этого баланса в одну сторону может привести к кровотечениям, а в другую сторону – к образованию тромбов.

Главный механизм остановки кровотечения – **свертывание крови, или гемокоагуляция**. Оно осуществляется путем взаимодействия между стенками сосудов, клетками крови (в первую очередь тромбоцитами) и плазменными ферментными системами (свертывающей, фибринолитической, калликреин-кининовой). В результате этого взаимодействия образуется фибриновый каркас, который стабилизируют тромбоцитарную пробку и трансформирует ее в плотный сгусток.

3.2. Механизм гемостаза

Основные механизмы гемостаза включают первичный (сосудисто-тромбоцитарный) гемостаз, вторичный (коагуляционный или плазменный) гемостаз, фибринолиз. При повреждении сосуда задействуются все механизмы гемостаза.

1. Сосудистый гемостаз (спазм сосуда)

При нарушении целостности сосуда запускается механизм свертывания крови. В первую очередь реагируют рецепторы боли, которые вызывают рефлекторное сужение сосудов. В результате уменьшается просвет сосуда и, соответственно, снижается скорость кровотока, уменьшая кровопотерю.

2. Тромбоцитарный гемостаз

В остановке кровотечения также принимает участие и сама сосудистая стенка. В норме она ведет себя по отношению к крови, как нейтральный проводник, не мешая кровотоку. Однако при повреждении сосуда коллаген, содержащийся

внутри стенок сосудов, обнажается и вступает в контакт с клетками и компонентами плазмы крови. Этот контакт инициирует сложные биохимические реакции – активацию и агрегацию (склеивание) тромбоцитов, необходимые для формирования «белого» тромба, который служит первичным барьером, способствующим восстановлению целостности сосуда.

3. Коагуляционный (плазменный) гемостаз

После образования первичного сгустка активируются факторы свертывания крови, благодаря которым из растворимого белка плазмы крови – фибриногена образуется нерастворимый фибрин. Он формирует вокруг сгустка тромбоцитов фибриновую сеть, способную удерживать тромбоциты и остальные элементы крови, создавая надежный «красный» тромб. Этот тромб стягивает края раны и полностью восстанавливает целостность поврежденного сосуда.

4. Фибринолиз

После восстановления поврежденного сосуда активируется система фибринолиза – процесс разрушения и удаления сформировавшегося тромба. Это помогает восстановить нормальный кровоток в сосуде и предотвратить чрезмерное образование тромбов.

Баланс между свертыванием крови и фибринолизом обеспечивает антикоагуляционная система.

Антикоагуляционная система – это совокупность механизмов и факторов, которые регулируют и тормозят процесс свертывания, предотвращая патологическое тромбообразование.

3.3. Факторы свертывания крови, каскад активации

Компоненты свертывающей системы, присутствующие в плазме, называются **факторами свертывания крови**. Изначально они находятся в неактивной форме. При повреждении кровеносного сосуда инициируется каскад свертывания, и каждый фактор свертывания активируется в особом порядке с целью сформировать фибриновый сгусток. Общепринята римская нумерация факторов свертывания в порядке хронологии их открытия. Активированные факторы свертывания обозначаются дополнительной буквой «а», следующей за римским номером.

В таблице 1 представлены физико-химические свойства факторов свертывания крови.

Таблица 1

Физико-химические свойства факторов свертывания крови

№	Название фактора	Молекулярная масса	Концентрация в плазме крови	Изоэлектрическая точка
I	Фибриноген	340 кДа	2–4 г/л	5,5–6,5
II	Протромбин	72 кДа	110 мг/л	4,4–6,0
III	Тканевый тромбопластин	–	Не циркулирует в плазме	–

IV	Ионы Ca ²⁺	–	–	–
V	Проакцелерин	330 кДа	4–10 мг/л	5,5–6,0
VII	Проконвертин	63 кДа	0,4–0,6 мг/л	5,5–6,0
VIII	Антигемофильный глобулин А	260 кДа	0,1–0,4 мг/л	5,5–6,8
IX	Кристмас-фактор	57 кДа	3–5 мг/л	5,2–6,0
X	Фактор Стюарта–Прауэра	60 кДа	7–10 мг/л	5,5–6,0
XI	Фактор Розенталя	160 кДа	4–6 мг/л	5,0–6,2
XII	Фактор Хагемана	80 кДа	24 мг/л	5,5–6,2
XIII	Фибринстабилизирующий фактор	320 кДа	22 мг/л	5,2–6,5

Факторы свертывания крови:

• **Фактор I** (фибриноген) – бесцветный белок, растворенный в плазме крови. Является важнейшим компонентом свертывающей системы крови. При активации системы свертывания подвергается ферментативному расщеплению тромбином (IIa). При этом образуется фибрин-мономер, который под действием XIIIa фактора свертывания крови полимеризуется и выпадает в осадок в виде белых нитей фибрина-полимера, формируя тромб.

• **Фактор II** (протромбин) – сериновая протеаза, относится к классу гидролаз, синтезируется в печени. Является одним из основных белков плазмы крови, определяющих свертывание крови. При гидролитическом расщеплении протромбина(II) образуется активный фермент свертывания крови – тромбин (IIa). Главная его функция – превращение фибриногена (I) в фибрин (Ia).

• **Фактор III** (тканевый фактор, тканевый тромбопластин, тромбокиназа) – трансмембранный белок состоит из апопротеина III и комплекса фосфолипидов. Входит в состав мембран большинства клеток нашего организма, не циркулирует в крови, отсутствует на клетках эндотелия сосудов. При повреждении эндотелия сосуда плазма крови вступает в контакт с клетками, несущими тканевый фактор. Тканевой тромбопластин активирует внешнюю систему свертывания крови, которая запускается в ответ на повреждение кровеносного сосуда.

• **Фактор IV** (ионы Ca²⁺) активирует определенные факторы свертывания и способствует образованию кровяного сгустка при повреждении сосудов. Нормальная скорость свертывания крови обеспечивается оптимальными концентрациями ионов Ca²⁺.

• **Фактор V** (проакцелерин) – белок β-глобулин, не является проферментом. Синтезируется в печени, не зависит от витамина K. Он является предшественником акцелерина (Va). Раньше акцелерин считался VI фактором, но был изъят из классификации, так как является активной формой проакцелерина.

• **Фактор VII** (проконвертин) – белок γ -глобулин, протеаза. Проконвертин является предшественником конвертина (VIIa), синтезируется в печени с участием витамина К. Основной физиологической ролью проконвертина является активация фактора свертывания крови X. Совместно с тканевым тромбопластином (III) он образует комплекс, который переводит фактор свертывания X из неактивной в активную форму. Активированный фактор X в свою очередь участвует в процессах активации протромбина и переходе его в тромбин.

• **Фактор VIII** (антигемофильный глобулин A) – белок β -глобулин. Образует комплекс с фактором Виллебранда, который синтезируется в клетках эндотелия и печени. Играет важную роль в процессах свертывания крови, является необходимым компонентом крови для формирования активного фактора X при обязательном участии фактора IX.

• **Фактор IX** (антигемофильный глобулин B, Кристмас-фактор) – белок α -глобулин, протеаза. Образуется в печени с участием витамина К. Принимает участие в образовании активного фактора X при обязательном участии фактора VIII.

• **Фактор X** (фактор Стюарта–Прауэра) – белок γ -глобулин, протеаза. Продуцируется в печени при участии витамина К. Под воздействием нескольких факторов свертывания (III, VII, VIII, IX) он переходит в активную форму Xa. Она в свою очередь совместно с фактором свертывания V и ионами Ca^{2+} образует ферментный комплекс, выполняющий функцию активатора протромбина (II).

• **Фактор XI** (фактор Розенталя) – белок γ -глобулин, протеаза. Образуется в печени, активируется фактором XII. В свою очередь вместе с ионами Ca^{2+} оказывает непосредственное влияние на фактор IX, переводя его в активное состояние.

• **Фактор XII** (фактор Хагемана) – белок β -глобулин, протеаза. Синтезируется в печени. В норме находится в неактивном состоянии в плазме крови. Его активация происходит при контакте с отрицательно заряженными поверхностями, например, с коллагеном, обнажающимся при повреждении сосудов и кожных покровов. В активации и действии фактора XII участвуют также высокомолекулярный кининоген и протеолитические ферменты, например, калликреин, тромбин или трипсин. Активированный фактор Хагемана в свою очередь воздействует на фактор свертывания крови XI и запускает так называемую внутреннюю систему гемостаза.

• **Фактор XIII** (фибринстабилизирующий фактор, протрансглутаминаза или фактор Лаки-Лоранда) – профермент, активируется тромбином, путем частичного протеолиза до фактора XIIIa (трансглутаминазу). Фактор XIIIa представляет собой фермент, который сшивает растворимые молекулы фибрина-мономера (агрегированного фибрина), превращая его в более прочную и нерастворимую форму – фибрин-полимер (стабилизация фибринового сгустка). Дефицит фактора XIII ухудшает стабильность сгустка и увеличивает склонность к кровотечениям.

Активация факторов свертывания при коагуляционном гемостазе происходит последовательно по цепочке. Один фермент, работающий с постоянной скоростью, дает линейную зависимость концентрации продукта от времени. У каскада из N ферментов эта зависимость будет иметь вид t^N , где t – время. Для эффективной работы системы важно, чтобы реакция происходила именно по такому «взрывному» сценарию, так как это минимизирует период, когда сгусток фибрина еще недостаточно прочен. Такой механизм обеспечивает быстрый ответ организма при повреждении сосуда.

Каскад свертывания крови протекает по двум относительно независимым механизмам: внешний и внутренний пути, которые затем объединяются в общий путь. Различия этих механизмов обусловлены природой ферментных комплексов, инициирующих свертывание.

Схема каскадной модели активации факторов свертывания и работа антикоагуляционной системы представлены на рис. 7.

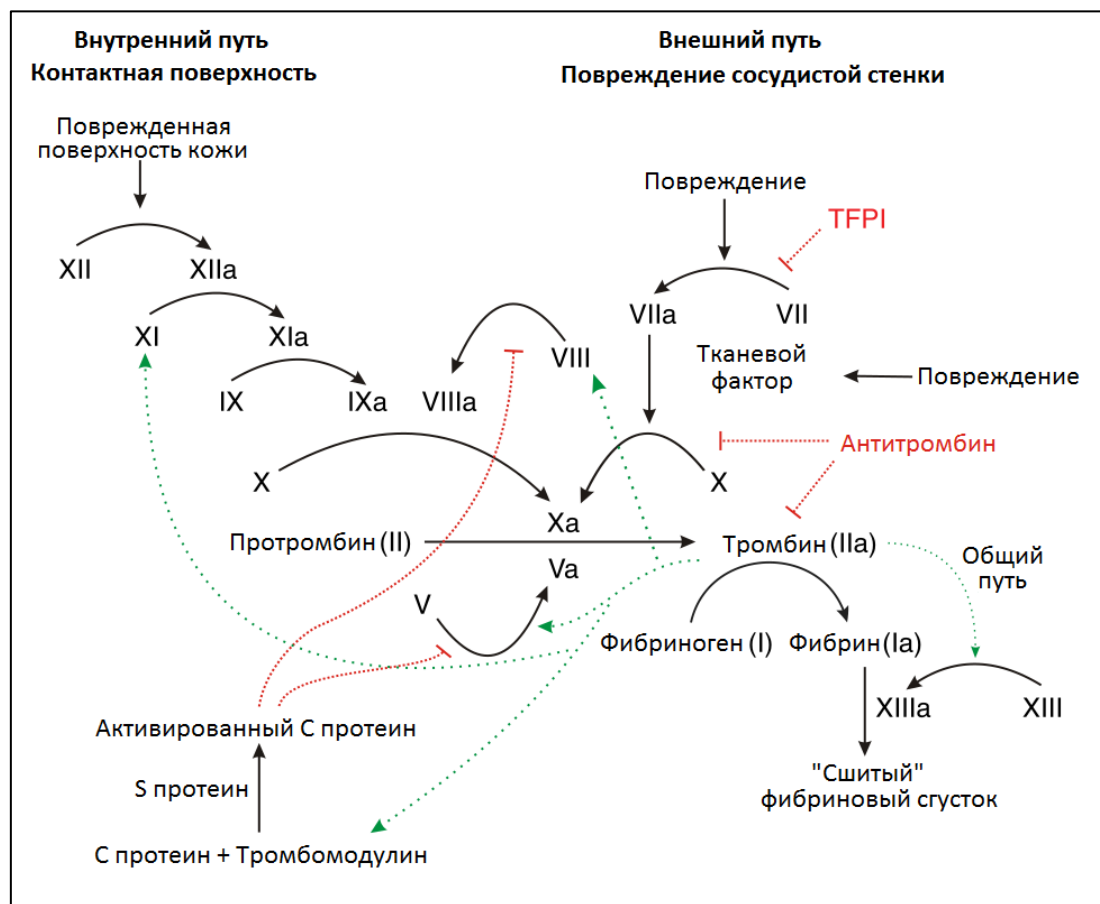


Рис. 7. Каскадная модель активации факторов свертывания по внутреннему и внешнему путям: зелеными стрелочками показаны реакции, в которых фактор активируется тромбином. Красными стрелочками показаны реакции, которые ингибируются определенными компонентами
 Авторство: Nekish27. Собственная работа, CC BY-SA 4.0,
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=128703810>

1. Внешний путь

Иницируется при повреждении сосудистой стенки и контакте крови с тканевым фактором (ТФ, фактор III).

- Тканевый фактор (фактор III) высвобождается из поврежденных тканей.
- ТФ связывается с фактором VII из плазмы, активируя его до активной формы VIIa.
- Комплекс ТФ + VIIa (внешняя теназа) активирует фактор X до Xa.
- Также активируется фактор IX (частично), что важно для внутреннего пути.

2. Внутренний путь

Иницируется при повреждении сосудистой стенки и контакте крови с коллагеном.

- Поврежденный эндотелий обнажает коллаген.
- Фактор XII активируется до XIIa при контакте с поврежденной поверхностью.
- Фактор XIIa активирует фактор XI до XIa. Фактор XI также может активироваться до XIa тромбином.
- Фактор XIa активирует фактор IX до IXa.
- Для эффективного функционирования фактор IXa нуждается в кофакторе. В данном случае это фактор VIIIa, который активируется тромбином. Это называется **положительной обратной связью** – процесс, когда фермент активирует собственное образование для быстрого образования прочного фибринового сгустка.
- Комплекс IXa + VIIIa (внутренняя теназа), активирует фактор X до Xa.

Как было показано экспериментально и теоретически, положительная обратная связь активации фактора V тромбином формирует **порог по активации** – свойство системы не реагировать на малую активацию, но быстро срабатывать при появлении большой. Подобное умение переключаться считается очень важным для свертывания, поскольку это позволяет избежать случайных срабатываний системы.

3. Общий путь

- Объединение активированных факторов Xa из внутреннего и внешнего путей формирует комплекс протеинкиназы – фактор Xa в сочетании с фактором Va (активирующийся тромбином), который превращает протромбин (фактор II) в тромбин (фактор IIa).
- Тромбин (IIa) играет центральную роль: он превращает растворимый фибриноген (I) в нерастворимый фибрин (Ia).
- Фибриновые нити образуют сетку, которая стабилизирует тромб.
- Тромбин также активирует фактор XIII до XIIIa, который способствует перекрестному связыванию фибриновых нитей, укрепляя тромб.

Работа антисвертывающей системы представлена ингибиторами протеиназ свертывания. Основными являются антитромбин III и ингибитор пути тканевого фактора (TFPI).

Антитромбин III (АТ III) – это природный антикоагулянт, который синтезируется в печени и циркулирует в плазме крови. Ингибирует активность тромбина (IIa) и фактора Ха. Важным кофактором антитромбина III является гепарин, который усиливает его ингибирующие свойства.

Антитромбин III обеспечивает контроль за свертыванием крови, предотвращая чрезмерное образование тромбов.

TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor) – природный ингибитор внешнего пути свертывания крови. Синтезируется эндотелиальными клетками, тромбоцитами и другими клетками.

TFPI связывается с комплексом тканевого фактора (TF) и фактором VIIa, блокируя его активность. После связывания с комплексом TF-VIIa, TFPI также связывается с фактором Ха, ингибируя и его активность. Эти действия снижают образование тромбина и замедляют каскад свертывания, предотвращая чрезмерное образование тромбов.

Кроме этого, тромбин в комплексе с тромбомодулином (трансмембранный белок) превращает протеин С в его активную форму – активированный протеин С (APC). Для эффективной работы протеина С необходимо присутствие кофактора – протеина S, который усиливает его ингибирующую активность.

APC расщепляет факторы свертывания Va и VIIIa, заставляя их полностью терять свою активность. Это также замедляет каскад свертывания и уменьшает образование фибринового сгустка. Эксперименты позволили предположить, что эта реакция останавливает пространственный рост тромба, ограничивая его размер.

Таким образом, тромбин – продукт каскада свертывания – ингибирует свое собственное производство: это называется **отрицательной обратной связью**.

Контрольные вопросы

1. Из каких компонентов состоит кровь и каков их примерный процентный состав?
2. Что такое гемостаз и какова его основная функция?
3. Назовите механизмы гемостаза, которые задействуются при повреждении сосуда.
4. Что происходит при первичном гемостазе?
5. Что такое фибринолиз и для чего он необходим?
6. Что такое факторы свертывания крови, и что происходит с ними при повреждении сосуда?

7. Объясните понятие «положительная обратная связь».
8. Как работают ингибиторы свертывания, такие как антитромбин III и TFPI, для регулирования процесса гемостаза?
9. Что такое «отрицательная обратная связь»?

ГЛАВА 4. МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ БЕЛКОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ

4.1. Получение плазмы

Основным сырьем для получения белков плазмы промышленным способом является донорская плазма крови человека. Существуют два способа ее получения.

Первый способ – это фракционирование крови, полученной традиционным донорством.

Фракционирование крови – это процесс разделения цельной крови на компоненты. Обычно это делается с помощью центрифугирования.

Компоненты крови, получаемые в процессе фракционирования, представлены на рис. 8:

- прозрачный раствор плазмы крови в верхней фазе (который можно разделить на фракции);
- лейкоцитарная оболочка, представляющая собой тонкий слой лейкоцитов (белых кровяных телец), смешанных с тромбоцитами в середине;
- эритроциты (красные кровяные тельца) на дне центрифужной пробирки.

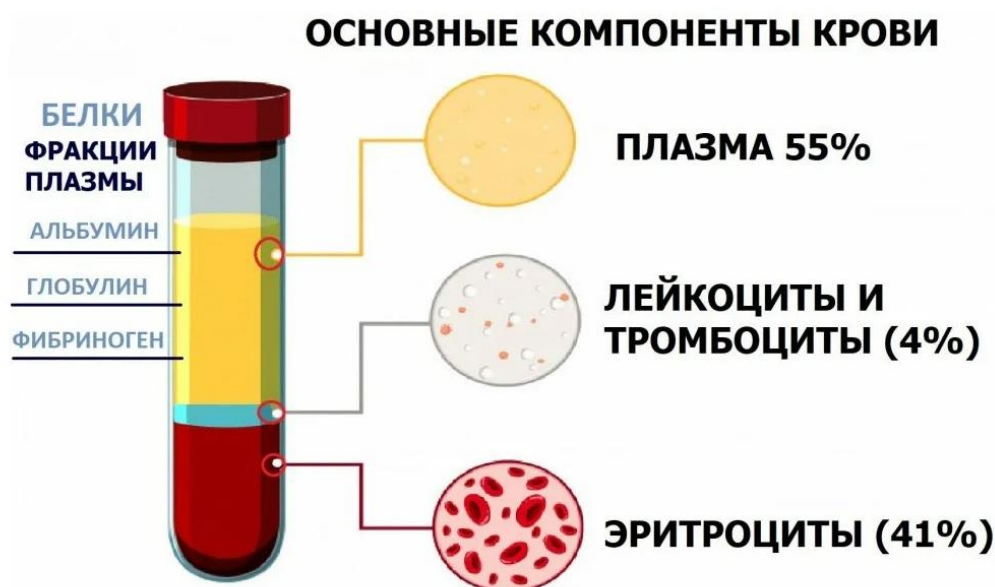


Рис. 8. Компоненты крови

Авторство: <https://mederispb.ru/articles/open/196>

Фракционирование – это многостадийный технологический процесс. Он требует глубоких знаний как в отношении самого процесса, так и в отношении оборудования, необходимого для достижения высокой производительности в экономически эффективные сроки.

Надлежащее соблюдение всех этапов фракционирования крови является гарантией качества получаемых препаратов. Некоторые из этапов могут также способствовать эффективному сокращению потенциальных вирусов-контаминантов.

В настоящее время чаще используется другой способ получения донорской плазмы – процедура донорского плазмафереза, которая является частным случаем афереза.

Плазмаферез – это процедура забора крови, получение из нее плазмы и возвращение клеток крови обратно донору.

Плазму от крови донора отделяют методом центрифугирования в специальном аппарате – сепараторе, представленный на рис. 9. В аппарате находится одноразовая пластиковая система, которая с помощью иглы подсоединяется к донору. Для предотвращения свертывания в кровь донора добавляют вещество, препятствующее свертыванию – антикоагулянт. Отделенная центрифугированием плазма собирается в стерильный мешок, а остальные компоненты крови переливаются обратно донору. Полученную плазму крови подвергают фракционированию для получения биопрепаратов.

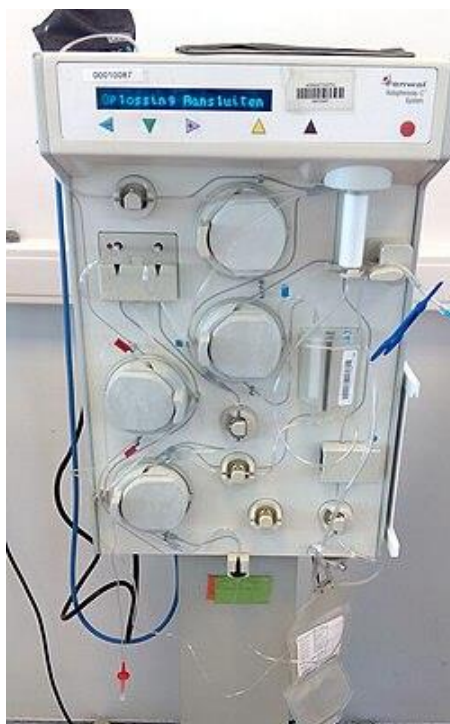


Рис. 9. Устройство для проведения плазмафереза

Авторство:

<https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9F%D0%BB%D0%B0%D0%B7%D0%BC%D0%B0%D1%84%D0%B5%D1%80%D0%B5%D0%B7>

Процедура афереза позволяет получить от одного донора существенно большее количество нужного компонента крови, чем при обычном донорстве цельной крови с ее последующим разделением на компоненты.

4.2. Фракционирование белков плазмы

Фракционирование плазмы – это процесс разделения плазмы на отдельные компоненты и фракции с последующей очисткой различными физико-химическими методами.

Основные компоненты плазмы крови человека:

1. Вода ~ 90–92 %.
2. Белки ~ 7–8 %, из них:
 - Альбумины ~ 60 %;
 - Глобулины (α -, β - и γ -глобулины) ~ 35 %;
 - Фибриноген ~ 4 %.
3. Неорганические вещества (минералы, ионы) ~ 1–2 %.
4. Органические вещества (глюкоза, мочевины, гормоны, витамины и др.) – менее 1 %.

Фракционирование плазмы крови человека позволяет получить очищенные и концентрированные белки необходимые для производства биопрепаратов для интенсивной и неотложной медицины, а также для лечения пациентов с дефицитами определенных компонентов крови. Также этот метод снижает риск передачи гемотрансфузионных инфекций по сравнению с использованием цельной плазмы.

4.2.1. Криопреципитация плазмы

Технологическую переработку плазмы крови осуществляют как с выделением криопреципитата, так и без него. Фракционирование плазмы с получением криопреципитата называется криопреципитацией. Криопреципитация является частным случаем фракционирования плазмы.

Криопреципитация плазмы – это процесс выделения из замороженной плазмы определенных белков, которые при размораживании оседают в виде осадка. Схема переработки представлена на рис. 10.

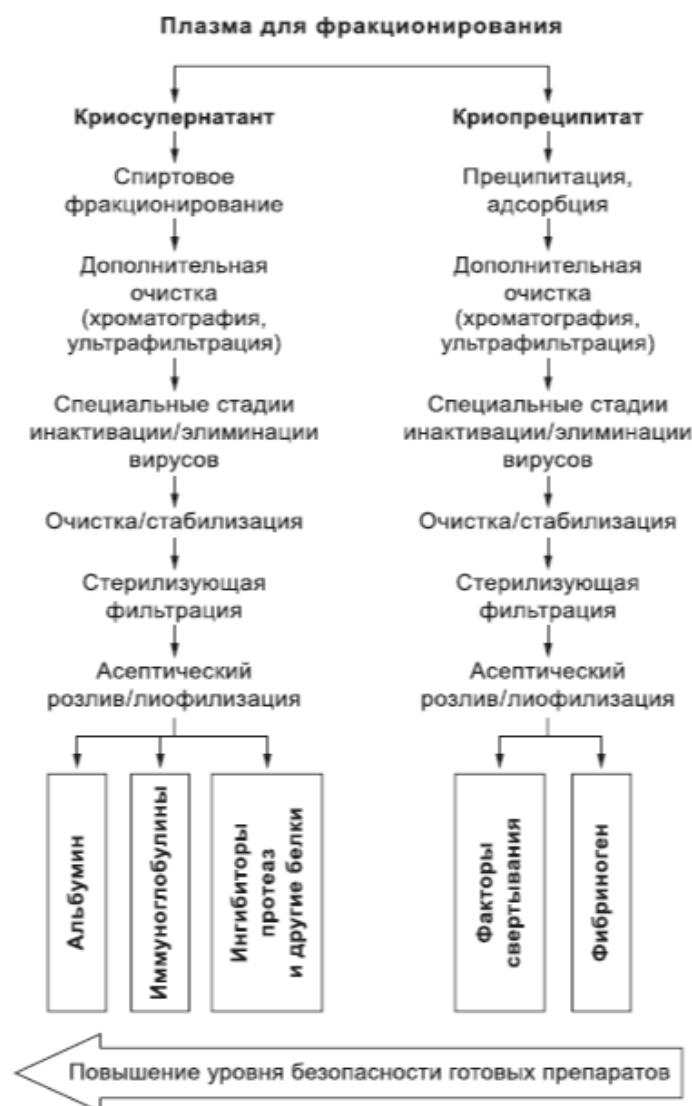


Рис. 10. Схема переработки плазмы крови с получением криопреципитата
 Авторство: Зубкова Н.В. Обеспечение инфекционной безопасности препаратов
 из плазмы крови доноров // Гематология и трансфузиология, 2014

Криопреципитат (КП) – концентрированный белковый препарат, представляющий собой смесь факторов свертывания крови и высокомолекулярных белков плазмы, полученный из свежзамороженной плазмы после ее оттаивания. Главными его компонентами являются фибриноген, фактор VIII (фактор Виллебранда), фактор XIII, антитромбин III и другие.

Криопреципитат в течение длительного времени являлся основным терапевтическим препаратом при лечении гемофилии А и болезни Виллебранда. Его лечебная эффективность обусловлена прежде всего высоким содержанием в нем FVIII по сравнению со свежзамороженной плазмой (СЗП). В настоящее время для лечения гемофилии А и болезни Виллебранда используют концентраты FVIII средней и высокой степени очистки, обладающие высокой степенью вирусной безопасности.

Криосупернатантная плазма или криосупернатант (КСП) – жидкий компонент донорской плазмы после удаления из нее криопреципитата. Она используется для получения фракций других факторов свертывания крови и для выделения фракций иммуноглобулина и альбумина человека.

Криосупернатантная плазма в течение длительного времени использовалась при лечении гемофилии В. В настоящее время для терапии гемофилии В используют концентраты FIX средней и высокой степени очистки, обладающие высокой степенью вирусной безопасности.

В КСП по сравнению со свежесзамороженной плазмой и криопреципитатом значительно снижены концентрации факторов VIII, XII, Виллебранда и фибриногена. Из криосупернатантной плазмы производят концентраты протромбинового комплекса.

На рис. 11 представлено схематическое изображение современного процесса производства препарата Октаплекс®.



Рис. 11. Схематическое изображение современного процесса производства препарата Октаплекс®

Авторство: Bertolini J. Production of Plasma Proteins for Therapeutic Use, 2013

Октаплекс представляет собой комплекс факторов свертывания крови II, VII, IX и X, который называется протромбиновым комплексом. Данный препарат производится из криообедненной плазмы. Первым этапом добавляют гепарин и производят коррекцию рН. Далее идет первый этап анионообменной хроматографии (QAE-сефадекс). После промывки сорбента адсорбированные витамин К-зависимые факторы и другие белки плазмы десорбируются путем повышения ионной силы с использованием элюирующего буфера. Последующая обработка сольвент/детергентом с 0,3% ТnBP/1% Полисорбатом 80 обеспечивает эффективную и надежную процедуру инактивации оболочечных вирусов. Адсорбция на втором анионообменном сорбенте (DEAE-сефароза) и последующая промывка способствуют эффективному удалению S/D реагентов и элюированию концентрированных факторов протромбинового комплекса вместе с остаточными белками плазмы.

Нанофильтрация элюата обеспечивает второй эффективный, специализированный и механистически иной этап снижения количества патогенов.

Далее проходят этапы диафильтрации и ультрафильтрации. После добавления гепарина стерильно отфильтрованный раствор разливается и лиофилизируется без добавления каких-либо белковых стабилизаторов, таких как альбумин.

Оптимизированное короткое время процесса от криообедненной плазмы до конечного продукта обеспечивает максимальную нативность продукта с превосходным профилем в отношении соотношения факторов, близкого к желаемому оптимуму 1:1:1:1 (FIX:FII:FVII:FX), сбалансированного эквивалентным содержанием ингибиторов (белки C и S) и минимальным содержанием маркеров активации коагуляции и активированных факторов, таких как FVIIa. Кроме того, белок Z (кофактор, участвующий в регуляции свертывания) содержится в физиологически значимых концентрациях.

Для дальнейшего концентрирования белковых фракций из КСП используют последовательные стадии преципитации, адсорбции с параллельным выделением фракций других факторов свертывания и проведением стадий элиминации/инактивации вирусов.

Основным методом является спиртовое фракционирование по Кону. Условия для получения различных фракций представлены на рис. 12.



Рис. 12. Диаграмма фракционирования белков плазмы крови человека этанолом (по методу Кона)
 Авторство: <https://xumuk.ru/biologhim/007.html>

Для выделения и очистки концентратов используются разные методы: фильтрация, преципитация и различные виды хроматографии.

На рис. 13 представлена типовая многостадийная схема производственного процесса получения плазменного фактора крови IX.

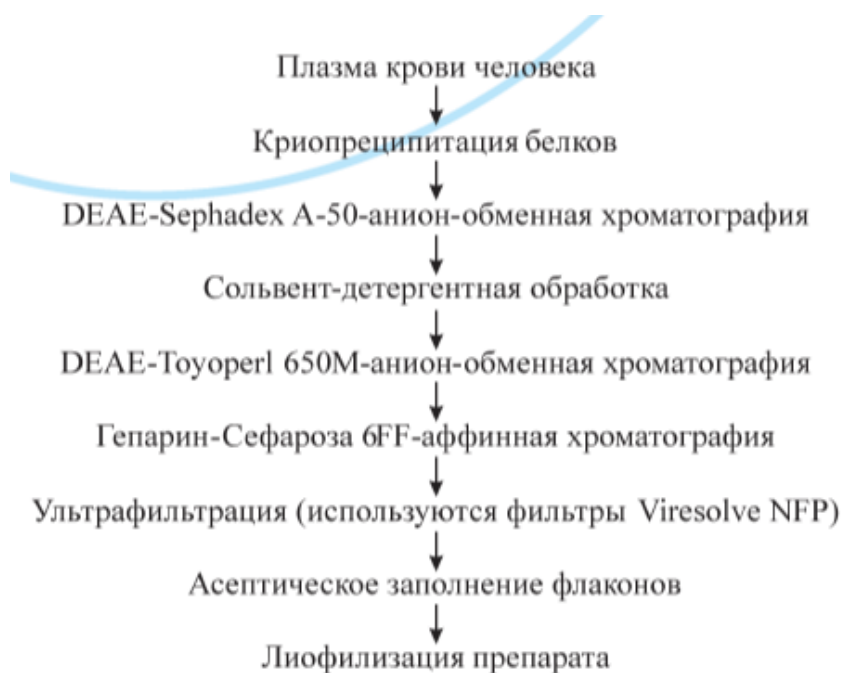


Рис. 13. Типовая многостадийная схема производственного процесса получения фактора крови IX
 Авторство: Супотницкий М.В. Препараты крови человека и животных в аспекте показателей качества, эффективности и безопасности // Биопрепараты, 2015

Высокоочищенный фактор IX получают из концентрата протромбинового комплекса. На рис. 14 представлены сравнительные схемы процесса очистки препаратов Альфанин®, Репленин®, Бетафакт®.

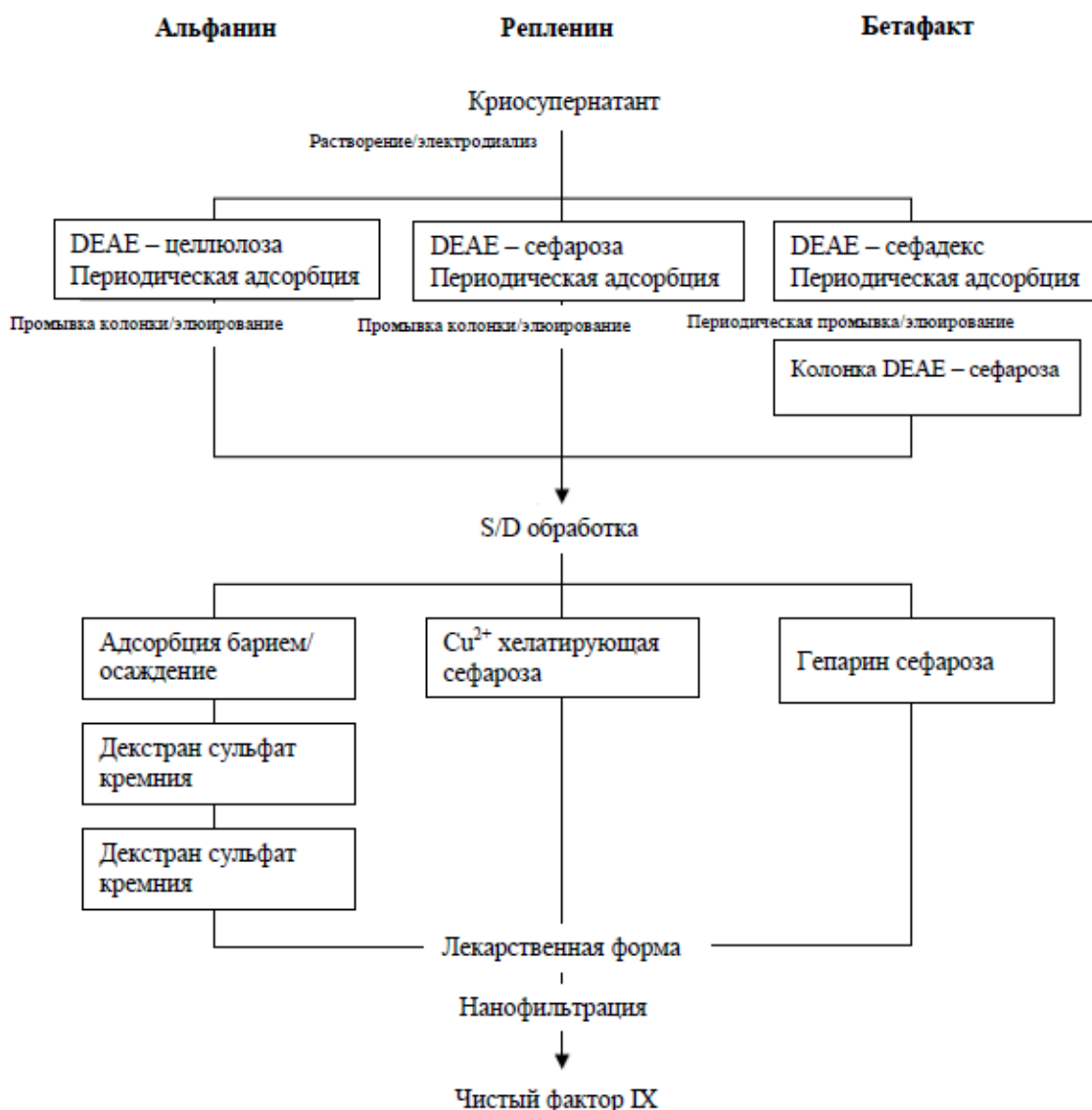


Рис 14. Сравнительные схемы процесса очистки препаратов Альфанин®, Репленин®, Бетафакт®

Авторство: Bertolini J. Production of Plasma Proteins for Therapeutic Use, 2013

В процессе производства необходимо иметь подробные спецификации для промежуточных продуктов с указанием точной концентрации этанола, используемого для осаждения, концентрации белка в промежуточных продуктах, температуры, pH и ионной силы растворов, времени обработки, а также данные о пределах допустимой погрешности и сведения о методах контроля всех показателей. На рис. 15 представлены основные технологии, используемые для получения различных биопрепаратов.

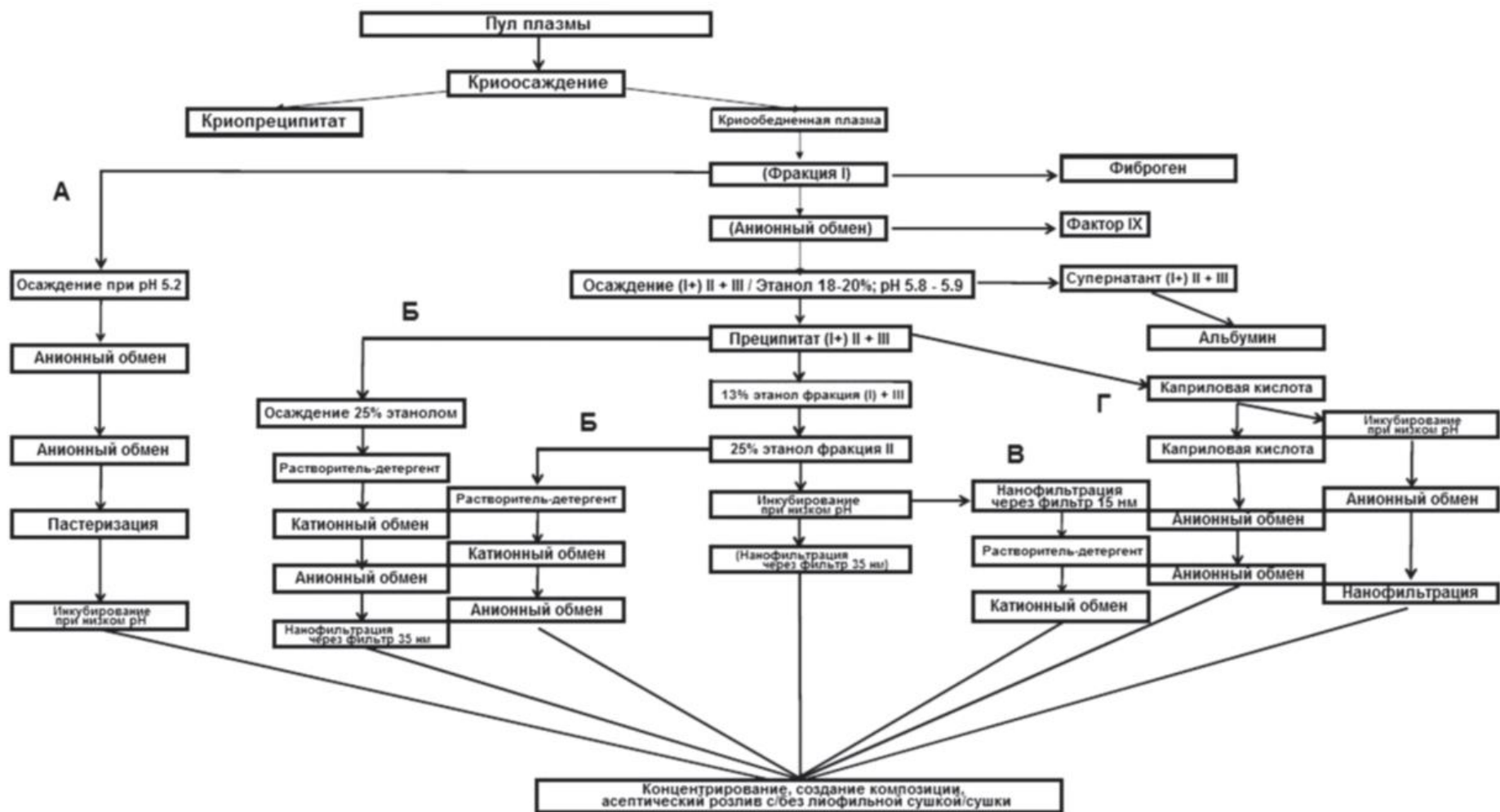


Рис. 15. Основные технологии, используемые для получения коммерческого ВВИГ и других компонентов крови из плазмы человека. А, Б, В и Г – технологии, описанные в работах J. Bertolini [10], W. Teschner et al. [11], F.G. Terpstra et al. [12] и M. Stucki et al. [13] соответственно

Авторство: Супотницкий М.В. Препараты крови человека и животных в аспекте показателей качества, эффективности и безопасности // Биопрепараты, 2015

Контрольные вопросы

1. Что является основным сырьем для получения белков плазмы? Какими способами получают это сырье?
2. Что такое фракционирование крови? Какие компоненты получают при фракционировании?
3. В чем заключается суть процедуры плазмафереза?
4. В чем заключается преимущество плазмафереза по сравнению с традиционным донорством?
5. Что такое фракционирование плазмы? Какие компоненты содержатся в плазме?
6. Что можно поучить при фракционировании плазмы?
7. Что такое криопреципитация плазмы? Назовите этапы.
8. Что такое криосупернатантная плазма? Ее отличия от криопреципитата.
9. Какие методы используют для дальнейшего концентрирования белковых фракций из криосупернатантной плазмы?

ГЛАВА 5. ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ГЕМОФИЛИИ

5.1. Эволюция лечения гемофилии

Гемофилия является заболеванием, связанным с нарушением свертываемости крови. Поэтому единственный эффективный вариант лечения – это переливание крови или регулярно проводимая заместительная терапия препаратами крови.

До 1930-х годов лечение больных гемофилией ограничивалось иммобилизацией конечностей, наложением тугих повязок и местным применением холода. В 30-е годы гемофилию стали лечить переливанием цельной крови.

В 1940–1950-х годах начали использовать для переливания свежезамороженную плазму крови, содержащую только небольшое количество необходимых факторов свертывания. Поэтому были необходимы продолжительные введения больших объемов плазмы, проводимые обычно в условиях стационара. К середине 1960-х годов была разработана технология криопреципитации – процесс осаждения белков крови при определенных условиях оттаивания свежезамороженной плазмы. К концу 1960-х годов появились методы выделения и очистки из плазмы факторов VIII и IX. В 1990-х годах появились рекомбинантные факторы свертывания, что позволило концентрировать и более точно дозировать факторы свертывания в значительно меньшем объеме. Также это открыло возможность лечения гемофилии амбулаторно.

На рис. 16 можно проследить эволюцию лечения гемофилии: видно, что для того чтобы ввести больному гемофилией 2000 МЕ фактора свертывания крови VIII (FVIII) необходимо внутривенно перелить 4000 мл цельной крови, или 2000 мл плазмы, или 400 мл криопреципитата, или 20 мл концентрата FVIII 1-го поколения, или 5 мл препарата FVIII, полученного с помощью рекомбинантной технологии – rFVIII.

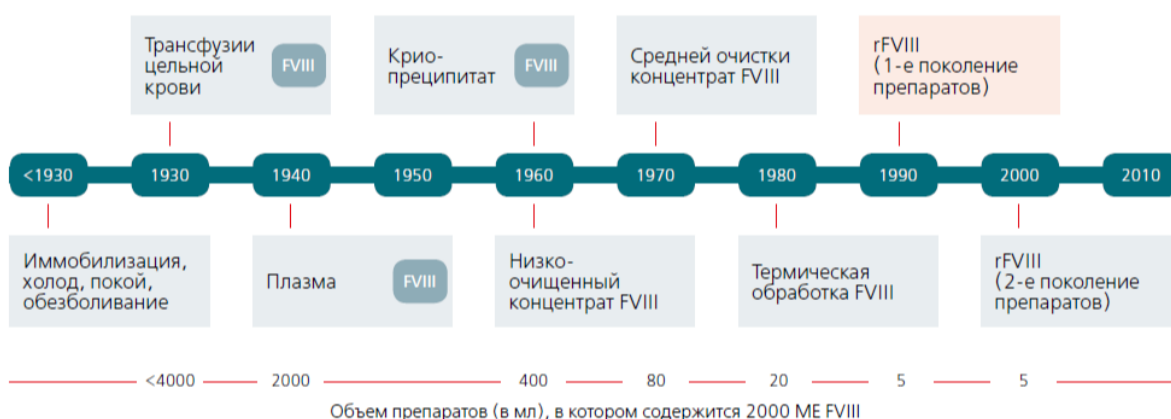


Рис. 16. Эволюция лечения гемофилии

Авторство: Тарасова И.С. Октофактор. Первый отечественный рекомбинантный препарат фактора свертывания крови VIII для лечения больных гемофилией А // Приложение к журналу Геминформ, 2015.

При легкой степени гемофилии А иногда бывает достаточно приема препарата десмопрессин, который помогает высвободить накопленный фактор VIII из кровеносных сосудов. При средней тяжести гемофилии А преимущественно назначается терапия по требованию – при проявлении геморрагического синдрома. Для пациентов с тяжелой формой гемофилии «золотым стандартом» является профилактическая схема лечения – регулярная заместительная терапия фактором VIII вне кровотечений с целью их предотвращения.

При лечении гемофилии В, стандартный протокол лечения требует регулярное введение фактора IX для компенсации дефектного фактора свертывания крови.

Препараты крови, используемые для лечения гемофилии, принято классифицировать на две группы:

- получаемые из плазмы доноров,
- получаемые с помощью технологии рекомбинантной ДНК.

Основной источник для получения препаратов крови является плазма. Как было озвучено раньше, существуют два способа получения свежезамороженной плазмы:

- плазмаферез – процедура, при которой часть забранной крови возвращают донору;
- центрифугирование цельной крови.

Препараты фактора VIII (FVIII), производимые из плазмы, различаются, прежде всего, по содержанию фактора Виллебранда (vWF), который играет важную роль в функционировании фактора VIII.

Фактора Виллебранда – антигеморрагический сосудистый фактор, он синтезируется клетками эндотелия сосудов и мегакариоцитами (клетками костного мозга), содержится в плазме и в тромбоцитах. Около 95 % фактора VIII связано с фактором Виллебранда. Он стабилизирует гетеродимерную структуру молекулы фактора VIII, защищает ее от протеолиза, увеличивая период полувыведения из сосудистого русла, снижает иммуногенность, и способствует транспорту к месту повреждения, служа внутрисосудистым белком-носителем для фактора VIII.

5.2. Рекомбинантные препараты факторов свертывания

В связи с тем, что количество донорской плазмы, из которой получают препараты крови, ограничено, разрабатываются альтернативные способы производства факторов свертывания. Это может повысить безопасность препаратов и увеличить число пациентов с гемофилией, которые получают оптимальное лечение.

Наиболее безопасными и перспективными в этом плане стали рекомбинантные препараты факторов свертывания крови (РФСК). Их основными преимуществами являются независимость от донорской плазмы, высокая активность, высокая степень очистки, вирусная безопасность, снижение интенсивности и частоты выработки ингибирующих антител. Это открывает новые возможности развития заместительной терапии.

Рекомбинантные препараты факторов свертывания крови относятся к группе биотехнологических лекарственных препаратов (БтЛП), производство которых осуществляется с использованием технологии рекомбинантной ДНК – технологии контролируемой экспрессии генов, кодирующих биологически активные белки в прокариотах и эукариотах, включая измененные клетки млекопитающих.

Процесс производства современных рекомбинантных факторов свертывания крови очень сложен и предусматривает последовательную смену нескольких стадий.

На первом этапе выделяют ген человека, кодирующий синтез дефицитного FVIII или FIX. Затем при помощи вектора встраивают ДНК дефицитного фактора в геном лабораторных животных (например, ядро клеток яичников китайского хомячка), которые способны продуцировать необходимый рекомбинантный фактор. Следующий этап включает замораживание и хранение клеток-продуцентов. После размораживания клетки помещают в специальный биореактор, в котором происходит накопление и выделение rFVIII или rFIX из клеток в питательный раствор. Затем проводят очистку полученного рекомбинантного белка с помощью различных методов, в том числе методом хроматографии. Может быть предусмотрено несколько ступеней очистки. Для обеспечения максимальной инфекционной безопасности препарата в последнее время в процесс производства введена ультрафильтрация через нанофильтры. Последним этапом происходит стабилизирование препарата.

Схема производства рекомбинантного фактора VIII представлена на рис. 17. В таблице 2 представлены препараты, зарегистрированные в РФ.

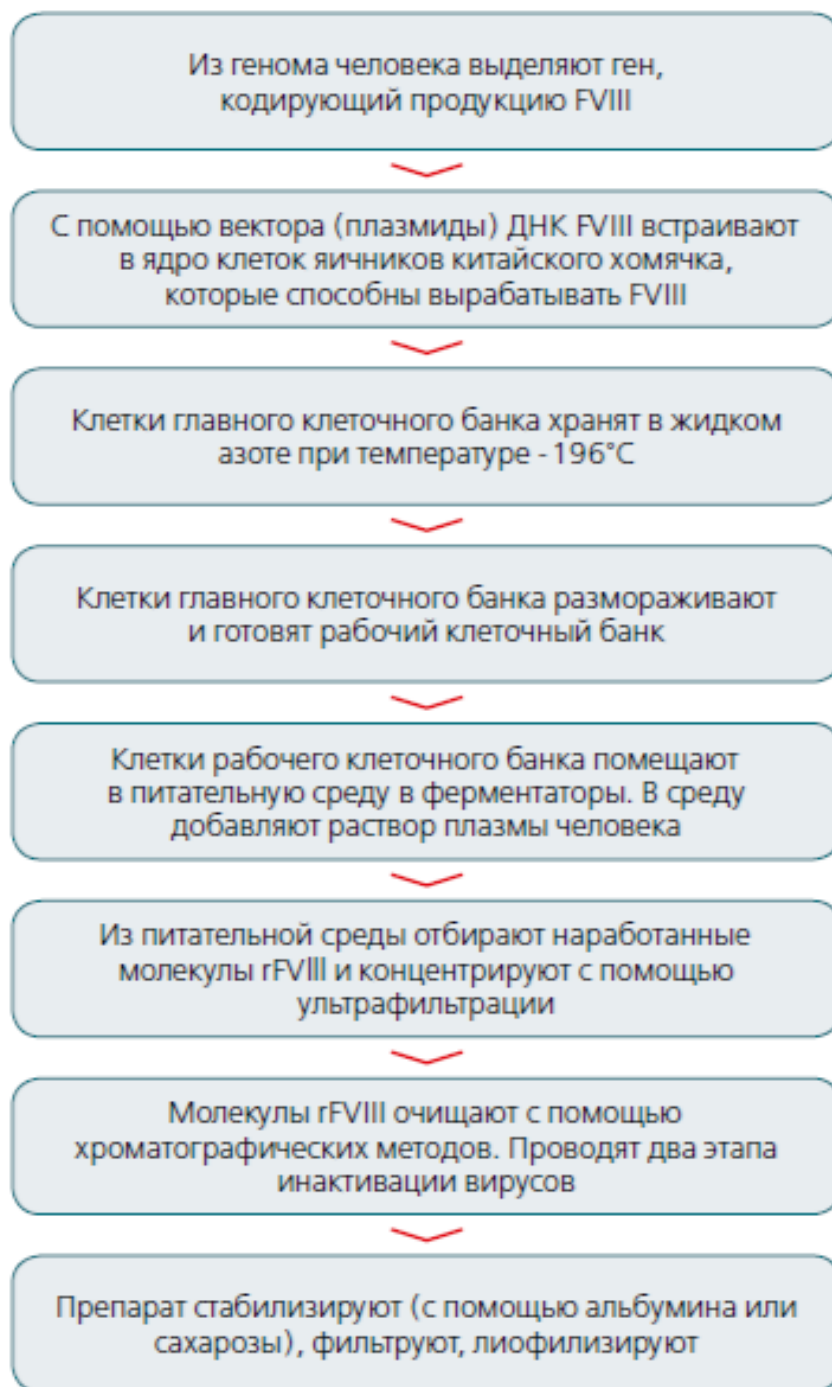


Рис. 17. Схема технологического процесса производства рекомбинантного фактора VIII
Авторство: Тарасова И.С. Октафактор. Первый отечественный рекомбинантный препарат фактора свертывания крови VIII для лечения больных гемофилией А // Приложение к журналу Геминформ, 2015.

Препараты для лечения гемофилии, зарегистрированные в РФ

Источник получения препарата	Препараты FVIII для лечения гемофилии А	Препараты FIX для лечения гемофилии В	Препараты для лечения ингибиторной гемофилии
Плазма доноров	Агемфил А (ГНЦ, Россия)	Агемфил В (ГНЦ, Россия)	ФЕЙБА® («Бакстер»)
	Бериате® («CSL Behring»)	Аймафикс АИ® (Кедрион)	Уман-комплекс® («Кедрион»)
	Вилате® («Октафарма»)	Иммунин® (Бакстер)	
	Гемоктин («Биотест»)	Мононайн® («CSL Behring»)	
	Гемофил М® («Бакстер»)	Октанайн® («Октафарма»)	
	Иммунат® («Бакстер»)		
	Козйт ДВИ® («Байер»)		
	Октанат® («Октафарма»)		
	Эмоклот ДИ® («Кедрион»)		
Рекомбинантная ДНК-технология	Когенэйт ФС® («Байер»)	Иннонафактор (ЗАО «ГЕНЕРИУМ», Россия)	НовоСэвен® («Ново Нордиск»)
	Рекомбинат® («Бакстер»)		Коагил-VII (ЗАО «ГЕНЕРИУМ», Россия)
	Адвейт® («Бакстер»)		
	Октофактор (ЗАО «ГЕНЕРИУМ», Россия)		

Авторство: Тарасова И.С. Октофактор. Первый отечественный рекомбинантный препарат фактора свертывания крови VIII для лечения больных гемофилией А // Приложение к журналу Геминформ, 2015.

Основным аспектом при производстве биотехнологических лекарственных препаратов является поддержание стабильного уровня получения целевого белка заданной молекулярной структуры, которая определяет фармацевтические свойства готового продукта. Структура белковой молекулы рекомбинантных

факторов может как совпадать, так и отличаться от структуры аналогичного фактора свертывания крови, выделенного из плазмы, при условии сохранения биологической активности препарата.

Клеточные культуры, полученные из клеток или тканей человека и животных, должны пройти проверку на подлинность, бактериологическую стерильность, контаминацию посторонними агентами в соответствии с утвержденными стандартами.

В качестве основных клеточных линий для производства РФСК используют эукариотические клетки млекопитающих: ВНК (Baby hamster kidney) – клетки почки новорожденного хомячка, СНО (Chinese hamster ovary) – клетки яичника китайского хомячка и НЕК (human embryonic kidney) – эмбриональные клетки почки человека. Использование этих клеточных культур в качестве продуцентов позволяет получать белки со стабильной структурой, необходимой аминокислотной последовательностью и профилем гликозилирования.

Производство основано на системе банков клеток-продуцентов: ГБК (главный банк клеток) и РБК (рабочий банк клеток). Они обеспечивают стабильный выпуск лекарственного препарата соответствующего качества. ГБК обычно является производным от отобранного клеточного клона, содержащего экспрессирующую конструкцию. РБК получают путем размножения клеток из одной или более ампул ГБК.

В процессе культивирования эукариотических клеток используются культуральные среды, которые содержат компоненты сывороток животного происхождения. Это является источником дополнительного риска для пациента в отношении бактериальной, вирусной и прионной безопасности, а также развития аллергических реакций из-за остаточного содержания гетерологичных белков. Кроме того, в первых препаратах РФСК в качестве стабилизатора использовался человеческий сывороточный альбумин (ЧСА).

Поиск способов культивирования рекомбинантных клеток без использования сыворотки и животных белков привел к разработке новых препаратов РСФК, при производстве которых используют синтетические питательные среды DMEM/HAM F12, 199, RPMI с добавлением гидролизата сои, например, пептонов из соевой муки, расщепленных ферментативно папаином. Стабилизатор ЧСА был заменен на соединения, основанные на молекулах сахаров (сахароза, трегалоза, маннитол).

В соответствии с этим различают три поколения рекомбинантных лекарственных препаратов:

- **препараты первого поколения** производятся в клеточной культуре, содержащий белки животного происхождения и содержат человеческий сывороточный альбумин в качестве стабилизатора;

- **препараты второго поколения** производятся в культуре клеток с использованием белков плазмы человека, готовый препарат не содержит человеческий альбумин в качестве стабилизатора;
- **препараты третьего поколения** производятся без добавления человеческих белков и белков животного происхождения на всех этапах производства.

Технология производства препаратов РФСК должна основываться на валидированной системе посевного материала, в которой используется штамм-продуцент, соответствующий международным и отечественным требованиям. Требования к сырью следует рассматривать как требования к клеткам-продуцентам, банкам клеток, родительским клеткам, среде для культивирования и характеристике экспрессирующей конструкции.

В таблице 3 представлены различия в технологии производства препаратов РФСК разных поколений.

Особенности технологии производства препаратов РСФК, зарегистрированных в РФ

МНН	Линия штамма-производителя	Экспрессирующая конструкция	Наличие белков животного, человеческого происхождения в культуральной среде	Способ очистки продуцируемого белка	Способ вирусной инактивации	Стабилизатор
Препараты первого поколения						
Октоког альфа	СНО	Нуклеотидная последовательность эндогенного ФСК VIII + фактор WF	Бычий сывороточный альбумин, инсулин, апротинин	Иммуноаффинная хроматография	Пастеризация	Человеческий сывороточный альбумин
Препараты второго поколения						
Октоког альфа	СНО	Нуклеотидная последовательность эндогенного ФСК VIII	Белки плазмы человека, инсулин	Иммуноаффинная хроматография	Обработка с использованием растворителя/детергента (ТБФ, тритон-100)	Сахароза
Октоког альфа	ВНК	Нуклеотидная последовательность ФСК VII	Эмбриональная телячья сыворотка, инсулин	Иммуноаффинная хроматография + анионообменная хроматография	Диафильтрация, стерилизующая фильтрация	Маннитол
Октоког альфа	ВНК	Нуклеотидная последовательность ФСК VII	Эмбриональная телячья сыворотка, инсулин	Иммуноаффинная хроматография + анионообменная хроматография	Ультрафильтрация, стерилизующая фильтрация	Сахароза, маннитол
Мороктоког альфа	СНО	Нуклеотидная последовательность ФСК VIII с делецией В домена	Эмбриональная телячья сыворотка	Катионнообменная, иммуноаффинная, анионообменная хроматография	Обработка с использованием растворителя/детергента (ТБФ, тритон-100)	Сахароза

МНН	Линия штамма-продуцента	Экспрессирующая конструкция	Наличие белков животного, человеческого происхождения в культуральной среде	Способ очистки продуцируемого белка	Способ вирусной инактивации	Стабилизатор
Нонаког альфа	СНО	Нуклеотидная последовательность ФСК IX	Эмбриональная телячья сыворотка	Иммуноаффинная, анионообменная хроматография	Тангенциальная фильтрация с тритоном-100	Сахароза
Нонаког альфа	СНО	Нуклеотидная последовательность ФСК IX	Эмбриональная телячья сыворотка	Иммуноаффинная, анионообменная хроматография	Тангенциальная фильтрация с тритоном-100	Сахароза
Препараты третьего поколения						
Октоког альфа	СНО	Нуклеотидная последовательность эндогенного ФСК VIII + фактор WF	Соевый гидролизат без добавления сыворотки/компонентов сыворотки человеческого/животного происхождения	Иммуноаффинная хроматография	Обработка с использованием растворителя/детергента (ТБФ, тритон-100)	Трегалоза, маннитол
Мороктоког альфа	СНО	Нуклеотидная последовательность эндогенного ФСК VIII с делецией В домена	Соевый гидролизат без добавления сыворотки/компонентов сыворотки человеческого/животного происхождения	Аффинная хроматография на основе синтетического лиганда	Обработка с использованием растворителя/детергента + нанофильтрация	Сахароза

Авторство: Устинникова О. Б. Технологии производства рекомбинантных факторов свертывания крови в аспекте современных требований к качеству и безопасности биотехнологических препаратов // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований, 2016

5.2.1. Модификации рекомбинантных препаратов

Среди минусов немодифицированных препаратов факторов VIII и IX, используемых для лечения гемофилии, можно выделить следующие:

- теоретическая вероятность вирусного инфицирования при использовании плазменных препаратов;
- высокая иммуногенность как плазменных, так и рекомбинантных препаратов;
- более низкая эффективность рекомбинантных препаратов;
- низкий период циркуляции в крови факторов свертывания крови.

Для устранения этих недостатков проводят модификации и исследования по совершенствованию препаратов:

- разработка рекомбинантных препаратов, получаемых с использованием клеточной линии человека для максимального сходства действующего вещества с белками человеческого организма;
- удаления В-домена молекулы FVIII для повышения ее стабильности и более прочного связывания с vWF;
- конъюгация молекулы факторов свертывания с полиэтиленгликолем или создание слитных белков (fusion proteins) – молекул факторов свертывания с Fc-фрагментом иммуноглобулина или альбумином для увеличения периода циркуляции препарата в организме;
- разработка и модификация альтернативных препаратов для лечения гемофилии, таких как препарат FVIIa, аптамер, моноклональные антитела и анти-смысловые олигонуклеотиды, блокирующие активность ингибиторов тканевого фактора (TF) и антитромбина III (АтIII).

Большое внимание уделяется препаратам с удаленным В-доменом. На рис. 18 представлены структурные различия между нативной молекулой FVIII и молекулой FVIII с удаленным В-доменом.

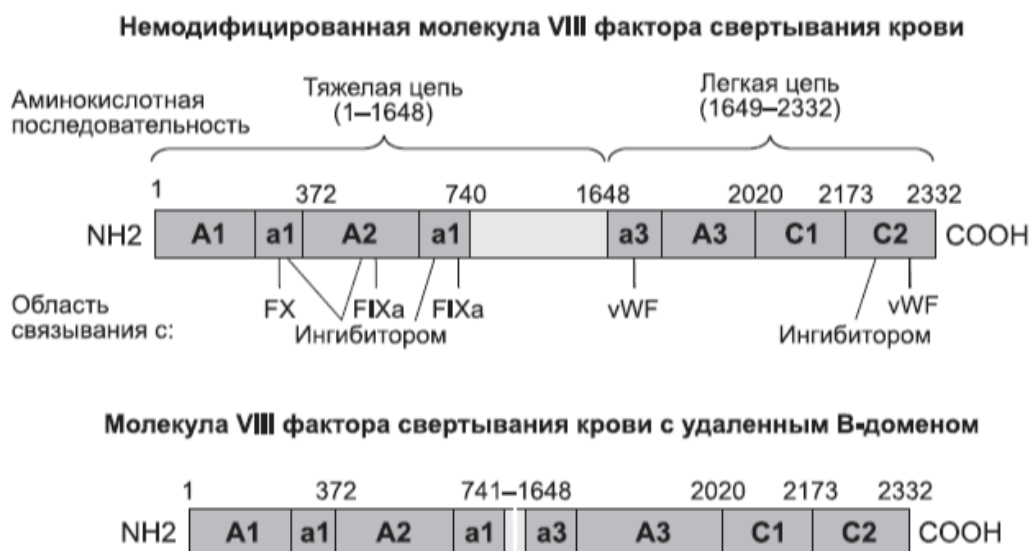


Рис. 18. Структурные различия между нативной молекулой FVIII и молекулой FVIII с удаленным В-доменом
 Авторство: Солдатов А.А. Основные направления по разработке и модификации препаратов для лечения гемофилии // Гематология и трансфузиология, 2016

Молекула фактора VIII содержит 2332 аминокислотных остатка. Структура белка является доменной и состоит из доменов A1-A2-B-A3-C1-C2. На границах А-доменов расположены три кислых субдомена a1, a2 и a3.

Рекомбинантный фактор VIII с удаленным В-доменом – биоаналог природного фактора VIII, у которого полностью (или почти полностью) удален В-домен – большой участок между А2 и А3. Рекомбинантный FVIII сохраняет коагуляционную активность, поскольку В-домен не участвует напрямую в коагуляции и в плазме обычно удаляется протеазами, остается только активная форма без В-домена.

Удаление В-домена уменьшает размер молекулы FVIII приблизительно на 900 аминокислот. Молекулярная масса BDD-фактора VIII около 170–180 кДа по сравнению с 280 кДа у полноразмерного белка. Это позволяет упростить структуру рекомбинантного белка, повысить стабильность, увеличить выход белка при его экспрессии в клетках и снизить гетерогенность. Удаление В-домена также не повышает риск развития иммунной реакции на препарат FVIII, при этом сохраняется связывание с факторами и коагуляционная функция. При проведении клинических исследований препараты с удаленным В-доменом продемонстрировали аналогичную с нативным (немодифицированным FVIII) препаратом эффективность и безопасность.

На фармацевтическом рынке рекомбинантных факторов представлены несколько препаратов: Рекомбинат, Когенэйт, РеФакто, Адвейт.

Рекомбинат – препарат, полученный на основе генномодифицированных клеток СНО (клетки яичника китайского хомячка), в которые встроены гены фактора VIII человека. В процессе производства препарата в клеточной культуре используют белки животного происхождения, такие как инсулин, аprotинин, альбумин. При достижении необходимого количества фактора свертывания крови в биореакторе, клетки экспрессионной системы отфильтровывают. Затем переходят к процессу очистки целевого белка методом иммуноаффинной хроматографии с использованием мышиных моноклональных антител к FVIII. Далее полуфабрикат доочищают с помощью ионообменной хроматографии и на заключительной стадии проводят вирусную инактивацию сольвент-детергентным методом. В состав конечного продукта входит альбумин человека, как стабилизатор.

Когенэйт – препарат, изготовленный в клеточной культуре ВНК (клетки почек китайского хомячка), в которую внесли ген FVIII. После фильтрации препарат подвергается вирусной инактивации сольвент-детергентным методом и проходит 6 ступеней очистки, включая ионообменную хроматографию и иммуноаффинную хроматографию с использованием мышиных моноклональных антител. В процессе производства используются белки плазмы человека вместо белков животного происхождения. Конечный продукт стабилизируется не человеческим белком, а сахарозой.

РеФакто – производство препарата осуществляется в клеточной культуре СНО (клетки яичников китайского хомячка), с внесенным геном FVIII, который лишен В-домена, не играющего значительной роли в процессе свертывания крови. После фильтрации препарат подвергается вирусной инактивации сольвент-детергентным методом и проходит несколько стадий очистки различными видами хроматографии. Особенностью этого препарата является использование в процессе очистки синтетического лиганда вместо мышиных моноклональных антител. В конечном продукте отсутствуют человеческие белки. Препарат характеризуется высокой специфической активностью за счет удаления «немого» В-домена.

Адвейт – препарат производится методом проточного культивирования в клеточной культуре СНО (клетки яичников китайского хомячка) с внесенным геном FVIII. Производство Адвейта осуществляется без добавления человеческих и животных белков в клеточную культуру, а также без их использования в процессе очистки препарата. Для очистки препарата применяют иммуноаффинную хроматографию на моноклональных антителах и двухступенчатую ионообменную хроматографию (катионная и анионная). Вирусная инактивация осуществляется сольвент-детергентным методом. На финальном этапе производства препарата добавляются вспомогательные вещества с нейтральным рН, не содержащие белков.

Таким образом, производство Адвейта в среде, не содержащей альбумин и плазму обеспечивает высокую степень безопасности относительно риска передачи гемотрансмиссивных вирусов.

Отсутствие белков животного или человеческого происхождения в клеточной культуре и конечном препарате является значительным преимуществом при сравнении иммуногенности рекомбинатных препаратов FVIII.

В таблице 4 представлены различия между этими рекомбинантными препаратами FVIII. Среди сравниваемых препаратов наиболее предпочтительным для использования выглядит Адвейт.

Таблица 4

Характеристики рекомбинантных препаратов FVIII

Характеристики	Торговое название препарата			
	Рекомбинат™	Когенэйт®	РеФакто®	Адвейт™
Поколение	первое	второе	второе	третье
Размерность молекулы	полноцепочечная	полноцепочечная	с удаленным В-доменом	полноцепочечная
Клеточная линия продуцента	СНО	ВНК	СНО	СНО
Стабилизатор FVIII	альбумин человека	сахароза	сахароза	трехалоза
Присутствие протеинов плазмы животного/человека в клеточной среде	да (бычий)	да (человеческий)	да (человеческий)	нет
Присутствие протеинов плазмы животного/человека в конечном продукте	да	нет	нет	нет

Авторство: Нургожин Т.С. Полноцепочечный, не содержащий человеческих и животных белков, препарат рекомбинантного фактора свертывания крови VIII адвейт (октоког альфа) – место в ряду антигемофильных препаратов / Медицина и экология, 2017.

Контрольные вопросы

1. Эволюция лечения гемофилии. Ключевые моменты.
2. Какие группы препаратов используют для лечения гемофилии?
3. Какие преимущества имеют рекомбинантные препараты по сравнению с плазменными?

4. Какие этапы включает в себя производство рекомбинантных факторов свертывания крови?

5. Основные клеточные линии, используемые при производстве рекомбинантных факторов свертывания крови.

6. Чем отличаются три поколения рекомбинантных факторов свертывания крови?

7. Какие модификации проводят для совершенствования немодифицированных препаратов?

8. Какие рекомбинантные препараты представлены на рынке? В чем заключается отличие препарата РеФакто?

9. Почему препарат Адвейт считается более инфекционно безопасным в отношении вирусной контаминации?

ГЛАВА 6. ПОКАЗАТЕЛИ КАЧЕСТВА ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ГЕМОФИЛИИ

6.1. Показатели качества препаратов факторов свертывания крови, полученных из плазмы крови

Препараты факторов свертывания крови, содержащие один или несколько факторов свертывания крови, относятся к лекарственным средствам, полученным из плазмы крови человека.

Качество препаратов крови, которое определяется эффективностью и безопасностью, должно соответствовать требованиям фармакопейных статей. Для каждой производимой серии препарата необходимо проводить испытания по всем показателям спецификации. Также должны быть предусмотрены дополнительные испытания для всех веществ, входящих в состав препарата или используемых в процессе производства препарата (например, количественное определение остаточного содержания в препарате сольвентов и детергентов).

Производство препаратов крови должно обеспечивать сохранение структуры и функции белков крови, специфическую и вирусную безопасность препаратов, а также не допускать контаминацию чужеродными агентами в соответствии с общей фармакопейной статьей (ОФС) «Лекарственные препараты из плазмы крови человека».

Для производства препаратов крови используется плазма крови здоровых доноров, отвечающую требованиям фармакопейной статьи (ФС) «Плазма человека для фракционирования». Плазму для фракционирования получают из цельной крови человека методами центрифугирования или плазмафереза. Плазма должна быть стерильной без содержания антибактериальных и противогрибковых средств.

Доноры крови и плазма крови должны проходить обследование в соответствии с действующими нормативными правовыми документами. Каждая индивидуальная порция плазмы должна контролироваться на отсутствие инфекционных маркеров, передающихся при гемотрансфузиях. При заготовке плазмы крови необходимо использовать разрешенные гемоконсерванты.

Производство препаратов должно обеспечивать отсутствие или минимальное содержание примесей, включая белки, вирусы, иммуногенные компоненты.

Испытания по показателям контроля качества фармацевтической субстанции проводят согласно соответствующим общим фармакопейным статьям (ОФС).

Подлинность препаратов из плазмы крови человека подтверждают наличием только сывороточных белков крови человека методом иммуноэлектрофореза в геле в соответствии с ОФС «Имуноэлектрофорез в агаровом геле», методом иммунодиффузии в геле в соответствии с ОФС «Имунодиффузия в геле».

Препараты крови не должны содержать антибиотики или консерванты.

При производстве лекарственных средств существует риск вирусного инфицирования. Такому риску подвергаются все препараты, при производстве которых используют сырье и материалы животного или человеческого происхождения, такие как кровь, моча, различные биологические жидкости, органы и ткани.

Основные причины вирусной контаминации препаратов из плазмы крови – это использование плазмы, инфицированной гемотрансмиссивными вирусами, или случайное внесение вирусов в процессе производства.

Гемотрансмиссивные вирусы – вирусы, передающиеся от человека к человеку через кровь и ее компоненты. К таким вирусам относятся: вирус иммунодефицита человека 1 и 2 типов (ВИЧ-1 и ВИЧ-2), вирусы гепатитов В (ВГВ), С (ВГС), D (ВГД), парвовирус В19, вирус лихорадки Западного Нила и многие другие.

Вирусная безопасность обеспечивается в соответствии с ОФС «Вирусная безопасность» и «Вирусная безопасность лекарственных препаратов из плазмы крови человека».

Для уменьшения потенциального риска передачи гемотрансмиссивных вирусов необходимо внедрить систему мер по обеспечению вирусной безопасности при производстве препаратов из плазмы крови человека. Для этого необходимо:

- обеспечить вирусную безопасность индивидуальных донаций плазмы крови доноров (источника субстанции);
- обеспечить вирусную безопасность субстанции «Плазма человека для фракционирования»;
- обеспечить вирусную безопасность в процессе производства лекарственных препаратов из плазмы крови человека.

Ввиду того, что ни один из методов не гарантирует полное отсутствие риска передачи гемотрансмиссивных вирусов, необходимо использовать все факторы обеспечения вирусной безопасности для сведения этого риска к минимуму.

Для исключения попадания вирусов в готовые лекарственные препараты при производстве используют не менее двух стадий вирусной инактивации и/или элиминации вирусов, эффективность которых подтверждена снижением концентрации модельных вирусов.

По показателю «вирусная безопасность» биологические лекарственные препараты, полученные из плазмы крови человека не должны содержать поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg), антител к вирусам гепатитов В, С, ВИЧ-1 и ВИЧ-2.

Если для вирусной инактивации в производственном процессе применяют химические вещества, их концентрация должна быть снижена до безопасного уровня, не оказывающего отрицательного воздействия на безопасность препарата для пациентов.

Все растворы плазменных препаратов факторов свертывания асептически расфасовывают в первичную упаковку методом стерилизующей фильтрации, лиофилизируют и укупоривают под вакуумом или в атмосфере инертного газа в соответствии с ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственных средств» и ОФС «Лекарственные препараты из плазмы крови человека».

В плазме, используемой при производстве препаратов лабильных белков, а именно факторов свертывания крови, проводят определение их активности в соответствии с требованиями ОФС «Определение активности факторов свертывания крови». Испытания проводят в объединенной пробе, которая содержит не менее 10 индивидуальных единиц плазмы.

Фактор свертывания крови VII представляет собой белковую фракцию плазмы крови человека, содержащую одноцепочечный гликопротеиновый фактор свертывания крови VII и небольшие количества активированной формы двухцепочечного производного фактора VIIa.

На плазменные препараты фактора свертывания крови VII распространяется ФС «Фактор свертывания крови VII человека».

Препараты фактора свертывания крови VII человека могут содержать факторы свертывания II, IX, X, протеин С и протеин S, содержание которых определяют в готовом препарате. Препарат может содержать стабилизаторы, например, альбумин, полисорбат, натрия хлорид, натрия цитрат, кальция хлорид и другие.

Активность фактора VII должна составлять не менее 2 МЕ на мг белка до внесения стабилизаторов белковой природы.

Фактор свертывания крови VIII человека является препаратом белковой фракции крови человека, содержащим гликопротеиновый комплекс фактора свертывания крови VIII и различные количества фактора Виллебранда.

Производство плазменных препаратов факторов свертывания крови VIII регулируется ФС «Фактор свертывания крови VIII человека».

Препарат фактора свертывания VIII также может содержать различные стабилизаторы.

Активность препарата должна быть не менее 20 МЕ фактора VIII в 1 мл.

Фактор свертывания крови IX человека является препаратом белковой фракции крови человека, полученным из плазмы методом, который эффективно отделяет фактор IX от других факторов протромбинового комплекса (II, VII, X).

Производство плазменных препаратов фактора свертывания крови IX осуществляется в соответствии с ФС «Фактор свертывания крови IX человека».

Активность препарата быть не менее 20 МЕ фактора IX в 1 мл.

Препарат фактора свертывания IX может содержать стабилизаторы. Специфическая активность (не менее 50 МЕ/мг общего белка) определяются до добавления любого белка-стабилизатора.

6.2. Показатели качества рекомбинантных препаратов факторов свертывания крови

Рекомбинантные факторы свертывания крови (РФСК) представляют собой лиофилизированные препараты гликопротеинов, созданные на основе технологии рекомбинантной ДНК. Эти препараты обладают биологической активностью плазменных факторов свертывания крови и предназначены для заместительной терапии при заболеваниях, связанных с нарушениями системы свертывания крови.

РФСК представлены препаратами на основе VII рекомбинантного активированного фактора свертывания крови (rFVIIa), VIII рекомбинантного фактора свертывания крови (rFVIII) и IX рекомбинантного активированного фактора свертывания крови (rFIXa).

Требования, предъявляемые к этим препаратам, изложены в ОФС «Факторы свертывания крови человека (генно-инженерные, рекомбинантные)».

Подлинность препаратов должна подтверждаться с помощью комплекса методов, которые позволяют специфически идентифицировать РФСК с использованием стандартных образцов.

Структура белковой молекулы и ее посттрансляционные модификации должны быть подтверждены с применением пептидного и карбогидратного картирования, а также других дополнительных физико-химических методов исследования: электрофорезом в полиакриламидном геле, изоэлектрическим фокусированием, эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографией и другими аналитическими методами.

Контрольные вопросы

1. Какие требования предъявляются к донорам крови и плазме крови, используемой для получения препаратов?
2. Как подтверждается подлинность препаратов из плазмы крови человека?
3. Каковы причины вирусной контаминации при производстве лекарственных средств из крови и биологических материалов?
4. Какие вирусы относятся к гемотрансмиссивным вирусам?
5. Какие меры по обеспечению вирусной безопасности внедряются при производстве препаратов из плазмы крови человека?
6. Почему важно использовать все меры по обеспечению вирусной безопасности в процессе производства?
7. Что означает показатель «вирусная безопасность» для биологических лекарственных препаратов из крови человека?
8. Что такое рекомбинантные факторы свертывания крови?
9. Какие требования предъявляются к рекомбинантным факторам свертывания крови?

ГЛАВА 7. ПРОБЛЕМА ИНФЕКЦИОННОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ПРЕПАРАТОВ ИЗ ПЛАЗМЫ

Традиционным источником факторов свертывания крови является донорская плазма. Появление и использование для лечения плазменных факторов свертывания существенно повысило продолжительность и качество жизни пациентов. Но при этом возник риск заражения смертельно опасными гемотрансмиссивными вирусами, так как для создания одной препарата объединяли тысячи образцов донорской плазмы.

В результате этого в 1980-х годах около 60–70 % пациентов с тяжелой формой гемофилией заразились ВИЧ, и почти 100 % гепатитом С. Эта страшное событие подтолкнуло ученых начать разработку новых методов по дезинфекции и очистки плазменных препаратов.

Но, даже несмотря на строгий отбор доноров, скрининг донорской плазмы и инактивацию вирусов в плазме при производстве препаратов крови, остается риск передачи вирусных и прионных инфекций. Для устранения риска инфицирования препараты подвергают антивирусной обработке.

Вирус – это неклеточный организм, состоящий из генетического материала в виде ДНК или РНК, заключенных в белковую оболочку – капсид, который окружает и защищает генетическую информацию вируса.

Вирусы делятся на две группы:

- оболочечные (например, ВИЧ, гепатиты В и С) – имеют дополнительную мембранную оболочку, состоящую из липида и белка. Эту мембрану, окружающую капсид, называют суперкапсидом;
- безоболочечные (гепатит А, парвовирус В19) – не имеют такой мембраны.

Методы антивирусной обработки можно разделить на две группы: **методы элиминации** (удаления) и **методы инактивации** (разрушения) вирусов.

В процессе элиминации вирус полностью удаляют из продукта, а при инактивации вирус лишают вирулентности посредством изменения генетического материала вирусов или разрушения вирусной оболочки или капсида. Изменение генетического материала лишает вирусы способности размножаться в организме хозяина, а разрушение вирусной оболочки изменяет способность вируса взаимодействовать с компонентами клеток. После инактивации в препарате может остаться некоторое количество неинфекционных вирусных частиц.

Также методы антивирусной обработки можно разделить на **специфические** и **неспецифические**. Специфические методы действуют только на один вид вирусов, неспецифические методы действуют на оба вида вирусов.

При применении только одной стадии антивирусной обработки невозможно обеспечить качественную элиминацию/инактивацию безоболочечных вирусов из-за резистентности одних вирусов (например, парвовирусов животных) к многократной тепловой обработке и способности других (например, цирковирусов) проникать через фильтры с малыми порами при мембранной фильтрации ввиду их незначительных размеров. В связи с этим при производстве препаратов необходимо использовать не менее двух взаимодополняющих стадий элиминации/инактивации вирусов с различными механизмами действия, которые направлены на широкий спектр вирусов. Предполагается, что вирусы, оставшиеся инфекционными после первой стадии, будут инактивированы на второй стадии. Обязательно одна из стадий антивирусной обработки должна быть направлена на удаление безоболочечных вирусов.

К методам элиминации вирусов относятся:

- хроматография;
- нанофильтрация;
- преципитация.

К методам инактивации вирусов относятся:

- тепловая обработка:
 - пастеризация или нагревание в растворе;
 - нагревание в сухом виде;
- сольвент – детергентная обработка;
- обработка каприловой кислотой;
- обработка фенолом.

7.1. Методы элиминации вирусов

7.1.1. Хроматография

Хроматография – неспецифический метод элиминации вирусов, чаще всего используемый для получения высокоочищенного продукта.

Механизм хроматографии, как метода антивирусной обработки, заключается в том, что вирусы, как и другие частицы, могут быть разделены от целевых белков или компонентов препарата за счет различий в размерах, зарядах и аффинности к определенным материалам.

Наиболее широко используемой является ионообменная хроматография. Существует большой выбор анионообменных и катионообменных сорбентов, которые выбираются в зависимости от поставленной задачи. Это, например, сорбенты на основе DEAE-сефарозы, Q-сефарозы, CM-сефарозы, SP-сефарозы, сефакрила S-300 и других.

Также элиминации вирусов используют аффинную хроматографию. Обычно для этого применяют сорбенты на основе моноклональных антител, но они имеют значительные недостатки. К ним относятся: ограниченный срок службы сорбента, относительно медленная скорость адсорбции целевого белка. Снижение количества иммобилизованных антител при элюции. Поэтому хорошей альтернативой таким иммуносорбентам являются аффинные сорбенты с иммобилизованными пептидомиметиками или не биологическими синтетическими лигандами.

Например, моноклональные антитела могут быть заменены синтетическим лигандом – полипептидом, который разработан для устранения потенциального заражения мышинным вирусом. Такие сорбенты меньше подвержены разрушению ферментами и не загрязняют продукт иммуногенными биополимерами, и поэтому отлично подходят для очистки белков в фармацевтических целях.

7.1.2. Наночелчтрация

Наночелчтрация – неспецифический метод элиминации вирусов, основанный на использовании мембран с очень мелкими порами, способных задерживать вирусные частицы.

Раствор или суспензия пропускаются через мембрану под давлением. Вирусы задерживаются на поверхности или внутри пор мембраны из-за их размеров, в то время как белки беспрепятственно проходят через фильтр.

Эффективное удаление вирусов требует, чтобы размер пор фильтра был меньше эффективного диаметра вирусов. Размер белков FVII 8–10 нм, FVIII 10–15 нм, размер FIX 8–12 нм. Размер ВИЧ 100–120 нм, гепатит В 42 нм, гепатит С 50 нм, гепатит А 27–32 нм, парвовирус 18–26 нм.

Чаще всего используются фильтры с размерами пор от 15 до 35 нм. Большие белки, которые имеют тенденцию в высокой степени образовывать агрегаты, могут быть по размерам больше мелких вирусов. В этих случаях наночелчтрация не применима.

При использовании наночелчтров обязательно тщательное отслеживание их работы. Целостность фильтра проверяют перед использованием и после использования. Если фильтр не проходит тест на целостность после использования, процедура челчтрации повторяется. Помимо этого, их используют только один раз.

Наночелчтрация может быть использована как в качестве основного метода антивирусной обработки, так и в качестве дополнительной стадии для минимизации риска вирусной контаминации.

Метод наночелчтрации обладает неоспоримыми преимуществами: он не загрязняет препарат химическими реагентами и не вызывает денатурацию белков.

7.1.3. Преципитация

Преципитация является еще одним методом элиминации вирусов, основанным на принципе осаждения частиц.

При добавлении в раствор определенных веществ (например, солей, полимеров, органических соединений) происходит изменение условий среды, например, снижается растворимость. Это приводит к тому, что вирусы, находящиеся в растворе, связываются с реагентами и образуют нерастворимые комплексы, которые выпадают в осадок.

Самым распространенным методом является этанольное фракционирование, поскольку этанол обладает и дезинфицирующими свойствами. Вирусы как крупные молекулы имеют тенденцию осаждаться на начальной стадии фракционирования при низких концентрациях этанола.

Осажденные комплексы можно отделить от раствора с помощью центрифугирования или фильтрации. Это позволяет удалить вирусы из образца. После отделения комплексов необходимо провести анализ на наличие вирусов, используя методы, такие как ПЦР, иммуноанализ или другие молекулярные методы.

7.2. Методы инактивации вирусов

7.2.1. Тепловая обработка

Тепловая обработка является неспецифическим методом инактивации вирусов, при котором инфекционность вирусов ликвидируется посредством их тепловой денатурации. Применяют как нагревание в жидком состоянии (пастеризация), так и нагревание в лиофильно высушенном виде.

Пастеризация представляет собой длительное нагревание продуктов, находящихся в жидком состоянии, например, при 60 °С в течение минимум 10 часов. Нагревание в сухом виде происходит от 80 °С до 100 °С, экспозиция от 30 минут до 72 часов. Выбор способа зависит от термолабильности белкового продукта.

В настоящее время широко используется метод «теплового шока»: в течение короткого времени вирусы подвергают нагреванию при очень высоких температурах (обычно свыше 80–100 °С). Такое нагревание вызывает денатурацию вирусов, разрушение капсида и повреждение генетического материала, что делает вирусы неспособными к репликации. После нагревания выполняется быстрое охлаждение, чтобы предотвратить дальнейшие повреждения или разрушение важных компонентов препарата.

Эффективность метода зависит от комплекса факторов, влияющих на вирус: температурный режим, продолжительность воздействия при заданной температуре.

7.2.2. Сольвент-детергентный (SD) метод

Сольвент-детергентный (SD) метод является специфическим методом инактивации, так как позволяет инактивировать вирусы с липидной оболочкой, но практически не действует на безоболочечные вирусы. Он основан на использовании органических растворителей (сольвентов) и поверхностно-активных веществ (детергентов) для инактивации вирусов.

Механизм действия основан на том, что сольвенты растворяют липидные оболочки вирусов, вызывая их разрушение, а детергенты взаимодействуют с липидными мембранами вирусов и белковыми компонентами, способствуя их разрушению и денатурации.

Используемые детергенты ТВИН 80 или ТРИТОН X-100 в сочетании с гидрофобным растворителем три-*n*-бутилфосфатом (ТБФ) разрушают липопротеиновые мембраны вирусов. Оставшиеся фрагменты нуклеиновой кислоты не обладают патогенным действием. В присутствии детергента невозможны обратные соединения или регенерация мембран вирусов.

Эффективность метода определяется температурой и временем воздействия. Важно правильно подобрать концентрацию и время воздействия для достижения оптимальной инактивации вирусов без повреждения продукта.

Все добавленные растворители или ПАВ в обязательном порядке должны быть удалены из лекарственного препарата. Обычно для удаления растворителя или ПАВ используется хроматография или замена буфера путем тангенциальной ультрафильтрации. Их удаление подтверждается с помощью подходящего метода анализа.

7.2.3. Обработка каприловой кислотой

Обработка каприловой кислотой является специфическим методом инактивации оболочечных вирусов.

Каприловая кислота и ее производные могут разрушать липидную оболочку вирусов (например, коронавирусов, гепатитов и других оболочечных вирусов), что приводит к их инактивации. Этот эффект обусловлен способностью жирных кислот взаимодействовать с липидным слоем вируса, нарушая его структуру, приводя к денатурации.

Каприловую кислоту (с концентрацией от 0,1 % до 1 % по массе/объему раствора) добавляют к продукту или суспензии под контролем pH и температуры. Выдерживают от 30 минут до нескольких часов при температуре 20–37 °С.

После инактивации вирусов проводят очистку и фильтрацию для удаления остатков каприловой кислоты и побочных продуктов. Для этого используют методы ультрафильтрации, диализа или хроматографии.

Кроме того, каприловая кислота может связываться и с интегральными белками. Это также может приводить к потере вирусами способности связываться с клетками-мишенями.

Эффективность метода зависит от времени экспозиции и концентрации каприловой кислоты, оптимизированных для конкретного типа вируса и продукта. Использование каприловой кислоты должно проводиться в условиях, исключающих контакт с кожей и дыхательными путями.

7.2.4. Обработка фенолом

Обработка фенолом – неспецифический метод инактивации вирусов.

Фенол взаимодействует с белками вирусов и разрушает их структуру, что приводит к потере инфекционной способности вирусных частиц. Он обладает высокой эффективностью против различных вирусов, включая оболочечные и безоболочечные вирусы.

Обычно используют растворы фенола в концентрации от 0,1 % до 2 %. Конкретная концентрация зависит от типа вируса, материала и требований к безопасности. Время экспозиции в растворе с препаратом – 10–30 минут при комнатной температуре.

После инактивации необходимо провести очистку или нейтрализацию для удаления остатков фенола, чтобы избежать повреждения активных компонентов препарата. Для очистки используют диализ, ультрафильтрация или химические нейтрализаторы.

Фенол является токсичным веществом, поэтому его использование должно осуществляться в условиях с хорошей вентиляцией, с использованием средств индивидуальной защиты.

Для достижения максимальной эффективности важно строго соблюдать протоколы по концентрации, времени воздействия и мерам безопасности.

В таблице 5 представлены методы антивирусной обработки при производстве различных препаратов FVIII.

Для любой технологии производства препаратов крови должна быть предусмотрена процедура подтверждения эффективности инактивации вирусов с использованием модельных вирусов. Каждый реагент, который может взаимодействовать с генами вируса, потенциально способен вызывать мутации. Поэтому необходимо показать, что все реагенты нейтрализуются или удаляются из перерабатываемого биологического продукта до того применения пациентами.

**Стадии элиминации и инактивации вирусов в процессе производства
некоторых препаратов FVIII**

Препарат FVIII	Технология производства	Стадии элиминации вирусов	Стадии инактивации вирусов	
			I	II
Гемоктин	Из плазмы доноров	Отделение криопреципитата. Адсорбция на Al(OH) ₃ . Ионообменная хроматография	Сольвент/ детергент	Обработка при температуре 100 °С
Гемофил М	Из плазмы доноров	Иммуноафинная хроматография. Ионообменная хроматография	Сольвент/ детергент	–
Козйт ДВИ	Из плазмы доноров	Отделение криопреципитата. Преципитация с полиэтиленгликолем. Гелевая хроматография	Сольвент/ детергент	Обработка при температуре 80 °С
Октанат	Из плазмы доноров	Отделение криопреципитата. Адсорбция на Al(OH) ₃ . Ионообменная хроматография	Сольвент/ детергент	Обработка при температуре 100 °С
Адвейт	Рекомбинантная	Иммуноафинная хроматография. Ионообменная хроматография	Сольвент/ детергент	–
Когенэйт ФС	Рекомбинантная	Иммуноафинная хроматография моноклональными антителами. Ионообменная хроматография	Сольвент/ детергент	–
Рекомбинат	Рекомбинантная	Иммуноафинная хроматография. Ионообменная хроматография	Сольвент/ детергент	–

Авторство: Румянцев А.Г. Гемофилия в практике врачей различных специальностей, 2012.

Контрольные вопросы

1. Для чего проводят антивирусную обработку препаратов в процессе производства?
2. Дайте определение понятию «вирус». Какие виды вирусов есть?
3. Классификация методов антивирусной обработки.

4. Почему необходимо использовать не менее двух стадий элиминации/инактивации вирусов?
5. Какие методы относятся к методам элиминации?
6. Какие методы относятся к методам инактивации?
7. В чем заключается суть хроматографии, как метода антивирусной обработки?
8. Что такое нанофильтрация? Принцип действия нанофильтрации.
9. В чем заключается суть тепловой обработки препаратов?
10. Почему необходимо подтверждать эффективность инактивации вирусов методом моделирования контаминации сырья разными вирусными агентами?

ГЛАВА 8. ПРОБЛЕМАТИКА ВЫРАБОТКИ АНТИТЕЛ К РЕКОМБИНАТНОМУ ФАКТОРУ, ИНГИБИТОРНАЯ ФОРМА ГЕМОФИЛИИ

До 1980-х годов основной проблемой использования препаратов факторов свертывания была высокая вероятность инфицирования больных вирусами. После внедрения в производственный процесс методов элиминации/инактивации вирусов этот риск снизился, основным недостатком осталась высокая нежелательная иммуногенность препаратов. В ответ на введение препаратов FVIII или FIX возможно развитие иммунного ответа с выработкой антител – ингибиторов, которые блокируют специфическую активность препаратов. Это приводит к развитию ингибиторной формы гемофилии.

Ингибиторная форма гемофилии – состояние, при котором у больных с дефицитом одного из факторов свертывания крови начинают вырабатываться антитела к вводимому фактору свертывания крови.

Заместительная терапия препаратами, вызывающими выработку ингибиторов, не эффективна, так как ингибиторы нейтрализуют терапевтический эффект вводимых препаратов, увеличивают риск кровотечений и приводят к необходимости использования более сложных и дорогих методов лечения.

Ингибиторы (антитела) вырабатываются при применении и плазменных, и рекомбинантных препаратов. Но введение рекомбинантных препаратов вызывает более активную выработку ингибиторов по сравнению с аналогичными плазменными препаратами. При назначении рекомбинантного FVIII больным, которые впервые получают лечение, ингибиторы вырабатываются у 29–32 %, а при назначении больным плазменного FVIII – у 0–12 %. У больных, которые раньше принимали препарат, при применении рекомбинантного FVIII ингибиторы определяются в 36 % случаев, а при применении плазменного FVIII – в 21 %.

На развитие ингибиторной формы гемофилии указывают состояния больного, при которых у больного сохраняется кровотечение, несмотря на проводимую заместительную терапию фактором свертывания крови или, когда для остановки кровотечения требуется все большие дозы препарата.

Наличие ингибитора подтверждается специальным количественным анализом крови, называемым Бетезда (Bethesda) тест. Титр ингибитора выражается в Бетезда единицах (БЕ). При титре ингибитора $> 0,6$ БЕ/мл считают, что развивается ингибиторная гемофилия.

Ингибиторы классифицируют по степени ответа иммунной системы больного на повторные введения факторов свертывания VIII или IX. Различают два типа ингибиторов:

1. **Высокорезагирующий ингибитор** – ингибитор, который вырабатывается в случае, когда при введении больному фактора свертывания развивается быстрый и сильный иммунный ответ. В организме больного наблюдается высокий

титр Бетезда единиц, активность ингибитора в таком случае выше 5 БЕ/мл. Требуется особого подхода к лечению.

2. Низкорреагирующий ингибитор – ингибитор, который вырабатывается в случае, когда при введении больному факторов свертывания развивается медленный и слабый иммунный ответ. В организме больного наблюдается низкий титр Бетезда единиц, активность ингибитора в таком случае не превышает 5 БЕ/мл.

У больных с полным дефицитом FVIII или FIX механизм выработки антител к препарату связан с тем, что система иммунитета до введения препарата не контактировала с данным фактором свертывания. Отсутствие контакта с фактором свертывания препятствует формированию иммунологической толерантности к этому белку. В результате при введении факторов свертывания крови иммунная система распознает их как «чужеродные агенты» и отвечает развитием иммунного ответа с выработкой аллоантител – антител, вырабатываемых в ответ на чужие антигены другого организма того же вида.

У больных с неполным дефицитом факторов свертывания развитие иммунной реакции на препарат может быть связано с наследственными особенностями или наличием воспалительного процесса. Выработка антител к препаратам свертывания крови обусловлена многими факторами, включая индивидуальную предрасположенность пациента, расовые различия, состояние системы иммунитета, тип генетического дефекта, использование различных видов антигемофильных препаратов и иммуногенный потенциал самих препаратов.

Выработка антител при введении препаратов фактора VIII (IgG1 или IgG4) происходит в 25–30 % случаев, в некоторых случаях – до 52 %. В то время как выработка антител к фактору IX встречается реже – примерно в 3 % случаев. Однако при введении препаратов FIX значительно чаще вырабатываются антитела, вызывающие развитие анафилактических реакций.

Более редкое развитие иммунной реакции на введение препаратов FIX связано с тем, что структура молекулы FIX имеет сходное строение с другими К-зависимыми факторами свертывания, синтез которых не нарушается при гемофилии. Поэтому при введении препаратов FIX, даже при полном отсутствии их синтеза в организме больного, иммунная система, вероятно, распознает их как «свои» белки, а не «чужеродные».

Лечение больных с ингибиторной формой гемофилии представляет собой серьезную проблему. У пациентов с низкорреагирующим ингибитором возможна заместительная терапия препаратом фактора VIII или IX. Но для достижения лечебного эффекта и преодоления действия антител необходимо использовать более высокие дозы препарата или увеличивать частоту его введения.

При высокорреагирующем ингибиторе стандартная терапия препаратом фактора VIII или IX обычно невозможна, так как даже большое количество факторов

свертывания нейтрализуются ингибитором. В таких случаях используют альтернативные методы лечения, которые зависят от природы кровотечения и типа гемофилии.

Наиболее эффективным методом для лечения больных с ингибиторной формой гемофилии является процедура, называемая индукцией иммунной толерантности (ИИТ). При этом лечении больному регулярно в течение нескольких недель или месяцев вводятся препараты факторов свертывания VIII или IX. Целью такого лечения является достижение толерантности иммунной системы по отношению к факторам VIII или IX. Такое лечение является длительным и дорогостоящим, но эффективным в 60–80 % случаев.

В редких случаях при высоком титре антител единственным вариантом для лечения больного становится специфическая терапия, например, удаление ингибитора методом плазмафереза. Однако эта мера является временной, так как повторное введение фактора стимулирует организм к выработке новых антител в течение нескольких дней.

Еще одной из основных проблем для терапевтического и профилактического применения препаратов факторов свертывания является низкий период циркуляции FVIII или FIX в крови человека.

Период полувыведения FVIII составляет около 12 часов (с колебаниями от 8 до 24 часов) и зависит от клиренса фактора Виллебранда (vWF), который связывается с FVIII. Период полувыведения FIX колеблется от 18 до 24 часов.

С учетом перечисленных недостатков становится очевидной необходимость разработки и внедрения новых методов лечения гемофилии. Для увеличения периода полувыведения препаратов в организме проводят различные модификации молекул факторов свертывания. К таким модификациям относятся, например, конъюгация молекулы факторов свертывания с полиэтиленгликолем (пегилирование) или создание препаратов на основе слитных белков (fusion proteins) – слияние молекул факторов свертывания с Fc-фрагментом иммуноглобулина (Ig) или альбумином. Препараты с более длительным периодом полувыведения снижают частоту внутривенных инъекций, улучшают результаты лечения и позволяют пациентам вести более активный образ жизни.

Для снижения иммуногенности разрабатывают рекомбинантные препараты, получаемые с использованием клеточной линии человека для того, чтобы действующее вещество препарата имело максимальное сходство с белками человека. Для повышения стабильности, эффективности молекулы FVIII и более прочного связывания с vWF проводят удаление В-домена.

Также в последние годы ведутся клинические испытания новых препаратов для лечения гемофилии.

К таким препаратам относятся:

- Эмицизумаб – биспецифичное моноклональное антитело, имитирующее функцию FVIII, связывая FIXa с FX;
- Концизумаб – моноклональное антитело, блокирующие активность ингибитора пути тканевого фактора;
- Фитусиран – аптамер на основе антисмыслового олигонуклеотида, блокирующий мРНК, ответственную за синтез антитромбина III.

Фитусиран и концизумаб пока не зарегистрированы для применения ни в одной стране мира. Эмицизумаб зарегистрирован в США, Европе и России.

Основным преимуществом этих препаратов является то, что они не вызывают выработку антител к факторам свертывания и могут быть использованы для лечения больных с наличием в плазме крови ингибиторов.

Контрольные вопросы

1. Какая основная проблема при использовании препаратов факторов свертывания осталась после внедрения методов антивирусной обработки?
2. Что такое ингибиторная форма гемофилии?
3. Почему при наличии ингибиторов не эффективна стандартная заместительная терапия?
4. Что указывает на развитие ингибиторной формы гемофилии? Как определяют наличие ингибитора?
5. Классификация ингибиторов по степени ответа иммунной системы.
6. Почему развивается иммунный ответ у пациентов с неполным дефицитом факторов свертывания?
7. Почему введение препарата FIX вызывает меньший иммунный ответ?
8. Какой метод является наиболее эффективным для лечения больных с ингибиторной формой гемофилии и почему?
9. Какие методы модификации молекул факторов свертывания используют для увеличения их периода полувыведения? Для чего это делается?
10. Какие препараты для лечения гемофилии проходят клинические испытания? В чем их преимущество?

ГЛАВА 9. ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ КАК СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ГЕМОФИЛИИ

Генная терапия как направление биомедицины появилась в 90-х годах XX века. Основная ее задача – введение генетического материала (ДНК или РНК) в клетки с целью лечения определенного заболевания. В результате этого происходит изменение функции клетки и начинается синтез белка, который кодирует введенный ген. Такая терапия применяется для исправления генетических дефектов, которые могут быть врожденными (генеративные мутации при наследственных заболеваниях) или приобретенными (соматические мутации в опухолевых клетках). В процессе становления генной терапии ученым пришлось решить немало вопросов.

Для успешного лечения терапевтический ген, вводимый больному, должен обладать определенными свойствами:

- ген должен быть долгоживущим для более редкого введения больному;
- ген должен встроиться в ДНК клетки между уже имеющимися генами, не мешать удвоению ДНК и делению клетки.

Из существующих методов переноса генетического материала в клетку самым эффективным и поэтому чаще используемым оказался метод переноса гена с помощью вирусных векторов.

Вирусные векторы разрабатывают на основе нативных вирусов, в которые вместо собственного гена вируса внедряют необходимый терапевтический ген. В случае лечения гемофилии, ген, отвечающий за синтез фактора свертывания VIII или IX. Модифицированный вирус – вектор, содержащий терапевтический ген, вводят в организм пациента. Далее вирус проникает в клетки печени – основного органа, где синтезируются факторы свертывания, и внедряет необходимый генетический материал. Это позволяет клеткам начать производить белки, необходимые для нормализации свертываемости крови, что ведет к выздоровлению больного.

В качестве векторов можно использовать даже патогенные вирусы. При этом удаляют гены, которые отвечают за патогенность. Наряду с этим устраняют свойство вирусов самостоятельно размножаться внутри организма человека, чтобы исключить риск неконтролируемого распространения.

Кроме того, вирусные векторы имеют свою емкость, так как их ДНК или РНК должна уместиться в белковой оболочке, в которую она инкапсулирована. Ген фактора VIII крупнее, чем фактора IX, что создает проблемы со его встраиванием в вектор. Проблема решается путем удаления В-домена.

Одним из главных препятствий при использовании генной терапии является возникновение иммунного ответа при введении вектора, поэтому чем меньше вектор несет своей информации, тем лучше, так как в таком случае вероятность иммунного ответа становится меньше.

С целью переноса генетического материала было изучено множество вирусных векторов. Широкое распространение получили:

- аденовирусные векторы;
- аденоассоциированный вирусные векторы;
- ретровирусные векторы.

9.1. Аденовирусные векторы

Аденовирус является ДНК-содержащим безоболочечным вирусом, способным инфицировать оба типа клеток – делящиеся и неделящиеся, включая клетки печени, легких и эпителия.

Использование аденовирусных векторов имеет свои преимущества:

- высокая эффективность доставки гена;
- возможность получения высоких уровней экспрессии введенного гена;
- относительно простая подготовка и масштабируемость.

Но также у этого метода имеются недостатки. Одним из главных недостатков является формирование иммунного ответа на введенный препарат. Это препятствует использованию аденовирусов *in vivo*. Также использование аденовирусных препаратов дает лишь временный эффект, поскольку аденовирусные векторы обычно не интегрируются в геном хозяина, что требует повторных введений.

В последние годы ведутся исследования по использованию аденовирусных векторов для лечения гемофилии. В некоторых случаях удалось достичь положительных результатов: повышение уровня фактора свертывания и снижение частоты кровотечений. Однако полностью избавиться от развития иммунных реакций и обеспечить длительный эффект действия пока не удастся.

Иммунный ответ развивается даже в случае использования новых хелперзависимых форм аденовирусных векторов. При создании этих векторов от исходного вирусного генома остаются только нуклеотидная последовательность, ответственная за обратную транскрипцию, и последовательность, кодирующая процесс «распаковки» вируса. Введение такого вектора может вызвать развитие иммунной тромбоцитопении – снижение уровня тромбоцитов, которое достигает максимума в течение 24–48 ч после введения. После появляются признаки гепатотоксичности – повреждения печени. В дальнейшем возможно развитие системного воспалительного синдрома, который может привести к смерти.

В связи с этим, пока не разработаны методы для уменьшения или устранения острого токсического эффекта, возникающего при введении аденовирусного вектора, применение таких препаратов в большинстве случаев ограничено. В основном аденовирусные препараты находятся на стадии клинических испытаний.

В настоящее время все больше внимания уделяют аденоассоциированным вирусным векторам, которые вызывают меньшие иммунные реакции и могут обеспечивать более длительную экспрессию гена, встраиваясь в геном.

9.2. Аденоассоциированные вирусные векторы

Аденоассоциированный вирус (англ. adeno-associated virus, AAV) – непатогенный, безоболочечный, стабильный, ДНК-содержащий вирус маленького размера, относящийся к роду Dependoparvovirus (от лат. Dependo – «зависеть»). AAV способен инфицировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки.

Аденоассоциированный вирус интересен тем, что ему для самостоятельного размножения необходимо наличие вспомогательного вируса. Без такого вируса AAV размножаться не сможет. В качестве вируса-помощника чаще всего выступает аденовирус.

Аденоассоциированный вирус содержит внутри только два собственных гена. Один ген кодирует синтез белков, которые необходимы для размножения AAV, другой – синтез белков капсида.

Аденоассоциированный вирус обладает рядом преимуществ при использовании в качестве вектора.

Одним из таких преимуществ AAV является его свойство интегрироваться в геном хозяина по специфическим участкам девятнадцатой хромосомы, случайные встраивания при этом происходят крайне редко. Поэтому использование аденоассоциированных вирусов в качестве векторов является более предсказуемым и надежным методом, чем использование ретровирусов. Ретровирусы потенциально могут выступать в роли мутагенов, так как интегрируются в геном случайным образом.

Еще одним преимуществом является то, что аденоассоциированный вирусный вектор обладает очень низкой иммуногенностью и способен обеспечивать стабильную и длительную экспрессию введенного гена. Соответственно, необходимость регулярных инъекций значительно снижается или исчезает, что облегчает лечение и повышает комфорт пациента.

Существует несколько серотипов AAV – виды вируса, которые отличаются друг от друга антигенами на своей белковой оболочке. Разные серотипы обладают разными свойствами тропизма к тканям, что делает их полезными для доставки генов в различные органы.

Серотипы AAV:

- AAV1 – обладает тропизмом к скелетным мышцам, сердцу и ЦНС;
- AAV2 – самый широко используемый вектор, обладает тропизмом к печени, сетчатке и ЦНС;
- AAV5 – тропизм к нейронам, легким и сетчатке;
- AAV6 – тропизм к скелетным мышцам, сердцу и легким;
- AAV8 – тропизм к печени и скелетным мышцам;
- AAV9 – тропизм к печени, сердцу и ЦНС, в частности к нейронам.

Заметный успех был достигнут фирмой «Avigen» при переносе вектором AAV2 гена фактора свертывания IX в печень. При разработке вектора на основе аденоассоциированного вируса собственные гены вируса были удалены и заменены нужным терапевтическим геном. Это сделало риск иммунного ответа минимальным. Схема данного метода представлена на рис. 19.

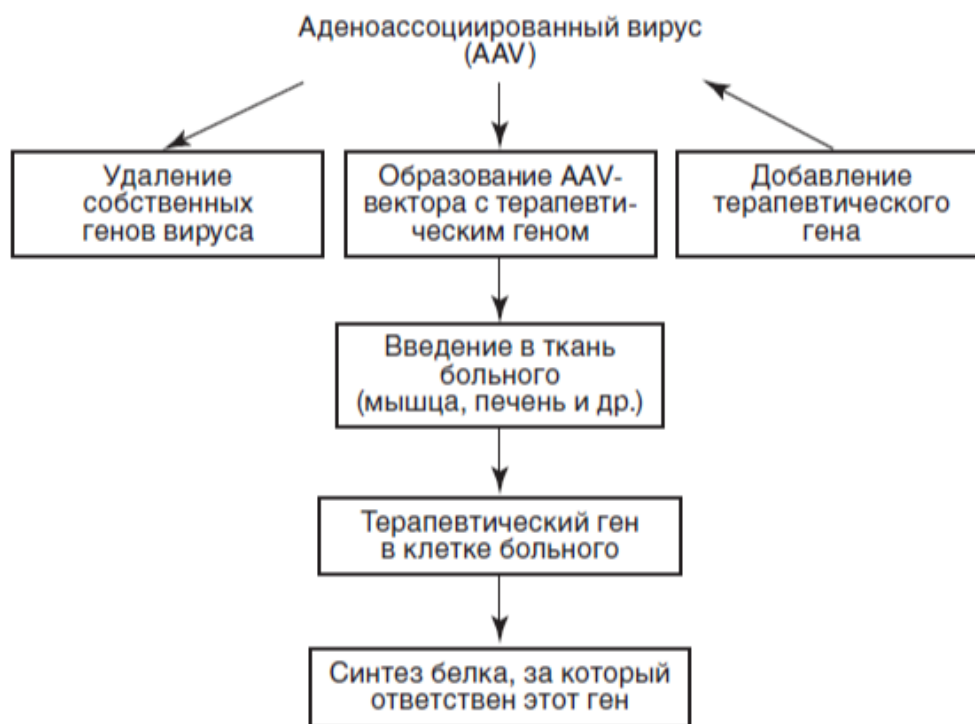


Рис. 19. Схема экспериментальной генной терапии гемофилии
Авторство: Румянцев А.Г. Гемофилия в практике врачей различных специальностей, 2012

Векторная система компании «Avigen» на основе AAV способна доставлять гены в клетки разнообразных тканей, включая мышцы, печень, кожу и др. Особенно удобно введение в мышцу, так как это может быть сделано обычным шприцем. При этом терапевтический эффект после однократного введения максимально продолжался до 18 мес.

На основании этого учеными компании «Avigen» совместно с Детской больницей в Филадельфии был разработан генно-терапевтический метод для лечения гемофилии В с использованием однократной внутримышечной инъекции вектора AAV, содержащего ген FIX. Сначала опыты были проведены на мышах, а затем и на более крупных животных – собаках. В результате работы были получены достаточно неплохие результаты: максимальное время терапевтического эффекта составляло 9 мес при отсутствии токсичности. Это послужило основанием для проведения клинических испытаний. Препарат для лечения гемофилии В при помощи генной терапии получил название «Coagulin-B».

Соагулин-В вводили больным внутримышечно, токсического эффекта от препарата не наблюдалось, уровень фактора свертывания повышался. Но эффект препарата был кратковременным и при этом требовалось довольно много инъекций. Позднее было показано, что фактор IX прекращал вырабатываться в связи с клеточным иммунным ответом.

Позднее было получено разрешение на клиническое испытание препарата, которое вводится в печень. У пациентов был получен терапевтический уровень фактора более 10 % и препарат не оказывал токсического эффекта. К сожалению, такой уровень фактора держался только в течение первых четырех недель, позже он резко упал. Проблему падения уровня фактора решить не удалось. В мае 2004 года было принято решение о прекращении клинического испытания.

Однако другими компаниями исследования не прекращались и позднее удалось достичь более длительной экспрессии трансгена при использовании AAV вектора. Так, после однократного введения аденоассоциированного вирусного препарата была зафиксирована экспрессия трансгена в течение 6 лет у приматов и в течение 8 лет у собак. Другие клинические исследования по оценке эффективности AAV вектора показали, что терапевтический эффект AAV транспортируемого трансгена сохраняется в мозге человека на протяжении как минимум 10 лет.

Аденоассоциированные вирусные препараты активно исследуются и применяются в клинических испытаниях для лечения гемофилии. Они показывают многообещающие результаты по повышению уровня факторов свертывания и снижению симптомов заболевания. Однако вопросы долговременной эффективности и безопасности требуют дальнейшего изучения.

9.3. Ретровирусные векторы

Ретровирусы (Retroviridae, лат. retro – обратный) – это оболочечный РНК-содержащие вирусы. В клетке хозяина их РНК преобразуется в ДНК с использованием механизма обратной транскрипции.

Семейство ретровирусов делится на два подсемейства орторетровирусы (Orthoretrovirinae) и спумаретровирусы (Spumaretrovirinae), которые в свою очередь делятся на роды и виды.

К орторетровирусам (др.-греч. ortho – прямой) – собственно ретровирусам, относятся:

- Альфаретровирусы (Alpharetrovirus);
- Бетаретровирусы (Betaretrovirus);
- Гаммаретровирусы (Gammaretrovirus);
- Дельтаретровирусы (Deltaretrovirus);
- Эпсилонретровирусы (Epsilonretrovirus);
- Лентивирусы.

Одним из главных ограничений применения ретровирусных векторов в генной терапии является их неспособность инфицировать неделящиеся клетки, т. е. клетки мышц, мозга, легких и печени. В связи с этим в настоящее время наблюдается повышенный интерес к развитию вирусных векторов на основе лентивирусов, которые имеют свои преимущества при использовании в качестве векторов. Наиболее изученным представителем лентивирусов является ВИЧ.

Основным преимуществом использования лентивирусов в качестве векторов является их уникальная способность инфицировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки, а также низкая иммуногенность.

Как отмечалось выше, ретровирусы, как и AAV, умеют встраиваться в геном хозяина, что обеспечивает стабильную длительную экспрессию терапевтического гена. Однако при этом в клетках происходят мутации, которые вызывают развитие злокачественных опухолей. Такое явление называется генотоксичность – свойство вируса повреждать генетическую информацию в клетке, вызывая мутации, которые в дальнейшем могут привести к раку.

В этом плане лентивирусы также имеют неоспоримое преимущество. Исследования показали, что существует возможность создать безопасные векторы на основе лентивирусов, которые не будут обладать свойством генотоксичности. При сравнении на мышах было показано, что при использовании лентивирусных векторов вероятность развития опухоли в 10 раз ниже, чем при использовании γ -ретровирусов. Считается, что это связано с различием места встраивания в геном хозяина.

В целом для создания векторов более оптимальны лентивирусы, так как во многом они превосходят γ -ретровирусы. Тщательный подход с учетом различных факторов может предотвратить возникновение гепатотоксичности при использовании ретровирусных векторов.

Подводя итог, можно с уверенностью сказать о том, что генная терапия постоянно развивается и обладает большим потенциалом. В этой области постоянно исследуются новые векторные системы и способы преодоления существующих проблем.

Контрольные вопросы

1. Какова основная задача генной терапии?
2. Какими свойствами должен обладать терапевтический ген для успешного лечения?
3. Как разрабатываются вирусные векторы и что происходит после внесения вектора в организм больного?
4. Какие вирусные векторы наиболее распространены?
5. Преимущества и недостатки аденовирусных векторов.

6. В чем особенность аденоассоциированных вирусов?
7. Преимущества использования аденоассоциированных вирусных векторов.
8. Почему в качестве векторов в основном используют лентивирусы?

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Апарцин Е. К. Методы доставки генетического материала в клетки и возможности их применения в генной терапии / Е. К. Апарцин, Н. Ю. Кнауэр // *Гены & клетки*. – 2016. – № 11(2). – С. 32–41.
2. Безопасность использования ретровирусных векторов в генной терапии / Е. В. Богословская, Д. В. Глазкова, Г. А. Шипулин, В. В. Покровский // *Вестник РАМН*. – 2012. – № 10. – С. 55–61.
3. Выделение плазменного фактора свертывания крови IX высокой степени очистки / Т. Л. Дереза, И. А. Скрылева, О. Г. Кутюрова, А. Л. Берковский // *Гематология и трансфузиология*. – 2014. – № 2(59). – С. 25–29.
4. Гемофилия: сайт. – URL: <https://gemotest.ru/info/spravochnik/zabolevaniya/gemofiliya/> (дата обращения: 21.09.2025).
5. Гемофилия в современной британской королевской семье: сайт. – URL: <https://thecrowns.ru/korolevskaya-semya/gemofiliya-v-sovremennoj-britanskoj-korolevskoj-seme.html> (дата обращения: 19.03.2025).
6. Гены и клетки: сайт. – URL: <https://genescells.ru/2313-1829/announcement/view/824> (дата обращения: 15.03.2025).
7. Зубкова Н. В. Биотехнологические аспекты эффективной и безопасной переработки донорской плазмы: проблемы и перспективы / Н. В. Зубкова // *Биопрепараты*. – 2014. – № 1(49). – С. 44–49.
8. Зубкова Н. В. Обеспечение инфекционной безопасности препаратов из плазмы крови доноров / Н. В. Зубкова // *Гематология и трансфузиология*. – 2014. – № 2(59). – С. 4–10.
9. Как работает система свертывания крови?: сайт. – URL: <https://biomolecula.ru/articles/kak-rabotaet-svertyvanie-krovi> (дата обращения: 05.09.2025).
10. Крохотные курьеры: как аденоассоциированные вирусы спасают жизни: сайт. – URL: <https://biomolecula.ru/articles/krokhotnye-kurery-kak-adenosotsirovannye-virusy-spasaiut-zhizni> (дата обращения: 02.03.2025).
11. Нерешенные вопросы оказания медицинской помощи пациентам с ингибиторной формой гемофилии в России / Н. И. Зозуля, В. М. Чернов, И. С. Тарасова, А. Г. Румянцев // *Российский журнал детской онкологии и гематологии*. – 2019. – № 6(2). – С. 48–53.
12. Основные направления по разработке и модификации препаратов для лечения гемофилии / А. А. Солдатов, Ж. И. Авдеева, В. Д. Мосягин [и др.] // *Гематология и трансфузиология*. – 2016. – № 61(4). – С. 208–215.
13. Панов В. П. Принципы обеспечения вирусной безопасности продуктов крови (обзор) / В. П. Панов // *Химико-фармацевтический журнал*. – 2004. – № 3(8). – С. 39–47.

14. Плазмаферез: сайт. – URL:
<https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9F%D0%BB%D0%B0%D0%B7%D0%BC%D0%B0%D1%84%D0%B5%D1%80%D0%B5%D0%B7> (дата обращения: 28.01.2026).
15. Полноцепочечный, не содержащий человеческих и животных белков, препарат рекомбинантного фактора свертывания крови VIII Адвейт (октоког альфа) – место в ряду антигемофильных препаратов / Т. С. Нургожин, А. Е. Гуляев, Ш. Сергазы [и др.] // Медицина и экология. – 2017. – № 4. – С. 27–36.
16. Препараты, полученные из крови человека и животных, в аспекте показателей качества, эффективности и безопасности / М. В. Супотницкий, А. А. Елапов, И. В. Борисевич [и др.] // Биопрепараты. – 2015. – № 3. – С. 33–48.
17. Румянцев А. Г. Гемофилия в практике разных врачей / А. Г. Румянцев, С. А. Румянцев, В. М. Чернов. – Москва. – ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 136 с.
18. Свертывание крови: сайт. – URL:
https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A1%D0%B2%D1%91%D1%80%D1%82%D1%8B%D0%B2%D0%B0%D0%BD%D0%B8%D0%B5_%D0%BA%D1%80%D0%BE%D0%B2%D0%B8 (дата обращения: 27.03.2025).
19. Свертывающая система крови. Общее представление о ферментном каскаде процесса свертывания: сайт. – URL:
<https://studfile.net/preview/4081741/page:7/> (дата обращения: 25.02.2025).
20. Супотницкий М. В. Генотерапевтические векторные системы на основе вирусов / М. В. Супотницкий // Биопрепараты. – 2011. – № 3. – С. 15–26.
21. Тарасова И. С., Чернов В. М. Октофактор. Первый отечественный рекомбинантный препарат фактора свертывания крови VIII для лечения больных гемофилией А / И. С. Тарасова, В. М. Чернов // Приложение к журналу Геминформ. – 2015. – № 28(1). – С. 1–4.
22. Устинникова О. Б. Технологии производства рекомбинантных факторов свертывания крови в аспекте современных требований к качеству и безопасности биотехнологических препаратов / О. Б. Устинникова, О. Б. Рунова, Е. В. Новикова // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. – № 11. – С. 491–495.
23. Фракционирование и очистка белков: сайт. – URL:
<https://xumuk.ru/biologhim/007.html> (дата обращения: 21.05.2026).
24. Фракционирование плазмы крови: сайт. – URL:
<https://mederispb.ru/articles/open/196> (дата обращения: 15.05.2025).
25. Bertolini J. Production of Plasma Proteins for Therapeutic Use / J. Bertolini, N. Goss, J. Curling. – Wiley (John Wiley & Sons), 2013. – 496 p.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ГЛАВА 1. ГЕМОРРАГИЧЕСКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ.....	5
1.1. Определение гемофилии	5
1.2. Механизмы наследования гемофилии	5
1.3. Типы гемофилии	7
ГЛАВА 2. ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ ЗНАНИЙ О ГЕМОФИЛИИ.....	10
ГЛАВА 3. МЕХАНИЗМ РАБОТЫ СИСТЕМЫ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ	15
3.1. Определение гемостаза.....	15
3.2. Механизм гемостаза.....	15
3.3. Факторы свертывания крови, каскад активации.....	16
ГЛАВА 4. МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ БЕЛКОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ ...	23
4.1. Получение плазмы	23
4.2. Фракционирование белков плазмы	25
4.2.1. Криопреципитация плазмы	25
ГЛАВА 5. ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ГЕМОФИЛИИ	33
5.1. Эволюция лечения гемофилии	33
5.2. Рекомбинантные препараты факторов свертывания.....	34
5.2.1. Модификации рекомбинантных препаратов.....	42
ГЛАВА 6. ПОКАЗАТЕЛИ КАЧЕСТВА ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ГЕМОФИЛИИ	47
6.1. Показатели качества препаратов факторов свертывания крови, полу- ченных из плазмы крови.....	47
6.2. Показатели качества рекомбинантных препаратов факторов свертыва- ния крови	50
ГЛАВА 7. ПРОБЛЕМА ИНФЕКЦИОННОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ПРЕПАРА- ТОВ ИЗ ПЛАЗМЫ.....	51
7.1. Методы элиминации вирусов	52
7.1.1. Хроматография.....	52
7.1.2. Наночелчтрация.....	53
7.1.3. Преципитация.....	54
7.2. Методы инактивации вирусов	54
7.2.1. Тепловая обработка	54
7.2.2. Сольвент-детергентный (SD) метод.....	55
7.2.3. Обработка каприловой кислотой.....	55
7.2.4. Обработка фенолом	56

ГЛАВА 8. ПРОБЛЕМАТИКА ВЫРАБОТКИ АНТИТЕЛ К РЕКОМБИНАТ-НОМУ ФАКТОРУ, ИНГИБИТОРНАЯ ФОРМА ГЕМОФИЛИИ.....	59
ГЛАВА 9. ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ КАК СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ГЕМОФИЛИИ.....	63
9.1. Аденовирусные векторы	64
9.2. Аденоассоциированные вирусные векторы	65
9.3. Ретровирусные векторы.....	67
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	70

ОПИСАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОСТИ ИЗДАНИЯ:

Интерфейс электронного издания (в формате pdf) можно условно разделить на 2 части.

Левая навигационная часть (закладки) включает в себя содержание книги с возможностью перехода к тексту соответствующей главы по левому щелчку компьютерной мыши.

Центральная часть отображает содержание текущего раздела. В тексте могут использоваться ссылки, позволяющие более подробно раскрыть содержание некоторых понятий.

МИНИМАЛЬНЫЕ СИСТЕМНЫЕ ТРЕБОВАНИЯ:

Celeron 1600 Mhz; 128 Мб RAM; Windows XP/7/8 и выше; 8x DVD-ROM; разрешение экрана 1024×768 или выше; программа для просмотра pdf.

СВЕДЕНИЯ О ЛИЦАХ, ОСУЩЕСТВЛЯВШИХ ТЕХНИЧЕСКУЮ ОБРАБОТКУ И ПОДГОТОВКУ МАТЕРИАЛОВ:

Оформление электронного издания : Издательский центр «Удмуртский университет».

Компьютерная верстка: Т. В. Опарина

Авторская редакция.

Подписано к использованию 15.05.2026

Объем электронного издания 2,5 Мб

Издательский центр «Удмуртский университет»

46034, г. Ижевск, ул. Ломоносова, д. 4Б, каб. 021

Тел. : +7(3412)263-751 E-mail: E-mail: editorial@udsu.ru
