

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Факультет фармацевтичних технологій та менеджменту
Кафедра біотехнології

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему: **«АНАЛІЗ ТЕХНОЛОГІЙ ОТРИМАННЯ РЕКОМБІНАНТНИХ
ФАКТОРІВ КРОВІ»**

Виконав: здобувач вищої освіти 2 курсу групи ПБтм23(1,6д)-01
спеціальності: 162 Біотехнології та біоінженерія
освітньої програми Промислова біотехнологія
Андрій ЧЕРНЕЦЬКИЙ

Керівник: доцент закладу вищої освіти
кафедри біотехнології, к. фарм. н., доц. Ольга КАЛЮЖНАЯ

Рецензент: начальник відділу фармацевтичної розробки ТОВ
«БІОЛІК ФАРМА», к. фарм. н., с.н.с. Олена НАЗАРОВА

АНОТАЦІЯ

У роботі проаналізовано сучасні технології отримання рекомбінантних факторів згортання крові, які використовуються для лікування гемофілії А та В. Розглянуто основні етапи виробництва рекомбінантних факторів VIII (rFVIII) та IX (rFIX), особливості клітинних ліній (CHO, ВНК, HEK293), вдосконалення процесів очищення та зменшення імуногенності продуктів. Представлено характеристику технологій різних поколінь рекомбінантних факторів згортання крові, а також їхній вплив на лікування та зручність для пацієнтів. На прикладі рекомбінантного фактора крові rFVIII (Nuwiq®) розроблено рекомендації для впровадження подібних технологій на вітчизняних підприємствах. Робота складається зі вступу, трьох розділів, висновків. Загальний обсяг роботи - 76 сторінки, кількість рисунків - 9, таблиць - 8, джерел літератури - 52.

Ключові слова: рекомбінантні фактори крові, гемофілія, клітинні лінії, технологія виробництва.

ANNOTATION

The paper analyzes modern technologies for obtaining recombinant blood clotting factors used for the treatment of hemophilia A and B. The main stages of production of recombinant factors VIII (rFVIII) and IX (rFIX), features of cell lines (CHO, ВНК, HEK293), improvement of purification processes and reduction of immunogenicity of products are considered. Characteristics of technologies of different generations of recombinant blood clotting factors are presented, as well as their impact on treatment and convenience for patients. Using the example of recombinant blood factor rFVIII (Nuwiq®), recommendations for the implementation of similar technologies at domestic enterprises are developed. The paper consists of an introduction, three sections, and conclusions. The total volume of the paper - 76 pages, the number of figures - 9, tables – 8 and references are 52.

Key words: recombinant blood factors, hemophilia, cell lines, production technology.

ЗМІСТ

Вступ	3
Розділ 1 Огляд літератури	7
1.1 Механізм гемостазу та важливість факторів згортання крові при гемостазі	7
1.2 Лікування та профілактика порушень утворення факторів крові	9
Висновок до розділу 1	12
Розділ 2 Об'єкти та методи досліджень	14
2.1. Об'єкти досліджень	14
2.2. Методи досліджень	21
Висновок до розділу 2	22
Розділ 3 Експериментальна частина	23
3.1 Загальна характеристика технологій отримання рекомбінантних факторів крові	23
3.2 Характеристика препаратів рекомбінантних факторів крові VIII (rFVIII) та IX (rFIX)	26
3.2.1 Рекомбінантний фактор крові VIII (rFVIII)	26
3.2.2 Рекомбінантний фактор крові IX (rFIX)	31
3.3 Методи подовження періоду напіврозпаду препаратів rFVIII і rFIX	34
3.4 Забезпеченість препаратами факторів крові людини в Україні	38
3.5 Порівняння технологій виробництва рекомбінантних факторів крові	46
3.6 Технологія виробництва рекомбінантного фактора VIII останнього покоління	54
Висновок до 3 розділу	69
Висновки	73
Список використаних джерел	76
Додаток. Публікації за темою роботи	83

ВСТУП

Актуальність теми. Гемостаз - це складний процес зупинки кровотечі з ушкодженої кровоносної судини, що включає взаємодію факторів згортання крові в каскаді згортання крові з активованими тромбоцитами та стінкою судини.

Порушення синтезу або зниження активності окремих факторів згортання крові призводить до виникнення серйозних захворювань, таких як афібриногенемія (дефіцит фактора FI), парагемофілія (дефіцит фактора FV), гемофілія А (дефіцит фактора FVIII), гемофілія В або хвороба Крістмаса (дефіцит фактора FIX), гемофілія С або хвороба Розенталя (дефіцит фактора FXI) та дефект Хагемана (дефіцит фактора FXII). Ці захворювання належать до орфанних генетичних або набутих невиліковних патологій, єдиним методом лікування яких є довічна замісна терапія.

Одним із відомих Х-зчеплених генетичних захворювань є гемофілія, яка може бути гемофілією А в результаті мутації в гені F8 (фактор VIII) або гемофілією В у результаті мутації в гені F9 (фактор IX), що призводить до недостатнього рівня білків, необхідних для каскаду згортання крові. У пацієнтів з тяжкою гемофілією активність фактора VIII або фактора IX у плазмі крові становить менше 1 %. Це є причиною спонтанних або посттравматичних епізодів кровотечі, що призводить до ускладнень захворювання та смерті.

Поширеність гемофілії у світі, зокрема й в Україні, є приблизно однаковою: 24,5 випадку гемофілії А на 100 тисяч новонароджених хлопчиків, тоді як гемофілія В зустрічається приблизно в 5 разів рідше. Загалом у світі налічується близько 418 тисяч пацієнтів із тяжкою формою гемофілії А та В. Якщо додати до цього число пацієнтів із легкими та середніми формами гемофілії, загальна кількість перевищує 1,1 мільйона. За даними Національної служби здоров'я України в нашій країні офіційно зареєстровано біля 2 тисяч пацієнтів із гемофілією (1902 хворих на гемофілію - за даними електронної

системи охорони здоров'я станом на 15.04.2024).), більшість із яких мають тяжку форму захворювання.

Основним методом лікування гемофілії є регулярне введення фактора згортання крові, зазвичай 2-3 рази на тиждень. Це допомагає запобігати спонтанним і надмірним кровотечам. У разі ускладнень застосовується терапія «за потребою», коли препарат вводиться частіше і у вищих дозах під час госпіталізації.

Засоби для лікування гемофілії мають високу вартість, тому забезпечення пацієнтів здійснюється державою через централізовані закупівлі, які координує Міністерство охорони здоров'я. При необхідності госпіталізації пацієнти з гемофілією можуть отримати безкоштовну медичну допомогу у гематологічних відділеннях тих закладів, які мають договір із НСЗУ за пакетом стаціонарної допомоги.

Отже, сучасне лікування гемофілії базується на профілактиці кровотечі, яка полягає в дороговартісній довічній замісній інфузійній терапії факторами згортання плазми крові. Але слід зазначити, що кількість факторів згортання крові в білках плазми людини занадто низька, щоб їх можна було виділити в достатній кількості. Крім того, виробництво продуктів фактора згортання крові, отриманих із плазми, суттєво залежить від постачання людської плазми. А також слід відмітити таку проблему як інактивація вірусу в плазмі, яка часто не є повною, що створює серйозний ризик зараження вірусом через використання продуктів, отриманих із плазми. Таким чином, виробництво та клінічне застосування терапевтичних продуктів факторів згортання крові, отриманих із плазми, серйозно обмежені в ресурсах та клінічних ризиках. Тому сучасна замісна інфузійна терапія факторами згортання плазми крові базується на застосуванні їх рекомбінантних версій або терапії рекомбінантними моноклональними антитілами, також нещодавно у лікуванні стали застосовувати підходи генної терапії. Слід відзначити, що серед сучасних рекомбінантних засобів для лікування гемофілії на вітчизняному ринку присутні препарати закордонних компаній.

Таким чином, дослідження, які спрямовані на аналіз сучасних технологій виробництва рекомбінантних факторів крові для лікування гемофілії та їх подальше впровадження на вітчизняних підприємствах, мають значну актуальність.

Метою дослідження є аналіз сучасних технологій отримання рекомбінантних факторів згортання крові VIII та IX для лікування гемофілії, вивчення особливостей їх виробництва, включаючи клітинні лінії, посттрансляційні модифікації, методи очищення, а також оцінка їхньої ефективності та безпеки для подальшого застосування у фармацевтичній практиці, зокрема і вітчизняними підприємствами.

Завдання дослідження:

1. провести огляд сучасних технологій виробництва рекомбінантних факторів згортання крові VIII (rFVIII) та IX (rFIX);
2. вивчити класифікацію рекомбінантних факторів згортання крові за поколіннями та їхній вплив на зручність лікування для пацієнтів;
3. систематизувати та проаналізувати препарати рекомбінантних факторів згортання крові VIII (rFVIII) та IX (rFIX), що наявні на світовому фармацевтичному ринку;
4. дослідити особливості використання клітинних ліній (CHO, ВНК, НЕК293) у виробництві рекомбінантних білків;
5. охарактеризувати сучасні методи подовження періоду напіврозпаду препаратів рекомбінантних факторів згортання крові VIII (rFVIII) та IX (rFIX), а також вплив посттрансляційних модифікацій на ефективність і стабільність рекомбінантних факторів крові;
6. охарактеризувати методи очищення білків, включаючи багатоступеневі хроматографічні процеси, для забезпечення високої чистоти та безпечності продуктів;
7. проаналізувати забезпеченість препаратами факторів крові людини в Україні;
8. порівняти технології виробництва рекомбінантних факторів крові на

прикладі препаратів 1 та 4 поколінь;

9. дослідити технології виробництва рекомбінантного фактора VIII останнього покоління на прикладі Human-cl rhFVIII, Nuwiq®;

10. на основі проведеного аналізу розробити технологічну схему та рекомендації щодо можливості впровадження сучасних технологій виробництва рекомбінантних факторів крові на вітчизняних підприємствах.

Об'єкти дослідження: фактори згортання крові, а саме FVIII та FIX, які мають вирішальну роль у функціонуванні системі згортання крові, а також рекомбінантні препарати rFVIII та rFIX.

Предмет дослідження: сучасні технології виробництва рекомбінантних факторів крові та методи покращення безпечності та ефективності препаратів.

Методи дослідження: методи описового та аналітичного дослідження - проаналізовані літературні і доступні в Інтернеті джерела, проведено порівняльний аналіз та систематизація даних.

Практичне значення отриманих результатів. Проведений аналіз сучасних технологій виробництва рекомбінантних факторів крові та розроблена на його основі технологічна схема (на прикладі рекомбінантного препарату 4 покоління) можуть бути використані вітчизняними виробниками при впровадженні власної технології.

Апробація результатів дослідження і публікації. Окремі результати досліджень представлені на V Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю, 10-11 грудня 2024 р., м. Харків, та опубліковані у матеріалах: Чернецький А. В. Тенденції розвитку технологій виробництва рекомбінантних факторів крові / А. В. Чернецький // V Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю «YOUTH PHARMACY SCIENCE», 10-11 грудня 2024 р., НФаУ. – Харків, 2024. – С. 170-172.

Структура та обсяг кваліфікаційної роботи. Робота складається зі вступу, трьох розділів - огляду літератури, об'єктів та методів дослідження, експериментальної частини, висновку. Загальний обсяг роботи 76 сторінки, кількість рисунків - 9, таблиць -8, джерел літератури – 52, додатків 1.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Механізм гемостазу та важливість факторів згортання крові при гемостазі

Проблема зупинки кровотечі є актуальною при багатьох захворюваннях та патологіях, особливо у випадках лікування спадкового порушення згортання крові - гемофілії, яка належить до невиліковних захворювань.

Зупинка кровотечі на місці пошкодження судини забезпечується фізіологічним процесом гемостазом. Основою згортання крові є перехід розчинного білка фібриногену, що міститься у плазмі, у нерозчинний фібрин.

Механізм гемостазу можна розділити на чотири етапи: 1) звуження кровоносної судини, 2) утворення тимчасової «тромбоцитарної пробки», 3) активація коагуляційного каскаду, 4) утворення «фібринової пробки» або остаточного згустку.

Гемостаз сприяє серії ферментативних активацій, які призводять до утворення згустку з тромбоцитами та фібрином. Цей згусток ущільнює пошкоджену ділянку, контролює та запобігає подальшій кровотечі, поки відбувається процес регенерації тканин. Коли травма починає заживати, пробка повільно перебудовується, і вона розчиняється з відновленням нормальної тканини на місці пошкодження.

Безпосередньо процес згортання крові складається з кількох етапів. Перший етап, або первинний гемостаз, включає формування первинного тромбоцитарного тромбу в зоні пошкодження судини. Це відбувається завдяки адгезії та агрегації тромбоцитів, а також спазму судин. Первинний гемостаз запускає другий етап - згортання, що є багатофазним ферментативним процесом. При цьому активуються спеціальні білкові речовини - фактори згортання крові. Вторинний гемостаз полягає в активації згортання, що зміцнює тромбоцитарний тромб за допомогою фібринової сітки.

Ендогенні інгібітори згортання запобігають надмірному утворенню тромбу і розвитку тромбозу. Фібринолітична система забезпечує розчинення фібрину, а інші компоненти тромбу видаляються шляхом фагоцитозу. Взаємодія тромбоцитів, факторів згортання плазми, клітин ендотелію та субендотеліальних структур судин відіграє ключову роль у гемостазі. Крім того, процес загоєння ран ініціюється факторами крові, які виділяються тромбоцитами та ендотеліальними клітинами, а після завершення загоєння фібрин розщеплюється фібринолітичною системою плазми крові.

Фактори згортання крові виявляються у всіх формених елементах крові (тромбоцитах, еритроцитах, лейкоцитах). Згідно з міжнародною номенклатурою, вони позначаються римськими цифрами відповідно до хронології відкриття. Ці фактори поділяються на дві групи: ферменти (фактори XII, XI, X, VII, II) та неферменти (фактори I, IV, V, VIII). Фактор I (фібриноген) відіграє ключову роль у формуванні кров'яного згустку, а фактори IV, V і VIII є активаторами ферментативних процесів.

Коагуляційний каскад, вперше запропонований у 1964 р., передбачає злиття внутрішнього та зовнішнього шляхів у загальний шлях для послідовної активації 12 факторів згортання крові зі зв'язуванням активованих тромбоцитів з утворенням тромбу на стінці судини (рис. 1.1). Кожному з 12 факторів згортання присвоєно римський цифри від I до XIII, за винятком VI, оскільки згодом було встановлено, що фактор згортання крові VI є активованим фактором згортання крові V (FVa). За винятком фактора згортання IV (FIV), який є іоном кальцію (Ca^{2+}), інші 11 факторів згортання є білками.

Взаємодія факторів згортання відбувається на поверхні тромбоцитів та ендотеліальних клітин, унаслідок чого утворюється тромбін, який перетворює фібриноген на фібрин, що закріплює гемостатичну пробку.

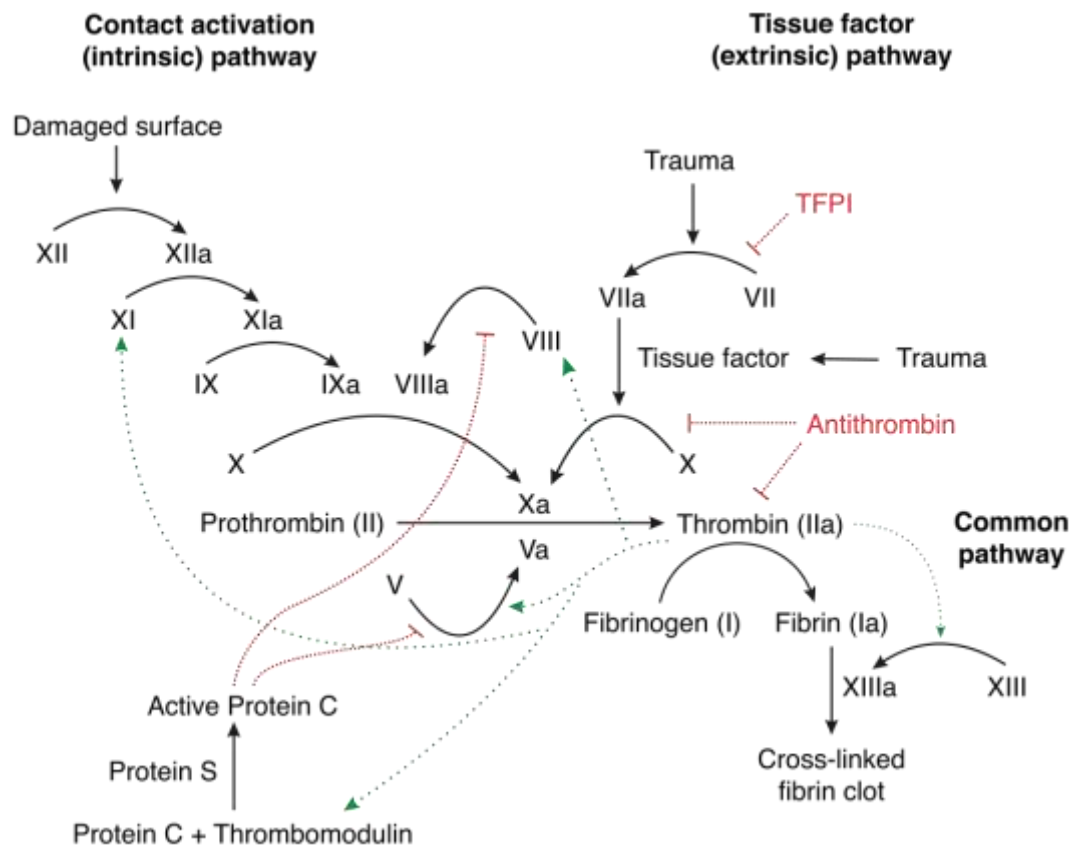


Рис. 1.1 - Схема дії факторів згортання крові при гемостазі
(Джерело: <https://en.wikipedia.org/wiki/Coagulation>)

При внутрішньому механізмі активації згортання фактор XII, високомолекулярний кініноген, прекалікреїн та активований фактор XI (фактор XIa) взаємодіють, формуючи фактор IXa з фактора IX. Потім фактор IXa об'єднується з фактором VIIIa та фосфоліпідним коагулянтном, створюючи комплекс, який активує фактор X. У зовнішньому шляху активації згортання фактор VIIa разом із тканинним фактором (TF) безпосередньо активує фактор X.

1.2 Лікування та профілактика порушень утворення факторів крові

Порушення синтезу або зниження активності окремих факторів згортання крові призводять до розвитку серйозних захворювань – патологій, що належать до орфанних генетичних або набутих невиліковних захворювань, таких як: афібриногенемія (дефіцит FI), парагемофілія (дефіцит FV), гемофілія

А (дефіцит FVIII), гемофілія В або хвороба Крістмаса (дефіцит FIX), гемофілія С або хвороба Розенталя (дефіцит FXI) і дефект Хагемана (дефіцит FXII). Будь-який дефект у функціональності факторів коагуляції може призвести до розладів коагуляції, включаючи найпоширеніші розлади хвороби фон Віллебранда, гемофілії та дефіциту вітаміну К. Також сюди слід віднести порушення гемостазу після великої травматичної кровотечі пов'язане з порушенням згортання крові. Великий крововилив є основною причиною смерті пацієнтів із травматичними ушкодженнями, якій можна запобігти, у всьому світі. За статистичними даними одна людина помирає від травм майже кожні 3 хвилини, і 40 % цих смертей спричинені великою кровотечею або її наслідками. Тому фактори згортання крові вважаються найбільш доцільними продуктами гемостазу під час операції.

У 1950-х і на початку 1960-х рр. лікування хворих на гемофілію ґрунтувалося на переливанні цільної крові або свіжої плазми. У 1964 р. були ідентифіковані та названі фактори згортання крові. Стаття в журналі Nature детально описувала процес згортання крові, назвавши його каскадом коагуляції. На жаль, це лікування не було ефективним, оскільки ці продукти крові не мали достатньо факторів VIII або IX для зупинки серйозної внутрішньої кровотечі. Більшість хворих на важку гемофілію та деякі хворі на помірну або легку гемофілію помирали в дитинстві чи ранньому дорослому віці. Найпоширенішими причинами смерті були кровотечі в життєво важливих органах, особливо в головному мозку, і невелика кровотеча після операції або після травми. У тих, хто досяг повноліття, були серйозні деформації в суглобах через часті кровотечі. Гемофілія була однією з найболючіших хвороб через масивну кровотечу в суглоби та м'язи.

Першим великим проривом у лікуванні гемофілії став кріопреципітат, який був відкритий доктором Джудіт Пул у 1964 р. Доктор Пул виявила, що повільне розморожування замороженої плазми утворює осад, що містить FVIII. Це дозволило внутрішньовенно вводити більше фактора VIII у меншому обсязі. Вперше вдалося отримати достатню кількість фактора згортання крові

VIII для контролю сильної кровотечі, дозволяючи навіть хірургічні втручання. Кріопреципітат став широко доступним для пацієнтів з гемофілією А, а також для пацієнтів з хворобою фон Віллебранда та дефіцитом фібриногену або фактора XIII.

Наприкінці 1960-х рр. промисловість почала розробляти різні методи (часто включаючи кріопреципітацію) для відділення FVIII, а також FIX від об'єднаної плазми, що призвело до отримання концентрованих ліофілізованих препаратів FVIII або FIX.

Доступність цих продуктів повністю змінила життя хворих на гемофілію, які змогли проводити лікування вдома, стати незалежними від лікарень і мати кращу якість життя. На жаль, ці продукти, отримані від сотень донорів, об'єднаних для формування пулу плазми, відповідальні за передачу вірусів, що передаються через кров, таких як гепатит і ВІЛ.

У 1984 р. була клонована кДНК FVIII, що дозволило виробляти рекомбінантний FVIII задля уникнення можливих вірусних інфекцій. Це, безсумнівно, був другий великий прорив у лікуванні гемофілії А. Клінічні випробування на людях почалися через 3 роки, а в 1992 р. було ліцензовано перший продукт рекомбінантного фактора VIII (Recombinate), що стало революцією в лікуванні хворих на гемофілію, принісши більше безпеки та ефективності для пацієнтів.

У 2022 р. продукти гемостазу принесли дохід у розмірі 1650 млн доларів США, а до кінця 2033 року ринок, за оцінками, отримає дохід у розмірі 1734,2 млн доларів США завдяки зростанню на 5,1 % протягом прогнозованого періоду (2023-2033).

На сьогоднішній день на ринку гемостатиків доступні 5 типів рекомбінантних факторів згортання крові, тоді як інші 7 типів є продуктами, отриманими з плазми крові людини, серед рекомбінантних препаратів різними виробниками виробляються 12 рекомбінантних FVIII та 6 рекомбінантних FIX.

Відомо, що для повної біологічної зміни потрібна складна

посттрансляційна модифікація. активності кожного гемостатичного білка. Більше того, величезні відмінності в структурах цих факторів згортання створюють специфічні проблеми для їх подальшої обробки порівняно з антитілами, технологічний процес яких був добре налагоджений. На сьогодні лише тромбін (активованій фактор згортання крові II, FIIa), FVII, фактор крові VIII (FVIII), фактор IX (FIX) і фактор XIII (FXIII) мають ліцензовані рекомбінантні продукти, а перший гемостатичний фактор людини (TF, фактор III, FIII) знаходиться на II/III фазах клінічних досліджень. Таким чином, економічно ефективно виробництво рекомбінантних факторів згортання крові з високою активністю є важливою задачею промисловості, а враховуючи, що в Україні не налагоджено виробництво рекомбінантних факторів крові, то у даній роботі ми зупинимось на ґрунтовному аналізі технологій виробництва цієї групи препаратів, а саме rFVIII та rFIX.

Висновок до розділу 1

Від початку відкриття системи каскаду гемостазу продукти факторів згортання крові, виділені та очищені з плазми, стали використовуватись як засоби для контролю кровотечі. Але кількість факторів згортання крові в білках плазми людини занадто низька для виділення в достатній кількості. Крім того, виробництво продуктів факторів згортання крові, отриманих із плазми, суттєво залежить від постачання людської плазми, а інактивація вірусу в плазмі часто не є повною, що створює серйозний ризик зараження вірусом через використання продуктів, отриманих із плазми. Таким чином, виробництво та клінічне застосування терапевтичних продуктів факторів згортання крові, отриманих із плазми, серйозно обмежені в ресурсах та клінічних ризиках, тому у сучасній терапії застосовуються рекомбінантні фактори крові.

З моменту появи першого продукту на основі рекомбінантного фактору згортання (Recombinate®, рекомбінантний фактор згортання крові VIII

(rFVIII)) у 1992 р., який усував можливість вірусних інфекцій і забезпечував більшу безпеку та ефективність для пацієнтів, продукти з рекомбінантним фактором згортання крові стали вважається такими, що відповідають нагальній клінічній потребі, і стали однією із найбільших груп на фармацевтичному ринку.

Але, незважаючи на знання, отримані протягом більш ніж 25 років промислового виробництва, виробництво рекомбінантних факторів згортання крові все ще можна вважати викликом для промисловості, що обумовлює необхідність вдосконалення виробничих процесів для забезпечення економічно вигідного та ефективного лікування пацієнтів.

РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Об'єкти досліджень

Об'єктами роботи є фактори згортання крові. На рис. 2.1 зображено каскад факторів згортання крові у системі гемостазу.

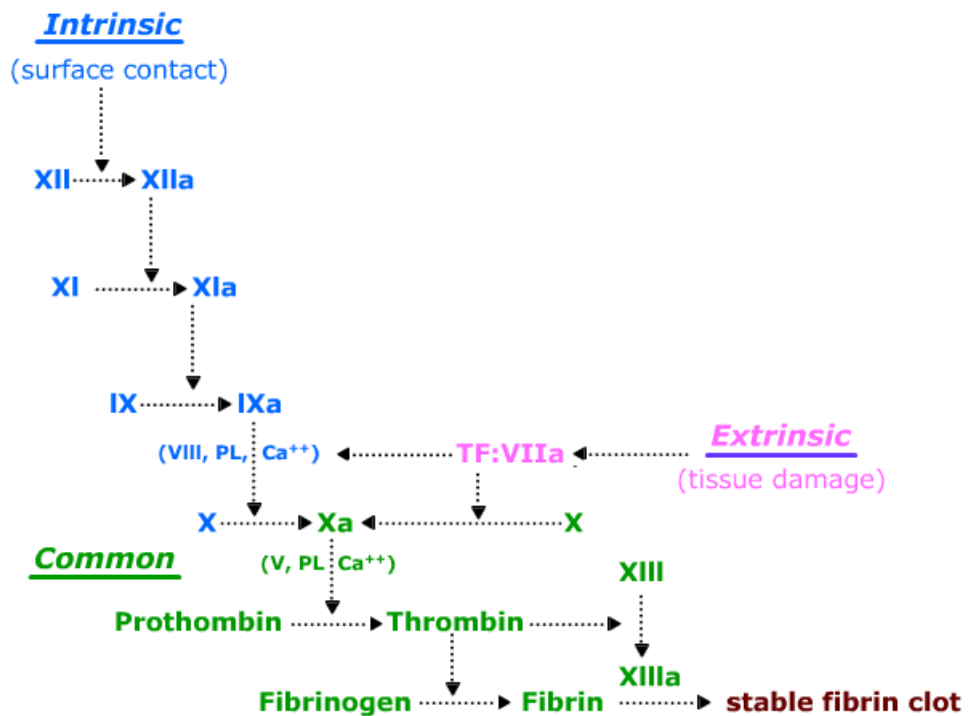


Рис. 2.1 - Каскад згортання крові:

I – фібриноген, II – протромбін, III – тканинний тромбопластин (тканинний фактор), IV – іонізований кальцій (Ca^{2+}), V – нестабільний фактор або проакцелерин, VI – відсутній, VII – стабільний фактор або проконвертин, VIII – антигемофільний фактор, IX – компонент плазмового тромбопластину, фактор Крістмаса, X – фактор Стюарта-Прауера, XI – плазмовий попередник тромбопластину, XII – фактор Хагемана, XIII – фібрин-стабілізуючий фактор, PL – фосфоліпід мембрани тромбоцитів, TF – тканинний фактор, (a) – активована форма.

Внутрішній шлях (контакт з поверхнею) – Синій

Зовнішній шлях (пошкодження тканин) – Фіолетовий

Спільний шлях (зелений)

(Джерело: <https://www.rnceus.com/coag/process21.html>)

Згортання крові - це третій етап гемостазу, який перетворює циркулюючі в крові речовини в нерозчинний гель. Гелеві пробки проникають у кровоносні судини та зупиняють втрату крові. Процес потребує факторів згортання крові,

кальцію та фосфоліпідів.

Якщо тромбоцитарної пробки недостатньо для зупинки кровотечі, тромбоцити виділяють гранули, які прилипають до білків у стінці судини. Тромбоцити дегранулюють і вивільняють АДФ, серотонін і тромбоксан А₂, що активує більше тромбоцитів. Тромбоцити також вивільняють активатори протромбіну, які каталізують циркулюючий протромбін, у тромбін. Реакція потребує іонізованого кальцію (Ca²⁺), який доступний у крові та з внутрішньоклітинних джерел. Тромбін сприяє перетворенню білка фібриногену у фібрин, утворюючи мережу зчеплених волокон і каркас для згустку. Тромбоцити в тромбі починають скорочуватися, стискаючи тромб і зближуючи стінки судин, починаючи процес загоєння рани. Фосфоліпіди є важливими компонентами клітинних і тромбоцитарних мембран. Вони забезпечують поверхню, на якій можуть відбуватися хімічні реакції коагуляції. Печінка виробляє фактори згортання крові (білки).

Будь-який з двох різних шляхів може ініціювати коагуляцію. Внутрішній шлях ініціюється подіями, які відбуваються в просвіті кровоносних судин. Для внутрішнього шляху потрібні лише елементи (фактори згортання крові, Ca²⁺, поверхня тромбоцитів тощо), які знаходяться всередині судинної системи. Зовнішній шлях є іншим шляхом згортання. Для цього потрібен тканинний фактор (тканинний тромбопластин), речовина, яка є «зовнішньою» або зазвичай не циркулює в судинах. Тканинний фактор виділяється, коли стінка судини розривається.

У табл. 2.1 наведено загальну характеристику всіх факторів крові.

Таблиця 2.1 – Характеристика факторів крові

Фактор	Назва	Джерело	Шлях	Опис	Функція
I	Фібриноген	Печінка	Спільний	Плазмовий глікопротеїн; Молекулярна маса - 340 кДа	Адгезивний білок, що сприяє утворенню фібринового згустку
II	Протромбін	Печінка	Спільний	Вітамін К-залежна серинова протеаза; молекулярна маса 72 кДа	Присутній в активованій формі та є основним ферментом коагуляції
III	Тканинний фактор	Секретується пошкодженими клітинами та тромбоцитами	Зовнішній та внутрішній	Відомий як тромбопластин; молекулярна маса - 37 кДа	Ліпопротеїновий ініціатор зовнішнього шляху коагуляції
IV	Іони кальцію	Кістки і кишечник	Весь процес	Необхідний для зв'язування факторів коагуляції з фосфоліпідами (формально відомий як фактор IV)	Металевий катіон, що важливий у механізмах коагуляції
V	Проакцелерин (лабільний фактор)	Печінка і тромбоцити	Внутрішній і загальний	Молекулярна маса - 330 кДа	Кофактор для активації протромбіну до тромбіну (комплекс протромбінази)
VII	Проконвертин (стабільний фактор)	Печінка	Зовнішній	Вітамін К-залежна серинова протеаза, молекулярна маса - 50 кДа;	Ініціює зовнішній шлях із тканинним фактором, активує фактори IX та X
VIII	Антигемофільний фактор A (кофактор)	Тромбоцити і ендотелій	Внутрішній	молекулярна маса - 330 кДа	Кофактор для активації фактора X у внутрішньому шляху (утворення теназного комплексу)
IX	Фактор Крістмаса / Антигемофільний B	Печінка	Внутрішній	Вітамін К-залежна серинова протеаза, молекулярна маса - 50 кДа;	Активована форма – фермент внутрішнього шляху активації фактора X (формує теназний комплекс з фактором VIII)
X	Фактор Стюарта-Прауера (фермент)	Печінка	Внутрішній і загальний	Вітамін К-залежна серинова протеаза, молекулярна маса - 58,9 кДа;	Активована форма – фермент фінальної фази коагуляції, активує протромбін (формує протромбіназний комплекс з фактором V)
XI	Плазмовий тромбопластиновий антецедент	Печінка	Внутрішній	Серинова протеаза, молекулярна	Активация внутрішнього шляху коагуляції

				маса - 160 кДа;	фактора IX
XII	Фактор Хагемана	Печінка	Внутрішній (активує плазмін)	Серинова протеаза, молекулярна маса -80 кДа;	Ініціює активований частковий тромбопластиновий час; активує фактори XI, VII та прекалікреїн
XIII	Фактор стабілізації фібрину	Печінка	Затримує фібриноліз	Зшиває фібрин, молекулярна маса - 320 кДа;	Трансамідаза, що зшиває фібриновий згусток

Варто зазначити, що існують «альтернативні» шляхи активації факторів згортання. Наприклад, фактор VIIa зовнішньої системи разом із тканинним тромбопластином можуть активувати фактор IX внутрішньої системи. Через це дефіцит факторів VIII або IX викликає значно тяжчі кровотечі, ніж нестача факторів XI або XII, оскільки у другому випадку фактор IX може активуватися під впливом фактора VIIa. Також фактор VII може активуватися продуктами розщеплення фактора XI або фактором IXa внутрішньої системи. Тому у даній роботі зупинимось на ґрунтовному аналізі технологій виробництва саме цих двох факторів крові - FVIII, FIX та технологіях отримання їхніх рекомбінантних аналогів - rFVIII, rFIX.

Фактор крові VIII (FVIII). Фактор VIII був уперше відкритий у 1937 р., але лише у 1979 р. його очищення Едвардом Тадденхемом, Френсіс Ротблат і співробітниками привело до молекулярної ідентифікації білка.

Фактор згортання крові VIII (антигемофільний глобулін) є білком β -глобулінової природи, який утворює комплекс із фактором Віллебранда, синтезованим у клітинах ендотелію та печінки. Він відіграє ключову роль у процесах згортання крові. У людини він кодується геном F8. FVIII вперше був охарактеризований у 1984 р. вченими Genentech. Ген фактора VIII розташований на X-хромосомі (Xq28) (рис. 2.2).

У разі відсутності FVIII розвивається гемофілія А, X-зчеплений розлад кровотечі. Як препарат FVIII входить до списку основних лікарських засобів BOOЗ (WHO Model List of Essential Medicines).

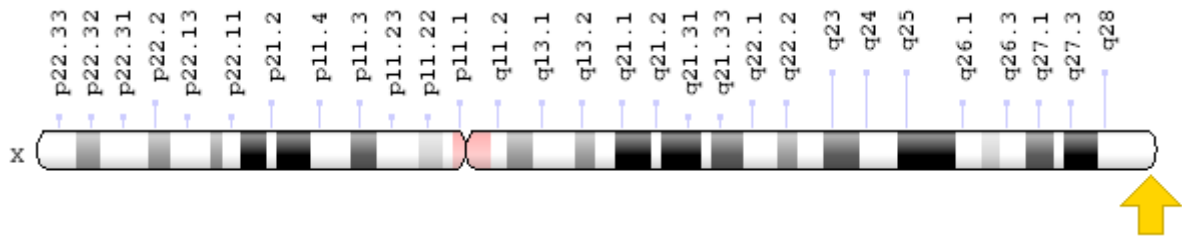


Рис. 2.2 - У людини ген F8 розташований на X-хромосомі в позиції q28
(Джерело: Hemophilia A and Induced Pluripotent Stem Cells, Nelwan M., 2017)

Фактор VIII (FVIII) виробляється в синусоїдальних клітинах печінки та ендотеліальних клітинах за межами печінки по всьому тілу. Цей білок циркулює в кровотоці в неактивній формі, зв'язаний з іншою молекулою, що називається фактором фон Віллебранда, доки не станеться травма, яка пошкодить кровоносні судини. У відповідь на травму фактор згортання крові VIII активується та відділяється від фактора фон Віллебранда. Активний білок (іноді його записують як фактор згортання крові VIIIa) взаємодіє з іншим фактором згортання крові, який називається фактором IX. Ця взаємодія запускає ланцюг додаткових хімічних реакцій, які утворюють тромб. Активація фактора VIII відбувається зовнішнім шляхом за участю тромбіну та іонів Ca^{2+} шляхом відщеплення від фактора Віллебранда. Його основна функція полягає у протеолізі фактора X, що здійснюється за участю фактора IX. Цей процес активації фактора X відомий як теназна реакція.

Фактор VIII - це великий глікопротеїн плазми крові з 2332 амінокислот, організованих у шість доменів, позначених як: A1-A2-B-A3-C1-C2 (рис. 2.3). Три домени A є гомологічними церулоплазміну, домен B є унікальним, а два дискоїдиноподібні домени C, зв'язуються з фосфоліпідними мембранами. Фактор VIII, отриманий із очищеної плазми, існує як суміш гетеродимерів важкого ланцюга (heavy chain, HC), що складається з доменів A1-A2 і частин домену B, і легкого ланцюга (light chain, LC) доменів A1-C1-C2. LC і HC нековалентно пов'язані через двовалентні іони Ca^{2+} . Фактор VIII активується тромбіном, що призводить до розщеплення всього B-домену, видалення N-кінцевого кислого домену легкого ланцюга LC і розділення доменів A2 і A1 важкого ланцюга HC. Активований FVIII (FVIIIa) є гетеротримером, що

складається з нековалентно пов'язаних доменів A1, A2 і легкого ланцюга LC. A1 і LC зберігають залежний від іонів металу зв'язок через домени A1-A3. Зв'язок між доменами A2 і A1 опосередковується виключно гідрофобними та електростатичними взаємодіями. Фактор VIIIa є кінетично нестабільним із періодом напіврозпаду приблизно 6 хвилин *in vitro*, оскільки домен A2 лише слабо приєднаний до решти молекули ($K_d \sim 500$ мкМ) і спонтанно дисоціює. Зв'язування FVIII з мембраною здійснюється через LC і, зокрема, через домени C. Домени A2 і A3 містять основні сайти зв'язування FIXa.

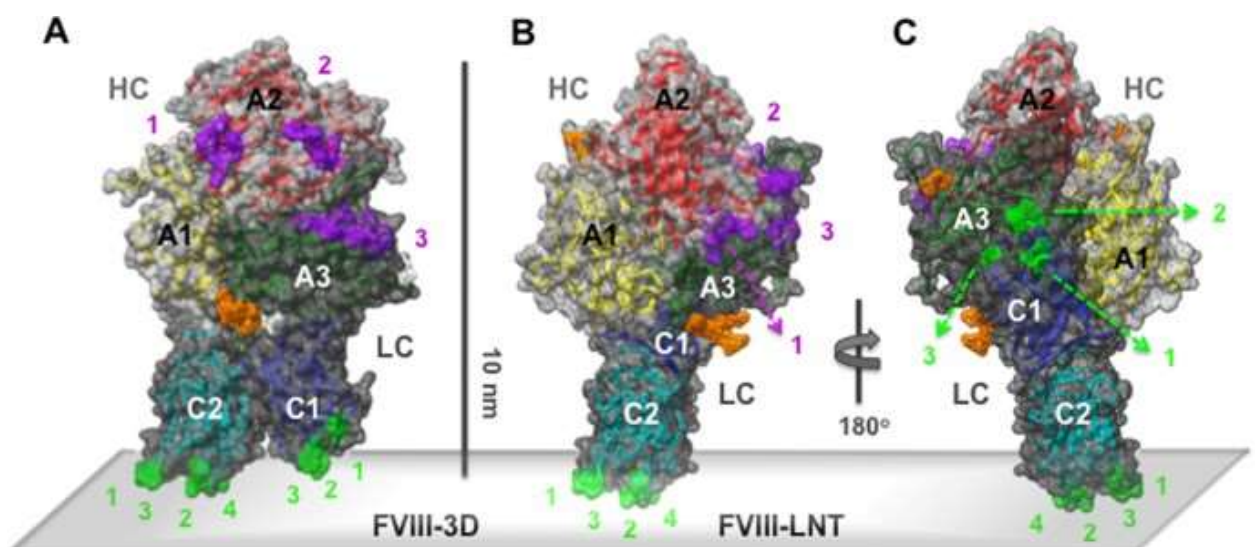


Рис. 2.3 - Поверхнева та стрічкова презентація структури фактора VIII, організованої у тривимірних та мембранних спіральних кристалах:

А. FVIII-3D: кристалічна структура FVIII, організована як тривимірний кристал у розчині.

В. FVIII-LNT: Структура FVIII, організована у зв'язаному мембраною спіральному кристалі. Легкий ланцюг FVIII (LC) показаний темно-сірим кольором, а важкий ланцюг (HC) – світло-сірою поверхнею. Домени FVIII позначені кольором і показані стрічками:

A1 - жовтий, A2 - червоний, A3 - зелений, C1 - темно-синій, C2 - світло-блакитний.

Поверхня мембрани зображена у вигляді світло-сірого паралелепіпеда. Залишки домену FVIII-C1: Ile2158-Arg2159 (1), Lys2092-Phe2093 (2), Ile2059 (3) і залишки домену FVIII-C2: Met119-Phe2200 (1), Leu2251-2252 (2), Val2223 (3) і His2315 (4), які є частиною інтерфейсу FVIII - мембрана показаний зеленою поверхнею. Залишки домену FVIII-A2: Arg 562 (1) і Lys713 (2) і з домену FVIII-A3: Lys1818 (3) частина інтерфейсу FVIIIa-FIXa і відповідні петлі показані як фіолетова поверхня. Залишки цукру NAG: 2234, 2335 і MAN: 2336, 2337, 2338, розділені на межі доменів C1-A3, показані помаранчевою поверхнею.

Обидві структури представлені доменом C2, орієнтованим однаково до мембрани.

Структура FVIII-LNT повернута на 180° від В. навколо осі у (перпендикулярно до поверхні мембрани), показуючи положення домену C1 відповідно до домену C2 у конформації, зв'язаній з мембраною. Масштабна шкала становить 100 Å.

(Джерело: Dimeric Organization of Blood Coagulation Factor VIII bound to Lipid Nanotubes, D. Dalm et al., 2015)

Фактор крові IX (FIX). Фактор IX (EC 3.4.21.22), також відомий як фактор Крістмаса, є однією з серинових протеаз, які беруть участь у згортанні крові; він належить до сімейства пептидаз S1. Дефіцит цього білка викликає гемофілію В.

Це було виявлено у 1952 р. після того, як у хлопчика на ім'я Стівен Крістмас було виявлено відсутність саме цього фактора, що призвело до гемофілії. Як і FVIII FIX входить до списку основних лікарських засобів ВООЗ (WHO Model List of Essential Medicines).

Фактор IX виробляється як зимоген, неактивний попередник. Він обробляється для видалення сигнального пептиду, глікозилюється, а потім розщеплюється фактором XIa (контактний шлях) або фактором VIIa (шлях тканинного фактора) для отримання дволанцюгової форми, де ланцюги з'єднані дисульфідним містком. При активації у фактор IXa , у присутності Ca^{2+} , мембранних фосфоліпідів і кофактора фактора VIII, він гідролізує один аргінін - ізолейциновий зв'язок у факторі X з утворенням фактора Ха.

Білок фактора IX складається з чотирьох білкових доменів: домену Gla, двох тандемних копій домену EGF і С-кінцевого трипсиноподібного домену пептидази, який здійснює каталітичне розщеплення. Показано, що N-кінцевий домен EGF принаймні частково відповідає за зв'язуючий фактор тканини, залишки від 88 до 109 другого домену EGF опосередковують зв'язування з тромбоцитами та збирання комплексу, що активує фактор X (рис. 2.4).

Розкрито структури всіх чотирьох доменів. Для білка свині була визначена структура двох доменів EGF і трипсиноподібного домену. Структура домену Gla, який відповідає за Ca(II) -залежне зв'язування фосфоліпідів, також була визначена за допомогою ЯМР.

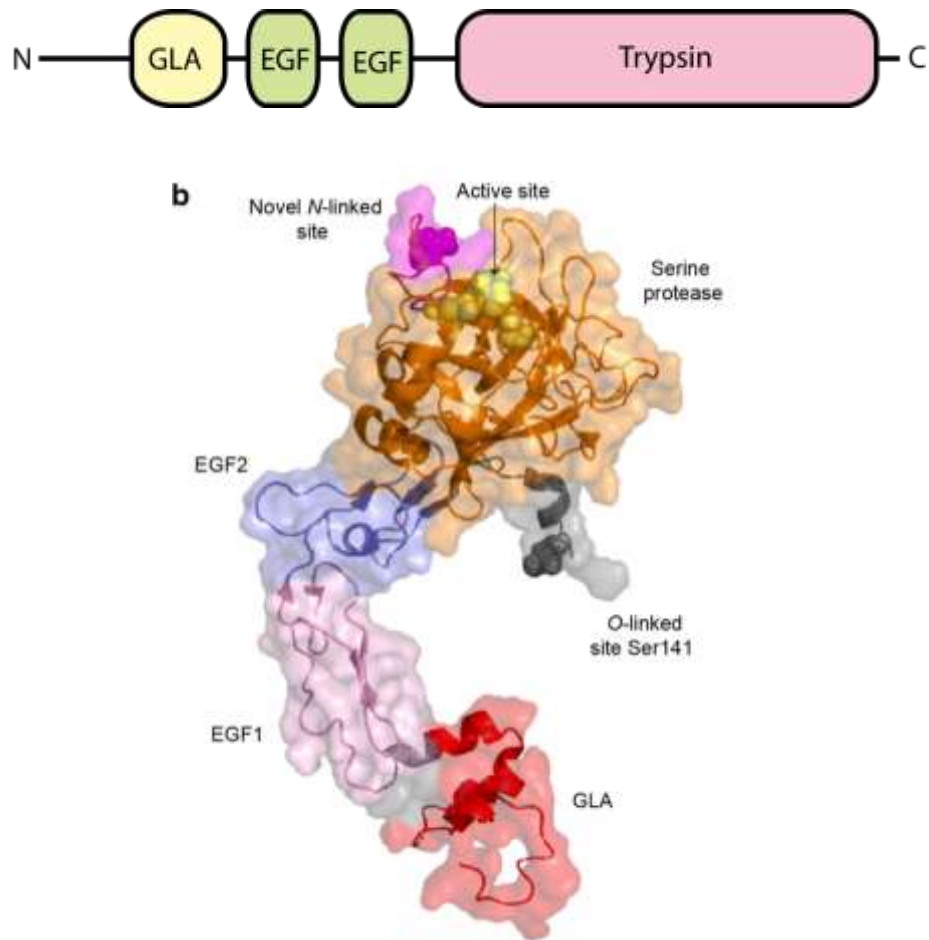


Рис. 2.4 - Структура фактора IX

(Джерело: Identification of novel glycosylation events on human serum-derived factor IX, Pegg C.L. et al., 2020)

Оскільки ген фактора IX розташований у Х-хромосомі (Xq27.1-q27.2), його мутації з втратою функції є рецесивними, зчепленими з Х-хромосою: чоловіки відчувають фенотип захворювання набагато частіше, ніж жінки. Було виявлено щонайменше 534 хвороботворні мутації в цьому гені. Ген F9 вперше був клонований у 1982 році Котоку Курачі та Ерлом Деві.

Поллі, трансгенна клонована вівця породи Полл Дорсет, що несе ген фактора IX, була виведена доктором Яном Вілмутом в Інституті Росліна в 1997 році.

2.2 Методи досліджень

Використано методи описового та аналітичного дослідження -

проаналізовані літературні і доступні в Інтернеті джерела. У роботі проведено аналіз технологій виробництва рекомбінантних факторів крові на основі даних з відкритих джерел літератури та офіційних джерел, зокрема: U.S. Food and Drug Administration (FDA), European Medicines Agency (EMA), Державний реєстр лікарських засобів України, Ліки Контроль, Державний експертний центр Міністерства охорони здоров'я України, Державне підприємство «Медичні Закупівлі України».

Висновок до розділу 2

Серед факторів крові, що реалізують каскад реакцій згортання крові, зупинились на FVIII та FIX, нестача яких призводить до гемофілії А та В. Основним варіантом лікування пацієнтів з гемофілією А та В є введення рекомбінантних факторів згортання крові за потребою або з метою профілактики. У цьому розділі визначено об'єкти роботи та надано їх характеристику – природних факторів крові FVIII та FIX, також визначено методи дослідження, що включають методи описового та аналітичного дослідження.

РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

3.1 Загальна характеристика технологій отримання рекомбінантних факторів крові

Гемофілія А і В є Х-зчепленими розладами кровотечі, що виникають внаслідок дефіциту факторів коагуляції VIII (FVIII) і IX (FIX) відповідно. Гемофілія А зустрічається в 1 з 5000, а гемофілія В у 1 з 30 000 чоловіків.

Сучасне лікування гемофілії А і В почалося в 1950-х і на початку 1960-х рр., коли з'явилася можливість лікувати епізоди кровотечі за допомогою вливань цільної крові та свіжої плазми. Але лише виявлення кріопреципітату у 1964 р. Джудіт Грем Пул дозволило вводити достатню кількість FVIII у відносно невеликих обсягах для ефективного контролю кровотечі та зробити хірургічне втручання можливим для таких хворих. Подальший розвиток, що призвів до виробництва концентратів FVIII і факторів протромбінового комплексу (містять FIX), які можна було відновити в невеликих кількостях рідини, дозволив лікування в домашніх умовах і привів до впровадження профілактичних схем заміни факторів. Сьогодні концентрати факторів, отримані з плазми, і концентрати рекомбінантних факторів, отримані за допомогою генної інженерії, дозволяють лікувати гемофілію без ризику передачі інфекційних агентів.

Рекомбінантні фактори класифікують за розвитком технологій виробництва на 4 покоління:

I покоління: містять білки людини або тварин як у культуральному середовищі, так і в кінцевому продукті. Для їх виробництва застосовують клітинні культури, до яких додають білки тварин або людини. Кінцевий продукт також містить людський альбумін як стабілізатор. Перший препарат цього покоління - rFVIII (Recombinate®, Baxter Healthcare, Австрія), ліцензований у 1992 р.

II покоління: містять білки лише в культуральному середовищі, але не в

кінцевому продукті. Як стабілізатори використовують сахарозу, гліцин, гістидин і кальцій. Виробництво включає сольвент-детергентний метод для вірусної інактивації. До цього покоління належать, наприклад, препарати rFVIII (Kogenate®FS, Bayer, Німеччина).

III покоління: повністю позбавлені білків як у культуральному середовищі, так і в кінцевому продукті. Альбумін замінений на синтетичні пептиди, введено додаткові етапи очищення, такі як нанофільтрація (розмір пор 15–25 нм), що ефективно видаляє ретровіруси. До таких препаратів належить ReFacto AF® (Pfizer, США).

Препарати I–III поколінь відносяться до продуктів зі стандартним періодом напіввиведення (сумірний із природним фактором крові). Проте необхідність частого введення (через день або тричі на тиждень) створює незручності для пацієнтів. Це стало стимулом для розробки *IV покоління* з подовженим періодом напіввиведення, наприклад, Eloctate® (Biogen Idec, Швейцарія) і Adynovate® (Takeda, Японія).

Особливостями розвитку технологій виробництва рекомбінантних факторів крові є: вдосконалення клітинних ліній, досягнення людського профілю глікозилювання, вдосконалення процесів очищення, подовження періоду напіввиведення препаратів.

Клітинні лінії: для синтезу рекомбінантних факторів використовують клітини яєчника китайського хом'яка (CHO) або клітини нирки новонародженого хом'яка (ВНК). Вони секретують фактор крові у культуральне середовище, яке проходить багатоетапне очищення (іонообмінна, гель-проникна, афінна хроматографія). Але на сьогодні важливим питанням в лікуванні гемофілії залишається ризик розвитку нейтралізуючих алоантитіл (інгібіторів; зустрічаються до 40% пацієнтів з важкою гемофілією А та приблизно у 3% пацієнтів з важкою гемофілією В). Для вирішення проблеми утворення імунногенності виробниками пропонується перехід на клітинні лінії людини, прикладом яких є лінія Нек-293 (ембріональні ниркові клітини людини, Human Embryonic Kidney cells).

Глікозилювання: фактори крові синтезуються із профілем глікозилювання, ідентичним людському. Це знижує імуногенність і покращує ефективність. Для досягнення людського профілю глікозилювання компанія Octapharma AG розробила перший rFVIII, експресований у клітинах людини (Hek293) - Nuwiq® (схвалений FDA у 2015 році).

Процеси очищення: Виробництво включає багатоступеневе очищення та етапи вірусної інактивації, що забезпечує безпечність продукту.

Завдяки розвитку технологій на сьогодні спостерігається розширення асортименту препаратів факторів крові людини.

Препарати rFVIII: Виведено 12 комерційних препаратів, серед яких Recombinate® (Рекомбінат, Baxter Healthcare, Австрія), ReFacto AF® (Рефакто АФ, Genetics Institute, США), Kogenate®FS (Коджинейт Байер, Bayer Corp., Німеччина).

Препарати rFIX: Ліцензовано 6 препаратів, зокрема Alprolix® (Bioverativ, США), BeneFix® (Pfizer, США), Idelvion® (CSL Behring, Швейцарія).

rFVIIa: NovoSeven® (Novo Nordisk, Данія).

Також слід відмітити і розвиток альтернативних терапій при лікуванні порушень синтезу факторів крові, зокрема застосування моноклональних антитіл (Hemlibra® (еміцизумаб, Roche, Швейцарія) та розвиток генної терапії (у 2022 р. були схвалені Roctavian™ (BioMarin, США) для лікування гемофілії А та Hemgenix (CSL Behring, Швейцарія) для лікування гемофілії В).

Таким чином технології виробництва рекомбінантних факторів крові продовжують розвиватися, сприяючи зручності та ефективності лікування пацієнтів.

3.2 Характеристика препаратів рекомбінантних факторів крові VIII (rFVIII) та IX (rFIX)

3.2.1 Рекомбінантний фактор крові VIII (rFVIII)

Перший рекомбінантний фактор коагуляції VIII, Recombinate®, був випущений у 1992 році Інститутом генетики (Genetics Institute) та Baxter Healthcare Corporation, Hyland Division. Kogenate® від Bayer Healthcare Pharmaceuticals був випущений через кілька місяців, у 1993 році. Обидва продукти були розроблені з використанням білків тваринного походження в середовищі клітинної культури та людського сироваткового альбуміну в кінцевому продукті, розглядаючись як продукти першого покоління. Ризик впливу трансмісивних збудників (безоболочкові віруси, гепатит А та парвовірус В19, збудник Крейтцфельда–Якоба та його варіанти або ще невідомі збудники) призвело до розробки продуктів другого покоління, у яких культуральне середовище було доповнене білками людського походження замість білків тваринного походження (фетальна сироватка великої рогатої худоби) і альбумін не додавали до остаточної формули. У цьому випадку були використані нові технології для стабілізації молекули FVIII, наприклад, із сахарозою та трегалозою. У таблиці 3.1 наведено перелік рекомбінантних продуктів на основі FVIII, які вийшли на ринок з 1992 року, а також основні характеристики кожного з них.

До продуктів третього покоління відносяться ті, в яких не використовуються ні тваринні, ні людські білки для культивування та очищення клітин. Деякі дослідження показали, що пацієнти, які отримували препарати rFVIII другого покоління, мали вищий ризик розвитку інгібіторів порівняно з препаратами третього покоління. Інгібітор FVIII - це імуноглобулін G (IgG), який виробляє пацієнт і має високу поліклональну спорідненість проти білка FVIII. Інгібіторні антитіла зазвичай спрямовані проти A2, A3 і C2 доменів FVIII. Зв'язування інгібітора в цих доменах призводить до стеричної блокади функціональних епітопів FVIII.

Механізми, пов'язані з цим різним інгібітором, залишаються неясними та не були з'ясовані дослідженнями. Однак не виключено, що зміни у виробничому процесі можуть призвести до зміни імуногенності продукту. Незважаючи на передбачуваний нижчий ризик розвитку інгібіторів, у деяких продуктах третього покоління під час подальшої обробки (афінна хроматографія) використовуються МкАТ мишачого походження. Незважаючи на ефективність, використаної афінної очистки мишачих МкАТ у виробничому процесі може збільшити ймовірність антигенності під час інфузії продукту пацієнтам, оскільки залишкові МкАТ можуть бути присутніми в стоках через вимивання з опорної матриці, яка використовується під час хроматографії. Крім того, існує більша вартість очищення на основі моноклональних антитіл і проблеми, пов'язані зі стабільністю, оскільки сайт зв'язування антитіла може не піддаватися суворим умовам, необхідним для дезінфекції колонки. Останні схвалені продукти rFVIII (Eloctate®, Nuwiq®, Kovaltry®) використовують рекомбінантні білки, вироблені в *S. cerevisiae*, як афінний ліганд або пептиди, щоб уникнути перерахованих вище недоліків. Використання пептиду замість МкАТ для афінної хроматографії може принести як переваги також вищу ефективність і вибірковість.

Незважаючи на якість препаратів rFVIII третього покоління з точки зору ефективності та безпеки, лікування цими продуктами все ще обмежене через короткий період напіввиведення (8-12 годин), що вимагає ін'єкцій 3 рази на тиждень або через день для профілактики та лікування. Ця ситуація пов'язана з відсутністю повного захисту та вищі витрати на лікування через обмежене дотримання пацієнтами режиму профілактики. Продукти з подовженим періодом напіввиведення, такі як Eloctate® і Adynovate®, мають перевагу зменшуючи частоту введення, тим самим покращуючи комплаєнс пацієнтів і збільшуючи проміжок часу без кровотечі у пацієнтів. Eloctate був розроблений шляхом злиття димерних доменів CH2–CH3 людського IgG1 з рекомбінантним FVIII із видаленим доменом В. У клінічних випробуваннях Eloctate® показав 1,5-кратний подовжений період напіврозпаду, а також

меншу річну частоту кровотечі порівняно з його незлитим аналогом, без явної імуногенності. Adynovate® був розроблений за технологією пегіляції з рекомбінантного повнорозмірного FVIII Advate®. Період напіврозпаду був збільшений у приматів у 1,8 рази порівняно з непегільованим продуктом (Advate®). У I фазі клінічного випробування період напіврозпаду Adynovate® був у 1,4–1,5 рази вищим порівняно з Advate®. До теперішнього часу не було повідомлено про чітке підвищення частоти інгібіторів FVIII для пегільованих продуктів rFVIII. Дійсно, було показано, що пегілювання знижує імуногенність рекомбінантних білків після введення тваринам у порівнянні з непегільованими аналогами. Деякі автори вважають ці продукти з подовженим періодом напіврозпаду продуктами четвертого покоління.

Новою терапевтичною альтернативою для пацієнтів з інгібітором є гуманізоване біспецифічне антитіло, яке зв'язується з активованим фактором IX (фактор IXa) і сполучає фактор X, таким чином діючи як фактор-міметик VIII. Еміцізумаб має унікальну структуру та на нього не впливають інгібітори фактора VIII. Більше того, результати клінічних випробувань показали, що цей продукт є безпечним, і щотижневе підшкірне введення може зменшити або запобігти епізодам кровотечі у пацієнтів з важкою гемофілією А з або без інгібіторів фактора VIII.

Таблиця 3.1 – Характеристика препаратів рекомбінантних факторів VIII (rFVIII)

Продукт	Виробник	Покоління	Клітинна лінія	Основні характеристики	Рік затвердження
Recombinate® (також продається як Bioclate® компанією Aventis Behring)	Genetics Insitute/Baxter (на сьогодні Shire-Baxalta)	1	CHO	Повна версія. mAb (мишачі гібридами) – афінна хроматографія. Людський альбумін як стабілізатор. Період напіврозпаду $t_{1/2}$ - 14,6 год	1992, FDA
Kogenate® (також	Bayer	1	ВНК	Повна версія. mAb (мишачі	1993, FDA

продається як Helixate® компанією Aventis-Behring)				гібридами) – афінна хроматографія. Людський альбумін як стабілізатор. Період напіврозпаду $t_{1/2}$ - 12 год	
Refacto®	Wyeth	2	CHO	Делетований В-домен. mAb (мишачі гібридами) – афінна хроматографія. Сахароза як стабілізатор. Період напіврозпаду $t_{1/2}$ - 14,8 год	1998, EMA 2000, FDA
Kogenate® FS (також продається як Helixate® FS компанією Aventis-Behring)	Bayer	2	ВНК	Повна версія. mAb (мишачі гібридами) – афінна хроматографія. Сахароза як стабілізатор. Період напіврозпаду $t_{1/2}$ - 12 год	2000, FDA
Advate®	Bayer	3	CHO	Повна версія. mAb (мишачі гібридами) – афінна хроматографія. Трегалоза та манітол як стабілізатор. Період напіврозпаду $t_{1/2}$ - 13 год	2004, EMA 2007, FDA
Refacto® AF (також проється як Xyntha поза ЄС)	Pfizer	3	CHO	Делетований В-домен. спорідненість на основі поліпептидного ліганду хроматографія. Сахароза як стабілізатор. Період напіврозпаду $t_{1/2}$	2008, FDA

Novoeight®	Novo Nordisk	3	CHO	- 11-12 год Делетований В-домен. mAb (мишачі гібридоми) – афінна хроматографія. Сахароза як стабілізатор. Період напіврозпаду $t_{1/2}$ - 11-12 год	2013, ЕМА
Adynovate® (у ЄС як Adynovi®)	Shire-Baxalta	3	CHO	Повна версія, пегильований. mAb (мишачі гібридоми) – афінна хроматографія. Трегалоза і манітол як стабілізатор. Період напіврозпаду $t_{1/2}$ - 13,4-14,7 год	2015, FDA 2018, ЕМА
Afstyla®	CSL Behring	3	CHO	Усічений одноланцюговий білок В-домену. mAb (мишачі гібридоми) – афінна хроматографія. Сахароза як стабілізатор. Період напіврозпаду $t_{1/2}$ - 14,2-14,3 год	2016, FDA
Eloctate® (у ЄС Elocta®)	Biogen Idec	4	Hek-293	Злитий білок FVIII-Fc з видаленням В-доменом (IgG1). Рекомбінантний білок (утворений у <i>S. cerevisiae</i>) - афінна хроматографія. Сахароза як стабілізатор. Період напіврозпаду $t_{1/2}$ - 19 год	2014, FDA 2015, ЕМА
Nuwiq®	Octapharma AG	4	Hek-293	Делетований В-домен.	2014, ЕМА 2015, FDA

				Рекомбінантний Ab фрагмент (утворений в <i>S. cerevisiae</i>) - афінна хроматографія. Сахароза як стабілізатор. Період напіврозпаду $t_{1/2}$ - 15 год	
Kovaltry®	Bayer	3	BHK expressing HSP 70	Повна версія. Пептидний ліганд - афінна хроматографія. Сахароза як стабілізатор. Період напіврозпаду $t_{1/2}$ - 13-14 год	2016, FDA

Примітки:

Клітинні лінії: CHO – клітини яєчника китайського хом'яка, Chinese Hamster Ovary cells; BHK – ниркові клітини дитинчат хом'яка, Baby Hamster Kidney cells; Hek-293 - Ембріональні ниркові клітини людини, Human Embryonic Kidney cells; BHK expressing HSP 70 – heat shock protein 70, лінія, що експресує білки теплового шоку.

3.2.2 Рекомбінантний фактор крові IX (rFIX)

Незважаючи на те, що рекомбінантний FIX менший і менш складний, ніж FVIII (415 амінокислот, одноланцюгова молекула), як білок, залежний від вітаміну К, він потребує, окрім звичайної посттрансляційної модифікації, звичайної для глікопротеїнів, гамма-карбоксилювання та протеолітичної обробки за допомогою PACE/Furin (Paired Basic Amino acid Cleaving Enzyme) для ефективної експресії білка.

У таблиці 3.2 наведено перелік рекомбінантних продуктів на основі FIX, а також основні характеристики кожного з них.

Таблиця 3.2 – Характеристика препаратів рекомбінантних факторів IX (rFIX)

Продукт	Виробник	Покоління	Клітинна лінія	Основні характеристики	Рік затвердження
BeneFIX®	Pfizer	3	CHO	Молекула з поліморфізмом Ala-148. Хроматографія	1997, FDA

				без mAb. Сахароза як стабілізатор. Період напіврозпаду $t_{1/2}$ - 18,8 год	
Rixubis®	Baxter/Baxalta	3	CHO	Молекула з поліморфізмом Ala-148. Хроматографія без mAb. Манітол/ Сахароза як стабілізатор. Період напіврозпаду $t_{1/2}$ - 25,4-26,7 год	2013, FDA
Alprolix®	Biogen Idec	4	HEK-293	Злитий білок rFIX-IgG1 Fc. Афінна хроматографія з протеїном А. Манітол/ Сахароза як стабілізатор. Період напіврозпаду $t_{1/2}$ - 82,1 год	2014, FDA
Ixinity®	Emergent Biosolutions	3	CHO	Молекула з поліморфізмом Thr-148. Хроматографія без mAb. Манітол/ Тригалоza як стабілізатор. Період напіврозпаду $t_{1/2}$ - 24 год	2015, FDA
Idelvion®	CSL Behring	3	CHO	Злитий білок rFIX-IgG1 Fc. Манітол/ Сахароза як стабілізатор. Період напіврозпаду $t_{1/2}$ - 92-94,8 год	2016, FDA

Примітки:

Клітинні лінії: CHO – клітини яєчника китайського хом'яка, Chinese Hamster Ovary cells; Hek-293 - Ембріональні ниркові клітини людини, Human Embryonic Kidney cells.

Перший комерційний продукт, BeneFIX®, був випущений через кілька років після продуктів rFVIII, у 1997 році Pfizer, і протягом багатьох років це був єдиний рекомбінантний продукт rFIX, доступний для лікування гемофілії В. З моменту розробки під час виробництва не використовувалися білки тваринного чи людського походження, оскільки Rixubis® є найранішим рекомбінантним фактором згортання крові третього покоління. Rixubis® і Ixinity®, затверджені в 2013 і 2015 роках відповідно, також є рекомбінантними продуктами третього покоління, виробленими в клітинних лініях CHO. Ixinity®, на відміну від інших рекомбінантних продуктів FIX, що містять поліморфізм Ala-148, має первинну амінокислотну послідовність з переважаючим поліморфізмом Thr-148. У FIX, отриманому з плазми, можна знайти обидва варіанти.

Гемофілія В, як і гемофілія А, потребує постійних інфузій для профілактики та лікування, що також призводить до утворення продуктів з довгим періодом напіврозпаду. Alprolix® від Biogen, створений прямим злиттям (без лінкерної області) мономерного домену Fc людського IgG1 з карбоксильним кінцем людського FIX (rFIXFc), був першим, розробленим у цій категорії, і був схвалений FDA у 2014 році. Alprolix® продемонстрував 3-4-кратне подовження кінцевого періоду напіврозпаду в доклінічних дослідженнях (миші, щури, собаки та мавпи) і 3-кратне подовження у клінічних дослідженнях фази I-II. У дослідженні фази III період напіввиведення склав 82,1 години, що відповідає введенню кожні 1–2 тижні. Оскільки Alprolix® виробляється в клітинній лінії людини Hek 293, він можна вважати продуктом четвертого покоління, як і продукти rFVIII Eloctate® і Nuwivq®.

Idelvion® від CSL Behring - ще один продукт у цій категорії, схвалений FDA. Цей продукт був розроблений шляхом злиття rFIX з рекомбінантним альбуміном. Під час клінічних досліджень Idelvion® демонстрував приблизно 5-кратне збільшення періоду напіввиведення порівняно з отриманим із плазми та іншим рекомбінантним продуктом FIX ($t_{1/2}$ - 92–94,8 год). Цей збільшений

період напіввиведення може призвести до подовження інтервалу дозування від кожних 3–4 днів (звичайні продукти rFIX) до кожних 14 днів.

3.3. Методи подовження періоду напіврозпаду препаратів rFVIII і rFIX

Незважаючи на постійне вдосконалення технологій отримання рекомбінантних факторів крові, на сьогодні важливими питаннями в лікуванні гемофілії залишаються ризик розвитку нейтралізуючих алоантитіл (інгібіторів; зустрічаються до 40% пацієнтів з важкою гемофілією А та приблизно у 3% пацієнтів з важкою гемофілією В) і обмеженість у зручному лікуванні для пацієнтів через необхідність періодичних внутрішньовенних ін'єкцій для підтримки рівня FVIII або FIX у безпечному діапазоні (зазвичай рівні FVIII або $\text{FIX} > 1\%$). Ці проблеми згадувались у попередніх підрозділах, і для вирішення проблеми утворення імунногенності виробниками пропонується перехід на клітинні лінії людини. У цьому підрозділі детально зупинимось на шляхах вирішення проблеми зручності лікування пацієнтів, а саме розглянемо методи подовження шляху напіврозпаду факторів крові для скорочення частоти прийому препаратів факторів крові.

FVIII має період напіврозпаду 12 год з високою індивідуальною варіабельністю, тобто більшість пацієнтів з тяжкою формою гемофілії А з профілактичною метою повинні робити ін'єкції звичайних концентратів FVIII три рази на тиждень або частіше. Період напіврозпаду FIX трохи довший (18–24 год), але пацієнти з важкою формою гемофілії В для захисту від спонтанної кровотечі також повинні робити ін'єкції концентратів FIX в середньому двічі на тиждень. Незважаючи на існуючі схеми профілактичного лікування, пацієнти з важкими формами гемофілії все ще мають підвищений ризик кровотечі та не повністю захищені від епізодів спонтанної кровотечі. У сукупності існує потреба в більш безпечних, більш тривалих та зручніших методах лікування пацієнтів з гемофілією А або В.

Для вирішення проблеми подовження періоду напіврозпаду факторів

крові застосовують наступні технології: злиття з білковими кон'югатами (Fc-частиною IgG1 або альбуміна), хімічна модифікація (ПЕГелювання) та модифікація білкової послідовності. За допомогою цих методів можна подовжити період напіврозпаду продуктів FIX у 4-6 разів, а FVIII – у 1,5-2 рази (подовження періоду напіврозпаду FVIII обмежено через взаємодію із фактором фон Вілебранда). Обидва продукти з подовженим періодом напіврозпаду покращили та полегшили замісну терапію при гемофілії А та В.

1. Злиття з білковими кон'югатами

Як імуноглобулін G (IgG), так і альбумін є білками з дуже довгим періодом напіврозпаду - до кількох тижнів. Обидва білки піддаються внутрішньоклітинному механізму рециркуляції через неонатальний Fc-рецептор (FcRn), який захищає їх від лізосомальної деградації. Після інтерналізації ендотеліальною клітиною білки, зв'язані з рецептором FcRn у підкислених ендосомах, захищені від лізосомального сортування та деградації. Це дозволяє повертатися назад на поверхню клітини з рН-залежним вивільненням у кровообіг.

Цей механізм повертання діє навіть, коли Fc-частина IgG (Fc-злиття) або альбуміну (злиття альбуміну) безпосередньо зливається з факторами згортання, такими як FVIII і FIX, що призводить до подовженого періоду напіврозпаду злитих білків *in vivo*.

2. Хімічна модифікація (ПЕГілювання)

Ковалентна модифікація терапевтичних білків ланцюгами поліетиленгліколю (ПЕГ) є усталеним підходом до подовження періоду напіврозпаду та активності білків *in vivo*. Зв'язування одного або кількох ланцюгів ПЕГ з терапевтичною молекулою відоме як ПЕГілювання. Молекула ПЕГ є неімуногенною, нетоксичною та високогідрофільною. Кон'югація ПЕГ збільшує час циркуляції FVIII і FIX головним чином шляхом захисту від ферментативного перетравлення та блокування взаємодії з рецепторами кліренсу.

3. Модифікація білкової послідовності

FVIII людини складається з двох ланцюгів глікопротеїну і циркулює в плазмі в комплексі з фактором фон Віллебранда (vWF). Молекулярна маса такого повнорозмірного FVIII становить приблизно 280 кДа; він складається з важкого ланцюга (домени A1a1 A2a2B) і легкого ланцюга (домени a3A3C1C2), які утримуються разом нековалентними взаємодіями.

На відміну від інших комерційно доступних концентратів FVIII, які є дволанцюговими молекулами, був розроблений рекомбінантний одноланцюговий FVIII (rFVIII-SingleChain). Цей одноланцюговий препарат складається з усіченого В-домену, який ковалентно зв'язує важкий і легкий ланцюги. Оскільки три переважні ділянки розщеплення тромбіну не зачіпаються в цій концепції, активація тромбіном призводить до структурно нормальної активованої молекули FVIII. rFVIII-SingleChain демонструє покращену внутрішню стабільність і помітно підвищену спорідненість до vWF. Ця вища спорідненість з vWF призводить до покращених фармакокінетичних властивостей з точки зору подовженого періоду напіврозпаду.

Обмеження подовження періоду напіврозпаду FVIII. У плазмі людини переважна більшість (95–98%) фактора VIII утворює комплекс з vWF. Взаємодія між vWF і FVIII має вирішальне значення для функції FVIII, імуногенності та кліренсу, оскільки vWF по суті виконує функцію шаперона для FVIII. Кліренс vWF і FVIII відбувається здебільшого як комплекс, що призводить до періоду напіврозпаду FVIII приблизно 12 год. Біоінженерні варіанти FVIII, такі як ПЕГільовані форми, Fc-частина IgG-зв'язаних форм, одноланцюговий rFVIII все ще значною мірою регулюються взаємодією з vWF. Таким чином, період напіврозпаду vWF (приблизно 15 годин, висока варіабельність між індивідуумами) є обмежуючим фактором для подовження періоду напіврозпаду FVIII за допомогою доступних сьогодні методів. Усі описані вище підходи дозволяють досягти лише помірного збільшення періоду напіврозпаду FVIII (у 1,5-2 рази порівняно з немодифікованим FVIII),

на відміну від FIX, для якого середній період напіврозпаду можливо збільшити у 4-6 разів.

Характеристика продуктів факторів крові з подовженим періодом напіврозпаду наведено у табл. 3.3 та 3.4.

Таблиця 3.3 - Продукти FVIII з подовженим періодом напіврозпаду (напіввиведення)

Назва діючої речовини (Міжнародна непатентована назва, МНН)	Торгова марка	Технологія подовження періоду напіврозпаду	Клітинна лінія	Розмір молекули	Середній період напіврозпаду, год
Efmoroctocog alfa Ефмороктоког альфа	Elocta®	Fc-злиття	Нек	делетований В домен	19
Rurioctacog alfa pegol Руріоктаког альфа пегол	Adynovi®	ПЕГ-гілювання до лізину, експонованого на поверхні	CHO	Повна молекула	14-16
Turoctocog alfa pegol Туроктоког альфа пегол	Esperoct®	єдине сайт-специфічне ПЕГілювання до О-зв'язаного глікану у В-домене	CHO	Усічений В домен	19
Damoctocog alfa pegol Дамоктоког альфа пегол	Jivi®	сайт-специфічне ПЕГілювання до цистеїну 1805	ВНК	Повна молекула	19
Lonoctocog alfa Лоноктоког альфа	Afstyla®	ковалентно зв'язаний важкий і легкий ланцюги з підвищеною спорідненістю до vWF	CHO	делетований В домен	14,5

Примітки:

Клітинні лінії: Нек - Ембріональні ниркові клітини людини, Human embryonic kidney; CHO - клітини яєчника китайського хом'яка, Chinese hamster ovary; ВНК – ниркові клітини дитинчат хом'яка, Baby Hamster Kidney cells;; vWF – фактор фон Вілебранда, von Willebrand Faktor

**Таблиця 3.4 - Продукти FIX з подовженим періодом напіврозпаду
(напіввиведення)**

Назва діючої речовини (Міжнародна непатентована назва, МНН)	Торгова марка	Технологія подовження періоду напіврозпаду	Клітинна лінія	Розмір молекули	Середній період напіврозпаду, год
Eftrenanocog alfa Ефтренаког альфа	Alprolix®	Fc-злиття	Нек	Повна молекула	82
Albutrepenonacog alfa Альбутрепенонаког альфа	Idelvion®	альбумін-злиття	CHO	Повна молекула	102
Nonacog beta pegol Нонаког бета пегол	Refixia®	сайт-специфічне ПЕГілювання до пептиду активації	CHO	Повна молекула	93

Примітки:

Клітинні лінії: Нек - Ембріональні ниркові клітини людини, Human embryonic kidney;
CHO - клітини яєчника китайського хом'яка, Chinese hamster ovary

3.4 Забезпеченість препаратами факторів крові людини в Україні

В Україні препарати факторів крові як плазмові, так і рекомбінантні не виробляються. У табл. 3.5 наведені препарати фактори згортання крові закордонних компаній, зареєстровані в Україні за даними Державного реєстру лікарських засобів та порталу Ліки України (пошук – МНН: Coagulation factor).

**Таблиця 3.5 – Перелік препаратів факторів згортання крові згідно з
Державним реєстром лікарських засобів**

№	Препарат	Фармакотерапевтична група/ МНН / АТХ-код	Склад (діюча речовина)	Виробник
1	РІКСУБІС/RIXU BIS порошок та розчинник для розчину для ін'єкцій по 250 МО; порошок у флаконах, розчинник (вода для ін'єкцій) по 5 мл у флаконах;	Антигеморагічні засоби. Фактор згортання крові IX / Coagulation factor IX B02BD04 Coagulation factor IX /	1 флакон містить: фактор коагуляції крові людини IX, рекомбінантний (нонаког гамма) - 250 МО, 500 МО, 1000 МО, 2000 МО або 3000 МО;; 1 флаконом з розчинником (вода для ін'єкцій) по 5 мл	Баксалта Белджіум Мануфактурінг СА/Бакстер СА, Бельгія/Бельгія Бакстер АГ, Австрія офі Технологіє енд Інновейшійон ГмбХ, Австрія хамельн

	по 1 флакону з порошком у комплекті з 1 флаконом з розчинником та пристроєм для розчинення у коробці			фармацевтикалс гмбх, Німеччина Баксалта ЮС Інк., США
2	АІМАФІКС порошок та розчинник для розчину для інфузій, 500 МО/10 мл; по 500 МО у флаконі № 1 у комплекті з розчинником (вода для ін'єкцій) по 10 мл у флаконі № 1 та набором для розчинення і введення у картонній коробці	Антигеморагічні засоби. Фактор згортання крові IX / Coagulation factor IX B02BD04 Coagulation factor IX	10 мл відновленого розчину містять: фактор коагуляції крові людини IX - 500 МО або 1000	КЕДРІОН С.П.А., Італія ФАЛОРНІ С.Р.Л., Італія АЛЬФАСІГМА С.П.А., Італія
3	УМАН КОМПЛЕКС 500 МО/20мл/UMAN COMPLEX 500 IU/20 ml порошок для розчину для інфузій по 500 МО у флаконі № 1 у комплекті з розчинником (вода для ін'єкцій) по 20 мл у флаконі № 1 та набором для розчинення і введення у картонній коробці	Протигеморагічні засоби. Комбінація факторів коагуляції крові IX, II, VII і X. Код АТС B02B D01 / Coagulation factor IX, II, VII and X in combination / B02BD01 Coagulation factor IX, II, VII and X in combination	1 флакон містить: протромбіновий комплекс людини: фактор коагуляції крові людини IX – 500 МО; фактор коагуляції крові людини II – 500 МО; фактор коагуляції крові людини X – 400 МО	Кедріон С.п.А., Італія
4	ОКТАПЛЕКС 500 МО порошок та розчинник для розчину для інфузій по 500 МО; дві коробки об'єднуються між собою пластиковою	Протигеморагічні засоби, комбінація факторів зсідання крові IX, II, VII та X. Код АТС B02B D01 / Coagulation factor IX, II, VII and X in combination / B02BD01 Coagulation factor IX, II, VII and X in combination	1 флакон (20 мл) містить: загальний білок - 260-820 МО; фактор коагуляції крові людини II - 280-760 МО; фактор коагуляції крові людини VII - 180-480 МО; фактор коагуляції крові	Октафарма Фармацевтика Продуктіонсгес м.б.Х. (виробник, відповідальний за виробництво за повним циклом), Австрія Октафарма (виробник

	плівкою: картонна коробка №1: по 1 флакону з порошком для розчину для інфузій та інструкцією про застосування; картонна коробка №2: по 1 флакону із розчинником (вода для ін'єкцій, 20 мл) у картонній коробці разом з комплектом для розчинення та внутрішньовенного введення (1 шприц одноразовий; 1 комплект для переносу (1 двухкінцева голка, 1 фільтровальна голка); 1 комплект для інфузій (голка-метелик); 2 просочених спиртом тампонів)		людини IX - 500 МО; фактор коагуляції крові людини X - 360-600 МО; білок C - 260-620 МО; білок S - 240-640 МО	відповідальний за виробництво за повним циклом за виключенням вторинної упаковки), Франція Октафарма Дессау ГмбХ (виробник (альтернативний), відповідальний за вторинне пакування та візуальну інспекцію), Німеччина
5	ОКТАНАТ порошок для розчину для ін'єкцій по 50 МО/мл; Картонна коробка № 1: містить 1 флакон з порошком для розчину для ін'єкцій. Картонна коробка № 2: містить 1 флакон з розчинником (вода для ін'єкцій по 5 мл (250 МО/флакон) або 10 мл (500 МО/флакон)) та комплект для	Протигеморагічні засоби. Фактор коагуляції крові VIII / Coagulation factor VIII / B02BD02 Coagulation factor VIII	1 флакон розчину для ін'єкцій містить 250 МО або 500 МО фактора VIII коагуляції крові людини; загальний білок не більше 5,5 мг (для 250 МО/флакон), не більше 11 мг (для 500 МО/флакон), або 1 флакон розчину для ін'єкцій містить 1000 МО фактора VIII коагуляції крові людини; загальний білок не більше 22 мг	Октафарма АБ (виробництво за повним циклом за виключенням вторинної упаковки), Швеція Октафарма Фармацевтика Продуктінсгес м.б.Х. (виробництво за повним циклом, включаючи візуальну інспекцію), Австрія Октафарма (виробництво за повним циклом за виключенням

	розчинення та внутрішньовенного введення (1 шприц одноразовий, 1 двостороння голка, 1 голка з фільтром, 1 голка для ін'єкцій, 2 просочені спиртом тампони) у пакеті або блістері. Коробка № 1 та коробка № 2 об'єднуються між собою пластиковою плівкою			вторинної упаковки), Франція Октафарма Дессау ГмбХ (вторинне пакування, візуальна інспекція), Німеччина Октафарма Продукціонсгеселлшафт Дойчланд м.б.Х. (виробництво кріопреципітата), Німеччина
6	РЕФАКТО АФ ліофілізат для розчину для ін'єкцій по 250 МО, 1 флакон з ліофілізатом у комплекті з 1 попередньо наповненим шприцом з розчинником по 4 мл (натрію хлорид (9 мг/мл), вода для ін'єкцій), 1 адаптером для флакону, 1 системою для інфузії, 2 тампонами зі спиртом, 1 пластирем та 1 марлевою подушечкою в картонній коробці; або 1 флакон з ліофілізатом у комплекті з 1 попередньо наповненим шприцом з розчинником по 4 мл (натрію хлорид (9 мг/мл), вода для	Антигеморагічні засоби. Фактор згортання крові VIII. Код АТС B02B D02 / Coagulation factor VIII / B02BD02 Coagulation factor VIII	1 флакон містить 250 МО або 500 МО, або 1000 МО, або 2000 МО мороктокогу альфа (фактор коагуляції крові VIII рекомбінантний)	Баєт Фарма С.А. (виробництво ліофілізату за повним циклом; контроль якості розчинника (окрім дослідження сили тертя поршня), вторинне пакування розчинника у набір з препаратом; відповідальний за випуск серії), Іспанія Лабораторія Біолаб, С.Л. (альтернативна лабораторія для тестування препарату за показником "Стерильність"), Іспанія Веттер Фарма-Фертигунг ГмбХ & Ко. КГ (виробництво розчинника в шприцах, контроль якості розчинника; виробництво

	ін'єкцій), 1 адаптером для флакону, 1 системою для інфузії, 2 тампонами зі спиртом, 1 пластирем та 1 марлевою подушечкою в картонній коробці			розчинника в шприцах, контроль якості розчинника (окрім дослідження герметичності); візуальний контроль розчинника, контроль якості розчинника (окрім дослідження герметичності, сили тертя поршня; візуальний контроль розчинника, контроль якості розчинника (дослідження герметичності, сили тертя поршня)), Німеччина
7	АДВЕЙТ порошок та розчинник для розчину для ін'єкцій, по 250 МО; 1 флакон з порошком у комплекті з 1 флаконом з розчинником (вода для ін'єкцій) по 5 мл та по 1 пристосуванню для розведення БАКСДЖЕКТ II у коробці	Кров і кровотворні органи. Антигеморагічні засоби. Вітамін К та інші гемостатичні засоби. Фактори згортання крові. Фактор коагуляції крові VIII / Coagulation factor VIII / B02BD02 Coagulation factor VIII	1 флакон містить: 250 МО* фактора коагуляції крові людини VIII рекомбінантного (рДНК)** , октокогу альфа, що після розведення становить приблизно 50 МО/мл фактора коагуляції крові людини VIII рекомбінантного, октокогу альфа; 500 МО* фактора коагуляції крові людини VIII рекомбінантного (рДНК)**, октокогу альфа, що після розведення становить приблизно 100 МО/мл фактора коагуляції крові людини VIII рекомбінантного, октокогу альфа;	Баксалта Белджіум Мануфактурінг СА (вторинне пакування готового лікарського засобу та розчинника, частковий контроль якості готового лікарського засобу, випуск серії готового лікарського засобу та розчинника), Бельгія Баксалта Мануфактурінг Сарл (виробництво нерозфасованого продукту, первинне пакування готового лікарського

			1000 МО* фактора коагуляції крові людини VIII рекомбінантного (рДНК)** , октокогу альфа, що після розведення становить приблизно 200 МО/мл фактора коагуляції крові людини VIII рекомбінантного, октокогу альфа; 1500 МО* фактора коагуляції крові людини VIII рекомбінантного (рДНК)** , октокогу альфа, що після розведення становить приблизно 300 МО/мл фактора коагуляції крові людини VIII рекомбінантного, октокогу альфа; 2000 МО* фактора коагуляції крові людини VIII рекомбінантного (рДНК)** , октокогу альфа, що після розведення становить приблизно 400 МО/мл фактора коагуляції крові людини VIII рекомбінантного, октокогу альфа; 3000 МО* фактора коагуляції крові людини VIII рекомбінантного (рДНК)** , октокогу альфа, що після розведення становить приблизно 600 МО/мл фактора коагуляції крові людини VIII рекомбінантного, октокогу альфа;	засобу та частковий контроль якості готового лікарського засобу), Швейцарія Такеда Мануфекчурінг Австрія АГ (виробництво нерозфасованого продукту, первинне пакування готового лікарського засобу та частковий контроль якості готового лікарського засобу), Австрія Зігфрід Хамельн ГмбХ (виробництво, первинне пакування та контроль якості розчинника), Німеччина
--	--	--	---	---

			* Активність (в міжнародних одиницях) визначається з використанням хромогенної кількісної проби порівняно з внутрішнім стандартним зразком, що відповідає стандарту ВООЗ. Питома активність становить приблизно 4000 – 10000 МО/мг білка. ** Фактор коагуляції крові людини VIII виробляється за технологією рекомбінантного ДНК з клітин яєчника китайського хом'яка. В процесі посіву клітинної культури, на етапі очищення і кінцевого приготування рецептури не додаються (екзогенні) білки людського чи тваринного походження.	
--	--	--	---	--

Як бачимо з табл. 3.5 в Україні зареєстровано 7 препаратів факторів згортання крові, всі з яких іноземного виробництва. З переліку препаратів 4 препарата – плазмові: Уман комплекс та Октаплек – комбінація факторів IX, II, VII, X (протромбіновий комплекс людини), Аімафікс – фактор IX, Октанат – фактор VIII; тільки 3 препарати – рекомбінантні: Ріксубіс – рекомбінантний фактор крові IX, Рефакто та Адовейт – рекомбінантний фактор крові VIII.

В Україні лікарські засоби для лікування дорослої та дитячої гемофілії пацієнти можуть отримати безоплатно по програмі Доступні ліки, що розміщено на сайті Медичні закупівлі України, зокрема Фактор IX коагуляції

крові людини (рекомбінантний), Фактор IX коагуляції крові людини (рекомбінантний), Антиінгібіторний коагулянтний комплекс, оброблений парою, Фактор IX коагуляції крові людини (плазмовий).

У табл. 3.6 наведено перелік препаратів, доступних для пацієнтів за бюджетною програмою згідно з наказом «Про затвердження номенклатури лікарських засобів, медичних виробів та допоміжних засобів до них, що закуповуватимуться за напрямами використання бюджетних коштів»

**Таблиця 3.6 - Номенклатура лікарських засобів за напрямом
«Лікарські засоби для забезпечення дітей, хворих на гемофілію типів А
або В або хворобу Віллебранда»**

Міжнародна непатентована назва лікарського засобу	Форма випуску	Дозування	Примітка
Фактор коагуляції крові VIII (рекомбінантний)	флак.	250 МО	Лікування дітей з гемофілією типу А
Фактор коагуляції крові VIII (рекомбінантний)	-«-	500 МО	-«-
Фактор коагуляції крові VIII (рекомбінантний)	-«-	1000 МО	-«-
Фактор коагуляції крові VIII (рекомбінантний)	-«-	1500 МО	-«-
Фактор VIII коагуляції крові людини (плазмовий)	-«-	250 МО	-«-
Фактор VIII коагуляції крові людини (плазмовий)	-«-	500 МО	-«-
Фактор VIII коагуляції крові людини (плазмовий)	-«-	1000 МО	-«-
Фактор IX коагуляції крові людини (рекомбінантний)	-«-	500 МО	Лікування дітей з гемофілією типу В
Фактор IX коагуляції крові людини (плазмовий)	-«-	500 МО та/або 600 МО	-«-
Фактор IX коагуляції крові людини (рекомбінантний)	-«-	1000 МО	-«-
Фактор IX коагуляції крові людини (плазмовий)	-«-	1000 МО та/або 1200 МО	-«-
Фактор коагуляції крові людини VIII та фактор Віллебранда людини	-«-	500 МО	Лікування та профілактика дітей з хворобою Віллебранда 3-го типу
Фактор коагуляції крові людини VIII та фактор Віллебранда людини	-«-	1000 МО	-«-

Фактор VIII коагуляції крові людини (плазмовий)	-«-	1000 МО	Лікування дітей з інгібіторною формою гемофілії типу А або В
Ептаког-альфа (рекомбінантний фактор згортання крові VIIa)	-«-	2 мг (100 КМО)	-«-
Ептаког-альфа (рекомбінантний фактор згортання крові VIIa)	-«-	5 мг (250 КМО)	-«-
Антиінгібіторний коагулянтний комплекс	-«-	500 МО	-«-
Антиінгібіторний коагулянтний комплекс	-«-	1000 МО	-«-
Еміцизумаб	-«-	30 мг	-«-
Еміцизумаб	-«-	60 мг	-«-
Еміцизумаб	-«-	105 мг	-«-
Десмопресин	амп., флак., шприц	15 мкг/мл, 1 мл	Лікування дітей з хворобою Віллебранда 1-го та 2-го типу та легкої форми гемофілії типу А
Фактор коагуляції крові людини VIII та фактор Віллебранда людини	флак.	500 МО	Лікування дітей з хворобою Віллебранда 2-го типу
Фактор коагуляції крові людини VIII та фактор Віллебранда людини	-«-	1000 МО	-«-

Таким чином, бачимо, що, незважаючи на постійний розвиток та вдосконалення технологій виробництва факторів крові людини, як плазмових, так і рекомбінантних, проблема забезпеченості цими препаратами в Україні залишається актуальною, особливо, враховуючи відсутність в Україні власного виробництва факторів крові. Вирішення цієї проблеми полягає в опануванні вітчизняними виробниками технології виробництва сучасних препаратів для лікування розладів системи згортання крові.

3.5 Порівняння технологій виробництва рекомбінантних факторів крові

Порівняємо технології виробництва рекомбінантних препаратів різних

поколінь на прикладі rFVIII, наведених у табл. 3.7.

Таблиця 3.7 - Порівняння технологій виробництва рекомбінантних факторів крові

Назва препарату	Виробник	Середня ціна	Чи зареєстрований в Україні	Чи входить у програму "Доступні ліки"	Клітинна лінія та характеристика технології виробництва	Переваги технології	Недоліки технології
Recombinate	Baxter	≈ \$1,500/доза	Так	Ні	Клітини CHO, рекомбінантний фактор VIII	Економічне виробництво, добре досліджений	Короткий період напіввиведення, висока імуногенність
Kogenate	Bayer	≈ \$1,400/доза	Так	Ні	Клітини CHO, рекомбінантний фактор VIII	Стабільна експресія, низький рівень домішок	Часте введення, альбумін як стабілізатор
Refacto	Pfizer	≈ \$1,700/доза	Так	Так	Клітини CHO, модифікований рекомбінантний фактор VIII	Підвищена активність, менше антигенних домішок	Вища ціна, складність очищення
Advate	Takeda	≈ \$1,800/доза	Так	Так	Клітини CHO, рекомбінантний фактор VIII без альбуміну	Менший ризик імуногенності, відсутність тваринних білків	Складне виробництво, висока ціна
Refacto AF	Pfizer	≈ \$1,750/доза	Так	Так	Клітини CHO, модифікований фактор VIII	Стабільність білка, менша імуногенність	Висока вартість
NovoEight	Novo Nordisk	≈ \$1,600/доза	Так	Так	Клітини CHO, без використання тваринних білків	Висока чистота, знижена імуногенність	Дорожче очищення
Adynovate	Takeda	≈ \$2,000/доза	Так	Ні	Клітини CHO, фактор VIII із подовженим періодом напіввиведення	Зручність для пацієнтів через рідкісні введення	Дуже висока ціна, складність виробництва
Afstyla	CSL Behring	≈ \$1,850/доза	Так	Ні	Клітини CHO, фактор VIII з одноцепочковою структурою	Знижений ризик утворення інгібіторів	Висока вартість
Eloctate	Sanofi	≈ \$2,500/доза	Так	Ні	Клітини HEK293, фактор VIII із кон'югованим Fc-фрагментом	Подовжений період напіввиведення, рідкісні введення	Дуже дорога технологія виробництва
Nuwiq	Octapharma	≈ \$1,700/доза	Так	Ні	Клітини HEK293, фактор VIII без тваринних білків	Людоподібні модифікації, низька імуногенність	Менша продуктивність клітин
Kovaltry	Bayer	≈ \$1,600/доза	Так	Ні	Клітини CHO, покращений рекомбінантний фактор VIII	Стабільність білка, добре досліджений	Потребує частого введення

Технологія виробництва рекомбінантних факторів крові включає декілька ключових етапів: клонування гена (ген фактора вставляється у вектор, який потім трансфікують у клітинні лінії, наприклад, CHO або HEK293), культивування (клітини вирощують у біореакторах із постійним контролем температури, рН та рівня кисню), очищення (багатоступеневе очищення за допомогою хроматографії - афінна, іонообмінна), формулювання

(додавання стабілізаторів, наприклад, сахарози, ліофілізація продукту для стабільності), контроль якості (перевірка на чистоту, активність та стерильність).

Нижче наведено умови виробництва та особливості технологій для препаратів рекомбінантних факторів крові на прикладі препарату I покоління rFVIII та IV покоління rFIX.

Технологія виробництва препарату Recombinate® (рекомбінантний фактор VIII I покоління)

Recombine® є першим рекомбінантним фактором VIII, розробленим для лікування гемофілії А. Його виробництво базується на використанні клітинних технологій для експресії білка, що повторює функції людського фактора VIII. Основні етапи виробництва включають:

1. Клонування гена фактора VIII

Сировина та обладнання: генетична послідовність людського фактора VIII, плазмідні вектори для перенесення генетичного матеріалу, ферменти рестрикції та лігази, ПЛР-обладнання та електрофорез.

Процес: виділення гена фактора VIII та його вставка в плазмідний вектор, плазмідний вектор вводиться в клітини хазяїна (клітини CHO — яєчник китайського хом'яка).

Контроль: підтвердження успішного клонування шляхом ПЛР, секвенування та аналізу експресії.

2. Культивування клітин-продуцентів

Сировина та обладнання: клітини CHO, живильні середовища, що містять амінокислоти, вітаміни та інші поживні компоненти, біореактори з контролем температури, рН і рівня кисню.

Процес: клітини культивуються в суспензійних умовах при 37 °C, рН 7.2, експресія фактора VIII стимулюється оптимальними умовами середовища.

Контроль: відстеження щільності клітин, рН середовища та рівня експресії білка, тести на відсутність бактеріальної та вірусної контамінації.

3. Збір та первинне очищення

Сировина та обладнання: центрифуги та фільтри для видалення клітинних залишків, буферні розчини.

Процес: культуральна рідина відокремлюється від клітин, виконується первинна фільтрація для видалення великих домішок.

Контроль: перевірка активності фактора VIII у культуральній рідині.

4. Афінна хроматографія

Сировина та обладнання: хроматографічні колонки з лігандами, специфічними до фактора VIII, буфери для елюції білка.

Процес: рідина проходить через хроматографічні колонки, де фактор VIII зв'язується з лігандом, білок елююється за допомогою специфічного буфера, видаляючи домішки.

Контроль: аналіз чистоти білка (електрофорез, спектрофотометрія), перевірка залишкових домішок, включаючи протеїни хазяїна.

5. Концентрування та стерилізація

Сировина та обладнання: ультрафільтраційні мембрани, стерильні фільтри.

Процес: концентрація очищеного фактора VIII до необхідної концентрації, стерилізація шляхом фільтрації для видалення потенційних мікроорганізмів.

Контроль: перевірка стерильності продукту.

6. Формулювання

Сировина та обладнання: стабілізатори (альбумін, сахароза), ліофілізатори для стабілізації продукту.

Процес: додавання стабілізаторів до очищеного білка, ліофілізація для отримання порошкової форми продукту.

Контроль: перевірка активності після формулювання.

7. Розфасовка та пакування

Сировина та обладнання: стерильні флакони та герметичні кришки, автоматизовані системи фасування.

Процес: ліофілізований порошок розфасовується у флакони та герметично закривається, кожен флакон проходить індивідуальний контроль якості.

Контроль: візуальний огляд, тести на герметичність і відповідність стандартам GMP.

Особливості виробництва Recombinate: використання альбуміну як стабілізатора, виробництво відповідає міжнародним стандартам GMP.

Технологія виробництва препарату Alprolix® (рекомбінантний фактор IX IV покоління)

Виробництво препарату Alprolix®, який є рекомбінантним фактором згортання крові IX, здійснюється за допомогою сучасних біотехнологічних методів. Хоча детальна інформація про виробничий процес є комерційною таємницею компанії-виробника, загальні етапи виробництва рекомбінантних білків можна описати наступним чином:

1. Клонування гена фактора IX

Сировина та обладнання: ДНК-послідовність, що кодує людський фактор IX, плазмідні вектори для перенесення гена, ферменти рестрикції та лігази, термоцилер для ампліфікації ДНК.

Процес: ген фактора IX ампліфікується за допомогою ПЛР та вставляється у плазмідний вектор, вектор вводиться в клітини-хазяїни шляхом трансфекції.

Контроль: перевірка успішності трансфекції за допомогою ПЛР та секвенування.

2. Культивування клітин-продуцентів

Сировина та обладнання: клітини Нек, живильні середовища, що містять необхідні поживні речовини, біореактори з контролем параметрів середовища.

Процес: клітини культивуються в біореакторах при оптимальних умовах (температура - 37°C, рН 7.2, рівень кисню) для експресії фактора IX.

Контроль: моніторинг росту клітин, рівня експресії білка та відсутності контамінації.

3. Відокремлення та очищення білка

Сировина та обладнання: хроматографічні колонки (іонообмінна, афінна хроматографія), буферні розчини для елюції білка.

Процес: культуральна рідина, що містить фактор IX, піддається серії хроматографічних очищень для видалення домішок та отримання високочистого білка.

Контроль: аналіз чистоти білка за допомогою електрофорезу та мас-спектрометрії.

4. Кон'югація з Fc-фрагментом

Сировина та обладнання: Fc-фрагмент імуноглобуліну людини, хімічні реагенти для кон'югації.

Процес: фактор IX з'єднується з Fc-фрагментом для подовження періоду напіввиведення препарату в організмі.

Контроль: перевірка ефективності кон'югації та біологічної активності отриманого продукту.

5. Формулювання та ліофілізація

Сировина та обладнання: стабілізатори та буферні розчини, ліофілізатор для сушіння продукту.

Процес: очищений білок змішується зі стабілізаторами та піддається ліофілізації для отримання стабільного порошку.

Контроль: перевірка стабільності та стерильності кінцевого продукту.

6. Розфасовка та пакування

Сировина та обладнання: скляні флакони, гумові пробки, алюмінієві ковпачки, автоматизовані системи наповнення та запаювання.

Процес: ліофілізований продукт розфасовується у стерильні флакони, які герметично закриваються та упаковуються.

Контроль: перевірка герметичності, відсутності сторонніх часток та відповідності стандартам якості.

Кожен етап виробництва супроводжується строгим контролем якості та відповідністю міжнародним стандартам GMP, що гарантує безпеку та

ефективність препарату Alprolix.

Порівняння технологій виробництва Recombinate і Alprolix

Recombine і Alprolix - це препарати, розроблені для лікування порушень згортання крові, які використовують різні технології виробництва та мають свої переваги та недоліки. Порівняння технологій провели по таким параметрам: діюча речовина – білок, клітинні лінії, що використовується у виробництві, етапи очищення, частота введення, імуногенність, вартість технології.

1. Білок

Recombine: Рекомбінантний фактор VIII, застосовується для лікування гемофілії А. Alprolix: Рекомбінантний фактор IX із кон'югованим Fc-фрагментом, призначений для лікування гемофілії В.

Переваги: Recombinate - простий фактор VIII без додаткових модифікацій, що забезпечує природну біологічну активність; Alprolix - Кон'югація з Fc-фрагментом подовжує період напіввиведення, що зменшує частоту введення препарату.

Недоліки: Recombinate - потребує частого введення через короткий період напіввиведення (8-12 годин); Alprolix - більш складний виробничий процес через додавання Fc-фрагмента, що збільшує витрати на виробництво.

2. Клітинні лінії

Recombine: Використовуються клітини яєчника китайського хом'яка (СНО). Alprolix: Використовуються клітини людської нирки (НЕК293).

Переваги: Recombinate - СНО-клітини забезпечують стабільну експресію та високу продуктивність; Alprolix - НЕК293-клітини забезпечують більш людоподібні посттрансляційні модифікації, що знижує ризик імуногенності.

Недоліки: Recombinate - СНО-клітини можуть продукувати небажані гліканові епітопи, які підвищують імуногенність; Alprolix: НЕК293-клітини мають нижчу продуктивність, ніж СНО, що може обмежити масштаб виробництва.

3. Очищення

Recombinate: Очищається за допомогою хроматографії із застосуванням альбуміну як стабілізатора. Alprolix: Використовується сучасна афінна хроматографія з поліпшеною селективністю.

Переваги: Recombinate - використання альбуміну є економічним рішенням для стабілізації білка; Alprolix - сучасні методи очищення забезпечують високу чистоту та мінімальний рівень домішок.

Недоліки: Recombinate - залишковий альбумін може нести ризик вірусної контамінації, Alprolix - вищі витрати на виробництво через складні методи очищення.

4. Частота введення

Recombinate: Потребує введення 3–4 рази на тиждень через короткий період напіввиведення. Alprolix: Завдяки Fc-фрагменту вводиться 1 раз на 1–2 тижні.

Переваги: Alprolix - зручніше для пацієнтів через меншу частоту ін'єкцій, підвищує прихильність до терапії.

Недоліки: Recombinate - часті введення можуть бути обтяжливими для пацієнтів.

5. Імуногенність

Recombinate: Вищий ризик утворення антитіл через використання тваринних білків та менш людоподібні глікозилювання. Alprolix: Менший ризик імунної відповіді завдяки людоподібним модифікаціям білка.

Переваги: Alprolix - зменшений ризик ускладнень, пов'язаних з утворенням інгібіторів.

Недоліки: Recombinate - потребує додаткових досліджень для зменшення імуногенності.

6. Вартість виробництва: Recombinate - економічніше виробництво завдяки простішій технології, Alprolix - високі витрати через складніший процес і необхідність у додаткових етапах.

Таким чином, Recombinate підходить для ситуацій, коли потрібне

швидке та доступне лікування, але вимагає частого введення та має вищий ризик імуногенності, Alprolix є сучаснішим рішенням із подовженим періодом напіввиведення, зниженою імуногенністю та більшою зручністю для пацієнтів, але потребує складнішого та дорожчого виробництва. Вибір препарату залежить від потреб пацієнта, клінічних обставин та економічних можливостей.

3.6 Технологія виробництва рекомбінантного фактора VIII останнього покоління

Незважаючи на успіхи у клонуванні гену FVIII і розроблені методів експресії та очищення рекомбінантного білка, що призвело до значного покращення доступності та безпеки замісної терапії FVIII, існували проблеми, пов'язані зі складністю у виробництві rFVIII - великого багатодоменого глікопротеїну зі значними посттрансляційними модифікаціями. Вироблення інгібіторів FVIII є найсерйознішим ускладненням при лікуванні гемофілії. За оцінками, інгібітори розвиваються у 38% пацієнтів, які раніше не отримували лікування та 1% пацієнтів, які раніше лікувалися. Для зменшення ризику утворення інгібіторів у пацієнтів були розроблені препарати rFVIII нового покоління, отримані з лінії людських клітин. Першим зареєстрованим препаратом 4 покоління є Nuwivq® (ЕМА надала дозвіл у 2014 р., FDA – у 2015 р.) також зареєстрований в Україні. Опис технології цього препарату та технологічна схема буде представлено у цьому підрозділі.

Human-cl rhFVIII (Nuwivq®, Octapharma AG, Швейцарія), симоктоког альфа - це людський rFVIII 4 покоління, який виробляється в клітинній лінії людини (HEK293F) без хімічної модифікації або злиття з будь-яким іншим білком/фрагментом. Культивується без добавок людського або тваринного походження, позбавлений антигенних білкових епітопів нелюдського походження та має високу спорідненість до фактора фон Віллебранда. Лікування Nuwivq® було оцінено в семи завершених клінічних дослідженнях,

які включали 201 пацієнта, що раніше отримували лікування (190 осіб) з тяжкою гемофілією А, включаючи 59 дітей. Nuwiq® доступний у формах по 250 МО, 500 МО, 1000 МО, 2000 МО, 2500 МО, 3000 МО та 4000 МО, усі з об'ємом інфузії 2,5 мл. Nuwiq® схвалено для використання в лікуванні та профілактиці кровотеч у пацієнтів із гемофілією А (вродженим дефіцитом FVIII) у всіх вікових групах. У 2020 р. FDA схвалило оновлену інформацію про призначення Nuwiq® для включення даних про імуногенність у пацієнтів, які раніше не отримували лікування.

Ендогенний FVIII зазнає значних посттрансляційних модифікацій, зокрема сульфатування та глікозилювання, які необхідні для повної функціональної активності FVIII. Ступінь сульфатування певних залишків, зокрема Tyr1680, визначає афінність зв'язування FVIII з його молекулярним шапероном *in vivo*, фактором фон Віллебранда (VWF). Сайт сульфатування Tyr1680 знаходиться в безпосередній близькості до пептиду V1670-D1687 у кислому а3-доміні FVIII, який бере участь у зв'язуванні FVIII-VWF. Близьке розташування сайту сульфатування в Tyr1680 підтверджує спостережуваний вплив цього сайту сульфатування на афінність зв'язування FVIII-VWF (рис. 3.1).

Human-cl rhFVIII (human-cl - a cell line of human origin, rhF - recombinant human factor) містить посттрансляційні модифікації людини, повністю сульфатований і містить лише людські глікани. Профіль сульфатування human-cl rhFVIII, порівняний з pdFVIII людини (pd - plasma-derived), забезпечує більш високу афінність зв'язування з VWF, ніж інші продукти rFVIII. Отже, це підвищує стабільність human-cl rhFVIII і знижує імуногенний потенціал, створений незв'язаним циркулюючим FVIII. Крім того, human-cl rhFVIII позбавлений антигенних нелюдських епітопів, присутніх у продуктах rFVIII, отриманих із клітинних ліній хом'яка. Поєднання повної сульфатації та відсутності антигенних вуглеводних епітопів має потенціал для мінімізації внутрішньої імуногенності інфузійного rFVIII.

Стадія 0. Отримання виробничої клітинної лінії

Лінія людських ембріональних клітин нирок HEK 293 широко використовується як хазяїн експресії в наукових дослідженнях, але рідко використовувалась для комерційного виробництва рекомбінантних білків. Технічні переваги цієї клітинної лінії включають відпрацьовану схему вирощування, легке обслуговування та високу ефективність трансфекції та виробництва білка. Але існували проблеми вирощування її у безсироватковому середовищі через те, що більшість клонів на ньому не виживало, а ті, що виживали виробляли нижчі рівні рекомбінантного білка після перенесення в безсироваткове середовище. Ці проблеми перешкоджали використанню клітин HEK 293 для промислового виробництва білка. Однак у 2003 році компанія Invitrogen адаптувала клітини HEK 293 для росту в суспензійній культурі та за відсутності сироватки, і цю лінію клітин назвали HEK293 F. Компанія Octapharma AG вибрала HEK 293 F як лінію клітин-господарів і згодом розробила всі необхідні методи промислового виробництва рекомбінантного білка в цих клітинах на основі великого попереднього досвіду з батьківськими клітинами HEK 293, а також з клітинними лініями хом'яків CHO і BHK. Успішна адаптація методології до унікальних характеристик клітин HEK 293 F дозволила використовувати цю клітинну лінію як виробничу лінію клітин.

Клітинна лінія людського cl rhFVIII була створена компанією Octapharma шляхом трансфекції клітин HEK 293 F кДНК FVIII людини. Основною причиною використання клітинної лінії людини є наявність механізму трансляції та всіх субклітинних компартментів, необхідних для генерування правильно згорнутого і повністю активного FVIII з автентичною людською структурою посттрансляційної модифікації.

Клітини HEK 293 F (Invitrogen, Швейцарія) культивували в середовищі FreeStyle™ 293 Expression, проводили трансфекцію запатентованою експресійною плазмідною Octapharma, що несе рекомбінантну кДНК з видаленим В-доменом FVIII людини. Вектор, який використовується для

створення експресійної плазмиди, містить промотор, який є високоактивним в еукаріотичних клітинах, а також сигнал термінації транскрипції, який підвищує стабільність мРНК. Трансфектанти були відібрані в середовищі, що містить гігromіцин, і проаналізовані за рівнем та якістю секретованого FVIII. Субклонування дало клон із вищими ростовими властивостями, стабільністю, рівнем продуктивності та якістю секретованого FVIII, який був розмножений і кріоконсервований як дослідницький клітинний банк (research cell bank, RCB). Цей банк використовувався для створення головного банку клітин (master cell bank, MCB), з якого створювався робочий банк клітин (working cell bank, WCB). MCB і WCB зберігалися в паровій фазі рідкого азоту. Етапи розробки виробничої клітинної лінії для human-cl rhFVIII (Nuwiq®) представлено на рис. 3.2.

Також слід відмітити багатокомплексний підхід до очищення препарату. Процес очищення включає етап видалення клітин (центрифугування/фільтрування), два етапи фільтрації, п'ять хроматографічних колонок і дві спеціальні стадії очищення від патогенів (обробка розчинником/детергентом і нанофільтрація 20 нм). На ключовому етапі очищення використовується афінна смола (VIIISelect) з високою специфічністю для FVIII, видаляючи по суті всі білки клітин-господарів із виділенням >80% продукту. Багатоетапний процес очищення у виробничому масштабі ефективно видаляє домішки, пов'язані з процесом і продуктом, і призводить до отримання продукту rhFVIII високої чистоти із загальним виходом ~50%. Питома активність кінцевого продукту становить >9000 МО/мг, а співвідношення між активним фактором VIII і присутнім загальним білком FVIII становить >0,9. Таким чином багатоетапний процес очищення забезпечує видалення клітин-господарів, компонентів середовища, хімічних речовин, які використовуються під час очищення, ДНК і білків, а також потенційно присутніх оболонкових і безоболонкових вірусів. Весь процес виробництва не містить продуктів тваринного походження, що забезпечує зниження імуногенності продукту та безпеку препарату. Етапи процесу

очищення human-cl rhFVIII (Nuwiq®) наведено на рис. 3.3.

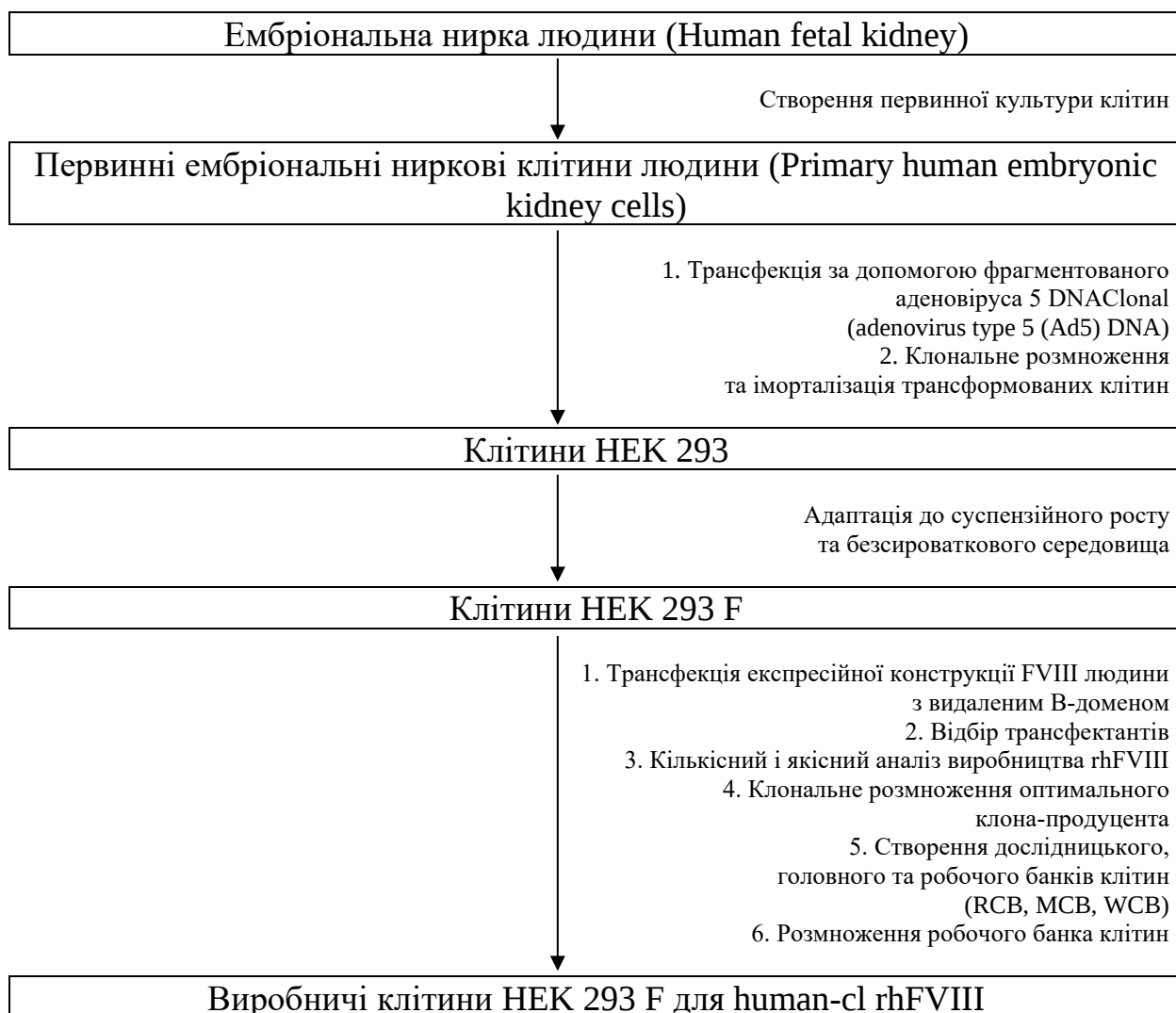


Рис. 3.2 – Розробка виробничих клітин НЕК 293 F для human-cl rhFVIII (Nuwiq®)

Клітини НЕК 293 були створені Френком Грехемом (Frank Graham) в лабораторії Alexander van der Eb у 1973 р. та широко застосовувались в академічних дослідженнях через гарний ріст, високу ефективність трансфекції та задовільну експресію білків.

Культуру первинних клітин, отриману з нирки плода жіночої статі, трансфікували розрізаною ДНК аденовірусу 5. Одну трансформовану клітину було виділено, розмножено та увічнено, що дало початок клітинній лінії 293 ембріональної нирки людини (НЕК). Але ці клітини не були пристосовані до вирощування у безсироватковому середовищі, що є оптимальною умовою для отримання рекомбінантних факторів крові максимально позбавлених тваринних білків задля зниження імуногенності. У 2003 р. компанія Invitroge адаптувала цю клітинну лінію до суспензійного росту у безсироватковому середовищі, отримав клітини НЕК 293 F. На основі НЕК 293 F компанія Octapharma створила виробничі клітини для продукції human-cl rhFVIII. НЕК 293 F стабільно трансфікували експресійною плазмідною, що кодує білок FVIII людини з видаленим В-доменом. Трансфектанти були відібрані, розширені та оптимізовані для максимальної експресії білка FVIII людини.

(джерело: The first recombinant human coagulation factor VIII of human origin: human cell line and manufacturing characteristics, E. Casademunt et al., 2012, адаптоване автором)

Overview Principal Description of the Nuwiq Purification Process

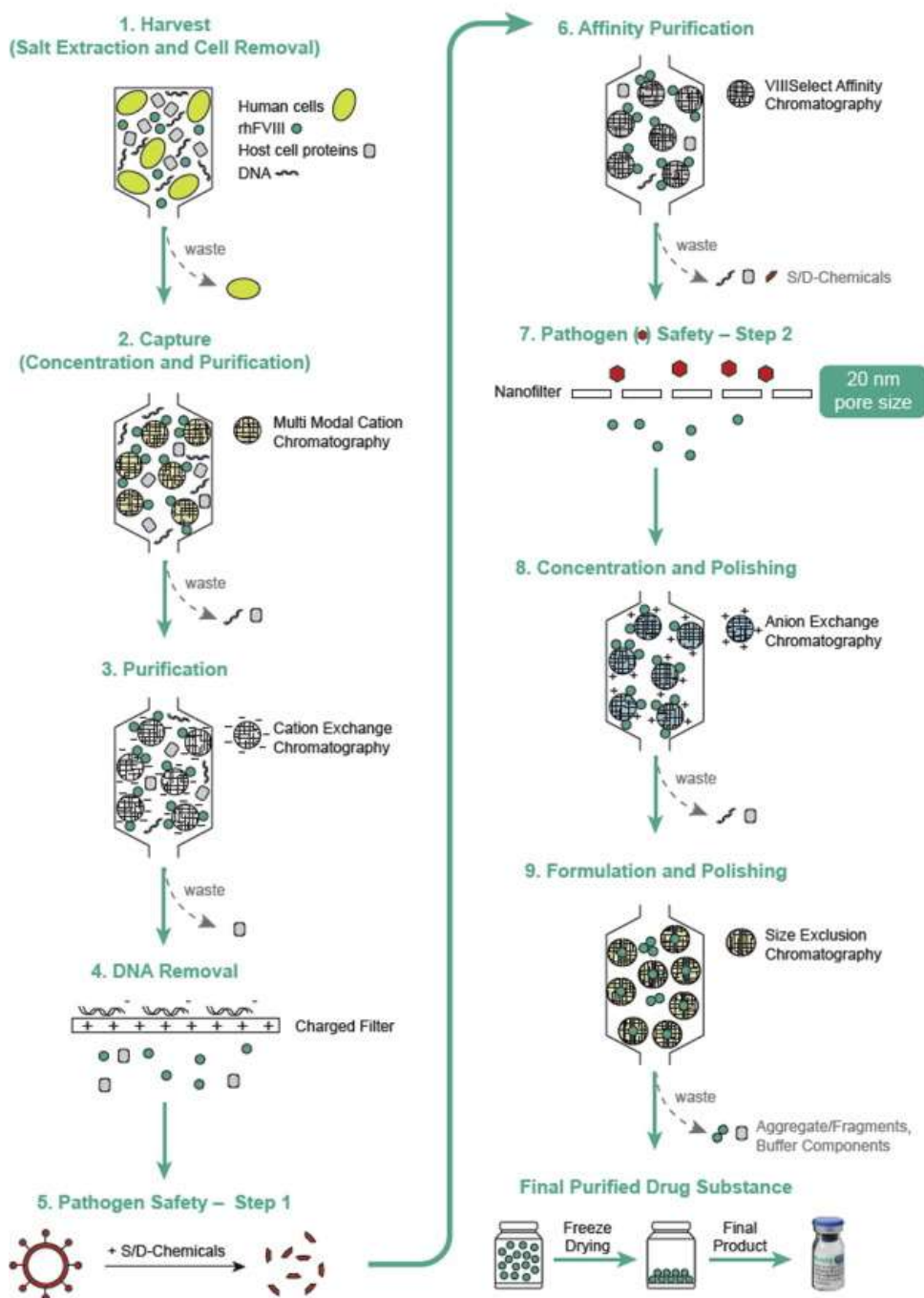


Рис. 3.3 - Етапи очищення human-cl rhFVIII (Nuwiq®)

(джерело: Development, upscaling and validation of the purification process for human-cl rhFVIII (Nuwiq®), a new generation recombinant factor VIII produced in a human cell-line / S. Winge et al., 2015)

Стадія 1. Культивування виробничих клітин HEK 293 F у колбах

Для експресії білка використовується запатентована лінія виробничих клітин HEK 293 F, отримання якої наведено на рис. 3.2. Для кожної виробничої серії Nuwiq® використовують флакон замороженого банку клітин із клітинами HEK293F. Клітини розморожують та розмножують за допомогою

запатентованого безсивороткового середовища у шейкерних колбах до отримання необхідної щільності клітин. Проводять кількісний і якісний аналіз виробництва rhFVIII клітинами та передають на стадію 2.

Стадія 2. Культивування посівної серії

Отриману на стадії 1 суспензію клітин переносять у посівний біореактор - інокулятор на 20 л. Посівний матеріал у реакторі вирощується у періодичному режимі з контролем таких параметрів, як тиск, температура, рН, рівень розчиненого кисню, вуглекислий газ, швидкість перемішування (3–30 Вт/м³). При досягненні необхідної щільності клітин проводять кількісний і якісний аналіз виробництва rhFVIII клітинами та суспензію передають на стадію 3.

Стадія 3. Виробниче культивування

Отриману на стадії 2 суспензію клітин переносять у виробничий біореактор – ферментер на 100 л. Виробнича культура у реакторі вирощується у періодичному режимі перфузії з використанням мембранної системи утримання клітин. Швидкість перфузії регулюють щодня (після кожного вимірювання щільності клітин для підтримки специфічної швидкості перфузії клітин) до моменту збору клітин у партії (вихідний матеріал для очищення). Протягом культивування проводиться контроль та підтримка на відповідному рівні таких параметрів, як тиск, температура, рН, рівень розчиненого кисню, вуглекислий газ, швидкість перемішування (3–30 Вт/м³). При досягненні необхідної щільності клітин проводять кількісний і якісний аналіз виробництва rhFVIII клітинами та суспензію передають на стадію 4.

Стадія 4. Збір культурального розчину (урожаю)

Для розділення клітин від експресованого ними rhFVIII проводять сольову екстракцію - до клітинної суспензії додають натрію хлорид. Клітини видаляють центрифугуванням та фільтрацією, а культуральний розчин - урожай, що містить компоненти середовища, ДНК та білки клітин-хазяїна, зокрема і експресований rhFVIII, передають на стадію 5.

Стадія 5. Первинне очищення та концентрування культурального розчину (урожаю)

При попередньому очищенні та концентруванні rhFVIII зв'язується з мультимодальною смолою, тоді як компоненти середовища, ДНК і білки клітин-господаря видаляються з колонки за допомогою етапів промивання.

Первинне очищення та концентрування (захоплення) продукту проводять на мультимодальній катіонообмінній хроматографічній колонці об'ємом 2 л (висота шару 15 см і діаметр 14 см), в яку вносять 150–200 кг вільного від клітин урожаю після врівноваження 0,3 М розчином NaCl при рН 7 зі швидкістю потоку 70 л/год. Додатково колонку промивають за допомогою поетапної процедури загальною кількістю 50 об'ємів колонки, знижуючи рН до 6,5 за допомогою різних концентрацій NaCl (0,3 М, 1 М, 0,1 М і 0,3 М). Остання промивка включає комбінацію аргініну (0,4 М) і етиленгліколю (10%). rhFVIII елюювали та збирали з колонки шляхом підвищення концентрації аргініну до 0,8 М. Потім колонку регенерують висококонцентрованим сольовим розчином в поєднанні з неіонним детергентом (0,5 М NaCl + 1% Triton X-100), низьким (1 М HAc) і високим (1 М NaOH) рН і зберігають у слабкому (0,05 М) розчині гідроксиду натрію до наступної виробничої партії.

Стадія 6. Катіонообмінне очищення фракції rhFVIII

При катіонообмінному очищенні фракція rhFVIII додатково очищується за допомогою негативно зарядженої хроматографічної смоли.

Катіонообмінну очистку проводять на колонці об'ємом 2 л (висота шару 12 см і діаметр колонки 14 см), в якій елюат з попередньої стадії розведений у десять разів до провідності, що дорівнює приблизно 0,1 М NaCl, рН 6,5, перед нанесенням на колонку, яка попередньо була врівноважена буфером 0,1 М NaCl, рН 6,5 при потоці 55 л/год. Колонку додатково промивають за допомогою поетапної процедури загальною кількістю 50 об'ємів колонки шляхом збільшення концентрації NaCl до 0,15 М. rhFVIII елюювали та збирали з колонки шляхом подальшого збільшення концентрації NaCl до 0,3

М. Потім колонку регенерували за допомогою висококонцентрованого сольового розчину в поєднанні з неіонним детергентом (0,5 М NaCl + 1% Triton X-100), низьким (0,1 М HAc) і високим (1 М NaOH) pH і зберігають у слабкому (0,05 М) розчині гідроксиду натрію до початку виробництва наступної партії.

Стадія 7. Видалення ДНК з фракції rhFVIII

Для видалення ДНК застосовують фільтрацію з позитивно зарядженою мембраною. У цьому процесі позитивно заряджений фільтр видаляє негативно заряджену ДНК.

3–4 л фракції, що містить rhFVIII з попередньої стадії, обробляють на аніонообмінній мембрані площею 2500 см², урівноваженої тим же розчином, що використовувався для елюювання FVIII на попередній стадії, при максимальному тиску 3 бари. rhFVIII вилучають у проточній фракції

Стадія 8. Вірусна інактивація фракції rhFVIII

Вірусна інактивація здійснюється хімічним методом (сольвент-детергентний метод, S/D method – solvent/detergent). 2–5 партії (10–25 кг) з попередньої стадії об'єднують та додають 1% Triton X-100 і 0,3 % три(н-бутил)фосфату (TnBP), перемішують при 22 °C протягом 30–60 хв. У випадку наявності оболонкових вірусів вони будуть інактивовані завдяки хімічному руйнуванню ліпідної оболонки. Інактивований розчин фракції rhFVIII передають на наступну стадію.

Стадія 9. Афінне очищення фракції rhFVIII

Ця стадія є основною стадією видалення практично усіх білків клітини-господаря. Використовують афінний ліганд нетваринного походження, який виробляється в клітинах дріжджів і є специфічним для FVIII.

Використовується афінна лігандна хроматографічна смола FVIII нетваринного походження (VIIISelect™ хроматографічна колонка). Афінну очистку проводять на колонці об'ємом 1,5 л (висота шару 10 см і діаметр 14 см), у яку наносять інактивований розчин фракції rhFVIII з попередньої стадії. Колонку попередньо врівноважують 0,3 М NaCl, буфером pH 6,5 при потоці

22 л/год. Колонку додатково промивають зі швидкістю потоку 55 л/год за допомогою поетапної процедури загальною кількістю 25 об'ємів колонки шляхом збільшення концентрації NaCl від 0,3 М до 1 М. rhFVIII елюювали та збирають з колонки шляхом додавання 50 % етиленгліколю. Після процесу колонку регенерують висококонцентрованим сольовим розчином (2 М NaCl) і розчином з низьким рН (0,15 М фосфорна кислота + 0,17 М НАс + 2,2% (об./об.) бензиловий спирт) і зберігають в розчині етанолу (20%) до наступної виробничої партії.

Стадія 10. Нанофільтрація фракції rhFVIII

Нанофільтрація забезпечує видалення вірусів (оболонкових та необолонкових). Пори розміром близько 20 нм мають здатність захоплювати всі патогени залежно від розміру, включаючи будь-які теоретично присутні невеликі віруси без оболонки (наприклад, парвовіруси), віруси з пошкодженою оболонкою, пріони тощо.

3–5 л фракції rhFVIII з попередньої стадії розбавляють в 10 разів (отримуючи концентрацію NaCl 0,1 М при рН 7,5). Розчин пропускають через нанофільтр площею 1 м² (Planova 20™), урівноважений буферним розчином 0,1 М NaCl, рН 7,5, під тиском 0,6–0,8 бар. rhFVIII виділяють у проточній фракції.

Стадія 11. Аніонообмінне очищення

Аніонообмінна хроматографія забезпечує концентрування продукту і подальше очищення продукту за рахунок використання позитивно зарядженої хроматографічної смоли.

Аніонообмінну очистку проводять на колонці об'ємом 0,5 л (висота шару 7 см і діаметр колонки 10 см), в яку вносять фільтрат rhFVIII з попередньої стадії. Колонку попередньо врівноважують буферним розчином 0,1 М NaCl, рН 7,5 при швидкості потоку 13 л/год. Надалі колонку промивають за допомогою поетапної процедури загальною кількістю 15 об'ємів колонки шляхом збільшення концентрації NaCl від 0,1 М до 0,3 М. rhFVIII елюють та збирають з колонки шляхом подальшого збільшення концентрації NaCl до 0,4

М. Після процесу колонку регенерують висококонцентрованим сольовим розчином (2 М NaCl) і високим рН (1 М NaOH) і зберігають в слабкому (0,01 М) розчині гідроксиду натрію до наступної виробничої партії. Концентрований rhFVIII передається на наступну стадію.

Стадія 12. Ексклюзійна хроматографія

Продукт rhFVIII отримують шляхом заміни буфера з використанням колонки ексклюзійної хроматографії видаляючи залишки білків клітини господаря та буферні компоненти (хімічні продукти реакцій очищення).

Ексклюзійну хроматографію проводять на колонці об'ємом 5 л (висота шару 60–70 см, діаметр колонки 10 см), у яку наносять 200–400 мл розчину rhFVIII з попередньої стадії. Колонку попередньо врівноважують розчином композиції (нативний буферний розчин цукру / амінокислоти / неіонного детергента при рН 7) зі швидкістю потоку 65 мл/хв. Мономерну фракцію rhFVIII збирають відповідно до часу утримування, виміряного поглинанням при 280 нм. Після процесу колонку регенерують висококонцентрованим сольовим розчином з високим рН (1 М NaOH) і зберігають в слабкому (0,01 М) розчині гідроксиду натрію до наступної виробничої партії. Кінцевий очищений та концентрований rhFVIII передають на стадії отримання лікарської форми.

Стадія 13. Ліофілізація та герметизація препарату

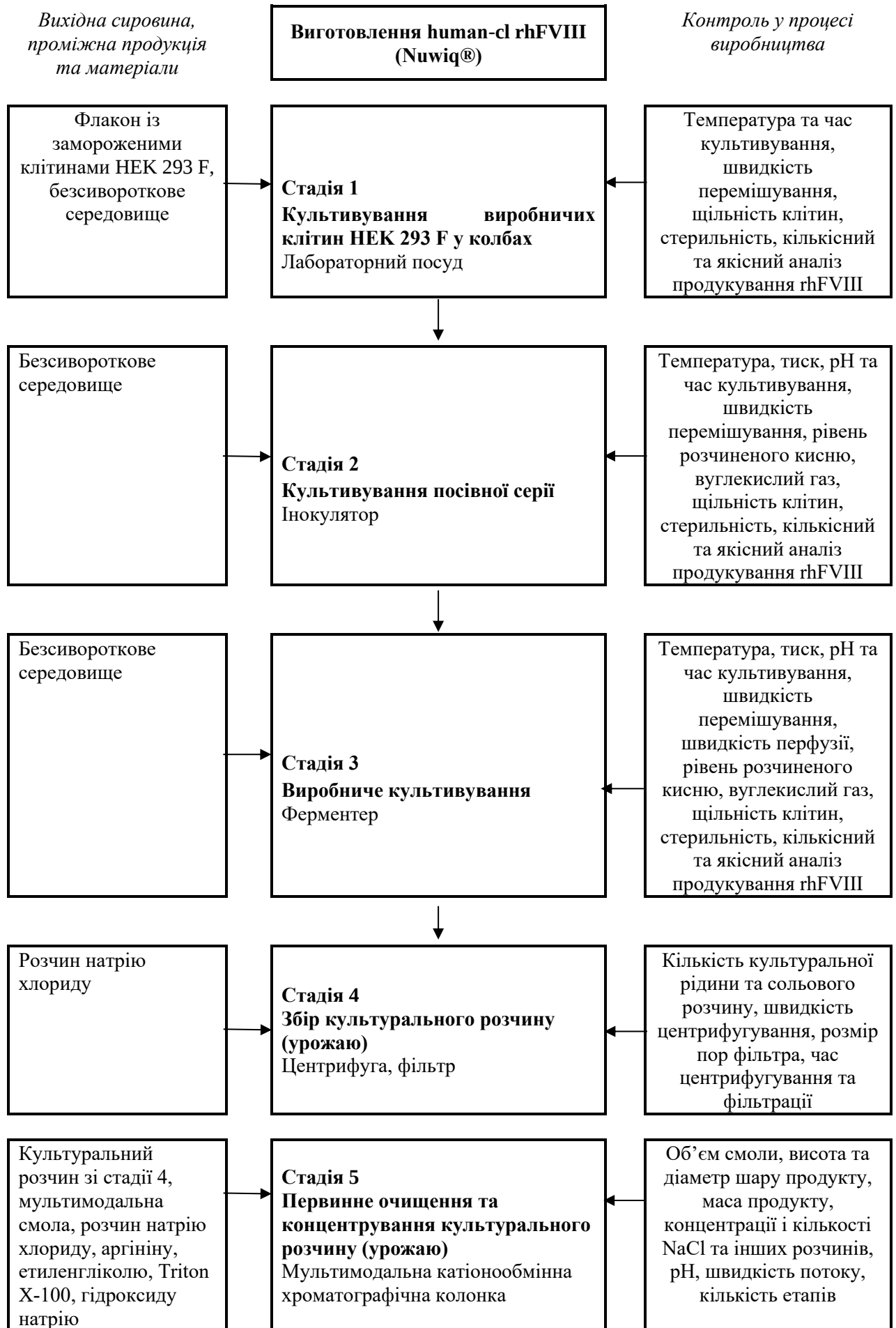
Препарат випускається у вигляді ліофілізованого порошку у флаконах (250 МО, 500 МО, 1000 МО, 2000 МО, 2500 МО, або 3000 МО). У комплекті: 1 флакон з порошком, 1 попередньо заповнений шприц з розчинником по 2,5 мл (вода для ін'єкцій) разом з комплектом для розчинення і внутрішньовенного введення (1 адаптер для відкриття флакона, 1 голка-метелик, 2 просочені спиртом тампони) в картонній коробці.

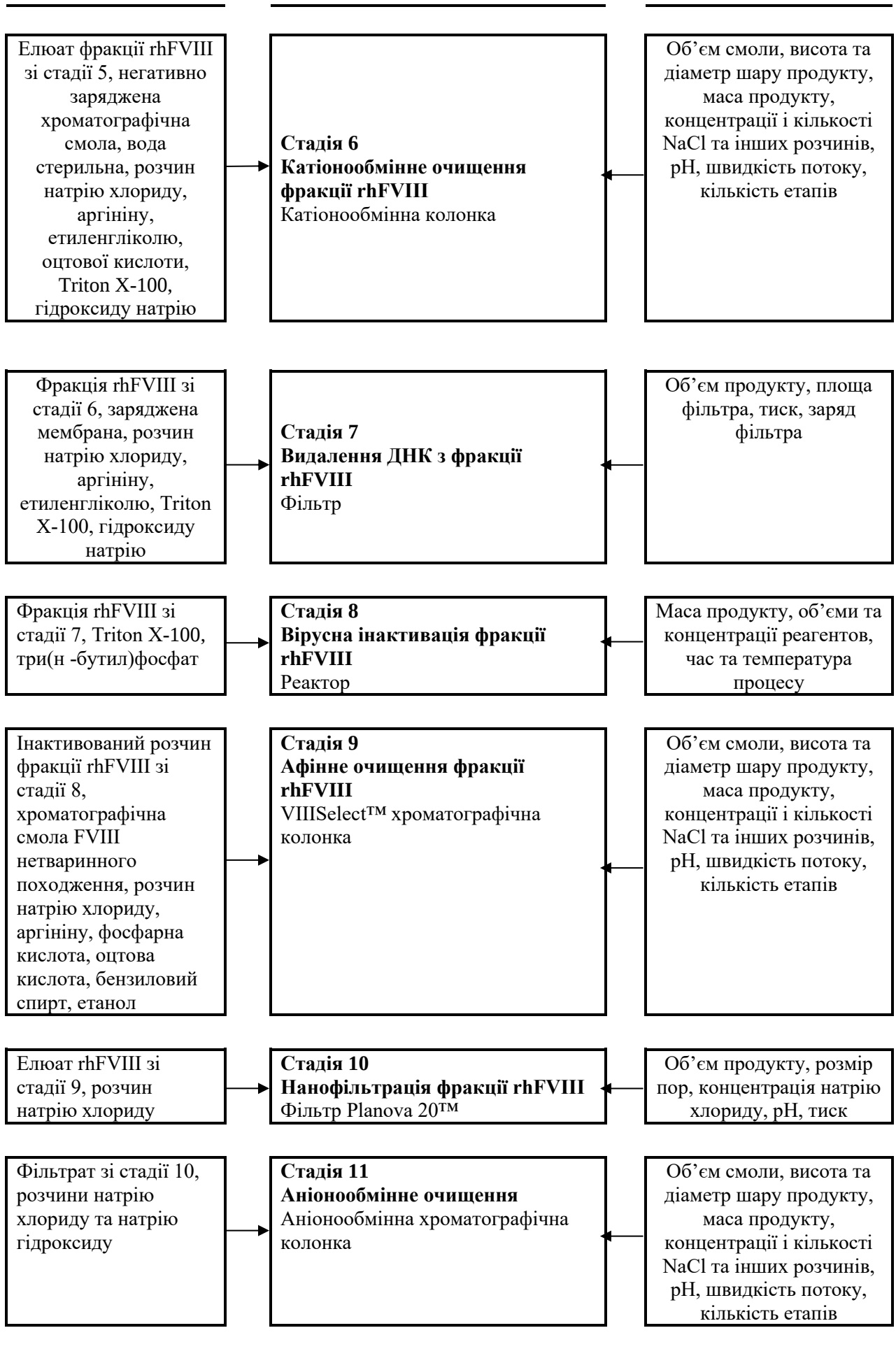
Для отримання лікарської форми кінцевий rhFVIII розливають у флакони та проводять етапи ліофілізації в ліофільній сушарці, що включають етапи заморожування при температурі $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ та вакуумі, при якому волога випаровується, оминаючи рідку фазу, та сушіння для швидкого випаровування

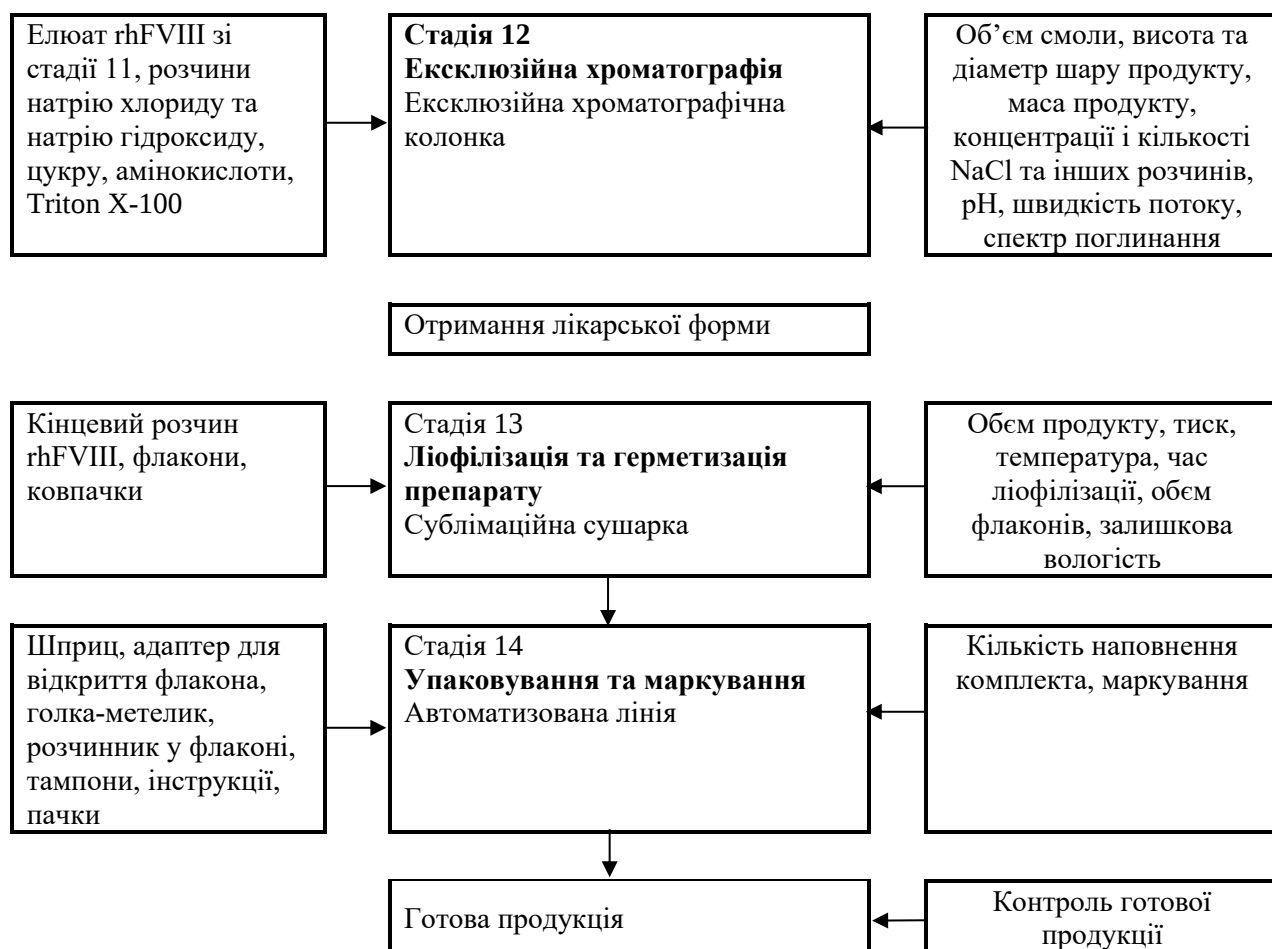
поверхневої вологи. Флакони укупорюють пробками та передають на стадії маркування та пакування готового препарату.

Надважливим процесом при виробництві рекомбінантних факторів крові є контроль всіх етапів виробництва та готового продукту, який включає визначення: вірусної безпеки, біологічної активності rhFVIII, кількісного вмісту антигену FVIII, кількісного вмісту ДНК, концентрацію загального білку, визначення білків клітини-господаря, специфічної активності rhFVIII, розподілу молекулярної маси, мономери rhFVIII, агрегати та фрагменти, кінетичні параметри афінного ліганду, речовин, що вимиваються із хроматографічних смол, смоли, що застосовуються на всіх етапах очищення.

Технологічна схема наведеної вище технології представлена на рис. 3.4.







Рисю 3.4 – Технологічна схема виробництва human-cl rhFVIII (Nuwiq®)

Висновок до 3 розділу

Лікування порушень функціонування системи згортання крові, зокрема гемофілії А та В, зазнало значного прогресу, починаючи з 1950-х років. Сучасні методи включають використання концентратів факторів коагуляції, плазмових препаратів та рекомбінантних факторів крові, що усувають ризик інфекцій.

Серед рекомбінантних факторів крові виділяють чотири покоління препаратів, від перших, які містять білки тваринного та людського походження, до четвертого покоління з подовженим періодом напіввиведення.

Основні етапи технології виробництва включають клонування генів, культивування клітин, очищення, формулювання та контроль якості. Виробництво супроводжується строгим контролем на кожному етапі, що

забезпечує високу якість препаратів.

Розвиток технологій включає вдосконалення клітинних ліній, процесів очищення, людський профіль глікозилювання, і впровадження нових стабілізаторів.

У виробництві рекомбінантних факторів крові застосовують клітинні лінії СНО, ВНК, та Нек-293, використання останніх дозволяє наблизити проблему розвитку імунногенності у пацієнтів до її вирішення. Також для подолання проблем розвитку інгібіторів та безпеки препаратів застосовують сучасні методи очищення, такі як нанофільтрація, багатоетапна хроматографія, які забезпечують безпечність продуктів; застосовують нові клітинні лінії та технології; впроваджують альтернативну терапію (моноклональні антитіла та генна терапія).

В Україні зареєстровано 7 препаратів факторів згортання крові (4 плазмові та 3 рекомбінантні), безкоштовне забезпечення пацієнтів здійснюється за програмою «Доступні ліки», та слід зазначити, що власного виробництва факторів крові немає.

У роботі проведено порівняння технологій виробництва препаратів першого покоління (Recombinate®) та четвертого покоління (Alprolix®). У виробництві препарату першого покоління використовуються клітини СНО; основна особливість – застосування альбуміну як стабілізатора, що є економічно вигідним, але має ризик вірусної контамінації; частота введення препарату висока (3–4 рази на тиждень) через короткий період напіввиведення. У виробництві препарату четвертого покоління використовуються клітини НЕК293 для синтезу факторів крові із людоподібними модифікаціями; інновація – кон'югація з Fc-фрагментом, що подовжує період напіввиведення до 1–2 тижнів; забезпечує менший ризик імунногенності, але вимагає складнішого та дорожчого виробництва.

Таким чином, проведене порівняння Recombinate® та Alprolix® дозволило виокремити переваги та недоліки препаратів, що може допомогти пацієнтам у виборі препарату. Перевагами препаратів першого покоління є

простіша технологія та нижча вартість виробництва, недоліками – висока частота введення, ризик імуногенності через використання альбуміну. Перевагами препаратів четвертого покоління є подовжений період напіввиведення, менший ризик імунної відповіді, недоліками – складний процес виробництва та висока вартість.

У роботі деталізовано технологічний процес виробництва рекомбінантного фактору крові новітнього покоління Nuwiq® (rFVIII), отриманого із людської клітинної лінії HEK 293 F, що забезпечує автентичну посттрансляційну модифікацію білка. Виробництво виключає використання продуктів тваринного походження, що знижує імуногенність. Аналіз наукових досліджень дозволив виокремити переваги виробництва препарату, а саме: використання клітин HEK 293 F, що забезпечує високу ефективність трансфекції та стабільність експресії білка, та адаптацію до безсироваткових середовищ, що забезпечує зниження ризику контамінації та покращення якості препарату; процес очищення включає багатоступеневе очищення (катионно- та аніонообмінна хроматографія, афінна очистка, нанофільтрація), що видаляє білки клітин-господарів, ДНК, віруси та інші домішки. Ці технології гарантують високу чистоту ($>0,9$ співвідношення активного FVIII до загального білка) та специфічну активність (>9000 МО/мг) препарату, а особливості структури білка (повна сульфатованість і людські глікани) забезпечують високу спорідненість до фактора фон Віллебранда, що підвищує стабільність білка, відсутність антигенних епітопів мінімізує ризик імуногенності.

На основі аналізу наукових статей та сайту виробника препарату була складена технологічна схема виробництва, що складається із наступних стадій: культивування виробничих клітин HEK 293 F у колбах, культивування посівної серії, виробниче культивування, Збір культурального розчину (урожаю), первинне очищення та концентрування культурального розчину (урожаю), катионообмінне очищення фракції rhFVIII, видалення ДНК з фракції rhFVIII, вірусна інактивація фракції rhFVIII, афінне очищення фракції rhFVIII,

нанофільтрація фракції rhFVIII, аніонообмінне очищення, ексклюзійна хроматографія, ліофілізація та герметизація препарату. Проведений аналіз дозволить вітчизняним виробникам використовувати сучасні світові досягнення для розробки власної технології виробництва факторів крові.

ВИСНОВКИ

1. Розглянуто та систематизовано сучасні технології виробництва, які базуються на клітинних лініях CHO, ВНК та HEK293. Виявлено, що сучасні процеси забезпечують високу ефективність та безпечність завдяки використанню вдосконалених методів культивування, очищення та стабілізації білків. Сучасні технології виробництва rFVIII та rFIX базуються на використанні клітинних ліній, які забезпечують стабільну експресію білків та можливість масштабного виробництва. Технології передбачають клонування гена, культивування клітин у біореакторах із суворим контролем умов, багатоступеневі методи очищення та формулювання кінцевого продукту. Для зниження імуногенності та підвищення ефективності використовуються інноваційні підходи, такі як видалення доменів білка, що не впливають на активність, але підвищують ризик утворення антитіл.

2. Виділено чотири покоління рекомбінантних факторів крові, де кожне наступне покоління спрямоване на зниження ризику імуногенності, збільшення періоду напіврозпаду препаратів та зручність лікування. Препарати першого покоління містять білки тваринного чи людського походження, що збільшує ризик імуногенності. Друге покоління позбавлене білків у кінцевому продукті, а третє - виключає їх і під час культивування. Четверте покоління (наприклад, Nuwiq®) створено з використанням клітин людського походження, що усуває антигенні епітопи нелюдського походження, забезпечує подовжений період напіврозпаду та зручність у використанні.

3. На світовому ринку представлено широкий спектр препаратів rFVIII та rFIX, таких як Eloctate®, Alprolix®, Adynovate®. Препарати різняться за поколіннями, періодом напіврозпаду, методами очищення та стабілізації. Лідери ринку пропонують інноваційні рішення, наприклад, кон'югацію з Fc-фрагментами або пегіляцію, що подовжує тривалість дії препаратів, зменшує частоту введень та підвищує якість життя пацієнтів.

4. СНО та ВНК-клітини є стандартом у виробництві рекомбінантних білків, завдяки їхній стабільності та високій продуктивності. Однак клітини НЕК293 мають перевагу у створенні білків із людоподібними посттрансляційними модифікаціями (глікозилювання, сульфатування), що суттєво знижує імуногенність продуктів. НЕК293 F, адаптовані до безсироваткових умов, забезпечують високу ефективність виробництва та зменшення ризику контамінації.

5. Подовження періоду напіврозпаду досягається за рахунок пегіляції або кон'югації з Fc-фрагментами, що дозволяє рідше вводити препарат. Висока спорідненість до фактора фон Віллебранда, досягнута завдяки повній сульфатованості та людським гліканам, підвищує стабільність білків у кровотоці. Ці підходи забезпечують зниження ризику імунних реакцій та збільшують терапевтичну ефективність.

6. Багатоступеневе очищення білків включає катіонно- та аніонообмінну хроматографію, афінну очистку з використанням специфічних лігандів, нанофільтрацію для видалення вірусів. Ці методи забезпечують високу чистоту (>99%), зниження рівня домішок (ДНК, білки клітин-господарів) та гарантують безпечність кінцевого продукту.

7. В Україні доступні як плазмові, так і рекомбінантні препарати для лікування гемофілії, зареєстровано 7 основних препаратів рекомбінантних та плазмових факторів крові, які доступні пацієнтам безкоштовно за програмою «Доступні ліки». Однак власного виробництва подібних препаратів немає, що створює залежність від імпорту. Пацієнти забезпечуються препаратами безкоштовно за державними програмами, проте їхня кількість часто є обмеженою.

8. Препарати першого покоління виробляються із залученням білків тваринного чи людського походження, що збільшує ризик передачі інфекцій та утворення антитіл. Препарати четвертого покоління усувають ці недоліки за рахунок використання клітин людського походження та сучасних методів очищення, що підвищує безпечність і ефективність.

9. Human-cl rhFVIII, Nuwiq® виробляється на основі клітин HEK293 F з використанням запатентованих методів трансфекції, культивування та багатоступеневого очищення. Препарат демонструє високу стабільність, низький ризик імуногенності, доступний у різних дозуваннях і схвалений для використання у всіх вікових групах. На прикладі Human-cl rhFVIII показано, що використання клітин HEK293 F, багатоступневих методів очищення та сучасних підходів до культивування забезпечує отримання високоякісного продукту з мінімальним ризиком імуногенності.

10. На основі аналізу наукових джерел запропонована технологічна схема виробництва Human-cl rhFVIII, Nuwiq® включає етапи створення банків клітин, культивування у безсироваткових середовищах, багатоступеневе очищення та формулювання кінцевого продукту. Рекомендовано впровадити цю схему на вітчизняних підприємствах для зменшення залежності від імпорتنих препаратів та забезпечення потреб пацієнтів в Україні.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Безоплатні ліки та медвироби : Медичні закупівлі України. URL: <https://mpu.gov.ua/uk/patients/catalog> (дата звернення: 10.12.2024).
2. Вільчевська К. В. Гемофілія в Україні: проблеми, досягнення та перспективи. *Health-ua.com*. 2021. URL: <https://health-ua.com/article/65639-gemofliya-vukran-problemi-dosyagnennya-taperspektivi> (дата звернення: 10.12.2024).
3. Державний експертний центр Міністерства охорони здоров'я України : офіційний сайт. URL: <https://www.dec.gov.ua/> (дата звернення: 01.12.2024).
4. Державний реєстр лікарських засобів України : офіційний сайт. URL: <http://www.drlz.com.ua/ibp/ddsite.nsf/all/shlist?opendocument&sklad=%F0%E8%F2%F3%EA%F1%E8%EC%E0%E1> (дата звернення: 20.11.2024).
5. Державна Фармакопея України / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2-ге вид. Допов. 6. Харків : ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2023. 422 с.
6. Дослідження на фармацевтичному ринку України асортименту біологічних лікарських засобів, що містять діючі речовини, отримані з плазми крові людини та тварин / О. О. Салій та ін. *Фармацевтичний журнал*. 2020. Т. 75, № 4. С. 18-29.
7. Дудна Д., Стернберг С. Зламати ДНК. Редагування генома та контроль над еволюцією / пер. Г. Литвиненко. Київ : Наш формат, 2019. 296 с.
8. Краснопольський Ю. М., Пилипенко Д. М. Фармацевтична біотехнологія: сьогодення та майбутнє : навч. посіб. для студентів біотехнологічних спец. Харків : Друкарня Мадрид, 2022. 151 с.
9. Методичні рекомендації до виконання кваліфікаційної роботи магістра для здобувачів вищої освіти спеціальності 162 «Біотехнології та

біоінженерія» ОП «Промислова біотехнологія» / Н. В. Хохленкова та ін. Харків : НФаУ, 2022. 40 с.

10. Настанова з лікування гемофілії / А. Шривастана та ін. 3-тє вид. ; Всесвітня федерація гемофілії. Київ, 2020. 190 с. URL: <https://www1.wfh.org/publications/files/pdf-1922.pdf> (дата звернення: 10.12.2024).

11. Пегільований рекомбінантний повноланцюговий фактор згортання VIII із подовженим періодом напіввиведення у лікуванні дітей з тяжкою формою гемофілії / А. Е. S. Mullins та ін. *Health-ua.com*. 2021. URL: <https://health-ua.com/article/64579-peglovanij-rekombnntnij-povnolantcyugovij-faktor-zgortannyaVIII-zpodovzhen> (дата звернення: 10.12.2024).

12. Півень О. О., Скоробогатова З. М. Сучасні інструменти редагування геному з основами молекулярної генетики : навч. посіб. Київ : Біокомполіт, 2021. 178 с.

13. Пономарьов П. Х., Притульська Н. В., Донцова І. В. Генетично модифіковані організми: трансгенні культури, ферментні препарати, харчові продукти : монографія. Київ : Київ. нац. торг.-екон. ун-т, 2014. 208 с.

14. Попова М. Е., Пальчевська Т. А., Тарасенко Г. В. Дослідження на фармацевтичному ринку України асортименту біологічних лікарських засобів, що містять діючі речовини, отримані з плазми крові людини та тварин *Фармацевтичний журнал*. 2020. Т. 75, № 4. С. 18-29.

15. Шурко Н. О., Вороняк М. І., Даниш Т. В. Препарати фактора згортання крові VIII та способи їх отримання. *Studia Biologica*. 2014. № 8 (1). Р. 197-204. URL: https://www.researchgate.net/publication/330988903_preparati_faktora_zgortanna_krovi_viii_ta_sposobi_ih_otrimanna (дата звернення: 25.11.2024).

16. Про безпеку та якість донорської крові та компонентів крові : Закон України від 12.01.2022 № 1962-IX. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/931-20#n249> (дата звернення: 01.12.2024).

17. Про затвердження порядку контролю за дотриманням показників безпеки та якості донорської крові та її компонентів : Наказ МОЗ України від 09.03.2010 № 211. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0368-10#Text> (дата звернення: 01.12.2024).

18. Про затвердження Порядку скринінгу донорської крові та її компонентів на гемотрансмісивні інфекції : Наказ МОЗ України від 19.02.2013 № 134. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0365-13#Text> (дата звернення: 01.12.2024).

19. Про лікарські засоби : Закон України. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/2469-20#Text> (дата звернення: 01.12.2024).

20. Про затвердження Положення про контроль за відповідністю імунобіологічних препаратів, що застосовуються в медичній практиці, вимогам державних та міжнародних стандартів : Постанова КМУ від 15 січня 1996 р. № 73. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/73-96-%D0%BF#Text> (дата звернення: 01.12.2024).

21. Шапран Ю. П. Біотехнологія, генна інженерія : навч.-метод. посіб. Переяслав-Хмельницький : Домбровська Я., 2019. 132 с.

22. Advances and challenges in the purification of recombinant coagulation factors: A review / Y. Linling et al. *Journal of Chromatography A*. 2024. Vol. 1716. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2024.464662>.

23. Approval, check. Now, can BioMarin make a commercial success of its hemophilia A gene therapy in Europe? URL: <https://www.fiercepharma.com/pharma/epic-accomplishment-biomarins-roctavian-becomes-europes-1st-hemophilia-gene-therapy-us> (Date of access: 01.12.2024).

24. BioMarin Announces Advancements in FDA Review of ROCTAVIAN™ (Valoctocogene Roxaparvovec) for Adults with Severe Hemophilia A. URL: <https://investors.biomin.com/2022-11-23-BioMarin-Announces-Advancements-in-FDA-Review-of-ROCTAVIAN-TM-Valoctocogene-Roxaparvovec-for-Adults-with-Severe-Hemophilia-A> (Date of access: 01.12.2024).

25. Beyond borders: EY biotechnology report 2024. URL: https://www.ey.com/en_us/life-sciences/biotech-outlook (Date of access: 01.12.2024).

26. Biologicals: finished product : European Medicines Agency. URL: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/research-development/scientific-guidelines/biologicals/biologicals-finished-product> (Date of access: 01.12.2024).

27. Biotherapeutics: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. URL: <https://www.edqm.eu/en//biotherapeutics> (Date of access: 01.12.2024).

28. Blood products : World Health Organisation. URL: https://www.who.int/health-topics/blood-products#tab=tab_1 (Date of access: 01.12.2024).

29. Classification of recombinant factor VIII products and implications for clinical practice: A systematic literature review / Ay Cihan et al. *Haemophilia*. Vol. 30, Iss. 3 P. 577–588. DOI: 10.1111/hae.15001.

30. Critical Evaluation of Strategies for the Production of Blood Coagulation Factors in Plant-Based Systems / O. Top et al. *Frontiers in Plant Science*. 2019. Vol. 10. DOI: 10.3389/fpls.2019.00261.

31. Development, upscaling and validation of the purification process for human-cl rhFVIII (Nuwiq®), a new generation recombinant factor VIII produced in a human cell-line / S. Winge et al. *Protein Expression and Purification*. 2015. Vol. 115. P.165–175. DOI: 10.1016/j.pep.2015.08.023 (Date of access: 15.12.2024).

32. Dimeric Organization of Blood Coagulation Factor VIII bound to Lipid Nanotubes / D. Dalm, et al. *Scientific Reports*. 2015. Vol. 5(11212). DOI: 10.1038/srep11212.

33. EU/3/16/1752 - orphan designation for treatment of haemophilia A : European Medicines Agency. URL: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/orphan-designations/eu-3-16-1752> (Date of access: 01.12.2024).

34. Factor VIII – referral : European Medicines Agency. URL: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/referrals/factor-viii> (Date of access: 01.12.2024).

35. Graf L. Extended Half-Life Factor VIII and Factor IX Preparations. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2018. Vol. 45(2). P. 86–91. DOI: 10.1159/000488060.

36. Hemostasis and bleeding disorders Organisation. URL: https://www.amboss.com/us/knowledge/Hemostasis_and_bleeding_disorders (Date of access: 01.12.2024).

37. Identification of novel glycosylation events on human serum-derived factor IX / C. L. Pegg et al. *Glycoconjugate Journal*. 2020. Vol. 37. P. 471–483. DOI: 10.1007/s10719-020-09922-2.

38. Joint United Kingdom (UK) Blood Transfusion and Tissue Transplantation Services Professional Advisory Committee. URL: <https://www.transfusionguidelines.org/transfusion-handbook/3-providing-safe-blood/3-3-blood-products> (Date of access: 01.12.2024).

39. Lenting P. J., Denis C. V., Christophe O. D. Emicizumab, a bispecific antibody recognizing coagulation factors IX and X: how does it actually compare to factor VIII? *Blood*. 2017. Vol. 130(23). P. 2463–2468. DOI: 10.1182/blood-2017-08-801662.

40. Lymphocyte : National Human Genome Research Institute. URL: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Lymphocyte> (Date of access: 01.12.2024).

41. Immunoglobulins : Medical Microbiology. URL: <https://myplace.frontier.com/~dffix/medmicro/igs.htm> (Date of access: 01.12.2024).

42. National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information Human. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK236299/> (Date of access: 01.12.2024).

43. Nelwan M. Hemophilia A and Induced Pluripotent Stem Cells. *Journal of Advances in Biology & Biotechnology*. 2017. Vol. 14. P. 1–11. DOI: 10.9734/JABB/2017/35111.

44. Octapharma announces FDA approval of updated NUWIK® Prescribing Information to include immunogenicity data in previously untreated patients : Octapharma. URL: <https://www.octapharma.com/news/press-release/2020/fda-approval-of-updated-nuwiq-to-include-immunogenicity-data-in-pups/> (Date of access: 15.12.2024).

45. Pray L. A. Restriction enzymes are one of the most important tools in the recombinant DNA technology toolbox. But how were these enzymes discovered? And what makes them so useful? *Nature Education*. 2008. Vol. 1(1). P. 38. URL: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/restriction-enzymes-545/> (Date of access: 25.11.2024).

46. Swiech K., Picanço-Castro V., Covasb D. T. Production of recombinant coagulation factors: Are humans the best host cells? *Bioengineered*. 2017. Vol. 8(5). P. 462–470. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5639856/> (Date of access: 01.12.2024).

47. The FDA Just Approved The Most Expensive Drug in The World. URL: <https://www.sciencealert.com/the-fda-just-approved-the-most-expensive-drug-in-the-world> (Date of access: 25.11.2024).

48. The first recombinant human coagulation factor VIII of human origin: human cell line and manufacturing characteristics / E. Casademunt et al. *European Journal of Haematology*. 2012. Vol. 89. P. 165–176. DOI: 10.1111/j.1600-0609.2012.01804.x.

49. U.S. Food and Drug Administration, FDA, USFDA. URL: <https://www.fda.gov/> (Date of access: 15.11.2024).

50. World Federation of Hemophilia. URL: <https://wfh.org/> (Date of access: 01.12.2024).

51. World Health Organization. URL: <https://www.who.int/> (Date of access: 10.12.2024).

52. WHO Model Lists of Essential Medicines. World Health Organization.
URL: <https://www.who.int/groups/expert-committee-on-selection-and-monitoring> (Date of access: 01.12.2024).

ДОДАТОК

Публікації за темою роботи

Секція 6
«СУЧАСНА БІОТЕХНОЛОГІЯ»

ТЕНДЕНЦІЇ РОЗВИТКУ ТЕХНОЛОГІЙ ВИРОБНИЦТВА РЕКОМБІНАНТНИХ ФАКТОРІВ КРОВІ

Чернецький А. В.

Науковий керівник: Калюжная О. С.

Національний фармацевтичний університет, Харків, Україна
kalyuzhnayao.s@gmail.com

Вступ. Фактори згортання крові зафіксовані у всіх формених елементах крові (тромбоцитах, еритроцитах, лейкоцитах). За міжнародною номенклатурою плазменні фактори згортання крові позначаються римськими цифрами з урахуванням хронології їхнього відкриття. Усі фактори поділяють на дві групи: ферменти – фактори XII, XI, X, VII, II, неферменти – фактори I, IV, V, VIII (фактор I є білком фібриногеном, який виконує важливішу функцію у формуванні згустку крові, інші (IV, V, VIII) є активаторами ферментативних процесів).

Порушення утворення певних факторів, зниження їхньої активності є причиною складних захворювань: афібриногенемія – FI, парагемофілія – FV, гемофілія А – FVIII, гемофілія В (хвороба Крістмаса) – FIX, гемофілія С (хвороба Розенталя) – FXI, дефект Хагемана – FXII. Вони відносяться до орфаних генетичних або набутих невиліковних хвороб, єдиним методом лікування яких є пожиттєва замісна терапія.

Поширеність гемофілії у різних країнах світу є приблизно однаковою – 24,5 випадку гемофілії А на 100 тис. новонароджених хлопчиків, а гемофілії В – майже в 5 разів менше. У світі нараховується близько 418 тис. хворих на тяжку форму гемофілії А та В. Однак якщо до загальної кількості цих пацієнтів додати кількість хворих на гемофілію легкої та середньої тяжкості, то вона перевищить 1,1 млн. В Україні на обліку перебувають понад 2 тис. пацієнтів з гемофілією (більшість із них мають тяжку форму хвороби).

Сучасне лікування гемофілії почалося з середини 1960-х рр., коли було відкрито кріопреципітат та виявлено, що при повільному розморожуванні замороженої плазми утворюються осад, що містить FVIII. З 1990-х рр. стали доступні рекомбінантні концентрати, отримані методами генної інженерії. Це подолало найважливішу проблему застосування препаратів крові – можливість заразитися гемотрансмісійними інфекціями (ГТІ). У багатьох країнах лікування рекомбінантними препаратами є стандартом лікування.

Мета дослідження. Аналіз сучасних тенденцій у виробництві рекомбінантних факторів згортання крові з подальшою розробкою технологічної схеми виробництва, яка може бути реалізована вітчизняними підприємствами.

Матеріали та методи. Аналіз наукових публікацій з відкритих джерел та сайтів компаній виробників та їх систематизація.

Результати дослідження. Рекомбінантні фактори за етапами технологічного одержання поділяють на три покоління: I – містять білки людини чи тварин, як у культуральному середовищі, так і в кінцевому продукті; II – містять білок лише в культуральному середовищі, але не в кінцевому продукті; III – повністю позбавлені білка як у культурі, так і в кінцевому продукті.

При виробництві рекомбінантних препаратів I покоління застосовують клітинну культуру, що додатково містить білки тварин чи людини, продукт також містить альбумін людини, який додається як стабілізатор. Перший рекомбінантний фактор крові rFVIII (Recombinate®, Рекомбінат, Baxter Healthcare, Австрія) було ліцензовано у 1992 р.

Рекомбінантні препарати II покоління rFVIII (Kogenate®FS, Коджинейт Байер, Bayer Corp., Німеччина) містять як стабілізатор замість альбуміну сахарозу, гліцин, гістидин і кальцій та в процесі їх одержання використовують сольвент-детергентний метод вірусної інактивації.

Але поряд із проблемою вірусної безпеки існує інше клінічне ускладнення замісної терапії – це виникнення інгібіторних антитіл, наявність яких може спричинити неефективність замісної терапії, чого позбавлені препарати III покоління. Так, у виробництві препаратів III покоління rFVIII (наприклад, ReFacto AF®, Рефакто АФ, Genetics Institute, США) повністю виключений альбумін, моноклональні антитіла були замінені на синтетичні пептиди та введено додатковий етап вірусної інактивації нанофільтрацію (фільтри з розміром пор 15 – 25 нм), що дає змогу позбутися ретровірусів.

Рекомбінантні препарати першого – третього покоління відносяться до класу продуктів зі стандартним періодом напіввиведення (фактор, який зберігається в організмі стільки ж часу, скільки природний фактор). Використання звичайних рекомбінантних препаратів через день чи тричі на тиждень викликає незручності для пацієнтів. Тому для забезпечення довшого періоду розроблені препарати з подовженим періодом, які можна віднести до рекомбінантних препаратів четвертого покоління. До продуктів з пролонгованим періодом напіврозпаду відносяться Eclatate®, Biogen Idex, Швейцарія, та Adynovate®, Адіновейт, Takeda Pharmaceutical Company, Японія.

Рекомбінантні препарати одержують шляхом введення генів фактора крові людини в геном клітин яєчника китайського хом'яка (Chinese hamster ovary (CHO)) або в клітини нирки новонародженого хом'яка (Baby hamster kidney (BHK)). Клітинна лінія секритує фактор крові у культуральне середовище, яке піддається низці процесів очищення комбінацією іонообмінної, гель-проникної та афінної хроматографії. Синтезовані рекомбінантні фактори за структурою ідентичні плазмовому.

Але рекомбінантні терапевтичні білки, вироблені в клітинах, відмінних від людини, можуть містити гліканові епітопи, які є антигенними для людини і можуть потенційно вплинути на ефективність рекомбінантного продукту. Прагнучи до людського профілю глікозилювання, покращуючи таким чином функцію та знижуючи імуногенність, Octapharma AG розробила перший rFVIII, експресований у клітинній лінії людини (HeK293) – Nuwiq®, який був схвалений у 2015 р. FDA як перший продукт IV покоління. Культивування клітин проводиться з використанням середовища, що не містить сироватки, без добавок тваринного або людського походження, ризик вірусного зараження кінцевого продукту майже незначний, так як процес очищення включає 5 хроматографічних етапів і 2 етапи видалення будь-яких теоретично наявних вірусів. Також проводяться дослідження з клітинними лініями печінки людини (SK-HEP і HepG2), клітинною лінією, що є гібридом HEK293 і лінії В-клітин людини (HKB-11).

Окрім різних препаратів rFVIII (виведено на ринок 12 комерційних препаратів) розроблені препарати rFIX (ліцензовано 6 препаратів: Alprolix®, Bioverativ Therapeutics, Inc, США; BeneFix®, Бенефікс, Pfaizer, США; Idelvion®, CSL Behring Lengnau AG, Швейцарія; Ixinity®, Medexus Pharma, Inc., Канада; Rebinyn®, Novo Nordisk, Данія; Rixubis®, Пікеубіс, Baxalta Innovations GmbH, Австрія), rFVIIa (NovoSeven®, НовоСебен, Novo Nordisk, Данія) та нефакторних препаратів, застосування яких дозволяє знизити навантаження на хворого від необхідності частого введення препаратів крові (прикладом є зареєстрований в Україні препарат Hemlibra®, Гемлібра, MHH: Emicizumab (Еміцизумаб), F. Hoffmann-La Roche Ltd, Швейцарія).

Також слід відмітити досягнення генної терапії. Так, у серпні 2022 р. американська біотехнологічна компанія BioMarin Pharmaceutical Inc. отримала умовний дозвіл від Європейської комісії на маркетинг генної терапії Roctavian™ (Valoctocogene Roxaparvovec) для лікування тяжкої гемофілії А у дорослих пацієнтів, а у листопаді 2022 р. FDA схвалило перший препарат для лікування гемофілії В – Hemgenix від біофармацевтичного гіганта в галузі виробництва плазменних та рекомбінантних препаратів крові CSL Behring.

Висновки. Єдиним методом лікування хворих на порушення утворення факторів крові є позитивна замісна терапія. На сьогоднішній день у багатьох країнах використання рекомбінантними препаратами є стандартом лікування. Для зменшення побічних ефектів та покращення ефективності препаратів проводиться удосконалення технології виробництва. Серед останніх тенденцій у лікуванні порушень утворення факторів крові можна виокремити оцінку нових ліній людських клітин для виробництва рекомбінантних факторів крові та розвиток методів генної терапії.

БІОЛОГІЧНІ МАТЕРІАЛИ ВІДОМИХ ЛЮДЕЙ, ЯК ФАКТОР МАРКЕТИНГУ

Шгоян М. Х.

Науковий керівник: Філіпцова О. В.

Національний фармацевтичний університет, Харків, Україна

shgoyanmilana@gmail.com

Вступ. Парфуми на честь знаменитостей стали популярними в парфумерній індустрії і часто асоціюються з брендами, які відображають стиль та імідж конкретної знаменитості. Ці аромати, як правило, створюються у співпраці з парфумерами, щоб передати особистість та імідж знаменитості, і часто мають особливу символіку та натхненні її особистим життям та кар'єрою.

Мета дослідження. Аналіз ефективності брендингу парфумів, пов'язаних із відомими людьми.

Матеріали та методи. Виконання даного дослідження проводилося за допомогою літературного огляду наукових статей, джерел з інтернет-ресурсів.

Результати дослідження. Завдяки біотехнологіям можна отримувати ароматичні компоненти, які зазвичай видобуваються з природних джерел (наприклад, квітів або дерев). Це органічні сполуки, такі як ванілін, лавандова олія або ефірні олії цитрусових, які можна отримати шляхом мікробіологічного бродіння, генетичної модифікації бактерій або дріжджів. Генетично модифіковані організми (ГМО) дозволяють створювати нові аромати, які неможливо або дуже затратно отримати звичайними методами. Біотехнологічні методи дозволяють знизити навантаження на природу, так як зменшують необхідність в масовому вирощуванні рослин, а також зменшення необхідності тварин для отримання парфумерних інгредієнтів тваринного походження.

Процес починається з того, що парфумери або парфумерні бренди звертаються до знаменитості або її команди для створення парфуму, який буде асоціюватися з її ім'ям. Це може бути результатом контракту, співпраці або маркетингової стратегії. Багато знаменитостей мають певну роль у процесі вибору ароматів, інгредієнтів і навіть у розробці упаковки. Парфумери працюють разом з командою знаменитості, щоб створити аромат, який найкраще відображатиме її стиль, характер і публічний імідж. Наприклад, якщо знаменитість



Міністерство
охорони здоров'я
України

Національний
фармацевтичний
університет



СЕРТИФІКАТ

Цим засвідчується, що

Чернецький А. В.

**Науковий керівник:
Калюжная О. С.**

брав(ла) участь у роботі IV Всеукраїнської
науково-практичної конференції
з міжнародною участю

**YOUTH
PHARMACY
SCIENCE**

Ректор НФаУ,
д. фарм. н., проф.



Алла КОТВИЦЬКА

10-11 грудня 2024 р.
м. Харків,
Україна