

В.В.ВДОВИН, Гематологическое консультативно-диагностическое отделение
Измайловской ДГКБ Департамента здравоохранения г. Москвы

Вирусная безопасность

КОНЦЕНТРАТОВ**ФАКТОРОВ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ****ГЕМОФИЛИИ НА СОВРЕМЕННОМ ЭТАПЕ**

История лечения гемофилии насыщена сенсационными открытиями и трагическими событиями, послужившими поводом к биотехнологической революции в переработке человеческой плазмы и генной инженерии.

В 40-х — 50-х годах прошлого века начались первые испытания по заместительной терапии при гемофилии с использованием фракций человеческой плазмы, полученных по методу Кона, и животных антигемофильных глобулинов [1].

В 1956 г. шведскими учеными из человеческой плазмы глициновым методом Blombacks был получен концентрат в виде фракции I-0, обладающий хорошим клиническим эффектом при лечении кровотечений у больных гемофилией А, включая хирургические операции [2].

В 1959 г. Pool и Robinson из свежзамороженной человеческой плазмы получили криопреципитат как источник фактора VIII, который с середины 60-х годов прошлого столетия стал препаратом, широко используемым во всем мире с гемостатической целью при гемофилии А. Активность одной дозы была очень низкая, что затрудняло дозирование препарата [2,8].

Большие объемы препаратов для обеспечения гемостатического эффекта, пирогенные и аллергические реакции были основными недостатками и осложнениями при применении препаратов первого поколения [1].

В конце 60-х годов криопреципитат стал использоваться для получения более активного лиофилизированного концентрата с активностью фактора VIII 1—5 МЕ на мг белка, что также было далеко до идеального препарата в лечении кровотечений [2].

Для лечения гемофилии В применялась нативная замороженная плазма (НЗП), а с конца 60-х годов концентраты факто-

ра IX, полученные модифицированным методом Tullis с использованием ДЕАЕ-целлюлозы [2].

Появились новые риски осложнений в виде гемолиза и тромбозов [1].

Тем не менее, препараты американских и европейских фирм стали широко использоваться у больных гемофилией, включая домашнее и профилактическое лечение, тем самым радикально улучшив качество жизни пациентов с гемофилией.

Заводы производили концентраты факторов из больших пулов плазмы от нескольких тысяч доноров. Вирусная безопасность полученных препаратов не принималась во внимание. Инфицированными гепатитами В и С, ВИЧ-инфекцией оказались тысячи пациентов с гемофилией. Таким образом, колоссальный прогресс в лечении гемофилии обернулся эпидемиологической трагедией для больных гемофилией во многих странах мира [1, 2, 7].

Почти 10-летний бум роста производственных мощностей по переработке человеческой плазмы в развитых странах мира в 70-х годах был временно приостановлен. Мировая наука и производство объединились для решения актуальных социальных проблем здравоохранения.

С начала 80-х годов активизировались исследования по внедрению в технологию плазмопроизводства методов вирусной инаktivации самой плазмы и ее продуктов. Акцентируется внимание на возможностях получения более чистых концентратов факторов VIII и IX, включая достижения генной инженерии в получении рекомбинантных препара-

тов. И уже начиная с 1983—1984 гг. ведущие фирмы по производству концентратов факторов свертывания стали применять различные методы вирусной инаktivации: сухой термической, влажной термической обработки, обработки паром и химической инаktivации с использованием растворителя-детергента [1, 2].

Производители плазменных и рекомбинантных препаратов, а также организации по фракционированию плазмы руководствуются требованиями к качеству производства и к качеству продукта, изложенными в международных нормативах GMP/EC и GMP США, которые с января 1993 г. являются основными в международной практике [9].

Более чем 25-летний мировой опыт применения и совершенствования методов вирусинаktivации в плазмопроизводстве и профилактических мер на этапе заготовки донорской плазмы гарантируют практически 100%-ную вирусную безопасность (99,9%) изготавливаемых концентратов факторов свертывания для лечения гемофилии.

Профилактика вирусной безопасности будущей продукции начинается уже на этапе центров заготовки донорской плазмы. Тщательно обследуются доноры и собранная плазма на ВИЧ-инфекцию и гепатиты А, В и С. Для лабораторного исследования крови применяется ПЦР-генотестирование, как наиболее чувствительный и достоверный метод. Карантинизация собранной плазмы на 3—6 месяцев при температуре хранения -30°C позволяет изъять из хранилища инфицированную плазму и уничтожить ее в случае обнаружения вирус-позитивных результатов анализов у кого-либо из доноров за данный период хранения плазмы. Таким образом, отбор доноров,

биотехнологический скрининг (ПЦР-метод) на частицы вирусов в донорской плазме, карантинизация плазмы и строгие нормативные требования к плазмозаготовке позволяют создать качественный пул для начала производственного цикла по плазмопереработке. Качеству собранной плазмы придается очень важное значение, так как одна порция инфицированной плазмы способна контаминировать весь пул, используемый для приготовления партии препарата [1, 5, 8].

В заводских условиях из донорской плазмы готовят пул в несколько сот литров, который в дальнейшем подвергается криопреципитации, хроматографической очистке, а также лиофилизации. Данные технологические процессы способны отделить получаемое сырье (будущие концентраты факторов) от вероятных вирусов, представляя собой первую механическую ступень вирусной защиты будущих препаратов [5].

Хроматографический метод очистки применяется также при получении рекомбинантных препаратов и может составлять от 3 до 6 этапов хроматографии [10].

Наиболее важными и ответственными в производственном цикле являются химическая и тепловая процедуры вирусинактивации.

В 90-х годах компания «Октафарма» разработала и внедрила новый метод вирусной инактивации — сольвент-детергентный (S/D метод), который впоследствии взяли на вооружение другие компании. Этот метод является неспецифическим и позволяет инактивировать все вирусы с липидной оболочкой: в частности ВИЧ, вирусы гепатита В и С, а также возможные неизвестные вирусы с липидной оболочкой. Вирусы ВИЧ-инфекции, гепатитов В и С являются наиболее патогенными, поскольку имеют относительно сложное строение и легче преодолевают иммунный барьер. Однако S/D обработка столь действенна, что вирусная нагрузка в 1 000 000 000 частиц на миллилитр устраняется менее чем за 2 минуты. Тем не менее S/D обработку для многих препаратов выполняют в течение 8—12 часов, что обеспечивает высокий уровень вирусной безопасности. Применяемые детергенты

ТВИН-80 или ТРИТОН-X-100 в сочетании с гидрофобным растворителем три-н-бутилфосфатом (TNBP) разрушают липопротеиновые мембраны. Оставшиеся фрагменты нуклеиновой кислоты не обладают патогенным действием. В присутствии детергента невозможны обратные соединения или регенерация мембран. Эффективность S/D метода зависит от температуры и времени воздействия [1, 5].

18-летний опыт применения сольвент-детергентного метода вирусной инактивации доказал свою высокую эффективность отсутствием у пациентов, получающих препараты, ВИЧ-инфекции и гепатитов В и С.

S/D метод также применяется в качестве дополнительного метода вирусной инактивации при изготовлении рекомбинантных препаратов [10].

Тепловой способ вирусной инактивации применяется на лиофилизированных факторах для воздействия на оболочечные вирусы (ВИЧ, гепатиты В и С) и на вирусы, не имеющие оболочек (гепатит А, парвовирус В19). Эффективность данной вирусной инактивации зависит от комбинации нескольких факторов воздействия на вирус: температурный режим, экспозиция установленной температуры, физическое состояние препарата, содержание соли, природа и концентрация стабилизатора [5]. Стабилизатор необходим для сохранения гемостатической активности концентрата, получаемого фактора свертывания крови. Тепловой режим варьируют от 80°C до 100°C, экспозиция от 30 минут до 72 часов. В настоящее время практически всеми фирмами применяется т.н. «тепловой шок»: температурный режим 100°C в течение 30 минут. Нарушения в технологической цепочке тепловой вирусной инактивации повышают опасность разрушения белков и снижают эффективность препарата. Кроме того, имеются опасения, что денатурированные белки обладают повышенной иммуногенностью и повышают риск образования ингибитора, что может быть зарегистрировано при появлении ингибитора у нескольких больных, получающих данную партию препарата, или при проведении теста на фармакокинетику [1, 5].

Помимо S/D метода и тепловой обработки третьим неспецифическим методом инактивации вирусов является нанофильтрация, нацеленная на безоболочечные вирусы. Это весьма действенный метод, хотя он и уступает по эффективности S/D обработке. С другой стороны, патогенность безоболочечных вирусов не так высока, и они преимущественно передаются пероральным и воздушно-капельным путями.

Таким образом, вероятность заражения через препараты плазмы резко снизилась. Фактически, съесть гамбургер в ресторане быстрого питания более опасно в отношении заражения вирусом гепатита А, чем ввести концентрат факторов свертывания, в котором вирусы инаktivированы.

Кроме того, среди многочисленных факторов, влияющих на вирусную безопасность, действуют также строгие нормативные требования к производству полученных из плазмы и рекомбинантных препаратов [9].

Тот факт, что более чем за 15 лет ни один пациент не заразился серьезной инфекцией, свидетельствует в пользу мер, которые принимаются ради безопасности современных препаратов, полученных из плазмы крови и генной инженерией.

Безопасность и полученных из плазмы, и рекомбинантных препаратов широко признают власти, врачи и Всемирная федерация гемофилии. Управление по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств США констатирует, что «и полученные из плазмы, и рекомбинантные препараты являются безопасными в отношении возбудителей инфекций» (FDA, 2003).

Это подтверждают данные о том, что Американский Красный Крест распространил более 1,8 млрд. международных единиц полученных из плазмы и прошедших обработку смесью растворитель/детергент препаратов, и с 1985 г. не было зарегистрировано ни одного случая передачи вируса.

Европейское исследование также подтвердило отсутствие связанных с препаратами инфекционных заболеваний. В течение 16-ти лет проводили наблюдение за 81 пациентом из Австрии в смешанном ретроспективном 2-летнем

ТАБЛИЦА 1 Количество детей, больных гемофилией по Москве, инфицированных гепатитом С по возрастным группам с 1986 по 2003 г.р. на 01.01.2004 г.

Год рождения	Гемофилия А			Гемофилия В			Всего инфицировано
	Всего	Неинф.	Инфицир.	Всего	Неинф.	Инфицир.	
1986	11	3	8	3	1	2	10 (71,4%)
1987	6	4	2	3	1		4 (44,4%)
1988	8	6	2	3	2	1	3 (27,2%)
1989	9	7	2	1	1	-	2 (20,0%)
1990	6	5	1	1	1	-	1 (14,2%)
1991	6	4	2	-	-	-	2 (33,3%)
1992	7	6	1	1	1	-	1 (12,5%)
1993	9	9	-	3	3	-	-
1994	4	4	-	1	1	-	-
1995	4	4	-	-	-	-	-
1996	4	4	-	2	2	-	-
1997	4	4	-	-	-	-	-
1998	7	7	-	2	2	-	-
1999	5	5	-	2	2	-	-
2000	2	2	-	-	-	-	-
2001	3	3	-	-	-	-	-
2002	3	3	-	-	-	-	-
2003	4	4	-	-	-	-	-
Всего	102	84	18 (17,6%)	22	17	5 (22,7%)	23 (18,5%)

проспективном исследовании, охватывающем 772 человеко-лет. В этом исследовании сделан вывод о высокой безопасности полученных из плазмы концентратов, прошедших обработку, по инактивации вирусов [11].

В недавно опубликованном документе по европейским принципам лечения гемофилии дополнительно рассмотрена проблема прионов, вызывающих вариантную болезнь Якоба—Крейтцфельда. Поскольку о случаях подобной инфекции не сообщалось, ее риск «крайне мал» [6, 8].

Эпидемиологическая картина среди детей с гемофилией в Москве за 30 лет работы гематологического центра Измайловской ДГКБ (1978—2008 гг.) с момента его открытия отражает все особенности соблюдения вирусной безопасности при использовании отечественных криопреципитатов, нативной замороженной плазмы (НЗП) и концентратов факторов VIII и IX зарубежных фирм. Пройден длительный и трудный путь от обеспечения пациентов криопреципитатом и нативной замороженной плазмой до необ-

ходимости их замены концентратами факторов VIII и IX [3, 4]. Мы приводим данные по инфицированности гепатитом С среди детей с гемофилией А и В в возрасте от 1 года до 18 лет (1986—2003 гг. рождения) на 1 января 2004 г. При этом стоит отметить следующее. До 1993 г. для лечения больных гемофилией мы использовали только криопреципитат до 20 000 доз в год и до 300 литров нативной замороженной плазмы. С 1993 г. стали применять концентраты факторов VIII и IX, которые поступали по гуманитарной помощи. В первую очередь концентратами были обеспечены дети первых 3 лет жизни, которые в дальнейшем лечились только фактором. Дети до 1992 г. получали сочетанную терапию: криопреципитат, НЗП и факторы VIII, IX. С 1996 г. начались закупки препаратов за счет бюджета города, что позволило перевести всех детей с гемофилией В на лечение концентратом фактора IX, а при гемофилии А — расширить возможности применения фактора VIII у детей до 7 лет, а затем до 12 лет, включая домашнее профилактическое лечение [4]. С января

2003 г. дети старших возрастных групп от 12 до 18 лет с гемофилией А были полностью переведены на лечение концентратом фактора VIII. Это стало возможным благодаря тому, что значительная часть детей, достигших 18 лет, с тяжелой гемофилической артропатией и нуждающихся в больших дозах концентрата фактора VIII за 7 лет наблюдения (с 1996 по 2003 г.) была переведена во взрослую сеть. Дети, находящиеся на профилактике и на лечении по требованию с 1993 г., давали экономии препарата, ввиду значительного сокращения спонтанных кровотечений и предупреждения тяжелых кровотечений при травмах, т.к. получали своевременную гемостатическую терапию.

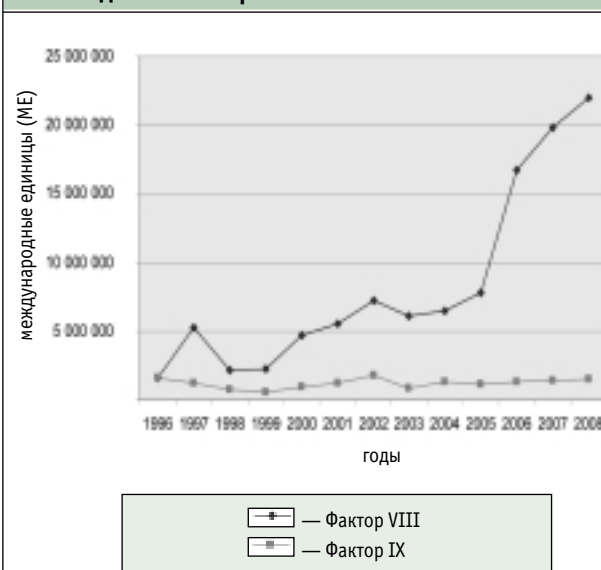
В рамках изложенного эпидемиологическая ситуация по гепатиту С на 1 января 2004 г. выглядела следующим образом: в группе детей 1986 г.р. из 14 человек гепатит С обнаружен у 10 (71,4%); у детей 1987 г.р. из 9 человек гепатит С — у 4 (44,4%); с последующим снижением числа инфицированных вплоть до 1992 г.р., что представлено в *таблице 1*. У детей с 1993 по 2003 г.р. гепатит С не был обнаружен. В результате из 124 детей с гемофилией, состоящих на диспансерном наблюдении по Москве на 1 января 2004 г., только у 23 (18,5%) имел место гепатит С.

До начала 80-х годов прошлого века методы вирусного контроля на станциях переливания крови в России не могли гарантировать вирусную безопасность по гепатиту С, что привело к высокому уровню инфицированности данной патологии. В свою очередь, в России не применялись лиофилизированные препараты первого поколения, приготовленные из пула плазмы. За 30 лет работы Гемоцентра ИДГКБ, благодаря активной позиции Правительства Москвы и Департамента здравоохранения по лекарственному обеспечению больных гемофилией безопасными и эффективными препаратами, среди детей с гемофилией в Москве не было выявлено ни одного случая инфицирования ВИЧ. Имели место редкие случаи заболевания гепатитом В до 1986 г. Отсутствие инфицирования гепатитом С среди детей, начиная с 1993 г.р., говорит о высокой вирусной безопасности используе-

ТАБЛИЦА 2 Обеспечение концентратами факторов VIII и IX детей с гемофилией по Москве с 1996 по 2008 гг. в международных единицах

Год	Фактор VIII (МЕ.)	Фактор IX (МЕ)
1996	1 620 500	1 636 500
1997	5 268 334	1 217 600
1998	2 177 903	721 000
1999	2 239 920	517 000
2000	4 727 771	953 650
2001	5 580 000	1 201 250
2002	7 272 856	1 738 800
2003	6 104 000	860 850
2004	6 449 230	1 300 650
2005	7 834 052	1 139 500
2006	16 754 519	1 350 200
2007	19 791 092	1 442 780
2008	21 963 250	1 470 500
Всего	107 783 427	15 550 280

РИСУНОК Обеспечение концентратами факторов VIII и IX детей с гемофилией по Москве с 1996 по 2008 гг.



мых с этого времени концентратов факторов VIII и IX, а позднее — препаратов протромбинового комплекса и рекомбинантного фактора VII активированного, а также принятых эффективных мерах по противовирусному контролю за донорами и плазмой на СПК Москвы.

В общей сложности с 1996 по 2008 гг. известные зарубежные фирмы: Behringwerke AG — Германия, Kedrion — Италия, Immuno — Австрия, BPL — Англия, Baxter — США, Bayer — США, Octapharma — Швейцария, Biotest — Германия, NovoNordisk — Дания — поставили для детского населения Москвы более 107 млн. единиц (107 783 500 МЕ) концентрата фактора VIII и более 15 млн. единиц (15 550 250 МЕ) концентрата фактора IX, более 3 720 000 единиц препаратов протромбинового комплекса, более 9 311 мг препарата

фактора VII рекомбинантного активированного (табл. 2, рис.). Значительное увеличение объемов препаратов факторов VIII и IX, начиная с 2006 г. по Москве, обусловлено федеральной программой ДЛО 2005 г.

Все препараты, как плазменные, так и рекомбинантные, были зарегистрированы в России. Надежная вирусная безопасность концентратов факторов, полученных из донорской плазмы и с помощью генной инженерии, обеспечила благополучную эпидемиологическую обстановку среди пациентов с гемофилией с 1993 г. по настоящее время.

На сегодняшний день рекомбинантные препараты составляют менее 10% от общего количества применяемых нами концентратов факторов. Рекомбинантный фактор VII активированный стал применяться с 2001 г., рекомбинантный фактор VIII — с 2005 г. По мере накопле-

ния опыта в применении рекомбинантных концентратов фактора VIII в нашей стране, получения результатов по эффективности лечения и вероятности развития ингибитора, регулирования рыночных цен эти препараты займут достойное место в списке с надежно зарекомендовавшими себя плазменными препаратами.

Благодаря решению проблем лекарственного обеспечения концентратами факторов больных гемофилией в России, стало возможно улучшить результаты лечения данной категории больных, обеспечить им более высокое качество жизни и увеличить ее продолжительность. Тем не менее гемофилия представляет собой серьезную медико-социальную проблему как для больных и их родственников, так и для органов здравоохранения и общества в целом [12].



ЛИТЕРАТУРА

- Teitel J.M. Safety of coagulation factor concentrates. Haemophilia (1998), 4, 393—401.
- Nilsson I.M. Hemophilia, 1994.
- Vdovin V.V., Sadovnikov V.I. Hemophilia — the Fatal Consequences when not Treated Adequately. Biomedical Progress. Volum 7, №1, 1994, 1—4.
- Вдовин В.В. Лечение детей с гемофилией в детском гематологическом центре. Вестник службы крови России. 1999, 3, 20—22.
- Русанов В.М. Вирусная безопасность донорской плазмы. Вестник службы крови России. 2008, 2, 34—37.
- Colvin B.T. Et al. European principles of haemophilia care. Haemophilia. 2008, 1—14.
- Eyster M.E. Coping with the HIV epidemic 1982 — 2007: 25-year out-comes of the Hershey Haemophilia Cohort. Haemophilia (2008) 14, №4, 697—702.

- Mannucci D.M. Back to the future: a recent history of haemophilia treatment. Haemophilia (2008), 14 (suppl. 3), 10—18.
- Русанов В.М., Суханов Ю.С. Система обеспечения качества стандартизации производственных процессов получения препаратов плазмы за рубежом и состояющие проблемы в Российской Федерации. Вестник службы крови России. (1999), 3, 6—12.
- Bayer Health Care. Представительство в России: ЗАО «АО Шеринг». Когенейт ФС — осознание фактов. Брошюра о препарате Когенейт ФС. УО987CIS 11.09.2006.
- Muntean W., Zenz W., Falger J., et al. Sixteen years of treatment with pasteurized human clotting factor concentrate in children and adolescents: a pharmacovigilance investigation comprising 727 patient years. Seminar Thrombosis and Haemostasis 2001. 28 (suppl. 1): 63—73.
- Чернов В.М., Румянцев А.Г. Актуальные проблемы гемофилии в исследованиях российских ученых. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2008, том 7, №1, 5—15.