

Молекулярно-биологические проблемы создания лекарственных средств и изучение механизма их действия

© Коллектив авторов, 2016

*О. Б. Устинникова**, *О. Б. Рунова*, *Е. В. Новикова*, *В. П. Бондарев*,
Е. В. Лебединская

АКТУАЛЬНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ РАЗРАБОТКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ФАКТОРОВ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ

ФГБУ "Научный центр экспертизы средств медицинского применения" Минздрава России,
Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, д. 8;
* e-mail: Ustinnikova@expmed.ru

Представлены данные об актуальных направлениях разработки рекомбинантных факторов свертывания крови (РФСК). Показано, что основными направлениями создания новых модификаций РФСК, отличных по структуре и составу от эндогенных факторов свертывания крови с сохранением свойств активности, являются направления, позволяющие получить менее иммуногенные препараты со сниженной способностью индукции нейтрализующих антител (ингибиторов) и пролонгации терапевтического эффекта в результате повышения порога инактивации.

Ключевые слова: рекомбинантные факторы свертывания крови; нейтрализующие антитела (ингибиторы); пролонгация терапевтического эффекта; модификация рекомбинантного белка.

Основным патогенетическим принципом лечения гемофилии остается пожизненная заместительная терапия препаратами на основе факторов свертывания крови (ФСК). Для поддерживающей терапии или остановки кровотечений различной этиологии у больных с патологией системы свертывания крови используются препараты факторов свертывания, выделенные из плазмы крови человека или полученные рекомбинантным путем, что приводит к улучшению качества жизни, увеличению ее продолжительности, уменьшению поражений опорно-двигательного аппарата и инвалидизации [1].

Однако заместительная терапия обладает рядом недостатков: частота инъекций антигемофильных препаратов, их иммуногенность, выработка антител к ФСК. При использовании человеческой и свиной плазмы, несмотря на современные способы очистки, остается потенциальный риск вирусной, прионной или иной контаминации.

К настоящему времени достигнут предел развития базовых технологий получения препаратов из плазмы крови человека. Их дальнейшее развитие не предполагает выхода за пределы частных усовершенствований технологий получения и очистки препаратов крови [23]. В связи с этим на первый план выходят рекомбинантные факторы свертывания крови (РФСК), возможность модификации которых открывает новые перспективы развития заместительной терапии.

Цель данного обзора — анализ современных тенденций создания препаратов РФСК в аспекте проблем пожизненной заместительной терапии.

Одним из шунтирующих средств первой линии для остановки кровотечений у пациентов с ингибиторной формой гемофилии является РФСК VIIa — эптакога альфа (активированный) [11]. Установлена его способность инициировать гемостаз в месте повреждения, приводящая к формированию комплексов с тканевым фактором (тканевым тромбопластином) поврежденной ткани независимо от присутствия факторов свертывания крови VIII и IX с активацией факторов IX и X. Так как тканевый фактор подвергается воздействию только в месте повреждения, то рекомбинантный фактор VIIa, образуя здесь активный комплекс, обуславливает эффективный локальный гемостаз, а не системную активацию коагуляции, что существенно снижает риск тромбообразования [24].

Данный рекомбинантный белок получают трансформацией клеток млекопитающих (ВНК) рекомбинантными плазмидами, несущими ген FVII человека. Первичная структура эптакога альфа активированного идентична человеческому активированному фактору свертывания крови VII [25]. Известны структурные особенности посттрансляционных модификаций и механизм активации фактора, обеспечивающие его активность при отсутствии образования нейтрализующих антител и других иммунологических явлений, что актуально для больных с приобретенной гемофилией с ингибитором к FVIII и FIX [26, 27].

Помимо эптакога альфа, технология рекомбинантной ДНК используется для производства антигемофильных препаратов, механизм действия которых основан на восполнении находящегося в дефиците или

отсутствующего фактора свертывания для обеспечения системной активации коагуляции.

Можно выделить 5 основных направлений создания таких препаратов:

полноразмерные РФСК VIII и IX (октоког альфа, нонаког альфа);

делеционные варианты полноразмерных РФСК VIII и IX (мороктоког альфа, симоктоког альфа, туроктоког альфа, нонаког гамма), в которых частично или полностью исключен В-домен;

продолгованные производные препаратов, в которых к молекуле фактора свертывания крови или его делеционного варианта ковалентно присоединены группы полиэтиленгликоля (пегилированный октоког альфа, бероктоког альфа);

гибридные факторы, ковалентно сшитые с доменом Fc иммуноглобулина человека G1 [28];

гетерологичные рекомбинантные факторы — свиной рекомбинантный фактор свертывания крови VIII.

Имеющиеся в настоящее время модификации РФСК, особенности их структур и используемые клеточные продуценты представлены в таблице.

С начала 1990-х гг. для лечения гемофилии используются РСФК, полученные с использованием технологии трансфекции клеток хомячка: линии ВНК и СНО [29]. Каждый из рекомбинантных факторов свертывания крови по коагуляционной активности аналогичен соответствующему эндогенному фактору, однако имеет особенности структуры, обусловленные посттрансляционными модификациями, которые в свою

очередь зависят от используемых клеток-продуцентов. Посттрансляционное гликозилирование белков в гетерологичных эукариотических клетках оказывает наибольшее влияние на функционирование, фармакокинетику и иммуногенность молекулы, поскольку не является идентичным нативному человеческому фактору и может приводить к иммуногенным реакциям, в том числе и ингибиторным [30]. Кроме того, использование гетерологичных клеток увеличивает вероятность контаминации гетерологичными примесями: белком и ДНК штамма-продуцента. В связи с этим был продолжен поиск клеточных линий, обеспечивающих высокую производительность и качество целевого продукта.

До недавнего времени линия эмбриональных клеток почки человека НЕК широко использовалась только в научных исследованиях. Технические преимущества этой клеточной линии, заключающиеся в надежной модели роста, простоте обслуживания, высокой эффективности трансфекции и производства белка, послужили основой ее использования для производства РФСК с профилем гликозилирования, более похожим на профиль, присущий клеткам человека [31, 32]. Структурные исследования продукта показали, что N-гликолилнейраминная кислота, которая является иммуногенной для человека и присутствует в рекомбинантных гликопротеинах, экспрессируемых клетками СНО, не была обнаружена в РФСК, полученных в линии НЕК [33, 34]. Экспрессируемый клеточной линией НЕК РФСК не содержит антигенного углеводно-

Модификации РФСК

Модификация РФСК (международное непатентованное наименование — МНН)	Особенности структуры	Тип продуцента
Эптаког альфа	РСФК VIIa (аминокислотная последовательность эндогенного ФСК VIIa)	ВНК (Baby hamster kidney) — клетки почки новорожденного сирийского хомячка
Бероктоког альфа	РСФК VIII (аминокислотная последовательность эндогенного ФСК VIII + полиэтиленгликоль)	СНО (Chinese hamster ovary) — клетки яичника китайского хомяка
Октоког альфа	РСФК VIII (аминокислотная последовательность эндогенного ФСК VIII)	
Сусоктоког альфа	РСФК VIII (аминокислотная последовательность эндогенного свиного ФСК VIII с удаленным В-доменом)	
Октоког альфа	РСФК VIII (аминокислотная последовательность эндогенного ФСК VIII)	
Октоког альфа + полиэтиленгликоль	(аминокислотная последовательность эндогенного ФСК VIII + полиэтиленгликоль)	
Мороктоког альфа	РСФК VIII (аминокислотная последовательность эндогенного ФСК VIII с удаленным В-доменом)	
Туроктоког альфа	РСФК VIII (аминокислотная последовательность эндогенного ФСК VIII с удаленной 21 аминокислотой В-домена)	
Нонаког альфа	РСФК IX (первичная последовательность аминокислот идентична Ala148 аллельной форме полученного из плазмы крови фактора IX)	
Нонаког гамма	РСФК IX (первичная последовательность аминокислот идентична Ala148 аллельной форме полученного из плазмы крови фактора IX, не используются компоненты человеческого/животного происхождения)	
Симоктоког альфа	РСФК VIII (первичный продукт трансляции расщеплен на 2 субъединицы (легкую 80 кДа и тяжелую 90 кДа) и соединен двухвалентным ионом металла с образованием активного белка)	
Мороктоког альфа + IgG1	РСФК VIII (мороктоког альфа с ковалентно сшитым доменом Fc иммуноглобулина человека G1)	
Нонаког альфа + IgG1	РСФК IX (нонаког альфа с ковалентно сшитым доменом Fc иммуноглобулина человека G1)	

го эпитопа Gal α 1,3Gal (характерного для РФСК, экспрессируемых клеточной линией СНО) и характеризуется более высокой связывающей способностью с фактором Виллебранда, что минимизирует циркуляцию несвязанного фактора и приводит к сокращению потенциального риска развития иммуногенных реакций [32, 35].

На основе анализа использования линий клеток НЕК, СНО, ВНК и успешной адаптации методологии культивирования клеток в бессывороточной среде для промышленного производства нового поколения РФСК VIII — симоктокога альфа с удаленным В-доменом — выбрана клеточная линия НЕК. В-домен был замещен пептидным линкером из 16 остатков, содержащим низкоиммуногенный участок расщепления фуриноподобных протеаз. Этот протеолитический участок расщепления был введен в линкер для получения субъединиц РСФК VIII с молекулярной массой 80 и 90 кДа (по аналогии с ФСК) [36].

В 2014 г. представлены еще 2 препарата для лечения гемофилии (А и В) на основе клеточной линии НЕК. Существенным преимуществом данных препаратов является их пролонгированное действие. Достигается такой эффект благодаря ковалентному связыванию молекулы РФСК с доменом Fc — константным регионом человеческого иммуноглобулина G1 [37]. Выявлено существенное снижение титра антител у пациентов старше 15 мес уже после трехкратного в течение недели применения препарата [38].

Также, в 2014 г. FDA одобрило препарат РФСК сусоктокога альфа для применения у пациентов с приобретенной гемофилией А. Сусоктокога альфа представляет собой свиной РФСК VIII с достаточно схожей с ФСК VIII человека структурой, что позволяет использовать его в качестве коагулянта. Молекула свиного РФСК представляет собой гликопротеин, аналог эндогенного свиного фактора, с приблизительной массой 170 кДа, состоящий из 2 цепей — тяжелой (90 кДа) и легкой (80 кДа). 24 аминокислоты В-домена свиного фактора были заменены на специфический линкер, обеспечивший активность фактора, сопоставимую с активностью эндогенного человеческого фактора VIII. Для трансфекции использовали клеточную линию ВНК. Производственный процесс включает многостадийную очистку с использованием технологий хроматографии и исключает использование белковых компонентов человеческого и животного происхождения. Преимущества данного гетерологичного фактора заключаются в низкой индукции ингибирующих антител к ФСК VIII человека и повышенном пороге инактивации циркулирующими в крови антителами к человеческому фактору VIII [39, 40].

В мае 2016 г. FDA зарегистрирован новый одноцепочечный рекомбинантный фактор VIII, продуцируемый клетками СНО. Он представляет собой конструкцию, где В-домен полноразмерного фактора VIII природного (эндогенного) типа был делетирован, а также удалены 4 аминокислоты рядом с кислым А3 доменом (аминокислоты 765 до 1652 полноразмерного фактора

VIII). Этот РФСК экспрессирован как одноцепочечная молекула фактора VIII с ковалентной связью между тяжелой и легкой цепями, в результате чего увеличивается стабильность и аффинность к фактору Виллебранда. За исключением нового N-гликозилированного сайта на стыке между тяжелой и легкими цепями, посттрансляционные модификации сопоставимы с эндогенным фактором VIII. Проведенные исследования подтвердили, что такая структура молекулы обеспечивает высокую коагуляционную способность препарата и низкий уровень выработки нейтрализующих антител к ФСК VIII [41].

Помимо разработки новых структур молекул РФСК, актуальным остается совершенствование технологии производства уже имеющихся на фармацевтическом рынке препаратов. Так, в 2015 г. был представлен препарат, созданный на основе полноразмерного РФСК VIII, в котором цепи молекулы ковалентно связаны с одной или несколькими молекулами полиэтиленгликоля с молекулярной массой 20 кДа, что обеспечило пролонгированное действие препарата [42].

В качестве перспективного направления разработки РФСК можно рассматривать совершенствование имеющихся РФСК, разработку новых белков с модифицированной структурой, а также создание комбинированных препаратов на их основе.

ЛИТЕРАТУРА

1. P. M. Mannucci, *Haemophilia*, **14**(3), 10 – 18 (2008).
2. URL: <http://www1.wfh.org/publications/files/pdf-1429.pdf>.
3. E. Santagostino, M. Mancuso, A. Rocino, et al., *Br. J. Haematol.*, **130**(3), 422 – 427 (2005).
4. J. Astermark, E. Berntorp, G. White, et al., *Haemophilia*, **7**(3), 267 – 272 (2008).
5. J. Astermark, S. Lacroix-Desmazes, M. T. Reding, *Haemophilia*, **14**(3), 36 – 42 (2008).
6. E. Santagostino, M. E. Mancuso, J. G. van der Bom, et al., *Abstr. of the World Federation of Hemophilia Congress*, Vancouver (2006), Abstr. 14.
7. E. F. Tizzano, C. Altisent, M. Domènech, et al., *Thromb. Haemost.*, **76**(1), 125 – 126 (1996).
8. D. DiMichele, *Br. J. Haematol.*, **138**(3), 305 – 315 (2007).
9. T. Abshire, G. Kene, *J. Thromb. Haemost.*, **2**, 899 – 909 (2004).
10. M. Mancuso, P. Mannuccio, A. Rocino, et al., *Abstr. of the 51th ASH Annual Meeting*, New Orleans (2009), Abstr. 3500.
11. Н. И. Зозуля, *Автореф. дис. ... докт. мед. наук*, Москва (2010).
12. А. И. Воробьев, О. П. Плющ, З. С. Баркаган и др., *Проблемы стандартизации в здравоохран.*, № 3, 18 – 74 (2008).
13. URL: <http://www1.wfh.org/publication/files/pdf-1472.pdf>.
14. M. Richards, M. Williams, E. Chalmers, et al., *B. J. Haematol.*, **149**(4), 498 – 507 (2010).
15. W. Collins Peter, P. Daniel, D. P. Hart, *B. J. Haematol.*, **160**(2), 153 – 170 (2013).
16. Н. И. Зозуля, Т. В. Северова, *Бюл. сиб. мед.*, № 2, 35 – 36 (2008).
17. T. C. Lei, D. W. Scott, *Blood*, **105**, 4865 – 4870 (2005).
18. S. Haya, M. F. Lopez, J. A. Aznar, et al., *Haemophilia*, **7**, 34 – 36 (2001).
19. Е. Г. Лопатина, О. П. Плющ, К. Г. Копылов, *Новое в трансфузиол.*, № 35, 15 – 2 (2003).

20. Е. В. Журавлева, *Автореф. дис. ... канд. мед. наук*, Москва (1999).
21. C. Von Auer, J. Oldenburg, M. von Depka, et al., *N. Y. Acad. Sci.*, **1051**, 498 – 505 (2005).
22. D. Keeling, C. Tait, M. Makris, *Haemophilia*, **9**(1), 1 – 23 (2003).
23. Н. Б. Зубкова, *Биопрепараты*, № 1, 4 – 10 (2014).
24. N. Key, L. Aledort, D. Beardsley, et al., *Thromb. Haemost.*, **80**(6), 912 – 918 (1998).
25. J. Ingerslev, D. Freidman, D. Gastineau, et al., *Haemostasis*, **26**(1), 118 – 123 (1996).
26. О. Б. Устинникова, В. П. Бондарев, О. Б. Рунова, *Мол. мед.*, № 6, 3 – 7 (2015).
27. N. Key, L. Aledort, D. Beardsley, et al., *Thromb. Haemost.*, **80**(6), 912 – 918 (1998).
28. Y. Su, G. Carey, M. Marie, et al., *J. Immunol.*, **181**, 1153 – 1160 (2008).
29. *International Conference on Harmonisation*, ICH Q5D, Vol. 63, No. 182, The Federal Register, ICH, Geneva (1998), pp. 50244 – 50249.
30. W. C. Lee, A. V. Joshi, S. Woolford, et al., *Haemophilia*, **14**, 454 – 465 (2008).
31. Y. Durocher, S. Perret, A. Kamen, *Nucleic. Acids Res.*, **30**, 9 – 10 (2002).
32. P. Thomas, T. G. Smart., *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **51**, 187 – 200 (2005).
33. J. Gitschier, W. I. Wood, T. M. Goralka, et al., *Nature*, **312**, 326 – 330 (1984).
34. H. Sandberg, C. Kannicht, P. Stenlund, et al., *Thromb. Res.*, **130**(5), 808 – 817 (2012).
35. T. Lissitchkov, K. Hampton, M. von Depka, et al., *Haemophilia*, **22**(2), 225 – 231 (2015).
36. S. Winge, L. Yderland, C. Kannicht, et al., *Protein Expr. Purif.*, **115**, 165 – 175 (2015).
37. A. Tiede, J. Oldenburg, T. Lissitchkov, et al., *Haemophilia*, **22**(3), 374 – 380 (2015).
38. J. N. Mahlangu, M. Ragni, N. Gupta, et al., *Thromb. Haemost.*, **116**(1), 1081 – 1248 (2016).
39. C. L. Groomes, D. M. Gianferante, G. D. Crouch, et al., *Pediatr. Blood Cancer.*, **63**(5), 922 – 924 (2016).
40. C. B. Burness, L. J. Scott, *Drugs*, **76**(7), 815 – 821 (2016).
41. D. Lillicrap, A. Schiviz, C. Apostol, et al., *See comment in Pub-Med Commons below Haemophilia*, **22**(2), 308 – 317 (2016).
42. URL:<http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/BloodBloodProducts/ApprovedProducts/LicensedProductsBLAs/FractionatedPlasmaProducts/UCM506511.pdf>.
43. URL:<http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/BloodBloodProducts/ApprovedProducts/LicensedProductsBLAs/FractionatedPlasmaProducts/ucm471752.htm>.

Поступила 07.07.16

TOPICAL DIRECTIONS OF DEVELOPMENT OF RECOMBINANT BLOOD COAGULATION FACTORS

O. B. Ustinnikova, O. B. Runova, E. V. Novikova, V. P. Bondarev, and E. V. Lebedinskaya

State Scientific Center for Expert Evaluation of Medicinal Products, Ministry of Public Health of the Russian Federation, Moscow, 127051 Russia

* e-mail: Ustinnikova@expmed.ru

Modern ways of development of recombinant blood coagulation factors (RBCFs) are reviewed. In comparison to plasma coagulation factors, RBCFs are superior due to their higher degree of purification, independence of production from donor plasma, and significantly lower risk of contamination. The main directions of creating new RBCF modifications with the structure and composition different from endogenous factors, while retaining the characteristics of activity, are those ensuring the possibility of obtaining less immunogenic preparations with suppressed induction of inhibitors and prolonged therapeutic effect as a result of increase in the inactivation threshold.

Keywords: recombinant blood coagulation factors; inhibitory antibodies; prolongation of therapeutic effect; modification of recombinant proteins.