Biofarmaceutici podrijetlom iz ljudske plazme

Safić, Jasna

Professional thesis / Završni specijalistički

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:449308

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Jasna Safić

BIOFARMACEUTICI PODRIJETLOM IZ LJUDSKE PLAZME

Specijalistički rad

Zagreb, 2015

PSS studij: Klinička farmacija

Mentori rada: Doc.dr.sc. Ivan Pepić

Prof. dr. sc. Vesna Bačić Vrca

Specijalistički rad obranjen je dana 30.10.2015. na Farmaceutsko – biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu pred povjerenstvom u sastavu:

1. Doc. dr. sc. Jasmina Lovrić
   Sveučilište u Zagrebu
   Farmaceutsko-biokemijski fakultet

2. Doc. dr. sc. Ivan Pepić
   Sveučilište u Zagrebu
   Farmaceutsko-biokemijski fakultet

3. dr. sc. Marjana Duerrigl
   Pliva Hrvatska d.o.o.

Rad ima 8 (uvodnih) + 76 = 84 lista.

Ovaj rad izrađen je na Farmaceutsko – biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagreb u sklopu poslijediplomskog specijalističkog studija „Klinička farmacija“ pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Ivana Pepića.

Od srca zahvaljujem doc. dr. sc. Ivanu Pepiću na stručnoj pomoći pri izradi ovog rada.

Sažetak

Cilj: Pregledno prikazati i usporediti klasične i suvremene industrijske postupke proizvodnje, opisati posebnosti u formulacijskim, regulatornim i farmakovigilancijskim zahtjevima, te istaknuti najvažnije kliničke značajke biofarmaceutika iz ljudske plazme.

Materijal i metode: Pretraživala se literatura u bibliografskim bazama podataka (PubMed, ScienceDirect) prema osnovnim ključnim riječima. Članci prikupljeni pretraživanjem razvrstani su od općih prema specijaliziranim pri čemu su odabrani relevantni članci, a koji su zatim proučavani na analitički i kritički način. U radu su navedeni najvažniji rezultati, kao i vlastita razmatranja.

Rezultati: Biofarmaceutici iz ljudske plazme dobiveni suvremenim tehnikama proizvodnje imaju značajno industrijsko poboljšanje iskorištenja sirovine i visok stupanj sigurnosti. Unatoč uvođenju metoda uklanjanja virusa, još se uvijek ne može sasvim isključiti rizik od prijenosa uzročnika krvlju prenosivih bolesti putem ovih lijekova. Registracijski postupci predviđaju pripremanje posebne dokumentacije koja prati kvalitetu plazme (Glavna dokumentacija o plazmi). Osim prijenosa uzročnika krvlju prenosivih bolesti, glavni rizici primjene su i trombotski događaji.

Zaključak: Biofarmaceutici iz ljudske plazme dobivaju se iz krvi ili plazme dobrovoljnih davatelja postupcima frakcioniranja. Industrijska proizvodnja biofarmaceutika iz ljudske plazme složen je i zahtjevan tehnološki proces. Biofarmaceutici podrijetlom iz ljudske plazme nalaze se na Popisu esencijalnih lijekova Svjetske zdravstvene organizacije i često se primjenjuju kod bolesti opasnih po život, te predstavljaju klinički nezamjenjivu skupinu lijekova.

Summary

Objectives: Systematically review and compare the traditional and modern industrial production processes, describe the special features in the formulation, regulatory and pharmacovigilance requirements, and highlight the most important clinical features of plasma-derivated biopharmaceutical products.

Material and Methods: The literature was searched in bibliographic databases (PubMed, ScienceDirect) according to the primary keywords. Articles obtained by searching of the literature were classified from general to more specialized. Relevant articles are selected, and then examined in an analytical and critical way. The most important results, as well as own considerations are quoted in the overview.

Results: Plasma-derivated biopharmaceutical products obtained by modern production techniques have significantly enhanced the industrial utilization of raw materials and high degree of safety. Despite of introduction of the virus reduction methods, the transmission of blood-born infection by these medicinal products still cannot be excluded. Registration procedures request the preparation of special documentation which accompanies the quality of plasma (Plasma Master File). Beside the transmission of blood-born infection, the most important risks of administration are thrombotic events.

Conclusion: Plasma-derivated biopharmaceutical products are obtained by fractionation procedures from blood or plasma of volunteer donors. Industrial production of plasma-derivated biopharmaceutical products is a complex and demanding process technology. Plasma-derivated biopharmaceutical products are on the list of essential medicines of the World Health Organization and they are often administered to life-threatening diseases and represent an irreplaceable group of clinical drugs.

SADRŽAJ:

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA 1

2. CILJ ISTRAŽIVANJA 3

3. MATERIJALI I METODE 4

4. RASPRAVA 5

4.1. PROIZVODNJA BIOFARMACEUTIKA IZ LJUDSKE PLAZME 5

4.1.1 LJUDSKA PLAZMA KAO ISHODNA SIROVINA 6

4.1.1.1 Screening davatelja plazme 6

4.1.1.2 Metode prikupljanja plazme 7

4.1.1.3 Ispitivanje patogena 9

4.1.1.4 Obrada, zamrzavanje, čuvanje i transportiranje plazme 10

4.1.2. INDUSTRIJSKA OBRADA PLAZME 10

4.1.2.1 Osnovna tehnologija frakcioniranja proteina plazme 14

4.1.2.2 Osnovne metode uklanjanja virusa 17

4.1.3 INDUSTRIJSKI POSTUPCI U PROIZVODNJI SPECIFIČNIH PROTEINA PLAZME 23

4.1.3.1 Faktor VIII 23

4.1.3.2 Von Willebrandov faktor 24

4.1.3.3 Fibrinogen 25

4.1.3.4 Fibrinsko ljepilo 25

4.1.3.5 Protrombinski kompleks 25

4.1.3.6 Faktor IX 26

4.1.3.7 Faktor VII 26

4.1.3.8 Faktor XI 26

4.1.3.9 Faktor XIII 27

4.1.3.10 Aktivirani faktori zgrušavanja 27

4.1.3.11 Antikoagulansi i inhibitori proteaza 28

4.1.3.12 Albumin 29

4.1.3.13 Imunoglobulin G 30

4.2 KONTROLA KAKVOĆE 30

4.2.1 Procesna kontrola kakvoće 30

4.2.2 Kontrola kakvoće gotovog lijeka 31

4.3 ODOBRAVANJE I FARMAKOVIGILANCIJA 32

4.4 KLINIČKI ASPEKTI BIOFARMACEUTIKA IZ LJUDSKE PLAZME 34

4.4.1 LJUDSKA PLAZMA - SLOŽENI BIOLOŠKI FLUID 34

4.4.1.1 Sustav zgrušavanja 34

4.4.1.2 Sustav fibrinolize 37

4.4.1.3 Sustav komplementa 38

4.4.2 PREGLED PATOLOŠKIH STANJA 39

4.4.2.1 Nasljedni poremećaji zgrušavanja 40

4.4.2.2 Stečeni poremećaji zgrušavanja krvi 43

4.4.2.3 Trombofilija ili hiperkoagulabilnost 44

4.4.2.4 Imunodeficijencije 45

4.4.2.5 Autoimune bolesti 47

4.4.3 PREGLEDNI PRIKAZ LIJEKOVA 48

4.4.3.1 Antitrombotici 53

4.4.3.2 Antihemoragici 54

4.4.3.3 Zamjena za krv i perfuzijske otopine 57

4.4.3.4 Ostali hematološki pripravci 58

4.4.3.5 Imunoglobulini 59

4.4.3.6 Ostali potencijalno terapijski proteini plazme 60

4.5 INDUSTRIJSKO - EKONOMSKA RAZMATRANJA 63

5. ZAKLJUČCI 65

6. LITERATURA 66

7. POPIS SKRAĆENICA 72

8. ŽIVOTOPIS 74

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

Biofarmaceutici podrijetlom iz ljudske plazme dobivaju se iz krvi i plazme dobrovoljnih davatelja. Prikupljena se ljudska plazma može koristiti kao samostalni terapijski pripravak (poznata i kao "klinička plazma" ili "svježe zamrznuta plazma"), ali i kao ishodna sirovina za proizvodnju biofarmaceutika iz ljudske plazme (u literaturi poznati i kao "frakcionirani farmaceutski pripravci"; "proizvodi plazme"; "derivati plazme"). Ljudska plazma je kompleksan biološki materijal koji sadrži više stotina različitih proteina uključenih u mnogobrojne fiziološke funkcije. Na albumine i imunoglobuline odnosi se 80% svih proteina plazme, dok su u manjoj mjeri zastupljeni fibrinogeni, faktori zgrušavanja i inhibitori proteaza (alfa1-proteinaza inhibitor i antitrombin). Frakcioniranjem proteina plazme danas se dobivaju biofarmaceutici od velikog medicinskog značaja koji su često ujedno i jedine mogućnosti u prevenciji i liječenju po život opasnih stanja nastalih kao posljedica traume, kongenitalnih malformacija, imunoloških bolesti ili infekcija (1).

Biofarmaceutici podrijetlom iz ljudske plazme svrstani su u pet terapijskih skupina: antitrombotici (antitrombin, protein C), antihemoragici (faktor VIII, von Willebrandov faktor, fibrinogen, fibrinsko ljepilo, protrombinski kompleks, faktor VII, faktor IX, faktor XIII, aktivirani faktori zgrušavanja, alfa1-proteinaza inhibitor), zamjena za krv i perfuzijske otopine (albumin), ostali hematološki pripravci (inhibitor C1-esteraze) i imunoglobulini. U skupini potencijalno terapijskih proteina plazme uglavnom nalazimo lijekove kojima je dodijeljen status tzv. lijekova za liječenje rijetkih bolesti (engl. orphan drugs), te se očekuje njihovo odobravanje. Među njima treba spomenuti: (*i*) ljudski faktor zgrušavanja X koji je indiciran kod ljudi s nasljednim nedostatkom ovog faktora zgrušavanja koji može za posljedicu imati intrakranijalno

krvarenje (2); (*ii*) ljudski plazmin koji pokazuje pozitivne rezultate u liječenju akutne periferne okluzije arterija (3); (*iii*) ljudski plazminogen namijenjen liječenju rijetkog kroničnog pseudomembranoznog konjuktivitisa (4), ali i sprječavanju posljedica nedostatka plasminogena kao što su upale i oštećenja različitih organa (5); (*iv*) ljudski apotransferin namijenjen liječenju kongenitalne hipotransferinemije (6) te drugi. U literaturi se također mogu naći dobri rezultati u pretkliničkim i ranim kliničkim ispitivanjima za inhibitor inter-alfa-tripsina, apolipoprotein A-I, lektin koji veže manozu, a osim toga neki od već odobrenih lijekova ispituju se u novim indikacijama (alfa1-proteinaza inhibitor).

Trenutno se oko 20 lijekova dobivenih iz ljudske plazme koristi za liječenje bolesti opasnih po život ili ozljeda povezanih s poremećajima krvarenja, trombotskim poremećajima, imunološkim bolestima, infekcijama kao i degenerativnih bolesti tkiva, zbog čega su ovi lijekovi klinički važni velikom broju bolesnika.

Industrijski proces odvajanja terapijskih proteina plazme poznat je pod nazivom "frakcioniranje". Svake se godine frakcionira oko 23 do 28 milijuna litara ljudske plazme u svijetu, u otprilike 70 proizvodnih pogona. Moderno frakcioniranje plazme objedinjuje proizvodne etape do izolacije sirovih frakcija koje se zatim dalje pročišćavaju do individualnih terapijskih proizvoda. U proizvodnji se koriste isključivo validirani postupci za inaktiviranje i/ili uklanjanje uzročnika infekcija potencijalno prisutnih u početnoj mješavini (pulu) plazme. Cijeli se ovaj sofisticirani industrijski proces provodi pod uvjetima visokih higijenskih kriterija u licenciranim postrojenjima za frakcioniranje plazme koje rade u skladu s dobrom proizvođačkom praksom i slijede principe osiguranja kakvoće (1, 7).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj: Pregledno prikazati i usporediti klasične i suvremene industrijske postupke proizvodnje, opisati posebnosti u formulacijskim, regulatornim i farmakovigilancijskim zahtjevima, te istaknuti najvažnije kliničke značajke biofarmaceutika iz ljudske plazme.

Hipoteze: Suvremene tehnike proizvodnje biofarmaceutika iz ljudske plazme značajno poboljšavaju iskorištenje industrijskog procesa. Standardi kakvoće ljudske plazme i biofarmaceutika proizvedenih iz ljudske plazme zadovoljavajuće su definirani unutar EU. Odobravanje i farmakovigilancija biofarmaceutika iz ljudske plazme zahtijeva specifičan pristup. Biofarmaceutici iz ljudske plazme čine klinički nezamjenjivu skupinu lijekova.

3. MATERIJALI I METODE

U svrhu izrade ovog specijalističkog rada pretraživala se literatura u bibliografskim bazama podataka (Pubmed, ScienceDirect) prema sljedećim osnovnim ključnim riječima*: plasma pools; plasma fractionation; fractionation industry; human plasma derivatives; plasma derived medicines; industrial purification; nanofiltration; Cohn process; quality assurance; Good Manufacturing Practice; formulation strategies; lyophilized dosage form; Plasma Master File; Official batch release; EU marketing authorization; pharmacovigilance; adverse reactions; risk factors; blood born infections; clinical aspect*.

Članci prikupljeni pretraživanjem literature razvrstani su od općih prema specijaliziranim pri čemu su odabrani članci relevantni za problematiku specijalističkog rada. Relevantni članci proučavani su na analitički i kritički način s obzirom na definiranje znanstvenog i stručnog problema, istraživanje postojećih znanja o definiranom problemu (literaturni navodi), oblikovanje radne hipoteze, odabir metoda za ispitivanje hipoteze, prikaz i analizu rezultata te izvedene zaključke. Pri proučavanju relevantnih članaka izdvojeni su najvažniji rezultati, rasprave i zaključci koji su zatim prikazani ovim specijalističkim radom. Vlastita razmatranja proučavane problematike izvedena na temelju proučavanih članaka sastavni su dio rasprave ovog specijalističkog rada.

Lijekovi proizvedeni iz ljudske plazme registrirani u RH i svijetu analizirani su uz uporabu baza podataka o lijekovima na mrežnim stranicama regulatornih tijela (HALMED, EMA, HMA, MHRA, FDA).

4. RASPRAVA

4.1. PROIZVODNJA BIOFARMACEUTIKA IZ LJUDSKE PLAZME

Industrijska proizvodnja biofarmaceutika iz ljudske plazme u širem smislu složen je i zahtjevan tehnološki proces, a pojedini dijelovi takve proizvodnje uključuju:

(*i*) prikupljanje ishodne sirovine od dobrovoljnih davatelja, a što uključuje razgovor s davateljima i ispitivanje donirane krvi s ciljem izdvajanja rizičnih uzoraka;

(*ii*) obrada ishodne sirovine - plazma se dobiva centrifugiranjem iz pune krvi ili češće aferezom;

(*iii*) ispitivanja na prisutnost patogena - plazma se ispituje na prisutnost virusa, dok se bakterije, paraziti i unutarstanični virusi uništavaju i/ili uklanjaju u kasnijim dijelovima proizvodnje;

(*iv*) zamrzavanje i transport dobivene donacije plazme - plazma se zamrzava i transportira, a temperatura zamrzavanja i transporta ovisi o lijeku koji se iz takve plazme proizvodi;

(*v*) karantena plazme u za to predviđenim prostorima proizvođača;

(*vi*) kontrola kakvoće ishodne sirovine namijenjene proizvodnji;

(*vii*) odmrzavanje i miješanje plazme - izrada pula plazme;

(*viii*) ispitivanje pula plazme na virusne markere;

(*ix*) klasični industrijski postupci frakcioniranja proteina ljudske plazme - Cohnov postupak modificiran prema Kistler-Nitschmannu;

(*x*) pročišćavanje specifičnog izoliranog proteina;

(*xi*) izrada disperzije s određenim udjelom izoliranog proteina;

(*xii*) izrada gotovog farmaceutskog oblika - dodatak konzervansa, stabilizatora, sredstava za krio- i/ili liozaštitu proteina, punjenje, liofilizacija. Razvoj prikladnog farmaceutsko - tehnološkog

oblika u ranim fazama proizvodnje biofarmaceutika iz ljudske plazme osnova je osiguranja stabilnosti gotovog lijeka (1, 7).

4.1.1 LJUDSKA PLAZMA KAO ISHODNA SIROVINA

Postupci koje se koriste tijekom prikupljanja plazme za frakcioniranje imaju izravan utjecaj na sigurnosni profil proizvoda koji se iz te plazme proizvode iz razloga što se veliki pulovi plazme iz kojih se proizvode lijekovi za stotine ili čak tisuće bolesnika sastoje od individualnih donacija. Iz toga proizlazi da je prikupljanje plazme integralni dio proizvodnje modernih frakcioniranih proizvoda. Zahtjevi za prikupljanje plazme mogu se razlikovati od onih za proizvodnju svježe zamrznute plazme. U reguliranom okruženju plazma za frakcioniranje se prikuplja od strane licenciranih institucija (banke krvi, centri za krv, centri za prikupljanje plazme aferezom) nad kojim inspekciju provodi nadležno nacionalno regulatorno tijelo. Institucije za prikupljanje plazme provode i unutarnji nadzor kako bi se potvrdilo da su zahtjevi za prikupljanje, kakvoću i sigurnost od strane ugovornih dobavljača zadovoljeni. Posebno važna područja uključuju: a) screening davatelja i ispitivanje donirane plazme; b) zahtjevi za označivanjem, dokumentacijom i sljedivošću; i c) rukovanje s krvlju i plazmom. Takve su informacije sastavni dio registracijske dokumentacije za biofarmaceutike iz ljudske plazme u Europskoj uniji i inkorporirane su unutar dokumenta koji se zove Glavna dokumentacija o plazmi (engl. Plasma Master File, PMF) (1).

4.1.1.1 Screening davatelja plazme

Kandidati za doniranje plazme moraju dobiti edukacijski materijal te također moraju proći razgovor sa zdravstvenim osobljem čiji je cilj procjena rizika ili znakova infekcije, a kako bi se potvrdilo da njihova plazma odgovara zahtjevima za plazmu namijenjenu frakcioniranju.

Medicinske se informacije o davateljima prikupljaju, čuvaju i koriste za kontinuirano provođenje epidemioloških ispitivanja populacije davatelja. Takva ispitivanja pomažu u utvrđivanju incidencije i prevalencije kao i trendova markera poznatih infekcija (primjerice HIV-a, HCV i HBV) u populaciji, a što je ujedno i važno za rano otkrivanje hitnih stanja i ranu implementaciju sigurnosnih mjera prevencije (8).

Davatelji plazme su osobe koje zadovoljavaju kriterije za donaciju, ne posjeduju faktore rizika za infektivne uzročnike koji se prenose krvlju i odgovaraju zahtjevima definiranim od strane proizvođača frakcioniranih proizvoda plazme kao i nadležnog regulatornog tijela zemlje u kojoj se plazma prikuplja i u kojoj će se lijek koristiti. Kriteriji za odabir davatelja također uzimaju u obzir i znanstvene spoznaje o rizicima prijenosa infektivnih uzročnika putem proizvoda dobivenih iz pulova plazme (9).

4.1.1.2 Metode prikupljanja plazme

Trenutno se oko 35% frakcionirane plazme u svijetu dobiva iz pune krvi, a 65% aferezom. Način na koji se krv odnosno plazma prikuplja, obrađuje i čuva može utjecati na kakvoću plazme, ali i na iskorištenje većine osjetljivih proteina kao što je faktor VIII (FVIII). Preciznije, rad s plazmom mora biti takav da spriječi aktivaciju sustava zgrušavanja, komplementa i fibrinolize, a koji mogu dovesti do stvaranja plazminih proteaza. Kako bi se sačuvao integritet plazme i smanjili rizici potrebno je:

1. dobro izmiješati krv s otopinom antikoagulansa;
2. ograničiti prikupljanje na period ne dulji od 15 minuta;
3. izbjegavati promjene temperature krvi.

Nekoliko sati nakon prikupljanja, krv se centrifugira kako bi se stanični elementi odvojili od plazme. Srednji volumen plazme dobiven iz jedne donacije pune krvi iznosi oko 220 ml, ali

varira ovisno o volumenu prikupljene pune krvi (400 - 450 ml) i hematokritu davatelja. Plazma koja se dobiva aferezom (engleski naziv "source plazma" - izvorna plazma) prikuplja se od davatelja procesom u kojem se iz krvi davatelja u koju se dodaje antikoagulans (općenito 4%-tna otopina natrijeva citrata) odmah fizičkim putem izdvajaju krvne komponente (centrifugiranjem, filtriranjem ili kombinacijom ove dvije tehnike). Zatim se krvne stanice vraćaju u organizam davatelja, dok se plazma zadržava u za to predviđenim spremnicima (plastične vrećice ili boce). Trajanje uobičajenog postupka plazmafereze ovisi o broju ciklusa i traje između 35 i 70 minuta. Volumen plazme dobivene aferezom iznosi između 450 i 880 ml što ovisi o regulativi pojedine zemlje i protokolu prikupljanja (10).

Bilo da se plazma dobiva iz pune krvi ili aferezom, i jedna i druga se mogu koristiti za proizvodnju cijelog raspona frakcioniranih biofarmaceutika iz krvne plazme. Sadržaj faktora zgrušavanja, posebice FVIII, niži je u plazmi iz pune krvi nego u plazmi dobivene aferezom iz sljedećih razloga:

- dužeg procesa prije zamrzavanja,
- većeg udjela antikoagulansa,
- više razine kontaminacije sa stanicama koje mogu osloboditi proteolitičke enzime, a koji mogu utjecati na stabilnost faktora zgrušavanja.

Plazma dobivena aferezom sadrži manje imunoglobulina (IgG) kada se prikuplja od učestalih davatelja. Sustav afereze koji se koristi ne utječe na sadržaj proteina i kakvoću frakcioniranih proteina, iako se sadržaj preostalih stanica razlikuje na temelju tipa i konfiguracije uređaja za odvajanje (separaciju) stanica (10).

4.1.1.3 Ispitivanje patogena

Virusni infektivni uzročnici su identificirani kao potencijalni kontaminanti ljudske krvi. Bakterije, paraziti i unutarstanični virusi ne prenose se putem proizvoda dobivenih iz plazme jer se uništavaju u koracima zamrzavanje-odmrzavanje ili filtracijom preko filtara veličine pora 0,2 do 1 μm koji se koriste tijekom proizvodnje frakcioniranih proizvoda. Patogeni virusi koji se prenose putem krvi uključuju HIV, HCV, HBV, virus zapadnog Nila (VZN), virus hepatitisa A (HAV) i parvovirus B19 (B19) (12).

Neka se ispitivanja provode od strane institucija za prikupljanje krvi, a druga od strane proizvođača lijekova dobivenih iz plazme. U Republici Hrvatskoj svaka se uzeta individualne doza krvi ili krvnog sastojka serološki ispituje na biljege krvlju prenosivih bolesti, a najmanje na prisutnost HBsAg, anti-HCV, HIV Ag/At i antitijela na uzročnika sifilisa, *Treponema pallidum* (13, 14). Osim serološkog ispitivanja, obavezno se provodi i molekularno odnosno NAT ispitivanje (engl. Nucleic Acid amplification Technique) na biljeg HIV (HIV RNA) biljeg HCV (HCV RNA) i biljeg HBV (HBV DNA). NAT ispitivanje se temelji na visokoj osjetljivosti i specifičnosti za nukleinske kiseline virusa, kojom se prisutnost virusa otkriva ranije od drugih metoda i skraćuje period od infekcije do pozitivnog rezultata testa pretraživanja (engl. window period). Može se provoditi na individualnim donacijama ili na mini-pulovima, ali je na individualnim donacijama osjetljivije. Proizvodni pul plazme također se ispituje na biljege krvlju prenosivih bolesti kako bi se potvrdila odsutnost seroloških i/ili genskih virusnih markera HIV-a, HBV-a, HCV-a, HAV-a i B19 (15, 16).

Unatoč strogom screeningu davatelja i ispitivanju donacija, zarazni se virusi ipak mogu nalaziti u pulovima plazme za frakcioniranje. Stoga postupci inaktivacije/uklanjanja virusa, koji su ciljano uvedeni u proces proizvodnje biofarmaceutika iz plazme, predstavljaju najvažnije momente u proizvodnji sigurnih lijekova. Ispitivanja koja se preklapaju kod institucija za prikupljanje krvi i

kod proizvođača lijekova iz plazme trebala bi osigurati da je prisutnost virusa minimalna i da je značajno ispod učinkovitosti procesa uklanjanja virusa koji se koristi u proizvodnom postupku (12).

4.1.1.4 Obrada, zamrzavanje, čuvanje i transportiranje plazme

Očuvanje FVIII tijekom prikupljanja krvi/plazme i njegova obrada vrlo je važna za većinu proizvođača koncentriranih oblika faktora zgrušavanja. Plazma dobivena aferezom općenito se može brzo zamrznuti, osiguravajući optimalno očuvanje FVIII. Suprotno od toga, puna krv mora se centrifugirati kako bi se dobile komponente krvi. Kad je krv ohlađena pri 4 ˚C nakon prikupljanja, plazma se mora odvojiti unutar 6 do 8 sati kako bi se očuvao FVIII, ali ako se ohladi brzo do stalnih 20 ˚C uz uporabu uređaja kao što je butanediol ploča, faktori zgrušavanja mogu biti stabilni od 18 do 24 sata. Nakon odvajanja staničnih elemenata, plazma za frakcioniranje se mora brzo zamrznuti pri temperaturama ispod -20 ˚C, -25 ˚C ili -30 ˚C ovisno o nacionalnim zahtjevima. Plazma namijenjena za proizvodnju IgG i albumina mora se zamrznuti pri -20 ili nižoj temperaturi unutar 72 sata nakon prikupljanja. Plazma namijenjena frakcioniranju čuva se pri temperaturi -20 ˚C ili nižoj, obično nekoliko mjeseci ili čak više, ovisno koja se proteinska frakcija želi izdvojiti i proizvesti u lijek. Temperatura čuvanja mora biti konstantna, koliko god je to moguće, a to uključuje i temperaturu tijekom transporta do proizvodnog pogona za frakcioniranje (1, 17).

4.1.2. INDUSTRIJSKA OBRADA PLAZME

Industrijska proizvodnja biofarmaceutika iz ljudske plazme započinje primitkom plazme od odgovarajuće institucije za prikupljanje plazme i sastoji se od niza koraka shematski prikazanih Slikom 1 (1).

Zaprimanje plazme isporučene od institucija za prikupljanje plazme
Kontrola parametara prilikom isporuke i praćenje izvršavanja obaveza

|
|

Karantena plazme u hladnom prostoru (npr. < - 20 °C ili niže)
Kontrola dokumentacije
Dodatna ispitivanja i kontrola kakvoće

|
|

Priprema serije plazme

|
|

Kondicioniranje pakiranja plazme

|
|

Puliranje i obrada velikih razmjera
Otvaranje pakiranja plazme
Krioprecipitacija
Faze frakcioniranja (npr. frakcioniranje etanolom)
Priprema (i skladištenje) intermedijarnih frakcija
Nizvodna obrada proteina i postupci uklanjanje virusa za pojedine proteine
Završna obrada i terminalna sterilna filtracija (0,2 μm)

|
|

Aseptičko doziranje
Punjene u bočice / boce
+ / - Liofilizacija

|
|

Karantena – kontrola kakvoće

|
|

Provjera zapisa i dokumentacije o proizvodnoj seriji

|
|

Označivanje - pakiranje

|
|

Slaganje u kutije - Isporuka

Slika 1. Shematski prikaz proizvodnje biofarmaceutika iz ljudske plazme od primitka plazme do isporuke lijeka (1).

Proizvođač lijekova iz krvne plazme prilikom primitka plazme provjerava da li su zadovoljeni svi propisani zahtjevi kod transporta plazme (pakiranje, označivanje, temperatura tijekom transporta koja se mora bilježiti u log-bookovima, dostupnost uzoraka za dodatno ispitivanje i drugo). Plazma se pri primitku odmah stavlja u karantenu u prijenosnom hladnjaku. Dokumentacija se verificira (potpisan certifikat o podrijetlu i kontroli plazme, datum prikupljanja plazme, broj transportnog spremnika, virološki i imunohematološki podaci iz screeninga, laboratorijska oprema korištena za ispitivanje, broj serije) i prati se izvršenje obaveza kod trenutne isporuke. Može se provesti dodatno ispitivanje kao što je NAT ispitivanje na mini-pulu plazme (primjerice na HCV, HIV, HBV, HAV i/ili B19) i/ili određivanje aktivnosti FVIII i sadržaj proteina iz uzoraka donacija individualne plazme. Samo one donacije individualne plazme koje zadovoljavaju kriterije koriste se za frakcioniranje. Prije odmrzavanja, donacije se mogu "kondicionirati" pri kontroliranoj temperaturi nekoliko sati prije otvaranja. Za otvaranje pakiranja razvijene su različite metode koje odgovaraju higijenskim zahtjevima kako bi se ograničilo mikrobiološko opterećenje. Zamrznute plazme vade se iz plastičnih spremnika i od njih se izrađuju pulovi namijenjeni krioprecipitaciji i sljedećim proizvodnim koracima. Frakcije koje nastaju tijekom proizvodnje mogu se čuvati za narednu izradu pulova za krioprecipitaciju i proizvodnju. Pročišćeni i sterilno profiltrirani proizvodi aseptički se pune u konačni spremnik (staklene bočice ili boce). Boce s albuminom zatim ulaze u terminalnu pasterizaciju. Mnogi proizvodi, osim albumina i IgG, čuvaju se u liofiliziranom obliku tijekom 3 do 6 dana ovisno o fizičko-kemijskim svojstvima i volumenu punjenja. Proizvedene se serije stavljaju u karantenu tijekom ispitivanja kontrole kakvoće. One serije koje odgovaraju specifikacijama opremaju se i isporučuju distributerima. Cijeli proizvodni ciklus od primitka zamrznute plazme do isporuke gotovih lijekova traje od nekoliko tjedana do nekoliko mjeseci (1, 17). Uobičajene metode pročišćavanja proteina plazme pregledno su prikazane Tablicom 1 (1).

Tablica 1. Uobičajene metode pročišćavanja proteina plazme (1).

Metoda	Opis	Princip separacije	Područje primjene
Krioprecipitacija	Odmrzavanje pune plazme; pri +1 °C do +4 °C	Različita topljivost na hladnoj pozitivnoj temperaturi	Precipitacija FVIII, vWF i fibrinogena
Precipitacija etanolom	Pojedinačne etape precipitacije krio-siromašne plazme s etanolom (10% do 40%), kod precizno definiranih uvjeta pH (oko 7,4 do 4,5), temperature (-3 °C do -6 °C), koncentracije proteina i ionskom snagom; uklanjanje precipitata centrifugiranjem ili dubinskom filtracijom	Različita topljivost u etanolu na hladnoj negativnoj temperaturi	Precipitacija fibrinogena, IgG, albumina, API, itd.
Ionsko izmjenična kromatografija	Vezanje proteina na čvrstu podlogu koja se obično nalazi u koloni	Vezanje na temelju električnog naboja. Ispiranje povećanjem sadržaja soli ili promjenom pH u otopini za ispiranje	Većina faktora zgrušavanja, inhibitori proteaza i antikoagulansi
Afinitetna kromatografija	Vezanje proteina na čvrstu podlogu koja se obično nalazi u koloni; ligandi su heparin, metali i želatina	Specifični afinitet proteinskih liganada. Ispiranje obično povećanjem sadržaja soli u otopini za ispiranje	AT, vWF, FIX, itd.
Imunoafinitetna kromatografija	Vezanje proteina na čvrstu podlogu koja se obično nalazi u koloni; ligandi su mišja monoklonska protutijela	Specifični afinitet proteina - protutijela. Ispiranje obično povećanjem sadržaja soli u otopini za ispiranje	FVIII, FIX, protein C
Kromatografija isključivanja po veličini	Nanošenje proteina na čvrstu podlogu koja se nalazi u koloni	Razdvajanje komponenti na temelju različite molekularne	API, FVIII

		veličine	
Ultrafiltracija	Selektivni proces frakcioniranja na membranama definirane veličine pora koje koncentriraju protein i uklanjaju nisko molekularne otopljene tvari i soli	Separacija na temelju različite molekularne mase	Svi proizvodi
Mikrofiltracija	Niskotlačni i unakrsni membranski proces za odvajanje koloidnih i suspendiranih čestica u rasponu veličine od 0,2 do 10 μm		Svi proizvodi

4.1.2.1 Osnovna tehnologija frakcioniranja proteina plazme

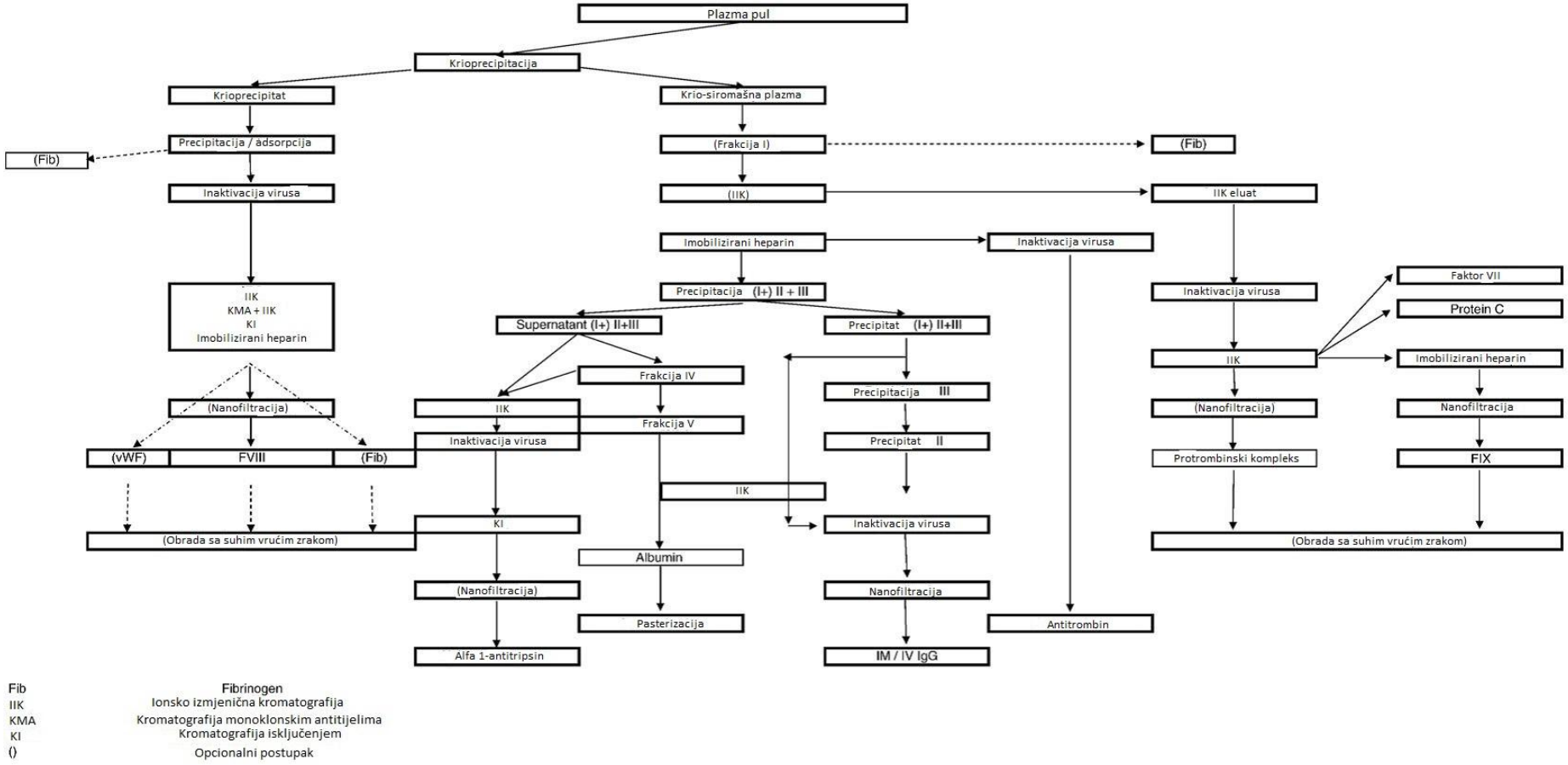
Osnovna tehnologija frakcioniranja proteina plazme najviše se oslanja na proces koji objedinjuje krioprecipitaciju i precipitaciju proteinskih frakcija hladnim etanolom, na način kako je 1940-tih razvio Cohn u SAD-u. Edwin J. Cohn je zajedno sa svojim suradnicima razvio detaljan postupak frakcioniranja koji se temeljio na promjeni pH, ionske snage, koncentracije etanola i temperature što je dovelo do precipitacije različitih proteinskih frakcija iz plazme. Albuminom dobivenim frakcioniranjem plazme prvi su put liječeni ranjenici u Pearl Harboru 1941. godine (18). Cohnov postupak je kasnije modificiran i unaprijeđen te su danas najkorištenije Cohn-Oncleyeva metoda i metoda po Kistleru i Nitschmannu koja je 70-tih godina prošlog stoljeća razvijena u Europi na način da je omogućila veće iskorištenje. Proces uključuje sporo odmrzavanje zamrznute plazme pri 2 °C do 4 °C i centrifugiranje u hladnom kako bi se uklonio krioprecipitat. Topljivosti različitih proteinskih frakcija u preostalom supernatantu zatim se podešava povećanjem koncentracije etanola, promjenom temperature/pH i/ili ionske snage. Precipitati frakcija koje sadrže različite proteine plazme odvajaju se centrifugiranjem ili filtracijom. U zadnjih je nekoliko godina značajno porasla složenost ovog procesa frakcioniranja i to prvenstveno:

- uvođenjem kromatografije kako bi se izolirali novi proteini iz već postojećih frakcija kao što je krioprecipitat, krio-siromašna plazma i Cohnove frakcije;
- ugradnjom kromatografije u proces frakcioniranja s etanolom kako bi se povećalo iskorištenje IgG;
- implementacijom postupaka za inaktivaciju i uklanjanje virusa.

Kromatografija je uvedena u 60-tim godinama prošlog stoljeća, ali se počela primjenjivati tek sredinom 80-tih godina. Anionsko izmjenična i afinitetna kromatografija često se koriste kako bi se dobili proteini pri fiziološkim vrijednostima pH i ionske jakosti, a zbog čega je najbolje očuvana funkcionalna aktivnost proteina. Imobilizirani heparin i monoklonska protutijela često su ligandi afinitetne kromatografije. Kromatografija se koristi u svrhu postizanja četiri osnovna cilja:

- poboljšanje čistoće proizvoda,
- ekstrakcija osjetljivih proteina,
- optimizacija iskorištenja proteina,
- uklanjanje tvari za inaktivaciju virusa (19, 20).

Shematski prikaz uobičajenih postupka industrijskog procesa frakcioniranja prikazan Slikom 2 (1).



Slika 2. Shematski prikaz uobičajenih postupaka industrijskog procesa frakcioniranja (1).

Pakiranja plazme (obično za jednu seriju iznose od 2000 do 4000 l) otvaraju se pod higijenskim uvjetima, i plazma se vadi iz spremnika te odmrzava pri temperaturi između 1 ˚C do 4 ˚C. Krioprecipitat se izolira uz uporabu ohlađene kontinuirane centrifuge, odvaja od centrifuge i zamrzava pri temperaturi od -30 ˚C ili nižoj kako bi ga se očuvao do buduće izrade pula plazme i daljnje obrade. Krio-siromašna plazma se odmah obrađuje kako bi se primarno kromatografskom tehnikom dobili osjetljiviji faktori zgrušavanja (kao što je protrombinski kompleks i njegove komponenete) i proteaza inhibitori (kao što je AT i inhibitor C1-esteraza). Pročišćeni intermedijeri mogu se čuvati do daljnje obrade. Plazma iz koje su izdvojeni faktori zgrušavanja/antikoagulansi ulazi zatim u etapu precipitacije etanolom. To vodi do suksesivne precipitacije frakcija fibrinogena, IgG i albumina, te intermedijera za ekstrakciju ostalih terapijskih proteina, kao što su API ili IgM. Dubinska filtracija je bolja od centrifugiranja za separaciju precipitata i poboljšanje iskorištenja proteina. Frakcioniranje hiperimune plazme (npr. anti-rhesus) obično se provodi na manjim serijama plazme uz uporabu potpunog kromatografskog procesa kako bi se optimiziralo iskorištenje IgG (19, 20).

4.1.2.2 Osnovne metode uklanjanja virusa

Od kraja 80-tih godina prošlog stoljeća pa do danas nije zabilježen niti jedan slučaj prijenosa HIV-a, HBV-a ili HCV-a putem lijekova iz dobivenih plazme koji su bili podvrgnuti postupku inaktivacije virusa. Postupci uklanjanja virusa uključuju korake inaktivacije virusa u kojima se virusi uništavaju i korake izdvajanja virusa u kojima se virusi i proteini izdvajaju u posebnim frakcijama. U proizvodnji biofarmaceutika iz ljudske plazme najčešće se koriste dvije metode uklanjanja virusa. Prvom metodom se inaktivira većina patogena, u prvom redu to su virusi s ovojnicom (HIV, HBV, HCV), dok je druga metoda učinkovita za viruse bez ovojnice, ali

istodobno pridonosi dodatnoj sigurnosti protiv svih infektivnih uzročnika. Većina postupaka uklanjanja virusa integrirana je u proces frakcioniranja proteina (eng. in-process treatment), ali neki od njih koji se temelje na toplini, primjenjuju se na lijek u gotovom pakiranju (terminalna obrada). Nadležna tijela zahtijevaju od proizvođača lijekova koji se dobivaju iz plazme provođenje ispitivanja učinkovitosti primijenjenog postupka uklanjanja virusa provođenjem validacija u umanjenom mjerilu koja koriste model relevantnog virusa kako bi se u proizvodnji koristile učinkovite i snažne procedure za uklanjanje virusa. Snažna procedura omogućava uklanjanje virusa kao što je VZN. Coronavirus, koji ima lipidnu ovojnicu i uzrokuje teški akutni respiratorni sindrom inaktivira se osnovnim metodama uklanjanja virusa kod biofarmaceutika iz plazme (12). Glavne značajke aktualnih metoda uklanjanja virusa prikazane su u Tablici 2 (1).

Tablica 2. Postupci uklanjanja virusa (1).

Postupak	Proizvodi	Ciljani virusi	Komentari
Postupak obrade tijekom proizvodnje			
Obrada s topljivim površinskim aktivnim tvarima	Faktori zgrušavanja (npr. FVIII, protrombinski kompleks, FIX, vWF, fibrinogen) AT IgG fibrinsko ljepilo	O	Bez ili s ograničenom denaturacijom proteina tPAT tvari su uklonjene u podetapama pročišćavanja proteina
Pasterizacija	Faktori zgrušavanja (npr. FVIII, fibrinogen) IgG API AT	O većina BO	Proteinski stabilizatori mogu ograničiti inaktivaciju virusa B19 je otporan na toplinu 10% do 30% gubitka funkcionalne aktivnosti faktora zgrušavanja
Zasićena para	Faktori zgrušavanja (npr. FVIII) C1-inhibitor fibrinsko ljepilo	O većina BO	Kao i pasterizacija
Obrada s niskim pH (pH 4)	IgG	O	Kao i ostali proteini plazme gubi funkcionalnu aktivnost pri niskom pH
Obrada s kaprilatnom kiselinom (pH manji od 5,5)	IgG i IgM	BO osjetljivi pri pH 4 O	Kao i ostali proteini plazme gubi funkcionalnu aktivnost pri niskom pH
Nanofiltracija	Faktori zgrušavanja (npr. FIX, FXI, FVIII, vWF) IgG API AT fibrinsko ljepilo	O BO	Uklanjanje virusa mehanizmom temeljenom na veličini i ovisi o veličini i obliku virusa te o poroznosti nanofiltra
Terminalna obrada			
Pasterizacija	Albumin	O BO	Samo za proizvode izdržljive prema obradi s toplinom uz prisutnost male količine stabilizatora

Obrada sa suhim vrućim zrakom	Faktori zgrušavanja (npr. FVIII, FIX, protrombinski kompleks, FXI)	neki O neki BO	Inaktivacija virusa koji su rezistentni na toplinu ovisno o temperaturi i trajanju Teško inaktivira B19 10% do 20% gubitak funkcionalne aktivnosti faktora zgrušavanja

O - virusi s ovojnicom; BO - virusi bez ovojnice

Inaktivacija virusa tijekom procesa proizvodnje

Metoda obrade dispergiranih proteina topljivim površinski aktivnim tvarima (tPAT) je metoda koja je razvijena sredinom 80-tih godina prošlog stoljeća, a ostala je jedna od najčešćih osnovnih metoda inaktivacije virusa. Otopine se proteina inkubiraju između 4 do 6 sati pri 24 ˚C do 37 ˚C uz dodatak 0,3% do 1% Tri-*n*-butil-fosfata (TnBP) i 1% Tween 80 ili Tion X-100. Obično se virusi s lipidnom ovojnicom inaktiviraju unutar nekoliko minuta, dok se virusi bez ovojnice ne uspijevaju pri tome inaktivirati. Istodobno, funkcionalna aktivnost većine osjetljivih proteina plazme - s izuzetkom nekih inhibitora serin proteaza - ostaje očuvana. tPAT obično se uklanja kromatografskom adsorpcijom, specifičnom precipitacijom proteina ili selektivnom adsorpcijom na hidrofobnoj kromatografskoj koloni (19, 20).

Pasterizacija je također česti postupak inaktivacije virusa i predstavlja toplinsku obradu otopina proteina tijekom 10 sati pri 60 ˚C, čime se denaturiraju proteini virusa i inhibira se njihova replikacija. Pasterizacija može inaktivirati i viruse s ovojnicom i viruse bez ovojnice, ali stabilizator koji je nužan kako bi se spriječio gubitak funkcionalnosti proteina može suziti raspon virusne inaktivacije. Stabilizatori se mogu ukloniti ultrafiltracijom, precipitacijom proteina ili kromatografijom.

Obrada zasićenom vodenom parom ima širok raspon inaktivacije virusa što je osigurano temperaturom, tlakom i trajanjem provođenja procesa. U svakom slučaju kod primjene toplinskih postupaka postoji rizik od stvaranja neoantigena koji mogu povećati imunogeničnost proteina (1).

Inkubacija pri niskom pH (najčešće pH = 4) pri temperaturi od 30-37 ˚C tijekom više od 20 sati prvi put je korištena u ranim 80-tim godinama za proizvodnju IgG. Ovaj oblik obrade inaktivira većinu virusa s lipidnom ovojnicom. U novije vrijeme je uvedena obrada s kaprilatnom (oktanoičnom) kiselinom kojom dolazi do precipitacije/inkubacije pri pH nižem od 6 za obradu ljudskog IgG te može inaktivirati viruse s lipidnom ovojnicom (1).

Inaktivacija virusa u terminalnoj fazi

U suvremenom načinu frakcioniranja plazme, toplinski postupci obrade liofiliziranih proizvoda (suhi vrući zrak) zbog svojih se ograničenja najčešće koriste kao sekundarni postupak inaktivacije virusa. Takva obrada se primjenjuje kod nekih koncentrata faktora zgrušavanja. Obavlja se pri 80 ˚C tijekom 72 sata ili pri 100 ˚C tijekom 30 minuta, općenito uz prisutnost proteinskih stabilizatora koji pridonose sigurnosti od HAV-a i ostalih virusa osjetljivih na toplinu, ali ne i za B19. Terminalna (tekućinska) pasterizacija pri 60 ˚C tijekom 10 sati je "zlatni standard" u proizvodnji albumina. U formulaciji lijeka kao stabilizatori se dodaju masne kiseline, kaprilati i triptofanati, koji štite albumin od denaturacije toplinom, a koji su istodobno kompatibilni s terapijskom primjenom te se stoga ne uklanjaju iz proizvoda (20).

Postupak izdvajanja virusa

Nanofiltracija je specifična filtracija virusa koja se koristi kod otopina proteina, a temelji se na višeslojnim membranama ili ekvivalentnim sustavima veličine pora 15 do 75 nm, a s ciljem uklanjanja virusa mehanizmom prosijavanja. Uvedena je sredinom 90-tih godina prošlog stoljeća kad je i široko prihvaćena kao snažno sredstvo prvenstveno za sve proizvode izuzev albumina. Nanofiltracija se koristi kao dopuna osnovnim postupcima inaktivacije virusa i kako bi se povećala sigurnost protiv virusa bez ovojnice te ostalih rezistentnih infektivnih uzročnika.

Izdvajanje virusa se može odvijati tijekom precipitacije proteina, kromatografije ili filtracije; takvi postupci pridonose smanjenju virusnog opterećenja proteina plazme tijekom proizvodnje. S obzirom da se takvi koraci teško mogu pratiti, ne postoji jamstvo da takva metoda može biti dovoljna samostalno bez osnovnih postupaka inaktivacije virusa (1, 21).

Metode izdvajanja priona

U prenosive spongiloformne encefalopatije (TSE) ubrajamo niz bolesti među njima i Creutzfeldt-Jakobovu bolest i varijantu te bolesti (vCJB). Sve donedavno rizik prijenosa TSE putem ljudske krvi smatrao se teoretskim, iako su ispitivanja na animalnom modelu potvrđivala taj rizik. U 2004. godini prijavljena su dva slučaja vCJB kod kojih je do prijenosa bolesti došlo putem transfuzije donirane krvi. Takvi su slučajevi bili pokretač da se kao potencijalni rizik za plazmu i lijekove iz plazme smatra i prijenos vCJB, iako do danas takav prijenos nije zabilježen kod ovih lijekova. Zbog svoje biološke prirode, vjerovalo se da je prion rezistentan na trenutne postupke inaktivacije virusa koje se koriste tijekom frakcioniranja plazme. Poznate metode kojima se inaktiviraju abnormalni prionski proteini koji su povezani s TSE (kao što su oksidacija, obrada jakom lužinom, ekstremna toplina) ujedno uništavaju proteine plazme i zbog toga se ne mogu koristiti. Ipak, suvremeni procesi frakcioniranja čini se da osiguravaju značajno uklanjanje/izdvajanje priona TSE u proizvodnom postupku. Biokemijska priroda patogenog prionskog proteina (PrP) značajno se razlikuje od mnogih proteina koji se izoliraju frakcioniranjem. PrP je hidrofoban, relativno netopljiv te formira fibrile nakon pročišćavanja što nisu svojstva topljivih terapijskih proteina koji se dobivaju iz plazme. Na taj način, mnoge metode koje za uklanjanje onečišćenja iz proizvoda plazmatskih proteina također mogu uklanjati i prione. Potencijalno, uklanjanje priona se može dogoditi tijekom precipitacijske, filtracijske ili kromatografske faze procesa pročišćavanja s promjenjivim stupnjevima ovisno o uvjetima

pročišćavanja. Primjerice kod precipitacije etanolom, stupanj uklanjanja je općenito poboljšan povećanjem koncentracije etanola ili smanjenjem pH. Općenito, proizvodi koji se dobivaju u kasnijim fazama frakcioniranja, kao što su albumini, IgG, API bolje su zaštićeni od lijekova koji se dobivaju u ranijim fazama kao što su faktori zgrušavanja (1, 22).

4.1.3 INDUSTRIJSKI POSTUPCI U PROIZVODNJI SPECIFIČNIH PROTEINA PLAZME

Tehnologije za proizvodnju biofarmaceutika iz ljudske plazme značajno su napredovale u zadnjih 30 godina dovodeći do razvoja lijekova većeg stupnja čistoće i veće sigurnosti primjene.

4.1.3.1 Faktor VIII

U zadnjih 30 godina razvijeno je nekoliko generacija FVIII, a trenutno se najviše napora ulaže u postupke uklanjanja priona (17). Trenutno kod svih odobrenih koncentrata FVIII, lijek se dobiva pročišćavanjem iz krioprecipitata. Krioprecipitat se podvrgava kombinaciji adsorpcije aluminijevim hidroksidom i precipitaciji, ili samo precipitaciji (primjerice uz uporabu glicina) kako bi se smanjila razina ostataka o vitaminu K ovisnih faktora zgrušavanja (s obzirom da oni mogu aktivirati FVIII tijekom nizvodnog (engl. downstream) procesa pročišćavanja) ili opterećenje proteinima kao što su fibrinogeni. Pročišćeni krioprecipitat zatim prolazi kroz virusnu inaktivaciju uz pomoć tPAT ili pasterizacije. Mnogi procesi još uključuju i anionsku izmjeničnu kromatografiju, afinitet monoklonskim antitijelima (uz uporabu anti-FVIII ili anti-vWF mišja antitijela) ili afinitet imobiliziranog heparina kako bi se uklonila onečišćenja proteinima (kao što su fibrinogen i fibronektin), većina ili djelomično vWF i tPAT. Imunopročišćeni FVIII eluat dalje se pročišćava kromatografijom kako bi se uklonili mišji IgG

ligandi. Prije formulacije i sterilne filtracije, neki proizvodi FVIII prolaze i nanofiltraciju kod koje se koriste membranski filtri veličine pora 35, 20 ili čak 15 nm, ako je pokrenuta djelomična disocijacija FVIII i visoko molekularnog vWF multimera. Alternativno, neki se liofilizirani preparati obrađuju toplinom pri temperaturi 80 ˚C ili 100 ˚C kako bi se inaktivirali virusi bez ovojnica kao što je HAV. Iskorištenje postupka je između 100 i 200 i.j. FVIII po litri plazme (1 i.j. FVIII se definira kao fiziološka aktivnost FVIII prisutna u 1 ml plazme). Čimbenici koji utječu na smanjenje iskorištenja pri proizvodnji FVIII uključuju krioprecipitaciju, kromatografsko pročišćavanje i inaktivaciju virusa toplinom. Današnji koncentrati FVIII sadrže specifičnu aktivnost između 10 i 100 i.j./mg proteina odnosno između 250 i 1000 i.j./dozi/bočici. U nekim lijekovima FVIII je formuliran tako da sadrži i albumine, dok su u drugima nalazi u kombinaciji s vWF koji pomaže u stabilizaciji FVIII (1, 23).

4.1.3.2 Von Willebrandov faktor

Kako kromatografsko pročišćavanje FVIII uklanja sve ili dio vWF, FVIII proizvodi koji su učinkoviti u liječenju von Willebradove bolesti (vWB) uglavnom su proizvodi niske čistoće proizvedeni iz krioprecipitata u kojem se nalaze oba faktora. Niska čistoća i visok sadržaj proteina ograničava izbor postupka virusne inaktivacije na pasterizaciju ili terminalnu obradu suhim vrućim zrakom pri 80 ˚C tijekom 72 sata. Visoko pročišćeni vWF, u velikoj je mjeri odvojen od FVIII, te je stoga specifičan za liječenje vWB, proizvodi se iz krioprecipitata pomoću kromatografije u 3 koraka uz uporabu 2 anionska izmjenjivača obloženih imobiliziranom želatinom. Uklanjanje virusa se provodi s tPAT, 35-nm nanofiltracijom ili terminalnom obradom suhim vrućim zrakom pri 80 ˚C tijekom 72 sata (1, 23).

4.1.3.3 Fibrinogen

Tradicionalni se proizvodi dobivaju višestrukim precipitacijskim koracima iz plazme ili krioprecipitata uz uporabu etanola i glicina, dok se suvremeni proizvodi pročišćavaju kromatografijom. Uklanjanje virusa se postiže postupkom uz tPAT, često dopunjenim s 35-nm nanofiltracijom ili terminalnom obradom suhim vrućim zrakom. Također se koristi i pasterizacija pri 60 ˚C tijekom 20 sata (1, 23).

4.1.3.4 Fibrinsko ljepilo

Fibrinsko ljepilo uključuje fibrinogenom bogat i pročišćen trombinski koncentrat. Proizvodi se precipitacijskim metodama iz krioprecipitata ili iz Cohnove frakcije I; frakcija također može sadržavati fibronektin, vWF, ili FXIII koji su zaslužni za dodatne fiziološke funkcije. Fibrinogenske frakcije se podvrgavaju inaktivaciji virusa pomoću tPAT, pasterizacije, obradom zasićenom vodenom parom, i/ili nanofiltracijom. Koncentracija fibrinogena je obično iznad 80 g/l i može biti formuliran uz dodatak antifibrinolitičkih tvari (1, 23).

4.1.3.5 Protrombinski kompleks

Koncentrat protrombinskog kompleksa (KPK) je smjesa faktora zgrušavanja ovisnih o vitaminu K u kojima FIX, FII, FX, protein C i protein S imaju nisku specifičnu aktivnost između 0,5 i 2 i.j./mg. Ako proizvod sadrži još i FVII, njegova je razina manja od razine FIX. Proizvodnja se osniva na metodi koja je razvijena još 1960-tih godina, a uključuje dietilaminoetil (DEAE) Sephadex ili apsorbirajuću celulozu s DEAE za krio-siromašnu plazmu. Nizvodne etanolne frakcije također mogu biti upotrjebljene kao početni materijali. Za inaktivaciju virusa najčešće se koristi tPAT metoda dopunjena 35-nm ili 15-nm nanofiltracijom te terminalna obrada suhim vrućim zrakom. Može se koristiti i pasterizacija i obrada zasićenom vodenom parom. Inaktivacija

tPAT metodom zahtjeva posljedičnu ionsku kromatografiju za uklanjanje tvari za inaktivaciju virusa. Iskorištenje postupka je između 250 i 380 i.j. FIX po litri plazme (1, 23).

4.1.3.6 Faktor IX

Visoko pročišćeni proizvodi s FIX razvijeni su kasnih 80-tih godina prošlog stoljeća što je dovelo do smanjenja tromboembolijskih poremećaja kod bolesnika s hemofilijom B u odnosu na prethodno primjenjivani KPK. FIX se dobiva kromatografskim pročišćavanjem iz KPK uz uporabu anionskog izmjenjivača u kombinaciji s imobiliziranim heparinom, afinitetnim metal kelatima ili monoklonskim protutijelima. Takvim procesima dobivaju se koncentrati FIX srednje specifične aktivnosti između 100 i 150 i.j./mg proteina, a iskorištenje postupka iznosi između 200 i 300 i.j. FIX po litri plazme (1, 24).

4.1.3.7 Faktor VII

Proizvodni postupak uključuje ionsku izmjeničnu kromatografiju ili adsorpciju aluminij hidroksidom, nakon čega slijedi nizvodni postupak sličan kao kod KPK i FIX. Inaktivacija virusa postiže se tPAT metodom, obradom zasićenom vodenom parom ili suhim vrućim zrakom (1, 24).

4.1.3.8 Faktor XI

Faktor XI može imati nisku pročišćenost i tada se pročišćava kromatografijom krio-siromašne plazme na DEAE celulozi i imobiliziranom heparinu. Nakon liofilizacije proizvod se podvrgava i obradi suhim vrućim zrakom kako bi se inaktivirali virusi. Visoko pročišćeni FXI se dobiva adsorpcijskom filtracijom nakon koje slijedi kationska izmjenična kromatografija. Inaktivacija virusa se provodi tPAT metodom uz dodatnu 15-nm nanofiltraciju (1, 25).

4.1.3.9 Faktor XIII

Faktor XIII je transglutaminaza koja katalizira završni korak u kaskadi zgrušavanja krvi, umreženi slobodni fibrinski polimer visoko organizirane strukture. Rana generacija koncentrata FXIII se dobivala iz placente, ali su kasnije ovi koncentrati zamijenjeni s koncentratima FXIII koji se dobivaju iz plazme. Proizvodi se na način da se prvo obavlja pročišćavanje supernatanta iz etanolne frakcije kriprecipitata, a pročišćavanje se provodi natrijevim citratom pri čemu se fibrinogen uklanja zagrijavanjem. Proizvod se zatim pasterizira u otopini sorbitola, sorbitol se uklanja ultrafiltracijom, zatim se vrši adsorpcija bentonitom i na kraju liofilizira (1, 26).

4.1.3.10 Aktivirani faktori zgrušavanja

Koncentrati ljudskog trombina dostupni su kao komponenta fibrinskog ljepila. Trombin se priprema aktivacijom KPK, često uz prisutnost kalcijevog klorida, nakon čega slijedi inaktivacija tPAT postupkom, pročišćavanje kationskom izmjeničnom kromatografijom i uklanjanje virusa 15-nm nanofiltracijom. Gotovi koncentrat trombina obično ima između 300 i 1000 i.j./ml, ali se izrađuje i proizvodi s manjom aktivnosti jer se koristi za kirurške zahvate kod kojih je potrebno sporije stvaranje ugruška.

Proizvodnja pročišćenog FVIIa je razvijena u Japanu. FVII se pročišćava anionskom izmjeničnom i imunoafinitetnom kromatogarfijom, a zatim se konvertira u FVIIa autoaktivacijom na anionskoj izmjeničnoj smoli i inkubacijom uz dodatak kalcijevih iona tijekom 18 sati pri 10 ˚C. Međuproizvod se zatim podvrgava nanofiltraciji i obradi suhim vrućim zrakom kako bi se uklonili virusi. Namijenjen je liječenju hemofiličara koji su razvili protutijela protiv FVIII ili FIX (23).

4.1.3.11 Antikoagulansi i inhibitori proteaza

Antitrombin (AT). Koncentrati AT su bili prvi proizvodi koji su proizvedeni afinitetnom kromatografijom. Proizvodnja iz krio-siromašne plazme obično uključuje ionsku izmjeničnu kromatografiju kako bi se uklonila KPK komponenta, nakon čega se dobiva AT pomoću imobiliziranog heparina. Uklanjanje virusa se obavlja pasterizacijom uz dodatak natrijeva citrata ili kombinacije saharoze i glicina, iako je tPAT postupak također dobar. Iskorištenje postupka je između 250 i 350 i.j./l plazme. AT se može dobiti i iz frakcije IV-1 kao polaznog materijala, ali su u tom slučaju iskorištenja znatno manja (23).

Alfa 1-proteinaza inhibitor (API, drugi naziv: alfa 1-antitripsin). Kako API ima slična fizičko-kemijska svojstva kao i albumin, molekularnu masu i izoelektričnu točku, bilo je teško osmisliti proizvodni postupak za API koji neće utjecati na već postojeći proizvodni postupak albumina. Proizvodi se uglavnom dobivaju iz frakcije IV 1-4, odnosno frakcije za otpad, koja zatim prolazi PEG precipitaciju i ionsku izmjeničnu kromatografiju. Iskorištenja su u tom slučaju mala i iznose oko 0,2 g/l. Inaktivacija virusa se provodi pasterizacijom ili dvostrukim postupkom uklanjanja virusa koji uključuje tPAT postupak i nanofiltraciju što se danas više koristi. U slučajevima kada postoji smanjena klinička potreba za albuminima, izolacija API iz gornjih frakcija, kao što su supernatant II i III, omogućava mnogo učinkovitiju proizvodnu shemu kod koje se mogu dobiti iskorištenja od 0,6 do 1 g/l (1, 23).

Protein C. Može se proizvoditi na dva načina. Prvi postupak započinje iz KPK koji se podvrgava pročišćavanju na 3 ionska izmjenjivača, dok se kod drugog procesa afinitetna i imunoafinitetna kromatografija kombiniraju s ionskom izmjenom. Uklanjanje virusa se postiže tPAT postupkom koji se može kombinirati s 15-nm nanofiltracijom ili s obradom suhim vrućim zrakom (1, 24).

Inhibitor C1-esteraza (ICE). ICE se dobiva pročišćavanjem afinitetnom ili ionskom izmjeničnom kromatografijom iz krio-siromašne plazme nakon ekstrakcije iz KPK-a i potencijalno AT-a. Inaktivacija virusa postiže se pasterizacijom, obradom suhim vrućim zrakom ili tPAT postupkom po mogućnosti u kombinaciji s nanofiltracijom (1, 24).

4.1.3.12 Albumin

Albumin je protein plazme odlične topljivosti i stabilnosti zbog čega se nalazi kao djelatna ili pomoćna tvar u mnogim terapijskim pripravcima. Svi pripravci albumina za terapijsku primjenu dobivaju se postupkom frakcioniranja iz krio-siromašne (ili KPK-siromašne i/ili AT-siromašne i/ili C1-inhibitor-siromašne) plazme pomoću etanola. Kritičnim uzvodnim (engl. upstream) procesom (precipitacija II i III) odvaja se IgG frakcija. Kako bi se optimiziralo iskorištenje, precipitati dobiveni frakcioniranjem etanolom odvajaju se dubinskom filtracijom. Obično se postižu iskorištenja albumina od 75% do 85% (25-28 g/l) i čistoće od 96% do 98%. Neki postupci kombiniraju frakcioniranje etanolom s ionskom izmjeničnom kromatografijom, koja općenito poboljšava čistoću albumina do 99%, gdje se albumin pročišćava anionskom izmjeničnom, kationskom izmjeničnom i gel-filtracijskom kromatografijom. Prilagodba koncentracije pročišćene frakcije, obično od 4% do 25%, postiže se ultrafiltracijom. Standardna metoda inaktivacije virusa je pasterizacija, koja bi se u skladu s farmakopejom trebala provoditi u gotovom pakiranju, bolje nego na seriji proizvoda neposredno prije aseptičkog punjenja. Srednja vrijednost iskorištenja albumina je između 24 i 26 g/l plazme (23).

4.1.3.13 Imunoglobulin G

Polivalentni preparati IgG, bilo da se primjenjuju intramuskularno, intravenski ili supkutano, tradicionalno se proizvode iz frakcije II, na način da se postupno frakcioniraju iz krio-siromašne plazme uz uporabu hladnog etanola koncentracije do 25%. Kako bi se optimiziralo iskorištenje, IgG proizvodi se ekstrahiraju iz gornjih etanolom precipitiranih frakcija, kao što su supernatant III ili precipitat II + III. Intermedijarne IgG frakcije se podvrgavaju ionskoj izmjeničnoj kromatografiji, kaprilatnoj kiselini ili PEG precipitacijama kako bi se uklonila proteinska onečišćenja, proteolitički enzimi i/ili agregati. Inaktivacija virusa provodi se inkubacijom pri niskom pH, pasterizacijom, tPAT postupkom, te obradom kaprilatnom kiselinom. Uklanjanje virusa 15-nm i 35-nm nanofiltracijom se koristi kada se žele ukloniti virusi bez ovojnice. Iskorištenje IgG kada se kombiniraju tradicionalno frakcioniranje etanolom i centrifugiranje iznosi između 2,7 i 3,2 g/l. Dubinska filtracija i/ili kromatografsko pročišćavanje uzvodnih frakcija mogu poboljšati srednje iskorištenje na raspon između 3,5 i 4,5 g/l ili više. Kromatografske tehnike se sve više koriste za proizvodnju hiperimunih IgG (specifičnih IgG), jer predstavljaju tehnike izbora za frakcioniranje manjih volumena plazme i mogu optimizirati iskorištenje. Proizvodni postupak mora uključivati najmanje dva postupka uklanjanja virusa (23).

4.2 KONTROLA KAKVOĆE

4.2.1 Procesna kontrola kakvoće

Prema europskim smjernicama dobre proizvođačke prakse za lijekove iz ljudske plazme, procesna kontrola kakvoće pri proizvodnji biofarmaceutika iz ljudske plazme mora biti opisana kroz postupke nadzora nad proizvodnjom, prostorom i opremom, a tamo gdje se provode kontrolna ispitivanja, načine uzimanja i čuvanja uzoraka, kao i postupke ispitivanja.

Izrada pula plazme mora biti pažljivo kontrolirana kako bi se izbjegla kontaminacija i ulazak stranog materijala. Obavezno se moraju dokumentirati nadzor nad relevantnim parametrima tijekom proizvodnje, kao što su pH, temperatura, koncentracija etanola, protein i njegova aktivnost gdje je prikladno, kao i rezultati broja bakterija i endotoksina. Identifikacije kritičnih procesnih kontrola kakvoće i njihovih ograničenja moraju biti na razini koju propisuje Q6B (CPMP/ICH/365/96) (27, 28).

4.2.2 Kontrola kakvoće gotovog lijeka

Svi gotovi biofarmaceutici iz ljudske plazme za koje postoje monografije u Europskoj farmakopeji moraju odgovarati zahtjevima određene monografije.

Svi se relevantni parametri moraju određivati u svakoj seriji gotovog lijeka. Dodatno, ispitivanja se moraju raditi na tvarima koje se koriste tijekom formulacije ili tijekom proizvodnje; primjerice, određivanje ostatne koncentracije otapala / tPAT tamo gdje su bili korišteni. Parametri specifikacija moraju odražavati učinkovitost proizvodnog procesa u skladu s Q6B. Uvijek kada je moguće interne referentne tvari treba odrediti u odnosu na internacionalne, farmakopejske referentne tvari (internacionalne standarde).

Serije tvari ili lijeka koje se koriste kao interne (engl. in-house) referentne tvari/materijali moraju biti detaljno opisane, a njihova namjena specificirana. Sve razlike u njihovoj proizvodnji u odnosu na komercijalnu proizvodnju moraju biti jasne. Također se mora uspostaviti procedura kojom se referentne tvari/materijali međusobno zamjenjuju. Uvijek kada je moguće interne referentne tvari treba odrediti u odnosu na internacionalne, farmakopejske referentne tvari (internacionalne standarde).

Varijabilnost početnih materijala / sirovina i heterogenost biofarmaceutika iz ljudske plazme važno je razmatrati tijekom validacije analitičkih metoda koje se koriste za sirovine, procesne

kontrole, djelatnih tvari i lijekova. Validacija se treba obavljati u skladu s važećim smjernicama za validaciju analitičkih metoda. Također se mora potvrditi prikladnost metoda opisanih u određenim monografijama vodeći računa o specifičnostima lijeka. Ako se koriste metode koje nisu obuhvaćene Europskom farmakopejom, mora se pokazati da alternativne metode daju ekvivalentne rezultate na više različitih serija lijeka.

Monografije Europske farmakopeje za biofarmaceutike iz ljudske plazme revidiraju se relativno često ovisno o zahtjevima nacionalnih regulatornih tijela, a na prijedlog proizvođač lijekova ili samih korisnika farmakopeja kako bi se potaknula uporaba alternativnih metoda ispitivanja (primjerice ispitivanje prisutnosti sadržaja pirogenih tvari *in vitro* metodom naspram ispitivanja pirogenih tvari *in vivo* koje se provodi na animalnom modelu kunića) (27, 28).

4.3 ODOBRAVANJE I FARMAKOVIGILANCIJA

Kao i za druge lijekove biološkog podrijetla, prije odobravanja biofarmaceutika iz ljudske plazme proizvođač mora dokazati ujednačenost kakvoće biofarmaceutika od serije do serije, kao i odsutnost virusnih kontaminanata u onom opsegu u kojem to dozvoljava tehnologija. Uz uobičajenu dokumentaciju koja se predaje nadležnom tijelu u svrhu stavljanja lijeka u promet, proizvođač biofarmaceutika iz ljudske plazme prilaže i PMF, koji podliježe znanstvenoj i tehničkoj ocjeni nadležnog tijela (29, 30).

PMF je samostalan dokument neovisan o ostaloj registracijskoj dokumentaciji, čija evaluacija i certifikacija nije obvezujuća od strane Europske agencije za lijekove (EMA), ali uvelike pojednostavljuje proceduru odobravanja, kako za nositelja odobrenja tako i za regulatorno tijelo ako se radi o lijekovima namijenjenima tržištima više od jedne zemlje Europske unije. Evaluaciju i certifikaciju od strane EMA moraju prihvatiti sve zemlje Europske unije. PMF se može

certificirati tijekom samog postupka odobravanja lijeka (bilo da se radi o centraliziranom postupku, postupku međusobnog priznavanja, decentraliziranom ili nacionalnom postupku), a u slučaju već odobrenog lijeka i naknadno. Nakon inicijalne certifikacije, PMF se mora ažurirati i re-certificirati jednom godišnje. Prilikom predaje zahtjeva za odobrenje novog lijeka koji se dobiva iz istog proizvodnog pula plazme, opisanog u već odobrenom PMF-u, nositelj odobrenja se poziva na već certificirani PMF, a popis lijekova koje obuhvaća jedan PMF, sastavni je dio tog PMF-a uključujući i one lijekove koji su u postupku odobravanja.

Unutar PMF-a moraju biti navedene sve institucije iz kojih se dobiva plazma za proizvodnju lijekova, te za svako mjesto moraju biti priloženi epidemiološki podaci o infekcijama koje se prenose krvlju za lokalno područje koje ta institucija pokriva (31).

Nakon ocjene PMF-a i registracijske dokumentacije, za svaki pojedini lijek dobiven iz plazme, nadležno tijelo izdaje odobrenje i provodi posebnu provjeru kakvoće serije lijeka koja je namijenjena tržištu. Posebna provjera kakvoće lijeka odnosi se na stručno administrativnu ocjenu dokumentacije o pojedinoj seriji lijeka na kojoj se obavlja posebna provjera kakvoće i laboratorijsko ispitivanje lijeka (32). Uz zahtjev za posebnu provjeru kakvoće lijeka iz ljudske plazme podnositelj zahtjeva obvezan je priložiti dokaz da je pul plazme koji je korišten u proizvodnji lijeka ispitan na virusne markere od strane službenog laboratorija za provjeru kakvoće lijeka u Europskoj uniji (33, 34).

Glavni čimbenici rizika pri primjeni biofarmaceutika iz ljudske plazme proizlaze iz prirode ishodne sirovine, odnosno pula plazme koja se dobiva od heterogene skupine dobrovoljnih davatelja. Iako suvremena proizvodnja lijekova iz plazme uključuje niz mjera za sprječavanje prijenosa infekcija kao što su odabir davatelja, analizu pojedinačnih donacija i pula plazme u svrhu otkrivanja specifičnih markera infekcija te provedbu učinkovitih koraka proizvodnje za inaktivaciju / uklanjanje virusa, kod primjene lijekova koji se dobivaju iz plazme mogućnost

prijenosa zaraznih bolesti ne može biti potpuno isključena. To se također odnosi na nepoznate viruse ili viruse u nastajanju te na druge patogene.

Ostali čimbenici rizika primjene biofarmaceutika iz ljudske plazme povezani su s kakvoćom proizvoda na koju može utjecati proces obrade ishodne sirovine, zbog čega se nakon primjene lijeka mogu javiti reakcije preosjetljivosti i trombotski događaji (29).

Postupanje s nuspojavama kao i uspostavljanje farmakovigilancijskog sustava kod proizvođača biofarmaceutika iz ljudske plazme provodi se u skladu s Dobrom farmakovigilancijskom praksom (engl. Good pharmacovigilance practices), te se svaka sumnja na prijenos uzročnika krvlju prenosivih bolesti također mora prijaviti i evidentirati kao i sve ostale nuspojave (35). Kako je veliki broj prijava sumnji na nuspojave ovih lijekova povezano s kakvoćom lijeka, farmakovigilancijske aktivnosti moraju biti usko povezane s aktivnostima kontrole kakvoće, te se takvi podaci između odjela farmakovigilancije i kontrole kakvoće moraju razmjenjivati.

4.4 KLINIČKI ASPEKTI BIOFARMACEUTIKA IZ LJUDSKE PLAZME

4.4.1 LJUDSKA PLAZMA - SLOŽENI BIOLOŠKI FLUID

4.4.1.1 Sustav zgrušavanja

Proces zgrušavanja predstavlja niz kompleksnih i povezanih reakcija u kojima sudjeluju plazmatski glikoproteini koje još zovemo faktorima zgrušavanja. Većina faktora zgrušavanja nastaje u jetri i izlučuje se u cirkulaciju. Faktore zgrušavanja označavamo rimskim brojevima prema redoslijedu njihova otkrića. Većina faktora zgrušavanja nalazi se u cirkulaciji u neaktivnom obliku i nema prokoagulantne aktivnosti. Tijekom zgrušavanja slijed reakcija dovodi do prijelaza prethodnika u aktivni oblik ili oblik kofaktora. Oznaka za aktivni oblik faktora

zgrušavanja ima malo slovo "a" uz rimsku brojku. Faktori zgrušavanja mogu se podijeliti u nekoliko skupina prema svojim karakteristikama. Faktori proenzimi (protrombin, prekalikrein, faktori XII, XI, X, IX i VII) prelaze u aktivne serinske proteaze tijekom procesa zgrušavanja. Kininogeni visoke molekularne mase, tkivni faktor (TF) i faktori V i VIII su kofaktori. TF je fiziološki prisutan u ekstravaskularnom prostoru i mora doći u dodir s krvi da bi djelovao kao kofaktor (36).

Prema karakteristikama razlikujemo sljedeće skupine faktora zgrušavanja:

1. **Protrombinska skupina faktora zgrušavanja** - faktori ovisni o vitaminu K: protrombin (FII), protein C, protein S, faktori VII, IX i X; svi su serinske proteaze osim proteina S,
2. **Skupina faktora V i VIII** - kofaktori serinskim proteazama,
3. **Trombin** - serinska proteaza koja nastaje iz protrombina u reakciji koju katalizira FXa; ima mnogobrojne fiziološke funkcije,
4. **Faktori kontaktne aktivacije** - to su prekalikrein, kininogen velike molekularne mase, faktor XII i faktor XI.

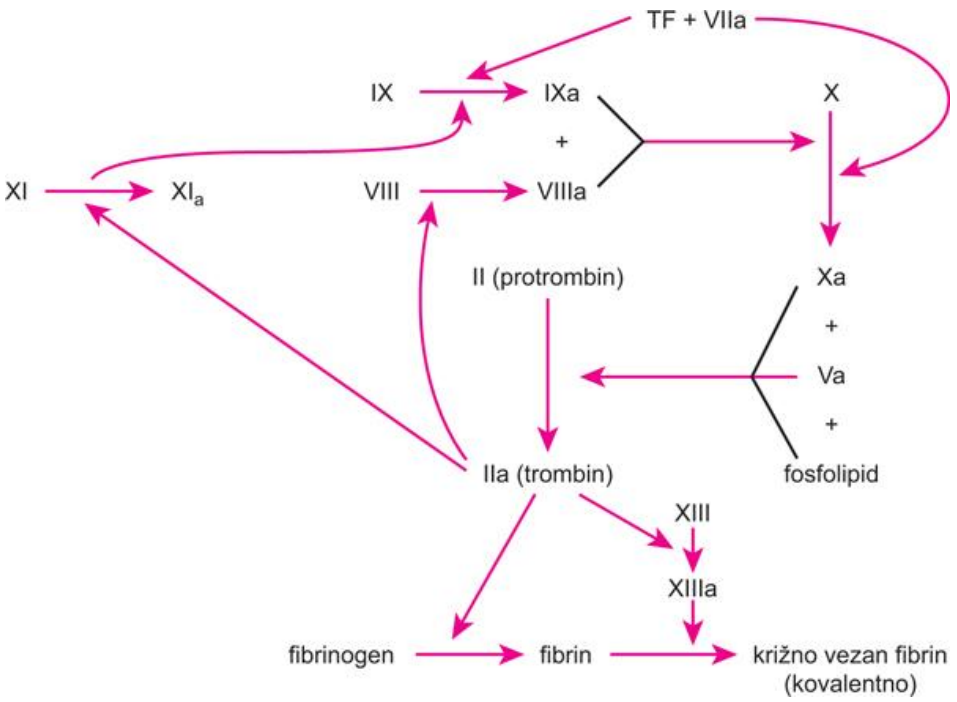
Glavna funkcija sustava zgrušavanja je stvaranje fibrina. Proces aktivacije tradicionalno se dijeli u vanjski i unutarnji put, iako *in vivo* ne postoje jasne podjele. Vanjski je put glavni put aktivacije zgrušavanja, gdje je ključna komponenta TF koji ima jaki afinitet za FVII. U slučaju ozljede TF ulazi u krv i uz prisutnost kalcija, FVII tvori kompleks s TF te se stvara FVIIa. Male količine FVIIa koje cirkuliraju, aktiviraju Xa i IXa koji povratno olakšavaju daljnju aktivaciju FVII vezanog za TF. Faktor IXa aktivira FXa, a FVIII je kofaktor koji povećava aktivnost FX. FXa je jedini enzim koji može pretvoriti protrombin u trombin. Jednom stvoreni trombin posreduje u pretvorbi fibrinogena u fibrin. Trombin katalizira pretvorbu FXIII u aktivni oblik koji tvori stabilni ugrušak (36).

Aktivacija FX s kompleksom FVIIa/TF kratkog je vijeka zbog prisutnosti inhibitora sustava zgrušavanja, inhibitora faktora tkivnog puta (tFPI). tFPI je inhibitor serinskih proteaza tipa Kunitz, regulira FVIIa/TF i katalitičku aktivnost FXa. Svoju inhibicijsku aktivnost iskazuje najprije vezanjem, a potom inhibicijom FXa i stvaranjem kompleksne inhibitorne strukture tFPI/Xa/VIIa/TF. Oslobađa se stimulacijom trombina (36).

Drugi fiziološki inhibitor sustava zgrušavanja jest AT III, plazmatski glikoprotein koji neutralizira trombin, faktore IXa, Xa, XIa i XIIa. Oni se međusobno vežu i to na AT III, a reaktivno mjesto je arginin (dok je na enzimu tj. faktorima zgrušavanja serin). Najvažnija je inhibicija trombina i FXa. Stvaranje kompleksa između AT III i enzima je spora bez prisutnosti heparina. Trombin inhibira i protein, heparinski kofaktor II.

Treći tip fiziološke inhibicije sustava zgrušavanja jest putem proteina C. Protein C se aktivira nakon vezanja trombina na trombomedulin, koji se nalazi na površini endotelne stanice. Nastali kompleks aktivira protein C koji je sposoban razgraditi aktivirani FVIIIa i FVa, te tako spriječiti daljnje stvaranje trombina. Djelovanje proteina C pojačava drugi o vitaminu K ovisni protein S, koji veže protein C za površinu trombocita. Osim toga aktivirani protein C potiče fibrinolizu.

Reakcija stvaranja fibrina u aktiviranom sustavu zgrušavanja shematski je prikazana Slikom 3 (37).



Slika 3. Sustav zgrušavanja (37).

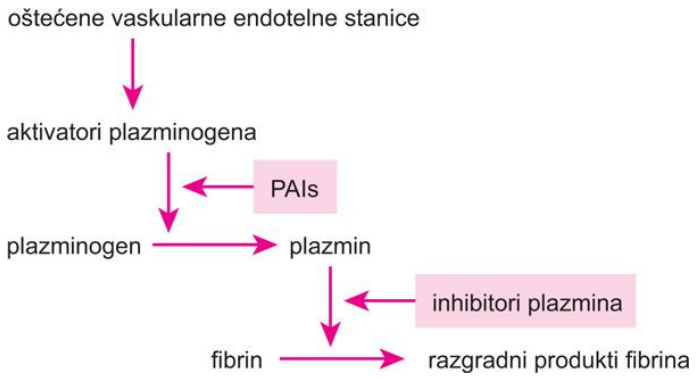
4.4.1.2 Sustav fibrinolize

Fibrinoliza je normalan hemostatski odgovor na oštećenje krvnih žila, odnosno fiziološki proces odstranjivanja neželjenih, netopljivih depozita fibrina enzimatskim cijepanjem, pri čemu nastaju topljivi fibrinski fragmenti.

Plazminogen je beta-globulin i proenzim u krvi i tkivnim tekućinama kojeg aktivatori pretvaraju u aktivni oblik plazmin. Aktivatori mogu biti unutarnji poput FXII, FXI i kalikrein, vanjski poput tkivnog aktivatora plazminogena (tPA) ili streptokinaze, urokinaze itd. tPA je serinska proteaza koja nastaje u endotelnim stanicama i veže se za fibrin. To pospješuje sposobnost pretvaranja plazminogena vezanog za tromb u plazmin. tPA se oslobađa nakon stimulacije traumom, naporom ili emocionalnim stresom. tPA je najvažniji aktivator plazminogena i viša je u starijoj dobi. Visoka razina tPA povezana je sa sklonošću krvarenju, a niža s razvojem tromboze.

Inhibitor tkivnog aktivatora plazminogena (PAI) je brzi inhibitor tPA, a nalazi se u plazmi i u trombocitima. Iz trombocita se kontinuirano oslobađa u cirkulaciju. Plazmin ima širu aktivnost nego trombin. Cijepa argininske i lizinske peptidne veze u različitim supstratima pa tako cijepa fibrinogen, fibrin, FV i FVIII. Cijepanjem fibrinogena ili fibrina plazminom stvaraju se dva osnovan tipa produkata: mali fragmenti (A, B, C) i veliki fragmenti koji se dalje cijepaju. Najveći je fragment X i on se oslobađa pri ranom cijepanju fibrinogena ili fibrina. Zadržao je osjetljiva mjesta za trombin i stoga je kompetativni inhibitor trombina. Daljnji manji fragmenti su Y, D i E. Fragment Y kompetativni je inhibitor polimerizacije fibrina. Velike količine D i E fragmenata nalaze se u plazmi bolesnika s diseminiranom intravaskularnom koagulacijom (DIK) i otporni su na daljnje djelovanje plazmina (36).

Sustav fibrinolize shematski je prikazan Slikom 4 (37).



Slika 4. Sustav fibrinolize (37).

4.4.1.3 Sustav komplementa

Sustav komplementa je sustav međusobno funkcionalno povezanih proteina čija aktivnost pokreće niz precizno reguliranih međureakcija. Sastavljen je od najmanje 30 proteina plazme koji

sudjeluju u obrani organizma kao i u imunološkim reakcijama. Svaka komponenta komplementa se razgrađuje u okviru svojih ograničenih proteolitičkih reakcija, koje mogu biti potaknute klasičnim, alternativnim ili u novije vrijeme opisanim lektinskim putem. Komponente klasičnog puta su obilježene velikim slovom C i brojem (npr. C1, C3) redoslijedom kojim su otkrivene. Komponente alternativnog puta su obilježene slovima (faktor D) ili imaju vlastita imena (npr. properdin).

Alternativni put je primitivniji i može biti potaknut različitim supstancama poput polisaharida (primjerice endotoksini) koji su smješteni u staničnoj stjenki ili pak mikroorganizmima. Aktivacija sustava komplementa klasičnim putem posredovana je imunim kompleksima i zahtijeva vezanje prve komponente komplementa C1 na Fc dio imunoglobulina za što su naročito prikladni IgG1, IgG3 i IgM izotipovi. Lektinski put je strukturno i funkcionalno sličan klasičnom putu, a potaknut je manoza vezujućim proteinom - lektinom, koji se veže za bakterijsku površinu koja sadrži manozne polisaharide. Nasljedni nedostatak ovog proteina u krvi utječe na imunološki sustav, te su osobe koje nose takav poremećaj sklone čestim infekcijama, među ostalim i ozbiljnih infekcijama kakve su pneumonija i meningitis (38).

4.4.2 PREGLED PATOLOŠKIH STANJA

Biofarmaceutici iz ljudske plazme indicirani su za primjenu kod:

- **nasljednih poremećaja zgrušavanja** (hemofilija A, von Willebradova bolest, hemofilija B, različiti nasljedni poremećaji ostalih faktora zgrušavanja krvi),
- **stečenih poremećaja zgrušavanja** (poremećaj vitamina K, DIK, protutijela na faktore zgrušavanja),

- nasljednih i/ili stečenih poremećaji hemostaze koji predisponiraju razvoj tromboze - **trombofilije ili hiperkoagulabilnost** (nasljedni manjak proteina C, proteina S, antitrombina i drugi),
- **imunodeficijencija**,
- **autoimunih bolesti** i
- ostalih poremećaja (primjerice imunoprofilaksa bjesnoće, hepatitisa B, tetenusa) (36).

4.4.2.1 Nasljedni poremećaji zgrušavanja

Hemofilija A ili klasična hemofilija nasljedni je poremećaj zgrušavanja krvi koji je posljedica manjka ili stvaranja defektne molekula plazmatskog FVIII. To je najpoznatiji i najčešći teški, nasljedni poremećaj zgrušavanja. Hemofilija A se pojavljuje kod 1 na 5000 muške novorođenčadi i na nju otpada otprilike 80-85% svih slučajeva hemofilije. Hemofilija A uzrokuje niz mutacija u velikom genu FVIII koje dovode do snižene razine plazmatskog FVIII. Nasljeđuje se spolno vezano, a trećina svih bolesnika nema podataka o bolesti u obitelji pa se smatra da je uzrok spontana mutacija (36, 39).

Bolest se klinički očituje prekomjernim krvarenjem u različite dijelove tijela i nema razlike u kliničkim obilježjima hemofilije A i B. U bolesnika s teškim oblikom bolesti prevladavaju opetovana bolna krvarenja u zglobove i hematomi u mišićima koji s vremenom progrediraju u tipične deformacije i invalidnost. Primarna hemostaza kod bolesnika s hemofilijom je uredna pa nema prekomjernih krvarenja kod površinskih ozljeda ili ogrebotina. Osim u zglobove krvarenje se može dogoditi i u visceralne organe, a najopasnije je u središnji živčani sustav. Klasifikacija težine bolesti temelji se na kliničkoj slici, simptomima krvarenja ili na razini nedostatnog FVIII u plazmi:

- teška hemofilija - razina FVIII je ispod 1% normale; spontana krvarenja u zglobove i mišiće, krvarenja nakon ozljeda, operacija i nesreća;
- umjerena hemofilija - razina FVIII od 1 do 5% normale; krvarenja u zglobove i mišiće nakon minimalne traume, prekomjerno krvarenje nakon operacija ili vađenja zuba;
- blaga hemofilija - razina FVIII od 5 do 40 % normale; nema spontanog krvarenja, samo nakon operacija, vađenja zubi i trauma.

Produžena se krvarenja pojavljuju i nakon ekstrakcije zuba. Hematurija se događa češće od gastrointestinalnog krvarenja. Perioperativna i postoperativna krvarenja u bolesnika s hemofilijom vitalno ga ugrožavaju kod teškog i umjerenog oblika bolesti. Spontano intracerebralno krvarenje pojavljuje se kod teškog oblika, češće nego u općoj populaciji. Iako se to rijetko događa, ubraja se u češće uzroke smrti (36, 39).

Rizik od razvoja inhibitora u bolesnika s hemofilijom povezan je s tipom prisutne mutacije koja znatno cijepa ili sprječava produkciju FVIII. Također, rizik od pojave inhibitora najveći je unutar prvih 20 do 100 dana liječenja s FVIII, pa su stoga najčešća u djece. Inhibitorna su protutijela uglavnom IgG imunoglobulini i vežu se na specifična mjesta unutar molekule FVIII.

Do nedavno su mnogi bolesnici s hemofilijom imali subkliničku sliku jetrene bolesti, a jedan od najčešćih uzorka smrti AIDS. To su bile posljedice prijenosa virusa hepatitisa A, B i C, te HIV-a putem koncentrata FVIII iz ljudske plazme. Uvođenjem metoda virusne inaktivacije, rizik od ovih infekcija se smanjio.

Liječenje hemofilije A provodi se primjenom FVIII koji nedostaje. Danas se smatra da je profilaktičko liječenje optimalan način liječenja bolesnika s teškim oblikom hemofilije, a primjenjuje se već od ranog djetinjstva. Cilj je održati razinu aktivnosti FVIII i/ili FIX na više od 1-2% normalne aktivnosti i tako spriječiti pojavu spontanih krvarenje. Lijek izbora je koncentrat

FVIII, dok je desmopresin alternativna mogućnost. Akutna krvarenja u bolesnika s inhibitorima na FVIII i/ili FIX liječe se primjenom aktiviranog koncentrata faktora protrombinskog kompleksa (engl. Factor eight inhibitor bypass activity, FEIBA) (36, 39).

Von Willebrandova bolest najčešći je nasljedni poremećaj hemostaze u ljudi, koji nastaje zbog mutacije na genu za vWF. vWB se većinom prenosi autosomno dominantno, no neki su bolesnici naslijedili dvostruko recesivni gen i oni uglavnom imaju teški oblik bolesti.

VWF je veliki protein koji se nalazi u plazmi i trombocitima i njegova je osnovna funkcija u posredovanju između eritrocita i endotela krvnih žila, odnosno u poticanju stvaranja ugruška na mjestu ozljede krvne žile. Osim toga sudjeluje u međusobnom odnosu trombocita s trombocitom i nositelj je FVII kojeg stabilizira.

Prema težini bolesti razlikujemo šest tipova vWB: tip 1, tip 2A, tip 2B, tip 2M, tip 2N, i tip 3. Pri tome tip 1 ima djelomični kvantitativni manjak vWF, dok kod tipa 3 postoji potpuni manjak vWF. Klinička slika podsjeća na hemofiliju A. Prisutna je sklonost krvarenju u meka tkiva i zglobove, mokraćni trakt, te krvarenja nakon manjih medicinskih invazivnih zahvata. Menoragije mogu biti veliki klinički problem.

Liječenje vWB ovisi o njenoj težini i tipu. U liječenju se primjenjuje desmopresin i koncentrat FVIII i vWF. Desmopresin, analog vazopresina djeluje tako da pospješuje oslobađanje vWF iz endotelnih stanica i povisuje razinu vWF i FVIII u cirkulaciji, te je lijek izbora kod tipa 1. Koncentrati vWF i FVIII se primjenjuju kod bolesnika koji ne reagiraju na desmopresin, što se obično događa u tipovima 2B i 3 (36).

Hemofilija B ili nasljedni manjak FIX nasljeđuje se spolno, X-vezano, recesivno i mnogo je rjeđi oblik od hemofilije A (oko 5 puta). Klinički se hemofilija B ne može razlikovati od hemofilije A.

Klasifikacija bolesti provodi se prema težini kliničke slike koja odgovara razini FIX. Za teški oblik bolesti razina FIX je ispod 1%, za umjereni je oblik od 1 do 5%, dok je za blagi oblik iznad 5% aktivnosti normale FIX.

Liječenje hemofilije B provodi se visoko pročišćenim koncentratima FIX porijeklom iz ljudske plazme ili rekombinantnim FIX. S obzirom na dulje poluvrijeme života primjena je rjeđa nego u hemofilije A, odnosno jednom dnevno (36).

Ostali nasljedni poremećaji zgrušavanja krvi

Nasljedni poremećaji zgrušavanja krvi, među ostalim faktora VII, X, XII, V, II i XI su rjeđi u populaciji i čine oko 5% svih nasljednih koagulopatija. Neki od njih ne uzrokuju krvarenja, a nedostatak FXII može dovesti do tromboze. Liječenje se provodi nadomjesno koncentratima deficitarnog faktora bilo iz ljudske plazme, bilo rekombinatnim faktorom ako je dostupan.

4.4.2.2 Stečeni poremećaji zgrušavanja krvi

Stečeni poremećaji koagulacije mnogo su češći od nasljednih i pojavljuju se u prethodno zdravih osoba uglavnom sekundarno uz osnovnu bolest. Obično je riječ o defektu više faktora zgrušavanja i nije ih teško razlikovati od nasljednih poremećaja (36).

Diseminirana intravaskularna koagulacija ili potrošna koagulopatija je takav patološki poremećaj aktivacije sustava zgrušavanja koje dovodi do tromboze i krvarenja. Sam proces započinje izlaganjem krvi prokoagulantnim tvarima, pri čemu se u krvnom optoku stvara fibrin. Zbog pojačane potrošnje i stvaranja fibrina pada razina faktora zgrušavanja, pa ih vrlo brzo u krvnom optoku ima manje no što je potrebno za održavanje hemostaze. Tada dolazi do prevage

sustava fibrinolize pa nastupa krvarenje. Oba procesa tromboza i krvarenje obično dovode do teškog oštećenja organa. DIK se javlja kao komplikacija niza bolesti.

Liječenje se provodi na način da se liječi osnovna bolest, odnosno uzrok DIK-a, no isto je tako važno nadomjestiti faktore zgrušavanja i trombocite. Potporno liječenje provodi se primjenom koncentrata trombocita, eritrocita i koncentrata antitrombina, te antikoagulantnom terapijom. U teškom, fulminantnom obliku DIK-a primjenjuje se koncentrat antitrombina III, a rijetko i antifibrinolitici, osim ako istodobno ne postoji primarna fibrinoliza (36).

Protutijela na faktore sustava zgrušavanja ili inhibitori faktora zgrušavanja su abnormalne endogene komponente koje djeluju na bilo koju fazu zgrušavanja krvi. Najčešća su protutijela na FVIII i javljaju se u otprilike 20% bolesnika s hemofilijom. Ponajviše se vide u težem obliku bolesti. Inhibitori se mogu pojaviti i kod osoba koje nemaju hemofiliju, kod kroničnih upalnih bolesti, starijih bolesnika, zatim kao reakcija na lijekove i tijekom trudnoće. Većina protutijela na FVIII su IgG imunoglobulini koji ne vežu komplement. Klinički se očituju teškim krvarenjima na minimalne traume koja mogu biti opasna za život. Ukoliko standardna nadomjesna terapija nije učinkovita, primjenjuje se FEIBA. Protutijela se mogu pojaviti i na druge faktore kao što su IX, V, XIII i vWF (36).

4.4.2.3 Trombofilija ili hiperkoagulabilnost

Trombofilija ili hiperkoagulabilnost nasljedni je i/ili stečeni poremećaj mehanizma hemostaze koji predisponira razvoj tromboze. Prirodni inhibitori faktora zgrušavanja koje nalazimo u plazmi su heparinski kofaktori (antitrombin i heparinski kofaktor II), protein C, protein S i tFPI. Stanje hiperkoagulabilnosti je najčešće stečeno, može biti posljedica ozljede, zloćudne bolesti, uznapredovale dobi, primjene različitih lijekova (primjerice kontraceptiva), te trudnoća.

Neke od nasljednih trombofilija su:

- **mutacija faktora V Leiden** – poremećaj kod kojeg postoji rezistencija na protein C odnosno nesposobnost aktiviranog proteina C da inaktivira FV, što povećava učestalost tromboze kod heterozigota 5 - 10 puta, a kod homozigota 50 - 100 puta u odnosu na zdravu populaciju;
- **mutacija gena protrombina** – poremećaj kod kojeg dolazi do povećanja razine protrombina (FII) koji je prethodnik trombina krajnjeg produkta kaskade zgrušavanja i ovisan je o vitaminu K; povećana razina trombina povećava rizik od tromboze;
- **nasljedni manjak proteina C** – poremećaj koji povećava rizik od tromboze za čak 7 puta, a manifestira se razvojem DIK-a, neonatalne purpure fulminans i opsežnim trombotskim epizodama; treba ga razlikovati od stečenog nedostatka proteina C, a liječi se koncentratima proteina C i antikoagulansima;
- **nasljedni manjak proteina S** – klinički sličan poremećaj kao i manjak proteina C, te se liječi istim putem;
- **nasljedni manjak AT** – poremećaj kod kojeg zbog nedostatka AT direktnog inhibitora trombina dolazi do povećanog rizika od tromboze, a liječi se koncentratom AT iz ljudske plazme i/ili rekombinantnim i to u situacijama kada postoji visok rizik od tromboze kao što je primjerice trudnoća (36).

4.4.2.4 Imunodeficijencije

Imunodeficijencija je stanje ljudskog organizma u kojem je imunološki sustav (jedna ili više njegovih komponenata: stanična imunost, humoralna imunost, sustav komplementa, fagociti)

nedostatan ili oslabljen u borbi protiv infekcija. Imunodeficijencije mogu biti primarne ili nasljedne, te sekundarne ili stečene (40).

Primarne imunodeficijencije

Ovi su poremećaji genetski određeni; mogu se javiti samostalno ili kao dio sindroma. Opisano ih je više od 100, a raznovrsnost unutar svakog poremećaja može biti znatna. Molekularna osnova za više od polovice poremećaja je poznata. Primarne imunodeficijencije se u pravilu javljaju u dojenačkoj dobi i djetinjstvu kao izrazito česte (ponavljajuće) ili neuobičajene infekcije. Oko 80% bolesnika prilikom prvog pojavljivanja je mlađe od 20 godina; zbog toga što je prijenos često vezan za X kromosom, 70% su muškarci. Sveukupna učestalost simptomatske bolesti je oko 1/10.000 ljudi.

Primarne imunodeficijencije su svrstane prema glavnoj komponenti imunološkog sustava koja je nedostatna (deficijentna), ne postoji ili je defektna: B stanice (ili Ig), T stanice, urođenoubilačke stanice (NK), fagocitne stanice ili komplement. Obzirom da je sve više informacija dostupno, podjela imunodeficijencija prema njihovim molekularnim defektima može biti korisnija (40).

Sekundarne imunodeficijencije

Uzroci su neimunološke sistemske bolesti (npr. dijabetes, pothranjenost, infekcija HIV–om) i imunosupresivna terapija (npr. kemoterapija, radioterapija). Sekundarne imunodeficijencije se također javljaju kod teško bolesnih, starijih osoba ili hospitaliziranih bolesnika. Dugotrajna i teška bolest može oslabiti imunološki odgovor; oštećenje je često reverzibilno, ako se bolest izliječi. Isto tako, imunitet slabi sa starenjem.

Imunodeficijencija može biti posljedica gubitka serumskih proteina (osobito IgG i albumina) u bubrezima u sklopu nefrotskog sindroma, preko kože kod teških opeklina ili dermatitisa, ili preko

probavnog trakta kod enteropatija. Enteropatija također može voditi gubitku limfocita rezultirajući limfopenijom. Ovi poremećaji mogu nalikovati nedostatku B i T stanica. Liječenje treba usmjeriti na osnovni poremećaj, dijeta bogata srednje–dugo lančanim masnim kiselinama može smanjiti gubitak imunoglobulina i limfocita preko probavnog sustava te biti od značajne koristi (40).

4.4.2.5 Autoimune bolesti

Idiopatska trombocitopenična purpura (ITP) je bolest koja se očituje hemoragijskom dijatezom zbog trombocitopenije, a posljedica je prisutnosti trombocitnih protutijela razreda IgG uz normalan do povećan broj megakariocita u koštanoj srži. Razgradnja trombocita u slezeni najvažniji je mehanizam koji uzrokuje skraćeni život trombocita u ITP-u. ITP je kod djece obično benigna bolest, dok je kod odraslih češći tzv. kronični oblik koji se liječi glukokortikoidima i/ili azatioprinom, a ako se ne postigne povoljan učinak splenektomijom. U bolesnika s refraktornom bolešću jedan od terapijskih pristupa je uporaba imunoglobulina (23).

Guillain-Barréov sindrom (GBS) je akutna upalna demijelinizirajuća polineuropatija, autoimuna bolest perifernog živčanog sustava, najčešće potaknuta akutnim upalnim procesom. Spada u širu skupinu perifernih neuropatija i postoji nekoliko varijanata sindroma. Bolest je najčešće ozbiljna, izaziva paralizu koja počinje u nogama (prvi stupanj je slabost u nogama), a širi se na gornje udove i lice te rezultira potpunim gubitkom svakog refleksa i potpunom paralizom cijelog tijela. Uobičajeno liječenje bolesti odvija se plazmaferezom ili intravenskim imunoglobulinama u kombinaciji s fizikalnom terapijom. Brzom primjenom terapije, većina pacijenata se oporavlja u potpunosti. No, smrt se može dogoditi u slučajevima u kojima su prisutne ozbiljne plućne komplikacije ili disautonomija (23).

Kawasakijev sindrom je bolest prvenstveno djece mlađe od 5 godina koja se očituje osipom, vrućicom, povećanjem limfnih čvorova i katkad upalom srca i zglobova. Uzrok bolesti je nepoznat, no određeni pokazatelji upućuju na virus ili drugi infektivni uzročnik. Rano liječenje značajno smanjuje rizik oštećenja koronarnih arterija i ubrzava nestanak vrućice, osipa i lošeg osjećanja. Tijekom prva četiri dana daju se visoke doze imunoglobulina i acetilsalicilne kiseline. Kada se temperatura normalizira, daju se niske doze acetilsalicilne kiseline još nekoliko mjeseci kako bi se smanjio rizik oštećenja koronarnih arterija i stvaranja ugrušaka (23).

Demijelinizacije (uključujući multiplu sklerozu) su neurološke bolesti koje se ne mogu u potpunosti uklopiti u autoimune bolesti, premda ima brojnih pokazatelja imunopatogeneze procesa demijelinizacije u tim stanjima. Intravenski imunoglobulini se primjenjuju uglavnom nakon neuspjeha uobičajenog načina liječenja, a opisano je nekoliko različitih režima primjene (23).

Sistemski eritematozni lupus (SLE) je autoimuna bolest koja uzrokuje sporadične upale zglobova, tetiva i drugog vezivnog tkiva. Za liječenje se najčešće primjenjuju glukokortikoidi, po potrebi u kombinaciji s citotoksičnim lijekovima (ciklofosfamid, azatioprin). Intravenski proizvodi imunoglobulina primjenjuju se kod bolesnika s raznim težim oblicima SLE-om koji ne reagiraju na uobičajeno liječenje (23).

4.4.3 PREGLEDNI PRIKAZ LIJEKOVA

Pregledni prikaz biofarmaceutika iz ljudske plazme trenutno odobrenih na tržištu EU pregledno su prikazani Tablicom 3.

Tablica 3. Pregled odobrenih biofarmaceutika iz ljudske plazme (izvor: baze podataka EMA-e i HALMED-a)

Terapijska skupina	Uobičajeni naziv	Zaštićeni naziv	Način primjene	ATC	Indikacije
Antitrombotici	Antitrombin	Anithrombin III Atenativ Kybernin P	intravenski	B 01 AB 02	Profilaksa i liječenje tromboembolijskih komplikacija kod naslijeđenog i stečenog manjka antitrombina III.
	Protein C	Ceprotin	intravenski	B 01 AD 12	Za liječenje fulminantne purpure i nekroze kože izazvane kumarinskim lijekovima kod bolesnika s teškim kongenitalnim nedostatkom proteina C. Za kratkotrajnu profilaksu kod bolesnika s teškim kongenitalnim nedostatkom proteina C u slučajevima: neposredno prije kirurškog ili drugog invazivnog liječenja, tijekom liječenja s kumarinima, kada terapija s kumarinima nije dovoljna odnosno kada nije moguća.
Antihemoragici	Alfa1- proteinaza inhibitor	Respreeza	intravenski	B 02 AB 02	Liječenje emfizema pluća uslijed kongenitalnog nedostatka proteina alfa1-antitripsin.
	Fibrinsko ljepilo: fibrinogen, ljudski; faktor zgrušavanja XIII, ljudski; aprotinin, sintetski; trombin, ljudski; kalcijev klorid	Tisseel Lyo	epilezijski	B 02 BC (V03AK - tkivni adheziv)	Suportivno liječenje gdje su standardne kirurške tehnike nedostatne. Za poboljšanje hemostaze. Kao tkivno ljepilo za potporu cijeljenju rane ili kao potpora šavu u vaskularnoj kirurgiji, kod gastrointestinalnih anastomoza, u neurokirurgiji i ostalim kirurškim postupcima u kojima može doći do kontakta s cerebrospinalnom tekućinom ili tvrdom mozgovnicom (dura mater). Za lijepljenje tkiva, za poboljšanje adhezije odvojenog tkiva (npr. tkiva zalistaka, presadaka (graftova), podijeljenih kožnih presadaka). Dokazana je učinkovitost u potpuno heparinizirani bolesnika.
	Fibrinogen, trombin	Raplixa▼ Evarrest ▼ Evicel	epilezijski	B 02 BC 30	Suportivna terapija radi poboljšanja hemostaze kod kirurških zahvata gdje standardne kirurške tehnike nisu dostatne.

		TachoSil			
	Protrombinski kompleks: faktori zgrušavanja II, VII, IX i X, protein C i protein S	Octaplex		B 02 BD 01	Liječenje krvarenja i perioperativna profilaksa krvarenja kod stečenog nedostatka faktora protrombinskog kompleksa, kao što je nedostatak uzrokovan liječenjem antagonistima vitamina K ili u slučaju predoziranja antagonistima vitamina K, kada je potrebna brza korekcija nedostatka. Liječenje krvarenja i perioperativna profilaksa kod nasljednog nedostatka FII i FX ovisnih o vitaminu K, kada pročišćeni lijek sa specifičnim faktorima nije dostupan.
	Faktor VIII	Beriate Emoclot Fanhdi Octanate	intravenski	B 02 BD 02	Liječenje i profilaksa krvarenja u bolesnika s hemofilijom A (prirođenim nedostatkom faktora VIII). Stečeni nedostatak faktora VIII.
	Proteini ljudske plazme koji djeluju protiv inhibitora faktora zgrušavanja VIII	Feiba	intravenski	B 02 BD 03	Liječenje bolesnika s hemofilijom A s inhibitorima FVIII. Liječenje nehemofiličnih bolesnika sa stečenim inhibitorima FVIII. Liječenje bolesnika s hemofilijom A s inhibitorima koji su iskusili značajno krvarenje u mišićno-koštanom sustavu što je zahtijevalo primjenu lijeka s aktivnošću protiv inhibitora ili u bolesnika kojima je zbog krvarenja znatno smanjena kakvoća života i/ili koji su iskusili jedno po život opasno krvarenje (npr. intrakranijalno, intraabdominalno ili intratorakalno krvarenje).
	Faktor IX	Nonafact Immunine Octanine F	intravenski	B 02 BD 04	Liječenje i profilaksa krvarenja u bolesnika s hemofilijom B (urođeno pomanjkanje FIX).
	Faktor VIII, von Willebrandov faktor	Voncento▼ Haemate P Immunate	intravenski	B 02 BD 06	Liječenje i profilaksa krvarenja u bolesnika s urođenim (hemofilija A) ili stečenim nedostatkom FVIII. Liječenje krvarenja u bolesnika s vWB s

					nedostatkom FVIII, kad učinkovit lijek protiv vWB nije dostupan i kad liječenje samo s dezmopresinom nije učinkovito ili je kontraindicirano.
Zamjena za krv i perfuzijske otopine	Albumin	Albumin Albumeon Albunorm Albutein Flexbumin Human Albumin Kedrion	intravenski	B 05 AA 01	Nadoknada i održavanje cirkulirajućeg volumena krvi u stanjima u kojima je dokazan njegov manjak i kada je primjena koloida primjerena.
Ostali hematološki pripravci	Inhibitor C1-esteraze	Cinryze▼	intravenski	B 06 AC 01	Liječenje i prevencija napadaja angioedema prije zahvata u odraslih i adolescenata s hereditarnim angioedemom. Rutinska prevencija napadaja angioedema u odraslih i adolescenata s teškim i ponavljajućim napadajima hereditarnog angioedema koji ne podnose preventivno peroralno liječenje ili im ono ne pruža dovoljnu zaštitu, odnosno u bolesnika koji se ne mogu primjereno zbrinuti ponavljanjem akutnog liječenja.
Imunoglobulini	Normalni ljudski imunoglobulin	Imunoglobulin Flebogamma DIF Gammanorm Hizentra▼ HyQvia▼ Ig Vena Intratect Kiovig Octagam Privigen	intravenski / intramuskularno / supkutano	J 06 BA	Nadomjesna terapija i imunomodulacijska terapija kod odraslih i djece.
Ostali potencijalno terapijski proteini plazme	Koagulacijski faktor X*	/	/	/	Liječenje nasljednog nedostatka FX koje ima za posljedicu produženo krvarenje i usporeno zacjeljivanjem rana, te može u konačnici dovesti do intrakranijalnog krvarenja.

	Plazmin*	/	/	/	Liječenje akutne periferne okluzije, odnosno iznenadne blokade u dostavi krvi ekstremitetima putem arterije uslijed krvnog ugruška što može biti životno-ugrožavajući zbog ireverzibilno oštećenog tkiva.
	Plazminogen*	/	/	/	Liječenje rijetkog kroničnog pseudomembranoznog konjuktivitisa koji može dovesti do sljepoće te također biti životno-ugrožavajući zbog posljedične plućne bolesti.
	Alfa 1-proteinaza inhibitor*	/	/	/	Liječenje reakcije protiv presatka koja nastaje nakon transplantacija hematopoetskih matičnih stanica tijekom liječenja leukemije.
	Imunoglobulin na specifični trombocitni antigen-1a*	/	/	/	Liječenje neonatalne aloimune trombocitopenije.

▼ - lijek pod dodatnim praćenjem; * - lijek sa liste Rare disease (orphan) designations

4.4.3.1 Antitrombotici

Antitrombin III (ATIII) je alfa 2 -globulin koji u krvi neutralizira djelovanje serin proteaza i jedan je od najvažnijih prirodnih inhibitora zgrušavanja krvi. Inhibira djelovanje aktiviranih faktora Xa, VIIa, IXa, Xa, XIa i XIIa. Aktivnost ATIII se jako pojačava u prisutnosti heparina, a antikoagulacijski učinci heparina ovise o prisutnosti ATIII. Kod odraslih osoba koncentracija ATIII u krvi iznosi između 0,15 i 0,39 g/l, odnosno aktivnost između 80 i 120%. Poluvijek života ATIII je od 1,5 do 2,5 dana.

Nedostatak ATIII može biti prirođen ili stečen pri različitim kliničkim poremećajima. Stečeni nedostatak AT može biti posljedica povećane potrošnje ili gubitka proteina odnosno poremećene sinteze ATIII. ATIII se primjenjuje kod bolesnika s plazmatskom aktivnošću ATIII 70% ispod normalne, za profilaksu i liječenje trombotskih i tromboembolijskih poremećaja.

Na tržištu su dostupni lijekovi u obliku praška i otapala za otopinu za infuziju od 500 i 1000 i.j. a indicirani su kod prirođenih ili stečenih stanja nedostatka antitrombina. Primjenjuje se intravenski kao polagana infuzija. Infuzija ATIII može biti posebno važna u situacijama kao što su: kirurški zahvati ili trudnoća i porod kod bolesnica s prirođenim nedostatkom ATIII, neadekvatan odgovor ili odsutnost odgovora na primjenu heparina, postojanje rizika od razvoja DIK-a, postojanje rizika od tromboze kod bolesnika s nefrotskim sindromom ili upalnom bolesti crijeva, kirurški zahvat ili krvarenje kod bolesnika s teškim zatajenjem jetre, osobito ako je bolesnik liječen koncentratima faktora zgrušavanja (23, 41).

Protein C je dostupan kao prašak i otapalo za otopinu za injekciju u dozi od 500 i.j. Primjenjuje se intravenskom injekcijom nakon rekonstitucije. Indiciran kod purpure fulminans i kumarinom inducirane nekroze kože u pacijenata s teškim prirođenim nedostatkom proteina C. Nadalje, lijek

je indiciran za kratkotrajnu profilaksu kod pacijenata s teškim prirođenim nedostatkom proteina C ako je zadovoljen jedan ili više od sljedećih uvjeta: predstojeća operacija ili invazivno liječenje, pri uvođenju liječenja kumarinom, kad liječenje samo kumarinom nije dovoljno, kad liječenje kumarinom nije moguće (42).

4.4.3.2 Antihemoragici

Alfa 1-proteinaza inhibitor je liofilizirani lijek u dozi od 1000 mg koji je izrađen kao prašak i otapalo za otopinu za infuziju. Odobren je od strane Povjerenstva za humane lijekove pri EMA-i u lipnju 2015. Primjenom ovog lijeka povećava se razina alfa-1 antitripsina u plućima kod osoba koji imaju nedostatak tog proteina. Alfa 1- antitripsin djeluje na način da inaktivira određene tvari kao što je elastaza, koje organizam normalno proizvodi. Elastaza u plućima razgrađuje elastična vlakna i uzrokuje nastajanje plućne fibroze. Za razliku od pušenja i upala koji pojačavaju oslobađanje elastaza iz upalnih stanica i stvaranje plućne fibroze, API sprječava djelovanje elastaze u plućima što posljedično zaustavlja razgradnju alveola, stvaranje fibroze i emfizema. U dvostruko slijepom, randomiziranom i multicentričnom kontroliranom ispitivanju RAPID, dokazano je da API usporava opadanje gustoće pluća na godišnjoj razini za 34% u odnosu na placebo tijekom dvije godine. Najčešće zamijećene nuspojave su preosjetljivost i alergijske reakcije. U najozbiljnijim slučajevima alergijske reakcije mogu progredirati do anafilaktičke reakcije, čak i kada bolesnik u prethodnoj primjeni nije pokazao preosjetljivost na lijek (43).

Fibrinsko ljepilo se sastoji od dviju komponenti: u prvoj se komponenti nalazi liofilizirani ljudski fibrinogen i ljudski koagulacijski faktor XIII rekonstituirani sa sintetskim aprotininom, dok se u drugoj komponenti nalazi liofilizirani trombin rekonstituiran s otopinom kalcijevog klorida. Fibrinsko ljepilo je namijenjeno samo za epilezijsku primjenu, dok je intravaskularna

primjena kontraindicirana. Lijek je namijenjen za suportivno liječenje gdje su standardne kirurške tehnike nedovoljne, za poboljšanje hemostaze, kao tkivno ljepilo za potporu cijeljenju rane ili kao potpora šavu u vaskularnoj kirurgiji, kod gastrointestinalnih anastomoza, u neurokirurgiji i ostalim kirurškim postupcima u kojima može doći do kontakta s cerebrospinalnom tekućinom ili tvrdom mozgovnicom (dura mater) (npr. kod otorinolaringologije, oftalmološke i spinalne kirurgije), za lijepljenje tkiva, za poboljšanje adhezije odvojenog tkiva (npr. tkiva zalistaka, presadaka, podijeljenih kožnih presadaka).

Dokazana je učinkovitost u potpuno hepariniziranih bolesnika (44).

Kombinacija **fibrinogena i trombina** se na tržištu nalazi u obliku matriksa, otopine ili praška tkivnog ljepila. Dostupno je više odobrenih lijekova, od kojih su neki trenutno pod dodatnim praćenjem. Lijek je indiciran za poboljšanje hemostaze kao suportivno liječenje kada standardne kirurške tehnike nisu dostatne. Namijenjen je samo za epilezijsku primjenu i ne smije se primijeniti intravaskularno. Ako se lijek nehotice primijeni intravaskularno, mogu nastupiti po život opasne tromboembolijske komplikacije. Također, slučajna injekcija u krvnu žilu može uzrokovati DIK, a postoji i rizik od anafilaktičke reakcije (45).

Protrombinski kompleks je dostupan kao prašak i otapalo za otopinu za infuziju, a sadrži faktore zgrušavanja II, VII, IX i X, te proteine C i S. Indiciran je za liječenje krvarenja i kao perioperativna profilaksa krvarenja kod stečenog nedostatka faktora zgrušavanja protrombinskog kompleksa, kao što je nedostatak uzrokovan liječenjem antagonistima vitamina K ili u slučaju predoziranja antagonistima vitamina K, kada je potrebna brza korekcija nedostatka. Nadalje, indiciran je i za liječenje krvarenja i kao perioperativna profilaksa kod nasljednog nedostatka FII

i FX ovisnih o vitaminu K, kada pročišćeni lijek sa specifičnim faktorima zgrušavanja nije dostupan (46).

Faktor VIII dostupan je u obliku praška i otapala za otopinu za injekciju u dozama od 250, 500, 1000 i 2000 i.j. za intravensku primjenu. Namijenjen je za liječenje i profilaksu krvarenja u bolesnika s hemofilijom A, a zbog premale doze vWF nije primjeren za liječenje vWB. Prilikom liječenja bolesnike treba nadzirati zbog razvoja inhibitora FVIII zbog kojih može doći do neučinkovitosti primjene lijeka. Ako nisu postignute očekivane razine aktivnosti FVIII u plazmi ili se krvarenje ne može kontrolirati prikladnom dozom, potrebno je učiniti testove kojima bi se utvrdilo da li su se razvili inhibitori FVIII. Prisutnost inhibitora obavezno treba provjeriti ako se pojave alergijske reakcije. Bolesnici s inhibitorima FVIII mogu imati povećan rizik od anafilaktičke reakcije (47).

Proteini ljudske plazme koji djeluju protiv inhibitora faktora zgrušavanja VIII (engl. Factor eight inhibitor bypass activity, FEIBA) liofilizirani je lijek dostupan na tržištu u obliku praška i otapala za otopinu za infuziju u dozi od 1000 j. Osim proteina koji djeluju protiv inhibitora sadrži i faktore zgrušavanja II, IX i X koji su uglavnom u neaktiviranom obliku, te aktivirani faktor zgrušavanja VII. U manjoj koncentraciji nalazi se i antigen FVIII, dok se faktori kalikrein-kinin sustava prisutni u tragovima. Lijek se primjenjuje intravenski kao polagana infuzija.

FEIBA je namijenjena za liječenje krvarenja u bolesnika s hemofilijom A s inhibitorima koagulacijskog faktora VIII, liječenje krvarenja u nehemofiličnih bolesnika sa stečenim inhibitorima FVIII i profilaksu krvarenja u bolesnika s hemofilijom A s inhibitorima koji su iskusili značajno krvarenje u mišićno-koštanom sustavu što je zahtijevalo primjenu lijeka s aktivnošću protiv inhibitora ili u bolesnika kojima je zbog krvarenja znatno smanjena kakvoća

života i/ili koji su iskusili jedno po život opasno krvarenje (npr. intrakranijalno, intraabdominalno ili intratorakalno) (48).

Faktor IX dostupan je u obliku praška i otapala za otopinu za infuziju u dozi od 500 i 1000 i.j. i primjenjuje se intravenski. Indicira je za liječenje i profilaksu krvarenja kod bolesnika s hemofilijom B. Primjena faktora IX je povezana s rizikom od razvoja tromboembolijskih komplikacija koji je veći kod primjene slabije pročišćenih proizvoda. Također, primjena lijekova FIX može potencijalno biti štetna kod bolesnika s fibrinolizom i DIK-om. Kao i kod FVIII, bolesnike treba promatrati na prisutnost inhibitora na FIX što se može očitovati alergijskom reakcijom (49).

Faktor VIII, von Willebrandov faktor dostupan je u obliku praška i otapala za injekciju ili infuziju, a primjenjuje se intravenski. Koncentrat FVIII i vWF namijenjen je za liječenje i profilaksu krvarenja u bolesnika s urođenim (hemofilija A) ili stečenim nedostatkom FVIII, te za liječenje krvarenja u bolesnika s vWB s nedostatkom FVIII, kad učinkovit lijek protiv vWB nije dostupan i kad liječenje samo s dezmopresinom nije učinkovito ili je kontraindicirano (50).

4.4.3.3 Zamjena za krv i perfuzijske otopine

Albumin. Preparati albuminskih infuzijskih otopina uglavnom sadrže samo albumine, dok se drugi plazmatski proteini nalaze u tragovima. Osim u infuzijskim otopinama, albumini se nalaze i u brojnim drugim lijekovima. Zbog svoje sposobnosti vezanja na različite površine, nalazi se u terapijskim pripravcima kao pomoćna tvar kada se veže na površinu primarnog pakiranja, a čime sprječava vezanje terapijskog proteina na tu istu površinu usljed koje bi moglo doći do poddoziranost bolesnika. Najznačajnije fiziološke značajke albumina proizlaze iz njegovog

doprinosa u održavanju onkotskog tlaka krvi i njegovih transportnih funkcija. Albumin stabilizira cirkulirajući volumen krvi i sudjeluje u transportu hormona, enzima, lijekova i toksina. Kao i druge koloidne otopine, albuminske otopine povećavaju intravaskularni onkotički tlak te povlače tekućinu iz intersticija u intravaskularni prostor i načelno se primjenjuju u volumenu koji je jednak volumenu izgubljene krvi. Na tržištu su dostupne hipoonkotska 5%-tna i hiperonkotska 20%-tna infuzijska otopina albumina.

Otopine albumina se primjenjuju kod potrebe za nadoknadom i održavanjem cirkulirajućeg volumena krvi u stanjima u kojima je dokazan njegov manjak i kada je primjena koloida primjerena. Obično se primjenjuju u stanjima u kojima se liječenjem kristaloidnim otopinama volumen plazme ne može održati dulje zbog niskog koloidno-osmotskog tlaka. Međutim, zbog sposobnosti da izvlače tekućinu iz izvanstaničnog u intravaskularni prostor, u mnogim stanjima hipovolemije i dehidracije gdje je izvastanični prostor već smanjen prvi izbor su kristaloidne otopine koje taj prostor šire (51, 52).

4.4.3.4 Ostali hematološki pripravci

Inhibitor C1-esteraze (ICE) je alfa 2-globulin čija je koncentracija u plazmi između 240 i 270 mg/l, a poluvrijeme života između 1,1 i 12,4 dana. To je inhibitor početne faze zgrušavanja, fibrinolize, aktivacije sustava komplementa i kalikrein-kininskog sustava. Na tržištu je dostupan u obliku praška i otapala za otopinu za injekciju i primjenjuje se intravenski. Lijek se trenutno nalazi pod dodatnim praćenjem. Odobrene indikacije za koncentrat ICE su liječenje i prevencija napadaja angioedema prije zahvata u odraslih i adolescenata s hereditarnim angioedemom, te rutinska prevencija napadaja angioedema u odraslih i adolescenata s teškim i ponavljajućim napadajima hereditarnog angioedema koji ne podnose preventivno peroralno liječenje ili im ono

ne pruža dovoljnu zaštitu odnosno u bolesnika koji se ne mogu primjereno zbrinuti ponovljenim akutnim liječenjem. Međutim, u literaturi se mogu naći i podaci o primjeni ovog lijeka kod stečenog nedostatka ICE-a, primjerice u limfoproliferativnim bolestima, zloćudnim tumorima i autoimunim bolestima (53, 54).

4.4.3.5 Imunoglobulini

Normalni ljudski imunoglobulin. Imunoglobulinski se preparati proizvode od pula plazme prikupljene od 10000 do 15000 ili čak i više davatelja. Zbog toga se u proizvodu nalaze protutijela protiv najčešćih uzročnika zaraznih bolesti s određenog geografskog područja, tj. područja u kojem žive davatelji krvi i uzročnika kojima je prokuženo pučanstvo toga područja. Njihovom su primjenom najbolje zaštićene osobe iz područja u kojem je prikupljena plazma za njihovu proizvodnju. Prvotna je nakana bila primjenjivati imunoglobuline za prevenciju nekih zaraznih bolesti i liječenje bolesnika s manjkom protutijela, a zatim se njihova uporaba proširila na liječenje bolesnika s autoimunim i drugim bolestima. To je postignuto povećanjem doze protutijela u liječenju, intravenskom primjenom i proizvodnjom specifičnih imunoglobulina (23, 55).

Imunoglobulinski preparati su vrlo sigurni lijekovi i vrlo rijetko izazivaju zarazu uzročnicima krvlju prenosivih bolesti. To posebno vrijedi za intramuskularne imunoglobuline (IMIG). U njihovu je proizvodnju uveden postupak inaktivacije virusa nakon nekoliko epidemija hepatitisa C uzrokovanih intravenskim prepratima (IVIG). Nakon uvođenja postupka inaktivacije virusa nije zabilježen niti jedan slučaj prijenosa uzročnika krvlju prenosivih bolesti. Između istovjetnih proizvoda raznih proizvođača postoje male, ali bitne razlike u odnosu koncentracija između raznih podgrupa IgG-e (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4). Također se razlikuju i u čistoći te u indikacijama (56, 57).

Prema načinu primjene IgG dijelimo na IMIG čija je koncentracija protutijela obično 16%, IVIG čija je koncentracija protutijela 5%, te IgG za supkutanu primjenu čija je koncentracija 20%. Prema specifičnosti protutijela, razlikujemo normalne standardne imunoglobulinske preparate u kojima se protutijela nalaze u onom odnosu u kojem su bila u plazmi od koje su proizvedeni. U preparatima specifičnih imunoglobulina koncentrirana su protutijela protiv jednog antigena ili uzročnika bolesti.

S upotrebom imunoglobulina povezuju se arterijski i venski tromboembolijski događaji uključujući infarkt miokarda, moždani udar, duboku vensku trombozu i plućnu emboliju. S posebnim se oprezom trebaju primjenjivati kod bolesnika s prethodnim faktorima rizika za trombotske događaje (poput uznapredovale dobi, hipertenzije, dijabetesa mellitusa i anamneze vaskularnih bolesti i slično).

Od nuspojava povremeno se mogu pojaviti drhtavica, glavobolja, groznica, povraćanje, alergijske reakcije, mučnina, artralgija, nizak krvni tlak i umjerena bol u križima. U rijetkim slučajevima, normalni ljudski imunoglobulin može uzrokovati nagli pad krvnog tlaka i, u izoliranim slučajevima, anafilaktički šok, čak i kada bolesnik nije pokazao preosjetljivost kod prethodne primjene lijeka. Lokalne reakcije na mjestima primjene uglavnom uključuju oteklinu, bolnost, crvenilo, otvrdnuće, lokalni osjećaj topline, svrbež, modrice i osip (58, 59).

4.4.3.6 Ostali potencijalno terapijski proteini plazme

Ljudski plazminogen je lijek kojemu je u kolovozu 2007. dodijeljen status lijeka za rijetke bolesti. Namijenjen je liječenju kroničnog pseudomembranoznog konjuktivitisa, kronične upalne bolesti oka koja nastaje uslijed nedostatka plazminogena. Nedostatak plazminogena uzrokuje stvaranje slojeva različitih materijala na očima, odnosno pseudomembrana, a u konačnici može rezultirati sljepoćom. Ovaj poremećaj može biti opasan po život zbog povezanosti s bolestima

pluća. Ljudski plazminogen nadomješćuje nedostatak plazminogena u organizmu i sprječava stvaranje konjuktivitisa. U srpnju 2015 odobren mu je status lijeka za rijetke bolesti i kod ostalih posljedica nedostatka plasminogena koje mogu dovesti do upala i oštećenja različitih organa među ostalim i mozga (4, 5).

Ljudski plazmin je dobio status lijeka za liječenje rijetkih bolesti u veljači 2011., a namijenjen je liječenju akutne periferne okluzije arterija. Akutna periferna okluzija arterija je iznenadni zastoj u opskrbi ekstremiteta arterijskom krvi uslijed krvnog ugruška. Krvni se ugrušak može stvoriti lokalno zbog suženja arterija ili može doći iz drugog dijela tijela, primjerice nakon operacije srca. Bolesnici obično osjete tešku bol u zahvaćenom ekstremitetu, koji postaje hladan i blijed. Lokalni živci se oštećuju što dovodi do gubitka osjeta i nemogućnosti pomicanja ekstremiteta. Nedostatak protoka krvi može dovesti do oštećenja tkiva ekstremiteta, a ako se radi o ireverzibilnom oštećenju, u konačnici i do amputacije. Ljudski plazmin se primjenjuje tako da se unese izravno u zahvaćenu arteriju pomoću katetera gdje djeluje na način da razbija krvni ugrušak (3).

Ljudski faktor zgrušavanja X je dobio status lijeka za rijetke bolesti u rujnu 2007., a namijenjen je za liječenje bolesnika s poremećajem krvarenja (hemofilijom) koji nastaje uslijed nasljednog nedostatka FX. Kod ovakvih bolesnika krvarenje je produženo, a zacjeljivanje rana usporeno. Krvarenja se mogu dogoditi u unutarnjim organima, a ako se dogode u mozgu (intrakranijalno) u tom slučaju bolest može biti opasna po život (2).

Ljudski apotransferin je lijek kojemu je u srpnju 2012. dodijeljen status lijeka za rijetke bolesti, a namijenjen za liječenje kongenitalne hipotransferinemije. Kongenitalna hipotransferinemija je genetska bolest koju karakterizira niska razina transferina. Transferin je transportni protein

odgovoran za vezivanje željeza i njegovu dostavu u koštanu srž gdje se koristi za proizvodnju hemoglobina. Niske razine transferina dovode do teške anemije i srčanih problema. Također može doći do nagomilavanja željeza u tkivu i organima, a što može imati za posljedicu veću pojavnost infekcija. Ljudski apotransferin nadomješta protein koji nedostaje i poboljšava simptome bolesti (6).

Alfa 1-proteinaza inhibitor, ljudski je dobio status lijeka za rijetke bolesti u ožujku 2015. za dodatnu indikaciju – liječenje reakcije protiv presatka koja nastaje nakon transplantacija hematopoetskih matičnih stanica tijekom liječenja leukemije. Tijekom transplantacije tijelo bolesnika transplantirane stanice prepoznaje kao strane i napada bolesnikove organe kao što su probavni sustav, koža i jetra dovodeći do njihova oštećenja. Alfa 1-proteinaza inhibitor inaktivira serinske proteaze (među ostalim elastazu u neutrofilima, tripsin i proteinazu-3) koje igraju važnu ulogu u procesu stanične upale i oštećenja, te poboljšava simptome bolesti. Alfa 1-proteinaza inhibitor također ima odobren status lijeka za rijetke bolesti, ako se inhalacijski primjenjuje kod cistične fibroze i plućnih bolesti kao posljedice kongenitalnog nedostatka ovog proteina (60).

Ljudski imunoglobulin na specifični trombocitni antigen-1a (engl. human platelet antigen-1a immunoglobulin) je dobio status lijeka za rijetke bolesti u listopadu 2011., a namijenjen je liječenju neonatalne aloimune trombocitopenije. Neonatalna aloimuna trombocitopenija nastaje aloimunizacijom majke fetalnim trombocitnim antigenima koji su naslijeđeni od oca, a ne nalaze se na majčinim trombocitima. Antitijela majke napadaju trombocite fetusa uzrokujući trombocitopeniju, što kod fetusa ili novorođenčeta povećava rizik od teškog krvarenja, a time i smrti. Lijek se dobiva iz krvi odgovarajućih žena koje sadrže antitijela na specifične trombocitne

antigene-1a, koji kada se primjeni uništava specifične trombocitne antigene-1a fetusa prije nego oni djeluju na majčin imunološki sustav (61).

4.5 INDUSTRIJSKO - EKONOMSKA RAZMATRANJA

Biofarmaceutici iz ljudske plazme imaju veliko medicinsko, socijalno i ekonomsko značenje. Ovi su lijekovi spasili i poboljšali kvalitetu života mnogih bolesnika, ali su istodobno bili uzrok jatrogenih bolesti od kojih su najznačajnije epidemije transfuzijskog hepatitisa i AIDS-a.

Na derivatima plazme se ostvaruje veliki profit. Između proizvodnje plazminih i naftnih derivata postoji velika sličnost: početni je materijal gotovo besplatan, proizvodi se dobivaju frakcioniranim postupcima, proizvodnja je ograničena na mali broj multinacionalnih tvrtki, prodajom naftnih i plazminih derivata ostvaruje se profit, promet derivatima plazme dio je međunarodne trgovine i ima golemo medicinsko i ekonomsko značenje. Davatelji besplatno daruju krv za liječenje nepoznatih sugrađana, no plazma za proizvodnju derivata plazme kupuje se čak i u nekim najrazvijenijih zemljama. Od početka 70-tih godine prošlog stoljeća derivati plazme su pravno izjednačeni s lijekovima te se na njih odnose svi zahtjevi regulatornih tijela koje je potrebno zadovoljiti i kod ostalih lijekova. U Republici Hrvatskoj promet derivatima iz krvne plazme mora biti sukladan Zakonu o lijekovima, a njihove karakteristike moraju odgovarati zahtjevima farmakopeje.

Kako je za proizvodnju biofarmaceutika iz ljudske plazme potrebna visoka tehnologija, a to ujedno znači i velika kapitalna ulaganja od strane lokalnih proizvodnih pogona za frakcioniranje plazme, sve se više prelazi na pragmatičniji način proizvodnje koji uključuje ugovorne licencirane proizvođače lijekova iz plazme. U takvim slučajevima lokalni proizvođač ili institucija za prikupljanje plazme dostavlja plazmu ugovornom proizvođaču, da bi se gotovi lijek

ponovo vratio zemlji od kuda plazma i dolazi. Takav ugovor mora uključivati kako nadzor nad plazmom namijenjenom za frakcioniranje tako i nadzor nad gotovim lijekom od strane regulatornih tijela. Lijekovi koji se trenutno dobivaju u ovakvim ugovornim proizvodnjama su FVIII, albumini, IgG, protrombinski kompleks i FIX (23, 62).

5. ZAKLJUČCI

Biofarmaceutici iz ljudske plazme dobivaju se iz krvi ili plazme dobrovoljnih davatelja, postupcima frakcioniranja koji se provode u proizvodnim pogonima čiji uvjeti udovoljavaju zahtjevima dobre proizvođačke prakse. Industrijska proizvodnja biofarmaceutika iz ljudske plazme složen je i zahtjevan tehnološki proces koji uključuje niz postupaka: prikupljanje i obrada plazme, ispitivanje na prisutnost patogena, zamrzavanje i transport obrađene plazme, karantena plazme, kontrola kakvoće, izrada pula plazme, ispitivanje pula plazme na virusne markere, postupci frakcioniranja proteina, pročišćavanje specifičnog izoliranog proteina, izrada disperzije s određenim udjelom izoliranog proteina i izrada gotovog farmaceutskog oblika.

Biofarmaceutici podrijetlom iz ljudske plazme nalaze se na Popisu esencijalnih lijekova Svjetske zdravstvene organizacije i često se primjenjuju kod bolesti opasnih po život (63). Prema ATC klasifikaciji svrstani su u pet terapijskih skupina: antitrombotici (antitrombin, protein C), antihemoragici (faktor VIII, von Willebrandov faktor, fibrinogen, fibrinsko ljepilo, protrombinski kompleks, faktor VII, faktor IX, faktor XIII, aktivirani faktori zgrušavanja, alfa1-proteinaza inhibitor), zamjena za krv i perfuzijske otopine (albumin), ostali hematološki pripravci (inhibitor C1-esteraze) i imunoglobulini. Primjenjuju se kod niza patoloških stanja: hemofilije A i hemofilije B, von Willebrandove bolesti, za profilaksu i liječenje trombotskih i tromboembolijskih poremećaja, zatim kod različitih imunodeficijencija i autoimunih trombocitopenija, za nadoknadu i održavanje cirkulirajućeg volumena krvi, kod hereditarnog angioedema te mnogih drugih.

6. LITERATURA

1. Burnouf T. Modern plasma fractionation. Transfus Med Rev. 2007; 21(2):101-17.
2. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Orphan_designation/2009/10/WC500006355.pdf, datum pristupa: 30.06.2015.
3. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Orphan_designation/2011/03/WC500102707.pdf, datum pristupa: 30.06.2015.
4. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Orphan_designation/2009/10/WC500006465.pdf, datum pristupa: 30.06.2015.
5. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Orphan_designation/2015/08/WC500192007.pdf, datum pristupa: 22.08.2015.
6. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Orphan_designation/2012/08/WC500131633.pdf, datum pristupa: 30.06.2015.
7. Burnouf T. New approaches for manufacturing plasma derivatives. ISBT Science Series. 2014; 9:160-67.
8. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2015/06/WC500187418.pdf, datum pristupa: 30.07.2015.
9. Farrugia A, Cassar J. Plasma-derived medicines: access and usage issues. Blood Transfus. 2012; 10(3):273-8.
10. Dierickx D, Macken E. The ABC of apheresis. Acta Clin Belg. 2015; 70(2):95-9.
11. Farrugia A. Plasma for fractionation: safety and quality issues. Haemophilia. 2004; 10(4):334-40.
12. Dodd RY. Emerging pathogens and their implications for the blood supply and transfusion transmitted infections. Br J Haematol. 2012; 159(2):135-42.

13. http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2007_08_80_2517.html, datum pristupa: 30.07.2015.
14. http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2007_08_80_2516.html, datum pristupa: 30.07.2015.
15. Hans R, Marwaha N. Nucleic acid testing-benefits and constraints. Asian J Transfus Sci. 2014; 8(1): 2-3.
16. http://www.hztm.hr/dokumenti/postupak-za-evaluaciju-doza-krvi-i-davatelja-krvi-prema-rezultatima-nat-i-seroloskih-testova-u-transfuzijskoj-djelatnosti-rh.pdf, datum pristupa: 30.07.2015.
17. Farrugia A, Evers T, Falcou PF, Burnouf T, Amorim L, Thomas S. Plasma fractionation issues. Biologicals. 2009; 37(2):88-93.
18. Curling J, Bryant C. The Plasma Fractionation Industry. BioProcess International. 2005.
19. Burnouf T, Goubran H, Radosevich M. Application of bioaffinity technology in therapeutic extracorporeal plasmapheresis and large-scale fractionation of human plasma. J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 1998; 715(1):65-80.
20. Burnouf T, Radosevich M. Affinity chromatography in the industrial purification of plasma proteins for therapeutic use. J Biochem Biophys Methods. 2001; 49(1-3):575-86.
21. Burnouf T, Radosevich M. Nanofiltration of plasma-derived biopharmaceutical products. Haemophilia. 2003; 9(1):24-37.
22. Burdick MD, Pifat DY, Petteway SR Jr, Cai K. Clearance of prions during plasma protein manufacture. Transfus Med Rev. 2006; 20(1):57-62.
23. Grgičević D, i sur. Transfuzijska medicina u kliničkoj praksi. Medicinska naklada. 2006; 172-181; 182-190; 197-205.

24. Jameel, F, Hershenson, S. Formulation and Process Development Strategies for Manufacturing Biopharmaceuticals. 2010; DOI: 10.1002/9780470595886.

25. Mitragotri S, Burke PA, Langer R. Overcoming the challenges in administering biopharmaceuticals: formulation and delivery strategies, Nature Rev Drug Discov. 2014; 13, 655-672.

26. Ofosu FA, Freedman J, Semple JW. Plasma-derived biological medicines used to promote haemostasis. Thromb Haemost. 2008; 99(5):851-62.

27. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/07/WC500109627.pdf , datum pristupa: 30.07.2015.

28. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002824.pdf, datum pristupa: 30.07.2015.

29. http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-1/dir_2003_63/dir_2003_63_en.pdf, datum pristupa: 30.07.2015.

30. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003747.pdf, datum pristupa: 30.07.2015.

31. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003663.pdf , datum pristupa: 30.07.2015.

32. http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2014_05_60_1118.html, datum pristupa: 30.07.2015.

33. Seitz R, Heiden M, Nübling CM, Unger G, Löwer J. The harmonization of the regulation of blood products: a European perspective. Vox Sang. 2008; 94(4):267-76.

34. http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-4/annex14_rev30-03_2011_en.pdf, datum pristupa: 30.07.2015.

35. http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/document_listing/document_listing_000345.jsp&mid=WC0b01ac058058f32c, datum pristupa: 30.07.2015.
36. Labar B, Hauptmann E i sur. Hematologija. Školska knjiga. 2007; 67-72; 98-101; 310-25.
37. http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/hematologija-i-onkologija/hemostaza, datum pristupa: 30.06.2015.
38. Heitzeneder S, Seidel M, Förster-Waldl E, Heitger A. Mannan-binding lectin deficiency - Good news, bad news, doesn't matter? Clin Immunol. 2012; 143(1):22-38.
39. Srivastava A, Brewer AK, Mauser-Bunschoten EP i sur. Guidelines for the management of hemophilia. Haemophilia. 2013; 19(1):e1-47.
40. http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/imunologija-i-alergije/imunodeficijencije, datum pristupa: 30.06.2015.
41. http://www.almp.hr/upl/lijekovi/SPC/UP-I-530-09-09-02-384.pdf, datum pristupa: 30.07.2015.
42. http://www.ema.europa.eu/docs/hr_HR/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000334/WC500023802.pdf, datum pristupa: 30.07.2015.
43. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Summary_of_opinion_-_Initial_authorisation/human/002739/WC500188773.pdf, datum pristupa: 30.07.2015.
44. http://www.almp.hr/upl/lijekovi/SPC/UP-I-530-09-13-02-219.pdf, datum pristupa: 30.07.2015.
45. http://www.ema.europa.eu/docs/hr_HR/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002515/WC500151568.pdf, datum pristupa: 30.07.2015.
46. http://www.halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/UP-I-530-09-09-01-295.pdf, datum pristupa: 30.07.2015.

47. http://www.almp.hr/upl/lijekovi/SPC/UP-I-530-09-14-01-379.pdf, datum pristupa: 30.07.2015.
48. http://www.almp.hr/upl/lijekovi/SPC/UP-I-530-09-12-02-279.pdf, datum pristupa: 30.07.2015.
49. http://www.almp.hr/upl/lijekovi/SPC/UP-I-530-09-13-02-489.pdf, datum pristupa: 30.07.2015.
50. http://www.almp.hr/upl/lijekovi/SPC/UP-I-530-09-09-02-350.pdf, datum pristupa 30.07.2015.
51. http://www.almp.hr/upl/lijekovi/SPC/UP-I-530-09-09-02-430.pdf, datum pristupa: 30.07.2015.
52. Banga AK. Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems, Third Edition. CRC Press; Boca Raton, FL, USA: 2015; 113.
53. http://www.ema.europa.eu/docs/hr_HR/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/001207/WC500108895.pdf , datum pristupa: 30.07.2015.
54. Stipić Marković A, Rožmanić V, Anić B i sur. Smjernice za dijagnostiku i liječenje herediratnog angioedema. Liječ Vjesn. 2014; 136:117-29.
55. http://www.almp.hr/upl/lijekovi/SPC/UP-I-530-09-14-01-158.pdf, datum pristupa: 30.07.2015.
56. Jolles S, Orange JS, Gardulf A i sur. Current treatment options with immunoglobulin G for the individualization of care in patients with primary immunodeficiency disease. Clin Exp Immunol. 2015; 179(2):146-60.
57. Späth PJ, Granata G, La Marra F i sur. On the dark side of therapies with immunoglobulin concentrates: the adverse events. Front Immunol. 2015; 6:11.

58. Ramírez E, Romero-Garrido JA, López-Granados E i sur. Symptomatic thromboembolic events in patients treated with intravenous-immunoglobulins: Results from a retrospective cohort study. Thrombosis Res. 2014; 133: 1045-51.

59. Stiehm ER. Adverse Effects of Human Immunoglobulin Therapy. Transfus Med Rev. 2013; 27(3):171-78.

60. http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002739/smops/Positive/human_smop_000840.jsp&mid=WC0b01ac058001d127&source=homeMedSearch&category=human, datum pristupa: 30.07.2015.

61. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Orphan_designation/2011/11/WC500117966.pdf, datum pristupa: 30.07.2015.

62. Burnouf T, Seghatchian J. “Go no Go” in plasma fractionation in the world's emerging economies: Still a question asked 70 years after the COHN process was developed! Transfus Apher Sci. 2014; 51(2):113-9.

63. http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/, datum pristupa: 30.07.2015.

7. POPIS SKRAĆENICA

API – alfa 1-proteinaza inhibitor (drugi naziv: alfa1-antitripsin)

AT – antitrombin

ATIII – antitrombin III

B19 – parvovirus B19

DIK – diseminirana intravaskularna koagulacija

EMA – engl. European Medicines Agency; Europska agencija za lijekove

FDA – engl. Food and Drug Administration; Američka agencija za hranu i lijekove

FEIBA – engl. Factor eight inhibitor bypass activity; aktivirani koncentrat faktora protrombinskog kompleksa

FVIII – faktor VIII

FVIIIa – aktivirani faktor VIII

HALMED – Hrvatska agencija za lijekove i medicinske proizvode

HAV – virus hepatitisa A

HBV – virus hepatitisa B

HCV – virus hepatitisa C

HIV – virus humane imunodeficijencije

HMA – engl. Heads of Medicines Agencies

ICE – inhibitor C1-esteraza

i. j. – internacionalna jedinica

IMIG – intramuskularni imunoglobulini

ITP – idiopatska trombocitopenična purpura

IVIG – intravenski imunoglobulini

KPK – koncentrat protrombinskog kompleksa

MHRA – engl. Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency

NAT – engl. Nucleic Acid amplification Technique

PAI – engl. plasminogen activator inhibitor; inhibitor aktivatora plazminogena

PMF – engl. Plasma Master File; Glavna dokumentacija o plazmi

SLE – sistemski eritematozni lupus

TF – tkivni faktor

tFPI – engl. tissue factor pathway inhibitor; inhibitor puta tkivnog faktora

tPA – engl. tissue plasminogen activator; tkivni aktivator plazminogena

tPAT – topljive površinski aktivne tvari

TSE – engl. transmissible spongiform encephalopathy; prenosive spongiloformne encefalopatije

vCJB – varijanta Creutzfeldt-Jakobove bolesti

vWB – von Willebradova bolest

vWF – von Willebrandov faktor

VZN – virus zapadnog Nila

8. ŽIVOTOPIS