

6. Trobisch H. Results of a quality-control study of lyophilized pooled plasmas which have been virally inactivated using a solvent detergent method (modified Horowitz procedure). *Beitr. Infusionsther.* 1991; 28: 92–109.
7. Bakaltcheva I. *Freeze-dried plasma format for the trauma care field.* Patent US 0233671 A1; 2010.
8. Matejtschuk P., Stanley M., Jefferson P. Freeze-drying of biological standards. In: Rey L., May J.C., eds. *Freeze-drying/lyophilization of pharmaceutical and biological products.* New York, London: Informa Healthcare; 2010: 317–53.
9. Savinykh E.Yu. Preparation of lyophilized substrates for the study of plasma procoagulant activity. Dis. St.Peterburg; 1999. (in Russian)
10. Savinykh E.Yu., Tarasova V.N., Platonova G.K. Substrate plasma in the research methods of coagulation. In: Blood products and blood substitutes, production, control and application: Proceeding of the Science Practice Conference. Kirov; 1995: 41–3. (in Russian)
11. Hugler P., Trobisch H., Neuman H., Moller A., Sirtl C., Derdak M., et al. Quality control of three different conventional fresh-frozen plasma preparations and one new virus-inactivated lyophilized pooled plasma preparation. *Klin. Wochenschr.* 1991; 69(3): 157–61.
12. Bakaltcheva I., Ketchum L. Method of producing glycine-stabilized lyophilized plasma. Patent US 7,931,319; 2011.
13. Heimburger N., Sieber A., Schwinn H. Stable plasma, process for preparing it and its use as comparative plasma in coagulation tests. Patent US4,056,484; 1977.
14. Technical Regulations on blood safety requirements, its products, blood-substituting solutions and technical equipment used in transfusion-infusion therapy. Approved RF Government Decree №29 of 26 Jan 2010. (in Russian). Available at: <http://base.garant.ru/12172686/> (Accessed 09.10.16).
15. Ragimov A.A., Shcherbakova G.N. *Guide infusion-transfusion therapy.* Moscow: Medical Information Agency; 2003. (in Russian)
16. Sword-Nilsson A.M., Persson P.O., Johnson U., Lethagen S. Factors influencing factor VIII activity in frozen plasma. *Vox Sang.* 2006; 90(1): 33–9.
17. European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. 18th ed. Strasbourg: Council of Europe Publishing; 2015.
18. Wilder D., Reid N., Bakaltcheva I. Hypertonic resuscitation and blood coagulation. In vitro comparison of several hypertonic solutions for their action on platelet and plasma coagulation. *Thrombos. Res.* 2002; 107(5): 255–61.

Поступила 26.09.16
Принята к печати 22.11.16

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 615.273.5.03:616.151.514.012

Солдатов А.А., Авдеева Ж.И., Мосягин В.Д., Олефир Ю.В., Бондарев В.П.

ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ПО РАЗРАБОТКЕ И МОДИФИКАЦИИ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ГЕМОФИЛИИ

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России,
127051, Москва, Россия

Основным методом лечения гемофилии А и В является заместительная терапия с использованием препаратов, получаемых из плазмы доноров или посредством технологии рекомбинантных ДНК. Среди основных недостатков немодифицированных препаратов факторов VIII и IX (FVIII и FIX) следует выделить низкий период циркуляции препарата в организме и выработку антител (ингибиторов) к белку препарата, что существенно снижает их эффективность. Повышение эффективности и безопасности рекомбинантных препаратов достигается за счет удаления В-домена в молекуле FVIII, пегилирования или разработки препаратов на основе слитных белков (fusion proteins – слияние молекулы препарата с альбумином или Fc-фрагментом IgG). Данные модификации в первую очередь способствуют повышению стабильности молекулы действующего вещества, увеличению периода полувыведения и снижению иммуногенности рекомбинантных препаратов. Заместительная терапия традиционными препаратами больных гемофилией, у которых определяются антитела (ингибиторы) к препарату, не эффективна. Учитывая это, в последние годы были разработаны новые препараты для альтернативных подходов методов лечения гемофилии. Разработан препарат на основе биспецифичных моноклональных антител, имитирующий функцию FVIII; моноклональные антитела и аптамер, блокирующие активность ингибитора пути тканевого фактора, и препарат на основе антисмыслового олигонуклеотида, блокирующий мРНК, ответственную за синтез антитромбина III. Основным преимуществом новых препаратов является то, что они не вызывают выработку антител к факторам свертывания и могут быть использованы для лечения больных с наличием в плазме крови ингибиторов.

Ключевые слова: гемофилия; рекомбинантный фактор VIII; рекомбинантный фактор IX; пегилированные белки; препараты моноклональных антител; препараты на основе слитных белков/fusion proteins; аптамер; антисмысловые олигонуклеотиды.

Для цитирования: Солдатов А.А., Авдеева Ж.И., Мосягин В.Д., Олефир Ю.В., Бондарев В.П. Основные направления по разработке и модификации препаратов для лечения гемофилии. *Гематология и трансфузиология.* 2016; 61(4): 208–215. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0234-5730-2016-61-4-208-215>

Soldatov A.A., Avdeeva Zh.I., Mosyagin V.D., Olefir Yu.V., Bondarev V.P.

MAIN DIRECTIONS FOR THE DEVELOPMENT AND MODIFICATION OF PREPARATIONS FOR THE TREATMENT OF HEMOPHILIA

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, 127051, Russian Federation

The basic method of the treatment of haemophilia A and B is the replacement therapy by preparations obtained from plasma of donors, or by recombinant DNA technology. Among the major shortcomings of unmodified drugs VIII and IX factors should be allocated between the low time circulation of the drug in the body of the patient and the delivery of antibodies (inhibitors) to a protein preparation that significantly reduces their effectiveness. The improvement of the efficiency and safety of recombinant preparations is achieved by removing B-domain of factor VIII molecule, pegylation or development of preparations of fusion proteins (fusion molecules of the preparation to the albumin or Fc-fragment of IgG). These modifications,

especially, enhance the stability of the molecule of the active substance to increase half-life and reduce immunogenicity of recombinant products. Replacement therapy with traditional preparations in hemophilia patients delivering antibodies (inhibitors) to the preparation is ineffective. Taking this into account, in recent years, new preparations have been developed for alternative approaches treatment of hemophilia. There were developed the preparation based on bispecific monoclonal antibody mimicking the function of factor VIII; monoclonal antibodies and aptamer blocking the activity of tissue factor pathway inhibitor, and the preparation based on antisense oligonucleotide blocking mRNA responsible for the synthesis of antithrombin III. The main advantage of these new formulations is that they do not cause the production of antibodies to coagulation factors and so can be used for the treatment of patients with inhibitors in blood.

Key words: hemophilia; recombinant factor VIII; recombinant factor IX; pegylated proteins; monoclonal antibody preparations; preparations based fusion proteins; aptamer; antisense oligonucleotides.

For citation: Soldatov A.A., Avdeeva Zh.I., Mosyagin V.D., Olefir J.V., Bondarev V.P. Main directions for the development and modification of preparations for the treatment of hemophilia. *Hematology and Transfusiology. Russian journal (Gematologiya i transfusiologiya)*. 2016; 61(4): 208-215. (in Russian). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0234-5730/2016-61-4-208-215>

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Received 29 January 2016

Accepted 22 November 2016

Гемофилия – наследственное нарушение свертывания крови, вызванное недостаточностью или полным отсутствием факторов свертывания крови VIII или IX (FVIII или FIX). При недостатке FVIII развивается гемофилия А, FIX – гемофилия В. Дефицит факторов свертывания крови сопровождается спонтанными или индуцированными кровоизлияниями в суставы, мышцы и внутренние органы.

До 1960-х годов лечение гемофилии практически отсутствовало. После разработки метода криопреципитации в 1966 г. был зарегистрирован первый препарат FVIII, который получали из плазмы крови доноров. Следует отметить, что в первые годы наблюдался острый дефицит данных препаратов, в США препараты разыгрывали в лотерею. В 1980-х годах было установлено, что препараты факторов свертывания крови, получаемые из плазмы, инфицированы вирусами (ВИЧ, гепатит С), что привело к заражению около 20 000 больных [1]. Данное обстоятельство послужило импульсом для разработки методов элиминации и инактивации вирусов при производстве плазменных препаратов и создания новых препаратов, получаемых без использования плазмы. В производственный процесс получения препаратов из плазмы (plasma derived – pd) FVIII и pdFIX) был включен этап термической обработки, который позволил устранить инфицирование препаратов микроорганизмами. Параллельно совершенствованию технологического процесса получения препаратов из плазмы проводили исследования по разработке факторов свертывания с использованием технологии рекомбинантных ДНК. На основе данной технологии получены и зарегистрированы препараты рекомбинантного FVIII свертывания крови (rFVIII) в 1992 г. и FIX (rFIX) в 1997 г. Технология получения препаратов на основе рекомбинантной ДНК позволяет значительно снизить риск вирусной контаминации препаратов.

В настоящее время основными препаратами заместительной терапии гемофилии являются плазменные и рекомбинантные препараты, однако они имеют ряд недостатков. Поэтому активно проводят исследования для совершенствования применяемых препаратов и разработки новых препаратов и методов лечения гемофилии. В обзоре представлен анализ основных направлений разработки препаратов для лечения гемофилии, которые были зарегистрированы в последние 2 года, или в настоящее время находятся на разных этапах экспериментальных или клинических исследований.

Для корреспонденции:

Солдатов Александр Алексеевич, доктор медицинских наук, главный эксперт управления экспертизы аллергенов, цитокинов и других иммуномодуляторов ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России. 127051, Москва, Россия. E-mail: Soldatov@expmed.ru.

For correspondence:

Soldatov Aleksandr A., MD, PhD, DSci, Chief expert of Office of expertise allergens, cytokines and other immunomodulators of Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, 127051, Russian Federation. E-mail: Soldatov@expmed.ru.

Основные проблемы, связанные с применением плазменных и рекомбинантных препаратов для лечения гемофилии

Среди препаратов для заместительной терапии гемофилии наиболее эффективными остаются препараты, получаемые из плазмы доноров. Основной проблемой производства данных препаратов является потребность в больших объемах плазмы. При этом, несмотря на то что с конца 1980-х годов не было зарегистрировано случаев инфицирования больных при применении pdFVIII и pdFIX, производители данных препаратов теоретически не могут исключить возможность вирусного их заражения.

Если еще до 1980-х годов основной проблемой использования указанных препаратов была высокая вероятность инфицирования больного, то после включения в производственный процесс методов инактивации/элиминации вирусов основным недостатком осталась их высокая нежелательная иммуногенность. В ответ на введение препаратов FVIII или FIX возможно развитие иммунного ответа с выработкой специфических антител к препарату, которые блокируют специфическую активность препаратов и тем самым снижают их клиническую эффективность. Поэтому антитела, вырабатываемые в ответ на введение препаратов (факторов свертывания крови), получили название ингибиторов. Антитела (ингибиторы) формируются при применении плазменных и рекомбинантных препаратов.

Введение препаратов FVIII может сопровождаться выработкой антител, относящихся к IgG1 или IgG4, которые встречаются в 25–30% (до 52%) случаев. Выработка антител к FIX встречается реже, чем FVIII (до 3% случаев). Однако в ответ на введение препаратов FIX значительно чаще вырабатываются антитела, вызывающие развитие анафилактических реакций [2].

Если у больного гемофилией встречается полный дефицит FVIII или FIX, механизм выработки антител к препарату связан с тем, что система иммунитета до введения препарата не контактировала с фактором. Отсутствие контакта с определенным фактором свертывания не позволяет сформировать иммунологическую толерантность против данного белка. Поэтому вводимые факторы свертывания крови при лечении гемофилии система иммунитета распознает как «чужеродные агенты» и отвечает на них развитием иммунного ответа с выработкой аллоантител (ингибиторов).

Предполагается, что у больных с неполным дефицитом факторов свертывания крови развитие иммунной реакции на препарат может быть связано с наследственными факторами, наличием воспалительного процесса или др. Выработка антител (ингибиторов) к препаратам свертывания крови обусловлена многими факторами, в том числе расовыми различиями, состоянием системы иммунитета, видом генетического дефекта (делеции или миссенс-мутации), чередованием различных антигемофильных средств, иммуногенным потенциалом препаратов и др.

Более редкое развитие иммунной реакции на введение препаратов FIX некоторые авторы связывают с тем, что структура

Таблица 1

Препараты последнего поколения для лечения гемофилии

Группа препаратов	Препарат	Действующее вещество
Модифицированные препараты FVIII	rFVIII-huCL	Рекомбинантный FVIII, полученный с использованием линии клеток почки эмбриона человека
	rhFVIII-SC	Рекомбинантный FVIII с удаленным В-доменом молекулы, полученный с использованием линии клеток почки эмбриона человека
	BAX 855	Пегелированный (20 кД) рекомбинантный FVIII
	BAY 94-9027	Пегелированный (60 кД) рекомбинантный FVIII с удаленным В-доменом
	N8-GP	Пегелированный (40 кД) рекомбинантный FVIII с удаленным В-доменом
	rFVIII-Fc	Слитый белок (fusion proteins) рекомбинантного FVIII с Fc-фрагментом IgG
Модифицированные препараты FIX	rFIX-FP	Слитый белок (fusion proteins) рекомбинантного FIX с альбумином
	rFIX-Fc	Слитый белок (fusion proteins) рекомбинантного FIX с Fc-фрагментом IgG
	N8-GP	Пегелированный (40 кД) рекомбинантный FIX
Препараты, действующие «в обход» FVIII и FIX	rFVIIa-FP	Слитый белок (fusion proteins) рекомбинантного FVIIa с альбумином
	hbS23	Моноклональные биспецифические антитела, связывающие FXa и FX
Препараты, блокирующие активность факторов противосвертывающей системы гемостаза	mAb2021 (conczumab)	Моноклональные антитела, связывающие (блокирующие) ингибитор пути TF
	BAX 499	Пегелированный аптамер, связывающий ингибитор пути TF
	ALN-AT3	Антисмысловый олигонуклеотид (siRNA), связывающий мРНК АТIII

молекулы FIX имеет сходное строение с К-зависимыми факторами свертывания, синтез которых не нарушается при гемофилии. Поэтому при введении препаратов FIX даже при полном отсутствии их синтеза в организме больного система иммунитета, вероятно, распознает их в качестве «своих», а не «чужеродных» белков.

Разработка рекомбинантных препаратов позволила исключить передачу возбудителей вирусной инфекции с плазменными препаратами. Однако опыт клинического применения препаратов rFVIII и rFIX указывает, что их эффективность ниже, чем аналогичных препаратов, полученных из плазмы. Кроме того, в некоторых работах показано, что введение рекомбинантных препаратов сопровождается и более активной выработкой ингибиторов, чем применение аналогичных плазменных препаратов [2–4]. При назначении rFVIII больным, которые впервые получали лечение, ингибиторы вырабатывались у 29–32% больных, а при назначении в аналогичной популяции больных pdFVIII – у 0–12%. У ранее леченных больных при назначении rFVIII ингибиторы определялись в 36% случаев, а при применении pdFVIII – в 21% [2–5].

Препараты заместительной терапии при гемофилии обычно назначают при развитии у больных кровотечений или для профилактики кровотечений при хирургических вмешательствах. Согласно мнению многих авторов [6–8], оптимальным методом предупреждения кровотечений является использование профилактических схем введения препаратов. Одной из основных проблем для терапевтического и профилактического применения рекомбинантных и плазменных препаратов является низкий период циркуляции FVIII или FIX в крови человека. Период полувыведения FVIII составляет около 12 ч (с колебаниями от 8 до 24 ч) и зависит от клиренса фактора Виллебранда (vWF), который связывается с FVIII. Период полувыведения FIX колеблется от 18 до 24 ч.

В связи с тем что плазменные и рекомбинантные препараты имеют низкий период циркуляции в организме, возникает необходимость их частого введения в процессе лечения и/или профилактики. Частое введение требует использования постоянных систем для введения (постоянных катетеров), что сложно выполнить при лечении детей.

Таким образом, среди недостатков, применяемых в настоящее время для лечения гемофилии немодифицированных препаратов FVIII и FIX, следует выделить следующие: теоретическая вероятность вирусного инфицирования больных плазменными препаратами, высокая иммуногенность плазменных и рекомбинантных препаратов, более низкая (в сравнении с плазменными препаратами) эффективность рекомбинантных препаратов и низкий период циркуляции в крови факторов свертывания крови.

Основные направления по разработке и модификации препаратов для лечения гемофилии

Для устранения указанных выше недостатков препаратов, используемых для лечения гемофилии, проводят исследования по их совершенствованию по следующим направлениям:

- разработка рекомбинантных препаратов, полученных с использованием клеточной линии человека для того, чтобы действующее вещество препарата имело максимальное сходство с белками человека;
- удаления В-домена молекулы FVIII для повышения ее стабильности и более прочного связывания с vWF;
- конъюгация молекулы факторов свертывания с полиэтиленгликолем или создание слитных белков (fusion proteins) – молекул факторов свертывания с Fc-фрагментом иммуноглобулина (Ig) или альбумином для увеличения периода циркуляции препарата в организме;
- разработка и модификация альтернативных препаратов для лечения гемофилии, таких как препарат FVIIa, аптамер, моноклональные антитела и антисмысловые олигонуклеотиды, блокирующие активность ингибиторов тканевого фактора (TF) и антитромбина III (АТIII).

Препараты, которые были зарегистрированы в последние 2 года или находятся на разных стадиях экспериментального и клинического исследования, представлены в **табл. 1**.

Модифицированные рекомбинантные препараты FVIII

Молекула FVIII содержит 2332 аминокислоты, большой размер молекулы отражается на ее стабильности. Методами компьютерного моделирования (*in silico*) было показано, что в области В-домена имеются аминокислотные последовательности (эпитопы), связывающиеся с антигенами МНС класса II. При этом В-домен не влияет на функциональную активность FVIII и не влияет на связывание с vWF. Соответственно удаление В-домена не повышает риск развития иммунной реакции на препарат FVIII. В то же время уменьшение размера молекулы (приблизительно на 870 аминокислот) приводит к повышению ее стабильности (см. **рисунок**) [9].

Учитывая данные особенности, были разработаны рекомбинантные препараты FVIII, полученные в системе клеток яичника китайского хомячка (CHO), в молекуле которых был удален В-домен. В препарате turgostocog alfa со стороны α2-домена оставлено 11 аминокислот (от 741 до 750), а со стороны α3 – 10 аминокислот (от 1638 до 1648). Данная модификация была использована для получения других препаратов (см. **рисунок**).

Удаление В-домена в препарате (rhFVIII-SC), полученном с использованием клеток почек эмбриона, привело к увеличению стабильности молекулы рекомбинантного rFVIII и более быстрому и сильному связыванию с FW. При проведении кли-

нических исследований препараты с удаленным В-доменом продемонстрировали аналогичную с нативным (немодифицированным FVIII) препаратом эффективность и безопасность [10, 11].

Наиболее распространенной клеточной линией для получения рекомбинантных препаратов является линия клеток CHO. Первые рекомбинантные препараты факторов свертывания крови также были получены с использованием клеток CHO. Однако белки, получаемые в системе клеток животных, отличаются от белков, синтезируемых клетками человека. В первую очередь эти различия касаются посттрансляционных модификаций. Например, гликаны молекулы rFVIII-huCL содержат Gal-α1-3-Gal и не содержат остатков N-гликолилнейраминной кислоты, которые содержатся в белках, получаемых в системе клеток CHO, а белки, получаемые в системе клеток CHO, не содержат Gal-α1-3-Gal. Особенности гликозилирования белков препаратов, синтезируемых клетками животных или микроорганизмов, оказывают влияние в первую очередь на развитие нежелательной иммуногенности препаратов.

Учитывая данные особенности, была разработана технология получения rFVIII с удаленным В-доменом в системе клеток почек эмбриона линии HEK293. На основании данной технологии были получены и зарегистрированы два препарата. Полученный по данной технологии препарат последнего поколения rFVIII-huCL (simostocog alfa) отличается тем, что при его производстве не применяются вещества (сыворотки для культивирования), получаемые от животных или человека [11].

Эффективность данных препаратов соответствует эффективности нативных (немодифицированных) препаратов для заместительной терапии, но значительно снижен риск безопасности их применения [12, 13].

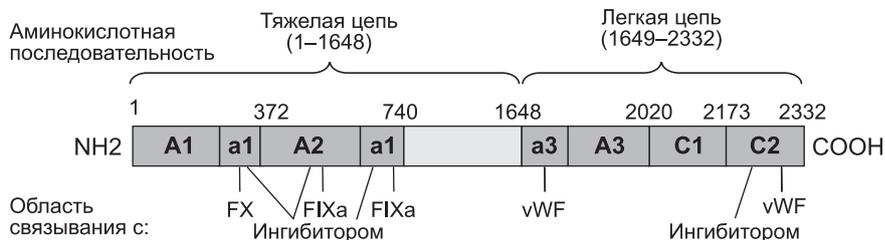
Пегелированные препараты

Проблемы, встречающиеся при применении плазменных и рекомбинантных препаратов, используемых для заместительной терапии, такие как нежелательная иммуногенность и короткий период полувыведения, характерны практически для всех современных биотехнологических препаратов. Одним из первых подходов, который был применен для устранения данных недостатков ряда препаратов (эритропоэтины, интерфероны, филграстимы и др.), является конъюгация молекулы белка препарата с полиэтиленгликолем. Связывание с полиэтиленгликолем эритропоэтинов, интерферонов, филграстимов и др. значительно повысило их эффективность и безопасность.

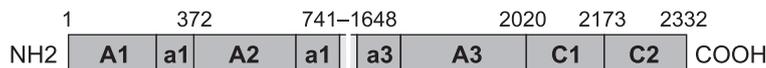
Пегелирование белковых препаратов приводит к увеличению молекулярной массы препарата. Высокая молекулярная масса пегелированного препарата вызывает задержку препарата в организме, что достигается не только за счет замедления его выведения через почки, но и в результате нарушения элиминации препарата в печени. Пегелирование белка сопровождается нарушением связывания препарата с LRP-рецептором (рецептор, связывающий белок клетками печени), необходимого для его метаболизма в клетках печени [14]. Пегелирование препаратов свертывания крови приводит к увеличению периода циркуляции препарата в крови и, следовательно, удлинению времени его действия (табл. 2).

Кроме того, конъюгация белка препарата с полиэтиленгликолем приводит к нарушению (или экранированию) детерминант (эпитопов) белковой молекулы препарата, которые являются ответственными за развитие иммунного ответа и индукцию синтеза антител к препарату, что приводит к значительному снижению нежелательной иммуногенности.

Немодифицированная молекула VIII фактора свертывания крови



Молекула VIII фактора свертывания крови с удаленным В-доменом



Пегелированная молекула VIII фактора свертывания крови



Препарат на основе слитных молекул F VIII (с удаленным В-доменом) Fc-фрагмента иммуноглобулина

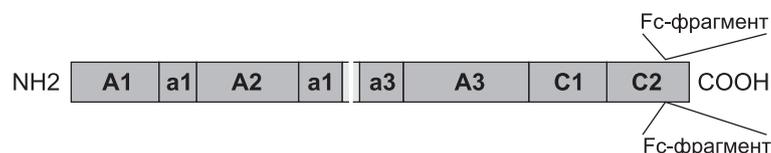


Схема основных подходов к модификации молекулы VIII фактора свертывания крови.

При разработке первых пегелированных препаратов rFVIII установлено, что связывание полиэтиленгликоля с лизином или N-концевыми аминокислотными группами в белковой молекуле действующего вещества приводит к снижению его эффективности и способности связываться с vWF. Связывание полиэтиленгликоля с цистеином не приводило к снижению специфической активности препарата.

Было разработано три варианта пегелированных препаратов rFVIII. В первом случае полиэтиленгликоль (мол. масса 20 кД) связывали с нативной молекулой rFVIII (препарат BAX 855). В двух других случаях препараты созданы на основе молекулы rFVIII с удаленным В-доменом, конъюгированной с полиэтиленгликолем с мол. массой 40 кД (препарат N8-GP) или с полиэтиленгликолем с мол. массой 60 кД (препарат BAY 94-9027) [14, 15].

Пегелирование препаратов приводило к значительному улучшению фармакокинетических свойств препаратов. Например,

Таблица 2

Результаты сравнительного изучения периода полувыведения и клиренса некоторых препаратов последнего поколения для лечения гемофилии

препарат	Исследуемый препарат		Препарат сравнения		
	период полувыведения, ч	клиренс, мл/ч на 1 кг	препарат	период полувыведения, ч	клиренс, мл/ч на 1 кг
rhFVIII-SC	10,83	4,11	Нативный	11,19	4,17
BAY 94-9027	18,5 (9,15–23,4)	0,014 (0,008–0,018)	Нативный	13 (10,2–15,9)	0,023 (0,01–0,029)
N8-GP	18,35	1,61	Нативный	11,73	2,41
rFIX-Fc	57,6 ± 8,27	3,18	rFIX	6,28 ± 1,11	8,4 ± 2,02
rFVIIa-FP	6,1–9,7	7,62	Нативный	3,9–5,99	33–37

при экспериментальном изучении свойств на мышцах и собаках показано, что пегилирование приводит к увеличению периода полувыведения BAY 94-9027 и снижению его иммуногенности в сравнении с нативным препаратом rFVIII-FS [14].

В настоящее время заканчивается регистрация пегилированного rFIX (препарат N9-GP), который представляет собой rFIX, конъюгированный с полиэтиленгликолем с мол. массой 40 кД [16].

Пегилирование препаратов факторов свертывания вызывает значительное удлинение периода полувыведения препарата из организма (см. табл. 2). Следует отметить, что в экспериментах на животных увеличение периода полувыведения пегилированных препаратов за счет снижения почечного клиренса сопровождалось вакуолизацией клеток почечных канальцев [16, 17].

Препараты на основе слитных белков (fusion proteins)

Еще один подход для увеличения времени циркуляции препарата в организме основан на слиянии молекулы фактора свертывания с другим белком. Увеличение времени циркуляции возможно при использовании Fc-фрагмента молекулы IgG или альбумина. Увеличение периода полувыведения данных белков обусловлено в первую очередь их способностью за счет Fc-фрагмента связываться с FcRn-рецептором на поверхности клеток.

FcRn-рецептор экспрессируется на поверхностной мембране многих клеток (моноциты/макрофаги, эндотелиальные клетки и др.) и обладает уникальной способностью связываться с Fc-фрагментом молекулы IgG только при pH в диапазоне 6,0–6,5, а при повышении значений pH до 7,0–7,5 отмечается очень слабое или полное отсутствие связывания. При взаимодействии рецептора с Fc-фрагментом происходит неспецифический эндоцитоз образовавшегося комплекса эндотелиальной клеткой (жидкая фаза пиноцитоза). При восстановлении pH до физиологического уровня комплекс транспортируется на поверхность клетки и молекула, содержащая Fc-фрагмент, высвобождается из указанного комплекса.

Таким образом, связывание Fc-фрагмента в составе препарата с FcγR-рецептором сопровождается пиноцитозом в лизосомы с последующим его протеолизом, а при связывании с FcRn-рецептором также происходит пиноцитоз, но препарат сохраняется в клетке, не подвергаясь протеолизу [18, 19].

В ряде работ [20, 21] показано, что FcRn принимают участие в реабсорбции белков и альбуминов в почечных канальцах. В то же время M. Sarav и соавт. [22] считают, что с участием FcRn происходит реабсорбция только альбуминов и FcRn-рецепторы не влияют на метаболизм белков в почках.

Слияние молекулы FVIII и FIX с Fc-фрагментом или альбумином приводит к увеличению периода выведения препарата. Однако молекула FVIII является достаточно большой и не может быть пиноцитирована эндотелиальной клеткой. Учитывая это, для получения препаратов слитых белков использовали FVIII с удаленным В-доменом. На основе данных подходов разработан препарат слитых белков (fusion proteins) молекулы FVIII (с удаленным В-доменом) и двумя Fc-фрагментами. Исследования на модели нокаутированных по FcRn-генам мышей показали, что увеличение периода циркуляции rFc-FVIII препарата происходит за счет участия FcRn-рецепторного механизма.

В 2014 г. был одобрен и препарат Efralococog alfa, который представляет собой слитый белок Fc-фрагмента (IgG1) с рекомбинантным FVIII, у которого удален В-домен (rBDD VIII-Fc; аббревиатура BDD означает удаленный В-домен).

Препарат rBDD VIII-Fc получают с использованием линии клеток HEK-293H (клетки 293 почек эмбриона человека). Использование данной линии клеток не случайно, так как это позволяет сохранить естественные посттрансляционные модификации молекулы FVIII. Сохранение естественного гликозилирования в препарате rFVIII-Fc позволяет поддерживать стабильность молекулы FVIII и сводит к минимуму образование неоптитов.

При удалении В-домена структура молекулы препарата, аминокислотная последовательность, профиль гликозилирования и биологическая активность оставшейся части молекулы препарата на основе белка слияния rBDD FVIII-Fc-фрагмент (rBDD FVIII-Fc) сохраняли функциональные свойства и структурные характеристики соответствующих участков молекулы нативного препарата FVIII. В исследованиях *in vitro* было установлено снижение на 30% аффинности связывания с vWF относительно нативного препарата. В исследованиях [23] на модели нокаутиро-

ванных по гену FVIII мышцах показано, что увеличение периода полувыведения обусловлено участием FcRn-рецептора. Клинические исследования продемонстрировали увеличение периода полувыведения препарата rBDD FVIII-Fc (до 18,8 ч) в сравнении с нативным препаратом (12,2–11 ч).

Разработчики препарата предполагают, что препарат rBDD FVIII-Fc будет обладать иммуномодулирующими свойствами. Известно, что распознавание Fc-фрагмента антитела человека иммунокомпетентными клетками приводит к формированию толерантности. Экспериментально было установлено появление Treg (Т-регуляторные клетки, ответственные за развитие толерантности к белку) в ответ на введение rBDD FVIII-Fc. Это позволяет предполагать снижение иммуногенности препарата при введении человеку. Однако эти ожидания пока не были подтверждены в клинических исследованиях [23, 24].

В 2014 г. в США и Канаде зарегистрирован препарат (coagulation Factor IX (Recombinant), Fc Fusion Protein), который представляет собой слитный белок (fusion proteins) рекомбинантных rFIX и Fc-фрагмента (rFIX-Fc).

Молекула rFIX состоит из 641 аминокислоты, Fc-фрагмент содержит 227 аминокислот. Препараты rFIX-Fc получают с использованием той же клеточной линии (HEK-293H), что и препарат rFVIII-Fc. В препарате rFIX-Fc определяется более высокий уровень β-гидроксигликозилирования в области Asp-64 относительно нативного плазменного FIX. Слияние молекул rFIX и Fc-фрагмента в препарате увеличивает его растворимость.

При проведении клинических исследований установлено, что соединение rFIX с Fc в первую очередь увеличивает период полувыведения препарата почти в 10 раз (см. табл. 2). Увеличение времени полувыведения препарата было достигнуто за счет замедления клиренса, который для rFIX-Fc составил 3,18 мл/ч на 1 кг массы тела, в то время как для rFIX был на уровне $8,4 \pm 2,02$ мл/ч на 1 кг массы тела. Это сопровождалось увеличением продолжительности циркуляции в крови FIX до 11,2 сут, что в 2 раза выше, чем при введении немодифицированного препарата (5,1 сут). Общее время циркуляции rFIX-Fc в организме составило $71,9 \pm 9,66$ ч ($53,2$ – $85,9$ ч) по сравнению с $26 \pm 6,07$ ч для нативного препарата.

Проведенные клинические исследования обосновали рекомендации для профилактического применения препарата rFIX-Fc в дозе 20 МЕ/кг (1 раз в неделю) или в дозе 40 МЕ/кг (введение каждые 10 дней) для поддержания содержания FIX в крови выше 1% [25].

Альбумин, представляет собой белок, который имеет высокий период полураспада (до 19 сут), в том числе и за счет способности связывания с RnFc-рецептором. Кроме того, молекула альбумина имеет высокую стабильность и не обладает иммуногенностью.

Был разработан препарат на основе слитого белка rFIX и альбумина (rFIX-FP). При клинических исследованиях установлено, что препарат обладает длительным периодом полувыведения ($t_{1/2}$ 99,88 ч; клиренс 0,71 мл/ч на 1 кг массы тела), что в 4,8 раза превышает период полувыведения нативного rFIX.

Лечение больных гемофилией с установленным наличием ингибиторов

Связывание ингибитора с препаратом приводит к блокированию его специфического действия. В подобной ситуации введение препаратов заместительной терапии в случае повреждения сосудистой стенки у больного гемофилией не вызывает остановки кровотечения. Поэтому лечение больных гемофилией, у которых определяются ингибиторы на плазменные или рекомбинантные препараты FVIII или FIX, неэффективно при использовании данных препаратов. Для подавления синтеза ингибиторов разработаны различные схемы десенсибилизации, в основе которых лежит введение больших доз препаратов, что требует и больших материальных затрат.

Альтернативой десенсибилизации является использование препаратов заместительной терапии, на которые не вырабатываются ингибиторы. Например, при развитии иммунного ответа с выработкой антител к препаратам FVIII человека больным до недавнего времени назначали препарат FVIII, полученный из плазмы свиньи (Huate C). Ингибиторы, которые вырабатывались у больных на человеческий FVIII, не блокировали специфическую активность FVIII, полученного из плазмы свиньи. Недостатком данного препарата является высокая вероятность

выработки антител (ингибиторов) к FVIII свиньи. Препарат был снят с производства из-за опасности контаминации паравирусом свиньи. В связи с этим был разработан рекомбинантный FVIII, аналогичный природному FVIII свиньи (OBI-1), препарат находится на этапе клинических исследований [26].

Препараты FVIIa применяют для лечения и профилактики гемофилии у больных, у которых выявлены антитела (ингибиторы) к препаратам FVIII или FIX. Механизм действия препаратов FVIIa обусловлен их способностью активировать систему свертывания крови без участия («в обход») FVIII или FIX.

Основным недостатком немодифицированных препаратов FVIIa является очень короткий период полувыведения (2,5 ч), что требует введения препаратов 2–3 раза в день с интервалом 2–3 ч при лечении кровотечений.

Учитывая продолжительный период полувыведения альбумина, создание препарата на основе слитного белка, молекул FVIIa и альбумина значительно увеличивало период полувыведения препарата rFVIIa-FP. При введении препарата крысам период полувыведения увеличивался в 5,8–6,7 раза в сравнении с немодифицированным препаратом. Введение препарата мышам приводило к повышению в 4 раза периода полувыведения и в 11 раз к снижению клиренса относительно немодифицированного препарата [27].

Установленные при экспериментальных исследованиях особенности фармакокинетики были подтверждены при клинических исследованиях с участием здоровых добровольцев и больных гемофилией. Период полувыведения rFVIIa-FP был 6,1–9,7 ч и клиренс – 7,62–12,74 мл/ч на 1 кг массы тела в сравнении с немодифицированным препаратом (3,9–5,99 ч и 33–37 мл/ч на 1 кг массы тела соответственно) [28].

Альтернативные препараты

В связи с тем что у больных гемофилией с ингибиторами применение препаратов заместительной терапии неэффективно, используются разные подходы к лечению данной категории больных. Например, для лечения гемофилии в комплексе с препаратами факторов свертывания крови были использованы препараты, подавляющие развитие иммунной реакции, такие как ритуксимаб (моноклональные антитела к CD20), в качестве альтернативы стероидным препаратам. Указанные моноклональные антитела, связываясь с CD20, индуцируют гибель В-клеток и соответственно подавляют выработку ингибиторов. При введении 19 больным гемофилией еженедельно в течение 1 мес препарата ритуксимаб в дозе 375 мг/м² вместе с высокими дозами FVIII привело к подавлению выработки ингибиторов у 14 (74%) больных. При этом у некоторых из этих больных все-таки определялось снижение периода полувыведения FVIII, у 10 больных наблюдался период ремиссии от 90 дней до 2 лет [29].

Кроме препаратов на основе факторов свертывания крови для остановки кровотечений, разработаны препараты, механизм действия которых отличается от действия препаратов заместительной терапии. Разработаны препараты, которые «в обход» FVIII или FIX активируют каскад свертывания крови или подавляют активность антисвертывающих факторов (блокаторы ингибитора пути TF и АТIII).

Действующее вещество препарата ACE 910 является биспецифическим гуманизированным моноклональным антителом, полностью имитирующим свойства FVIII. Связываясь с FIXa и FX, препарат инициирует развитие процесса свертывания крови без участия FVIII.

При экспериментальном исследовании на приматах [30] было показано, что препарат ACE 910 вызывает остановку кровотечения при использовании в дозе 1–3 мг/кг. Клинические исследования препарата ACE 910 у больных гемофилией А (в том числе и больных с ингибиторами) продемонстрировали его высокую эффективность и безопасность. Период полураспада препарата составляет около 3 нед, препарат эффективен при подкожном введении 1 раз в неделю. Самое главное преимущество данного препарата заключается в том, что он, активируя процесс свертывания крови, не вызывает выработки антител (ингибиторов) к факторам свертывания крови и может применяться у больных гемофилией с наличием ингибиторов [30, 31].

В норме TF в комплексе с активированным FVIIa активирует FIX и FX. Однако функция TF подавляется ингибитором TF. Поэтому блокирование ингибитора пути TF повышает прокоагулянтную активность факторов свертывания крови.

Разработан препарат Concizumab, который является моноклональным антителом к ингибитору пути TF. Связывание препаратом Concizumab ингибитора пути тканевого фактора приводит к повышению роли тромбина в процессе свертывания крови [32].

Исследования *in vitro* показали, что Concizumab вызывает выработку тромбина и FVIIa [33]. В экспериментах на кроликах была продемонстрирована способность препарата при подкожном и внутривенном введении останавливать кровотечение с такой же эффективностью, как и препаратов FVIIa. Введение препарата животным за 24 ч до травмы предотвращало развитие кровотечения [33].

Опубликованы результаты клинических исследований на здоровых добровольцах и больных гемофилией [34]. При подкожном введении Concizumab определяется в крови до 43 сут, при внутривенном введении период полувыведения находился в диапазоне 7,4–31,1 ч.

При введении препарата количество ингибитора пути TF в крови было обратно пропорционально концентрации Concizumab и в то же время сопровождалось прямо пропорциональным увеличением прокоагулянтной активности сыворотки крови. Данные изменения системы гемостаза сохранились в течение 14 сут после последнего введения препарата [32].

В сравнении с препаратами на основе плазменных или рекомбинантных факторов свертывания крови препараты на основе моноклональных антител являются более стабильными, имеют продолжительный период полувыведения, большую растворимость, селективность, специфичность и не вызывают выработки ингибиторов.

Препарат BAX 499 является синтетическим полинуклеотидом (аптамер), конъюгированным с полиэтиленгликолем. В организме препарат связывается с ингибитором пути тканевого фактора [34], блокируя его аналогично действию препарата на основе моноклональных антител (Concizumab).

При проведении клинических исследований на здоровых и больных гемофилией [35] продемонстрирована высокая эффективность и безопасность применения препарата BAX 499. Препарат был эффективен у всех включенных в исследование больных. При этом эффективность была выше у тех больных, которые имели более низкий уровень FVIII и более высокий уровень ингибитора пути TF до лечения.

В сравнении с препаратами на основе моноклональных антител технологический процесс получения аптамера проще и требует значительно меньше затрат. При его производстве отсутствует риск микробиологической контаминации, молекула действующего вещества обладает высокой стабильностью и не вызывает развитие иммунного ответа при его введении [35].

Еще одним направлением современной биотехнологии является разработка препаратов на основе так называемых антисмысловых олигонуклеотидов. Данные препараты обычно представляют собой короткую цепь нуклеотидов (как правило, 15–20 нуклеотидов), комплементарную мРНК, которая отвечает за синтез конкретного белка. В клетке антисмысловый олигонуклеотид может связывать соответствующий участок мРНК, тем самым блокируя синтез белка.

На основе данных подходов был разработан препарат ALT-AT3 (синтетический N-ацетилгалактозамин), представляющий собой антисмысловый олигонуклеотид, взаимодействующий с мРНК, отвечающей за синтез АТIII в гепатоцитах, что сопровождается подавлением синтеза АТIII. На модели гемофилии А и В мышей при повреждении сосудов лазерным излучением и развитии кровотечений, введение препарата приводило к остановке кровотечений. В настоящее время проводятся клинические исследования указанного препарата [36].

Немедикаментозное лечение больных гемофилией с установленным наличием ингибиторов

В качестве немедикаментозного способа удаления ингибиторов применяются методы плазмафереза и иммуноадсорбции. Следует отметить, что для полного освобождения от ингибитора методом плазмафереза необходимо удаление большого объема плазмы.

При проведении иммуноадсорбции в качестве сорбента используют белок А (компонент клеточной оболочки золотистого стафилококка), конъюгированный с сефарозой, который обладает способностью связываться с Fc-фрагментом молекулы IgG,

в том числе и с Fc-фрагментом ингибитора. Кроме белка А, в качестве сорбента могут быть использованы и другие системы, например Ig-Thera Sorb [37, 38]. Иммуноабсорбцию проводят при развитии кровотечений у больных гемофилией или перед хирургическими операциями [39].

Тем не менее указанные выше препараты и методы лечения применяют для заместительной терапии или блокирования различных звеньев системы гемостаза и не устраняют причину развития самого заболевания. В 2011 г. появились сообщения [40] о возможности передачи гена FIX с помощью аденоассоциированного вируса (AAV) в клетки, синтезирующие факторы свертывания крови. В настоящее время ведутся работы по созданию векторов AAV для переноса гена FVIII в соответствующие клетки больным гемофилией. Полученные к настоящему времени результаты исследований свидетельствуют о слабой выработке факторов свертывания крови в ответ на введение данного препарата. Основные исследования по данной проблеме направлены на повышение активности соответствующих векторов для переноса генов.

Таким образом, до 1960-х годов отсутствовали препараты для лечения гемофилии А и В, и продолжительность жизни таких больных была не более 25 лет. С появлением плазменных и рекомбинантных препаратов FVIII и FIX продолжительность жизни больных увеличилась до 65 лет. Однако традиционные препараты для заместительной терапии гемофилии еще далеки до совершенства и имеют ряд недостатков. Разработанные в последние годы биотехнологические препараты позволяют значительно снизить недостатки традиционных препаратов за счет повышения периода выведения препарата и снижения иммуногенности. Кроме того, появились препараты, альтернативные традиционным препаратам, на основе моноклональных антител, аптамера или антисмысловых олигонуклеотидов, которые в основном пока используются для лечения больных с ингибиторами. Усовершенствование традиционных препаратов для лечения гемофилии и разработка новых препаратов значительно повысили эффективность и безопасность терапии данного заболевания.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Mannucci P.M. AIDS, hepatitis and hemophilia in the 1980s: memoirs from an insider. *J. Thromb. Haemost.* 2003; 1(10): 2065–9.
- Wight J., Paisley S. The epidemiology of inhibitors in haemophilia A: a systematic review. *Haemophilia.* 2003; 9(4): 418–35.
- Ettingshausen C.E., Kreuz W. Recombinant vs. plasma-derived products, especially those with intact VWF, regarding inhibitor development. *Haemophilia.* 2006; 12(6): 102–6.
- Chalmers E.A., Brown S.A., Keeling D. Early factor VIII exposure and subsequent inhibitor development in children with severe haemophilia A. *Haemophilia.* 2007; 13(2): 149–55.
- Agostini D., Rosset C., Botton M.R., Kappel D.B., Vieira I.A., Gorziza R.P., et al. Immune system polymorphisms and factor VIII inhibitor formation in Brazilian haemophilia A severe patients. *Haemophilia.* 2012; 18(6): e416–28. doi: 10.1111/hae.12015.
- Srivastava A., Brewer A.K., Mauser-Bunschoten E.P., Key N.S., Kitchen S., Llinas A., et al. Guidelines for the management of hemophilia. *Haemophilia.* 2013; 19(1): e1–47.
- Ljung R., Auerswald G., Benson G., Jetter A., Jiménez-Yuste V., et al. Novel coagulation factor concentrates: Issues relating to their clinical implementation and pharmacokinetic assessment for optimal prophylaxis in haemophilia patients. *Haemophilia.* 2013; 19(4): 481–6.
- Collins P.W. Personalized prophylaxis. *Haemophilia.* 2012; 18(4): 131–5.
- Ezban M., Vad K., Kjalke M. Turoctocog alfa (NovoEight®) – from design to clinical proof of concept. *Eur. J. Haematol.* 2014; 93 (Issue 5): 369–76.
- Zollner S.B., Raquet E., Müller-Cohrs J., Metzner H.J., Weimer T., Pragst I., et al. Preclinical efficacy and safety of rVIII-Single Chain (CSL627), a novel recombinant single-chain factor VIII. *Thromb. Res.* 2013; 132(2): 280–7.
- Tiede A., Klamroth R., Oldenburg J. Turoctocog alfa (recombinant factor VIII) Manufacturing, characteristics and clinical trial results. *Hämostaseologie.* 2015; 35(14): 1–9.
- Casademunt E., Martinelle K., Jernberg M., Winge S., Tiemeyer M., Biesert L., et al. The first recombinant human coagulation factor VIII of human origin: human cell line and manufacturing characteristics. *Eur. J. Haematol.* 2012; 89(2): 165–76.
- Kessler C., Oldenburg J., Escuriola Ettingshausen C., Tiede A., Khair K., Negrier C., Klamroth R. Spotlight on the human factor: building a foundation for the future of haemophilia A management: report from a symposium on human recombinant FVIII at the World Federation of Hemophilia World Congress, Melbourne, Australia on 12 May 2014. *Haemophilia.* 2015; 21(Suppl. 1): 1–12. doi: 10.1111/hat.12582.
- Coyle T.E., Reding M.T., Lin J.C., Michaels L.A., Shah A., Powell J. Phase I study of BAY 94-9027, a PEGylated B-domain-deleted recombinant factor VIII with an extended half-life, in subjects with hemophilia A. *J. Thromb. Haemost.* 2014; 12(4): 488–96.
- Lillicrap D. Extending half-life in coagulation factors: where do we stand? *Thromb. Res.* 2008; 122(Suppl. 4): 2–8. doi: 10.1016/S0049-3848(08)70027-6.
- George L.A., Camire R.M. Profile of efralotocog alfa and its potential in the treatment of hemophilia A. *J. Blood Med.* 2015; 6: 131–41. doi: 10.2147/JBM.S54632.
- Negrier C., Knobe K., Tiede A., Giangrande P., Moss J. Enhanced pharmacokinetic properties of a glycoPEGylated recombinant factor IX: a first human dose trial in patients with hemophilia B. *Blood.* 2011; 118(10): 2695–701.
- Krippendorff B.F., Kuester K., Kloft C., Huisinga W. Nonlinear pharmacokinetics of therapeutic proteins resulting from receptor mediated endocytosis. *J. Pharmacokinet. Pharmacodyn.* 2009; 36(3): 239–60.
- Xu X., Vugmeyster Y. Challenges and opportunities in absorption, distribution, metabolism, and excretion studies of therapeutic biologics. *AAPS J.* 2012; 14(4): 781–91. doi: 10.1208/s12248-012-9388-8.
- Deng R., Loyet K.M., Lien S., Iyer S., De Forge L.E., Theil F.P., et al. Pharmacokinetics of humanized monoclonal anti-tumor necrosis factor- α antibody and its neonatal Fc receptor variants in mice and cynomolgus monkeys. *Drug Metab. Dispos.* 2010; 38(4): 600–5.
- Dall'Acqua W.F., Kiener P.A., Wu H. Properties of human IgG1s engineered for enhanced binding to the neonatal Fc receptor (FcRn). *J. Biol. Chem.* 2006; 281(33): 23514–24.
- Sarav M., Wang Y., Hack B.K., Chang A., Jensen M., Bao L., Quigg R.J. Renal FcRn reclaims albumin but facilitates elimination of IgG. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2009; 20(9): 1941–52.
- Lei T.C., Scott D.W. Induction of tolerance to factor VIII inhibitors by gene therapy with immunodominant A2 and C2 domains presented by B cells as Ig fusion proteins. *Blood.* 2005; 105(12): 4865–70.
- De Groot A.S., Moise L., McMurry J.A., Wambre E., Van Overvelt L., Moingeon P., et al. Activation of natural regulatory T cells by IgG Fc-derived peptide “Tregitopes”. *Blood.* 2008; 112(8): 3303–11.
- Young G., Mahlangu J.N., Kulkarni R., Nolan B., Liesner R., Pasi J., et al. Safety, efficacy, and pharmacokinetics of recombinant factor VIII Fc fusion protein (rFVIII-Fc) in previously-treated children with severe hemophilia A (Kids-ALONG). Presented at: 56th Annual Meeting and Exposition, December 17, 2014, San Francisco, CA. Available: <https://ash.confex.com/ash/2014/webprogram/Paper70146.html>. Accessed February 10, 2015.
- Hoots W.K. Urgent inhibitor issues: targets for expanded research. *Haemophilia.* 2006; 12(6): 107–13.
- Metzner H.J., Pipe S.W., Weimer T., Schulte S. Extending the pharmacokinetic half-life of coagulation factors by fusion to recombinant albumin. *Thromb. Haemost.* 2013; 110(5): 931–9.
- Golor G., Bensen-Kennedy D., Haffner S., Easton R., Jung K., Moises T., et al. Safety and pharmacokinetics of a recombinant fusion protein linking coagulation factor VIIa with albumin in healthy volunteers. *J. Thromb. Haemost.* 2013; 11(11): 1977–85. doi: 10.1111/jth.12409.
- Mathias M., Khair K., Hann I., Liesner R. Rituximab in the treatment of alloimmune factor VIII and IX antibodies in two children with severe haemophilia. *Br. J. Haematol.* 2004; 125(3): 366–8.
- Kitazawa T., Igawa T., Sampei Z., Muto A., Kojima T., Soeda T., et al. A bispecific antibody to factors IXa and X restores factor VIII hemostatic activity in a hemophilia A model. *Nat. Med.* 2012; 18(10): 1570–4.
- Muto A., Yoshihashi K., Takeda M., Kitazawa T., Soeda T., Igawa T., et al. Anti-factor IXa/X bispecific antibody (ACE910): hemostatic potency against ongoing bleeds in a hemophilia A model and the possibility of routine supplementation. *J. Thromb. Haemost.* 2014; 12(2): 206–13.
- Chowdary P., Lethagen S., Friedrich U., Brand B., Hay C., Abdul Karim A., et al. Safety and pharmacokinetics of anti-TFPI antibody (concizumab) in healthy volunteers and patients with hemophilia: a randomized first human dose trial. *J. Thromb. Haemost.* 2015; 13(5): 743–54. doi: 10.1111/jth.12864.
- Hilden I., Lauritzen B., Sorensen B.B., Clausen J.T., Jespersgaard C., Krogh B.O., et al. Hemostatic effect of a monoclonal antibody mAb 2021 blocking the interaction between FXa and TFPI in a rabbit hemophilia model. *Blood.* 2012; 119(24): 5871–8.
- Waters E.K., Genga R.M., Thomson H.A., Kurz J.C., Schaub R.G., Scheiffinger F., McGinness K.E. Aptamer BAX 499 mediates inhibition of tissue factor pathway inhibitor via interaction with multiple domains of the protein. *J. Thromb. Haemost.* 2013; 11(6): 1137–45.
- Gorczyca M.E., Nair S.C., Jilma B., Priya S., Male C., Reitter S., et al. Inhibition of tissue factor pathway inhibitor by the aptamer BAX499 improves clotting of hemophilic blood and plasma. *Thromb. Haemost.* 2012; 10(1): 1581–90.
- Sorensen B., Mant T., Akinc A. Aln-AT3 Investigators. A subcutaneously administered RNAi therapeutic (ALN-AT3) targeting antithrombin for treatment of hemophilia: interim Phase 1 study results in healthy volunteers and patients with hemophilia A or B. Presented at: 56th Annual Meeting and Exposition, December 17, 2014, San Francisco, CA. Available: <https://ash.confex.com/ash/2014/webprogram/Paper75077.html>. Accessed: Feb. 19, 2015.
- Jansen M., Schmaldienst S., Banyai S., Quehenberger P., Pabinger I., Delfler K., et al. Treatment of coagulation inhibitors with extracorporeal immunoadsorption (Ig-Therasorb). *Br. J. Haematol.* 2001; 112(1): 91–7.

38. Zeitler H., Ulrich-Merzenich G., Hess L., Konsek E., Unkrig C., Walger P., et al. Treatment of acquired hemophilia by the Bonn-Malmö Protocol: documentation of an in vivo immunomodulating concept. *Blood*. 2005; 105(6): 2287–93.
39. Berntorp E. Options for treating acute bleeds in addition to bypassing agents: extracorporeal immunoadsorption, FVIII/ FIX, desmopressin and antifibrinolytics. *Haemophilia*. 2006; 12(6): 62–6.
40. Nathwani A.C., Tuddenham E.G., Rangarajan S., Rosales C., McIntosh J., Linch D.C., et al. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N. Engl. J. Med.* 2011; 365(25): 2357–65. doi: 10.1056/NEJMoa1108046.
41. Nathwani A.C., Reiss U.M., Tuddenham E.G.D., Rosales C., Chowdhury P., McIntosh J., et al. Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *N. Engl. J. Med.* 2014; 371(21): 1994–2004.

Поступила 29.01.16
Принята к печати 22.11.16

КЛИНИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016
УДК 616.155.392.8-036.12-06-085

Власова Ю.Ю., Морозова Е.В., Смирнова А.Г., Гиндина Т.Л., Афанасьев Б.В.

КЛИНИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ КОМБИНАЦИИ ИНГИБИТОРОВ ТИРОЗИНКИНАЗЫ 2-ГО ПОКОЛЕНИЯ И 5-АЗАЦИТИДИНА В ТЕРАПИИ БОЛЬНОГО С МИЕЛОИДНЫМ БЛАСТНЫМ КРИЗОМ ХРОНИЧЕСКОГО МИЕЛОЛЕЙКОЗА

ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова»
Минздрава России, 197022, г. Санкт-Петербург, Россия

Несмотря на достигнутые успехи в эру ингибиторов тирозинкиназ, прогноз больных хроническим миелолейкозом с миелоидным бластным кризом остается неблагоприятным. Миелоидный бластный криз характеризуется рефрактерностью к цитотоксическим агентам и высоким риском рецидива. В статье представлены данные литературы об использовании гипометилирующих агентов в терапии миелоидного бластного криза хронического миелолейкоза, а также описание клинического случая успешной терапии больного хроническим миелолейкозом с миелоидным бластным кризом комбинацией ингибиторов тирозинкиназы 2-го поколения и 5-азацитидина.

Ключевые слова: хронический миелолейкоз; миелоидный бластный криз; 5-азацитидин.

Для цитирования: Власова Ю.Ю., Морозова Е.В., Смирнова А.Г., Гиндина Т.Л., Афанасьев Б.В. Клиническая эффективность комбинации ингибиторов тирозинкиназы 2-го поколения и 5-азацитидина в терапии больного с миелоидным бластным кризом хронического миелолейкоза. *Гематология и трансфузиология*. 2016; 61(4): 215-217. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0234-5730/2016-61-4-215-217>

Vlasova Yu.Yu., Morozova E.V., Smirnova A.G., Gindina T.L., Afanasiev B.V.

CLINICAL EFFICACY OF THE COMBINATION OF SECOND GENERATION TYROSINE KINASE INHIBITORS AND 5-AZACITIDINE IN THE TREATMENT OF CHRONIC MYELOID LEUKEMIA PATIENT IN MYELOID BLAST CRISIS

I.P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St.Petersburg, 197022, Russian Federation

Even in the tyrosine kinase inhibitors era, the prognosis of patients with chronic myeloid leukemia in myeloid blast crisis remains to be unfavorable. Myeloid blast crisis is characterized to be refractory to cytotoxic agents and high risk of recurrence. We described the patient with chronic myeloid leukemia in myeloid blast crisis who was successfully treated by the combination of the second generation tyrosine kinase inhibitor and 5-azacytidine.

Key words: chronic myelogenous leukemia; myeloid blast crisis; 5-azacytidine.

For citation: Vlasova Yu.Yu., Morozova E.V., Smirnova A.G., Gindina T.L., Afanasiev B.V. Clinical efficacy of the combination of second generation tyrosine kinase inhibitors and 5-azacytidine in the treatment of chronic myeloid leukemia patient in myeloid blast crisis. *Hematology and Transfusiology. Russian journal (Gematologiya i Transfuziologiya)*. 2016; 61(4): 215-217. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0234-5730/2016-61-4-215-217>

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.
Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Received 06 September 2016
Accepted 22 November 2016

Для корреспонденции:

Власова Юлия Юрьевна, врач-гематолог поликлинического отделения клиники «НИИ ДОГиТ им. Р.М. Горбачевой», ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П.Павлова» Минздрава России, 197022, г. Санкт-Петербург, Россия. E-mail: jj_vlasova@mail.ru

For correspondence:

Vlasova Yulia Yu., MD, doctor-hematologist of the outpatient department clinics of the I.P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University. St.Petersburg, 197022, Russian Federation. E-mail: jj_vlasova@mail.ru.

Information about authors:

Vlasova Yu.Yu., <http://orcid.org/0000-0002-7762-0107>; Morozova E.V., <http://orcid.org/0000-0002-0125-864X>; Smirnova A.V., <http://orcid.org/0000-0001-6559-6931>; Gindina T.L., <http://orcid.org/0000-0002-1302-3311>; Afanasiev B.V., <http://orcid.org/0000-0002-1235-4530>.