

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Интегрисане академске студије фармације

Г06 – Фармацеутска биотехнологија

РЕКОМБИНАНТНИ КРВНИ ПРОИЗВОДИ

11. НЕДЕЉА НАСТАВЕ

Летњи семестар 2022/2023. године

Крагујевац

Крвни производи

- Крв и препарати добијени из крви представљају значајну групу конвенционалних биолошких лекова.
- Пуна крв, концентрати еритроцита и тромбоцита, као и различити терапијски важни протеини крви (фактори коагулације и имуноглобулини) се и даље рутински користе у терапији, међутим поједини препарати крви добијају се и генским инжењерингом.

Хемостаза

- Крв има виталну улогу у организму, па постоје бројни процеси за одржавање хемостазе. Код људи постоје три главна механизма која учествују у процесу хемостазе:
 - Локална вазоконстрикција - своди на минимум даљи доток крви кроз то подручје;
 - Агрегација и накопљање тромбоцита - на месту крварења се ствара тромбоцитни чеп;
 - Индукција каскаде коагулације крви - растворљиви серумски протеин фибриноген се конвертује у нерастворљиви фибрин, а мономери фибрина се затим накопљају на месту оштећења, стварајући крвни угрушак (тромб).
- Ови механизми су ефикасни у лечењу повреда малих крвних судова (капилара и артериола), али су неефикасни код оштећења вена и артерија.

Процес коагулације

- Процес коагулације зависи од:
 - неколико макромолекулских кофактора и
 - различитих фактора коагулације који делују каскадно.
- Процес коагулације започиње кроз спољашње и унутрашње путеве који се покрећу оштећењем крвног суда тако што се на површини експримирају молекули са којима специфични протеини коагулације ступају у контакт. Крајњи (терминални) кораци оба пута коагулације су идентични.

Процес коагулације

- фактори коагулације

Ознака	Назив	Пут коагулације	Функција
I	Фибриноген	Оба	Након конверзије у фибрин, формира структурну основу тромба
II	Протромбин	Оба	Прекурсор тромбина, активира факторе I, V, VII, VIII и XIII
III	Ткивни фактор (тромбопластин)	Спољашњи	Додатни ткивни протеин који иницира спољашњи пут коагулације
IV	Јони калцијума	Оба	Неопходни за активацију фактора XIII и стабилизацију појединих фактора
V	Проакцелерин	Оба	Додатни протеин, повећава стопу активације фактора X
VII	Проконвертин	Спољашњи	Прекурсор конвертина (VIIa) који активира фактор X

- ❖ Фактори коагулације се обележавају римским бројевима и сви су протеини осим фактора IV, а већина се убраја у протеолитичке зимогене.
- ❖ Када су активирани, фактори се означавају додатком слова “a” након римског броја (нпр. фактор XIIa је активирани фактор XII).

Процес коагулације

- фактори коагулације

Ознака	Назив	Пут коагулације	Функција
VIII	Антихемофилијски фактор	Унутрашњи	Додатни протеин, повећава стопу активације фактора X
IX	<i>Christmas</i> фактор	Унутрашњи	Активирани фактор IX директно активира фактор X
X	Стјуарт-Поверов фактор	Оба	Фактор Xa конвертује протромбин у тромбин
XI	Прекурсор тромбопластина плазме	Унутрашњи	Фактор XIa активира фактор IX
XII	Хагеманов фактор	Унутрашњи	Активира се након површинског контакта или каликренин системом. Фактор XIIa помаже у иницирању унутрашњег пута.
XIII	Фактор стабилизације фибрина	Оба	Активирани фактор се умрежава са фибрином стварајући тврди угрушак.

Процес коагулације

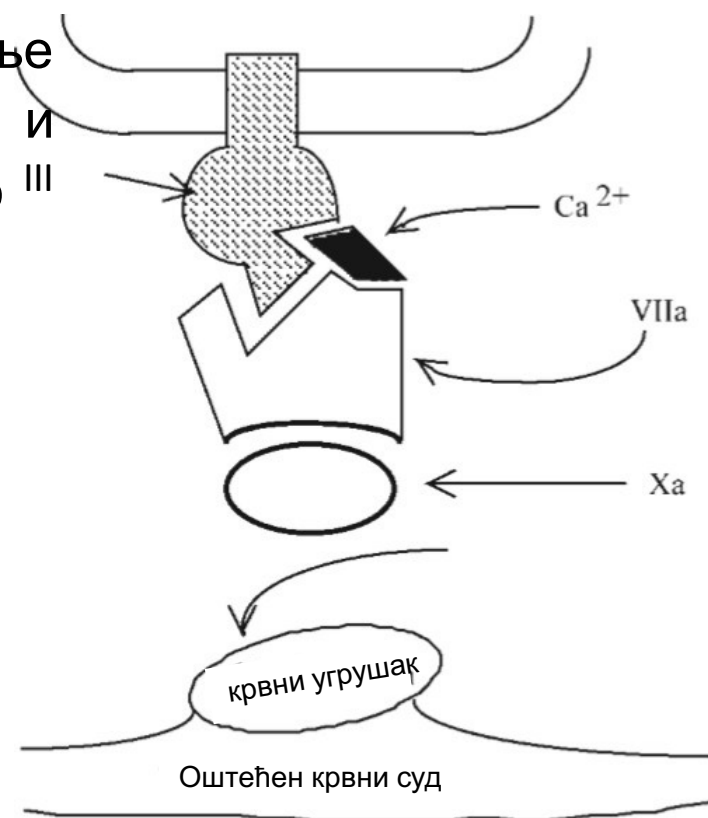
- спољашњи пут коагулације

- Фактор III (ткивни фактор) и фактор VII су карактеристични само за спољашњи пут коагулације.
 - Ткивни фактор је интегрални мембрански протеин присутан у великом броју различитих врста ткива (посебно у плућима и мозгу). Ослобађа се након руптуре крвног суда и на месту оштећења покреће каскаду спољашњег пута коагулације.
 - Фактор VII садржи бројне γ-карбоксиглутаматне остатке који имају есенцијалну улогу у везивању за јон Ca^{2+} .
- Коагулација је бржа када се покреће спољашњим путем.

Процес коагулације

- спољашњи пут коагулације

- 1) Спољашњи пут коагулације започиње интеракцијом фактора VII са Ca^{2+} и ткивним фактором, при чему долази до активације фактора VII.
- 2) Ткивни фактор, експримиран на месту повреде, заједно са фактором VIIa активира фактор X.
- 3) Фактор Xa остаје везан у комплексу са ткивним фактором и Ca^{2+} , при чему се на месту повреде формира угрушак.



Процес коагулације

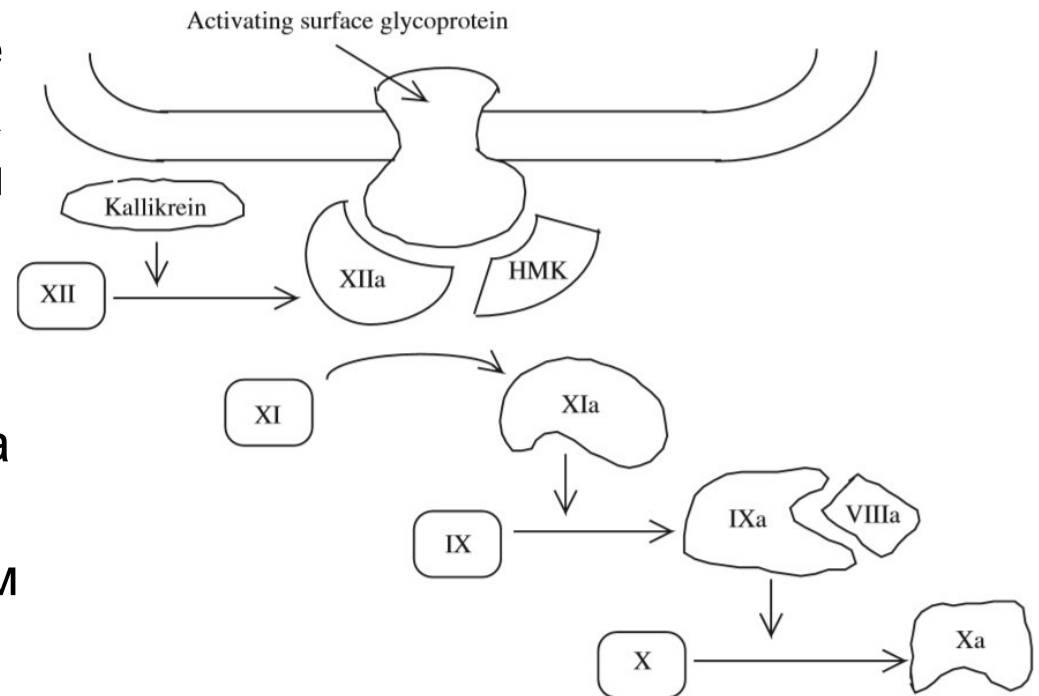
- унутрашњи пут коагулације

- У унутрашњи пут коагулације укључени су:
 - Фактори коагулације VIII, IX, XI и XII;
 - сви, сем фактора VIII су ендogene протеазе
 - прекаликреин, зимоген протеина каликреина од 88 kDa,
 - кининоген, гликопротеин плазме молекулске масе 150 kDa, који има функцију помоћног фактора.

Процес коагулације

- унутрашњи пут коагулације

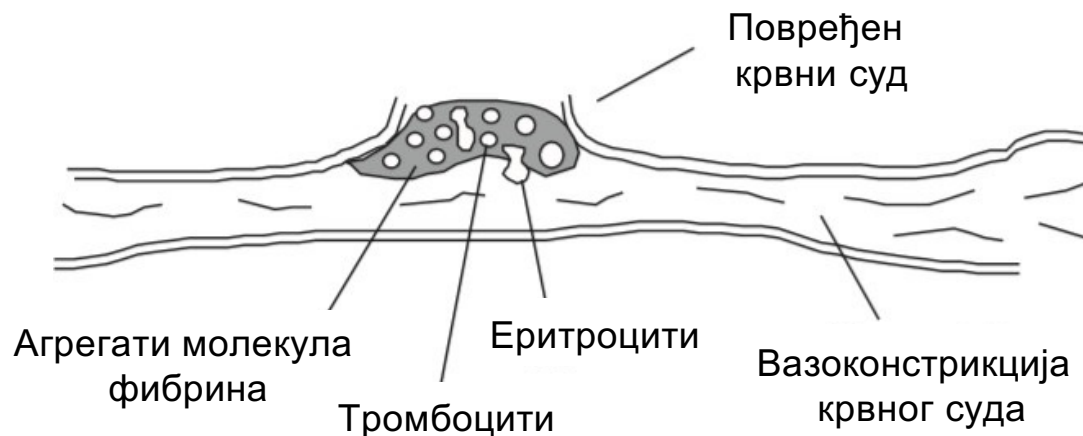
- 1) Унутрашњи пут коагулације се иницира активацијом фактора XII у присуству каликреина и кининогена.
- 2) Фактор XIIa се протеолитички одваја и активира фактор XI.
- 3) Фактор XIa, заузврат, активира фактор IX.
- 4) Фактор IXa се спаја са фактором VIIIa и активира фактор X.



Процес коагулације

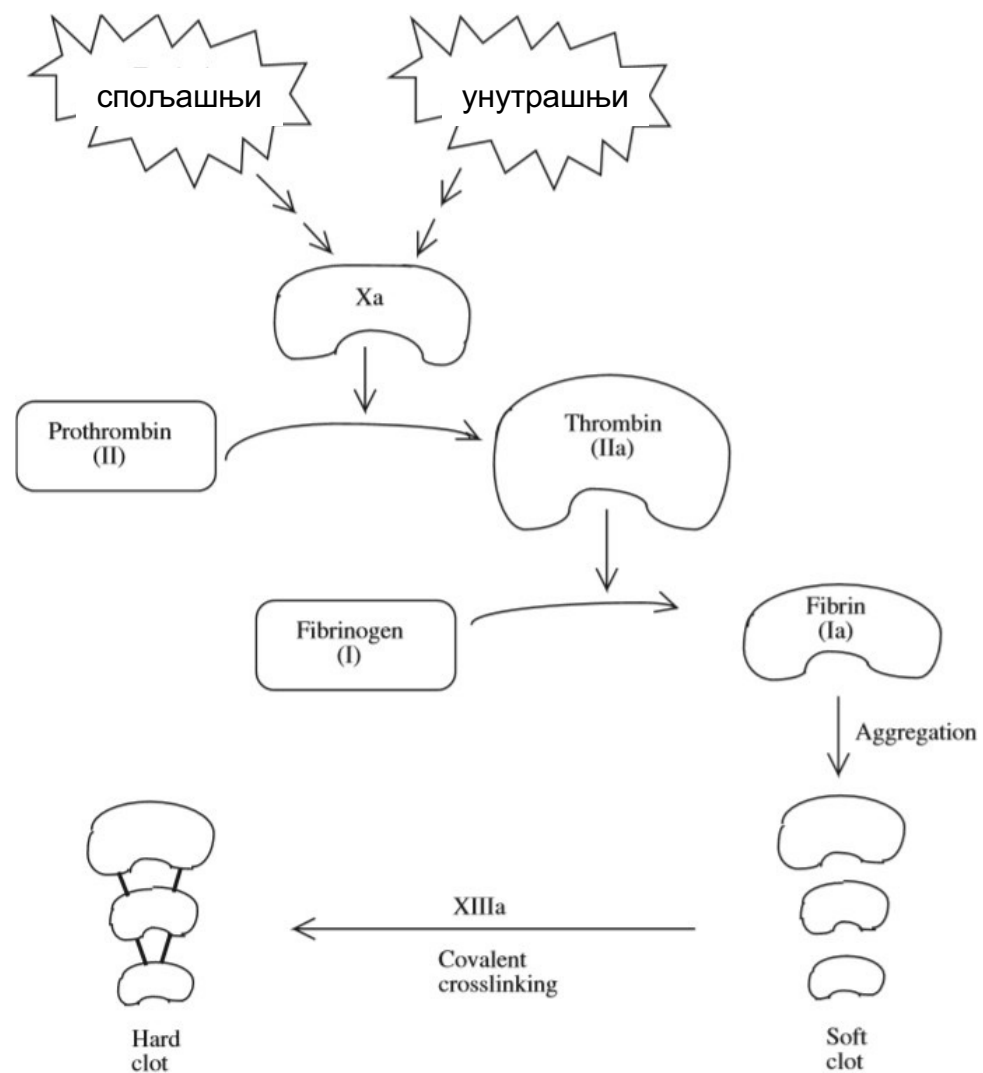
- терминални кораци

- У оба пута коагулације ствара се активирани фактор Ха, који катализује протеолитичку конверзију протромбина (фактор II) у тромбин (IIa).
- Тромбин катализује протеолитичку конверзију фибриногена (I) у фибрин (Ia). Појединачни молекули фибрина се накупљају и формирају меки угрушак.
- Фактор XIIIa катализује стварање ковалентних веза између појединих молекула фибрина, формирајући тврди угрушак.



Процес коагулације

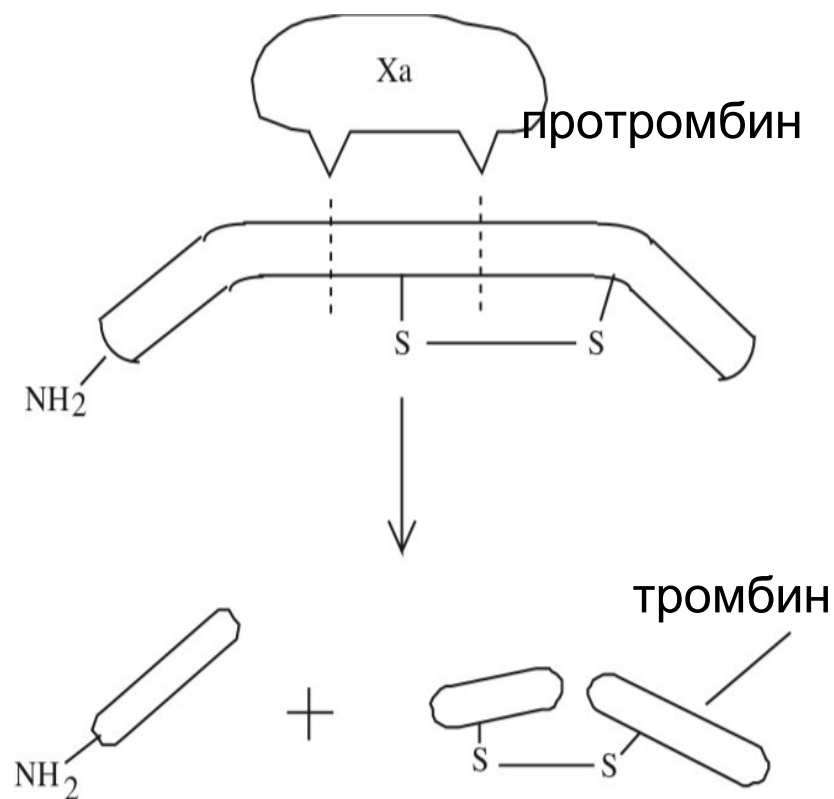
- терминални кораци



Процес коагулације

- терминални кораци

- Протромбин (фактор II) је гликопротеин састављен од 582 АК, молекулске масе 72,5 kDa и представља циркулишући зимоген тромбина (IIa). На N-терминусу садржи до шест γ -карбоксиглутаматних остатака преко којих везује неколико јона Ca^{2+} . Везивање Ca^{2+} олакшава везивање протромбина за фактор Ха на месту васкуларне повреде.
- Затим, комплекс фактора Ха протеолитички цепа протромбин на два места (Arg274-Thr275 и Arg323-Ile324), при чему настаје активни тромбин и неактивни фрагмент полипептида.



Процес коагулације

- терминални кораци

- Фибриноген (фактор I) је велики гликопротеин (340 kDa) који се састоји од две идентичне полипептидне јединице, састављене од α , β и γ подјединице. У N-терминусима фибриногена налазе се наелектрисане аминокиселине које репулзијом наелектрисања спречавају агрегацију појединачних молекула фибриногена.
- Тромбин, катализује протеолитичку активацију фибриногена и хидролизује њихове N-терминусе. Појединачни молекули фибрина су погоднији за агрегацију, па се на овај начин подстиче стварање меког угрушка који се стабилизује унакрсним ковалентним везама између појединих фибринских молекула.

Поремећаји коагулације

- Генски поремећаји попут недостатка експресије или измењене секвенце аминокиселина било ког фактора коагулације, могу имати озбиљне клиничке последице.
- Како би се поспешила коагулација, оба пута коагулације морају бити функционална. Инхибиција само једног од њих смањује способност коагулације, а као последица настају спонтане модрице и дуготрајна крварења која могу бити фатална.
- Постоје поремећаји готово свих фактора коагулације, осим ткивног фактора и Ca^{2+} .
- Најчешћи урођени поремећаји коагулације су:
 - недостатак фактора VIII (90%) и
 - недостатак фактора IX.

Поремећаји коагулације

- Поремећаји коагулације се најчешће лече применом концентрата одговарајућег фактора коагулације добијеног из пуне крви или применом пуне крви. Узимајући у обзир да оваква терапија носи ризик од настанка крвнопрениосивих обољења, нарочито хепатитиса и АИДС-а, тежи се да се у ову сврху користе фактори коагулације крви произведени генским инжењерингом.

Поремећаји коагулације

- дефицит фактора коагулације VIII

- У циркулацији је најчешће присутан интактни фактор VIII (комплекс фактора VIII) који у унутрашњем путу коагулације повећава брзину активирања фактора IX.
- Састоји се од два различита генска производа фактора VIII и већег броја копија вон Вилебрандовог фактора (vWF). Његова молекулска маса износи 1 - 2 MDa, а око 15% чини угљенохидратни део.
- Фактор VIII је полипептид, а његов настанак је кодиран дугим геном (289 kb). Транскрипцијом и обрадом иРНК настаје краћа иРНК која кодира настанак протеина молекулске масе 300 kDa. Након синтезе, овај полипептидни прекурсор се протеолитички обрађује и настају аминокиселински терминални и карбоксилни терминални полипептиди. Ови фрагменти се у присуству јона Ca^{2+} везују нековалентно при чему настаје зрели фактор VIII (VIII:C).

Поремећаји коагулације

- дефицит фактора коагулације VIII

- Зрели фактор VIII се затим ослобађа у плазму где се повезује са више копија vWF формирајући биолошки активни комплекс фактора VIII. vWF штити фактор VIII од протеолитичке разградње у плазми и на месту оштећења крвног суда се повезује са тромбоцитима и усмерава комплекс фактора VIII у положај који му омогућава да учествује у каскади коагулације.
- Хемофилија А (класична хемофилија, хемофилија) је коагулопатија која настаје услед недостатка или смањених нивоа комплекса фактора VIII. Наслеђује се рецесивно, геном који се налази на X хромозому.
- Вон Вилебрандова болест је сродни поремећај, такође изазван дефектом комплекса фактора VIII. Код особа оболелих од ове болести недостају обе компоненте зрелог комплекса фактора VIII.

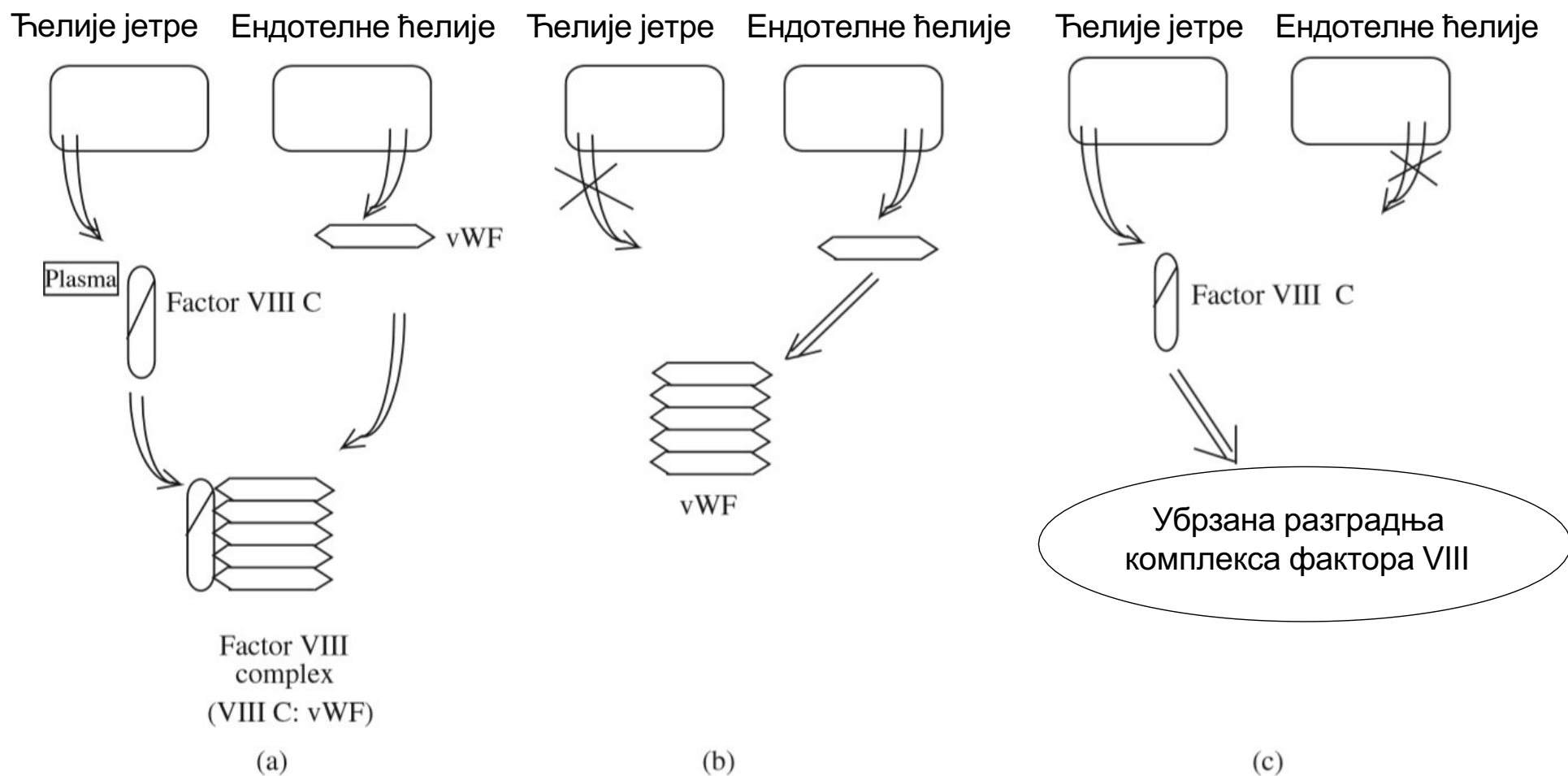
Поремећаји коагулације

- дефицит фактора коагулације VIII

- Тежина болести првенствено зависи од нивоа произведеног комплекса интактног фактора VIII.
 - Када се комплекс фактора VIII не синтетише, или је $<1\%$ од физиолошких вредности, пацијенти имају честа, тешка и спонтана крварења.
 - Када су вредности комплекса фактора VIII $\geq 5\%$ од физиолошких нивоа комплекса, пацијенти имају лакше симптоме.
- Терапијски режими су различити и у најтежим случајевима захтевају да пацијенти једном недељно током целог живота, примењују комплекс фактора VIII који је пречишћен из крви донора или добијен генским инжењерингом.

Поремећаји коагулације

- дефицит фактора коагулације VIII



Синтеза комплекса фактора VIII (a) код здравих појединаца, (b) код особа оболелих од хемофилије А, (c) код особа оболелих од вон Вилебрандове болести.

Производња фактора коагулације VIII

- нативни препарат

- Нативни фактор VIII се конвенционално добија пречишћавањем из крви донора, при чему се користе различити поступци фракционисања (најчешће преципитација) и хроматографског пречишћавања.
- Финални производ се стерилише филтрацијом и пакује у контејнере. Производ се затим лиофилизира, а контејнери се херметички затварају под вакуумом или се пре затварања пуне инертним гасом (нпр. азотом). Производ не садржи конзервансе.
- Леофилизирани производ се, до употребе чува на температури 2-8° С.

Производња фактора коагулације VIII

- нативни препарат

- Имуноафинитетна хроматографија се од 1988. године рутински користи у производњи фактора VIII јер њена висока биоселективност омогућава да се једним кораком добије неколико хиљада пута пречишћенији фактор.
- Поред имуноафинитетне хроматографије, производи углавном подлежу и додатним корацима за уклањање/инактивацију вируса.
 - Сиров производ се загрева до 10 h на 60°C и третира растварачем или разблаженим детерџентом пре хроматографије.

Производња фактора коагулације VIII

- рекомбинантни препарат

- Захваљујући комплементарној ДНК која кодира хумани фактор VIII, рекомбинантни препарати се производе коришћењем CHO, BHK, мишјих туморских и других ћелијских линија.
- На овај начин добија се производ који садржи само VIII:C (недостаје vWF).
 - Рекомбинантни VIII:C везује плазма vWF истим афинитетом као и нативни VIII:C.
- Да би се инаktivирале све потенцијално присутне вирусне честице, рекомбинантни фактор VIII се третира разблаженим детерџентом.
 - Разлике у особинама рекомбинантних и нативних производа готово да не постоје.

Производња фактора коагулације VIII

- рекомбинантни препарат

- Код појединих пацијената са хемофилијом А развија се имунска реакција на унети фактор VIII:C, без обзира на његов извор, па VIII:C производ мора да се примењује у вишим терапијским дозама. У тежим случајевима, производ може постати чак и неефикасан, па се тада:
 - трансфузијом мења целокупна крв, па су одређени временски период антифактор VIII:C антитела снижена;
 - директно примењује фактор Ха и на овај начин се заобилази нефункционални корак у коагулацији;
 - примењују високе дозе смеше фактора коагулације II, VII, IX и X, (ефикасност око 50%);
 - примењује фактор VIIa;
 - примењује фактор VIII свињског порекла, који може реаговати са антителима створеним на хумани фактор VIIIa (имунски систем производи антитела и за фактор коагулације свиње);
 - истовремено примењују фактор VIII и имуносупресиви.

Производња фактора коагулације VIII

- рекомбинантни препарат

- Пречишћавање финалног производа рекомбинантног фактора VIII:C је неопходно јер присутне нечистоће нису хуманог порекла, па су имуногене код људи. Извори таквих нечистоћа су:
 - ћелија домаћина – додатни протеини;
 - медијум у коме се налазе културе анималних ћелија;
 - антитела из имуноафинитетне колоне.
- Није довољно обезбедити одсуство контаминирајућих протеина, већ је неопходно отклонити и друге потенцијалне нечистоће, посебно ДНК (ДНК добијена из ћелијских линија домаћина може садржати онкогене).
- Модификовани облици VIII:C са додатним бенефитним карактеристикама се развијају мутацијама гена, али треба имати на уму да свака промена примарне секвенце молекула носи ризик од настанка имуногеног молекула.

Поремећаји коагулације

- дефицит фактора коагулације IX

- Особе са недостатком фактора IX развијају хемофилију Б, познату и као Божићна (*Christmas*) болест. Иако су клиничке последице врло сличне дефициту фактора VIII, инциденца ове болести је много мања.
- Особе које болују од хемофилије Б лече се *i.v.* применом концентрата фактора IX који се конвенционално добијају фракционисањем хумане крви. Међутим, постоји и рекомбинантни фактор IX који се производи у инжењерисаним CHO ћелијским линијама.

Производња фактора коагулације IX

- нативни препарат

- Препарат фактора IX добијен из крви донора садржи ниске нивое фактора II, VII и X, и користи се за лечење поремећаја коагулације изазване недостатком ових фактора.
- Препарат фактора IX се може пречистити имуноафинитетном хроматографијом и коришћењем имобилисаних анти-IX мишјих моноклонских антитела.
 - Пречишћавање имобилисаним анти-IX мишјим моноклонским антителима, подразумева употребу најмање једног моноклонског антитела које је специфично само за фактор IX који садржи претходно везани Ca^{2+} . Имобилизација овог антитела омогућава развој имуноафинитетног система у коме се фактор IX у присуству пуфера који садржи Ca^{2+} везује за колону. Елуација се убрзава једноставним увођењем хелатног средства (нпр. EDTA) у пуфер за елуацију.

Производња фактора коагулације IX

- рекомбинантни препарат

- Рекомбинантни фактор IX - нонаког алфа (*BeneFix*®) је 1997. године одобрен за клиничку примену код пацијената са хемофилијом Б.
- Овај једноланчани протеин молекулске масе 55 kDa има идентичну аминокиселинску секвенцу и релативно сличан профил посттранслационе модификације као нативни фактор IX. Производи се у СНО ћелијској линији и пречишћава до хомогености вишеструким хроматографским корацима, ултрафилтрацијом и дијафилтрацијом.
- Финални производ је лиофилизован, примењује се *i.v.*, а као нежељене ефекте може да изазове главобољу, грозницу и мучнину.

Производња фактора коагулације IX

- рекомбинантни препарат

- Синтетисан је и ефтренонаког алфа (rFIXFc) који представља рекомбинантни мономерни фузионисани протеин састављен од једног молекула фактора IX ковалентно фузионисаног са хуманим Fc фрагментом IgG1 антитела.
- Овај препарат је одобрен за клиничку примену од стране FDA 2014. године, а касније 2016. и од стране Европске агенције за лекове (*Alprolix*[®])
- Производи се рекомбинантном ДНК технологијом коришћењем хумане ембрионске ћелијске линије бубрега (*HEK293H*)
- Захваљујући ковалентно везаном Fc домену продужава се време полуетиминације лека, а самим тим и дејство лека и терапијска ефикасност.

Производња фактора коагулације VIIa

- Око 5 - 25% особа оболелих од хемофилије А развија антитела против фактора VIII, а 3 - 6% оболелих од хемофилије Б развија антитела против фактора IX. Код ових пацијената индикована је примена фактора VIIa јер он директно активира крајње кораке у каскади коагулације, независно од фактора VIII или IX.
- Фактор VIIa формира комплекс са ткивним фактором који у присуству фосфолипида и Ca^{2+} активира фактор X.

Производња фактора коагулације VIIa

- рекомбинантни препарат

- Рекомбинантни облик фактора VIIa – активирани ептаког алфа (NovoSeven®) се производи у ВНК ћелијској линији, а финални производ се разликује од нативног молекула само по начину гликозилације.
- Примарно се производи као неактивирани једноланчани полипептид од 406 АК, који се затим протеолитички деградира у дволанчани комплекс активног фактора VIIa.
- Пречишћавање подразумева употребу имуноафинитетне хроматографије.
- Након стерилизације филтрацијом, финални производ се асептично пуни у контејнере и лиофилизира.

Производња фактора коагулације XIII

- нативни препарат

- Веома ретко се дешава изостанак производње фактора XIII. Недостатак овог фактора смањује ефикасност коагулације код оболелих особа. Наиме, ковалентне везе које карактеришу трансформацију меког угрушка у тврди угрушак се не формирају.
- За лечење недостатка фактора XIII, примењују се препарати делимично пречишћени из хумане крви.
- Фактор коагулације XIII представља хетеротетрамерни зимоген који се састоји од две А- и две Б-подјединице. А-подјединица садржи активно место ензима и активациони пептид (37 АК), док Б-подјединице имају функцију носача хидрофобних А-подјединица кроз крвну плазму.
- Активација фактора XIII се дешава након дисоцијације активационог пептида А-подјединице под дејством тромбина и одвајањем Б-подјединица под дејством фибрина и Ca^{2+} , при чему настаје каталитички активан A_2 димер.

Производња фактора коагулације XIII

- рекомбинантни препарат

- Први рекомбинантни препарат фактора коагулације XIII одобрен је 2013. године за лечење конгениталне дефицијенције фактора коагулације XIII.
- Катридекаког - rhXIII A2 - подјединица (*Tretten®*) производи се трансгеном експресијом секвенце која кодира само А подјединицу фактора XIII у *S. cerevisiae*.
- Формулише се у облику лиофилизата, примењује се интравенски и чува на температури 2-8°C.

Фактори коагулације

- регистровани за клиничку примену у Р. Србији

Генерички назив	Заштићен назив	Експресиони систем	Индикације	Формулација
Хумани фактор коагулације IX	<i>Aimafix</i> <i>Haemonine</i> <i>Immunine</i> <i>Octanine F</i>	Хумана плазма	Хемофилија Б	Прашак и растварач за раств. за инф.
Хумани фактор коагулације VIII	<i>Beriate</i> <i>Emoclot</i> <i>Haemostin</i> <i>SDH</i> <i>Koate-DVI</i> <i>Octanate</i>	Хумана плазма	Хемофилија А	Прашак и растварач за раств. за инф. /i.v. инј.
Хумани фактор коагулације VIII + хумани вон Вилебрандов фактор	<i>Fanhdi</i> <i>Haemate O</i> <i>Immunate</i> <i>Wilate</i>	Хумана плазма	Хемофилија А, вон Вилебрандова болест	Прашак и растварач (у шприцу) за раств. за i.v. инј.
Хумани протромбински комплекс	<i>Octaplex</i>	Хумана плазма	Терапија крварења, Преоперативна профилактика код особа са поремећајима коагулације	Прашак и растварач за инфу.

Фактори коагулације

- регистровани за клиничку примену у Р. Србији

Генерички назив	Заштићен назив	Експресиони систем	Индикације	Формулација
Октоког алфа (hVIII)	<i>Advate Recombinate</i>	<i>CHO ВНК</i>	Хемофилија А	Прашак и растварач за инфу./инј.
Туроктоког алфа (rhVIII)	<i>NovoEight</i>	<i>CHO</i>	Хемофилија А	Прашак за раствор за инј. и растварач у шприцу
Туроктоког алфа пегол (rhVIII)	<i>Esperoct</i>	<i>CHO</i>	Хемофилија А	Прашак за раствор за инј. и растварач у шприцу
Мороктоког алфа (rhVIII)	<i>Refacto AF</i>	<i>CHO</i>	Хемофилија А	Прашак и растварач за раств. за инфу.
Симоктоког алфа (rhVIII)	<i>Nuwiq</i>	<i>Ћелије бубрега хуманог ембриона</i>	Хемофилија А	Прашак за раствор за инј. и растварач у шприцу

Фактори коагулације

- регистровани за клиничку примену у Р. Србији

Генерички назив	Заштићен назив	Експресиони систем	Индикације	Формулација
Антиинхибитор- ски комплекс фактора VIII	<i>Feiba NF</i>	<i>Хумана плазма</i>	Профилактика и терапија крварења код болесника са хемофилијом А и Б	Прашак и растварач за раств. за инфу.
Ептаког алфа активирани (rVIIa)	<i>NovoSeven</i>	<i>ВНК</i>	Крварења и хирушке интервенције код болесника који имају антитела на факторе VIII и IX	Прашак за раствор за инј. и растварач у шприцу.
Нонаког алфа (rIX)	<i>BeneFix</i>	<i>CHO</i>	Профилактика и терапија крварења код болесника са хемофилијом Б, стечени недостатак фактора IX	Прашак за раствор за инј. и растварач у шприцу
Нонаког бета пегол (rIX)	<i>Refixia</i>	<i>CHO</i>	Профилактика и терапија крварења код болесника са хемофилијом Б, стечени недостатак фактора IX	Прашак за раствор за инј. и растварач у шприцу

Антикоагуланси

- Иако је стварање крвних угрушака од суштинског значаја за одржавање хемостазе, неадекватна коагулација може довести до озбиљних, понекад фаталних стања. Тромб који се формира унутар крвних судова, делимично или у потпуности опструира проток крви и кисеоника до ткива. Емболијом настаје инфаркт миокарда, мождани удар и друга животно угрожавајућа стања.
- Антикоагуланси су супстанце које спречавају згрушавање крви и терапијски су значајни када постоји висок ризик од тромбозе. Често се примењују код пацијената са коронарном болешћу или у циљу секундарне превенције код пацијената који су доживели срчани или мождани удар.

Антикоагуланси

Антикоагуланс	Структура	Извор	Mr (Da)
Хепарин	Гликозаминогликан	Плућа говечета, гастрична мукоза свиње	3000 - 40000
Дикумарол	Кумарин	Хемијска синтеза	336,3
Варфарин	Кумарин	Хемијска синтеза	308,4
Хирудин	Полипептид	Пљувачка пијавице, рДНК	7000
Анкрод	Полипептид	Отров змије, рДНК	35000
Протеин С	Гликопротеин	Хумана плазма	62000

Антикоагуланси

- хепарин

- Хепарин је угљенохидратни антикоагуланс (гликозаминогликан) присутан у многим ткивима, посебно у ендотелу крвних судова.
- Након што доспе у крвоток, хепарин се везује за антитромбин и активира га. Комплекс хепарин-антитромбин везује бројне активирани факторе коагулације (IIa, IXa, Xa, XIa и XIIa) и инактивира их. Хепарин се потом одваја од комплекса и комбинује са наредним антитромбином, чиме се иницира други круг овог циклуса инхибиције.
- Првобитно је екстрахован из јетре, али се данас добија екстракцијом из плућа говечета или гастричне мукозе свиња.
- Иако је ефикасан и финансијски исплатив, има и недостатке:
 - потребна је примена кофактора (антитромбин III),
 - непредвидив дозни одговор.

Антикоагуланси

- антиметаболити витамина K

- Антиметаболити витамина K, дикумарол и варфарин, су антикоагуланси сродни кумарину који се примењују перорално.
- Антикоагулантни ефекат остварују спречавањем γ -карбоксилације фактора коагулације (специфични фактори II, VII, IX и X) зависних од витамина K.
- Након почетне синтезе ових фактора коагулације у јетри, деловањем специфичних карбоксилаза долази до γ -карбоксилације неколико остатака глутамата. Ова посттранслациона модификација је потребна да би ови фактори могли да вежу Ca^{2+} јоне и ефикасно функционисали.

Антикоагуланси

- антиметаболити витамина К

- За функционисање ензима карбоксилазе неопходно је присуство кофактора, витамина К. Заменом витамина К антиметаболитом дикумаролом, инаktivира се карбоксилаза и стварају се неактивни фактори крви који ометају функционисање коагулације.
- Једина озбиљна нежељена реакција ових антикоагуланаса је продужено крварење, па се дозирање спроводи индивидуално.

Антикоагуланси - *хирудин*

- Хирудин је антикоагуланс изолован из пијавица, који директно инхибира тромбин. Пијавице у пљувачци садрже супстанце које специфично инхибирају неки од елемената система коагулације крви, па након уједа могу да изазову продужено крварење.

Полипептид	Mr (Da)	Произвођач	Хемостатски ефекат
Хирудин	7000	<i>Hirudo medicinalis</i>	Везује се за тромбин и инхибира га
Роднин	11100	<i>Rhodnius prolixus</i>	Везује се за тромбин и инхибира га
Антистатин	15000	<i>Haementeria officinalis</i>	Инхибира фактор Ха
Антикоагулантни пептид крпеља (ТАР)	6800	<i>Ornithodoros moubata</i>	Инхибира фактор Ха
Калин	55000	<i>Hirudo medicinalis</i>	Инхибира адхезију тромбоцита
Декорзин	4400	<i>Macrobdella decora</i>	Инхибира адхезију тромбоцита

Антикоагуланси

- *хирудин*

- Хирудин је кратак полипептид од 65 АК, молекулске масе 7000 Да изолован из пљувачке пијавица. На положају 63 налази се тирозин који у бочном ланцу садржи сулфатну групу и има два домена:
 - N-терминални - глобуларни, стабилизован са три дисулфидне везе,
 - C-терминални - дужи са високим садржајем АК киселог карактера.
- Поред његове кључне улоге у стварању фибринског угрушка, тромбин има и неколико других неензимских биолошких улога:
 - индукује активацију и агрегацију тромбоцита;
 - делује као хемоатрактант за моноците и неутрофиле;
 - стимулише ендотелни транспорт.

Антикоагуланси

- *хирудин*

- Хирудин делује као антикоагуланс јер инаktivира тромбин након што се чврсто веже за њега. С-терминални регион хирудина се прво везује за површину тромбина, што доводи до конформационих промена ензима и олакшава да се N-терминална регија високим афинитетом веже за активно место тромбина.
- Фрагменти хирудина могу да вежу тромбин, али инхибирају само неке од његових активности (нпр. само каталитичка активност тромбина).

Антикоагуланси

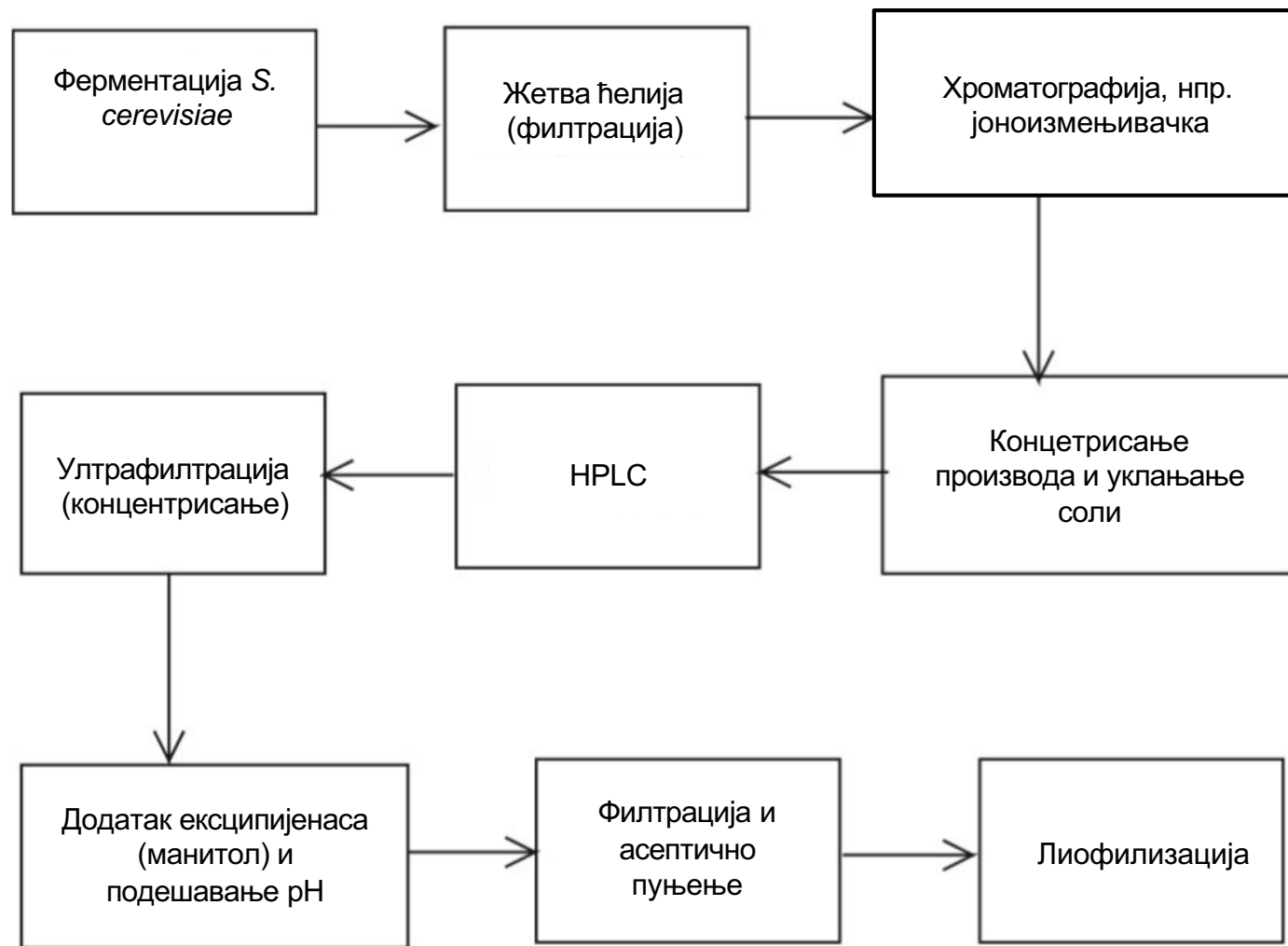
- *хирудин*

- Хирудин, као антикоагуланс има неколико предности:
 - делује директно на тромбин;
 - не захтева кофактор;
 - инциденца крварења је мања него код других антикоагуланаса;
 - слабо је имуноген.
- Иако је терапијски потенцијал хирудина познат годинама, у веома малим количинама се изолује из извора.
- Ген хирудина је клониран '80-их година, а потом је експримиран у великом броју рекомбинантних система (*E. coli*, *Bacillus subtilis* и *S. cerevisiae*).

Антикоагуланси

- лепирудин, десирудин

- Рекомбинантни хирудин, лепирудин (*Refludan*®) први пут је одобрен за клиничку употребу 1997. године, а данас постоји и десирудин (*Revasc*®, *Ipprivask*®) произведен у *S. cerevisiae*.
- Аминокиселинска секвенца лепирудина се од нативног хирудина разликује у:
 - прве две АК - два валина су замењена леуцином и треонином,
 - недостатку сулфатне групе на тирозину у позицији 63.
- Десирудин се разликује од хирудина само одсуству сулфатне групе на тирозину у позицији 63.
- Финални производ се формулише као лиофилизат, има рок трајања две године када се чува на собној температури, а непосредно пре *i.v.* примене се реконституише физиолошким раствором или водом за инјекције.



Схематски приказ производње лепирудина
Refludan[®] (рекомбинантни хирудин)

Антикоагуланси

- *антитромбин*

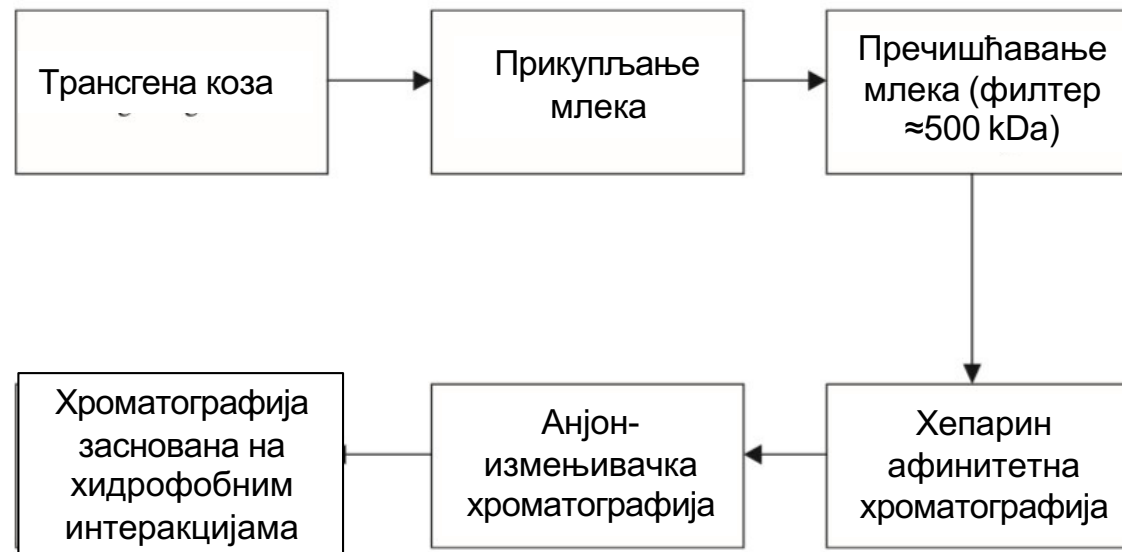
- Антитромбин је најчешћи природни инхибитор коагулације. Овај једноланчани гликопротеин је састављен од 432 АК, молекулске масе 58 kDa и има четири места за N-гликозилацију преко којих су везани олигосахаридни бочни ланци. Присутан је у плазми у концентрацији 150 µg/ml и снажан је инхибитор тромбина (директна инхибиција, 1:1), као и фактора IXa и Xa.
- Антитромбински концентрати добијени из плазме се користе у медицинске сврхе од '80-их година, за лечење наследног и стеченог антитромбинског дефицита, као и постпарталних тромбоемболијских догађаја.

.

Антикоагуланси

- *анти тромбин алфа*

Рекомбинантни анти тромбин - анти тромбин алфа (*Atrin*[®]) је добијен коришћењем трансгених коза и одобрен је за клиничку употребу 2006. године. Рекомбинантни производ има идентичну аминокиселинску секвенцу као и нативни хумани анти тромбин, али се олигосахаридни састав делимично разликује у односу на анти тромбин добијен из плазме, што доводи до повећаног афинитета према хепарину.



Схематски приказ производње и пречишћавања анти тромбина из млека трансгених коза. Пречишћавањем се постиже укупни принос производа >50%, са чистоћом >99%.

Антикоагуланси

- *дротрекогин алфа*

- Дротрекогин алфа (*Xigiris*®) је рекомбинантни хумани активирани протеин C, који има важну улогу у контроли коагулације, инхибицијом фактора коагулације V и VIII.
- Производи се у инжењерисаним хуманим ћелијским линијама бубрега (*human kidney cell line 293*) и карактерише га присуство неколико γ -карбоксиглутамата и β -хидроксилираних остатака.
- То је гликопротеински молекул молекулске масе 55 kDa, а састоји се из једног лаког и једног тешког ланца, међусобно повезаним дисулфидним везама.
- Иако се користио за лечење тешке сепсе, повучен је са тржишта након што је доказано да не побољшава исходе сепсе.

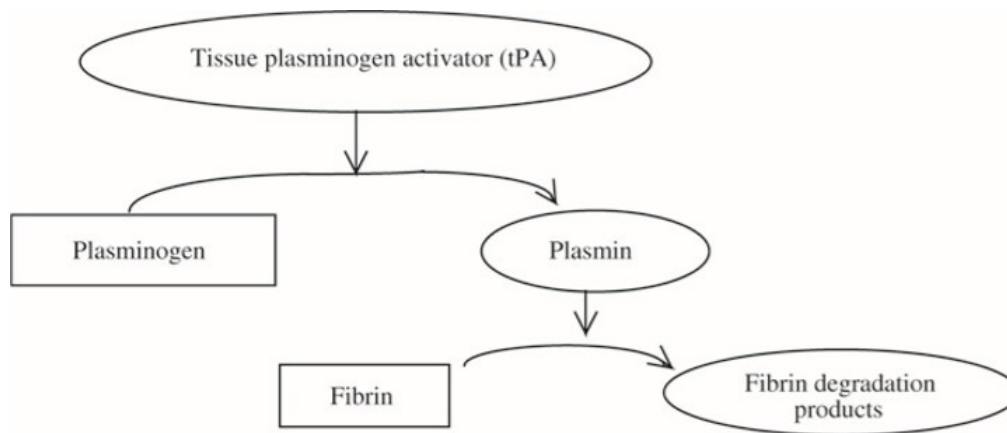
Тромболитици

- Процес тромбозе има за циљ да „затвори” оштећени крвни суд и на тај начин одржава хемостазу док се оштећени суд „не опорави”. Након опоравка, угрушак се уклања ензимским деградационим процесом, фибринолизом која зависи од серинске протеазе плазмينا, који разграђује фибринске нити присутне у угрушку.
- Када неадекватно стварање угрушка блокира крвни суд, настаје оштећење ткива, а степен оштећења зависи од дужине блокираног протока. Брзим уклањањем угрушка и применом тромболитика смањује се тежина оштећења ткива.

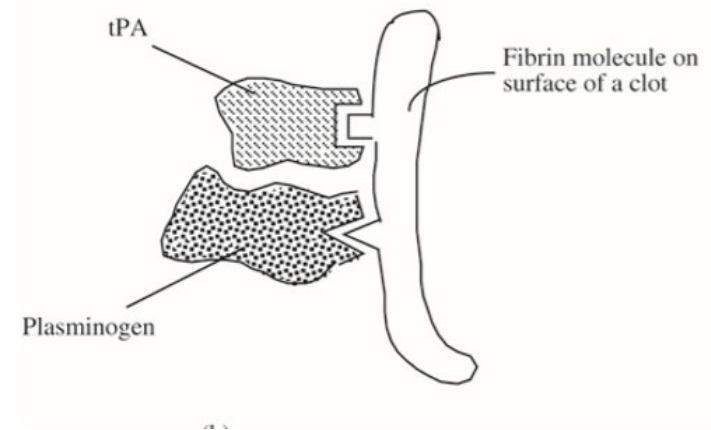
Тромболитици

- Плазмин је протеаза која катализује протеолитичку разградњу фибрина присутног у угрушцима и тиме ефикасно разграђује угрушак. Плазмин настаје из плазминогена, његовог циркулишућег зимогена.
- Плазминоген се синтетише и ослобађа из бубрега као једноланчани гликопротеин молекулске масе 90 kDa који је стабилизован са неколико дисулфидних веза.
- Фибринокиназа (*tPA*) је серинска протеаза састављена од 527 АК која представља најважнији физиолошки активатор плазминогена. Има четири потенцијална места гликозилације, од којих су три гликозилирана (остаци Asn 117, 184 и 448). Угљенохидратни остаци имају важну улогу у посредовању преузимања *tPA* у јетри и његовог уклањања из плазме.

Тромболиза



(a)



(б)

(a) процес тромболизе, у коме *tPA* протеолитички претвара зимоген плазминоген у активни плазмин, који заузврат деградира фибрин, и на тај начин раствара угрушак.

(б) *tPA* и плазминоген се везују за површину фибринског молекула на површини угрушка, обезбеђујући брзо и ефикасно активирање тромболизе

Ткивни активатор плазминогена

- Синтетише се претежно у васкуларним ендотелним ћелијама и има пет структурних домена који имају специфичну функцију.

<i>tPA</i> домени	Улога
F домен	Олакшава везивање <i>tPA</i> великим афинитетом за фибрин
R домен (домен протеазе)	Има специфичну протеолитичку активност на плазминоген
EGF домен (домен епидермалног фактора раста)	Везивање за хепатичке рецепторе, учествује у уклањању <i>tPA</i> из крви путем јетре
K ₁ домен	Учествује у везивању за хепатичке рецепторе
K ₂ домен	Учествује у стимулацији протеолитичке активности <i>tPA</i> деловањем фибрина

Ткивни активатор плазминогена

- Ткивни активатор плазминогена се у крви налази у два облика и оба имају фибринолитичку активност:
 - једноланчани полипептид (тип I *tPA*),
 - дволанчани (тип II), протеолитички добијен из једноланчаног молекула, претежно повезан са угрушцима који подлежу лизи.
- Фибрин садржи места везивања за плазминоген и *tPA*, чиме их доводи у непосредну близину и олакшава директно активирање плазминогена на површини угрушка.
- Процес активације потенциран је чињеницом да везивање *tPA* за фибрин:
 - (а) појачава накнадно везивање плазминогена;
 - (б) повећава активност *tPA* према плазминогену до 600 пута.

Ткивни активатор плазминогена

- Активирање тромболитичке каскаде настаје на површини угрушка, што је важно јер је специфичност плазмина за супстрат ниска. Циркулишући плазмин показује каталитички потенцијал у протеолизи фибриногена, фактора V и VIII.
- Иако растворљиви серумски *tPA* има мању активност према плазминогену, одређена количина слободно циркулишућег плазмина ипак настаје овом реакцијом. Међутим, циркулишући плазмин се брзо неутралише другим протеином плазме, α 2-антиплазмином (једноланчани гликопротеин од 70 kDa, који у односу 1:1 везује плазмин).
- Ризик од накнадних крварења се повећава када се не контролише концентрација циркулишућег плазмина.

Ткивни активатор плазминогена

- За разлику од слободног плазмина, плазмин на површини угрушка се споро инаktivира $\alpha 1$ -антиплазмином. Тромболитички систем има способност ауторегулације, што олакшава ефикасну деградацију угрушка уз минимално оштећење других елемената хемостазе.
- Иако је *tPA* први пут проучаван крајем '40-их година, његова детаљна карактеризација је била отежана јер се синтетише у веома малим количинама. Међутим, након открића да ћелијска линија *Bowes* меланома производи и лучи велике количине овог протеина, његово добијање је значајно олакшано.
- Постоје конвенционални и рекомбинантни препарати ткивног активатора плазминогена, а индиковани су код пацијената са акутним инфарктом миокарда, артеријском оклузијом, плућном емболијом и дубоком венском тромбозом.

Ткивни активатор плазминогена -стрептокиназа

- Препарати који се добијају конвенционалним техникама често садрже албумин јер спречава разградњу активног састојка након реконституције.
- **Стрептокиназа** је екстрацелуларни бактеријски протеин молекулске масе 48 kDa, производи га неколико сојева *Streptococcus haemolyticus* групе С. Његова способност да индукује лизу крвних угрушака је по први пут показана 1933. године.
- Ранији терапијски препарати често су изазивали имунолошке компликације изазване нечистоћама присутним у производима ткивних активатора плазминогена. Међутим, хроматографским пречишћавањем ови проблеми су спречени. Савремени препарати стрептокиназе се формулишу у облику лиофилизата.

Ткивни активатор плазминогена

-стрептокиназа

- Стрептокиназа се везује специфично и чврсто за плазминоген, индукују конформационе и чини плазминоген протеолитички активним. На овај начин, стрептокиназа-плазминоген комплекс катализује протеолитичку конверзију плазминогена до активног плазмина и индукује тромболитички ефекат.
- Хумани имунски систем стрептокиназу препознаје као антиген, па у неким случајевима примена стрептокиназе изазива алергијске реакције, најчешће благе осипе, а ретко озбиљније реакције, попут анафилактичког шока.

Ткивни активатор плазминогена

-стрептокиназа

- Други недостатак примене стрептокиназе је повећан ризик од крварења. Плазминоген активиран стрептокиназом лизира, не само фибриноген у угрушку, већ и слободни фибриноген у плазми, што може довести до смањења фибриногена у серуму и самим тим компромитовати способност хемостазе.
- Стрептокиназа се не примењује код пацијената са поремећајем коагулације или хроничним крварењем (улкус).

Ткивни активатор плазминогена

-урокиназа

- Способност одређене компоненте хуманог урина да раствара крвне угрушке по први пут је примећена 1885 године. Међутим, тек током 50-их година прошлог века, изолована је активна супстанца урокиназа.
- **Урокиназа** је серинска протеаза коју производи бубрег, налази се у плазми и урину. Способна је да протеолизом преведе плазминоген у плазмин. Постоје две форме ензима молекулске масе 33 и 54 kDa. Облик са мањом молекулском масом настаје протеолитичком разградњом ензима веће молекулске масе.
- Оба облика имају ензимску активност према плазминогену.
- Производ који се користи клинички садржи оба облика, при чему преовлађује форма са већом молекулском масом.

Ткивни активатор плазминогена -урокиназа

- Урокиназа се добија пречишћавањем директно из хуманог урина. Везује се за низ адсорбена, као што су силика гел и каолин (хидратисани алуминијум-силикат), који се користити за концентрисање и делимично пречишћавање производа. Такође, може да се концентрише и делимично пречисти таложењем помоћу натријум-хлорида, амонијум-сулфата или етанола.
- Додатна пречишћавања урокиназе подразумевају анјон-измењивачку хроматографију, гел-филтрацију и хроматографију засновану на хидроксиапатиту.
- Урокиназа је релативно стабилан молекул, активан после инкубације на 60° С током неколико сати или кратке инкубације при ниским (1) или високим (10) рН вредностима.

Ткивни активатор плазминогена

-урокиназа

- После пречишћавања, стерилне филтрације и асептичног пуњења хумана урокиназа се лиофилизира.
- Примењује се *i.v.* путем, а терапијски режим зависи од обољења и индивидуалних карактеристика пацијената.
- Због хуманог порекла, урокиназа ређе изазива имунски одговор од стрепокиназе.
- Урокиназа се може произвести рекомбинантном ДНК технологијом коришћењем хуманих ћелија бубрега.

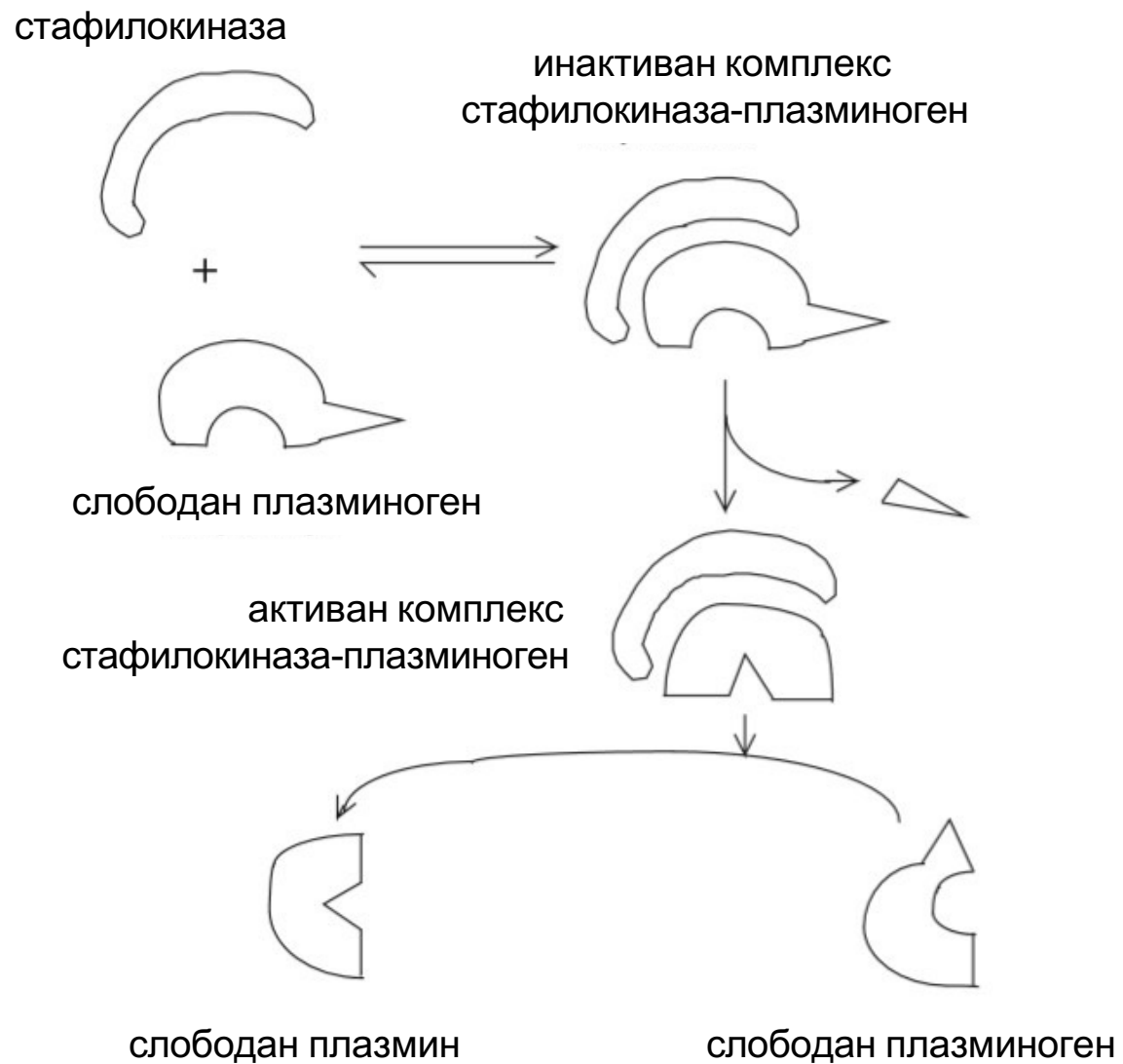
Ткивни активатор плазминогена

-стафилокиназа

- Стафилокиназа је протеин кога производе многи сојеви *S. aureus* и који има терапијски потенцијал као тромболитичко средство.
- Из природног извора се пречишћава комбинацијом таложења помоћу амонијум-сулфата и катјон-измењивачке хроматографије на карбоксиметил целулози, као и афинитетне хроматографије, код које је плазмин или плазминоген имобилисан на сефарозним куглицама.
- Зрели производ је полипептид, од 136 АК, молекулске масе око 16,5 kDa. Постоје и деривати мање молекулске масе код којих недостаје првих 6 или 10 аминокиселина на N-терминусу. Сва три имају сличне тромболитичке активности *in vitro*.

Ткивни активатор плазминогена -стафилокиназа

- Ген за стафилокиназу се клонира у *E. coli*, или у другим рекомбинантним системима. Протеин се у високим концентрацијама експримира интрацелуларно и представља 10 - 15% укупних ћелијских протеина.
- Може се пречистити директно из бистрог ћелијског хомогената комбинацијом јоноизмењивачке хроматографије и хроматографије засноване на хидрофобним интеракцијама.
- Иако стафилокиназа не показује значајну хомологију са стрептокиназом обе формирају комплекс са плазминогеном у односу 1:1 и на тај начин индукују тромболитички ефекат.



Схематски приказ механизма дејства стафилокиназе

Ткивни активатор плазминогена **-стафилокиназа**

- Везивањем стафилокиназе за плазминоген ствара се неактивни комплекс стафилокиназа–плазминоген, који индукује накнадну протеолитичку разградњу везаног плазминогена до плазмина, који остаје у комплексу са стафилокиназом.
- Овај комплекс (преко плазмина) катализује конверзију слободног плазминогена у плазмин и може да убрза процес претварања осталих комплекса стафилокиназа-плазминоген у комплекс стафилокиназа-плазмин.
- Крајњи ефекат је настанак активног плазмина, који директно разграђује фибрин у угрушку (тромболитички ефекат).

Ткивни активатор плазминогена *-стафилокиназа*

- Серумски протеин $\alpha 2$ -антиплазмин може да инхибира активирани комплекс плазмин-стафилокиназа. $\alpha 2$ -антиплазмин може узајамно деловати са активним делом комплекса, плазмином, што доводи до дисоцијације стафилокиназе и последичног стварања неактивног плазмин- $\alpha 2$ антиплазмин комплекса.
- Нативни молекул има кратак полуживот у серуму (6,3 min), али се ковалентним везивањем ПЕГ смањује брзина клиренса из серума, чиме се ефикасно продужава полуживот молекула.
- Пацијенти који су лечени применом стафилокиназе често развијају неутралишућа антитела.

Ткивни активатор плазминогена

-алтеплаза

- Ген за *tPA* је клониран из меланомских ћелија 1983. године што је касније омогућило обимну производњу у CHO ћелијским линијама помоћу рекомбинантне ДНК технологије.
- Комплементарна ДНК за *tPA* садржи 2530 нуклеотида и кодира зрели протеин од 527 АК. Образац гликозилације је сличан, али не идентичан, нативном хуманом молекулу.
- **Алтеплаза** (*Alteplase*®) је први пут регистрована 1987. године за лечење акутног инфаркта миокарда.
- Производња алтеплазе започиње ферментацијом (10 000 L), током кога култивисане CHO ћелије производе и излучују *tPA* у ферментациони медијум. Након уклањања ћелија филтрацијом и почетним концентровањем, производ се пречишћава комбинацијом неколико хроматографских корака, па финални производ има чистоћу >99%.

Ткивни активатор плазминогена

-алтеплаза

- Алтеплаза је лек избора код акутног инфаркта миокарда, а најефикаснија је уколико се примени до 12 h након појаве првих симптома.
- Терапијска доза од 90 - 100 mg, која се даје инфузијом током 90 минута, омогућава одржавање оптималне концентрације алтеплазе 3 - 4 mg/l у том периоду. Међутим, производ се брзо метаболише у јетри, са полуживотом у серуму ≈ 3 min.
- Као што је случај са већином тромболитичких агенаса, најзначајније нежељено дејство након примене *tPA* је повећан ризик од тешких крварења.

Ткивни активатор плазминогена

-ретеплаза

- **Ретеплаза** је модификовани хумани *tPA* произведен у рекомбинантним ћелијама *E. coli* (*Ecokinase*®, *Retevase*® и *Rapilysin*®).
- Развој овог производа заснован је на стварању синтетичке нуклеотидне секвенце која кодира скраћени молекул *tPA* (355 АК). Садржи само домене *tPA* одговорне за селективност и каталитичку активност. Нуклеотидна секвенца је интегрисана у експресиони вектор који је затим уведен у *E. coli* (сој K12) третирањем калцијум хлоридом.
- Протеин се експримира интраћелијски, где се накупља у облику инклузионих телаца.

Ткивни активатор плазминогена

-ретеплаза

- Захваљујући систему производње прокариота, производ је негликозилиран. Одсуство гликозилације, EGF и K₁ домена продужава инжењерисаном молекулу полуживот у серуму. Ретеплаза има полуживот у серуму до 20 минута, што олакшава његову примену (болус инјекција уместо континуиране инфузије).
- Одсуство F домена смањује афинитет везивања производа за фибрин, што може додатно појачати разградњу угрушка, јер се олакшава интензивнија дифузија тромболитика у унутрашњост.
- Финални стерилни производ се формулише као лиофилизат и има рок трајања две године када се чува на собној температури.



Схематски приказ производње ретеплазе (*Ecolinase*[®]), модификованог *tPA* молекула

Ткивни активатор плазминогена

-тенектеплаза

- **Тенектеплаза** (*Metalyse*®) је инжењерисани *tPA*, произведен у СНО ћелијској линији. Ова гликозилирана варијанта се за шест АК разликује од нативног *tPA*.
 - Thr 103 је замењен Asn,
 - Asn 117 је замењен Gln,
 - секвенца Lis-Hys-Arg-Arg 296-299 је замењена Ala-Ala-Ala-Ala
- Ове модификације довеле су до продуженог полуживота у плазми (15 - 19 min), као и повећане отпорности на PAI-1 (инхибитор плазминогена 1, природни инхибитор *tPA*).

Ткивни активатори плазминогена

- регистровани за клиничку примену у Р. Србији

Генерички назив	Заштићен назив	Експреси- они систем	Индикације	Формулација
Алтеплаза	<i>Actilyse</i>	СНО	Акутни инфаркт миокарда, Емболија плућа, Акутна церебрална тромбоемболија, Акутне, субакутне или хроничне тромбозе, Емболије периферних венских и артеријских крвних судова	Прашак и раств. за раствор за инј./инфуз.
Тенектеплаза	<i>Metalyse</i>	СНО	Акутни инфаркт миокарда, Емболија плућа, Акутна церебрална тромбоемболија, Акутне, субакутне или хроничне тромбозе, Емболије периферних венских и артеријских крвних судова	Прашак и раств. (у шприцу) за раств. за инј.

α 1-антитрипсин

-биохемија

- α 1-антитрипсин је серумски гликопротеин, једноланчани полипептид састављен од 394 АК, молекулске масе 52 kDa. Угљенохидратна компонента чини 12-16% укупне масе протеина. Постоје три места за N-гликозилацију (Asn 46, Asn 83 и Asn 247) преко којих су везани олигосахаридни бочни ланци. Синтетише се у јетри и излучује у крвоток, где је присутан у концентрацијама 2 - 4 g/l, представља >90% α 1-глобулинске фракције крви.
- α 1-антитрипсин представља главни инхибитор серинске протеазе присутан у крви. Као моћан инхибитор протеазе еластазе, има улогу да заштити плућа од протеолитичког оштећења инхибирањем неутрофилне еластазе.
- Ген за α 1-антитрипсин налази се на хромозому број 14.
 - Постоје бројне варијанте гена за α 1-антитрипсин. Регуларан облик се назива М, а тачкасте мутације у гену су створиле два главна додатна облика, S и Z. Ове мутације смањују синтезу и излучивања зрелог α 1-антитрипсина у крвоток.

α 1-антитрипсин

-производња и медицинска примена

- Особе са две копије Z гена имају смањену активност α 1-антитрипсина у серуму, што је често повезано са развојем емфизема (посебно код пушача). Стога се α 1-антитрипсин се користи за лечење емфизема
- Припрема се ограниченим фракционисањем пуне хумане крви.
- Ген за α 1-антитрипсин је експримиран у великом броју рекомбинантних система, укључујући и млеко трансгених оваца.
 - Иако би употреба рекомбинантног производа спречила преношење крвних патогена, производња је финансијски неисплатива.
 - бројни покушаји производње рекомбинантног препарата повезани су са ограничењима попут губитка активности и убрзане деградације. До данас је само један рекомбинантни препарат ушао у фазу I клиничког испитивања *INBRX-101*. Производи се рекомбинантном ДНК технологијом коришћењем CHO ћелијске линије. У питању је фузионисани протеин α 1-антитрипсин са Fc фрагментом IgG1 антитела.

Албумин

-биохемија

- Хумани серумски албумин (HSA) је негликозилиран полипептид од 585 АК, молекулске масе 65,5 kDa. Поседује 17 дисулфидних веза, које помажу у стабилизацији тродимензионалне структуре молекула. Синтетише се и излучује из јетре, а његов ген је присутан на хуманом хромозому број 4.
- HSA је најзаступљенији протеин у циркулацији. Васкуларни систем просечне одрасле особе садржи око 150 g албумина, односно око 60% укупних протеина плазме.
- HSA је одговоран за >80% колоидног осмотског притиска људске крви, па је од свих састојка плазме најодговорнији за регулацију волумена крви. Овај протеин чини крв гушћом од воде.
 - Лимфни систем представља велики депо овог протеина (до 230 g код одрасле особе).
 - Мање количине албумина су присутне у кожи.

Албумин

-физиолошка улога и клиничка примена

- Поред осморегулаторне функције, HSA има и транспортну улогу. Разни метаболити (масне киселине, аминокиселине, стероидни хормони и тешки метали, нпр. бакар и цинк и многи лекови) се везују за HSA и дистрибуирају кроз циркулацију.
- У терапији се примењује концентровани водени раствор 15 - 25% плазма протеина или изотонични водени раствор 4–5% плазма протеина, али је у оба случаја >95% албумин.
- HSA се користи као плазма експандер у лечењу хеморагије, шока, опекотина и едема, као и постоперативно.

Албумин

-производња и медицинска примена

- Припрема се фракционисањем из плазме или серума или пречишћавањем из плаценте, при чему се првенствено проверава присуство патогена у изворном материјалу.
- После пречишћавања, додаје се адекватан стабилизатор (често натријум-каприлат). Не захтјева конзервансе. Раствор се затим стерилише филтрацијом и асептично пуни у стерилне контејнере.
- Релативна термостабилност HSA омогућава накнадну термичку обраду, што додатно смањује ризик од случајног преношења резистентних патогена (посебно вируса). Овај третман подразумева загревање производа на 60° С током 10 h, тада се инкубира на 30–32° С током додатних 14 дана и потом се микробиолошки испитује.

Албумин

-производња и медицинска примена

- Упркос скринингу сировина и термичкој обради финалног производа, нативни HSA добијен из хумане крви понекад може садржи патогене.
- Рекомбинантна ДНК технологија омогућава превазилажење ових проблема. Ген за HSA или комплементарна ДНК могу се експримирати у великом броју микробиолошких система, укључујући *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *S. cerevisiae*, *Pichia pastoris* и *Aspergillus niger*.
- С обзиром на то да није гликозилиран могућа је производња нативног HSA у прокариотским и еукариотским системима.

Албумин

-производња и медицинска примена

- Међутим, велика количина HSA, као и присуство бројних дисулфидних веза, могу отежати рекомбинантну производњу великих концентрација правилно савијених производа у неким производним системима.
- Главна препрека у замени нативног HSA рекомбинантном формом је исплативост. За разлику од већине биофармацеутика, HSA се може произвести у великим количинама и јефтино директном екстракцијом из нативног извора.

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Хвала на пажњи