

Industrijski aspekti lijekova podrijetlom iz ljudske plazme

Safić, Jasna; Bačić Vrca, Vesna; Schenner, Silvia; Jukić, Irena; Pepić, Ivan

Source / Izvornik: **Farmaceutski glasnik, 2016, 72, 1 - 22**

Journal article, Published version

Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:288628>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Industrijski aspekti lijekova podrijetlom iz ljudske plazme

JASNA SAFIĆ¹, VESNA BAČIĆ VRCA², SILVIA SCHENNER¹, IRENA JUKIĆ¹,
IVAN PEPIĆ³

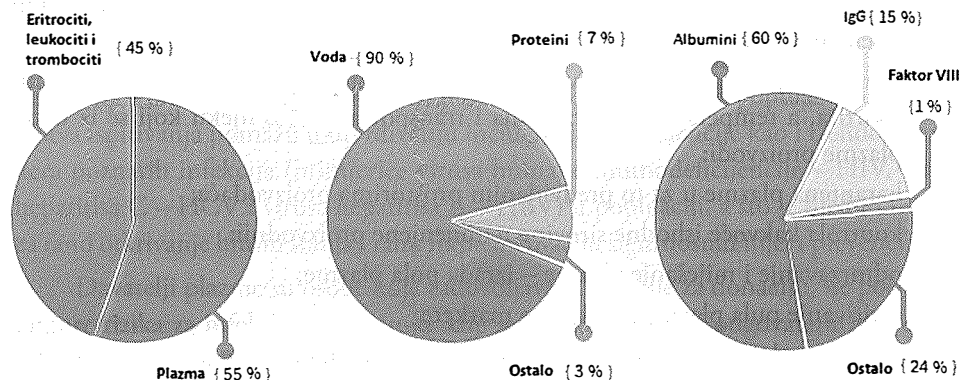
¹Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Zagreb

²Klinička bolnica Dubrava, Zagreb

³Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

1. UVOD

Lijekovi podrijetlom iz ljudske plazme dobivaju se iz krvi i plazme dobrovoljnih davatelja. Prikupljena se ljudska plazma može koristiti kao samostalni terapijski pripravak (poznata i kao »klinička plazma« ili »svježe zamrznuta plazma«), ali i kao ishodna sirovina za proizvodnju lijekova iz ljudske plazme (u literaturi poznati i kao »frakcionirani farmaceutski pripravci« ; »proizvodi plazme«; »derivati plazme«). Ljudska plazma je kompleksan biološki materijal koji sadrži više stotina različitih proteina uključenih u mnogobrojne fiziološke funkcije, a koji čine 7 % ukupnog udjela plazme. Albumini i imunoglobulini čine gotovo 80 % svih proteina plazme, dok su u manjoj mjeri zastupljeni faktori zgrušavanja i ostali proteini plazme (fibrinogeni i inhibitori proteaza kao što su alfa1-proteinaza inhibitor i antitrombin). Udjeli pojedinih proteina u plazmi prikazani su na slici 1. (1).



Slika 1. Proteini plazme

Frakcioniranjem proteina plazme danas se dobivaju lijekovi velikog medicinskog značenja koji su često i jedina mogućnost u prevenciji i liječenju po život opasnih stanja nastalih kao posljedica trauma, kongenitalnih malformacija, imunoloških bolesti ili infekcija (2).

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

Industrijski proces dobivanja terapijskih proteina plazme poznat je pod nazivom »frakcioniranje«, a podrazumijeva sve proizvodne postupke od izolacije sirovih frakcija do njihovog pročišćavanja i zgušćavanja, da bi se dobili individualni terapijski proizvodi. Svake se godine frakcionira od 23 do 28 milijuna litara ljudske plazme u svijetu, u otprilike 70 proizvodnih pogona. U proizvodnji se koriste isključivo validirani proizvodni postupci kao i validirani postupci za inaktiviranje i/ili uklanjanje uzročnika infekcija potencijalno prisutnih u proizvodnom pulu plazme. Cijeli se taj sofisticirani industrijski proces provodi pod uvjetima visoko higijenskih kriterija u licenciranim postrojenjima za frakcioniranje plazme koji rade u skladu s dobrom proizvođačkom praksom i slijede načela osiguranja kakvoće (2, 3).

2. PROIZVODNJA LIJEKOVA IZ LJUDSKE PLAZME

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

- (i) prikupljanje ishodne sirovine od dobrovoljnih davatelja, što uključuje razgovor s davateljima i ispitivanje darovane krvi radi izdvajanja rizičnih uzoraka;
- (ii) obrada ishodne sirovine – plazma se dobiva centrifugiranjem iz pune krvi ili češće aferezom;
- (iii) ispitivanja na prisutnost patogena – plazma se ispituje na prisutnost virusa, dok se bakterije, paraziti i unutarstanični virusi uništavaju i/ili uklanjaju u kasnijim dijelovima proizvodnje;
- (iv) zamrzavanje i transport dobivene donacije plazme – plazma se zamrzava i transportira, a temperatura zamrzavanja i transporta ovisi o lijeku koji se iz takve plazme proizvodi;
- (v) karantena plazme u za to predviđenim prostorima proizvođača;
- (vi) kontrola kakvoće ishodne sirovine namijenjene proizvodnji;
- (vii) odmrzavanje i miješanje plazme – izrada pula plazme;
- (viii) ispitivanje pula plazme na virusne markere;
- (ix) klasični industrijski postupci frakcioniranja proteina ljudske plazme – Cohnov postupak modificiran prema Kistler-Nitschmannu;

- (x) pročišćavanje specifičnog izoliranog proteina;
- (xi) izrada disperzije s određenim udjelom izoliranog proteina;
- (xii) izrada konačnog farmaceutskog oblika – dodatak konzervansa (dozvoljen samo u formulaciji višedoznih imunoglobulina za intramuskularnu primjenu), stabilizatora, sredstava za krio- i/ili liozaštitu proteina, doziranje, liofilizacija. Razvoj prikladnog farmaceutsko-tehnološkog oblika u ranim fazama proizvodnje lijekova iz ljudske plazme osnova je osiguranja stabilnosti konačnog proizvoda (2, 3).

2.1. Ljudska plazma kao ishodna sirovina

Postupci koje se koriste tijekom prikupljanja plazme za frakcioniranje imaju izravan utjecaj na sigurnosni profil lijekova koji se iz te plazme proizvode zbog toga što se veliki pulovi plazme iz kojih se proizvode lijekovi za stotine ili čak tisuće bolesnika sastoje od individualnih donacija. Iz toga proizlazi da je prikupljanje plazme integralni dio proizvodnje modernih frakcioniranih proizvoda. Zahtjevi za prikupljanje plazme za frakcioniranje mogu se razlikovati od onih za proizvodnju svježih zamrznute plazme. U reguliranom okruženju plazma za frakcioniranje se prikuplja od licenciranih institucija (banke krvi, centri za krv, centri za prikupljanje plazme aferezom) nad kojima inspekciju provodi nadležno nacionalno regulatorno tijelo. Institucije za prikupljanje plazme provode i unutarnji nadzor da bi se potvrdilo da su zahtjevi za prikupljanje, kakvoću i sigurnost od ugovornih dobavljača zadovoljeni. Osobito važna područja uključuju: a) *screening* davatelja i ispitivanje darovane plazme; b) zahtjevi za označivanjem, dokumentacijom i sljedivošću; i c) rukovanje s krvlju i plazmom. Takve su informacije sastavni dio registracijske dokumentacije za lijekove iz ljudske plazme u Europskoj uniji i sastavni su dio dokumenta koji se zove Glavna dokumentacija o plazmi (engl. *Plasma Master File*, PMF) (2).

2.1.1. *Screening* davatelja plazme

Kandidati za darivanje plazme moraju dobiti edukacijski materijal te također moraju proći razgovor s medicinskim osobljem s ciljem procjene rizika ili znakova infekcije, da bi se ustanovilo da njihova plazma odgovara zahtjevima za plazmu namijenjenu frakcioniranju. Medicinske se informacije o davateljima prikupljaju, čuvaju i koriste za kontinuirano provođenje epidemioloških ispitivanja populacije davatelja. Takva ispitivanja pomažu u utvrđivanju incidencije i prevalencije kao i trendova markera poznatih infekcija (primjerice virusa humane imunodeficiencije – HIV, virusa hepatitisa C – HCV i virusa hepatitisa B – HBV) u populaciji, a što je ujedno i važno za rano otkrivanje hitnih stanja i ranu implementaciju sigurnosnih mjera prevencije (4).

Davatelji plazme su osobe koje zadovoljavaju kriterije za donaciju, ne posjeduju faktore rizika za infektivne uzročnike koji se prenose krvlju i odgovaraju zahtjevima definiranim od proizvođača lijekova dobivenih frakcioniranjem plazme kao i nadležnog regulatornog tijela zemlje u kojoj se plazma prikuplja i u kojoj će se lijek koristiti.

Kriteriji za odabir davatelja također uzimaju u obzir i znanstvene spoznaje o rizicima prijenosa infektivnih uzročnika putem lijekova dobivenih iz pulova plazme (5).

2.1.2. Metode prikupljanja plazme

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

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

Nekoliko sati nakon prikupljanja, krv se centrifugira da bi se stanični elementi odvojili od plazme. Srednji volumen plazme dobiven iz jedne donacije pune krvi iznosi oko 220 mL, ali varira ovisno o volumenu prikupljene pune krvi (400 – 450 mL) i hematokritu davatelja. Plazma koja se dobiva aferezom (zove se još i »source plazma« – izvorna plazma) prikuplja se od davatelja procesom u kojem se iz krvi davatelja u koju se dodaje antikoagulans (općenito 4 %-tna otopina natrijeva citrata) odmah fizičkim putem odvajaju krvne komponente (centrifugiranjem, filtriranjem ili kombinacijom ove dvije tehnike). Zatim se krvne stanice vraćaju u organizam davatelja, dok se plazma zadržava u za to predviđenim spremnicima (plastične vrećice ili boce). Trajanje uobičajenog postupka afereze ovisi o broju ciklusa i traje između 35 i 70 minuta. Volumen plazme dobivene aferezom iznosi između 450 i 880 mL što ovisi o regulativi pojedine zemlje i protokolu prikupljanja (6).

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

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

Plazma dobivena aferezom sadrži manje imunoglobulina (IgG) kada se prikuplja od učestalih davatelja. Sustav afereze koji se koristi ne utječe na sadržaj proteina i kakvoću frakcioniranih proteina, iako se sadržaj preostalih stanica razlikuje na temelju tipa i konfiguracije uređaja za separaciju stanica (6).

2.1.3. Ispitivanje patogena

Virusni infektivni uzročnici su identificirani kao potencijalni kontaminanti ljudske krvi. Bakterije, paraziti i unutarstanični virusi ne prenose se putem lijekova

dobivenih iz plazme jer se uništavaju u koracima zamrzavanje – odmrzavanje ili filtracijom preko filtara veličine pora 0,2 do 1 μm koji se koriste tijekom proizvodnje frakcioniranih proizvoda. Patogeni virusi koji se prenose putem krvi uključuju HIV, HCV, HBV, virus hepatitisa A (HAV), virus Zapadnog Nila (VZN) i parvovirus B19 (B19) (7,8).

Neka ispitivanja provode institucije za prikupljanje krvi, a druga proizvođači lijekova dobivenih iz plazme. U Hrvatskoj se svaka uzeta individualna doza krvi ili krvnog sastojka serološki ispituje na biljege krvlju prenosivih bolesti, a najmanje na prisutnost hepatitis B površinskog antigena (HBsAg), protutijela na hepatitis C (anti-HCV), antigene i protutijela na HIV (HIV Ag/At) i protutijela na uzročnika sifilisa, *Treponema pallidum* (9, 10). Osim serološkog ispitivanja, obvezno se provodi i molekularno odnosno NAT ispitivanje (engl. *Nucleic Acid amplification Technique*) na biljeg HIV (HIV RNA) biljeg HCV (HCV RNA) i biljeg HBV (HBV DNA). NAT ispitivanje se temelji na visokoj osjetljivosti i specifičnosti za nukleinske kiseline virusa, kojim se prisutnost virusa otkriva ranije u odnosu na druge metode i skraćuje vrijeme od infekcije do pozitivnog rezultata ispitivanja (engl. *window period*). Takvo se ispitivanje može provoditi na individualnim donacijama ili mini-pulovima plazme, ali je na individualnim donacijama ispitivanje osjetljivije. Industrijski pul plazme također se ispituje na biljege krvlju prenosivih bolesti da bi se potvrdila odsutnost seroloških i/ili genskih virusnih markera HIV-a, HBV-a, HCV-a, HAV-a i B19 (11, 12).

Unatoč strogom *screeningu* davatelja i ispitivanju donacija, zarazni se virusi ipak mogu nalaziti u pulovima plazme za frakcioniranje, stoga postupci inaktivacije/uklanjanja virusa, koji su ciljano uvedeni u proces proizvodnje lijekova iz plazme, čine najvažniji dio u proizvodnji sigurnih lijekova. Ispitivanja koja se preklapaju kod institucija za prikupljanje krvi i kod proizvođača lijekova iz plazme trebala bi osigurati da je prisutnost virusa minimalna i da je značajno ispod učinkovitosti procesa uklanjanja virusa koji se koristi u proizvodnom postupku (8).

2.1.4. Obrada, zamrzavanje, čuvanje i transportiranje plazme

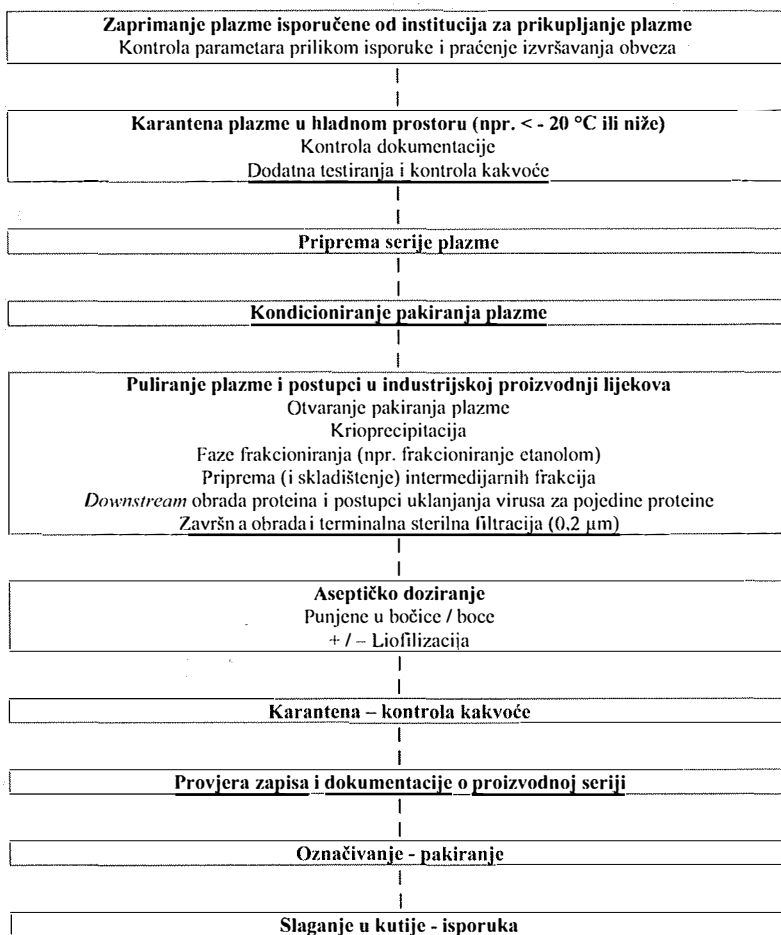
Očuvanje FVIII tijekom prikupljanja krvi/plazme i njegova obrada vrlo je važna za većinu proizvođača koncentriranih oblika faktora zgrušavanja. Plazma dobivena aferezom općenito se može brzo zamrznuti, osiguravajući optimalno očuvanje FVIII. Suprotno tome, puna krv mora se centrifugirati da bi se dobile komponente krvi. Kad je krv ohlađena pri 4 °C nakon prikupljanja, plazma se mora odvojiti unutar 6 do 8 sati da bi se očuvao FVIII, ali ako se ohladi brzo do stalnih 20 °C uz uporabu uređaja kao što je butanediol ploča, faktori zgrušavanja mogu biti stabilni od 18 do 24 sata. Nakon odvajanja staničnih elemenata, plazma za frakcioniranje mora se brzo zamrznuti pri temperaturama ispod -20 °C, -25 °C ili -30 °C ovisno o nacionalnim zahtjevima. Plazma namijenjena proizvodnji IgG i albumina zamrzava se pri -20 °C ili nižoj temperaturi unutar 72 sata nakon prikupljanja. Čuvanje plazme namijenjene

frakcioniranju vrši se pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ili nižoj temperaturi, obično nekoliko mjeseci ili čak više, ovisno koja se proteinska frakcija želi izdvojiti i proizvesti u lijek. Temperatura čuvanja mora biti konstantna, koliko god je to moguće, a to uključuje i temperaturu tijekom transporta do pogona tvornice za frakcioniranje (2, 13).

2.2. Industrijska obrada plazme

Industrijska proizvodnja lijekova iz ljudske plazme započinje primitkom plazme od odgovarajuće institucije za prikupljanje plazme i sastoji se od niza koraka shematski prikazanih slikom 2. (2).

Proizvođač lijekova iz krvne plazme pri primitku plazme provjerava jesu li zadovoljeni svi propisani zahtjevi pri transportu plazme (pakiranje, označavanje, temperatura tijekom transporta koja se mora bilježiti u *log-bookovima*, dostupnost uzoraka za



Slika 2. Shematski prikaz proizvodnje lijekova iz ljudske plazme od primitka plazme do isporuke lijeka (2).

dodatno ispitivanje i drugo). Plazma se pri primitku odmah stavlja u karantenu u prijenosnom hladnjaku. Dokumentacija se verificira (potpisan certifikat o podrijetlu i kontroli plazme, datum prikupljanja plazme, broj transportnog spremnika, virološki i imunohematološki podaci iz *screeninga*, laboratorijska oprema korištena za ispitivanja, broj serije i sl.) i prati se izvršenje obaveza kod trenutne isporuke. Može se provesti dodatno ispitivanje kao što je NAT ispitivanje na mini-pulu plazme (primjerice na HCV, HIV, HBV, HAV i/ili B19) i/ili određivanje aktivnosti FVIII i sadržaj proteina iz uzoraka donacija individualne plazme. Samo one donacije individualne plazme koje zadovoljavaju propisane kriterije koriste se za frakcioniranje. Prije odmrzavanja, donacije se mogu »kondicionirati« pri kontroliranoj temperaturi nekoliko sati prije otvaranja. Za otvaranje pakiranja doza plazme razvijene su različite metode koje odgovaraju higijenskim zahtjevima da bi se ograničilo mikrobiološko opterećenje plazme. Zamrznute plazme vade se iz plastičnih spremnika i od njih se izrađuju pulovi namijenjeni krioprecipitaciji i sljedećim proizvodnim koracima. Frakcije koje nastaju tijekom proizvodnje mogu se čuvati za narednu izradu pulova za krioprecipitaciju i proizvodnju. Pročišćeni i sterilno profiltrirani proizvodi aseptički se pune u gotov spremnik (staklene bočice ili boce). Boce s albuminom zatim ulaze u terminalnu pasterizaciju. Mnogi proizvodi, osim albumina i IgG, čuvaju se u liofiliziranom obliku tijekom 3 do 6 dana ovisno o fizičko-kemijskim svojstvima i volumenu doziranja. Proizvedene se serije stavljaju u karantenu tijekom ispitivanja kontrole kakvoće. One serije koje odgovaraju specifikacijama opremaju se i isporučuju distributerima. Cijeli proizvodni ciklus od primitka zamrznute plazme do isporuke gotovih lijekova traje od nekoliko tjedana do nekoliko ili više mjeseci (2, 13). Uobičajene metode pročišćavanja proteina plazme pregledno su prikazane tablicom 1. (2).

Tablica 1. Uobičajene metode pročišćavanja proteina plazme (2).

Metoda	Opis	Načelo separacije	Područje primjene
Krioprecipitacija	● dmrzavanje pune plazme; pri +1 °C do +4 °C	Različita topljivost na hladnoj pozitivnoj temperaturi	Precipitacija FVIII, vWF i fibrinogena
Precipitacija etanolom	Pojedinačne etape precipitacije krio-siromašne plazme etanolom (10 % do 40 %), kod precizno definiranih uvjeta pH (oko 7,4 do 4,5), temperature (-3 °C do -6 °C), koncentracije proteina i ionskom snagom; uklanjanje precipitata centrifugiranjem ili dubinskom filtracijom	Različita topljivost u etanolu na hladnoj negativnoj temperaturi	Precipitacija fibrinogena, IgG, albumina, API, itd.

Metoda	Opis	Načelo separacije	Područje primjene
Ionsko izmjenična kromatografija	Vežanje proteina na čvrstu podlogu koja se obično nalazi u koloni	Vežanje na temelju električnog naboja; ispiranje povećanjem sadržaja soli ili promjenom pH u otopini za ispiranje	Većina faktora zgrušavanja, inhibitori proteaza i antikoagulansi
Afnitetna kromatografija	Vežanje proteina na čvrstu podlogu koja se obično nalazi u koloni; ligandi su heparin, metali i želatina	Specifični afinitet proteinskih liganada; ispiranje obično povećanjem sadržaja soli u otopini za ispiranje	AT, vWF, FIX, itd.
Imunoafnitetna kromatografija	Vežanje proteina na čvrstu podlogu koja se obično nalazi u koloni; ligandi su mišja monoklonska protutijela	Specifični afinitet proteina – protutijela; ispiranje obično povećanjem sadržaja soli u otopini za ispiranje	FVIII, FIX, protein C
Kromatografija isključivanja po veličini	Nanošenje proteina na čvrstu podlogu koja se nalazi u koloni	Razdvajanje komponenti na temelju različite molekularne veličine	API, FVIII
Ultrafiltracija	Selektivni proces frakcioniranja na membranama definirane veličine pora koje koncentriraju protein i uklanjaju nisko molekularne otopljene tvari i soli	Separacija na temelju različite molekularne mase	Svi proizvodi
Mikrofiltracija	Niskotlačni i unakrsni membranski proces za odvajanje koloidnih i suspendiranih čestica u rasponu veličine od 0,2 do 10 μm		Svi proizvodi

FVIII – faktor VIII; vWF – von Willebrandov faktor; IgG – imunoglobulin G; API – alfa 1-proteinaza inhibitor; AT – antitrombin; FIX – faktor IX

2.2.1. Osnovna tehnologija frakcioniranja proteina plazme

Osnovna tehnologija frakcioniranja proteina plazme najviše se oslanja na proces koji objedinjuje krioprecipitaciju i precipitaciju proteinskih frakcija hladnim etanolom, na način kako je 1940-tih razvio Cohn u SAD-u. Edwin J. Cohn je zajedno sa svojim suradnicima razvio detaljan postupak frakcioniranja koji se temeljio na promjeni pH,

ionske snage, koncentracije etanola i temperature što je dovelo do precipitacije različitih proteinskih frakcija iz plazme. Albuminom dobivenim frakcioniranjem plazme prvi su put liječeni ranjenici u Pearl Harbóru 1941. godine (14). Cohnov postupak je kasnije modificiran i unaprijeđen te su danas najkorištenije Cohn-Onclleyeva metoda i metoda po Kistleru i Nitschmannu koja je 70-tih godina prošlog stoljeća razvijena u Europi na način da je omogućila veće iskorištenje. Proces uključuje sporo odmrzavanje zamrznute plazme pri 2 °C do 4 °C i centrifugiranje u hladnom da bi se uklonio krioprecipitat. Topljivosti različitih proteinskih frakcija u preostalom supernatantu zatim se podešava povećanjem koncentracije etanola, promjenom temperature/pH i/ili ionske snage. Precipitati frakcija koje sadrže različite proteine plazme odvajaju se centrifugiranjem ili filtracijom. U zadnjih je nekoliko godina značajno porasla složenost ovog procesa frakcioniranja i to prvenstveno:

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

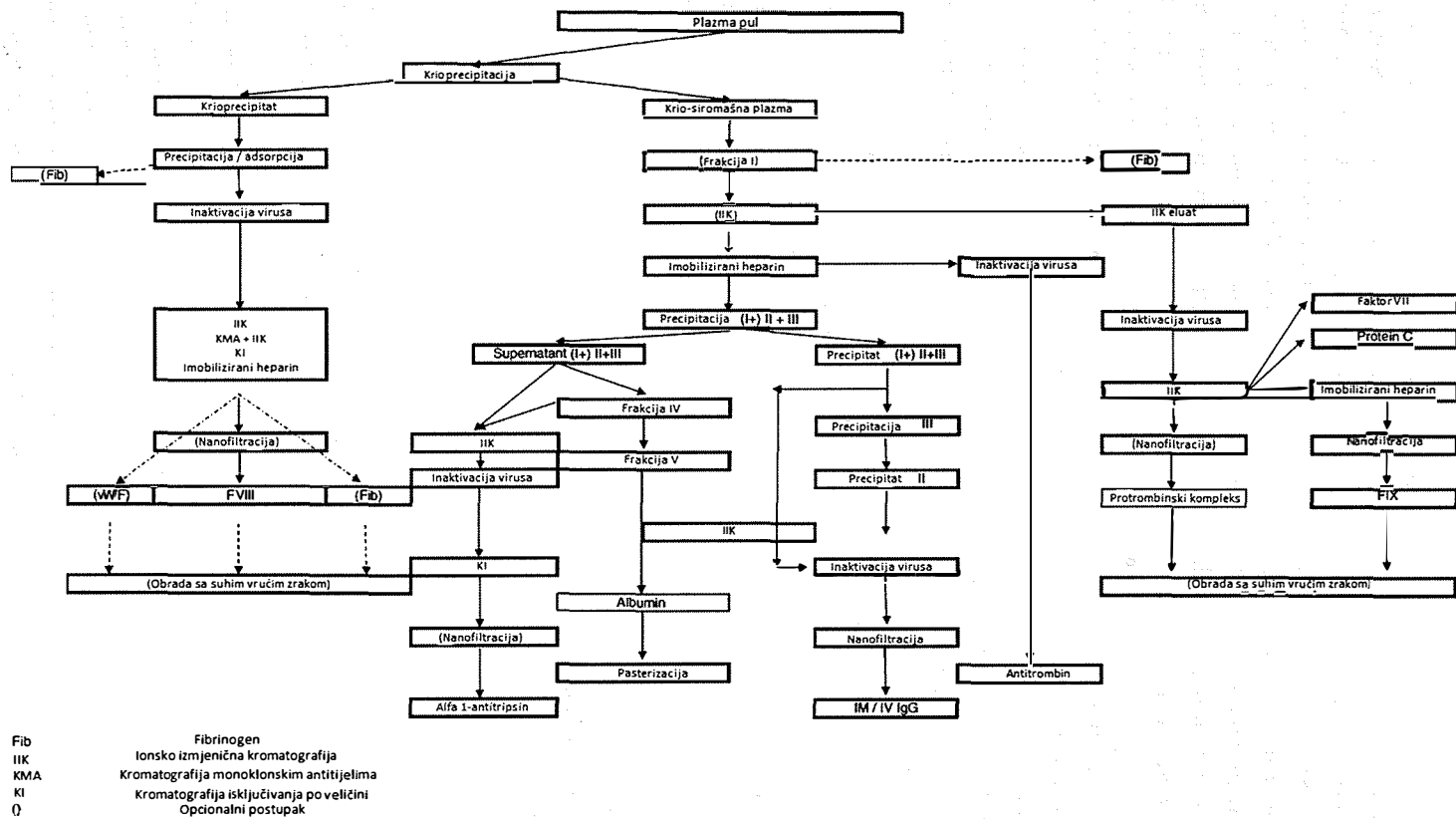
Kromatografija je uvedena u 60-tim godinama prošlog stoljeća, ali se počela primjenjivati tek sredinom 80-tih godina. Anionsko izmjenična i afinitetna kromatografija često se koriste da bi se dobili proteini pri fiziološkim vrijednostima pH i ionske jakosti, a zbog čega je najbolje očuvana funkcionalna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

- poboljšanje čistoće proizvoda,
- ekstrakcija osjetljivih proteina,
- optimizacija iskorištenja proteina,
- uklanjanje tvari za inaktivaciju virusa (15, 16).

Shematski prikaz uobičajenih postupaka industrijskog procesa frakcioniranja prikazan je slikom 3. (2).

Uobičajeno je da za jednu seriju lijeka, dobivenu od 2000 do 4000 L plazme, broj pojedinačnih pakiranja plazme iznosi 5000 do 20000 ovisno o načinu prikupljanja plazme. Pakiranja plazme otvaraju se pod kontroliranim uvjetima, plazma se vadi iz spremnika i odmrzava pri temperaturi 1 °C do 4 °C.

Krioprecipitat se izolira uz uporabu ohlađene kontinuirane centrifuge, odvaja od centrifuge i zamrzava pri temperaturi –30 °C ili nižoj da bi ga se očuvalo do buduće izrade pula plazme i daljnje obrade. Krio-siromašna plazma se odmah obrađuje da bi se primarno kromatografskom tehnikom dobili osjetljivi faktori zgrušavanja (kao što je protrombinski kompleks i njegove komponente) i proteaza inhibitori (kao što je AT i inhibitor C1-esteraza). Pročišćeni intermedijeri mogu se čuvati do daljnje obrade. Plazma iz koje su izdvojeni faktori zgrušavanja/antikoagulansi ulazi



Slika 3. Shematski prikaz uobičajenih postupaka industrijskog procesa frakcioniranja (2).

zatim u etapu precipitacije etanolom. To vodi do sukcesivne precipitacije frakcija fibrinogena, IgG i albumina, te intermedijera za ekstrakciju ostalih terapijskih proteina, kao što su API (alfa 1-proteinaza inhibitor) ili IgM. Dubinska filtracija je bolja od centrifugiranja za separaciju precipitata i poboljšanje iskorištenja proteina. Frakcioniranje hiperimune plazme (npr. anti-rhesus) obično se provodi na manjim serijama plazme uz uporabu potpunog kromatografskog procesa da bi se optimiziralo iskorištenje IgG (15, 16).

2.2.2. Osnovne metode uklanjanja virusa

Od kraja 80-tih godina prošlog stoljeća pa do danas nije zabilježen niti jedan slučaj prijenosa HIV-a, HBV-a ili HCV-a putem lijekova iz plazme koji su bili podvrgnuti postupku inaktivacije/odstranjenja virusa. Postupci uklanjanja virusa uključuju korake inaktivacije virusa u kojima se virusi uništavaju i korake izdvajanja virusa u kojima se virusi i proteini izdvajaju u posebnim frakcijama. U proizvodnji lijekova iz ljudske plazme najčešće se koriste dvije metode uklanjanja virusa. Prvom metodom se inaktivira većina patogena, virusa s ovojnicom (HIV, HBV, HCV), dok je druga metoda učinkovita za viruse bez ovojnice, ali istodobno pridonosi dodatnoj sigurnosti protiv svih infektivnih uzročnika. Većina postupaka uklanjanja virusa integrirana je u proces frakcioniranja proteina (engl. *in-process treatment*), ali neki od njih koji se temelje na toplini, primjenjuju se na proizvod u gotovom pakiranju (terminalna obrada). Nadležna tijela zahtijevaju od proizvođača provođenje ispitivanja učinkovitosti primijenjenog postupka uklanjanja virusa provođenjem validacija u umanjenom mjerilu koja koriste model relevantnog virusa da bi se u proizvodnji lijekova koristile učinkovite i snažne procedure za uklanjanje virusa. Snažna procedura omogućava uklanjanje virusa kao što je VZN. Coronavirus, koji ima lipidnu ovojnicu i uzrokuje teški akutni respiratorni sindrom inaktivira se osnovnim metodama uklanjanja virusa kod lijekova iz ljudske plazme (8).

Inaktivacija virusa tijekom procesa proizvodnje

Metoda obrade dispergiranih proteina topljivim površinski aktivnim tvarima (tPAT) je metoda koja je razvijena sredinom 80-tih godina prošlog stoljeća, a ostala je jedna od najčešćih osnovnih metoda inaktivacije virusa s lipidnom ovojnicom. Postupak je poznat i pod nazivom ŠD postupak (engl. *solvent detergent treatment*). Otopine se proteina inkubiraju između 4 do 6 sati pri 24 °C do 37 °C uz dodatak 0,3 % do 1 % tri-*n*-butil-fosfata (TnBP) i 1 % Tween 80 ili Tion X-100. Obično se virusi s lipidnom ovojnicom inaktiviraju unutar nekoliko minuta, dok se virusi bez ovojnice ne uspijevaju inaktivirati takvim postupkom. Istodobno, funkcionalna aktivnost većine osjetljivih proteina plazme, s izuzetkom nekih inhibitora serin proteaza, ostaje očuvana. tPAT obično se uklanja kromatografskom adsorpcijom, specifičnom precipitacijom proteina ili selektivnom adsorpcijom na hidrofobnoj kromatografskoj koloni (15, 16).

Pasterizacija je također čest postupak inaktivacije virusa i predstavlja toplinsku obradu otopina proteina tijekom 10 sati pri 60 °C, čime se denaturiraju proteini virusa i inhibira se njihova replikacija. Pasterizacija može inaktivirati i viruse s ovojnicom i viruse bez ovojnice, ali stabilizator koji je nužan da bi se spriječio gubitak funkcionalnosti proteina može suziti raspon virusne inaktivacije. Stabilizatori se mogu ukloniti ultrafiltracijom, precipitacijom proteina ili kromatografijom. Obrada zasićenom vodenom parom ima širok raspon inaktivacije virusa što je osigurano temperaturom, tlakom i trajanjem provođenja procesa. U svakom slučaju kod primjene toplinskih postupaka postoji rizik od stvaranja neoantigena koji mogu povećati imunogeničnost proteina (2).

Inkubacija pri niskom pH (najčešće pH = 4) pri temperaturi od 30–37 °C tijekom više od 20 sati prvi put je korištena u ranim 80-tim godinama za proizvodnju IgG. Ovaj oblik obrade inaktivira većinu virusa s lipidnom ovojnicom. U novije vrijeme je uvedena obrada s kaprilatnom (oktanoičnom) kiselinom kojom dolazi do precipitacije/inkubacije pri pH nižem od 6 za obradu ljudskog IgG te može inaktivirati viruse s lipidnom ovojnicom (2).

Inaktivacija virusa u terminalnoj fazi

U suvremenom načinu frakcioniranja plazme, toplinski postupci obrade liofiliziranih proizvoda (suhi vrući zrak) zbog svojih se ograničenja najčešće koriste kao sekundarni postupak inaktivacije virusa. Takva obrada se primjenjuje kod nekih koncentrata faktora zgrušavanja. Obavlja se pri 80 °C tijekom 72 sata ili pri 100 °C tijekom 30 minuta, općenito uz prisutnost proteinskih stabilizatora koji pridonose sigurnosti od HAV-a i ostalih virusa osjetljivih na toplinu, ali ne i za B19. Terminalna (tekućinska) pasterizacija pri 60 °C tijekom 10 sati je »zlatni standard« u proizvodnji albumina. U formulaciji lijeka kao stabilizatori dodaju se masne kiseline, kaprilati i triptofanati, koji štite albumin od denaturacije toplinom, a koji su istodobno kompatibilni s terapijskom primjenom te se stoga ne uklanjaju iz proizvoda (16).

Postupak izdvajanja virusa

Nanofiltracija je specifična filtracija virusa koja se koristi kod otopina proteina, a temelji se na višeslojnim membranama ili ekvivalentnim sustavima veličine pora 15 do 75 nm, radi uklanjanja virusa mehanizmom prosijavanja. Uvedena je sredinom 90-tih godina prošlog stoljeća kad je i široko prihvaćena kao snažno sredstvo prvenstveno za sve proizvode izuzev albumina. Nanofiltracija se koristi kao dopuna osnovnim postupcima inaktivacije virusa i kako bi se povećala sigurnost protiv virusa bez ovojnice te ostalih rezistentnih infektivnih uzročnika. Izdvajanje virusa se može odvijati tijekom precipitacije proteina, kromatografije ili filtracije; takvi postupci pridonose smanjenju virusnog opterećenja proteina plazme tijekom proizvodnje. S obzi-

rom na činjenicu da se takvi koraci teško mogu pratiti, ne postoji jamstvo da takva metoda može biti dovoljno samostalna bez osnovnih postupaka inaktivacije virusa (2, 17).

Metode izdvajanja priona

U prenosive spongiformne encefalopatije (engl. *transmissible spongiform encephalopathy*; TSE) ubrajamo niz bolesti među njima i Creutzfeldt-Jakobovu bolest i varijantu te bolesti (vCJB). Sve donedavno rizik prijenosa TSE putem ljudske krvi smatrao se samo teorijski mogućim, iako su ispitivanja na animalnom modelu potvrđivala taj rizik. U 2004. godini prijavljena su dva slučaja vCJB kod kojih je do prijenosa bolesti došlo transfuzijom darovane krvi. Takvi su slučajevi bili pokretač da se kao potencijalni rizik za plazmu i lijekove iz plazme smatra i prijenos vCJB, iako do danas takav prijenos nije zabilježen kod lijekova iz ljudske plazme. Zbog svoje biološke prirode, vjerovalo se da je prion rezistentan na trenutne postupke inaktivacije virusa koji se koriste tijekom frakcioniranja plazme. Poznate metode kojima se inaktiviraju abnormalni prionski proteini koji su povezani s TSE (kao što su oksidacija, obrada jakom lužinom, ekstremna toplina) ujedno uništavaju proteine plazme i zbog toga se ne mogu koristiti. Ipak, suvremeni procesi frakcioniranja čini se da osiguravaju značajno uklanjanje/izdvajanje priona TSE u proizvodnom postupku. Biokemijska priroda patogenog prionskog proteina (PrP) značajno se razlikuje od mnogih proteina koji se izoliraju frakcioniranjem. PrP je hidrofoban, relativno netopljiv te formira fibrile nakon pročišćavanja što nisu svojstva topljivih terapijskih proteina koji se proizvode iz plazme. Na taj način, mnoge metode za uklanjanje onečišćenja iz proizvoda plazmatskih proteina također mogu uklanjati i prione. Potencijalno, prioni se mogu ukloniti tijekom precipitacijske, filtracijske ili kromatografske faze procesa pročišćavanja s promjenjivim stupnjevima ovisno o uvjetima pročišćavanja. Primjerice kod precipitacije etanolom, stupanj uklanjanja je općenito poboljšan povećanjem koncentracije etanola ili smanjenjem pH. Općenito, proizvodi koji se dobivaju u kasnijim fazama frakcioniranja, kao što su albumini, IgG i API bolje su zaštićeni od lijekova koji se dobivaju u ranijim fazama kao što su faktori zgrušavanja (2, 18).

2.3. Industrijski postupci u proizvodnji specifičnih proteina plazme

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

2.3.1. Faktor zgrušavanja VIII

U zadnjih 30 godina razvijeno je nekoliko generacija FVIII, a trenutno se najviše napora ulaže u postupke uklanjanja priona (18). Prema raspoloživim podacima, kod svih odobrenih koncentrata FVIII, lijek se dobiva pročišćavanjem iz krioprecipitata.

Krioprecipitat se podvrgava kombinaciji adsorpcije aluminijevim hidroksidom i precipitaciji, ili samo precipitaciji (primjerice uz uporabu glicina) da bi se smanjila razina ostataka o vitaminu K ovisnih faktora zgrušavanja (s obzirom da oni mogu aktivirati FVIII tijekom *downstream* procesa pročišćavanja) ili opterećenje proteinima kao što su fibrinogeni. Pročišćeni krioprecipitat zatim prolazi kroz virusnu inaktivaciju pomoću tPAT ili pasterizacije. Mnogi procesi još uključuju i anionsku izmjeničnu kromatografiju, afinitet monoklonskim protutijelima (uz uporabu anti-FVIII ili anti-vWF mišja protutijela) ili afinitet imobiliziranog heparina da bi se uklonila onečišćenja proteinima (kao što su fibrinogen i fibronektin), većina ili djelomični von Willebrandov faktor (vWF) i tPAT. Imunopročišćeni FVIII eluat dalje se pročišćava kromatografijom da bi se uklonili mišji IgG ligandi. Prije formulacije i sterilne filtracije, neki proizvodi FVIII prolaze i nanofiltraciju kod koje se koriste membranski filtri veličine pora 35, 20 ili čak 15 nm, ako je pokrenuta djelomična disocijacija FVIII i visoko molekularnog vWF multimera. Alternativno, neki se liofilizirani proizvodi obrađuju toplinom pri temperaturi 80 °C ili 100 °C kako bi se inaktivirali virusi bez ovojnica kao što je HAV. Iskorištenje postupka je između 100 i 200 i.j. FVIII po litri plazme (1 i.j. FVIII se definira kao fiziološka aktivnost FVIII prisutna u 1 mL plazme). Čimbenici koji utječu na smanjenje iskorištenja pri proizvodnji FVIII uključuju krioprecipitaciju, kromatografsko pročišćavanje i inaktivaciju virusa toplinom. Današnji koncentrati FVIII sadrže specifičnu aktivnost između 10 i 100 i.j./mg proteina odnosno između 250 i 1000 i.j./dozi/bočici. U pojedinim lijekovima, FVIII je formuliran tako da sadrži i albumin, dok se u drugima nalazi u kombinaciji s vWF koji pomaže u stabilizaciji FVIII (2, 19).

2.3.2. Von Willebrandov faktor

Kako kromatografsko pročišćavanje FVIII uklanja sve ili dio vWF, FVIII proizvodi koji su učinkoviti u liječenju von Willebrandove bolesti (vWB) uglavnom su proizvodi niske čistoće proizvedeni iz krioprecipitata u kojem se nalaze oba faktora. Niska čistoća i visok sadržaj proteina ograničava izbor postupka virusne inaktivacije na pasterizaciju ili terminalnu obradu suhim vrućim zrakom pri 80 °C tijekom 72 sata. Visoko pročišćeni vWF, u velikoj je mjeri odvojen od FVIII, te je stoga specifičan za liječenje vWB. Proizvodi se iz krioprecipitata pomoću kromatografije u tri koraka uz uporabu dva anionska izmjenjivača obložena imobiliziranom želatinom. Uklanjanje virusa se provodi s tPAT, 35-nm nanofiltracijom ili terminalnom obradom suhim vrućim zrakom pri 80 °C tijekom 72 sata (2, 19).

2.3.3. Fibrinogen

Tradicionalno se proizvodi višestrukim precipitacijskim koracima iz plazme ili krioprecipitata uz uporabu etanola i glicina, dok se suvremeni lijekovi pročišćavaju kromatografijom. Uklanjanje virusa postiže se postupkom uz tPAT, često dopunjenim s 35-nm nanofiltracijom ili terminalnom obradom suhim vrućim zrakom. Također se koristi i pasterizacija pri 60 °C tijekom 20 sati (2, 19).

2.3.4. Fibrinsko ljepilo

Osnovne komponente fibrinskog ljepila su fibrinogen i pročišćen trombinski koncentrat. Proizvodi se precipitacijskim metodama iz krioprecipitata ili iz Cohnove frakcije I; frakcija također može sadržavati fibronektin, vWF ili faktor XIII (FXIII) koji su zaslužni za dodatne fiziološke funkcije. Fibrinogenske frakcije se podvrgavaju inaktivaciji virusa pomoću tPAT, pasterizacije, obradom zasićenom vodenom parom, i/ili nanofiltracijom. Koncentracija fibrinogena je obično veća od 80 g/L, a lijek može biti formuliran uz dodatak antifibrinolitičkih tvari (2, 19).

2.3.5. Protrombinski kompleks

Koncentrat protrombinskog kompleksa (KPK) je smjesa faktora zgrušavanja ovisnih o vitaminu K u kojima faktor IX (FIX), faktor II (FII), faktor X (FX), protein C i protein S imaju nisku specifičnu aktivnost između 0,5 i 2 i.j./mg. Ako proizvod sadrži još i FVII, njegova je razina manja od razine FIX. Proizvodnja se osniva na metodi koja je razvijena još 1960-tih godina, a uključuje dietilaminoetil (DEAE) Sephadex ili apsorbirajuću celulozu s DEAE za krio-siromašnu plazmu. Etanolne frakcije u *downstream* procesu također mogu biti uporabljene kao početni materijali. Za inaktivaciju virusa najčešće se koristi tPAT metoda dopunjena 35-nm ili 15-nm nanofiltracijom te terminalna obrada suhim vrućim zrakom. Može se koristiti i pasterizacija i obrada zasićenom vodenom parom. Inaktivacija tPAT metodom zahtijeva posljedičnu ionsku kromatografiju za uklanjanje tvari za inaktivaciju virusa. Iskorištenje postupka je između 250 i 380 i.j. FIX po litri plazme (2, 19).

2.3.6. Faktor zgrušavanja IX

Visoko pročišćeni proizvodi s FIX razvijeni su kasnih 80-tih godina prošlog stoljeća što je dovelo do smanjenja tromboembolijskih poremećaja kod bolesnika s hemofilijom B u odnosu na prethodno primjenjivani KPK. FIX se dobiva kromatografskim pročišćavanjem iz KPK uz uporabu anionskog izmjenjivača u kombinaciji s imobiliziranim heparinom, afnitetnim metal kelatima ili monoklonskim protutijelima. Takvim procesima dobivaju se koncentрати FIX srednje specifične aktivnosti između 100 i 150 i.j./mg proteina, a iskorištenje postupka iznosi između 200 i 300 i.j. FIX po litri plazme (2, 20).

2.3.7. Faktor VII

Proizvodni postupak uključuje ionsku izmjeničnu kromatografiju ili adsorpciju aluminijevim hidromidom, nakon čega slijedi *downstream* postupak sličan kao kod KPK i FIX. Inaktivacija virusa postiže se tPAT metodom, obradom zasićenom vodenom parom ili suhim vrućim zrakom (2, 20).

2.3.8. Faktor XI

Faktor XI (FXI) može se proizvoditi na dva načina. Prvi, kojim se dobiva FXI niske čistoće, pročišćava se kromatografijom iz krio-siromašne plazme na DEAE

celulozi i imobiliziranom heparinu. Nakon liofilizacije proizvod se podvrgava i obradi suhim vrućim zrakom da bi se inaktivirali virusi. Visoko pročišćeni FXI se dobiva adsorpcijskom filtracijom nakon koje slijedi kationska izmjenična kromatografija. Inaktivacija virusa se provodi tPAT metodom uz dodatnu 15-nm nanofiltraciju (2, 21).

2.3.9. Faktor XIII

FXIII je transglutaminaza koja katalizira završni korak u kaskadi zgrušavanja krvi, umreženi slobodni fibrinski polimer visoko organizirane strukture. Rana se generacija koncentrata FXIII dobivala iz placente, ali su kasnije ovi koncentрати FXIII zamijenjeni s koncentratima koji se dobivaju iz plazme. Proizvodi se tako da se prvo vrši pročišćavanje supernatanta iz etanolne frakcije kriprecipitata, a pročišćavanje se provodi natrijevim citratom pri čemu se fibrinogen uklanja zagrijavanjem. Proizvod se zatim pasterizira u otopini sorbitola, sorbitol se uklanja ultrafiltracijom, a zatim se vrši adsorpcija bentonitom i na kraju liofilizira (2, 22).

2.3.10. Aktivirani faktori zgrušavanja

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

Proizvodnja pročišćenog aktiviranog FVII (FVIIa) je razvijena u Japanu. FVII se pročišćava anionskom izmjeničnom i imunoafinitetnom kromatografijom, a zatim se konvertira u FVIIa autoaktivacijom na anionskoj izmjeničnoj smoli i inkubacijom uz dodatak kalcijevih iona tijekom 18 sati pri 10 °C. Međuproizvod se zatim podvrgava nanofiltraciji i obradi suhim vrućim zrakom kako bi se uklonili virusi. Namijenjen je liječenju hemofiličara koji su razvili protutijela protiv FVIII ili FIX (19).

2.3.11. Antikoagulansi i inhibitori proteaza

Antitrombin (AT). Koncentрати AT su bili prvi proizvodi koji su proizvedeni afinitetnom kromatografijom. Proizvodnja iz krio-siromašne plazme obično uključuje ionsku izmjeničnu kromatografiju da bi se uklonila KPK komponenta, nakon čega se dobiva AT pomoću imobiliziranog heparina. Uklanjanje virusa se provodi pasterizacijom uz dodatak natrijeva citrata ili kombinacije saharoze i glicina, iako je tPAT postupak također dobar. Iskorištenje postupka je između 250 i 350 i.j. AT/L plazme. AT se može dobiti i iz frakcije IV-1 kao polaznog materijala, ali su u tom slučaju iskorištenja znatno manja (19).

Alfa 1-proteinaza inhibitor (API, drugi naziv: alfa 1-antitripsin). S obzirom da API ima slična fizičko-kemijska svojstva kao i albumin, molekularnu masu i izoelektričnu točku, bilo je teško osmisлити proizvodni postupak za API koji neće utjecati na već postojeći proizvodni postupak albumina. Proizvodi se uglavnom dobivaju iz frakcije IV 1–4, odnosno frakcije za otpad, koja zatim prolazi PEG (polietilenglikol) precipitaciju i ionsku izmjeničnu kromatografiju. Iskorištenja su u tom slučaju mala i iznose oko 0,2 g/L. Inaktivacija se virusa provodi pasterizacijom ili dvostrukim postupkom uklanjanja virusa koji uključuje tPAT postupak i nanofiltraciju što se danas više koristi. U slučajevima kada postoji smanjena klinička potreba za albuminima, izolacija API iz gornjih frakcija, kao što su supernatant II i III, omogućava mnogo učinkovitiju proizvodnu shemu kod koje se mogu dobiti iskorištenja od 0,6 do 1 g/L (2, 19).

Protein C. Može se proizvoditi na dva načina. Prvi postupak započinje iz KPK koji se podvrgava pročišćavanju na tri ionska izmjenjivača, dok se kod drugog procesa afinitetna i imunoafinitetna kromatografija kombiniraju s ionskom izmjenom. Uklanjanje se virusa postiže tPAT postupkom koji se može kombinirati s 15-nm nanofiltracijom ili obradom suhim vrućim zrakom (2, 20).

Inhibitor C1-esteraza (ICE). ICE se dobiva pročišćavanjem afinitetnom ili ionskom izmjeničnom kromatografijom iz krio-siromašne plazme nakon ekstrakcije iz KPK-a i potencijalno AT-a. Inaktivacija virusa postiže se pasterizacijom, obradom suhim vrućim zrakom ili tPAT postupkom po mogućnosti u kombinaciji s nanofiltracijom (2, 20).

2.3.12. Albumin

Svi albumini za terapijsku primjenu dobivaju se frakcioniranjem iz krio-siromašne (ili KPK-siromašne i/ili AT-siromašne i/ili C1-inhibitor-siromašne) plazme pomoću etanola. Kritični *upstream* proces (precipitacija II i III) odvaja IgG frakciju. Da bi se optimiziralo iskorištenje, precipitati dobiveni frakcioniranjem etanolom odvajaju se dubinskom filtracijom. Obično se postižu iskorištenja albumina 75–85 % (25–28 g/L) i čistoće 96–98 %. Neki postupci kombiniraju frakcioniranje etanolom ionskom izmjeničnom kromatografijom, koja općenito poboljšava čistoću albumina do 99 %, gdje se albumin pročišćava anionskom izmjeničnom, kationskom izmjeničnom i gel-filtracijskom kromatografijom. Prilagodba koncentracije pročišćene frakcije, obično 4–25 %, postiže se ultrafiltracijom. Standardna metoda inaktivacije virusa je pasterizacija, koja bi se u skladu s farmakopejom trebala provoditi na gotovom pakiranju, bolje nego na seriji proizvoda neposredno prije aseptičkog doziranja. Srednja vrijednost iskorištenja albumina je između 24 i 26 g/L plazme (19).

2.3.13. Imunoglobulin G

Polivalentni preparati imunoglobulina G (IgG), bilo da se primjenjuju intramuskularno, intravenski ili subkutano tradicionalno se proizvode iz frakcije II, tako da se

postupno frakcioniraju iz krio-siromašne plazme uz uporabu hladnog etanola koncentracije do 25 %. Da bi se optimiziralo iskorištenje, IgG proizvodi se ekstrahiraju iz gornjih etanolom precipitiranih frakcija, kao što su supernatant III ili precipitat II + III. Intermedijarne IgG frakcije se podvrgavaju ionskoj izmjeničnoj kromatografiji, obradi kaprilatnom kiselinom ili PEG precipitacijama da bi se uklonila proteinska onečišćenja, proteolitički enzimi i/ili agregati. Inaktivacija virusa provodi se inkubacijom pri niskom pH, pasterizacijom, tPAT postupkom, te obradom kaprilatnom kiselinom. Uklanjanje virusa 15-nm i 35-nm nanofiltracijom koristi se kada se žele ukloniti virusi bez ovojnice. Iskorištenje IgG iznosi između 2,7 i 3,2 g/L kada se kombiniraju tradicionalno frakcioniranje etanolom i centrifugiranje. Dubinska filtracija i/ili kromatografsko pročišćavanje frakcija koje nastaju u fazama *upstream* procesa mogu poboljšati srednje iskorištenje na raspon između 3,5 i 4,5 g/L ili više. Kromatografske tehnike se sve više koriste za proizvodnju hiperimunih IgG (specifičnih IgG), jer predstavljaju tehnike izbora za frakcioniranje manjih volumena plazme i mogu optimizirati iskorištenje. Proizvodni postupak mora uključivati najmanje dva postupka uklanjanja virusa (19).

3. KONTROLA KAKVOĆE

3.1. Procesna kontrola kakvoće

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

Izrada pula plazme mora biti pažljivo kontrolirana da bi se izbjegla kontaminacija i ulazak stranog materijala. Obavezno se moraju dokumentirati nadzor nad relevantnim parametrima tijekom proizvodnje, kao što su pH, temperatura, koncentracija etanola, protein i njegova aktivnost gdje je prikladno, kao i rezultati ispitivanja kontaminacije bakterijama i endotoksinima. Identifikacije kritičnih procesnih kontrola kakvoće i njihovih specifikacija moraju biti na razini koju propisuje smjernica *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH)* za postupke ispitivanja biotehnoških lijekova, Q6B (CPMP/ICH/365/96) (23, 24).

3.2. Kontrola kakvoće gotovog lijeka

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

Svi se relevantni parametri kakvoće moraju određivati u svakoj seriji gotovog lijeka. Dodatno, ispitivanja se moraju raditi na tvarima koje se koriste tijekom formulacije

ili tijekom proizvodnje; primjerice, određivanje ostatne koncentracije otapala/tPAT tamo gdje su bili korišteni. Parametri specifikacija moraju odražavati učinkovitost proizvodnog procesa u skladu s Q6B.

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

Varijabilnost početnih materijala/sirovina i heterogenost lijekova iz ljudske plazme važno je razmatrati tijekom validacije analitičkih metoda koje se koriste za sirovine, procesne kontrole, djelatnih tvari i lijekova. Validacija se treba obavljati u skladu s važećim smjernicama za validaciju analitičkih metoda. Također se mora potvrditi prikladnost metoda opisanih u određenim monografijama vodeći računa o specifičnostima lijeka. Ako se koriste metode koje nisu obuhvaćene Europskom farmakopejom, mora se pokazati da alternativne metode daju ekvivalentne rezultate na više različitih serija lijeka.

Monografije Europske farmakopeje za lijekove iz ljudske plazme revidiraju se relativno često ovisno o zahtjevima nacionalnih regulatornih tijela putem delegacija u Povjerenstvu Europske farmakopeje, ali i putem Sekretarijata Europske farmakopeje na prijedlog proizvođača lijekova ili samih korisnika farmakopeja da bi se potaknule uporabe alternativnih metoda ispitivanja (primjerice ispitivanje prisutnosti pirogenih tvari *in vitro* metodom naspram ispitivanja *in vivo* metodom koja se provodi na animalnom modelu – kunića) (23, 24).

4. ODOBRAVANJE LIJEKOVA

Kao i za druge lijekove biološkog podrijetla, prije odobranja lijekova iz ljudske plazme proizvođač mora dokazati ujednačenost kakvoće lijeka od serije do serije, kao i odsutnost virusnih kontaminanata u onom opsegu u kojem to dozvoljava tehnologija. Uz uobičajenu dokumentaciju koja se predaje nadležnom tijelu u svrhu stavljanja lijeka u promet, proizvođač lijekova iz ljudske plazme prilaže i Glavnu dokumentaciju o plazmi (engl. *Plasma Master File*, PMF) dokument koji podliježe znanstvenoj i tehničkoj ocjeni nadležnog tijela (25, 26).

PMF je samostalan dokument neovisan o ostaloj registracijskoj dokumentaciji, čija evaluacija i certifikacija od Europske agencije za lijekove (engl. *European Medicines Agency*, EMA) nije obvezujuća ali uvelike pojednostavljuje postupak odobranja lijeka, kako za nositelja odobrenja tako i za regulatorno tijelo, ako se radi o lijekovima namijenjenima za tržište više od jedne zemlje u Europskoj uniji. Evaluaciju i certifikaciju EMA-e moraju prihvatiti sve zemlje Europske unije. PMF se može certificirati

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

U PMF-u moraju biti navedene sve institucije iz kojih se dobiva plazma za proizvodnju lijekova, te za svako mjesto moraju biti priloženi epidemiološki podaci o infekcijama koje se prenose krvlju za lokalno područje za koje je ta institucija nadležna (27).

Nakon ocjene PMF-a i registracijske dokumentacije za pojedini lijek dobiven iz plazme, nadležno tijelo izdaje odobrenje i provodi posebnu provjeru kakvoće serije lijeka koja je namijenjena tržištu. Posebna provjera kakvoće lijeka odnosi se na stručno administrativnu ocjenu dokumentacije o pojedinoj seriji lijeka na kojoj se obavlja posebna provjera kakvoće i laboratorijsko ispitivanje lijeka (28). Uz zahtjev za posebnu provjeru kakvoće lijeka iz ljudske plazme podnositelj zahtjeva obvezan je priložiti dokaz da je pul plazme koji je korišten u proizvodnji lijeka ispitan na virusne markere od službenog laboratorija za provjeru kakvoće lijeka u Europskoj uniji (29, 30).

Glavni čimbenici rizika pri primjeni lijekova iz ljudske plazme proizlaze iz prirode ishodne sirovine, odnosno pula plazme koja se dobiva od heterogene skupine dobrovoljnih davatelja. Iako suvremena proizvodnja lijekova iz ljudske plazme uključuje niz mjera za sprječavanje prijenosa infekcija kao što su odabir davatelja, analizu pojedinačnih donacija i pula plazme u svrhu otkrivanja specifičnih markera infekcija te provedbu učinkovitih postupaka inaktivacije/uklanjanja virusa tijekom proizvodnje, kod primjene lijekova iz ljudske plazme mogućnost prijenosa zaraznih bolesti ne može biti potpuno isključena. To se također odnosi na nepoznate viruse ili viruse u nastajanju te na druge patogene.

Ostali čimbenici rizika primjene lijekova iz ljudske plazme povezani su s kakvoćom proizvoda na koju može utjecati proces obrade ishodne sirovine, zbog čega se nakon primjene lijeka mogu javiti reakcije preosjetljivosti i trombotski događaji (25).

5. ZAKLJUČAK

Lijekovi iz ljudske plazme dobivaju se iz krvi i plazme dobrovoljnih davatelja, postupcima frakcioniranja u proizvodnim pogonima čiji uvjeti udovoljavaju zahtjevima dobre proizvođačke prakse. Zadnjih desetljeća značajno je porasla složenost procesa frakcioniranja uvođenjem kromatografskih tehnika i postupaka inaktivacije i uklanjanja virusa. Kromatografske tehnike su povećale iskorištenje procesa i omogućile

izolaciju novih proteina, dok je implementacija postupaka za inaktivaciju i uklanjanje virusa omogućila dobivanje sigurnijih lijekova. Temelj za davanje odobrenja za stavljanje lijeka u promet su podaci o ishodnoj sirovini koji se nalaze u zasebnom dokumentu pod nazivom Glavna dokumentacija o plazmi. Iako se danas lijekovi iz plazme proizvode detaljno opisanim, utvrđenim i validiranim postupcima i ispituju prema propisanim standardima kakvoće, rizik od prijenosa uzročnika krvlju prenosivih bolesti putem lijekova podrijetlom iz ljudske plazme ne može se isključiti. Kontrola svih čimbenika u lancu koji pridonose sigurnosti lijekova proizvedenih iz ljudske plazme bitna je za smanjenje rizika od mogućeg prijenosa zaraznih bolesti.

Industrial aspects of medicinal products derived from human plasma

J. Safić, V. Bačić Vrca, S. Schenner, I. Jukić, I. Pepić

Abstract

Medicinal products derived from human plasma are obtaining from blood and plasma of volunteer donors. Industrial production of plasma-derived medicinal products in a broader term is a complex and demanding technological process, and the most important parts of the production include: collection of raw materials from volunteer donors, plasma processing, testing on presence of potentially pathogenic agents, freezing and transporting of processed plasma, quarantine, quality control of raw materials, the pooling of starting materials, testing of the plasma pool for viral markers, fractionation, purification, production of dispersion with certain share of the isolated protein, production of the final pharmaceutical form. (*Croatian Institute of Transfusion Medicine, Zagreb; University Hospital Dubrava, Zagreb; Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb*)

1. <http://www.admabiologics.com/about-plasma/overview>, datum pristupa: 24.11.2015.
2. Burnouf T. Modern plasma fractionation. *Transfus Med Rev.* 2007; 21(2):101–17.
3. Burnouf T. New approaches for manufacturing plasma derivatives. *ISBT Science Series.* 2014; 9:160–67.
4. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2015/06/WC500187418.pdf, datum pristupa: 30.7.2015.
5. Farrugia A, Cassar J. Plasma-derived medicines: access and usage issues. *Blood Transfus.* 2012; 10(3):273–8.
6. Dierickx D, Macken E. The ABC of apheresis. *Acta Clin Belg.* 2015; 70(2):95–9.
7. Farrugia A. Plasma for fractionation: safety and quality issues. *Haemophilia.* 2004; 10(4):334–40.
8. Dodd RY. Emerging pathogens and their implications for the blood supply and transfusion transmitted infections. *Br J Haematol.* 2012; 159(2):135–42.
9. http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2007_08_80_2517.html, datum pristupa: 30.7.2015.

10. http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2007_08_80_2516.html, datum pristupa: 30.7.2015.
11. Hans R, Marwaha N. Nucleic acid testing-benefits and constraints. *Asian J Transfus Sci.* 2014; 8(1): 2–3.
12. <http://www.hzrm.hr/dokumenti/postupak-za-evaluaciju-doza-krvi-i-davatelja-krvi-prema-rezultatima-nat-i-seroloskih-testova-u-transfuzijskoj-djelatnosti-rh.pdf>, datum pristupa: 30.7.2015.
13. Farrugia A, Evers T, Falcou PF, Burnouf T, Amorim L, Thomas S. Plasma fractionation issues. *Biologicals.* 2009; 37(2):88–93.
14. Curling J, Bryant C. The Plasma Fractionation Industry. *BioProcess International.* 2005.
15. Burnouf T, Goubran H, Radosevich M. Application of bioaffinity technology in therapeutic extracorporeal plasmapheresis and large-scale fractionation of human plasma. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1998; 715(1):65–80.
16. Burnouf T, Radosevich M. Affinity chromatography in the industrial purification of plasma proteins for therapeutic use. *J Biochem Biophys Methods.* 2001; 49(1–3):575–86.
17. Burnouf T, Radosevich M. Nanofiltration of plasma-derived biopharmaceutical products. *Haemophilia.* 2003; 9(1):24–37.
18. Burdick MD, Pifat DY, Petteway SR Jr, Cai K. Clearance of prions during plasma protein manufacture. *Transfus Med Rev.* 2006; 20(1):57–62.
19. Grgičević D, i sur. Transfuzijska medicina u kliničkoj praksi. *Medicinska naklada.* 2006; 172–181; 182–190; 197–205.
20. Jameel, F, Hershenson, S. Formulation and Process Development Strategies for Manufacturing Biopharmaceuticals. 2010; DOI: 10.1002/9780470595886.
21. Mitragotri S, Burke PA, Langer R. Overcoming the challenges in administering biopharmaceuticals: formulation and delivery strategies, *Nature Rev Drug Discov.* 2014; 13, 655–672.
22. Ofosu FA, Freedman J, Semple JW. Plasma-derived biological medicines used to promote haemostasis. *Thromb Haemost.* 2008; 99(5):851–62.
23. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/07/WC500109627.pdf, datum pristupa: 30.7.2015.
24. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002824.pdf, datum pristupa: 30.7.2015.
25. http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-1/dir_2003_63/dir_2003_63_en.pdf, datum pristupa: 30.7.2015.
26. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003747.pdf, datum pristupa: 30.7.2015.
27. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003663.pdf, datum pristupa: 30.7.2015.
28. http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2014_05_60_1118.html, datum pristupa: 30.7.2015.
29. Seitz R, Heiden M, Nübling CM, Unger G, Löwer J. The harmonization of the regulation of blood products: a European perspective. *Vox Sang.* 2008; 94(4):267–76.
30. http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-4/annex14_rev30-03_2011_en.pdf, datum pristupa: 30.7.2015.

Prilježeno 21. listopada 2015.