

Разработка высокоэффективной технологии очистки рекомбинантного тканевого активатора плазминогена

Д.В. Чащинова, Н.А. Шамонов, Р.А. Вассарайс, Д.А. Кудлай
АО «ГЕНЕРИУМ»;
Российская Федерация, 123112, Москва, Тестовская ул., д. 10, подъезд 2

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Дарья Валентиновна Чащинова – научный сотрудник отдела масштабирования и внедрения технологий, Акционерное Общество «ГЕНЕРИУМ». Тел.: +7 (905) 144-16-74. E-mail: chacschinova@ibcgenerium.ru.

Николай Алексеевич Шамонов – исполняющий обязанности начальника отдела масштабирования и внедрения технологий, Акционерное Общество «ГЕНЕРИУМ», кандидат биологических наук. Тел.: +7 (964) 698-55-01. E-mail: shamonov@ibcgenerium.ru.

Роман Андреевич Вассарайс – научный сотрудник отдела масштабирования и внедрения технологий, Акционерное Общество «ГЕНЕРИУМ». Тел.: +7 (906) 613-72-52. E-mail: vassarays@ibcgenerium.ru.

Дмитрий Анатольевич Кудлай – генеральный директор, Акционерное Общество «ГЕНЕРИУМ», доктор медицинских наук, профессор. Тел.: +7 (985) 761-02-37. E-mail: dakudlay@generium.ru.

РЕЗЮМЕ

Введение. Алтеплаза (рекомбинантный тканевой активатор плазминогена) – основной тромболитик, рекомендованный для терапии ишемического инсульта и инфаркта миокарда. Алтеплазу получают методом рекомбинантной ДНК в культуре клеток СНО. Препарат Ревелиза® производства АО «ГЕНЕРИУМ» является первым зарегистрированным биоаналогом Актилизе® (алтеплаза, Boehringer Ingelheim). Существующие технологии получения алтеплазы сложны и имеют низкий выход.

Цель исследования. Разработка высокоэффективной методики очистки алтеплазы.

Материал и методы. Культуральная жидкость, содержащая алтеплазу (АО «ГЕНЕРИУМ»), лекарственный препарат Актилизе® (алтеплаза, Boehringer Ingelheim), аффинный сорбент CaptureSelect tPA (ThermoScientific).

Результаты. Разработана и масштабирована промышленная методика очистки алтеплазы на основе аффинного сорбента CaptureSelect tPA (Thermo Scientific).

Заключение. Разработанная методика очистки позволяет получать препарат, биоаналогичный препарату Актилизе® и соответствующий требованиям Фармакопеи.

Ключевые слова: хроматография, аффинный сорбент, тканевой активатор плазминогена, алтеплаза.

Для цитирования: Чащинова Д.В., Шамонов Н.А., Вассарайс Р.А., Кудлай Д.А. Разработка высокоэффективной технологии очистки рекомбинантного тканевого активатора плазминогена. Фармация, 2019; 68 (4): 39–46. <https://doi.org/10.29296/25419218-2019-04-06>

DEVELOPMENT OF A HIGHLY EFFICIENT TECHNOLOGY FOR PURIFICATION OF RECOMBINANT TISSUE PLASMINOGEN ACTIVATOR

D.V. Chashchinova, N.A. Shamonov, R.A. Vassarais, D.A. Kudlai
АО «GENERIUM», 10, Testovskaya, Moscow 123112, Russian Federation

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Daria V. Chashchinova – researcher of the Scale-Up and Technology Transfer Department, Joint Stock Company «GENERIUM». Tel.: +7 (905) 144-16-74. E-mail: chacschinova@ibcgenerium.ru.

Nikolay A. Shamonov – acting chief of the Scale-Up and Technology Transfer Department, Joint Stock Company «GENERIUM», Candidate of Biology Science. Tel.: +7 (964) 698-55-01/ E-mail: shamonov@ibcgenerium.ru.

Roman A. Vassarays – researcher of the Scale-Up and Technology Transfer Department, Joint Stock Company «GENERIUM». Tel.: +7 (906) 613-72-52. E-mail: vassarays@ibcgenerium.ru.

Dmitry A. Kudlai – general director of the Joint Stock Company «GENERIUM», Doctor of Medicine, Professor. Tel.: +7 (985) 761-02-37. E-mail: dakudlay@generium.ru.

SUMMARY

Introduction. Alteplase (recombinant tissue plasminogen activator (rtPA)) is the main thrombolytic agent recommended for the therapy of ischemic stroke and myocardial infarction. Alteplase is obtained by a recombinant DNA technique in CHO cell culture.

Revelyse® manufactured by AO «GENERIUM» is the first registered Actilyse (alteplase, Boehringer Ingelheim) biosimilar. The existing technologies to obtain alteplase are involved and have a low yield.

Objective: to develop a highly efficient procedure for purification of alteplase.

Material and methods. Alteplase-containing culture fluid (CF) (AO «GENERIUM»), Actilyse® (alteplase, Boehringer Ingelheim), the affinity sorbent CaptureSelect tPA (ThermoScientific).

Results. A commercial alteplase purification procedure based on the affinity sorbent CaptureSelect tPA (Thermo Scientific) was developed and scaled.

Conclusion. The developed alteplase purification procedure allows one to obtain a drug that is biosimilar to Actilyse® and meets the requirements of the Pharmacopoeia.

Key words: chromatography, affinity sorbent, tissue plasminogen activator, alteplase.

For citation: Chashchinova D.V., Shamonov N.A., Vassarais R.A., Dudlai D.A. Development of a highly efficient technology for purification of recombinant tissue plasminogen activator. *Farmatsiya (Pharmacy)*, 2019; 68(4): 39–46. <https://doi.org/10.29296/25419218-2019-04-06>

Введение

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), больше всего смертей в мире происходит от инфаркта миокарда, ишемического инсульта и легочной тромбоэмболии [1, 2]. Все эти состояния вызваны патологическим тромбообразованием. Для терапии таких заболеваний применяют тромболитические препараты, в частности, рекомбинантный человеческий тканевой активатор плазминогена (рТАП), или алтеплаза [3]. Алтеплаза – это основной тромболитик, рекомендованный Федеральным агентством по контролю за медицинскими препаратами и продуктами питания США (FDA) при инфаркте, ишемическом инсульте и массивной легочной тромбоэмболии [4]. Терапия алтеплазой включена в новейшие мировые рекомендации по лечению острого нарушения мозгового кровообращения [5] и клинические рекомендации «Ишемический инсульт и транзиторная ишемическая атака», утвержденные Минздравом Российской Федерации в 2015 г. Проведение тромболитизиса включено в стандарты терапии инфаркта миокарда Европейским обществом кардиологии [6] и приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации № 457н от 05.07.2016 «Об утверждении стандарта скорой медицинской помощи при остром трансмуральном инфаркте миокарда». Согласно другому приказу Министерства здравоохранения Российской Федерации, алтеплаза должна присутствовать в укладках и наборах для оказания первой медицинской помощи [7]. Препарат алтеплазы включен в список жизненно важных лекарственных препаратов [8] и входит в список 57 стратегически важных препаратов. Он указан в приказе Минпромторга № 965 от 23 октября 2009 г. «Об утверждении Стратегии развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2020 года». Препарат биоаналог алтеплазы Ревелиза®, производимый

АО «ГЕНЕРИУМ», зарегистрирован в Государственном реестре лекарственных средств в 2018 г.

Алтеплаза (тканевой активатор плазминогена, или ТАП) представляет собой полученный рекомбинантным способом гликозилированный белок размером 527 аминокислотных остатков, со сложной пятидоменной структурой, имеет 17 дисульфидных связей, является сериновой протеазой [9]. В организме человека ТАП гидролизует профермент плазминоген, переводя его в активную форму – плазмин. Активированный плазмин расщепляет связующую основу тромба – фибрин и способствует его растворению [10, 11].

Существует несколько подходов к производству алтеплазы. В работе [12] описан подход по получению препарата рекомбинантной ТАП (рТАП) из ткани матки (около 1 мг из 5 кг ткани). Другие авторы [13] предлагают метод получения его из клеток меланомы человека Bowes, где при культивировании клеток в адгезивном состоянии удалось получить до 60 мг рТАП в 1 л культуральной жидкости. Данные методы создания рТАП имеют низкий выход, а также высокие риски присутствия вирусов человека в конечном продукте. Наиболее безопасным и эффективным вариантом является получение целевой молекулы с использованием клеток яичника китайского хомячка (СНО). Однако существующие на данный момент технологии получения рТАП в клетках СНО отличаются сложностью и низкой продуктивностью как в культуральной части, так и в части очистки. В связи с этим необходимой задачей представляется разработка новой эффективной технологии очистки рТАП. Ключевые требования к разрабатываемой технологии очистки – высокая производительность, эффективность и безопасность. Новый препарат должен соответствовать требованиям Европейской фармакопеи и референтному препарату Актилизе® производства компании Boehringer Ingelheim (Германия) в соответствии с

правилами производства и проведения исследований биоаналогов [14].

Компания «ГЕНЕРИУМ» разработала новую технологию очистки рТАП, позволяющую с высоким выходом получать препарат, соответствующий требованиям Европейской фармакопеи, а также не уступающий по качеству препарату Актилизе®.

Материал и методы

Исходное сырье – культуральная жидкость, содержащая рТАП, производства компании АО «ГЕНЕРИУМ». В качестве референсного препарата использовался препарат Актилизе® (Beringer Ingelheimer). В качестве аффинного сорбента использовали сорбент CaptureSelect tPA (Thermo Scientific). Очистка производилась при помощи хроматографической системы AktaPurifier (GE).

В качестве дополнительных сорбентов применялись QSepharoseFF (GE), Fractogel EMD Chelate (Merck Millipore), EshmunoS (Merck Millipore).

Для оценки полученных результатов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) применяли предупакованные колонны TSK gel G3000SW 7,5•600 мм (Tosoh). В качестве аналитической хроматографической системы высокого давления применяли хроматограф Alliance 2695 (Waters).

Электрофорез осуществляли в системе mini-PROTEAN Tetracell (BioRad). Для представления полученных результатов использовались общепринятые рекомендации [15].

Штамм-продуцент рТАП культивировали на среде SFM4CHO (HyClone) с добавлением подпиток 1% ДМСО и 1% CHO Feed Bioreactor Supplement в режиме перфузии (100% в день) с помощью системы перфузионного культивирования ATF2 (Repligen).

Процесс хроматографической очистки рТАП выполняли с помощью колонны Tricorn 10/50, упакованной аффинным сорбентом с последовательными стадиями уравнивания стартового буферным; нанесения культуральной жидкости; промывки колонны с адсорбированным белком промывочным буфером; элюции целевого белка элюирующим буферным раствором.

Концентрацию белка определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм в кварцевых кюветах длиной оптического пути 1 см против раствора плацебо. Для расчетов использовали коэффициент экстинкции 1,9.

Гель-фильтрационную ВЭЖХ выполняли в изократическом режиме. В качестве подвижной

фазы использовали 250 мМ натрий-фосфатный буферный раствор, 0,1% додецилсульфат натрия, рН 6,8. Скорость потока через колонну составляла 0,5 мл/мин. Детекцию осуществляли спектрофотометрически (длина волны 214 нм).

Для определения соотношения одноцепочечной (оц) и двухцепочечной (дц) форм образец восстанавливали 30 мМ дитиотреитолом при температуре 80°C в течение 5 мин, затем осуществляли хроматографирование в указанных выше условиях.

Электрофорез (ЭФ) осуществляли в полиакриламидном геле в присутствии лаурилсульфата натрия в восстанавливающих с окраской нитратом серебра. К образцу белка добавляли буфер, содержащий DTT. Электрофорез проводили в 12% разделяющем геле. На дорожку вносили 10 нг белка. После ЭФ гели окрашивали раствором нитрата серебра. Для этого гели помещали в контейнер с раствором для отмывки гелей, содержащим этиловый спирт и уксусную кислоту, и нагревали до температуры 50÷60°C, выдерживали 5–7 мин при постоянном перемешивании на горизонтальной мешалке. Далее декантировали раствор для отмывки гелей и заливали гели нагретым до 50÷60°C медицинским асептическим раствором, разбавленным в 10 раз дистиллированной водой, выдерживали 10–15 мин при постоянном перемешивании на горизонтальной мешалке. Сливали медицинский асептический раствор и промывали гели дистиллированной водой в течение 1–2 мин при постоянном перемешивании на горизонтальной мешалке. Погружали гели в реактив нитрата серебра и инкубировали 15–17 мин при постоянном перемешивании на горизонтальной мешалке. Декантировали раствор нитрата серебра и промывали гели 3 раза сменной водой очищенной в течение 15–20 мин. Переносили гели в проявляющий раствор, содержащий уксусную кислоту и фармальдегид, и выдерживали до тех пор, пока на дорожках геля не становилась видимой основная полоса. Быстро переносили гели в 10% раствор уксусной кислоты и инкубировали не более 10 мин, затем промывали гели водой.

Ферментную активность рТАП определяли методом лизиса фибринового сгустка. Метод основан на определении времени лизиса сгустка, искусственно созданного с помощью компонентов крови (фибриноген, тромбин). Молекула рТАП активируется при связывании с фибрином и индуцирует превращение плазминогена в плазмин, способствуя растворению фибринового сгустка.

В набор пробирок вносили раствор тромбина и раствор стандартного образца или раствор испытуемых образцов. Полученный раствор добавляли в пробирки, содержащие смесь плазминоген/фибриноген. Время добавления раствора фиксировали. Полученную смесь интенсивно перемешивали и инкубировали при 37°C. Время лизиса сгустка определяли как время от момента добавления образца в раствор до момента, когда последний пузырек поднимется на поверхность.

С помощью калибровочной кривой зависимости десятичного логарифма активности стандарта [lg(A)] от десятичного логарифма значения времени лизиса [lg(t)] определяли уравнение прямой данной зависимости. Для вычисления десятичного логарифма активности испытуемого образца в полученное уравнение подставляли значение десятичного логарифма времени лизиса испытуемого образца.

Количественное определение остаточных белков штамма-продуцента (CHO) проводили методом иммуноферментного анализа, применяя набор «Immunozen zymetric Assay for the Measurement of CHO Host Cell Proteins – Catalog # F015» (Cygnus Technologies), согласно инструкции изготовителя.

Содержание остаточной ДНК штамма продуцента определяли методом количественного ПЦР (qPCR) в реальном времени с использованием системы Taqman (Thermo Scientific), согласно инструкции производителя.

Результаты и обсуждение

Разработка условий очистки рТАП на «CaptureSelect tPA»

Главной задачей данной работы было создание высокопроизводительной технологии хроматографической очистки рТАП, превышающей по своей эффективности известные аналоги и позволяющей получать кондиционный препарат, отвечающий требованиям Европейской фармакопеи.

На первом этапе разработки технологии очистки рТАП был проведен ряд экспериментов, направленных на поиск оптимальной схемы очистки рТАП на аффинном сорбенте.

Критериями приемлемости процесса служили параметры качества белка, содержащегося в элюате с аффинного сорбента: содержание мономера не менее 95%; удельная специфическая активность – от 460,0 до 670,0 тыс МЕ/мг.

Скрининг условий хроматографии на CaptureSelect tPA продемонстрировал, что оптимальная схема включает стадии уравнивания колонны стартовым буфером с нейтральным рН; нанесения культуральной жидкости; отмывки несвязавшихся компонентов стартовым буфером, отмывки связавшихся с сорбентом примесных веществ, при помощи растворов, содержащих NaCl в концентрации до 2 М, или каприлат натрия в концентрации до 0,2 М, или мочевины в концентрации до 1 М и имеющих рН 4,5–6,0; элюцию целевого белка раствором, имеющим рН 3,0–4,0, и содержащим аргинин в концентрации до 0,2 М

или мочевины в концентрации до 2 М в качестве стабилизирующих агентов. Типичная хроматограмма такого процесса приведена на рис. 1.

На рис. 2 и 3 представлено сравнение образцов, полученных по описанному процессу из культуральной жидкости и препарата Активлизе®.

Удельная активность белка в элюате с аффинного сорбента составила 624 тыс МЕ/мг, в биоэквивалентном препарате от 460 до 670 тыс МЕ/мг и соответственно активности референсного препарата. Таким образом, разработанная схема очистки позволяет выделять мономерную активную форму рТАП.

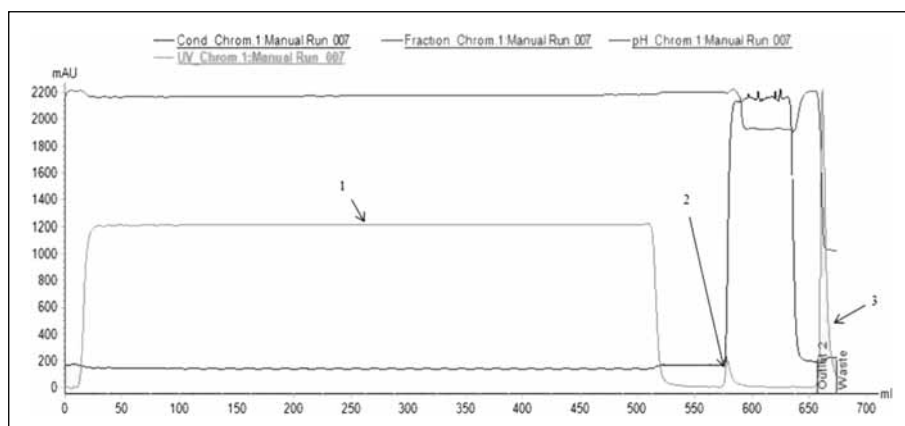


Рис. 1. Типичный вид хроматограммы при определении концентрации рТАП в КЖ при помощи аналитической хроматографии на сорбенте CaptureSelect tPA; 1 – пропуск не связавшихся с колонной примесей; 2 – отмывка связавшихся с колонной примесей; 3 – элюция целевого белка

Fig. 1. Typical chromatogram view in the determination of rtPA concentration of in CF using analytical chromatography on the sorbent CaptureSelect tPA; 1 – overshoot of impurities not bound to the column; 2 – washing of impurities bound to the column; 3 – elution of the target protein

Разработка технологии очистки рТАП с использованием аффинного сорбента

Использование CaptureSelect tPA позволяет создать новую высокоэффективную промышленную технологию получения препарата алтеплазы.

Важной особенностью рТАП является его склонность к агрегации и выпадению в осадок в растворах со значением выше pH 4,5, что обусловлено низкой растворимостью молекул рТАП со 2-м типом гликозилирования. Это свойство рТАП приводит к снижению выхода и качества рТАП из-за накопления олигомеров при проведении очистки. При разработке нового метода очистки рТАП была поставлена задача – создать простую и эффективную схему хроматографической очистки рТАП с использованием указанного аффинного сорбента: уравнивание колонны раствором А (фосфатно-солевой буфер); нанесение культуральной жидкости; отмывка от несвязавшихся примесей раствором А; отмывка сорбента раствором В, имеющим pH 8,0 и содержащим 2 М хлорид натрия, мочевины и каприлат натрия для повышения селективности связывания целевого белка; промывка колонки раствором А для удаления компонентов буфера В; элюция целевого раствора С (50 мМ ацетат натрия, 1 М мочевины, 0,05% полисорбат 80, pH 4,0).

Применение аффинного сорбента на 1-й стадии очистки позволило изолировать целевой белок и достоверно сократить содержание белков штамма-производителя после первой стадии очистки до 300 нг/мг. Однако было установлено, что при использовании аффинного сорбента на 1-й стадии очистки через 10 циклов емкость сорбента снижалась. По этой причине было принято решение перенести аффинную стадию очистки в середину процесса.

Для первичной очистки рТАП было решено использовать цинк-хелатную хроматографию на сорбенте Fractogel EMD Chelate. Несомненные преимущества данного подхода заключаются в высокой емкости по целевому белку (12 мг/мл) и химической стабильности хелатирующих функциональных групп. Разработана схема элю-

ции целевого белка градиентом от 0 до 1 М NaCl в присутствии 1 М мочевины при значении pH

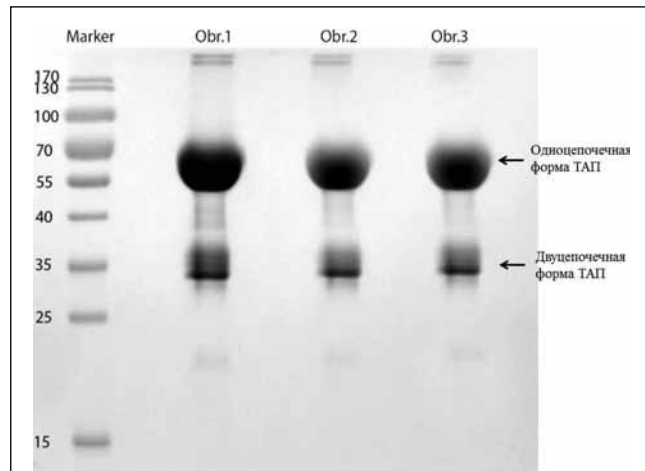


Рис 2. Электрофореграмма. Сравнение элюатов с CaptureSelect tPA, полученных с использованием различных буферов элюции, и оригинального препарата. Obr. 1, Obr.2 – образцы элюатов CaptureSelect tPA, Obr.3 – оригинальный препарат
Fig. 2. Electrophoregram. Comparison of eluates with CaptureSelect tPA, which are obtained using different elution buffers, and the original preparation. Obr. 1, Obr. 2 are CaptureSelect tPA eluate samples; Obr. 3 is an original preparation

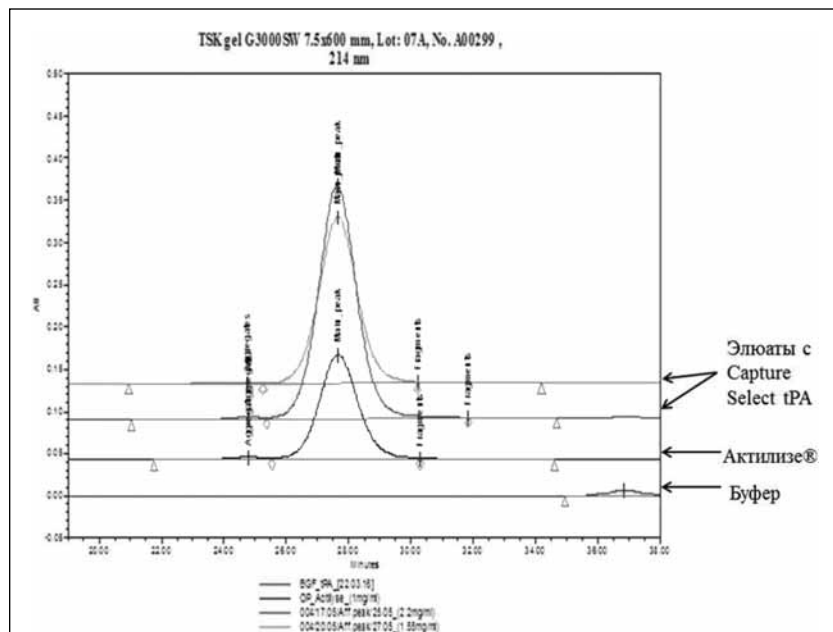


Рис 3. Профиль ВЭЖХ-ГФ элюатов, полученных на CaptureSelect tPA различными способами, в сравнении с оригинальным препаратом
Fig. 3. Profile of HPLC-GP eluates obtained on CaptureSelect tPA in various ways, as compared to that of the original preparation

4,0, позволяющая в 10 раз сократить содержание белков штамма-продуцента в элюате. Выход рТАП при использовании такого способа элюции близок к 90%, окраска и опалесценция в элюате отсутствуют.

Перевод целевого белка в буфер лекарственной субстанции проводился на катионообмен-

ном сорбенте Eshmuno S (Merck Millipore), что быстрее и экономичнее диафильтрации. Разработанная схема процесса предполагает нанесение раствора белка на колонку при pH 4,0 и элюцию непосредственно буфером лекарственной субстанции (400 мМ L-аргинина, 0,02 % полисорбата 80, pH 7,3). Выход со стадии составил около 90%.

Полученный раствор белка далее направляли на стадию очистки от остаточной ДНК штамма-продуцента; на анионообменном сорбенте QSepharoseFF, обеспечивающем эффективное удаление ДНК.

Для обеспечения противовирусной безопасности процесса были разработаны стадии вирусной инактивации и вирусной фильтрации. Вирусная фильтрация осуществлялась на типовых нанофильтрах с предфильтрами. По показателям производительности и стабильности скорости потока выбрана комбинация предфильтра Millex 0,22 мкм и нанофильтра Planova 20N. Средняя скорость потока при такой комбинации составила 46 л/м²·ч, объемная производительность – 114,5 л/м².

При масштабировании фильтрации на фильтре Planova 20N 0,01 м² скорость потока и объемная производительность сохраняются.

Исследована инактивация рТАП с применением сольвент-детергентного метода.

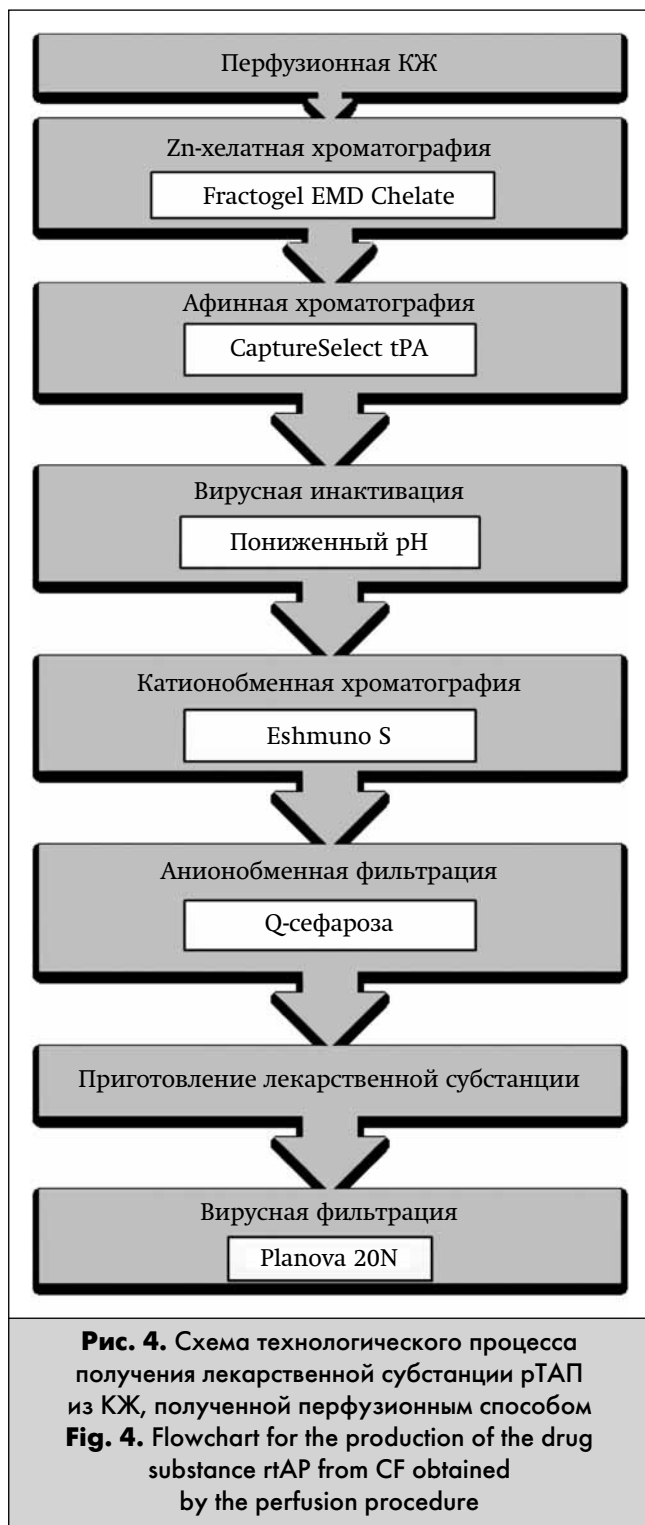
Комбинация разработанных для рТАП стадий очистки позволила создать высокоэффективную схему его очистки, представленную на рис. 4.

Масштабирование и валидация методики очистки рТАП с использованием аффинного сорбента

Апробация методики была проведена на материале, полученном при культивировании штамма-продуцента рТАП в режиме перфузии в механическом биореакторе объемом 3 л с системой перфузии ATF2, перфузией 100% объема реактора в сутки.

Выход очищенного рТАП с использованием разработанной методики на пике продуктивности составил около 125 мг с 1 л культуральной жидкости, средняя продуктивность всего процесса – 58 мг/л КЖ. Средний выход процесса очистки – 60%.

Разработанная схема очистки позволяет получать высокоочищенную субстанцию рТАП (содержание мономерной формы – более 98,0±0,5 %), белков штамма-продуцента – менее 10 нг/мг, остаточной ДНК – менее 5 пг/мг.



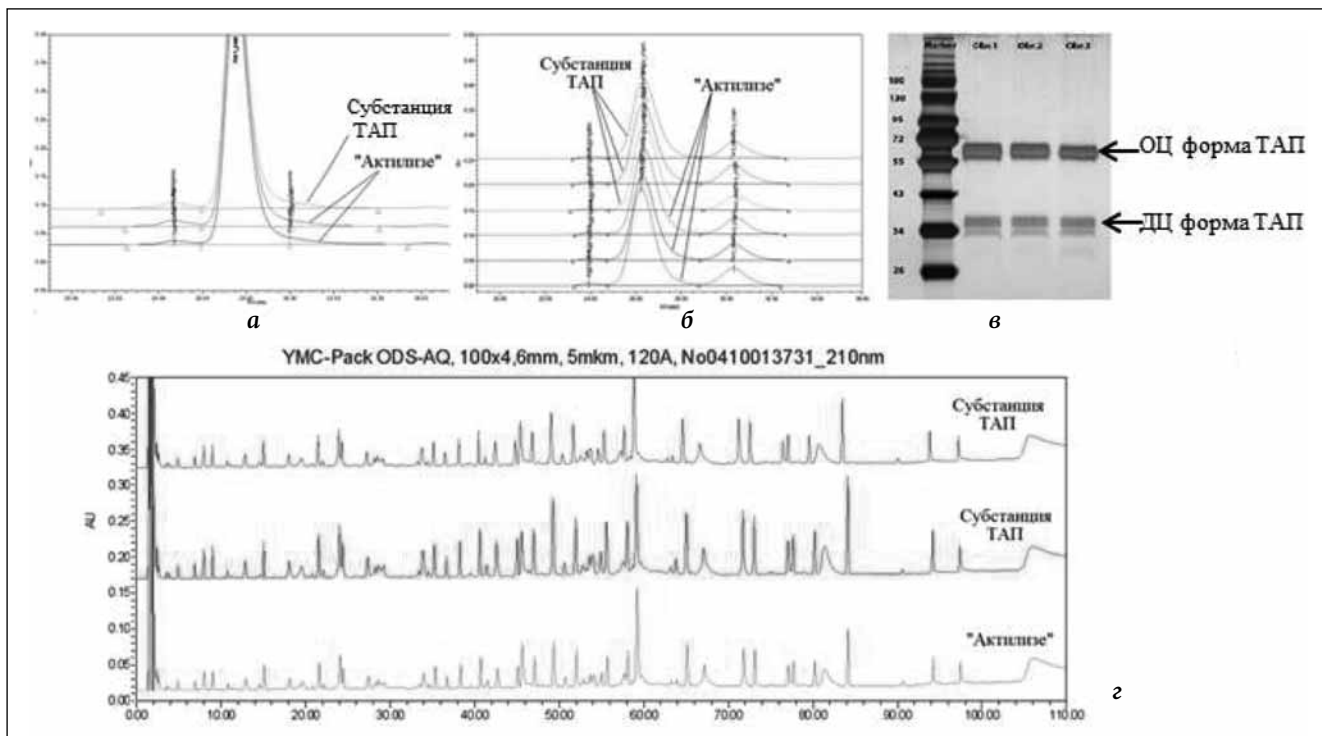


Рис. 5. Сравнение параметров качества препарата Актилизе® и субстанции рТАП, произведенной по разработанной технологии. а – гель-фильтрационная ВЭЖХ; б – гель-фильтрационная ВЭЖХ в присутствии DTT (определение соотношения одно-/двухцепочечной формы); в – ЭФ в ПААГ (Marker – маркер молекулярных весов; Obr. 1, Obr. 2 – препарат Актилизе®, Obr. 3 – субстанция Ревелизе®); г – пептидное картирование

Fig. 5. Comparison of the quality parameters of the drug Actilyse® and the substance rtAP obtained by the developed technology. a – gel-filtration HPLC; b – gel-filtration HPLC in the presence of DTT (determination of single/double-stranded ratio); c – EP in PAAG (Marker is a molecular-weight size marker; Obr. 1, Obr. 2 – the drug Actilyse®, Obr. 3 – the substance Revelyse®); d – peptide mapping

Сравнение ключевых параметров качества субстанции Ревелизе® (АО «ГЕНЕРИУМ») и препарата Актилизе® (Boehringer Ingelheim)

Результаты сравнительного анализа препарата Актилизе® и субстанции Ревелизе® производства АО «ГЕНЕРИУМ» по ключевым характеристикам представлены на рис. 5 и в таблице.

Заключение

Таким образом, разработан и масштабирован новый высокоэффективный способ очистки рТАП, позволяющий получить лекарственную субстанцию, не уступающую по потребительским свойствам референтному препарату Актилизе® (Boehringer Ingelheim) и соответствующую требо-

Сравнение ключевых параметров качества препарата Актилизе® и субстанции рТАП производства АО «Генериум»

Comparison of the key quality parameters of the drug Actilyse® and the substance rtAP manufactured by AO «Generium»

Параметр качества, требования Европейской фармакопеи 7,0 [16]	Препарат Актилизе® (Boehringer Ingelheim)	Субстанция рТАП (АО «ГЕНЕРИУМ»)
Содержание мономерной формы, не менее 95%	97,82	98,21
Соотношение одноцепочечной формы, не менее 60%	81,9 / 16,7	81,3 / 16,8
Активность, около 580 тыс. МЕ/мг	510	560
Содержание белков штамма-производителя, не более 20 нг/мг	6	8
Содержание остаточной ДНК, пг/мг (не регламентировано Европейской Фармакопеей 7,0)	1	4

ваниям Европейской фармакопеи. Также разработан эффективный способ достоверного определения содержания мономерной активной формы рТАП в культуральной жидкости, превосходящий по точности иные аналитические методы.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Литература / References

1. Collaborators G. B. D. C. o. D. Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet* (London, England). 2017. Т. 390; 10100: 1151-210. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32152-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32152-9)
2. Mokdad A. H., Forouzanfar M. H., Daoud F., Mokdad A. A., El Bcheraoui C. et al. Global burden of diseases, injuries, and risk factors for young people's health during 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2016. Т. 387; 10036: 2383-401. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00648-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00648-6)
3. Chapman S. N., Mehndiratta P., Johansen M. C., McMurry T. L., Johnston K. C., Southerland A. M. Current perspectives on the use of intravenous recombinant tissue plasminogen activator (tPA) for treatment of acute ischemic stroke. *Vasc Health Risk Manag*. 2014. Т. 10: 75-87. <https://doi.org/10.2147/VHRM.S39213>
4. Kowey P. R., Fisher L., Giardina E., et al. The tpa controversy and the drug approval process: The view of the cardiovascular and renal drugs advisory committee. *JAMA*. 1988. Т. 260; 15: 2250-2. PMID: 3139900
5. Powers Wj Fau, Rabinstein A. A., Rabinstein Aa Fau, Ackerson T., Ackerson T Fau, et al. 2018 Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association; 1524-4628 (Electronic). <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.118.020176>
6. Ibanez B Fau, James S., James S Fau, Agewall S., Agewall S Fau et al. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC); 1522-9645 (Electronic). <https://doi.org/10.5603/KP.2018.0041>
7. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 22 января 2016 г. №36н «Об утверждении требований к комплектации лекарственными препаратами и медицинскими изделиями упаковок и наборов для оказания скорой медицинской помощи, требования к комплектации лекарственными препаратами и медицинскими изделиями упаковок и наборов для оказания скорой медицинской помощи» [Электронный источник] / <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/71240210/> (дата обращения 01.07.2016). [Order of the Ministry of Health of the Russian Federation dated January 22, 2016 No. 36n «On approval of requirements for completing drugs and medical products for styling and emergency medical kits, requirements for completing medical equipment and medical products for styling and emergency medical kits» (in Russian)]
8. Распоряжение Правительства Российской Федерации от 10 декабря 2018 г. № 2738-р «Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения на 2019 год [Электронный источник] <https://spbmiac.ru/wp-content/uploads/2018/12/перечень-жизненно-необходимых-и-важнейших-лекарственных-препаратов-на-2019-г.pdf>. (дата обращения 01.01.2019). [Order of the Ministry of Health of the Russian Federation dated January 22, 2016 №36n «On approval of requirements for completing drugs and medical products for styling and emergency medical kits, requirements for completing medical equipment and medical products for styling and emergency medical kits» (in Russian)]
9. Ny T., Elgh F., Lund B. The structure of the human tissue-type plasminogen activator gene: correlation of intron and exon structures to functional and structural domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984. Т. 81; 17: 5355-DOI: 10.1073/pnas.81.17.5355
10. Collen D. On the regulation and control of fibrinolysis. Edward Kowalski Memorial Lecture, *Thromb Haemost*. 1980. Т. 43; 2: 77-89. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.17.5355>
11. Кузник Б.И. Геморрагические и тромботические заболевания и синдромы у детей и подростков: Патогенез, клиника, диагностика, терапия и профилактика. Б.И. Кузник, В.Г. Стуров Н.Ю. Левшин, О.Г. Максимова, Д.А. Кудлай. – 2-е изд., перераб. и доп. – Новосибирск: Наука, 2018;– 524 с. [Kuznik B. I. Hemorrhagic and thrombotic diseases and syndromes in children and adolescents: Pathogenesis, clinic, diagnostics, treatment and prevention. B. I. Kuznik, V. G. Sturov N. Yu. Levshin, O. G. Maksimova, D. A. Kudlay. – 2nd ed., pererab. I DOP. Novosibirsk: Nauka, 2018; 524 (in Russian)].
12. Rijken D. C., Wijngaards G., Zaal-de Jong M., Welbergen J. Purification and partial characterization of plasminogen activator from human uterine tissue. *Biochim Biophys Acta*. 1979. Т. 580; 1: 140-53. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(79\)90205-8](https://doi.org/10.1016/0005-2795(79)90205-8)
13. Dodd I., Jalalpour S., Southwick W., Newsome P., Browne M. J., Robinson J. H. Large scale, rapid purification of recombinant tissue-type plasminogen activator. *FEBS Lett*. 1986. Т. 209; 1: 13-7. PMID: 3100325
14. Иванов Р., Секарева Г., Кравцова О., Кудлай Д., Лукьянов С., Тихонова И., Дёмин А., Максимова Л., Никитина И., Обухов А., Зайцев Д., Степанов А., Носырева М., Самсонов М. Правила проведения исследований биоаналоговых лекарственных средств (биоаналогов), Фармакокинетика и фармакодинамика. 2014; 1: 21-36. [Ivanov R., Sekareva G., Kravtsova O., Kudlay D., Lukyanov S., Tikhonova I., Demin A., Maksimova L., Nikitina I., Obukhov A., Zaitsev D., Stepanov A., nosyreva, M., Samsonov, M. Rules of studies of biosimilar medicinal products (biosimilars), *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2014; 1: 21-36 (in Russian)].
15. Мамаев А.Н., Кудлай Д.А. Визуализация данных в презентациях, отчетах и исследованиях. М.: Практическая медицина, 2011: 39. [Mamaev A. N., Kudlay D. A. data Visualization in presentations, reports and studies. M.: Practical medicine, 2011. 39 p (in Russian)].
16. Council of Europe. European Pharmacopoeia 7.0. In: Monograph A. Strasbourg, Council of Europe – 2009 – Alteplase: 1352-5.

Поступила 7 мая 2019 г.

Received May 7 2019

Принята к публикации 5 июня 2019 г.

Accepted June 5 2019