

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043526**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- | | |
|--|--|
| (45) Дата публикации и выдачи патента
2023.05.30 | (51) Int. Cl. <i>A61K 39/395</i> (2006.01)
<i>C07K 16/00</i> (2006.01)
<i>B01D 15/36</i> (2006.01)
<i>B01D 15/38</i> (2006.01)
<i>B01D 29/56</i> (2006.01)
<i>B01J 20/281</i> (2006.01)
<i>B01J 20/282</i> (2006.01)
<i>B01J 20/285</i> (2006.01) |
| (21) Номер заявки
202290693 | |
| (22) Дата подачи заявки
2022.03.25 | |

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНА G ДЛЯ ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ

- | | |
|---|--|
| (43) 2023.05.29 | Первозчиков Антон Борисович,
Вязникова Татьяна Владимировна,
Саканян Елена Ивановна, Иванов
Александр Викторович, Белякова
Ольга Валерьевна, Орлова Екатерина
Владимировна, Зубкова Наталия
Васильевна (RU) |
| (96) 2022000024 (RU) 2022.03.25 | |
| (71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
"НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННОЕ
ОБЪЕДИНЕНИЕ ПО
МЕДИЦИНСКИМ
ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИМ
ПРЕПАРАТАМ "МИКРОГЕН" (RU) | (74) Представитель:
Шульгин В.Д. (RU) |
| (72) Изобретатель:
Николаева Алевтина Максимовна,
Разумихин Михаил Вадимович, | (56) RU-C2-2467783
RU-C2-2728724
CN-B-102250240
RU-C1-2332247 |

- (57) Изобретение относится к медицине, а именно к способам получения иммуноглобулинов из плазмы крови человека, и может быть использовано при производстве лекарственных препаратов. В качестве изобретения заявлен способ получения иммуноглобулина G для внутривенного введения, включающий растворение осадка II+III спиртового фракционирования плазмы крови по Кону в буферном растворе, вирусную сольвент-детергентную инактивацию раствора и его хроматографическую очистку через систему из трех последовательно соединенных колонн, заполненных соответственно гидрофобным, анионообменным и катионообменными сорбентами, с последующим элюированием иммуноглобулина G с колонны, заполненной катионообменным сорбентом. В отличие от прототипа перед хроматографической очисткой проводят фильтрацию вирусинактивированного раствора через глубинный фильтр с задерживающим рейтингом 0,65-4,0 мкм, при этом после элюирования полученный раствор иммуноглобулина G подвергают последовательным стадиям очистки через колонну, заполненную сорбентом для аффинной хроматографии, нанонфильтрации под давлением воздуха через систему из последовательно соединенных фильтров с задерживающим рейтингом 0,2 мкм и 20 нм, диафильтрации против раствора глицина, концентрирования, стерилизующей фильтрации и выдерживании раствора при низком значении pH, причем перед нанонфильтрацией устанавливают содержание белка в растворе иммуноглобулина до 25-31 мг/мл, а перед стерилизующей фильтрацией раствор концентрируют до достижения содержания белка 50-120 мг/мл. Технический результат, достигаемый при осуществлении изобретения, заключается в повышении чистоты произведенного иммуноглобулина G.

043526 B1**043526 B1**

Область техники

Изобретение относится к медицине, а именно к способам получения иммуноглобулинов из плазмы крови человека, и может быть использовано при производстве лекарственных препаратов.

Описание предшествующего уровня техники

Препараты иммуноглобулина человека нормального для внутривенного введения, применяющиеся в терапевтических целях, представляют собой полиспецифичные иммуноглобулины класса G (IgG), изготовленные из плазмы крови здоровых доноров. Иммуноглобулины человека используются при большом количестве (несколько сотен) иммунологических и неврологических заболеваний [Brand A. Brand A, De Angelis V, Vuk T, Garraud O, Lozano M, Politis D; European Mediterranean Initiative for Transfusion Medicine. Review of indications for immunoglobulin (IG) use: Narrowing the gap between supply and demand. *Transfus Clin Biol.* 2021 Feb;28(1):96-122. doi: 10.1016/j.tracli.2020.12.005. Epub 2020 Dec 13. PMID: 33321210.].

Показания к терапии препаратами иммуноглобулина человека различаются в зависимости от региона/страны. Основными нозологиями, при которых показаны иммуноглобулины являются первичный иммунодефицит, хроническая воспалительная демиелинизирующая полирадикулонейропатия (ХВДП), синдром Гийена-Барре и другие [Goddard, E.A. Intravenous immunoglobulin [Text]/E.A. Goddard// *Current Allergy and Clinical Immunology.* - 2008. - Vol. 21. - p. 26-31]. Расширение показаний к применению препаратов иммуноглобулина стало возможным благодаря росту их качества, появлению препаратов с сохраненной Fc-функцией молекулы, прошедших дополнительные стадии очистки и вирусинактивации, обеспечивающие удаление и/или инактивацию вирусов. Условно такие препараты называют "иммуноглобулины четвертого поколения" [Донюш Е.К. Использование внутривенных иммуноглобулинов в клинической практике // *Вопросы современной педиатрии.* - 2011. - Т. 10. - № 2. - с. 49-63.].

Наиболее востребованными за счет удобства применения (скорость введения, более низкие нагрузки объемом введения препарата и др.) являются внутривенные иммуноглобулины с дозировкой 100 мг/1 мл (10%) и выше. Учитывая, что потребность в препаратах иммуноглобулина для внутривенного введения во всем мире растет примерно на 6-8% в год, разработка универсальной вирусбезопасной технологии производства препаратов иммуноглобулинов для внутривенного введения четвертого поколения, отвечающего всем современным требованиям качества, является актуальной.

Известен способ получения иммуноглобулина, раскрытый в патенте РФ на изобретение № 2372939 (опубл. 17.12.2007). Известный способ включает очистку раствора иммуноглобулина, выделенного спиртовым фракционированием по методу Кона, обработку сольвент-детергентной смесью, в качестве которой используют 0,05 М ацетатный буферный раствор при pH 5,5, содержащий 1 мас.% три-н-бутилфосфата и 1 мас.% полисорбата 80 при перемешивании, с последующим разбавлением 0,05 М ацетатным буферным раствором при pH 5,5, содержащим 1 мас.% октаноата натрия, 0,15 М хлорида натрия и пропиленгликоль в концентрации 0,2 г/л, после чего иммуноглобулин иммобилизируют на сульфопропилкатионитном сорбенте и осуществляют промывание в две стадии с помощью колоночной хроматографии с последующей элюцией, причем на первой стадии промывания используют 0,05 М ацетатный буферный раствор при pH 5,5, содержащий 1 мас.% октаноата натрия, 0,15 М хлорида натрия и пропиленгликоль в концентрации 0,2 г/л.

Недостатком известного способа является отсутствие возможности проведения эффективной очистки иммуноглобулина из небогатой фракции - осадка А (по Кону) при обеспечении высокого выхода целевого продукта.

Известен способ очистки иммуноглобулина, раскрытый в патенте РФ на изобретение № 2332247 (опубл. 01.06.2007). Известный способ включает ее растворение в буферном растворе, вирусную сольвент-детергентную инактивацию и хроматографическую очистку, осуществляемую путем пропускания раствора через систему из трех последовательно соединенных колонок, заполненных анионитом, гидрофобным сорбентом и катионитом, соответственно, с промывкой системы колонок, элюированием иммуноглобулина с катионита буферным раствором, и направлением на регенерацию анионита и гидрофобного сорбента.

Недостатком известного способа является невысокая чистота произведенного иммуноглобулина из осадка А (по Кону). Это обусловлено тем, что полученный препарат содержит значительное количество других белковых примесей, примеси липидов. Помимо этого, способ не предусматривает стадий гарантированной очистки препарата от анти-А и анти-В изоагглютининов и инактивации безоболочечных вирусов.

Известен способ хроматографического выделения иммуноглобулина, раскрытый в патенте РФ на изобретение № 2467783 (опубл. 27.11.2012) - прототип. Известный способ включает растворение в буферном растворе белковой фракции плазмы крови, в качестве которой используют осадок А спиртового фракционирования плазмы крови по Кону. Производят предварительную очистку полученного раствора в двух последовательно соединенных колонках, заполненных гидрофобным сорбентом и анионитом, соответственно, с последующим пропусканием через упомянутые две колонки буферного раствора. После сбора предварительно очищенной жидкой фракции, содержащей иммуноглобулин, ее направляют на вирусную сольвент-детергентную инактивацию, а затем на хроматографическую очистку, осуществляемую

в системе из трех последовательно соединенных колонок, заполненных анионитом, гидрофобным сорбентом и катионитом, соответственно. Проводят элюирование иммуноглобулина с колонки, заполненной катионитом, а колонки с анионитом и гидрофобным сорбентом направляют на регенерацию.

Недостатком прототипа является сравнительно невысокая чистота произведенного препарата иммуноглобулина G. Это обусловлено тем, что производственный процесс не содержит стадий очистки препарата от анти-А и анти-В изоагглютининов, а также стадий инактивации безоболочечных вирусов. При этом прототип характеризуется длительным технологическим циклом получения продукта. Продолжительность цикла обусловлена тем, что хроматографическая очистка сырья проводится в два этапа и требует длительного уравнивания хроматографических колонок буферным раствором. Это приводит к тому, что способ позволяет получить недостаточно очищенный продукт при достаточно длительном процессе производства. В совокупности описанные недостатки позволяют говорить о том, что прототип характеризуется недостаточной эффективностью производственного процесса.

Раскрытие сущности изобретения

Техническая задача, положенная в основу изобретения, заключается в создании эффективного технологического процесса производства высокоочищенного вирусбезопасного иммуноглобулина G на основе методов хроматографии.

Технический результат, достигаемый при осуществлении настоящего изобретения, заключается в повышении чистоты произведенного иммуноглобулина G.

Дополнительный технический результат - сокращение продолжительности технологического цикла получения иммуноглобулина G.

В качестве изобретения заявлен способ получения иммуноглобулина G для внутривенного введения, включающий растворение осадка II+III спиртового фракционирования плазмы крови по Кону в буферном растворе, вирусную сольвент-детергентную инактивацию раствора и его хроматографическую очистку через систему из трех последовательно соединенных колонок, заполненных соответственно гидрофобным, анионообменным и катионообменными сорбентами, с последующим элюированием иммуноглобулина G с колонны, заполненной катионообменным сорбентом. В отличие от прототипа перед хроматографической очисткой проводят фильтрацию вирусинактивированного раствора через глубинный фильтр с задерживающим рейтингом 0,65-4,0 мкм, при этом после элюирования полученный раствор иммуноглобулина G подвергают последовательным стадиям очистки через колонну, заполненную сорбентом для аффинной хроматографии, нанонфильтрации под давлением воздуха через систему из последовательно соединенных фильтров с задерживающим рейтингом 0,2 мкм и 20 нм, диафильтрации против раствора глицина, концентрирования, стерилизующей фильтрации и выдерживании раствора при низком значении pH, причем перед нанонфильтрацией устанавливают содержание белка в растворе иммуноглобулина до 25-31 мг/мл, а перед стерилизующей фильтрацией раствор концентрируют до достижения содержания белка 50-120 мг/мл.

В частности, в качестве гидрофобного сорбента используют агарозу с фенильными функциональными группами и размером частиц 45-165 мкм.

В частности, в качестве анионообменного сорбента используют поперечно-сшитый полистиролдивинилбензол с функциональными группами четвертичного полиэтиленimina, средним размером частиц 50 мкм, размером пор не менее 500 и не более 10000 Å.

В частности, в качестве катионообменного сорбента используют поперечно-сшитый полистиролдивинилбензол с сульфопропильными функциональными группами, средним размером частиц 50 мкм, размером пор не менее 500 и не более 10000 Å.

В частности, в качестве сорбента для аффинной хроматографии используют смесь аффинных сорбентов, которая содержит полиметакрилатные гранулы, ковалентно связанные с трисахаридным лигандом антигена А крови, и полиметакрилатные гранулы, ковалентно связанные с трисахаридным лигандом антигена В крови, с размером частиц 65 мкм.

Настоящее изобретение иллюстрируется следующими сопроводительными материалами:

в табл. 1 представлена сравнительная характеристика этапов хроматографической очистки иммуноглобулина G в соответствии с прототипом и заявленным изобретением;

в табл. 2 представлены результаты сравнительной характеристики продолжительности производственного цикла получения препаратов иммуноглобулина G в соответствии с прототипом и заявленным изобретением;

в табл. 3 представлены результаты оценки эффективности вирусной редукции препаратов иммуноглобулина G для внутривенного введения, произведенного в соответствии с заявленным изобретением;

в табл. 4 представлены показатели качества произведенных препаратов иммуноглобулина G для внутривенного введения в сравнении с требованиями Государственной Фармакопеи Российской Федерации и Европейской Фармакопеи.

В соответствии с данными, представленными в табл. 1, заявленный способ в сравнении с прототипом обладает рядом преимуществ в части эффективности производственного цикла препарата. Предложенная последовательность действий способа позволяет сократить продолжительность стадии хроматографической очистки в 6,9 раз с учетом включения дополнительной стадии очистки с применением аф-

финных сорбентов. При этом удалось исключить из процесса стадию предварительной хроматографической очистки иммуноглобулина на двух колоннах, которая по продолжительности составляла 16 ч, а с учетом уравнивания колонн - около 130 ч. Помимо этого, выбор носителей для использования в хроматографических колоннах в качестве гидрофобного, анионообменного и катионообменного сорбентов, позволил добиться снижения требуемого объема сорбента в 1,5-2 раза. Дополнительно увеличена линейная скорость потока при уравнивании, сорбции и элюировании, уменьшен требуемый объем буферного раствора, используемого при уравнивании колонн, сорбции и промывке.

В соответствии с данными, представленными в табл. 2, общая продолжительность процесса получения иммуноглобулина сократилась более чем в 7 раз по сравнению с прототипом, даже с учетом включения дополнительных стадий при подготовке раствора для хроматографической очистки и противовирусной фильтрации.

В соответствии с данными, представленными в табл. 3, результаты исследований полученных препаратов иммуноглобулина G с использованием модельных вирусов указывают на снижение вирусной нагрузки. Установлено снижение вирусной нагрузки на более 10 log для оболочечных и более 5 log для безоболочечных вирусов. Это объясняется наличием в заявленном способе стадий обработки сырья смесью сольвент-детергента, анионообменной хроматографией, нанофильтрацией и выдерживанием при низком значении pH. Помимо этого, вирусная нагрузка дополнительно может быть снижена следующими мероприятиями: отбором и обследованием доноров, тестированием плазмы для фракционирования на маркеры гемотрансмиссивных инфекций.

В соответствии с данными, представленными в табл. 4, основные показатели полученных препаратов иммуноглобулина G полностью соответствует требованиям, установленным Государственной Фармакопеей Российской Федерации и Европейской Фармакопеей.

Описание вариантов осуществления изобретения

Пример 1.

8,5 кг осадка II+III спиртового фракционирования плазмы крови по Кону растворяют в 10 mM натрий-ацетатном буферном растворе с pH 4,65, проводимостью 700 мкСм/см в соотношении 1:10 при температуре $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$. Объем раствора осадка II+III составляет 85 л. После чего в растворе осадка II+III устанавливают pH 4,00 и перемешивают в течение 1-2 ч при температуре $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$. Раствор после перемешивания осветляют с помощью центрифугирования.

Центрифугат (около 83,5 л) подвергают вирусной сольвент-детергентной инактивации в присутствии смеси вирусинактивирующих агентов (сольвент-детергента), в качестве которых используют твин-80 и трибутилфосфат. Концентрация твин-80 и трибутилфосфата в растворе осадка II+III составляет 1,0 % и 0,3% соответственно. Полученный раствор перемешивают при температуре $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$ в течение 6-16 ч. Скорость перемешивания устанавливают такой, чтобы исключить вспенивание раствора.

Далее проводят коррекцию pH вирусинактивированного раствора до значений pH 5,30, проводимости 1400 мкСм/см, выдерживают при температуре $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$ в течение 3 ч и фильтруют через глубинный фильтр с задерживающим рейтингом 0,65-4,0 мкм.

Затем раствор пропускают через три последовательно соединенные хроматографические колонны, которые заполнены различными типами сорбентов (гидрофобным, анионообменным и катионообменным). Первая колонна заполнена 15 л гидрофобного сорбента на основе агарозы с фенильными функциональными группами и размером частиц 45-165 мкм; вторая колонна заполнена 15 л анионообменного сорбента на основе поперечно-сшитого полистиролдивинилбензола с функциональными группами четвертичного полиэтиленимина, средним размером частиц 50 мкм и размером пор 500-10000 Å; третья колонна заполнена 10 л катионообменного сорбента на основе поперечно-сшитого полистиролдивинилбензола с сульфопропильными функциональными группами, средним размером частиц 50 мкм, размером пор 500-10000 Å.

Перед процессом сорбции хроматографические колонны уравнивают натрий-ацетатным буферным раствором с концентрацией 10 mM, pH 4,65, проводимостью 700 мкСм/см. Раствор пропускают с линейной скоростью 55 см/ч. На первой колонне происходит удаление пирогенов и связывание трибутилфосфата, липопротеидов и других примесей. На второй колонне происходит удаление пирогенов, ДНК-, РНК-примесей, белковых агрегатов, трансферрина, церулоплазмينا, иммуноглобулинов M и A. На третьей колонне происходит сорбция иммуноглобулина G. После завершения процесса сорбции первые две колонны отключают и передают на регенерацию, а третью колонну промывают 2 объемами колонны натрий-ацетатным буферным раствором, затем 1% раствором твин-80 (10 объемов колонны); 20% раствором этилового спирта (5 объемов колонны), затем 5 объемами колонны натрий-ацетатного буферного раствора концентрацией 10 mM, pH 4,65, проводимостью 700 мкСм/см.

Далее проводят элюирование иммуноглобулина G с хроматографической колонны, заполненной катионообменным сорбентом. Элюирование иммуноглобулина G проводят 0,2 M натрий-ацетатным буферным раствором с pH 4,80, проводимостью 14,0 мСм/см с линейной скоростью 21,0 см/ч. Полученный раствор пропускают через колонку, заполненную сорбентом для аффинной хроматографии, который представляет собой смесь аффинных сорбентов, содержащую полиметакрилатные гранулы, ковалентно

связанные с трисахаридным лигандом антигена А крови, и полиметакрилатные гранулы, ковалентно связанные с трисахаридным лигандом антигена В крови, с размером частиц 65 мкм. На колонке происходит сорбция изоагглютининов типа А и В, иммуноглобулин G проходит через колонку транзитом в режиме фильтрации. Раствор пропускают с линейной скоростью 100 см/ч. Объем раствора иммуноглобулина после хроматографической очистки составляет 20-30 л, концентрация белка составляет 30 мг/мл.

Далее в растворе после хроматографической очистки устанавливают содержание белка 25 мг/мл с помощью 0,2М натрий-ацетатного буферного раствора с рН 4,95, кондуктивностью 12,5 мСм/см и проводят нанофильтрацию раствора иммуноглобулина под давлением воздуха через систему из последовательно соединенных фильтров с задерживающим рейтингом 0,2 мкм и 20 нм. Первый фильтр в системе предназначен для предварительной очистки раствора, а второй для удаления вирусных частиц. Объем раствора иммуноглобулина после противовирусной нанофильтрации составляет 24-36 л.

Проводят диафильтрацию раствора иммуноглобулина против глицинового буферного раствора с концентрацией глицина 2,0% и рН 3,95 при температуре $(20\pm 5)^\circ\text{C}$ с использованием модулей из ацетата целлюлозы с порогом отсечения 30 кДа. После диафильтрации получают раствор иммуноглобулина с концентрацией белка 50-120 г/л, рН 4,0-4,5, концентрацией глицина 2,0%. Полученный раствор подвергают стерилизующей фильтрации и проводят дополнительную инактивацию вирусов путем выдерживания раствора при рН 4,0-4,5, температуре $36,0-38,0^\circ\text{C}$ в течение 24-48 ч.

При получении иммуноглобулина G в соответствии с заявленным способом выход продукта составляет 4,4 г с 1 л плазмы.

Пример 2.

9,5 кг осадка II+III спиртового фракционирования плазмы крови по Кону растворяют в 30 мМ натрий-ацетатном буферном растворе с рН 5,65, кондуктивностью 2100 мкСм/см в соотношении 1:10 при температуре $(5\pm 3)^\circ\text{C}$. Объем раствора осадка II+III составляет 95 л. После чего в растворе осадка II+III устанавливают рН 5,30 и перемешивают в течение 1-2 ч при температуре $(20\pm 5)^\circ\text{C}$. Раствор после перемешивания осветляют с помощью центрифугирования.

Центрифугат (около 93,5 л) подвергают вирусной сольвент-детергентной инактивации в присутствии смеси вирусиактивирующих агентов (сольвент-детергента), в качестве которых используют твин-80 и трибутилфосфат. Концентрация твин-80 и трибутилфосфата в растворе осадка II+III составляет 1,0% и 0,35% соответственно. Полученный раствор перемешивают при температуре $(20\pm 5)^\circ\text{C}$ в течение 6-16 ч. Скорость перемешивания устанавливают такой, чтобы исключить вспенивание раствора.

Далее проводят коррекцию рН вирусиактивированного раствора до значений рН 5,65, кондуктивности 2100 мкСм/см, выдерживают при температуре $(20\pm 5)^\circ\text{C}$ в течение 3 ч и фильтруют через глубинный фильтр с задерживающим рейтингом 0,65-4,0 мкм.

Затем раствор пропускают через три последовательно соединенные хроматографические колонны. Хроматографические колонны заполняют сорбентом таким же образом, как это было описано в примере 1.

Перед процессом сорбции хроматографические колонны уравнивают натрий-ацетатным буферным раствором с концентрацией 30 мМ, рН 5,65, кондуктивностью 2100 мкСм/см. Раствор пропускают с линейной скоростью 85 см/ч. После завершения процесса сорбции первые две колонны отключают и передают на регенерацию, а третью колонну промывают 2 объемами колонны натрий-ацетатным буферным раствором, затем 1% раствором твин-80 (10 объемов колонны); 20% раствором этилового спирта (5 объемов колонны), затем 5 объемами колонны натрий-ацетатного буферного раствора концентрацией 30 мМ, рН 5,65, кондуктивностью 2100 мкСм/см.

Далее проводят элюирование иммуноглобулина G с хроматографической колонны, заполненной катионообменным сорбентом. Элюирование иммуноглобулина G проводят 0,35 М натрий-ацетатным буферным раствором с рН 5,80, кондуктивностью 17,0 мСм/см с линейной скоростью 42,5 см/ч. Полученный раствор пропускают через колонку, заполненную сорбентом для аффинной хроматографии как указано в примере 1. Объем раствора иммуноглобулина после хроматографической очистки составляет 20-30 л.

Далее в растворе после хроматографической очистки устанавливают содержание белка 31 мг/мл с помощью 0,35 М натрий-ацетатного буферного раствора с рН 5,65, кондуктивностью 15,5 мСм/см и проводят нанофильтрацию раствора иммуноглобулина под давлением воздуха через систему из последовательно соединенных фильтров с задерживающим рейтингом 0,2 мкм и 20 нм. Первый фильтр в системе предназначен для предварительной очистки раствора, а второй для удаления вирусных частиц. Объем раствора иммуноглобулина после противовирусной нанофильтрации составляет 30-40 л.

Проводят диафильтрацию раствора иммуноглобулина против глицинового буферного раствора с концентрацией глицина 3,0% и рН 4,05 при температуре $(20\pm 5)^\circ\text{C}$ с использованием модулей из ацетата целлюлозы с порогом отсечения 30 кДа. После диафильтрации получают раствор иммуноглобулина с концентрацией белка 50-120 г/л, рН 4,5, концентрацией глицина 3,0%. Полученный раствор подвергают стерилизующей фильтрации и проводят дополнительную инактивацию вирусов путем выдерживания раствора при рН 4,5, температуре 36,0-38,0 $^\circ\text{C}$ в течение 24-48 ч.

При получении иммуноглобулина G в соответствии с заявленным способом выход продукта составляет 4,8 г с 1 л плазмы.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения иммуноглобулина G для внутривенного введения, включающий растворение осадка II+III спиртового фракционирования плазмы крови по Кону в буферном растворе, вирусную соль-вент-детергентную инактивацию раствора и его хроматографическую очистку через систему из трех последовательно соединенных колонн, заполненных соответственно гидрофобным, анионообменным и катионообменными сорбентами, с последующим элюированием иммуноглобулина G с колонны, заполненной катионообменным сорбентом, отличающийся тем, что перед хроматографической очисткой проводят фильтрацию вирусинактивированного раствора через глубинный фильтр с задерживающим рейтингом 0,65-4,0 мкм, при этом после элюирования полученный раствор иммуноглобулина G подвергают последовательным стадиям очистки через колонну, заполненную сорбентом для аффинной хроматографии, нанонфильтрации под давлением воздуха через систему из последовательно соединенных фильтров с задерживающим рейтингом 0,2 мкм и 20 нм, диафильтрации раствора иммуноглобулина против раствора глицина, стерилизующей фильтрации и выдерживании раствора при низком значении рН, причем перед нанонфильтрацией устанавливают содержание белка в растворе иммуноглобулина до 25-31 мг/мл, а перед стерилизующей фильтрацией раствор концентрируют до достижения содержания белка 50-120 мг/мл.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве гидрофобного сорбента используют агарозу с фенольными функциональными группами и размером частиц 45-165 мкм.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве анионообменного сорбента используют попеременно-сшитый полистиролдивинилбензол с функциональными группами четвертичного полиэтиленимина, средним размером частиц 50 мкм, размером пор не менее 500 и не более 10000 Å.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве катионообменного сорбента используют попеременно-сшитый полистиролдивинилбензол с сульфопропильными функциональными группами, средним размером частиц 50 мкм, размером пор не менее 500 и не более 10000 Å.

5. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве сорбента для аффинной хроматографии используют смесь аффинных сорбентов, которая содержит полиметакрилатные гранулы, ковалентно связанные с трисахаридным лигандом антигена А крови, и полиметакрилатные гранулы, ковалентно связанные с трисахаридным лигандом антигена В крови, с размером частиц 65 мкм.

Таблица 1

Сравнительная характеристика этапов хроматографической очистки иммуноглобулина

Параметр		Прототип	Заявляемый способ
Объем сорбента, л	Гидрофобный	30,0	15,0
	Анионообменный	30,0	15,0
	Катионообменный	15,0	10,0
Линейная скорость потока, см/ч	Уравновешивание	42,46	85,0
	Сорбция	21,23	55,0-85,0
	Элюирования	10,6	40,0
Объем растворов, л	Уравновешивание	2000	200
	Сорбция	355	320
	Промывка	450	200
	Элюирование	40	40
	Аффинная хроматография	-	20-30
Продолжительность, час	Уравновешивание	66,7	3,3
	Сорбция	23,7	5,2
	Промывка	30	3,3
	Элюирование	4	1,3
	Аффинная хроматография	-	5
Общая продолжительность, час		124,4	18,1

Таблица 2

**Сравнительная характеристика
продолжительности получения иммуноглобулина**

Стадия	Наличие стадии в схеме производства	
	Прототип	Заявляемый способ
Растворение осадка II-III	+ продолжительность 21-31 час	+ продолжительность 3-4 часа
Стадия хроматографической очистки (удаление пирогена, альбумина, гидрофобных белков, липидной фракции и белковых агрегатов)	+ продолжительность 16 часов (130 часов с уравниванием)	-
Стадия хроматографической очистки (удаление вирусинактивирующих агентов и очистка иммуноглобулина)	+ продолжительность 60 часов (132 часа с уравниванием)	+ продолжительность 22-26 часа с уравниванием (уравнивание?)
Противовирусная фильтрация	-	+ продолжительность 5-9 часов
Общая продолжительность	97-107 часов (262 часа с уравниванием колонн)	30-39 часов с уравниванием (? часов с уравниванием колонн)

Таблица 3

**Оценка эффективности вирусной
редукции при производстве препаратов
иммуноглобулина человека согласно изобретению**

	Редукция вирусов Log10							
	Оболочечные вирусы					Безоболочечные вирусы		
	DHBV	HIV-1	HCV	HBV	BVDV	B19V	PPV	EMCV
Общий фактор редукции вирусов	≥ 10,0	≥ 14,0	≥ 10,0	≥ 12,5	≥ 14,5	≥ 11,5	≥ 5,0	≥ 5,5

Примечание: HIV-1 - вирус иммунодефицита человека 1 типа; BVDV - вирус диареи КРС, HCV - вирус гепатита С; DHBV - вируса гепатита В уток, HBV - вирус гепатита В; B19V - парвовирус В19; PPV - парвовирус свиней, EMCV - вирус энцефаломиокардита мышей.

Таблица 4

**Основные характеристики иммуноглобулина
для внутривенного введения, полученного
согласно заявляемому способу**

Показатель	Требования Государственной Фармакопеи Российской Федерации и Европейской Фармакопеи	Среднее по 8 сериям*
Концентрация белка	50 - 120 мг/мл	102,0±1,9 мг/мл
Электрофоретическая однородность	≥95% от общего содержания белка	97.3±0.3 %
Молекулярные параметры	Содержание мономера и димера иммуноглобулина G должно быть не менее 90,0 %, полимеров и агрегатов – не более 3,0 %	99.81±0.08% 0.17±0.08%
Антикомплемментарная активность	1 мг белка иммуноглобулина не должен связывать более 1 ед. (CH ₅₀) комплемента	<1 CH ₅₀ /мг IgG
Анти-А, анти-В гемагглютинины	Агглютинация должна отсутствовать в разведении препарата 1:64	Агглютинация отсутствует
Целостность Fc-фрагмента	≥60% относительно стандарта**	134.6±5.5 %
Активатор прекалликреина	Не более 35 МЕ/мл	4.5±0.3 МЕ/мл
Выход	-	4,25±0,24 г IgG с 1 л плазмы

* 1 серия произведена из 350 л плазмы;

** стандартный образец Human Immunoglobulin BRP (Fc Function and Molecular size) (Ph. Eur.) code Y0001512.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2