

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202290693** (13) **A1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2023.05.29**

(22) Дата подачи заявки  
**2022.03.25**

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)  
*C07K 16/00* (2006.01)  
*B01D 15/36* (2006.01)  
*B01D 15/38* (2006.01)  
*B01D 29/56* (2006.01)  
*B01J 20/281* (2006.01)  
*B01J 20/282* (2006.01)  
*B01J 20/285* (2006.01)

---

**(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНА G ДЛЯ ВНУТРИВЕННОГО  
ВВЕДЕНИЯ**

---

(96) **2022000024 (RU) 2022.03.25**

(71) Заявитель:  
**АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО  
"НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННОЕ  
ОБЪЕДИНЕНИЕ ПО  
МЕДИЦИНСКИМ  
ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИМ  
ПРЕПАРАТАМ "МИКРОГЕН" (RU)**

(72) Изобретатель:  
**Николаева Алевтина Максимовна,  
Разумихин Михаил Вадимович,  
Перевозчиков Антон Борисович,  
Вязникова Татьяна Владимировна,  
Саканян Елена Ивановна, Иванов  
Александр Викторович, Белякова  
Ольга Валерьевна, Орлова Екатерина  
Владимировна, Зубкова Наталия  
Васильевна (RU)**

(74) Представитель:  
**Шульгин В.Д. (RU)**

---

(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 вирусиноактивированного 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, нанофильтрации 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 нанофильтрацией 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 настоящего изобретения, заключается в повышении чистоты произведенного иммуноглобулина G.

---

**A1**

**202290693**

**202290693**

**A1**

## Способ получения иммуноглобулина G для внутривенного введения

### 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 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 № 2 372 939 (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 необогащенной фракции – осадка А (по Кону) при обеспечении высокого выхода целевого продукта.

Известен способ очистки иммуноглобулина, раскрытый в патенте РФ на изобретение № 2 332 247 (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 № 2 467 783 (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 очистки 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 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, нанофильтрации 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 рН, причем перед нанофильтрацией 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 ангстрем.

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 ангстрем.

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 иллюстрируются следующими сопроводительными материалами:

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

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

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

– в таблице 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 таблице 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 аффинных сорбентов. При этом удалось исключить из процесса стадию предварительной хроматографической очистки иммуноглобулина на двух колоннах, которая по продолжительности составляла 16 часов, а с учетом уравнивания колонн около 130 часов. Помимо этого, выбор носителей для использования в хроматографических колоннах в качестве гидрофобного, анионообменного и катионнообменного 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 таблице 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 таблице 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 рН. 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 таблице 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 10ММ натрий-ацетатном буферном растворе с рН 4,65, кондуктивностью 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 рН 4,00 и перемешивают в течение 1-2 часов при температуре  $(20\pm 5)^{\circ}\text{C}$ . Раствор после перемешивания осветляют с помощью центрифугирования.

Центрифугат (около 83,5 л) подвергают вирусной сольвент-детергентной инаktivации в присутствии смеси вирусинаktivирующих 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 часов. Скорость перемешивания устанавливают такой, чтобы исключить вспенивание раствора.

Далее проводят коррекцию рН вирусинаktivированного раствора до значений рН 5,30, кондуктивности 1400 мкСм/см, выдерживают при температуре  $(20\pm 5)^{\circ}\text{C}$  в течение 3 часов 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 полиэтиленмина, средним размером частиц 50 мкм и размером пор 500 - 10000 ангстрем; 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 ангстрем.

Перед процессом сорбции хроматографические колонны уравнивают натрий-ацетатным буферным раствором с концентрацией 10 мМ, рН 4,65, кондуктивностью 700 мкСм/см. Раствор пропускают с линейной скоростью 55 см/час. 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, церулоплазмина, иммуноглобулинов М и А. 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 мМ, рН 4,65, кондуктивностью 700 мкСм/см.

Далее проводят элюирование иммуноглобулина G с хроматографической колонны, заполненной катионообменным сорбентом. Элюирование иммуноглобулина G проводят 0,2 М натрий-ацетатным буферным раствором с рН 4,80, кондуктивностью 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±5)°С 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 °С в течение 24 - 48 ч.

При получении иммуноглобулина G в соответствии с заявленным способом выход продукта составляет 4,4 г с 1 литра 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±3)°С. 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 часов при температуре (20±5)°С. Раствор после перемешивания осветляют с помощью центрифугирования.

Центрифугат (около 93,5 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 0,35% соответственно. Полученный раствор перемешивают при температуре (20±5)°С в течение 6-16 часов. Скорость перемешивания устанавливают такой, чтобы исключить вспенивание раствора.

Далее проводят коррекцию рН вирусинактивированного раствора до значений рН 5,65, кондуктивности 2100 мкСм/см, выдерживают при температуре (20±5)°С в течение 3 часов 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/час. 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 °С в течение 24 - 48 ч.

При получении иммуноглобулина G в соответствии с заявленным способом выход продукта составляет 4,8 г с 1 литра 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 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, 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 фенильными функциональными группами и размером частиц 45 - 165 мкм.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что 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 ангстрем.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что 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 ангстрем.

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 вирусиактивирующих 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%
Антикомплементарная активность	1 мг белка иммуноглобулина не должен связывать более 1 ед. (CH <sub>50</sub> ) комплемента	<1 CH <sub>50</sub> /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 прекаликрина	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.

**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**  
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:  
**202290693**

**А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:**  
См. дополнительный лист

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

**Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:**

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)  
A61K 39/395, C07K 1/30, 16/00, B01D 15/08, 15/36, 15/38, 29/56, B01J 20/281

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)  
Espacenet, ЕАПАТИС, ЕРОQUE Net, Reaxys, Google

**В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ**

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	RU 2467783 C2 (ЗАКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО "БИОХИММАК СТ") 27.11.2012	1-5
A	RU 2728724 C2 (АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО "НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННОЕ ОБЪЕДИНЕНИЕ ПО МЕДИЦИНСКИМ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИМ ПРЕПАРАТАМ "МИКРОГЕН") 13.03.2020	1-5
A	CN 102250240 B (SHANDONG TAIBANG BIOLOGICAL PRODUCT CO.,LTD.) 31.07.2013	1-5
A	RU 2332247 C1 (ЗАКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО "БИОХИММАК СТ") 27.08.2008	1-5

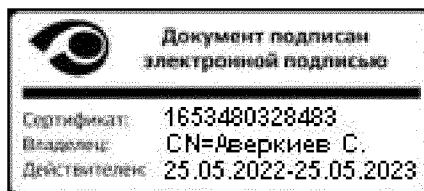
последующие документы указаны в продолжении

\* Особые категории ссылочных документов:  
«А» - документ, определяющий общий уровень техники  
«D» - документ, приведенный в евразийской заявке  
«Е» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее  
«О» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.  
"Р" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения  
«Х» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности  
«У» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории  
«&» - документ, являющийся патентом-аналогом  
«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 12 октября 2022 (12.10.2022)

Уполномоченное лицо:  
Начальник Управления экспертизы



С.Е. Аверкиев



**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**  
**(дополнительный лист)**

Номер евразийской заявки:

**202290693**

КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ (продолжение графы А)

A61K 39/395 (2015.01)  
C07K 16/00 (2006.01)  
B01D 15/36 (2006.01)  
B01D 15/38 (2006.01)  
B01D 29/56 (2006.01)  
B01J 20/281 (2006.01)  
B01J 20/282 (2006.01)  
B01J 20/285 (2006.01)