

## ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ УДАЛЕНИЯ ВИРУСОВ ПРИ ОЧИСТКЕ ИММУНОГЛОБУЛИНА G МЕТОДОМ ХРОМАТОГРАФИИ

### Н.В. Зубкова

д.фарм.н., зам. директора по технологиям, Центр разработок и внедрения,  
АО «Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген» (Москва)  
E-mail: n.v.zubkova@microgen.ru

### М.М. Кузнецова

технолог, цех диагностических препаратов, филиал АО «Научно-производственное объединение  
по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген» в г. Нижний Новгород  
«Нижегородское предприятие по производству бактериальных препаратов «ИмБио» (г. Нижний Новгород)  
E-mail: m.m.kuznetsova@microgen.ru

### А.В. Иванов

к.фарм.н., вед. науч. сотрудник, научный отдел, филиал АО «Научно-производственное объединение  
по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген» в г. Пермь  
«Пермское научно-производственное объединение «Биомед» (г. Пермь)  
E-mail: Ivanoffal@yandex.ru

### Е.В. Филатова

к.б.н., нач. научного отдела, филиал АО «Научно-производственное объединение  
по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген» в г. Нижний Новгород  
«Нижегородское предприятие по производству бактериальных препаратов «ИмБио» (г. Нижний Новгород)  
E-mail: hbsantigen@yandex.ru

### Е.В. Орлова

д.фарм.н., директор филиала АО «Научно-производственное объединение  
по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген» в г. Пермь  
«Пермское научно-производственное объединение «Биомед» (г. Пермь)  
E-mail: e.v.orlova@microgen.ru

### А.М. Николаева

д.б.н., гл. науч. сотрудник, научный отдел, филиал АО «Научно-производственное объединение  
по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген» в г. Пермь  
«Пермское научно-производственное объединение «Биомед» (г. Пермь)  
E-mail: a.m.nikolaeva@microgen.ru

### С.М. Староверов

д.х.н., генеральный директор, ЗАО «БиоХимМак СТ» (Москва)  
E-mail: info@bcmst.ru

### В.С. Карасев

к.б.н., ст. науч. сотрудник, ЗАО «БиоХимМак СТ» (Москва)  
E-mail: karasev@bcmst.ru

**Введение.** Разработан инновационный технологический процесс получения высокоочищенного препарата БиоГам® "Иммуноглобулин человека нормальный, раствор для инфузий, 50 мг/мл, 100 мг/мл", включающий в себя комбинацию методов спиртового фракционирования и хроматографии на ионообменных и гидрофобном носителях и дополнительные стадии инактивации вирусов для достижения надежного уровня безопасности.

**Цель.** Оценить в модельных экспериментах эффективность снижения титра нуклеиновых кислот (НК) вирусов гепатита В (ВГВ), гепатита С (ВГС) и парвовируса В19 (В19V) в процессе хроматографического выделения и очистки иммуноглобулина G из растворов осадков А (фракции II+III по Кону).

**Материал и методы.** Исследования выполнены в модельных экспериментах на трех сериях образцов осадка А, искусственно контаминированных вирусосодержащим материалом с концентрацией НК вирусов ВГВ –  $(1,77 \pm 0,42) \cdot 10^4$  МЕ/мл, ВГС –  $(1,42 \pm 0,14) \cdot 10^3$  МЕ/мл, В19V –  $(1,82 \pm 0,14) \cdot 10^5$  МЕ/мл и подвергнутых хроматографическому разделению в лабораторных условиях на уменьшенной копии технологического процесса. Фактор редукции вирусов определен по изменению вирусной нагрузки в исследуемых фракциях до и после процесса хроматографии.

**Результаты.** Установлено, что процесс хроматографии при выделении иммуноглобулина G из осадка А обеспечивал достоверный и воспроизводимый уровень редукции НК вирусов, в том числе до не определяемого методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) уровня, обеспечивая фактор редукции для ВГВ –  $(3,61 \pm 0,11)$  lg, для В19V –  $(3,77 \pm 0,02)$  lg, для ВГС –  $(2,23 \pm 0,03)$  lg.

**Выводы.** Стадия хроматографии, включенная в процесс производства препарата БиоГам®, вносит значимый вклад в обеспечение вирусной безопасности, при этом эффективность удаления гемотрансмиссивных агентов подтверждена экспериментально.

**Ключевые слова:** иммуноглобулин G, хроматография, обратное масштабирование технологического процесса, вирусная редукция, препараты крови.

**Для цитирования:** Зубкова Н.В., Кузнецова М.М., Иванов А.В., Филатова Е.В., Орлова Е.В., Николаева А.М., Староверов С.М., Карасев В.С. Оценка эффективности удаления вирусов при очистке иммуноглобулина G методом хроматографии. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2019;22(9):30–36. <https://doi.org/10.29296/25877313-2019-09-05>

Проблема вирусной безопасности и подходы к ее решению – один из наиболее актуальных вопросов, который длительное время обсуждается учеными, клиницистами и производителями лечебных препаратов из плазмы крови человека. Перечень гемотрансмиссивных патогенов, ассоциированных с кровью и плазмой крови человека, достаточно обширен, но наиболее опасными инфекционными агентами, риск контаминации которыми до сих пор существует, по праву считаются вирусы гепатитов В (ВГВ), С (ВГС), вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) и парвовирус В19 (В19V) [1, 2].

Для обеспечения безопасности выпускаемых препаратов производители традиционно используют комплекс мер, направленных, прежде всего, на минимизацию риска патогенной контаминации сырья, а также включают в технологические схемы производства дополнительные стадии удаления и/или инактивации вирусов и подтверждают их эффективность [3–5].

Комбинирование методов спиртового фракционирования и хроматографии при разделении белков плазмы в производственной практике позволяет повысить выход препарата, увеличить степень очистки до 99%, сохранить нативную структуру молекулы иммуноглобулина G (IgG), а также значительно сократить технологический цикл [6]. При этом необходимо убедиться, что процесс хроматографии обеспечивает не только очистку IgG, но и сокращение вирусной нагрузки в целевой фракции. При разработке дизайна валидационных исследований для оценки эффективности вирусной редукиции ключевыми моментами являются выбор вирусов для модельных экспериментов, создание адекватной лабораторной модели и статистическая обработка полученных результатов. При выборе метода детекции важно учитывать путь достижения редукиции, при этом для технологических стадий, направленных на удаление

вирусов, адекватным считается применение метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) [1, 7–10].

Цель работы – оценить эффективность снижения титра нуклеиновых кислот (НК) ВГВ, ВГС и В19V на стадии хроматографического выделения и очистки иммуноглобулина G при производстве инновационного препарата БиоГам® «Имуноглобулин человека нормальный хроматографически очищенный, раствор для инфузий, 50 мг/мл, 100 мг/мл».

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Растворы осадков А (фракции II+III по Кону) для моделирования процесса были приготовлены путем контаминации растворов осадков А, полученных из плазмы крови здоровых доноров в соответствии с экспериментально-производственным регламентом на БиоГам® (имуноглобулин человека нормальный хроматографически очищенный) АО НПО «Микроген», растворами осадков А, полученных в лабораторных условиях из искусственно контаминированной плазмы. Для контаминации плазмы использовали стандартные образцы предприятия с содержанием ДНК ВГВ, РНК ВГС и ДНК В19V, представляющие собой лиофилизированную вирусосодержащую плазму, аттестованную по содержанию нуклеиновых кислот вирусов относительно соответствующих стандартов ВОЗ. Выбор вирусов осуществляли исходя из факторов риска и особенностей их физико-химических свойств, а именно наличие и/или отсутствие липидной оболочки, структура генома.

Обратное масштабирование (моделирование процесса) хроматографической очистки и выделения иммуноглобулина G проводили в лабораторных условиях с использованием хроматографической системы Akta Prime Plus («GE Healthcare», Швеция). Основные параметры модельного процесса установлены с учетом уменьшения производственного масштаба приблизительно в 1000 раз (таблица).

**Таблица. Характеристики процесса для моделирования хроматографии в лабораторном масштабе**

Процесс	Сорбент	Высота, см	Диаметр слоя, см (площадь, кв. см)	Объем, л	Линейная скорость потока, см/ч	Поток, мл/мин
Производство	CT-150	10	30 (706)	7,1	Сорбция – 13–21 Промывка – 42 Элюция IgG – 9–10	Сорбция – 150–250 Промывка – 500 Элюция – 110–120
	DEAE	21	30 (706)	15		
	SP	21	30 (706)	15		
Уменьшение масштаба (кратность 1000)	CT-150	10	1,0 (0,785)	0,008	Сорбция – 12–21 Промывка – 42 Элюция IgG – 9–10	Сорбция – 0,17–0,27 Промывка – 0,5 Элюция – 0,12–0,13
	DEAE	19	1,0 (0,785)	0,015		
	SP	19	1,0 (0,785)	0,015		

В основе исследования лежало искусственное создание вирусной нагрузки в исходном материале и последующая оценка остаточной нагрузки в целевой фракции, полученной в процессе хроматографии [1, 8, 9].

Хроматографическую очистку иммуноглобулина G проводили с использованием следующих сорбентов: диасфер СТ-150 (стирол-дивинилбензолные группы) (ЗАО «БиоХимМак СТ», Россия), СПС-БИО DEAE (диэтиламиноэтильные группы) 75–150 мкм и СПС-БИО SP (сульфопропильные группы) 100–250 мкм на основе акрилового полимера (ООО «Техносорбент», Россия). Сорбенты были упакованы в хроматографические колонки УМС, Kronlab ТАС 10/250 с внутренним диаметром 10 мм и длиной 250 мм (УМС Europe GmbH).

Концентрацию нуклеиновых кислот ВГВ, ВГС и В19V в исследуемых пробах определяли методом ПЦР с использованием наборов реагентов производства ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора «Рибо-преп» (для выделения нуклеиновых кислот), «АмплиСенс HCV/HBV/HIV-FL» (аналитическая чувствительность РНК ВГС 100 МЕ/мл, ДНК ВГВ 50 МЕ/мл), «АмплиСенс HCV-Монитор-FL» (линейный диапазон измерения 300–1000000 МЕ/мл), «АмплиСенс HBV-Монитор-FL» (линейный диапазон измерения 150–1000000 МЕ/мл), «АмплиСенс Parvovirus B19-FL» (аналитическая чувствительность – 360 МЕ/мл; линейный диапазон измерения – 720–9000000 МЕ/мл) с помощью прибора «Rotor-Gene 6000» в соответствии с инструкциями по применению используемых диагностических наборов. Количественные исследования выполняли в двух повторах для каждой точки.

Уровень вирусной нагрузки ( $VL_{НК}$ ) в исходном материале и полученных пробах определяли по формуле

$$VL_{НК} = V(m) \times C,$$

где  $VL_{НК}$  – уровень вирусной нагрузки, выраженный в МЕ;  $V(m)$  – объем (мл) материала, исходного или полученного на стадиях модельного процесса;  $C$  – концентрация НК в исследуемом материале (МЕ/мл) или аналитическая чувствительность тест-системы в случае получения отрицательного результата тестирования.

Фактор вирусной редукции (RF) устанавливали для каждой стадии модельного процесса относительно исходного материала по формуле [8]

$$RF = \lg(VL_{НК}(1)/VL_{НК}(2)),$$

где RF – фактор редукции,  $VL_{НК}(1)$  – уровень нагрузки вирусной НК в исходном материале;

$VL_{НК}(2)$  – уровень нагрузки вирусной НК в материале, полученном на исследуемой стадии.

Статистическую обработку данных выполняли с применением программного обеспечения Microsoft Excel. Анализ данных по выборке проводили с помощью среднего значения при доверительном интервале (confidence interval, CI) 95%.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведен модельный процесс хроматографического выделения и очистки иммуноглобулина G, который включал в себя растворение белковой фракции плазмы крови (осадок А) в натрий-ацетатном буферном растворе. Полученную смесь перед сорбцией на колонку контаминировали вирусосодержащим образцом осадка А.

С целью создания адекватной лабораторной модели в исследованиях по определению уровня редукции вирусов с использованием хроматографической очистки имитировали условия производства, за исключением меньшего масштаба. Ключевыми параметрами хроматографии являлись: тип сорбентов для хроматографии, высота слоя сорбента в колонке, скорость потока, состав буфера (включая рН и электропроводимость), объем буфера, температура, нагрузка белка на сорбент и параметры элюции целевого иммуноглобулина.

Полученную реакционную смесь, содержащую IgG, подвергали хроматографической очистке, осуществляемой путем пропускания через систему из трех последовательно соединенных колонн, заполненных соответственно гидрофобным, анионообменным и катионообменным сорбентами.

Пробу подавали через колонны со скоростью около 0,2–0,3 мл/мин. При этом на первой колонне (гидрофобный сорбент) происходило удаление пирогенов, агрегатов, белковых примесей, липидов, а на второй колонне (анионит) происходило удаление пирогенов, ДНК-, РНК-примесей, белковых агрегатов, в то время как IgG, не взаимодействуя с сорбентами, проходил транзитом хроматографические колонки. На третьей колонне (катионит) осуществлялась сорбция иммуноглобулина G.

После нанесения пробы, на колонны с той же скоростью подавали натрий-ацетатный буферный раствор для полного прохождения пробы через все три колонны. Растворы на выходе из колонн, не содержащие ценных компонентов, подвергали обеззараживанию и утилизации.

Далее отсоединяли гидрофобную и DEAE колонны, и проводили элюирование иммуноглобу-

лина G с катионита буферным раствором, используемым для уравнивания системы, но имеющим значения pH и концентрации, необходимые для эффективного выделения целевого белка. Сбор фракций иммуноглобулина G осуществляли на основании показаний детектора оптической плотности при длине волны 280 нм, отраженных на хроматограмме в окне программы «PrimeView 5.31». Затем проводили регенерацию хроматографических колонн в соответствии с экспериментально-производственным регламентом на производство препарата БиоГам®.

Достоверность уменьшенной модели была продемонстрирована на основе анализа полученных хроматограмм, выхода иммуноглобулина G и показателей качества. Контроль качества проводили по следующим показателям: содержание белка, молекулярные параметры с точки зрения процентного содержания мономеров и агрегатов, измеренного с помощью высокоэффективной эксклюзионной хроматографии.

Описанная схема получения хроматографически очищенного иммуноглобулина G графически представлена на рис. 1.

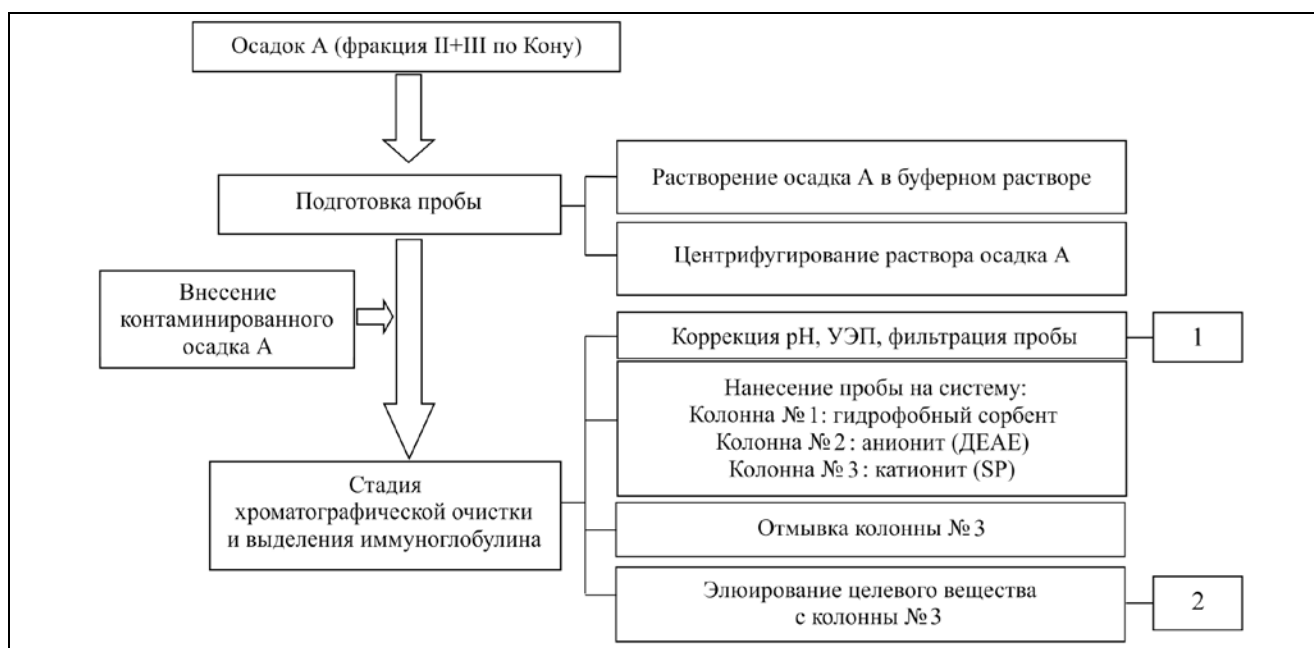


Рис. 1. Схема моделирования хроматографической очистки и выделения иммуноглобулина G (УЭП – удельная электронная проводимость; 1 и 2 – точки отбора проб для расчета редукции вирусов)

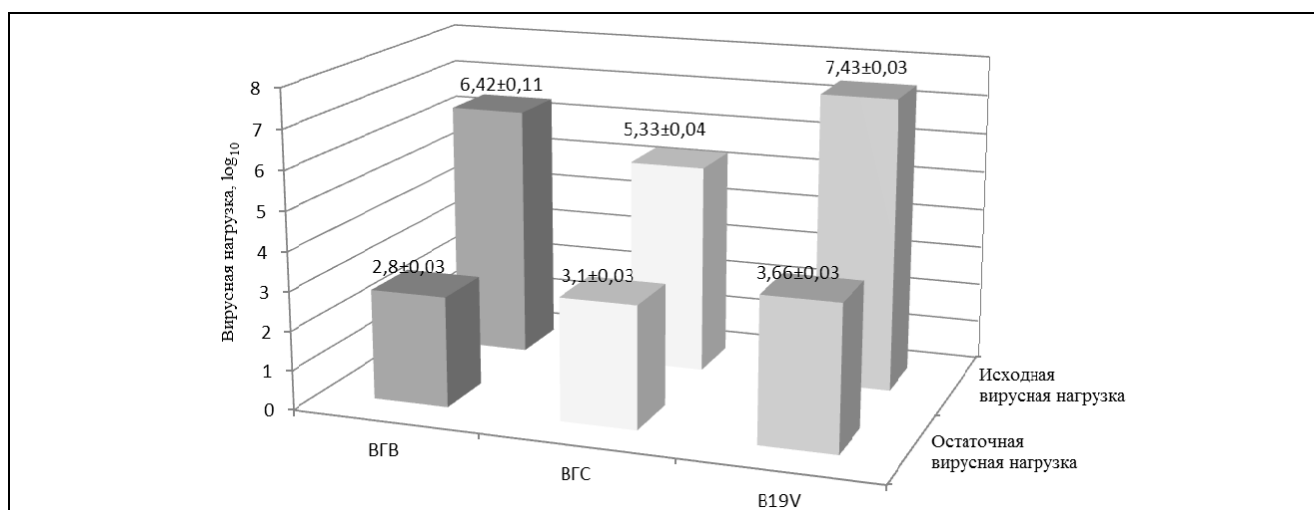


Рис. 2. Изменение вирусной нагрузки BGV, BGS и B19V при выделении и очистке иммуноглобулина G хроматографическим методом

Исходная концентрация НК вирусов в пробе, наносимой на хроматографическую систему, в среднем для трех серий составила:  $(1,77 \pm 0,42) \cdot 10^4$  МЕ/мл для ВГВ,  $(1,42 \pm 0,14) \cdot 10^3$  МЕ/мл для ВГС,  $(1,82 \pm 0,14) \cdot 10^5$  МЕ/мл для В19V. Так как в результате хроматографического процесса происходило изменение объема материала, содержащего целевую фракцию белка, полученные данные не позволяли объективно оценить уровень вирусной редукции. В связи с этим определяли уровень вирусной нагрузки ( $V_{L_{НК}}$ ) с учетом исходного или полученного в ходе процесса объема.

Было установлено, что в образцах целевой фракции иммуноглобулина нуклеиновые кислоты ВГВ, ВГС и В19V отсутствовали, поэтому для расчета фактора редукции использовали численные значения аналитической чувствительности тест-систем. Результаты исследований для трех серий представлены на рис. 2.

Из полученных данных следует, что процесс хроматографической очистки и выделения иммуноглобулина G из раствора осадка А обеспечивает снижение вирусной нагрузки для вирусов гепатита В и парвовируса В19. Фактор вирусной редукции для ВГВ составил  $(3,61 \pm 0,11)$  lg, для В19V  $(3,77 \pm 0,02)$  lg. Для ВГС фактор вирусной редукции составил менее 3,0 lg, однако в ходе хроматографического процесса вирус гепатита С был удален из иммуноглобулина G до не определяемого методом ПЦР уровня.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о задержании основной массы вирусных частиц сорбентами, используемыми в процессе хроматографического выделения и очистки иммуноглобулина G, и снижении вирусной нагрузки в целевой фракции белка.

## Выводы

1. На примере моделирования технологического процесса получения и очистки иммуноглобулина G хроматографическим методом было продемонстрировано, что данный процесс позволяет обеспечить достоверное снижение вирусной нагрузки основных гемотрансмиссивных вирусов.
2. Воспроизводимость результатов в опытах с тремя сериями образцов позволяет признать метод хроматографической очистки и выделения иммуноглобулина G эффективным в удалении оболочечных и безоболочечных вирусов и способным обеспечить дополнительную вирусную редукцию при производстве препаратов иммуноглобулинов.
3. Наличие в производственном процессе дополнительных стадий инактивации вирусов, таких как сольвент-детергентная обработка, инкубация при низких значениях pH, обеспечивает дополнительный уровень вирусной редукции и гарантирует вирусную безопасность инновационного препарата БиоГам® «Имуноглобулин человека нормальный хроматографически очищенный, раствор для инфузий, 50 мг/мл, 100 мг/мл».

## ЛИТЕРАТУРА

1. WHO Guidance document on viral inactivation and removal procedure intended to assure the viral safety of blood plasma products. WHO Technical Report, Series № 924, Annex 4 (2004). Available at: <http://www.who.int/bloodproducts/publication/en/>.
2. Gröner A. Pathogen safety of plasma-derived products – Haemate P/Humate-P. Haemophilia. 2008; 14 (5):54–71. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2008.01852.x>.
3. Velthove K.J., Over J., Abbink K., Janssen M.P. Viral safety of human plasma-derived medicinal products: impact of regulation requirements. Transfus. Med. Rev. 2013; 27 (3): 179–183. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2013.05.002>.
4. Laursen I.A., Blou L., Sullivan J.S., Bang P., Balstrup F., Houen G. Development, manufacturing and characterization of a highly purified, liquid immunoglobulin g preparation from human plasma. Transfus. Med. Hemother. 2014; 41(3): 205–212. DOI: <https://doi.org/10.1159/000357982>.
5. Radomski K.U., Lattner G., Schmidt T., Römisch J. Pathogen safety of a new intravenous immune globulin 10% liquid. BioDrugs. 2017; 31(2): 125–134. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s40259-017-0212-y>.
6. Патент 2467783 (РФ). Способ получения иммуноглобулинов из фракций, которые образуются при фракционировании человеческой плазмы крови [Электронный ресурс] / В.С. Карасев, О.П. Бочкова, С.М. Староверов, И.В. Красильников, А.М. Николаева, В.П. Петровских, А.Б. Перевозчиков; заявл. 30.07.2010; опубл. 10.12.2012. Режим доступа: <http://www.findpatent.ru/patent/246/2467783.html>
7. Roberts P.L., Dunkerley C., Walker C. Virus reduction in an intravenous immunoglobulin by solvent/detergent treatment, ion-exchange chromatography and terminal low pH incubation. Biologicals. 2012; 40(5):345–352. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.04.007>
8. Virus validation studies: the design contribution and interpretation of studies validating the inactivation and removal of viruses. CPMP/BWP/268/95 (1996). Available at: <https://www.ema.europa.eu/virus-validation-studies-design-contribution-interpretation-studies-validating-inactivation-removal>.
9. Правила проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза. Утв. Решением Высшего Евразийского экономического

совета от 03.11.2016. Available at: <http://docs.cntd.ru/document/456026116>.

14.06.2013. Available at: [http://www.consultant.ru/document/cons\\_doc\\_LAW\\_152004/](http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_152004/).

10. Правила надлежащей производственной практики. УТВ. приказом №916 Минпромторга России от

Поступила 13 июня 2019 г.

## EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF VIRUS REMOVAL DURING THE PURIFICATION OF IMMUNOGLOBULIN G BY CHROMATOGRAPHY

© Authors, 2019

### **N.V. Zubkova**

Dr.Sc. (Pharm.), Deputy Head of Technology of R&D Department;  
Joint Stock Company «Microgen Scientific Industrial Company for Immunobiological Medicines» (Moscow)  
E-mail: [n.v.zubkova@microgen.ru](mailto:n.v.zubkova@microgen.ru)

### **M.M. Kuznetsova**

Technologist, Diagnostic Department;  
Branch of Joint Stock Company «Microgen Scientific Industrial Company for Immunobiological Medicines»  
Nizhny Novgorod (Nizhny Novgorod)  
E-mail: [m.m.kuznetsova@microgen.ru](mailto:m.m.kuznetsova@microgen.ru)

### **A.V. Ivanov**

Ph.D. (Pharm.), Leading Research Scientist,  
Branch of Joint Stock Company «Microgen Scientific Industrial Company for Immunobiological Medicines»  
Perm «Biomed» (Perm)  
E-mail: [Ivanoffal@yandex.ru](mailto:Ivanoffal@yandex.ru)

### **E.V. Filatova**

Ph.D. (Biol.), Head of R&D Division;  
Branch of Joint Stock Company «Microgen Scientific Industrial Company for Immunobiological Medicines»  
Nizhny Novgorod «ImBio» (Nizhny Novgorod)  
E-mail: [hbsantigen@yandex.ru](mailto:hbsantigen@yandex.ru)

### **E.V. Orlova**

Dr.Sc. (Pharm.), Director;  
Joint Stock Company «Microgen Scientific Industrial Company for Immunobiological Medicines»  
Perm «Biomed» (Perm)  
E-mail: [e.v.orlova@microgen.ru](mailto:e.v.orlova@microgen.ru)

### **A.M. Nikolaeva**

Dr.Sc. (Biol.), Head of R&D Division;  
Branch Joint Stock Company «Microgen Scientific Industrial Company for Immunobiological Medicines»  
Perm «Biomed» (Perm)  
E-mail: [a.m.nikolaeva@microgen.ru](mailto:a.m.nikolaeva@microgen.ru)

### **S.M. Staroverov**

Dr.Sc. (Chem.), General director; Closed Joint-Stock Company «BioChemMack ST» (Moscow)  
E-mail: [info@bcmst.ru](mailto:info@bcmst.ru)

### **V.S. Karasev**

Ph.D. (Biol.), Leading Research Scientist, Closed Joint-Stock Company «BioChemMack ST» (Moscow)  
E-mail: [karasev@bcmst.ru](mailto:karasev@bcmst.ru)

**Introduction.** An innovative manufacturing process was developed to produce the highly purified preparation BioGam® "Human Immunoglobulin Normal, solution for infusion, 50 mg / ml, 100 mg / ml" using a combination of ethanol fractionation and chromatography on ion exchange and hydrophobic resin and an additional virus inactivation steps to achieve a reliable level of preparation safety.

**Aim.** This study aimed to investigate the nucleic acids (NA) clearance efficacy of the hepatitis B (HBV), hepatitis C viruses (HCV) and parvovirus B19 (B19 V) during chromatography process for the isolation and purification of immunoglobulin G from precipitate A (Cohn fraction II + III).

**Materials and methods.** Investigations were performed in model experiments with 3 series of precipitate A (II+III) samples knowingly contaminated with a virus containing material in which NA concentration of HBV virus was  $(1.77 \pm 0.42) \cdot 10^4$  IU / ml, HCV virus was  $(1.42 \pm 0.14) \cdot 10^3$  IU / ml, B19V virus  $(1.82 \pm 0.14) \cdot 10^5$  IU / ml and which were exposed to chromatographic separation on the scale-down model of the manufacturing process. The virus reduction factor was determined by the change in viral load in product fractions before and after the chromatography process.

**Results.** It has been established that the chromatography process demonstrated a reliable and reproducible level of virus nucleic acids reduction including to an undetectable by PCA level providing a reduction factor for HBV ( $3.61 \pm 0.11$ ) Ig, for HCV ( $2.23 \pm 0.03$ ) Ig and for B19V ( $3.77 \pm 0.02$ ) Ig.

**Conclusion.** A chromatographic stage in the manufacturing process of preparation BioGam® makes a significant contribution to ensuring its viral safety wherein the removal efficiency of blood-transmissible agents has been confirmed experimentally.

**Key words:** immunoglobulin G, chromatography, scale-down model of manufacturing process, viral reduction, blood preparations.

**For citation:** Zubkova N.V., Kuznetsova M.M., Ivanov A.V., Filatova E.V., Orlova E.V., Nikolaeva A.M., Staroverov S.M., Karasev V.S. Evaluation of the effectiveness of virus removal during the purification of immunoglobulin G by chromatography. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2019;22(9):30–36. <https://doi.org/10.29296/25877313-2019-09-05>

## REFERENCES

1. WHO Guidance document on viral inactivation and removal procedure intended to assure the viral safety of blood plasma products. WHO Technical Report, Series № 924, Annex 4 (2004). Available at: <http://www.who.int/bloodproducts/publication/en/>.
2. Gröner A. Pathogen safety of plasma-derived products – Haemate P/Humate-P. Haemophilia. 2008; 14 (5):54–71. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2008.01852.x>.
3. Velthove K.J., Over J., Abbink K., Janssen M.P. Viral safety of human plasma-derived medicinal products: impact of regulation requirements. Transfus. Med. Rev. 2013; 27 (3): 179–183. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2013.05.002>.
4. Laursen I.A., Blou L., Sullivan J.S., Bang P., Balstrup F., Houen G. Development, manufacturing and characterization of a highly purified, liquid immunoglobulin g preparation from human plasma. Transfus. Med. Hemother. 2014; 41(3): 205–212. DOI: <https://doi.org/10.1159/000357982>.
5. Radomski K.U., Lattner G., Schmidt T., Römisch J. Pathogen safety of a new intravenous immune globulin 10% liquid. BioDrugs. 2017; 31(2): 125–134. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s40259-017-0212-y>.
6. Patent 2467783 (RF). Sposob polucheniya immunoglobulinov iz frakcij, kotorye obrazuyutsya pri frakcionirovanii chelovecheskoj plazmy krovi [Elektronnyj resurs] / V.S. Karasev, O.P. Bochkova, S.M. Staroverov, I.V. Krasil'nikov, A.M. Nikolaeva, V.P. Petrovskih, A.B. Perevozchikov; zayavl. 30.07.2010; opubl. 10.12.2012. Rezhim dostupa: <http://www.findpatent.ru/patent/246/2467783.html>
7. Roberts P.L., Dunkerley C., Walker C. Virus reduction in an intravenous immunoglobulin by solvent/detergent treatment, ion-exchange chromatography and terminal low pH incubation. Biologicals. 2012; 40(5):345–352. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biologics.2012.04.007>
8. Virus validation studies: the design contribution and interpretation of studies validating the inactivation and removal of viruses. CPMP/BWP/268/95 (1996). Available at: <https://www.ema.europa.eu/virus-validation-studies-design-contribution-interpretation-studies-validating-inactivation-removal>.
9. Pravila provedeniya issledovaniy biologicheskikh lekarstvennyh sredstv Evrazijskogo ekonomicheskogo soyuza. Utv. Resheniem Vysshego Evrazijskogo ekonomicheskogo soveta ot 03.11.2016. Available at: <http://docs.cntd.ru/document/456026116>.
10. Pravila nadlezhashchej proizvodstvennoj praktiki. Utv. prikazom №916 Minpromtorga Rossii ot 14.06.2013. Available at: [http://www.consultant.ru/document/cons\\_doc\\_LAW\\_152004/](http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_152004/).

---

## Читайте в следующих номерах

**Н.В. Савинова, О.В. Данилова, Н.Г. Наумова, С.Е. Переведенцева, С.Р. Трофимова**

### **ВЛИЯНИЕ МАГНИЯ ОРОТАТА НА ОБМЕН КОЛЛАГЕНА И СОДЕРЖАНИЕ МИНЕРАЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ В КОСТНОЙ ТКАНИ КРЫС СО СТЕРОИДНЫМ ОСТЕОПОРОЗОМ**

**С.А. Тоцкая, М.Ю. Грязнов, С.И. Цыганок, О.М. Савченко**

### **ИЗУЧЕНИЕ СОСТАВА ЖИРНОГО МАСЛА И СОДЕРЖАНИЯ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ У ОСЛИННИКА ДВУЛЕТНЕГО**