



Разработка оптимальных условий нанофильтрации в технологии производства иммуноглобулина G человека нормального для внутривенного введения

Н.В. Зубкова¹, А.М. Николаева¹, А.В. Иванов^{1,✉}, О.В. Белякова¹, М.В. Разумихин¹,
Н.В. Винокурова¹, И.С. Ефимова¹, Т.И. Смолянова², Е.И. Саканян¹

¹ Акционерное общество «Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген», 2-й Волконский переулок, д. 10, Москва, 127473, Российская Федерация

² Акционерное общество «Национальная иммунобиологическая компания», 2-й Волконский переулок, д. 10, Москва, 127473, Российская Федерация

✉ Иванов Александр Викторович; a.v.ivanov@microgen.ru

Резюме

Актуальность. Лекарственные препараты на основе иммуноглобулина G (IgG) из плазмы крови человека широко применяются в терапии бактериальных и вирусных инфекций, первичных и вторичных иммунодефицитов, аутоиммунных заболеваний. Снизить риск производственной контаминации сырья различными патогенами, в том числе вирусами, позволяет процесс нанофильтрации. Для повышения вирусной безопасности необходимы исследования по разработке и внедрению дополнительных этапов инактивации и (или) элиминации вирусов.

Цель. Разработка оптимальных условий процесса нанофильтрации, валидация и масштабирование данной стадии для производства лекарственного препарата иммуноглобулина G человека для внутривенного введения.

Материалы и методы. Раствор IgG из фракции II+III плазмы крови, нанофильтры Planova – 20N и BioEx (Asahi Kasei, Япония), Viresolve Pro (Merck Millipore, США), Virosart – HC и HF (Sartorius, Германия), Pegasus – SV4 и Prime (Pall, США), предфильтры Sartopore из полиэфирсульфона, Virosart MAX (Sartorius, Германия) из полиамида, ЕКХ-Р (Pall, Германия) из регенерированной целлюлозы. Лабораторные исследования по валидации вирусной редукции выполняли с модельными тест-вирусами (ВИЧ-1, трансмиссивного гастроэнтерита (коронавируса) свиней, парвовирус свиней, вирус энцефаломиокардита мышей, вирус бычьей диареи) на базе ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Анализ данных по выборке проводили с помощью среднего значения при 95% доверительном интервале.

Результаты. Установлено, что производительность нанофильтрации для всех выбранных комбинаций «предфильтр – нанофильтр» зависит от концентрации IgG в испытуемом растворе. Максимальная пропускная способность и выход продукта составили: предфильтр (фильтр) ЕКХ-Р с нанофильтром Pegasus SV4 – 6300 г/м² (выход IgG более 95%); ЕКХ-Р или Sartopore (полиэфирсульфон) с Planova 20N – до 2980 г/м² (выход IgG – практически 100% при условии проведения процесса только при концентрации IgG 10 г/л). Для разных комбинаций фильтров уровень редукции соответствовал критериям приемлемости: ВИЧ-1 – от 4,00±0,05 до 4,75±0,04 log₁₀; коронавирус свиней – от 4,30±0,04 до 4,55±0,06 log₁₀; вирус энцефаломиокардита мышей – от 5,38±0,08 до 5,57±0,04 log₁₀; вирус бычьей диареи – более 5,00 log₁₀; парвовирус свиней – от 5,12±0,10 до 5,25±0,08 log₁₀. Статистически достоверного различия в зависимости уровня редукции от марки предфильтров не выявили.

Выводы. Подтверждена эффективность противовирусной нанофильтрации для вирусов с различными размерами вириона и физико-химическими характеристиками, включая мелкий парвовирус В19: уровень редукции вирусов для всех комбинаций составил более $4 \log_{10}$, что соответствует критериям приемлемости. Разработанные в лабораторных условиях параметры и соответствующая им длительность нанофильтрации, а также выход целевого продукта для всех комбинаций исследованных фильтров не изменились при масштабировании. Нанофильтрация может служить эффективным и высокопродуктивным инструментом удаления различных типов вирусов, который не влияет на качество продукта и значительно повышает вирусную безопасность биологических препаратов.

Ключевые слова: иммуноглобулин G человека нормальный; нанофильтрация; производственный процесс; оптимизация; вирусная безопасность; валидация вирусной редукции

Для цитирования: Зубкова Н.В., Николаева А.М., Иванов А.В., Белякова О.В., Разумихин М.В., Винокурова Н.В., Ефимова И.С., Смолянова Т.И., Саканян Е.И. Разработка оптимальных условий нанофильтрации в технологии производства иммуноглобулина G человека нормального для внутривенного введения. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(3–1):400–410. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-1-400-410>

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Determination of optimum nanofiltration conditions for the manufacturing process of human normal immunoglobulin G for intravenous administration

Nataliya V. Zubkova¹, Alevtina M. Nikolaeva¹, Alexander V. Ivanov^{1,✉},
Olga V. Beliakova¹, Mikhail V. Razumikhin¹, Natalia V. Vinokurova¹, Irina S. Efimova¹,
Tatiana I. Smolyanova², Elena I. Sakanyan¹

¹ Microgen Scientific Industrial Company for Immunobiological Medicines, 10 2nd Volkonsky Ln., Moscow 127473, Russian Federation

² National Immunobiological Company, 10 2nd Volkonsky Ln., Moscow 127473, Russian Federation

✉ Alexander V. Ivanov; a.v.ivanov@microgen.ru

Abstract

Scientific relevance. Medicinal products based on immunoglobulin class G (IgG) from human plasma are widely used in clinical practice to treat bacterial and viral infections, primary and secondary immunodeficiencies, and autoimmune diseases. Nanofiltration is a way to mitigate the risk of in-process contamination of raw materials with various pathogens, including viruses. Therefore, it is relevant to investigate the development and implementation of additional viral inactivation and/or elimination steps.

Aim. This study aimed to develop and validate optimum nanofiltration conditions and to scale up the nanofiltration step for the manufacturing of human IgG for intravenous administration.

Materials and methods. The study used a solution of IgG from plasma fractions II and III. The authors paired nanofilters manufactured by Planova 20N and BioEx (Asahi Kasei, Japan), Viresolve Pro (Merck Millipore, USA), Virosart HC and HF (Sartorius, Germany), and Pegasus SV4 and Prime (Pall, USA) with Sartopore polyethersulphone prefilters by Sartorius (Germany), Virosart MAX polyamide prefilters by Sartorius (Germany), and EKX-P regenerated cellulose prefilters by Pall (Germany). Virus reduction validation studies were performed with model viruses (human immunodeficiency virus type 1, porcine transmissible gastroenteritis virus, porcine parvovirus, murine encephalomyocarditis virus, and bovine viral diarrhoea virus) in the

laboratories of the N.F. Gamaleya centre. The sample data analysis involved calculating mean values with 95% confidence intervals.

Results. For all the selected combinations of prefilters and filters, the maximum nanofiltration throughput depended on the IgG concentration in the test solution. With the combination of an EKX-P filter with a Pegasus SV4 nanofilter, the maximum throughput and the IgG yield reached 6300 g/m² and 95%, respectively. When combined with a Planova 20N nanofilter, EKX-P and Sartopore (polyethersulphone) filters provided a maximum throughput of up to 2980 g/m² and an IgG yield of almost 100%, provided that the test solution had an IgG concentration of 10 g/L. With different filter combinations, virus reduction levels ranged from 4.00±0.05 to 4.75±0.04 log₁₀ for human immunodeficiency virus type 1, from 4.30±0.04 to 4.55±0.06 log₁₀ for porcine transmissible gastroenteritis virus, from 5.38±0.08 log₁₀ to 5.57±0.04 log₁₀ for murine encephalomyocarditis virus, 5.12±0.10 log₁₀ to 5.25±0.08 log₁₀ for porcine parvovirus, and exceeded 5.00 log₁₀ for bovine viral diarrhoea virus. The virus reduction levels achieved were not statistically associated with prefilter brands.

Conclusions. The study demonstrated that nanofiltration was effective at removing viruses with various virion sizes and physicochemical characteristics, including viruses as small as parvovirus B19. The levels of virus reduction exceeded 4 log₁₀ and met the acceptance criteria. The laboratory-scale nanofiltration parameters and the corresponding filtration times, as well as IgG yields, did not change when the process was scaled up. Therefore, nanofiltration is an effective and productive technique that helps eliminate various types of viruses and considerably improve viral safety without affecting the quality of biological medicinal products.

Key words: human normal immunoglobulin G; nanofiltration; production process; optimisation; virus safety; viral reduction validation

For citation: Zubkova N.V., Nikolaeva A.M., Ivanov A.V., Belyakova O.V., Razumikhin M.V., Vinokurova N.V., Efimova I.S., Smolyanova T.I., Sakanyan E.I. Determination of optimum nanofiltration conditions for the manufacturing process of human normal immunoglobulin G for intravenous administration. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(3-1):400-410. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-3-1-400-410>

Funding. The study was performed without external funding.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Введение

Лекарственные препараты из плазмы крови человека на основе иммуноглобулина класса G (IgG) широко применяются в клинической практике для терапии бактериальных и вирусных инфекций, первичных и вторичных иммунодефицитов, аутоиммунных заболеваний. При некоторых нозологических формах необходимо введение в больших дозах непосредственно в кровяное русло, что требует разработки особых подходов к обеспечению качества и безопасности таких препаратов [1, 2].

Перечень инфекционных угроз, ассоциированных с плазмой крови человека, обширен, из них наиболее опасна вирусная контаминация сырья. Очевидно, что обеспечение безопасности по отношению к потенциально содержащимся в исходной плазме человека вирусам — одна из основных задач, стоящих перед разработчиками и производителями препаратов крови [3, 4]. Традиционные технологические стадии очистки на производстве — спиртовое фракционирование, хроматография, а также специальные методы инактивации вирусов — недостаточно

эффективны, особенно в отношении мелких безоболочечных вирусов. Это подтверждается данными о случаях посттрансфузионных осложнений после применения препаратов крови [5].

К концу 1990-х годов развитие наук о материалах позволило разработать и вывести на рынок фильтры с размером пор 35 нм, а позднее — 20 нм, которые исключают проникновение через них соответствующих вирусных частиц. В настоящее время на рынке представлены противовирусные фильтры с разным механизмом действия (на основе неспецифической адсорбции, ионообменного захвата патогенных агентов и др.). Нанофильтрация — это наиболее перспективная и воспроизводимая инновационная технология, созданная на основе мембранной фильтрации, но отличающаяся фильтрами с меньшим размером пор [6–8].

Однако при использовании нанофильтрации в реальном производстве, особенно когда речь идет о таких крупных белковых молекулах, как IgG, возникают технологические препятствия: большая длительность стадии фильтрации, часто встречающееся механическое

повреждение мембран, небольшой ресурс нанофильтров, что обусловлено прежде всего очень малым размером пор фильтрующих материалов [6]. Как следствие, формируется относительно высокая себестоимость стадии нанофильтрации.

Цель работы – разработка оптимальных условий процесса нанофильтрации, валидация и масштабирование данной стадии для производства лекарственного препарата иммуноглобулина G человека для внутривенного введения.

Задачи исследования:

- выбор оптимальных условий процесса нанофильтрации;
- исследование разных комбинаций фильтров лабораторного масштаба;
- валидация (подтверждение эффективности) вирусной очистки с использованием широкого спектра модельных вирусов;
- масштабирование процесса в производственных условиях.

Материалы и методы

Раствор IgG для проведения испытаний был получен из фракции II+III плазмы крови в соответствии с экспериментально-производственным регламентом. Основные качественные характеристики препарата, а именно прозрачность, цветность, фракционный состав, молекулярный состав и содержание иммуноглобулинов класса G, соответствовали требованиям ФС.3.3.2.0008.15¹.

В исследование были включены лабораторные нанофильтры производства Planova – 20N и BioEx (Asahi Kasei, Япония), Viresolve Pro (Merck Millipore, США), Virosart – HC и HF (Sartorius, Германия), Pegasus – SV4 и Prime (Pall, США), с площадью фильтрации от 3,1 до 10,0 см². В качестве предфильтров использовали фильтры Sartopore из полиэфирсульфона (PES), диаметр пор – 0,1 мкм; Virosart MAX (Sartorius, Германия) из полиамида – 0,1 мкм; EKX-P (Pall, Германия) из регенерированной целлюлозы (RC) – 0,05–0,2 мкм.

Система для испытания фильтров включала фильтродержатель, компрессор (источник давления), емкость для фильтрата и весы. Исследования проводили при комнатной температуре

и постоянном рабочем давлении (0,8–3,0 бар в зависимости от рекомендаций производителей), которое регулировали с помощью прецизионного регулятора.

Производственные параметры нанофильтрации оценивали по следующим показателям: общая потеря целевого белка (г), производительность (г/м²/мин), пропускная способность (г/м²). Концентрацию белка определяли спектрофотометрическим² и биуретовым методом³.

Физико-химические свойства препаратов оценивали методами, рекомендованными Государственной фармакопеей Российской Федерации⁴. Исследования по валидации (оценке эффективности вирусной редукции) выполнены в соответствии с Правилами проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза⁵.

В основу методики положено искусственное создание вирусной нагрузки в исходном материале с последующим определением остаточной вирусной нагрузки (инфекционности) в целевой фракции после нанофильтрации. Для каждого вируса и комбинации фильтров выполнено по три и более опыта.

Использовали модельные тест-вирусы для контаминации сырья: вирус иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1), трансмиссивного гастроэнтерита свиней (коронавируса свиней), энцефаломиокардита мышей, парвовируса свиней, вирусной диареи – болезни слизистых крупного рогатого скота (вируса бычьей диареи). Модельные тест-вирусы культивировали на чувствительных клеточных линиях в среде DMEM (модифицированная способом R. Dulbecco, среда Игла), содержащей термоинактивированную эмбриональную телячью сыворотку (HyClone, США), глутамин и антибиотики. Исследования с модельными тест-вирусами были выполнены на базе ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Характеристика вирусов из модельных экспериментов представлена в *таблице 1*.

Раствор с материалом, содержащим вирусы, добавляли в растворы IgG непосредственно перед началом модельного процесса в количестве не более 10% от объема раствора IgG, конечная концентрация составля-

¹ ФС.3.3.2.0008.15 Иммуноглобулин человека нормальный для внутривенного введения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

² ОФС.1.2.3.0012.15 Определение белка. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

³ ОФС.1.8.2.0010.18 Количественное определение белка колориметрическим методом с биуретовым реактивом в препаратах крови человека и животных. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2. М.; 2018.

⁴ ФС.3.3.2.0008.15 Иммуноглобулин человека нормальный для внутривенного введения. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

⁵ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза» (с изменениями на 15.07.2022).

Таблица 1. Характеристика вирусов, использованных для моделирования вирусной нагрузки
Table 1. Characteristics of the viruses used in viral load models

Вирус <i>Virus</i>	Штамм <i>Strain</i>	Семейство <i>Family</i>	Геном <i>Genome</i>	Наличие липидной оболочки <i>Lipid envelope</i>	Размер, нм <i>Size, nm</i>	Клеточная линия <i>Cell line</i>
ВИЧ-1 <i>HIV-1</i>	HIV-1899A	<i>Retroviridae</i>	оцРНК <i>ssRNA</i>	+	100–120	MT-4
ТГСВ <i>TGEV</i>	ГКВ 2378 <i>GKV 2378</i>	<i>Coronaviridae</i>	оцРНК <i>ssRNA</i>	+	120–160	SPEV
ПВСв <i>PPV</i>	И-82 <i>I-82</i> ГКВ 2448 <i>GKV 2448</i>	<i>Parvoviridae</i>	дцДНК <i>dsDNA</i>	–	18–26	PK-15
ЭМКВ <i>EMCV</i>	ЕМС <i>EMC</i> ГКВ 787 <i>GKV 787</i>	<i>Picornaviridae</i>	оцРНК <i>ssRNA</i>	–	25–30	L929
ВД–БС КРС <i>BVDV</i>	T-04 <i>T-04</i> ГКВ 2390 <i>GKV 2390</i>	<i>Flaviviridae</i>	оцРНК <i>ssRNA</i>	+	40–60	MDBK

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. ВИЧ-1 – вирус иммунодефицита человека, тип 1; ТГСВ – трансмиссивный гастроэнтерит свиней (коронавирус свиней); ПВСв – парвовирус свиней; ЭМКВ – вирус энцефаломиокардита мышей; ВД–БС КРС – вирус бычьей диареи; MT-4 – перевиваемые лимфобластоидные клетки человека; SPEV – культура клеток почки эмбриона свиньи; PK-15 – культура клеток почек свиньи; L929 – клеточная линия фибробластов мыши, подкожная ткань; MDBK – культура клеток почек теленка; оцРНК – одноцепочечная (двухспиральная) РНК; дцДНК – двухцепочечная (двухспиральная) ДНК.

Note. HIV-1, human immunodeficiency virus type 1; TGEV, porcine transmissible gastroenteritis virus (porcine coronavirus); PPV, porcine parvovirus; EMCV, murine encephalomyocarditis virus; BVDV, bovine viral diarrhoea virus; MT-4, continuous human lymphoblastoid cell line; SPEV, embryonic porcine kidney cell line; PK-15, porcine kidney cell line; L929, mouse fibroblast cell line (subcutaneous tissue); MDBK, Madin–Darby bovine kidney cell line; ssRNA, single-stranded (double-helical) RNA; dsDNA, double-stranded (double-helical) DNA.

ла не менее $5 \log_{10}$ в соответствующих единицах измерения. Для каждого опыта использовали индивидуальный комплект фильтров, предфильтров и расходных материалов. Отбор проб проводили до и после процесса противовирусной фильтрации.

Инфекционную активность вирусов определяли методом 10-кратного титрования проб на чувствительной клеточной линии, выращенной в монослое на 96-луночных планшетах, по достижении максимального проявления цитопатического эффекта в монослое клеток (дополнительно для ВИЧ-1 – при обнаружении вирус-индуцированных синцитиев и накоплении антигена p24 ВИЧ). Титрование вирусов проводили методом Рида–Менча⁶ и выражали в \log_{10} ТЦИД₅₀/мл (50% тканевой цитопатической инфекционной дозы).

Фактор редукции (*RF*) вирусов оценивали по изменению вирусной нагрузки в исследуемых пробах до и после нанофильтрации:

$$RF = \log \left(\frac{V(m)_1 \times T_1}{V(m)_2 \times T_2} \right), \quad (1)$$

где $V(m)_1$ – объем (масса) образца перед фильтрацией, мл (г); $V(m)_2$ – объем (масса) образца после фильтрации, мл (г); T_1 – титр (концентрация) вируса (на 1 мл в образце перед фильтрацией); T_2 – титр (концентрация) вируса (на 1 мл в образце после фильтрации), или предел обнаружения вируса для конкретной аналитической методики.

Статистическую обработку данных проводили с применением программного обеспечения Microsoft Excel, анализ данных по выборке – при помощи среднего значения при 95% доверительном интервале.

Результаты и обсуждение

Основное сырье для производства иммуноглобулинов – плазма крови для фракционирования, которая может быть контаминирована различ-

⁶ Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Epidemiology*. 1938;27(3):493-7.

ными патогенными агентами [6–8]. При выборе технических характеристик наночисток для производства биопрепаратов учитывают прежде всего потенциальные риски, связанные с загрязнением сырья вирусами, а затем – данные о структуре и свойствах целевых молекул. Такие важные характеристики, как размер вирионов, наличие или отсутствие липидной оболочки и строение генома, могут оказать влияние на эффективность инактивирующих процедур. Характеристика основных семейств вирусов, циркулирующих в донорской популяции и представляющих опасность с точки зрения контаминации плазмы для фракционирования, особенно при формировании больших производственных пулов, представлена на рисунке 1.

Риск контаминации плазмы не равнозначен в случае разных типов вирусов и зависит от многих факторов. Существует ряд основных гемотрансмиссивных инфекций, которые развиваются под действием вирусов гепатита С, гепатита В, ВИЧ-1 и ВИЧ-2, и тестирование на маркеры данных патогенов обязательно для каждого донора. Однако в исходном сырье с определенной долей вероятности могут присутствовать и другие вирусы. По результатам выполненных ранее исследований установлено, что один из наиболее распространенных агентов, которым могут быть контаминированы производственные пулы

плазмы, – парвовирус В19. Линейный размер его вирионов 22–24 нм, поэтому в нашей работе использовались наночистки с размером пор не более 20 нм [9].

Известно, что условный размер молекулы IgG в поперечном диаметре составляет около 10–15 нм, это меньше размера пор наночисток, но сопоставимо. Вследствие этого для проведения исследований выбрали высокоочищенную хроматографическую фракцию иммуноглобулина, не содержащую агрегированных молекул.

Для оптимизации параметров наночистки в исследование включили фильтры с различными по типу и материалу мембранами – полволоконными и листовыми PES, PVDF (поливинилиденфторид), PC. Основные технические характеристики фильтров перечислены в таблице 2.

Для выявления оптимальных параметров наночистки использовали наночистки и префильтры лабораторного масштаба, в дальнейшем проводили масштабирование для производственного процесса. Предварительно в серии экспериментов установили, что производительность наночистки для всех выбранных комбинаций «префильтр – наночистка» зависит от концентрации IgG в испытуемом растворе. Оптимальную концентрацию белка оценивали по снижению выхода IgG: для большинства

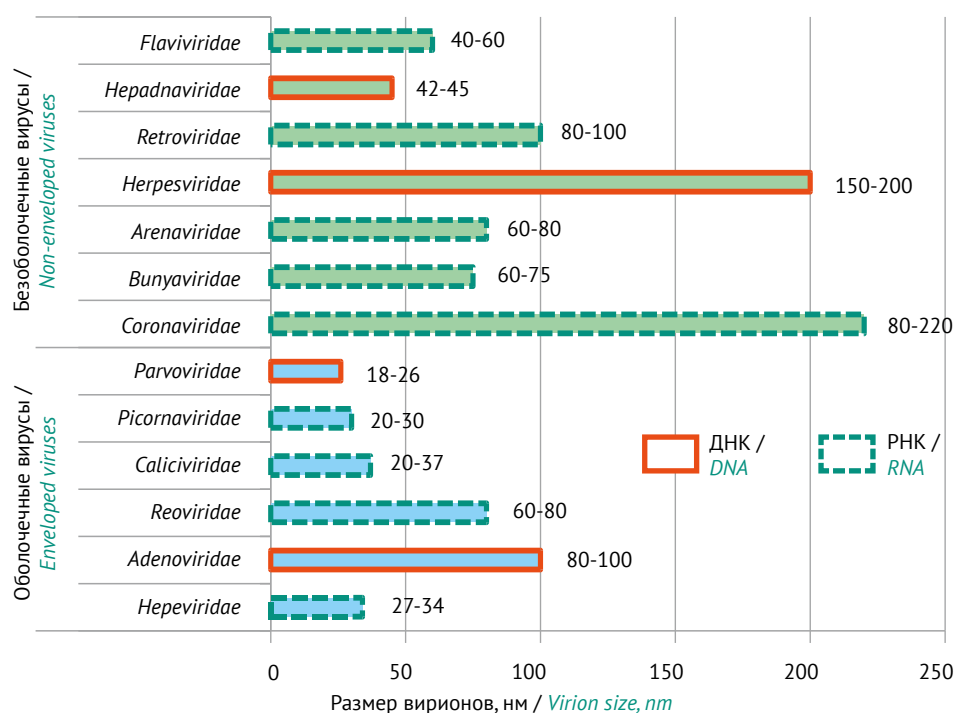


Рисунок из источника [6] переработан авторами / The figure is adapted by the authors from [6]

Рис. 1. Характеристика основных вирусов, циркулирующих в популяции человека.

Fig. 1. Description of the main viruses circulating in the human population.

Таблица 2. Характеристика исследуемых противовирусных фильтров
Table 2. Characteristics of the antiviral filters used in the study

Производитель <i>Manufacturer</i>	Наименование фильтра <i>Filter name</i>	Размер пор, нм <i>Pore size, nm</i>	Рабочее давление для фильтра, бар <i>Filter operating pressure, bar</i>	Материал мембраны фильтра <i>Filter membrane material</i>	Тип мембраны <i>Membrane type</i>	Площадь лабораторно- го фильтра, см ² <i>Laboratory- scale filter area, cm²</i>	Диапазон номи- нальной фильтрующей площади, м ² <i>Nominal filtration area range, m²</i>
Sartorius (Германия/ <i>Germany</i>)	Virosart HC	20	≤2,00	PES	Лист <i>Flat sheet</i>	5,0	0,0005–2,7000
	Virosart HF	20	≤2,00	PES	Полое волокно <i>Hollow fiber</i>	5,0	0,00017– 14,4000
Asahi Kasei (Япония/ <i>Japan</i>)	Planova BioEx	18	≤3,40	PVDF	Полое волокно <i>Hollow fiber</i>	10,0	0,0003–4,0000
	Planova 20N	19	≤0,98	RC	Полое волокно <i>Hollow fiber</i>	10,0	0,001–4,000
Pall (США/ <i>USA</i>)	Pegasus SV4	20	≤3,10	PVDF	Лист <i>Flat sheet</i>	9,6	0,00096– 2,25000
	Pegasus Prime	20	≤3,10	PES	Лист <i>Flat sheet</i>	2,8	0,00028– 3,00000
Merck Millipore (США/ <i>USA</i>)	Viresolve Pro	20	≤2,00	PES	Лист <i>Flat sheet</i>	3,4	0,00034– 1,53000

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. PES – полиэфиросульфон; PVDF – поливинилиденфторид; RC – регенерированная целлюлоза.
Note. PES, polyethersulphone; PVDF, polyvinylidene fluoride; RC, regenerated cellulose.

комбинаций фильтров она составила 10 г/л и менее. Однако для некоторых комбинаций удовлетворительные результаты были получены при концентрации белка до 27 и 34,5 г/л. Также экспериментально установили факт снижения скорости фильтрации из-за закупорки мембранных пор механическими примесями, которые присутствовали в исследуемом растворе. Как правило, в течение первых 1,5 ч не было зафиксировано значительных различий в производительности (г/м²/мин) как листовых, так и полволоконных фильтров разных производителей, однако постепенно скорость фильтрации замедлялась, а для отдельных комбинаций достигала нулевого значения. Результаты измерения пропускной способности различных комбинаций фильтров (г/м²) в течение 8 ч фильтрации представлены на рисунке 2.

По результатам оценки лабораторной производительности фильтров, а также с учетом их стоимости, в том числе для полномасштабного производственного процесса, для проведения нанофильтрации установили оптимальные комбинации «предфильтр – нанофильтр»,

из которых наилучшие результаты показало сочетание ЕКХ-Р (RC) с Pegasus SV4 (PVDF), а также комбинации ЕКХ-Р (RC) или Sartopore (PES) с Planova 20N (RC).

В дальнейшем процесс нанофильтрации масштабировали для производства. Установили, что в случае комбинации фильтров ЕКХ-Р и SV4 пропускная способность стадии – около 6300 г/м², а выход целевого продукта (IgG) – более 95%. Дополнительное технологическое преимущество данной комбинации фильтров проявилось в возможности работать с раствором IgG, а при концентрации белка 27 г/л – работать без существенного изменения выхода продукта. При фильтрации раствора иммуноглобулина с помощью комбинации ЕКХ-Р (RC) или Sartopore (PES) с Planova 20N максимальная пропускная способность была в диапазоне от 930 до 2980 г/м². Фильтр Planova 20N дал практически 100% выход целевого продукта, но процесс можно было вести только при концентрации IgG 10 г/л.

При внедрении нанофильтрации (как и любой другой технологической стадии вирусной

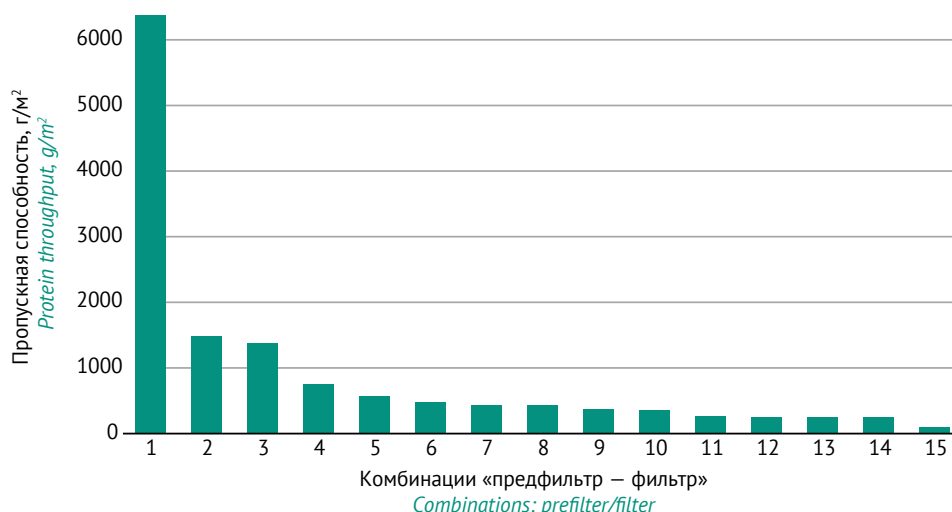


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 2. Пропускная способность исследованных комбинаций предфильтров и нанофильтров. Предфильтр/фильтр/концентрация белка в растворе: 1 – Pegasus SV4 (PVDF)/ЕКХ-Р (RC)/27,4 г/л; 2 – Planova 20N (RC)/ЕКХ (RC)/10 г/л; 3 – Planova BioEx (PVDF)/ЕКХ-Р (RC)/34,5 г/л; 4 – Planova 20N (RC)/Sartopore (PES)/10 г/л; 5 – Planova 20N (RC)/Sartopore (PES)/15 г/л; 6 – Planova BioEx (PVDF)/Sartopore (PES)/10 г/л; 7 – Virosart HC (PES)/Virosart Max (PA)/10 г/л; 8 – Virosart HC (PES)/Sartopore (PES)/10 г/л; 9 – Viresolve Pro (PES)/Sartopore (PES)/10 г/л; 10 – Virosart HF (PES)/Sartopore (PES)/10 г/л; 11 – Virosart HC (PES)/Sartopore (PES)/27,4 г/л; 12 – Planova 20N (RC)/Sartopore (PES)/27,4 г/л; 13 – Viresolve Pro (PES)/Sartopore (PES)/15 г/л; 14 – Planova 20N (RC)/ЕКХ-Р (RC)/34,5 г/л; 15 – Pegasus Prime (PES)/Sartopore (PES)/10 г/л. PES – полиэфирсульфон; PVDF – поливинилиденфторид; RC – регенерированная целлюлоза.

Fig. 2. Throughputs of various combinations of prefilters and nanofilters. Prefilter/filter/protein solution concentration: 1, Pegasus SV4 (PVDF)/EKX-P (RC)/27.4 g/L; 2, Planova 20N (RC)/EKX-P (RC)/10 g/L; 3, Planova BioEx (PVDF)/EKX-P (RC)/34.5 g/L; 4, Planova 20N (RC)/Sartopore (PES)/10 g/L; 5, Planova 20N (RC)/Sartopore (PES)/15 g/L; 6, Planova BioEx (PVDF)/Sartopore (PES)/10 g/L; 7, Virosart HC (PES)/Virosart Max (PA)/10 g/L; 8, Virosart HC (PES)/Sartopore (PES)/10 g/L; 9, Viresolve Pro (PES)/Sartopore (PES)/10 g/L; 10, Virosart HF (PES)/Sartopore (PES)/10 g/L; 11, Virosart HC (PES)/Sartopore (PES)/27.4 g/L; 12, Planova 20N (RC)/Sartopore (PES)/27.4 g/L; 13, Viresolve Pro (PES)/Sartopore (PES)/15 g/L; 14, Planova 20N (RC)/EKX-P (RC)/34.5 g/L; 15, Pegasus Prime (PES)/Sartopore (PES)/10 g/L. PES, polyethersulphon; PVDF, polyvinylidene fluoride; RC, regenerated cellulose.

редукции) в производственный процесс требуется доказательство ее эффективности в редукции вирусных контаминантов из плазмы. План валидационных исследований разрабатывают после установления производственных параметров процесса, но валидацию выполняют только в лабораторных условиях. Для этого проводят обратное масштабирование: расчет необходимого объема раствора IgG и количества суспензии, содержащей вирусы, для лабораторных модельных экспериментов, исходя из расчета нагрузки на 1 м² фильтра. Параметры обратного масштабирования производственного процесса для нанофильтров Pegasus SV4 и Planova 20N представлены в *таблице 3*.

Для проведения валидации вирусной редукции выбрали модельные вирусы с различными свойствами. Все вирусы, использованные в экспериментах, представлены в *таблице 1*. При оптимальных параметрах нанофильтрации с комбинацией «предфильтр – фильтр» экспериментально установили уровень редукции вирусов: ВИЧ-1 – от 4,00±0,05 до 4,75±0,04 log₁₀; коронавируса свиней – от 4,30±0,04 до 4,55±0,06 log₁₀; парво-

вируса свиней – от 5,12±0,10 до 5,25±0,08 log₁₀; энцефаломиокардита мышей – от 5,38±0,08 до 5,57±0,04 log₁₀; вируса бычьей диареи – более 5,00 log₁₀. Не установлено статистически достоверного различия в зависимости уровня редукции от марки предфильтров. Графические результаты редукции вирусов при нанофильтрации для двух комбинаций «предфильтр – фильтр» представлены на *рисунке 3*.

По результатам сравнения физико-химических и биологических характеристик IgG после нанофильтрации с исходными значениями установили, что нанофильтрация не влияет на характеристики продукта и все серии имеют сопоставимые качественные характеристики по всем физико-химическим и биологическим показателям, включая функцию Fc-фрагмента, антикомплементарную активность, содержание специфических антител. Не выявлено изменений в распределении подклассов иммуноглобулинов, при этом содержание мономеров и димеров IgG для некоторых экспериментов увеличилось с 97,3±0,2 до 99,1±0,3%, что свидетельствует об удалении олигомеров из продуктов во время

Таблица 3. Параметры моделирования противовирусной фильтрации для разных нанофильтров в лабораторном и производственном масштабе

Table 3. Parameters of laboratory-scale and production-scale models of antiviral filtration steps with different nanofilters

Масштаб <i>Scale</i>	Параметр <i>Parameter</i>				
	Площадь фильтра <i>Filter area</i>	Объем раствора IgG <i>IgG solution volume</i>	Максимальное давление, бар <i>Maximum pressure, bar</i>	Характеристика раствора IgG (концентрация белка, %) <i>IgG solution concentration, %</i>	Время фильтрации, ч <i>Filtration time, h</i>
Нанофильтр Planova 20N / <i>Planova 20N nanofilter</i>					
Производственный <i>Production</i>	1 м ² <i>1 m²</i>	До 100 л <i>Up to 100 L</i>	0,8–0,9	1	8–10
Лабораторный (1:1000) <i>Laboratory (1:1000)</i>	10 см ² <i>10 cm²</i>	75–85 мл <i>75–85 mL</i>	0,8–0,9		8–10
Нанофильтр Pegasus SV4 / <i>Pegasus SV4 nanofilter</i>					
Производственный <i>Production</i>	0,25 м ² <i>0.25 m²</i>	20–30 л <i>20–30 L</i>	2,9–3,1	2,7	4–6
Лабораторный (1:1000) <i>Laboratory (1:1000)</i>	9,6 см ² <i>9.6 cm²</i>	107–121 мл <i>107–121 mL</i>	2,9–3,1		4–6

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

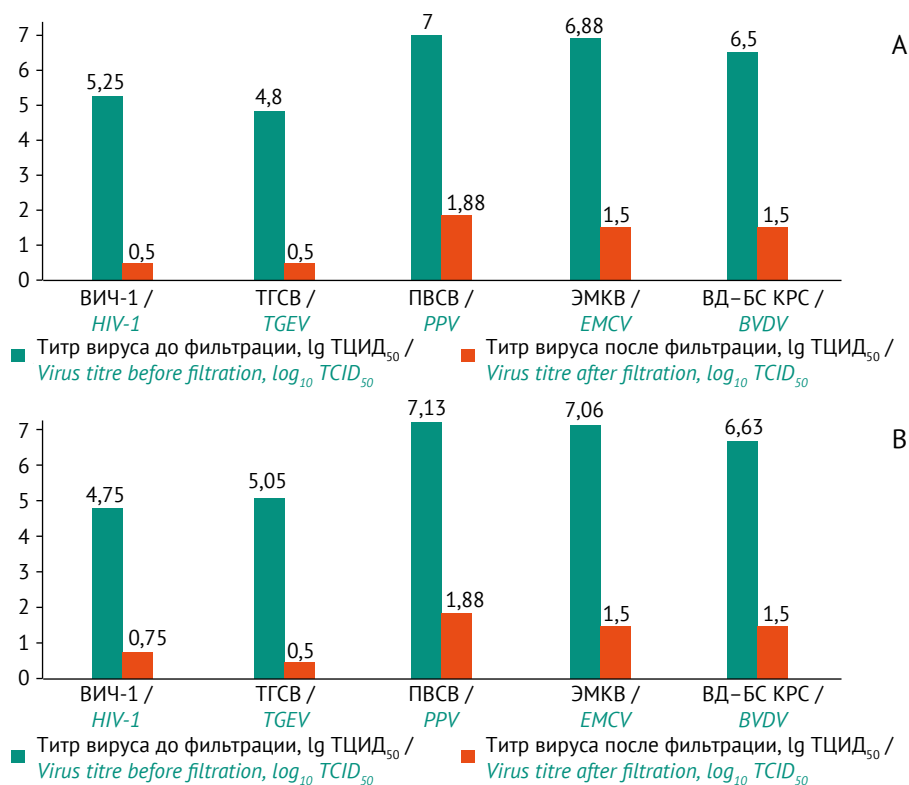


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 3. Редукция вирусов при нанофильтрации с разными комбинациями «предфильтр – фильтр». А – Planova 20N и Sartopore; В – Pegasus SV 40 и ЕКХ-Р. Ось ОХ – модельные тест-вирусы, ОУ – титр вируса. ТЦИД₅₀ – 50% тканевой цитопатической инфекционной дозы, ВИЧ-1 – вирус иммунодефицита человека, тип 1, ТГСВ – трансмиссивный гастроэнтерит свиней (коронавирус свиней), ПВСВ – парвовирус свиней, ЭМКВ – вирус энцефаломиокардита мышей, ВД-БС КРС – вирус диареи – болезни слизистых крупного рогатого скота.

Fig. 3. Virus reduction with nanofiltration using different combinations of filters and prefilters: A, Planova 20N and Sartopore; B, Pegasus SV 40 and EKX-P. HIV-1, human immunodeficiency virus type 1; TGEV, porcine transmissible gastroenteritis virus (porcine coronavirus); PPV, porcine parvovirus; EMCV, murine encephalomyocarditis virus; BVDV, bovine viral diarrhoea virus; TCID₅₀, 50% tissue culture infectious dose. The X-axis represents model test-viruses; the Y-axis shows virus titres.

противовирусной фильтрации и повышении качества конечного продукта.

Заключение

Производительность нанофильтрации для всех выбранных комбинаций «предфильтр – нанофильтр» зависит от концентрации IgG в испытуемом растворе. При максимальной пропускной способности (6300 г/м²) выход IgG составил более 95%.

Результаты подтвердили эффективность нанофильтрации для удаления вирусов с различными размерами вириона и физико-химическими характеристиками, включая парвовирус B19 и другие мелкие безоболочечные вирусы. Установленный уровень редукции для всех комбинаций «предфильтр – фильтр» составил более 4 log₁₀, что соответствует критериям приемлемости.

Литература/References

1. Киргизов КИ. Терапия внутривенными иммуноглобулинами в детской гематологии-онкологии и при трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. *Российский журнал детской гематологии и онкологии*. 2018;5(2):32–9.
Kirgizov KI. Therapy with intravenous immunoglobulins in pediatric hematology-oncology and transplantation of hematopoietic stem cells. *Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology*. 2018;5(2):32–9 (In Russ.).
<https://doi.org/10.17650/2311-1267-2018-5-2-32-39>
2. Radomski K, Lattner G, Schmidt T, Römisch J. Pathogen safety of a new intravenous immune globulin 10% liquid. *BioDrugs*. 2017;31(2):125–34.
<https://doi.org/10.1007/s40259-017-0212-y>
3. Соломай ТВ, Семененко ТА, Каражас НВ, Рыбалкина ТН, Корниенко МН, Бошьян РЕ и др. Оценка риска инфицирования герпесвирусами при переливании донорской крови и ее компонентов. *Анализ риска здоровью*. 2020;(2):135–42.
Solomay TV, Semenenko TA, Karazhas NV, Rybalkina TN, Kornienko MN, Boshyan RE, et al. Assessing risks of infection with herpes viruses during transfusion of donor blood and its components. *Health Risk Analysis*. 2020;(2):135–42 (In Russ.).
<https://doi.org/10.21668/health.risk/2020.2.15>
4. Crabol Y, Terrier B, Rozenberg F, Pestre V, Legendre C, Hermine O, et al. Intravenous immunoglobulin therapy for pure red cell aplasia related to human parvovirus B19 infection: a retrospective study of 10 patients and review of the literature. *Clin Infect Dis*. 2013;56(7):968–77.
5. Ma S, Pang G, Shao Y, Hongo-Hirasaki T, Shang M, Inouye M, et al. Validation and implementation of Planova™ BioEX virus filters in the manufacture of a new liquid intravenous immunoglobulin in China. *Biologicals*. 2018;52:37–43.
<https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2018.01.004>
6. Shokri Doodeji M, Zerafat MM. A review on the applications of nanofiltration in virus removal and pharmaceutical industries. *Glob J Nanomed*. 2018;3(5):555624.
<https://doi.org/10.19080/GJN.2018.03.555624>
7. Caballero S, Diez JM, Belda FJ, Otegui M, Herring S, Roth N, et al. Robustness of nanofiltration for increasing the viral safety margin of biological products. *Biologicals*. 2014;42(2):79–85.
<https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2013.10.003>
8. Inouye M, Burnouf T. The role of nanofiltration in the pathogen safety of biologicals. *Curr Nanosci*. 2019;16(3):413–24.
<https://doi.org/10.2174/1573413715666190328223130>
9. Филатова ЕВ, Зубкова НВ, Анастасиев ВВ. Выявление генетических и серологических маркеров парвовируса В19 в производственных пулах плазмы для фракционирования. *Биопрепараты*. 2013;(2):28–31.
Filatova EV, Zubkova NV, Anastasiev VV. Identification of genetic and serological markers of parvovirus B19 in the production pools of plasma for fractionation. *Biopreparation (Biopharmaceuticals)*. 2013;(2):28–31 (In Russ.).
EDN: [RDXVEB](https://dx.doi.org/10.26907/2542-1248.2013.2.28-31)

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Н.В. Зубкова** – обоснование концепции исследования, разработка дизайна экспериментального исследования,

Установлено, что процесс нанофильтрации не оказывает влияния на биологические и физико-химические характеристики иммуноглобулинов, что подтверждено сравнительными исследованиями препарата до и после нанофильтрации с использованием методов, рекомендуемых Государственной фармакопеей Российской Федерации.

Разработанные в лабораторных условиях параметры нанофильтрации и выход целевого продукта при изучении всех комбинаций исследованных фильтров не менялись при масштабировании в производстве и не приводили к изменениям длительности процесса.

Процесс нанофильтрации можно охарактеризовать как высокопроизводительную стадию при соблюдении оптимальных условий и эффективный инструмент для повышения вирусной безопасности препаратов иммуноглобулинов.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **N.V. Zubkova** substantiated the study concept, designed the experiments, summarised and interpreted the study results,

обобщение и интерпретация результатов исследования, оформление текста рукописи; **А.М. Николаева** – обоснование концепции исследования, сбор, анализ, обобщение и интерпретация результатов исследования, редактирование и переработка текста рукописи; **А.В. Иванов, О.В. Белякова, М.В. Разумихин, Т.И. Смолянова** – координирование этапов исследования, подготовка серий препарата для исследования, сбор, анализ и систематизация экспериментальных данных; **Н.В. Винокурова, И.С. Ефимова** – организация валидационных исследований процесса инактивации патогенных вирусов, сбор, анализ и систематизация экспериментальных данных; **Е.И. Саканян** – организация, координирование этапов исследования, редактирование и переработка текста рукописи.

and formatted the manuscript. **A.M. Nikolaeva** substantiated the study concept, summarised and interpreted the study results, revised and edited the manuscript. **A.V. Ivanov, O.V. Beliakova, T.I. Smolyanova, M.V. Razumikhin** coordinated the study; prepared IgG solution batches for the study; collected, collated, and analysed experimental data. **N.V. Vinokurova, I.S. Efimova** organised validation studies of the process for pathogenic virus inactivation; collected, collated, and analysed experimental data. **E.I. Sakanyan** organised and coordinated the study, revised and edited the manuscript.

Об авторах / Authors

Зубкова Наталия Васильевна, д-р фарм. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5795-4401>
ng-zubkoff@yandex.ru

Николаева Алевтина Максимовна, д-р биол. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3160-518X>
nikolaeva.alla@gmail.com

Иванов Александр Викторович, канд. фарм. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7608-1914>
Ivanoffal@yandex.ru

Белякова Ольга Валерьевна, канд. фарм. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6352-9380>
o.v.beliakova@yandex.ru

Разумихин Михаил Вадимович
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7364-5235>
razumikhin.m@gmail.com

Винокурова Наталья Владимировна
ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-6583-3277>
n.v.vinokurova@microgen.ru

Ефимова Ирина Сергеевна
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3757-1953>
efimovai@mail.ru

Смолянова Татьяна Ивановна
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2934-3002>
tatianasmolyanova@gmail.com

Саканян Елена Ивановна, д-р фарм. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8536-4804>
e.i.sakanjan@microgen.ru

Nataliya V. Zubkova, Dr. Sci. (Pharm.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5795-4401>
ng-zubkoff@yandex.ru

Alevtina M. Nikolaeva, Dr. Sci. (Biol.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3160-518X>
nikolaeva.alla@gmail.com

Alexander V. Ivanov, Cand. Sci. (Pharm.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7608-1914>
Ivanoffal@yandex.ru

Olga V. Beliakova, Cand. Sci. (Pharm.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6352-9380>
o.v.beliakova@yandex.ru

Mikhail V. Razumikhin
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7364-5235>
razumikhin.m@gmail.com

Natalia V. Vinokurova
ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-6583-3277>
n.v.vinokurova@microgen.ru

Irina S. Efimova
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3757-1953>
efimovai@mail.ru

Tatiana I. Smolyanova
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2934-3002>
tatianasmolyanova@gmail.com

Elena I. Sakanyan, Dr. Sci. (Pharm.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8536-4804>
e.i.sakanjan@microgen.ru

Поступила 11.07.2023

После доработки 04.09.2023

Принята к публикации 13.09.2023

Received 11 July 2023

Revised 4 September 2023

Accepted 13 September 2023