

УДК 577.112.85

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ. I. ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ОЧИСТКИ

Г. Л. ВОЛКОВ

Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев;
e-mail: volkov@biochem.kiev.ua

Препараты, пригодные для внутривенного введения иммуноглобулинов (IVIg), полученные из плазмы доноров, в настоящее время стали одним из основных продуктов на мировом рынке благодаря их успешному применению для профилактики и лечения многих инфекционных, аутоиммунных и воспалительных заболеваний. В данном обзоре рассматриваются классические промышленные процессы производства IVIg, а также новые хроматографические, мембранные и смешанные способы в контексте стоимости и выхода целевого продукта, который должен быть получен высокого качества, а также вирус- и прионбезопасным.

Ключевые слова: плазма крови доноров, иммуноглобулины, фракционирование, спиртовое осаждение, хроматографические методы, мембранная фильтрация, выход целевого продукта, степень очистки, инактивация вирусов.

Иммуноглобулины G (IgG) – второй по величине класс белков плазмы крови человека. Концентрация их может колебаться от 6,6 до 14,5 мг/мл плазмы [1]. Промышленные внутривенные иммуноглобулины (IVIg) успешно применяются в качестве профилактического средства против различных инфекций, а также имеют терапевтическое значение при лечении аутоиммунных и воспалительных процессов [2].

Принципы очистки IVIg практически не изменились за последние два десятилетия, что достаточно хорошо описано J. M. Curling и сотр. [3]. Основное внимание производителей сосредоточено на высокой степени очистки, удалении агрегатов, которые, как оказалось, вызывают у пациентов ряд побочных эффектов, а также на разрушении возможных вирусных контаминантов и удалении дезинтегрирующих агентов и вирусных фрагментов. Кроме того, резкий скачок частоты инфекционных заболеваний в 80-х годах XX столетия (например гепатита), вызванный зараженными препаратами крови, заставил производителей усилить как контроль с точки зрения инфекционной безопасности за входящим сырьем (плазмой крови) и конечным продуктом, так и ввести в производственные схемы целый ряд дополнительных этапов, которые бы гарантировали ожидаемую инфекционную безопасность. Все это привело к быстрому росту стоимости тестированной плазмы в среднем от 55–60 до 85 евро за 1 л (а в некоторых случаях до 100 евро за 1 л) при том, что стоимость препаратов

IVIg оставалась стабильной. В Украине и в странах СНГ рост цен на плазму был не столь значителен и в настоящее время стоимость 1 л составляет около 40–50 евро. Однако при достижении европейского уровня контроля качества и условий хранения плазмы ожидается, что цена 1 л этого сырья в Украине будет равна 70–75 евро. Учитывая, что покупательная способность украинского населения существенно ниже, чем в ЕС, цена на потребительский продукт существенно не возрастет и не будет превышать существующую более чем на 10–15%. Таким образом, рост эксплуатационных затрат при неизменном доходе заставляет промышленность перерабатывать сырье (плазму) настолько эффективно, насколько это возможно. Прямые пути повышения эффективности производства сводятся к следующему:

- увеличение числа продуктов, которые будут извлечены из плазмы;
- увеличение выхода всех продуктов, в том числе IVIg;
- разработка новых технологий комплексной переработки сырья с более высокими выходами целевых продуктов и лучшим их качеством.

Существуют и опосредованные пути увеличения эффективности производства, но они напрямую не связаны с технологией очистки и выделения плазменных белков и поэтому нами не рассматриваются.

В любом случае следует отметить, что наблюдается повышенная активность во всех трех перечисленных направлениях достиже-

ния эффективности производства белковых препаратов из плазмы крови, что сказывается на быстром росте объемов продукции на мировом рынке. Так, например, продажа IVIG в Северной Америке за 5 лет (1998–2003) увеличилась вдвое [4], а на мировом рынке за 10 лет в 3 раза [5]. Кроме того, мировой рынок пополнился генно-инженерными антителами, которые теперь применяются в клинической практике, а их важность резко возросла за последнее десятилетие [6, 7].

Фракционирование этанолом

История производства IVIG насчитывает более 50 лет. Первые процессы были разработаны в то время, когда о возможности хроматографического разделения белков еще даже не догадывались, а основным методом была двухфазная распределительная экстракция. В это время в 1955 г. А. А. Green и W. L. Hughes [8] описали растворимость белков в различных солевых растворах. Теоретическая зависимость между растворимостью белков и ионной силой раствора была описана модифицированным уравнением Деби-Хаккеля. В свете этой теории было бы просто непростительно, если бы кто-либо не попытался применить для фракционирования белков органические растворители. Добавление, например, этилового спирта к водным растворам белков уменьшает диэлектрическую проницаемость, снижая таким образом растворимость белков.

Ближе всех к пониманию процесса находился Е. J. Cohn, который впервые вместе с сотрудниками разработал ряд способов разделения белков плазмы. Следует отметить, что эти пионерские методы фракционирования этанолом до сих пор остаются основными при производстве препаратов IVIG [9]. Так, Е. J. Cohn и сотрудники разработали систему для разделения белков донорской плазмы с такими пятью переменными:

- концентрация белка;
- концентрация этанола;
- кондуктивность или ионная сила раствора;
- температура;
- рН.

Пять основных белков были сконцентрированы в пяти последовательных фракциях ступенчатым осаждением путем увеличения концентрации этилового спирта: фибриноген (фракция I), γ -глобулины (фракция II), обогащенные липидами β -глобулины (фракция III), α -глобулины (фракция IV) и альбумин (фракция V). Фракция II+III, полученная по

методу Е. J. Cohn 6, стала исходным материалом для большинства технологий выделения IVIG (рис. 1). Дальнейшее фракционирование фракции II+III может продолжаться при помощи этилового спирта или других осаждающих агентов, таких как полиэтиленгликоль (ПЭГ) или каприлат. Н. F. Deutsch и др. удалось увеличить выход IgG во фракции II при применении пониженной ионной силы для осаждения фракции III [10].

J. L. Oncley, основываясь на этой работе, разработал метод разделения (метод Е. J. Cohn 9) для отделения фракции III от фракции II+III [11]. Прецизионное разделение на 4 подфракции, содержавшие изоагглютинины (III-1), протромбин (III-2), плазминоген (III-3) и некоторые липопroteины (III-4), привело к удовлетворительной очистке фракции II, которая теперь содержала только антитела (рис. 2). Содержание IgG во фракции II составляло 5,47 г/л плазмы, в то время как во фракции II+III – 7 г/л плазмы, т.е. применение метода приводило к потере 22,9% IgG. Такая потеря могла быть сокращена при использовании технологии фильтрации вместо центрифугирования для удаления фракции III [12], которая в настоящее время в промышленной переработке не используется. В последующие годы были предприняты некоторые попытки для увеличения выхода путем изменения некоторых этапов осаждения. Например, когда фракция I подвергается осаждению, но одновременно выделяется фракция II+III и таким образом приблизительно 5–10% IgG может быть сохранено. В таком случае вводится дополнительный этап выделения фракции I+III.

P. Kistler и H. S. Nitschmann изменили схему фракционирования IgG, уменьшая содержание этилового спирта от 17 до 12% для осаждения осадка “B”, что соответствует фракции I+III [13]. В конечном итоге выход IgG был увеличен за счет улучшения чистоты конечного продукта. Содержащий осадок IgG включает, помимо 90% γ -глобулинов, также 2% β -глобулинов и 8% альбумина. Работа с этой “пастой” на этапе тонкой очистки требует удаления альбумина, например с помощью анионообменной хроматографии, что дает возможность достичь чистоты IgG более чем 95%.

В общем, выход IgG при фракционировании этиловым спиртом составляет примерно 3,5–4,2 г/л плазмы, так как 40–50% IgG остается (теряется) в надосадочных фракциях, которые не содержат IgG, или соосаждаются, т.е. также теряются с примесями. Приблизительно 5–10% соосаждается с фракцией I, 5–10% обнаруживается в надосадочной фракции II+III

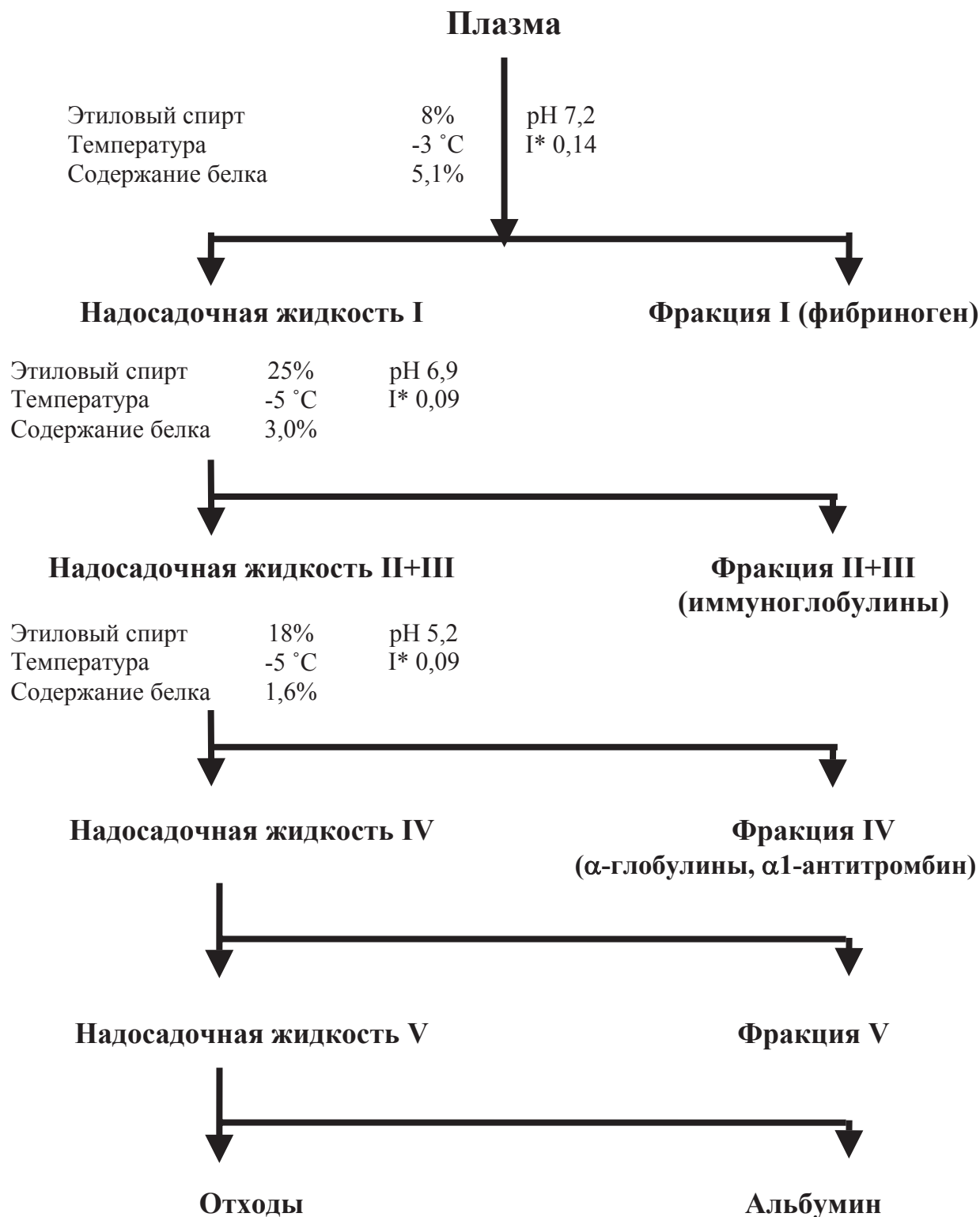


Рис. 1. Спиртовое фракционирование плазмы по методу Е. J. Соhn 6 (I* – ионная сила в расчете на 1 л раствора).

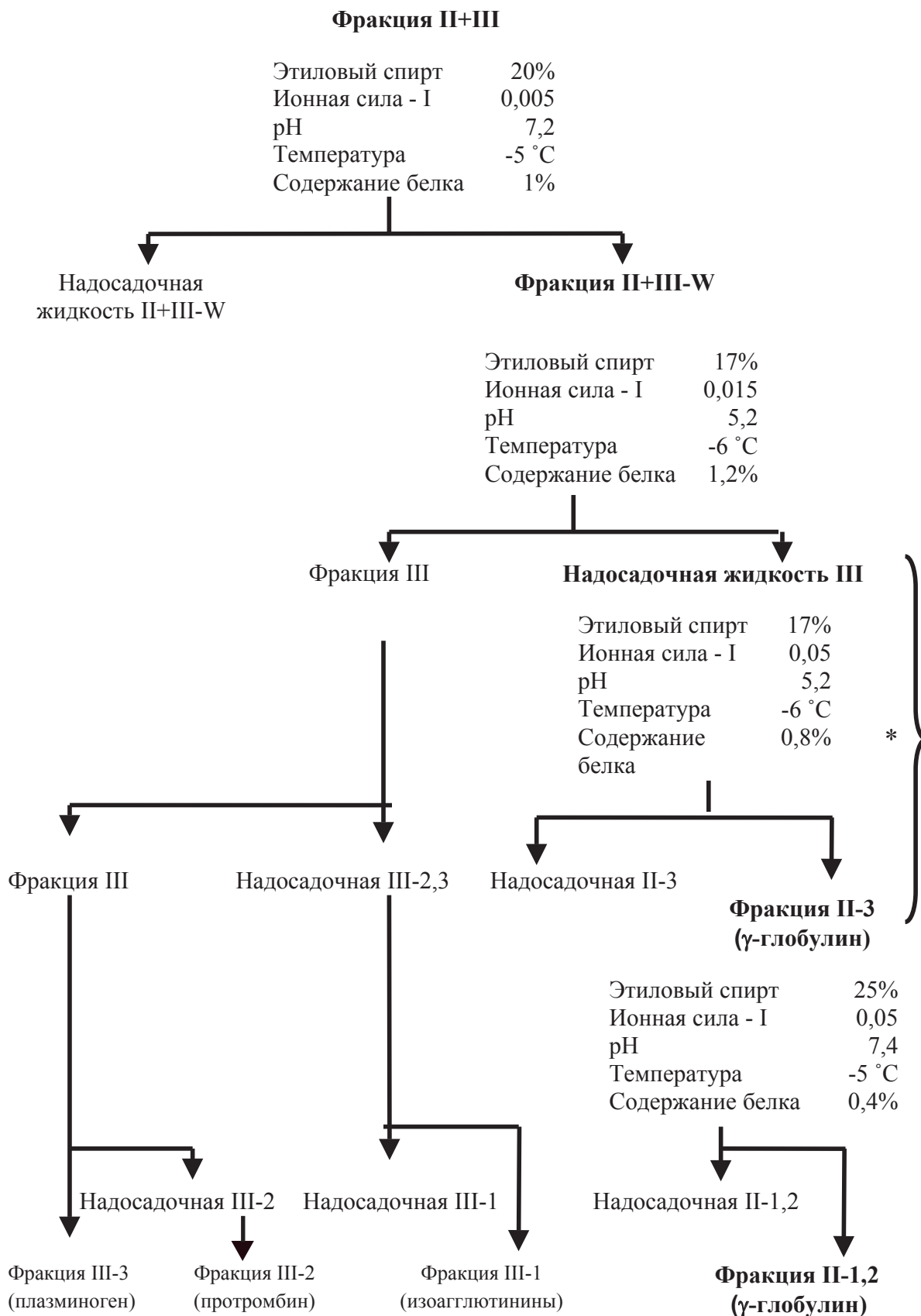


Рис. 2. Спиртовое фракционирование плазмы по методу J. L. Oncley 9 (* – в современном производстве этот этап пропускается).

(фракція альбуміна) і приблизительно 20% втрається з фракцією ІІІ. В подальшому на етапах від фракції ІІ до кінцевого препарату ІgG ще 5–10% втрачається в залежності від розробленого процесу.

Практически все етапи осадження повинні проводитися при температурі нижче точки замерзання, щоб уникнути денатурації білків. Це розглядається як головний недолік технології фракціонування етиловим спиртом в доповнення до дуже низького виходу.

Хроматографічна очистка

Уже в шестидесятих роках ІgG був виділений із сироватки крові людини 2-етапною б'єтч-технологією, використовуваною DEAE-сефадекс [14], причому був отриманий ІgG 97%-ої чистоти. В подальшому з'явилось декілька подібних схем для очищення ІgG, однак умови рН були далекі від оптимальних [15–18]. Далі було описано декілька хроматографічних процесів для виробництва ІVІG із донорської плазми без передшляхуєчого фракціонування етиловим спиртом [19–21]. Найчастіше зустрічаючись методом очищення ІgG від супутуючих білків плазми крові, таких як ІgА, ІgМ, альбумін, фібриноген і прекалікренін, являється аніонообмінна хроматографія. З її допомогою також можна видалити високомолекулярні агрегати [22]. Основна увага приділяється ІgG підкласу 4, які мають тенденцію зв'язуватися з активними групами сорбента. На цьому етапі в оптимізованих умовах можна досягти достатньо високого виходу ІgG (~ 95%). Головною метою цих процесів було перевищення середньогалузевий показника виходу ІgG 3,5 г/л плазми, забезпечуваного фракціонуванням спиртовим методом Е. J. Сohn. Крім того, використання етилового спирту, як необхідного агента, викликало денатурацію білків і формування агрегатів, а також перетворювало весь процес в потенційно пожего- і вибухоопасний.

Застосування аніонообмінної хроматографії, як першого етапу очищення ІgG, дозволило підвищити вихід білка на 32% і довести його до рівня 4,6 г/л плазми [23].

Катионообмінна хроматографія достатньо часто служить засобом додаткової очищення ІgG в комбінації з аніонообмінної хроматографією [24], що забезпечує помірний вихід цільового продукту.

Однак при безпосередньому використанні плазми в хроматографічних про-

цесах, рН і іонна сила самої плазми мало відповідають оптимальним умовам нанесення плазми на аніоно- або катионообмінну колонку. В такому випадку можливо використання двох шляхів оптимізації умов: мембранна діафільтрація [25] з доведенням рН і виключаючої-по-розміру хроматографії (раніше – гелі-хроматографія) в частині повної заміни буфера [26]. Проведення мембранної діафільтрації цільової плазми дуже ускладнено із-за її значущої в'язкості. Розбавлення плазми для прискорення процесу призводить до збільшення денатурації білків і суттєвому сповільненню першого хроматографічного кроку або, при збільшенні розмірів колони першого етапу, до значущого удорожання процесу. Процес заміни буфера на виключаючої-по-розміру хроматографічної колоні достатньо дешевий, швидкий (один цикл складає максимум 45 хв) і мало денатуруючий.

Препарат ІVІG, отриманий із плазми єдиного донора, містить тільки мономер ІgG, тоді як ІVІG, виділений із об'єднаної плазми тисячі здорових донорів, містить мономерний (150 кДа) і димерний ІgG [27]. Димер ІgG має аутоантигенну і екзоантигенну реакційну здатність [28]. Полімери, що складаються з декількох молекул ІgG, формуються в жорстких умовах виробничого процесу і не розчиняються, будучи однак денатурованими.

Виключаючої-по-розміру хроматографія являється незамінною для заключної фази розділення і забезпечує розділення різних форм ІgG (моно-, ди- і полімерів) по відповідним їм розмірам, і тому важливі для виробництва препарату ІVІG-мономери ІgG можуть бути практично повністю відокремлені від ди- і полімерів в стандартних умовах. Розділення вихідного матеріалу досягається в тому випадку, якщо вибрано правильний хроматографічний гелі і він не навантажено білком. G. Iberer і співр., наприклад, використовували в поліровочному етапі Superdex 200 («GE Healthcare AB», Швеція) для видалення полімерів із препарату ІVІG [29].

В більшості випадків комбіноване застосування іонообмінної і виключаючої-по-розміру хроматографії сприяє не тільки високій ступеню очищення ІgG (більше 95%), але також і видаленню реактивів, використаних для руйнування оболочкових вірусів методом розчинитель-детергент [30]. Після того, як ІgG зв'язується з іонообмінним сорбентом, зазначені реактиви вимиваються із колони.

Правда, весьма низкая динамическая емкость катионообменных сорбентов не способствует полному удалению реагентов, хотя новое поколение сорбентов имеет улучшенную динамическую емкостьсвязующую способность [31], а исключаящая-по-размеру хроматография служит дополнительным этапом удаления реагентов [32].

Однако наши исследования [33–34] и других авторов [35] показали, что исключаящая-по-размеру хроматография все же является излишним, страховочным этапом. Прецизионная оптимизация условий вирусинактивации, этапов ионообменной хроматографии (температура, рН, соотношение концентрации белка и реагентов) позволяет избавиться от исключаящей-по-размеру хроматографии, чем обеспечивается больший выход целевого продукта и удешевление процесса. К тому же производительность исключаящей-по-размеру хроматографии всегда будет несравнимо низкой, учитывая, что максимальный объем образца ограничен 5%-ми объема колонны и 7,5–10%-й концентрацией белка.

На рис. 3 приведена схема очистки IgG из плазмы крови доноров, состоящая только из хроматографических этапов и ставшая уже классической [36], так как позволяет получить препарат IVIG с высоким выходом (4,8–5,2 г/л плазмы), высоко очищенный (99,3% мономеров IgG) и полностью соответствующий другим требованиям Европейской фармакопеи. Большинство технологий принимают эту схему за основу и вводят некоторые модификации (например подобные сорбенты, но с большей динамической емкостью) или дополнительные этапы, если не удастся оптимизировать условия ионообменных процессов ([29, 37]).

Кроме описанных хроматографических методов существуют, например, аффинные. Однако наиболее распространенный лабораторный метод выделения и очистки поликлональных антител на протеине А или G не может быть использован в промышленных технологиях ввиду низкой динамической емкости указанных лигандов, их значительной стоимости, а также высокой лабильности лиганда (протеина А или G), привитого на матрицу сорбента. К недостаткам указанных лигандов следует отнести также и то, что протеин А не связывает IgG3 (этот подкласс является основным фактором гуморальной защиты против вирусных инфекций), а протеин G, хотя и связывает все подклассы IgG, но требует очень кислого рН для элюции, что уже является денатурирующей средой для субпопуляции поликлонально-

го IgG. Большинство современных аффинных сорбентов имеют высокую стоимость даже при масштабном их производстве и удовлетворительной динамической емкости [38].

В настоящее время разработаны синтетические лиганды (производные комбинаторных библиотек), предназначенные для очистки IgG [39]. S. F. Teng и соотр. описали лиганд для обратимой сорбции IgG, включающий шлейф триазина с пришитым 3-аминофенолом и 4-амино-1-нафтолом. Они показали, что этот лиганд, имитирующий синтетический протеин А, взаимодействует с IgG человека и избирательно выделяет IgG из разбавленной плазмы крови доноров. Авторы достигли адсорбционной емкости в диапазоне 16–26 мг белка на 1 мл геля при выходе 80%. Однако часть остаточного IgG элюировалась только раствором NaOH. Таким образом, пока этот сорбент не удовлетворяет требованиям крупномасштабных схем очистки IVIG [40].

Смешанные способы осаждения и хроматографической доочистки

Включение в схемы фракционирования осаждением IgG дополнительных хроматографических методов исторически было направлено прежде всего на удаление специфических агентов осаждения, например каприлата, полиэтиленгликоля (ПЭГ), окиси алюминия, спирта и т.д. Однако современные возросшие требования организаций, регулирующих выпуск лекарственных средств на рынок, обуславливают использование специализированных хроматографических методов для доведения чистоты и качества препаратов IVIG.

Фракционирование каприлатом. В 1960-х гг. было показано, что короткоцепочные жирные кислоты (C6–C12) формируют нерастворимые комплексы с α - и β -глобулинами, тогда как γ -глобулины практически не осаждаются [41]. M. Steinbuch с соотр. описали процесс очистки IgG с помощью каприлата (т.е. октаноата C8-насыщенной жирной кислоты) как осаждающего агента [42]. Неиммуноглобулиновые белки были осаждены из плазмы доноров разбавлением ацетатным буфером до конечного рН 4,8. Обогащенный раствор IgG был получен после дополнительного введения каприлата при энергичном перемешивании. Чистота и выход зависели от концентрации каприлата, рН, молярности буфера и фактора разведения. Авторы показали, что каприлат эффективно вводить в плазму в два приема с удалением осадков между ними.

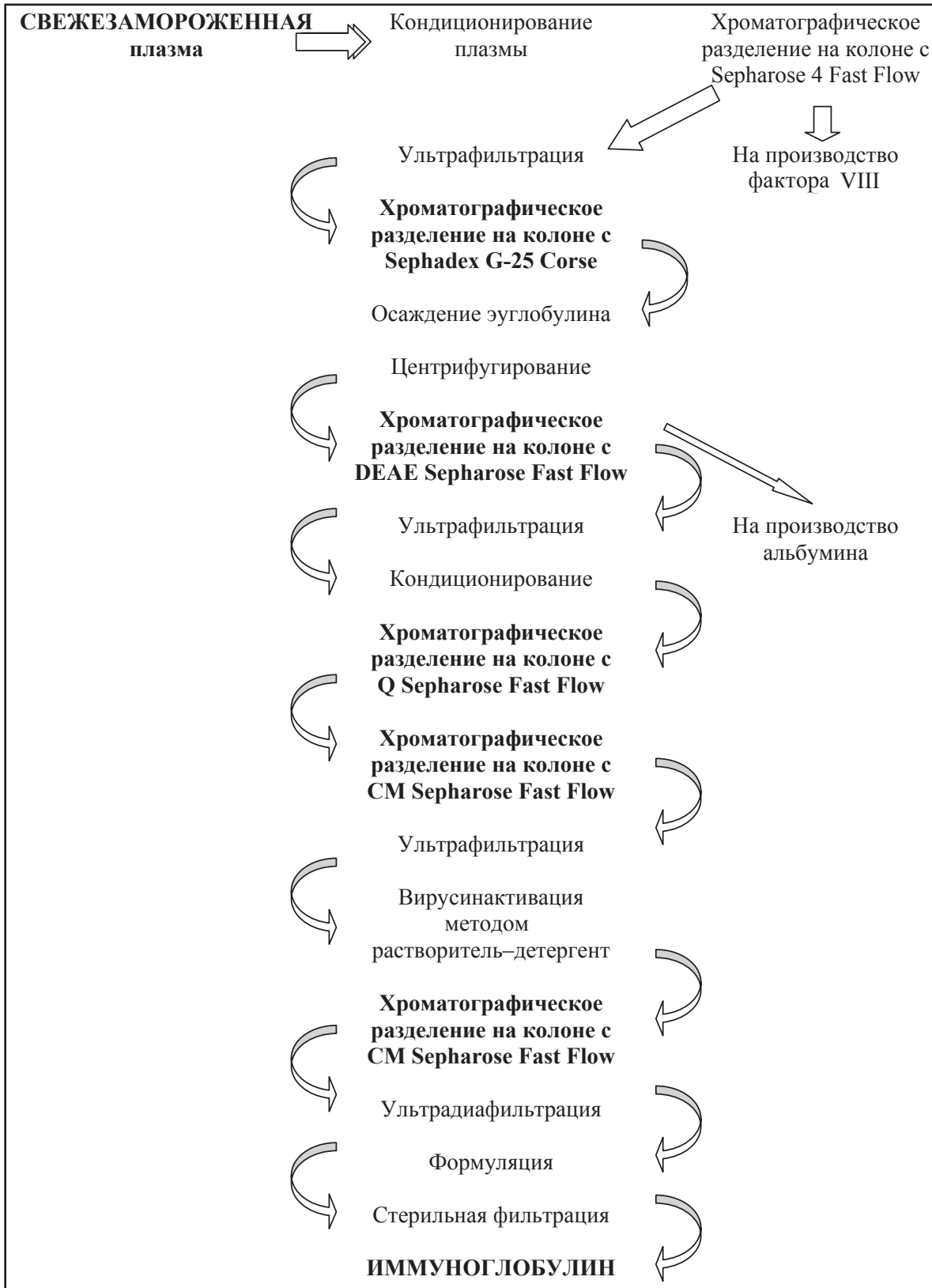


Рис. 3. Схема современной хроматографической очистки иммуноглобулинов из свежзамороженной плазмы.

A.F.S.A. Nabeeb и сотр. усовершенствовали выше описанный метод дополнительным выделением IgG из обогащенного раствора хроматографией на DEAE-целлюлозе [43] с 78–87%-м выходом IgG. В дальнейшем W. Lebing и др. [44] предложили схему очистки, основанную на методе A.F.S.A. Nabeeb и сотр. В качестве исходного материала для выделения IVIG вместо плазмы была использована ресуспендированная фракция II+III с последующими двумя этапами осаждения каприлатом в сочетании с двумя анионными обменными хроматографическими этапами. Обработка каприлатом несла двоякую функцию: очистки и инактивации вирусов. Вирусы без оболочки и с оболочкой частично были удалены при осаждении неиммуноглобулиновых белков [45]. Каприлат, IgA и IgM были удалены на двух анионообменных колонах. Был получен достаточно высокий выход IgG – 69%, что соответствовало приблизительно 4,8 г/л плазмы.

Фракционирование ПЭГ белков из естественных смесей, например таких, как плазма, осуществляется по специфическому механизму. IgG может быть выделен из фракции II+III с помощью только одного ПЭГ или смесью этилового спирта и ПЭГ [46–47].

Растворимость компонентов плазмы в присутствии переменных концентраций ПЭГ 6000 при различном pH была показана A. Poison с соавт. [48].

L. G. A. Falksveden разработал схему фракционирования с помощью ПЭГ 6000 для выделения альбумина и γ -глобулина [49], где IgG осаждали из плазмы при конечной концентрации ПЭГ 6000 13%. После обработки катионообменником, переосаждения, адсорбции на анионообменнике бэтч-методом и осаждении 25%-м этиловым спиртом был получен чистый конечный продукт IgG. ПЭГ 4000 использовался для осаждения агрегатов IgG после пастеризации [50–51]. Удаление ПЭГ проводили одним из следующих методов: методом мембранной ультра-/диафильтрации [51], связыванием IgG на катионите, осаждением белка ПЭГ [47] или 25%-м этиловым спиртом [49].

Дополнительные специальные хроматографические этапы очистки. Некоторые технологии, которые включают удаление липопротеинов путем обработки коллоидной окисью кремния, требуют специальных хроматографических этапов очистки. В этом случае применяют две анионообменные стадии. Сначала раствор, содержащий IgG, наносят на колонну с DEAE-сефарозой, уравновешенной при pH 5,2, а затем на макропористый анионообменный

сорбент при pH 6,5. В этом случае метод инактивации вирусов (пастеризация и обработка при низких значениях pH) интегрирован в единый процесс [19].

K. Tanaka с сотрудниками для получения препарата IVIG описал процесс очистки, начинающийся с растворения фракции II+III, сопровождающийся двумя этапами хроматографии на Q-сефарозе и CM-сефарозе и заканчивающийся полировочным этапом на сефакриле S-300 (исключающая-по-размеру хроматография) [37]. Таким методом был достигнут выход препарата в пределах 4,3 г/л плазмы.

В нашей лаборатории после тщательно оптимизированного перерастворения фракции II+III была применена хроматография во взвешенном слое (Expanded Bed Adsorption) на сорбенте Streamline DEAE. Затем следовал второй этап хроматографической очистки IgG-содержащей фракции на колонне с CM-сефарозой. Вирусинактивацию проводили в разбавленном растворе и при низких значениях pH. Рехроматография на колонне с CM-сефарозой позволила удалить вирусинактивирующие агенты и получить IgG, очищенный до 99,6%, с выходом 79,3% и антикомплементарной активностью 0,5–0,7 CH50/мг IgG [52].

Новые технологии очистки

Идея разработки новых сорбентов, которые захватывали бы IgG в значительных количествах непосредственно из плазмы, продолжает будоражить исследовательскую мысль. Так, Y. Sanak и сотр. предложили сорбент на основе поли(2-гидроксиэтил)метакрилата с пришитым L-гистидином в качестве лиганда [53], на котором IgG из плазмы доноров сорбировался в количестве 196 мг/г сорбента с чистотой 92%. IgG связывается по Fab-фрагменту и десорбируется 1 М NaCl при pH 4,0. К сожалению, связывающая емкость сорбента катастрофически зависима от скорости потока буфера и, следовательно, динамическая емкость сорбента оказалась совершенно неудовлетворительной.

Недавно была предложена новая система фракционирования белков плазмы, основанная на каскадной аффинной хроматографии [54] с выделением IgG, фактора FVIII, плазминогена, α 1-антитрипсина и альбумина. Принципом метода является дифференциальная адсорбция, где каждый последующий белок связывается с аффинным сорбентом своей колонки. Описанный выход для IgG составлял 70% по сравнению с 50% для обычного фракциониро-

вания по E. J. Cohn. Данные о стабильности отдельных хроматографических фракций (промежуточные продукты) представлены не были. Сравнительный финансовый анализ показал, что каскадное аффинное фракционирование имеет более высокие операционные затраты вследствие использования дорогих сорбентов и больших количеств буферных солей, чем метод E. J. Cohn. С другой стороны, доходы при использовании этого хроматографического метода должны быть более высокими вследствие более высокого выхода IgG и других белков, а также благодаря одновременному выходу серии белков из плазмы.

Также описана сравнительно новая технология "Gradiflow", заключающаяся в использовании мембранного препаративного электрофореза для выделения белков на основании двух характеристик белка: молекулярной массы и заряда. IgG из плазмы доноров этим методом можно выделить в 2 этапа с выходом 93,5% [55] или даже в 1 этап с выходом ~95,5% [56]. Хотя эта технология и может быть в дальнейшем масштабирована, однако до масштабного фракционирования с ее помощью нескольких тысяч литров плазмы лежит расстояние в несколько лет. Пока же максимальные объемы переработки плазмы достигают всего лишь нескольких литров из-за необходимости сильного разбавления плазмы и соответственно переработки больших объемов буфера.

Таким образом, и на современном этапе при переработке больших объемов плазмы (более 200000 л в год) метод фракционирования белков этиловым спиртом E. J. Cohn остается наиболее применимым. Развитие хроматографических методов, появление новых сорбентов с высокими емкостными характеристиками обуславливают как сочетанное использование этого метода с хроматографическими (переработка более 200000 л плазмы в год), так и применение исключительно хроматографических методов в производстве IVIG (переработка менее 200000 л плазмы в год).

ТЕХНОЛОГІЯ ОДЕРЖАННЯ ІМУНОГЛОБУЛІНІВ. І. ТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ОЧИЩЕННЯ

Г. Л. Волков

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна
НАН України, Київ;
e-mail: volkov@biochem.kiev.ua

Препарати внутрішньосудинних імуноглобулінів (IVIG), які одержують із плазми донорів, сьогодні стали одними із основних продуктів на світовому ринку завдяки їхньому успішному застосуванню для профілактики і лікування багатьох інфекційних, аутоімунних і запальних захворювань. У даному огляді розглядаються класичні промислові процеси виробництва IVIG, а також нові хроматографічні, мембранні і змішані засоби в контексті їхньої вартості і виходу цільового продукту, який має бути високої якості, а також вірус- і пріонбезпечним.

Ключові слова: плазма крові донорів, імуноглобуліни, фракціонування, спиртове осадження, хроматографічні методи, мембранна фільтрація, вихід цільового продукту, ступінь очищення, інактивація вірусів.

TECHNOLOGY OF IMMUNOGLOBULIN PRODUCTION. I. TECHNOLOGICAL ASPECTS OF PURIFICATION

Palladin Institute of Biochemistry, National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: volkov@biochem.kiev.ua

Summary

Plasma-derived intravenous immunoglobulin (IVIG) preparations have become the major plasma products on the world blood product market due to the successful application for the prophylactic prevention of infectious diseases and replacement therapy in autoimmune and inflammatory diseases. In this review classical manufac-

turing processes as well as new chromatographic, membrane, and mixed industrial technologies are discussed with respect to the cost and amount of the final product of high quality and virus- and prion-safety which is to be obtained.

Key words: donor blood plasma, immunoglobulins, fractionation, alcohol peeling, chromatographic methods, membrane filtration, target product, yield, purification grade, virus inactivation.

1. *Beeck H., Hellstern P.* // *Vox Sang.* – 1998. – **74**. – P. 219–223.
2. *Lemieux R., Bazin R., Neron S.* // *Mol. Immunol.* – 2005. – **42**. – P. 839–848.
3. *Curling J. M.* *Methods of Plasma Protein Fractionation* / In Academic Press Inc., 1980. – P. 82–87.
4. *The Plasma Protein Therapeutics Association Website:* <http://www.pptaglobal.org> [24 October, 2005].
5. *The Marketing Research Bureau I.* The worldwide plasma fractions market – 2004. February 2005, – P. 38–44.
6. *Humphreys D. P., Glover D. J.* // *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* – 2001. – **4**. – P. 172–185.
7. *Humphreys D. P.* // *Ibid.* 2003. – **6**. – P. 188–196.
8. *Green A. A., Hughes W. L.* / In: Colowick S. P., Kaplan N. O. (Ed.) *Methods in Enzymology.* – Academic Press Inc., New York 1955. – P. 67–90.
9. *Cohn E. J., Strong L. E., Hughes W. L. et al.* // *J. Am. Chem. Soc.* – 1946. – **68**. – P. 459–475.
10. *Deutsch H. F., Costing I. J., Albery R. A., Williams J. W.* // *J. Biol. Chem.* – 1946. – **164**. – P. 109–118.
11. *Onclay J. L., Melin M., Richert D. A. et al.* // *J. Am. Chem. Soc.* – 1949. – **71**. – P. 541–550.
12. *Cohn E. J., Gurd F. R. N., Surgenor D. M. et al.* // *Ibid.* – 1950. – **72**. – P. 465–474.
13. *Kistler P., Nitschmann H. S.* // *Vox Sang.* – 1962. – **7**. – P. 414–424.
14. *Baumstark J. S., Laffin R. J., Bardawil W. A.* // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1964. – **108**. – P. 514–522.
15. *Hoppe H., Mester T., Hennig W., Krebs H.* // *Vox Sang.* – 1973. – **25**. – P. 308–316.
16. *Cunningham C. J.* / *Biochemical Society Transactions*, 1980, 586th Meeting, Bristol, P. 178–179.
17. *Friesen A. D., Bowman J. M., Price H. W.* // *J. Appl. Biochem.* – 1981. – **3**. – P. 164–175.
18. *Friesen A. D., Bowman J. M., Bees W. C. H.* // *Vox Sang.* – 1985. – **48**. – P. 201–212.
19. *Bertolini J., Davies J., Wu J., Coppola G.* / *Purification of immunoglobulins.* 1998, WO 98/05686.
20. *Friesen A.* / *Process for preparing purified immune globulin (IgG).* 1986, CA 1 201 063.
21. *Burnouf-Radosevich M., Dernis D., Bonneel P., Bumouf T.* / *Immunoglobulin G concentrate for therapeutic use and process for producing said concentrate.* 1994, WO 94/29334.
22. *Ahrer K., Buchacher A., Iberer G. et al.* // *J. Chromatogr. A.* – 2003. – **1009**. – P. 89–96.
23. *Lontos J.* Presentation at the Plasma Product Biotechnology Meeting, Porto Elounda, Crete, 2005. P. 8–9.
24. *Laurson I., Teisner B.* / *Process for producing immunoglobulins for intravenous administration and other immunoglobulin products,* 1999. WO 99/64462.
25. *Berglof J. H., Eriksson T., Andersson I.* // *Develop. Biol. Standard.* – 1987. – **67**. – P. 25–29.
26. *Lebing W. R. et al.* // *Downstream.* – 2000. – **31**. – P. 19–20.
27. *Tankersley D. L., Preston S. M., Finlayson J. S.* // *Mol. Immunol.* – 1988. – **25**. – P. 41–48.
28. *Miescher S. M., Schaub A., Ghielmetti M. et al.* // *Arm. N.Y.Acad. Sci.* – 2005. – **1051**. – P. 582–590.
29. *Iberer G., Schwinn H., Josic D. et al.* // *J. Chromatogr. A.* – 2001. – **921**. – P. 15–24.
30. *Cameron R. et al.* // *Biologicals.* – 1997. – **25**. – P. 391–401.
31. *Staby A., Sand M. B., Hansen R. G. et al.* // *J. Chromatogr. A.* – 2004. – **1034**. – P. 85–97.
32. *Johnston A. et al.* // *Biologicals.* – 2000. – **28**. – P. 129–136.
33. *Волков Г. Л., Андрианов С. И., Горошнікова Т. В. та ін.* // *Укр. біохім. журн.* – 2000. – **72**, № 4–5. С. 109–121.
34. *Volkov G. L., Andrianov S. I., Slominskiy A. Yu. et al.* / *Plasma Product Biotechnology Meeting 2005, May 9–12 2005, Crete, Greece.* – P. 61.
35. *Lindquist L.-O., Anderson I.* / *Московская международная конференция «Биотехнология и медицина», Россия, Москва, 14–17 марта 2006.* – С. 222.
36. *Berglof J. H.* / *Colloque INSERM. John Libbey Eurotext Ltd.* – 1993. – **227**. – P. 31–36.
37. *Tanaka K., Sawatani E., Dias G. A. et al.* // *Braz. J. Med. Biol. Res.* – 2000. – **33**. – P. 27–30.
38. *Hahn R., Schlegel R., Jungbauer A.* // *J. Chromatogr. B.* – 2003. – **790**. – P. 35–51.
39. *Teng S. F., Sproule K., Husain A., Lowe C. R.* // *Ibid.* – 2000. – **740**. – P. 1–15.
40. *Buchacher A., Iberer G.* // *Biotechnol. J.* – 2006. – **1**. – P. 148–163.
41. *Chanutin A., Cuinish R. R.* // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1960. – **89**. – P. 218–220.
42. *Steinbuch M., Audran R.* // *Ibid.* – 1969. – **134**. – P. 279–284.

43. *Habeeb A. F. S. A., Francis R. D.* // *Prep. Biochem.* – 1984. – **14**. – P. 1–17.
44. *Lebing W., Remington K. M., Schreiner C., Paul H. I.* // *Vox Sang.* – 2003. – **84**. – P. 193–201.
45. *Trejo S., Hotta J., Lebing W. et al.* // *Ibid.* – P. 176–187.
46. *Uemura Y., Yang Y. H. J., Heldebrant C. M. et al.* // *Ibid.* – 1994. – **67**. – P. 246–254.
47. *Uemura Y., Uriyu K., Takechi K. et al.* / Method of producing immunoglobulin preparations for intravenous injection. 1987, EP 0246 579 A2.
48. *Poison A., Ruiz-Bravo C.* // *Vox Sang.* – 1972. – **23**. – P. 107–118.
49. *Pat. 3869436 US.* Method for fractionating plasma proteins using PEG and Ion-Exchangers / *Falksveden L. G. A.* – Publ. 03.1975.
50. *Uemura Y., Uriyu K., Hirao Y. et al.* // *Vox Sang.* – 1989. – **56**. – P. 155–161.
51. *Pat. EP 0911037 B1.* Room temperature storable immunoglobulin preparation for intravenous injection / *Hirao Y., Hashimoto M., Kitamura T., Uemura Y. et al.* – Publ. 28.04.1999.
52. *Волков Г.Л., Андрианов С.И., Сломинский А. Ю. и др.* // *Укр. біохім. журн.* – 2005. – **77**, № 2. – С. 26–57.
53. *Canak Y., Ozkara S., Akgol S., Denizil A.* // *React. Fund. Polym.* – 2004. – **61**. – P. 369–377.
54. *Curling J., Baines D., Bryant C. et al.* / Presentation at the Plasma Product Biotechnology Meeting, Porto Elounda, Crete, 2005. – P. 13–14.
55. *Li G., Stewart R., Conlan B. et al.* // *Vox Sang.* – 2002. – **83**. – P. 332–338.
56. *Evtushenko M., Wang K., Stokes H. W., Nair H.* // *Electrophoresis.* – 2005. – **26**. – P. 28–34.

Получено 16.05.2006