



## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 615.373

doi: 10.17308/sorpchrom.2024.24/12512

### Разработка метода получения иммуноглобулинов А и М для создания комплексного иммуноглобулинового препарата

**Виктор Семенович Карасев<sup>1,2,3✉</sup>, Ольга Петровна Бочкива<sup>1,2</sup>,**  
**Сергей Михайлович Староверов<sup>1,2</sup>, Александр Викторович Иванов<sup>4</sup>,**  
**Иван Сергеевич Пыцкий<sup>3</sup>, Алексей Константинович Буряк<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия, karasev@bcmst.ru✉

<sup>2</sup>АО «БиоХимМак СТ», Москва, Россия

<sup>3</sup>Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина АН РАН, Москва, Россия

<sup>4</sup>«НПО «Микроген», Пермский филиал, НПО «Биомед», Пермь, Россия

**Аннотация.** Работа посвящена исследованию возможности получения иммуноглобулинов А и М для создания комплексного иммуноглобулинового препарата, который используется для профилактики и лечения острых кишечных заболеваний. Эффективность данного препарата продемонстрирована в ходе многочисленных клинических испытаний и доказана временем, однако препарат, отвечающий всем современным требованиям по чистоте и вирусной безопасности, не выпускается у нас в стране. Ранее нами разработана технология получения свободного от вирусов иммуноглобулина G, включающая очистку инактивированной плазмы крови на трех сорбентах: гидрофобном, DEAE и сульфокатионите [1]. Исследования показали, что на DEAE сорбенте концентрируются иммуноглобулины А и М. После внедрения технологии получения иммуноглобулина G вопрос извлечения фракции иммуноглобулинов А и М стал особенно актуальным, так как может позволить осуществлять их выделение в одной технологии с получением иммуноглобулина G, что снижает экономические издержки и позволяет комплексно решать задачи переработки плазмы крови.

В работе исследованы условия элюирования фракции иммуноглобулинов А и М для последующей очистки на различных сорбентах. Показано, что элюирование с DEAE колонны 0,075 М раствором хлорида натрия в 20ММ натрий ацетатном буферном растворе при pH 5,65, позволяет удалить более 60% полимеров в сырье. Последующую очистку осуществляли на шести различных сорбентах, отличающихся носителем (агароза и полиметакрилат) и функциональными группами (сульфокатионит, слабый и сильный анионит) в четырех буферных системах с pH 5.0; 5.65; 6.8 и 7.4. Показано, что на анионообменном сорбенте на основе метакрилата Relisorb DA 400 при pH 7.4 достигается высокий выход по иммуноглобулином (70% для IgA и 80% для IgM) при низком содержании полимеров, что позволяет получить комплексный иммуноглобулиновый препарат, отвечающий современным требованиям.

**Ключевые слова:** переработка плазмы крови, иммуноглобулины А, М, G, комплексный иммуноглобулиновый препарат, ионообменная хроматография, гель-хроматография.

**Благодарности:** работа выполнена в рамках проекта Минобрнауки по развитию отечественного научного приборостроения, шифр темы: «Хроматограф».

**Для цитирования:** Карасев В.С., Бочкива О.П., Староверов С.М., Иванов А.В., Пыцкий И.С., Буряк А.К. Разработка метода получения иммуноглобулинов А и М для создания комплексного иммуноглобулинового препарата // Сорбционные и хроматографические процессы. 2024. Т. 24, № 5. С. 735-743. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12512>

Original article

### Development of a method for obtaining immunoglobulins A and M to create a complex immunoglobulin drug

**Viktor S. Karasev<sup>1,2,3✉</sup>, Olga P. Bochkova<sup>1,2</sup>, Sergey M. Staroverov<sup>1,2</sup>,**

© Карасев В. С., Бочкива О. П., Староверов С. М., Иванов А. В., Пыцкий И. С., Буряк А. К., 2024



**Alexander V. Ivanov<sup>4</sup>, Ivan S. Pytskiy<sup>3</sup>, Alexey K. Buryak<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Chemical Department, Lomonosov State University, Moscow, Russian Federation, karasev@bcmst.ru<sup>✉</sup>

<sup>2</sup>JSC "BioChemMack" ST, Moscow, Russian Federation

<sup>3</sup>A.N. Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

<sup>4</sup>NPO "Microgen", Perm branch, NPO Biomed, Perm, Russian Federation

**Abstract.** The possibility for obtaining immunoglobulins A and M for create a complex immunoglobulin drug, which is used for the prevention and treatment of acute intestinal diseases have been investigated. The effectiveness of this drug has been demonstrated in the course of numerous clinical trials and proven over time, but a drug that meets all modern requirements for purity and viral safety is not produced in our country. Previously, we developed a technology for obtaining virus-free immunoglobulin G, including the purification of inactivated blood plasma on three sorbents: hydrophobic, DEAE and sulfocationite. Studies have shown that immunoglobulins A and M are concentrated on the DEAE sorbent. After the introduction of the technology for obtaining immunoglobulin G, the issue of extracting the fraction of immunoglobulins A and M became especially relevant, since it can allow their isolation in one technology with the production of immunoglobulin G, which reduces economic costs and allows for a comprehensive solution to the problems of processing blood plasma. The work studies the conditions for elution of the fraction of immunoglobulins A and M for subsequent purification on various sorbents. It was shown that elution from a DEAE column with 0.075 M sodium chloride solution at pH 5.65 allows removing more than 60% of polymers in the raw material. Subsequent purification was carried out on six different sorbents that differed in the carrier (agarose and polymethacrylate) and functional groups (sulfonic cation exchanger, weak and strong anion exchanger) in four buffer systems with pH 5.0; 5.65; 6.8; and 7.4. It was shown that on the anion-exchange sorbent based on methacrylate Relisorb DA 400 at pH 7.4, a high yield of immunoglobulins is achieved (70% for IgA and 80% for IgM) with a low polymer content, which allows obtaining a complex immunoglobulin preparation that meets modern requirements.

**Keywords:** blood plasma processing, immunoglobulins A, M, G, complex immunoglobulin drug, ion exchange chromatography, gel chromatography.

**Acknowledgments:** the work was carried out within the framework of the project of the Ministry of Education and Science on the development of domestic scientific instrumentation, the cipher of the topic: "Chromatograph".

**For citation:** Karasev V.S., Bochkova O.P., Staroverov S.M., Ivanov A.V., Pytskiy I.S., Buryak A.K. Development of a method for obtaining immunoglobulins A and M to create a complex immunoglobulin drug. *Sorbtionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2024. 24(5): 735-743. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2024.24/12512>

## Введение

Лекарственные препараты, полученные из плазмы крови человека – особый класс терапевтических средств, часто используемых как единственный возможный вариант в предотвращении, регулировании и лечении угрожающих жизни состояний, вызванных травмой, врожденными недостатками, иммунологическими расстройствами или инфекциями [1-4].

Одними из важнейших препаратов крови являются иммуноглобулины. Несмотря на разнообразие функций, главным назначением иммуноглобулинов в организме является распознавание антигенов, в связи с чем второе название этих молекул – «антитела». При первой антигенной стимуляции лимфоциты производят в основном иммуноглобулины

класса M, при последующих контактах с антигеном синтезируются IgG и IgA [5].

В отличие от классического пути использования в качестве сырья осадка Б по Кону мы исследовали возможность наработки иммуноглобулинов А и М из боковых фракций новой технологии получения IgG, которая прошла все стадии технологических испытаний, включая валидацию вирусной безопасности и с успехом используется для наработки «Ковид Глобулина» из плазмы доноров, переболевших Ковид-19 [6, 7].

## Экспериментальная часть

**Растворители, реагенты и стандартные образцы.** Экспериментальные исследования проводили с использованием: TWIN 80 (Merck, Германия), трибутилфосфат (Merck, Германия), кислоты уксусной (ч.д.а., Россия), фосфата натрия (ч.д.а.



Таблица 1. Характеристики исследованных сорбентов  
Table 1. Characteristics of the studied sorbents

Наименование сорбента	Функциональная группа	Матрица	Размер частиц, мкм	Размер пор, нм
DEAE Sepharose CL-6B	Слабый анионит	6% агароза.	65-155	90
Relisorb DA 400	Слабый анионит	Полиметакрилат	50-150	90
ChromSpeed Q103	Сильный анионит	Полиметакрилат	60	50
ChromSpeed S103	Сульфокатионит	Полиметакрилат	60	50
Диасфер-АК-ДЕАЕ	Слабый анионит	Полиметакрилат	100-250	100
Диасфер-АК-СП	Сульфокатионит	Полиметакрилат	40-120	60

Россия), ацетата натрия (ч.д.а., Россия), хлорида натрия (ч.д.а., Россия), гидроксида натрия (ч.д.а., Россия), фосфорной кислоты (ч.д.а., Россия). Иммуноглобулин А, иммуноглобулин G, иммуноглобулин M, альбумин, а также образцы плазмы крови предоставлены НПО «Микроген». Деионизированную воду получали с помощью системы водоподготовки Milli-Q (Millipore, США) из дистиллированной воды. Подвижные фазы и рабочие растворы готовили растворением необходимых навесок в деионизованной воде, с последующей фильтрацией через 0.2 мкм фильтр.

### Оборудование

Взвешивания сухих реагентов проводили на весах ACCULAB VI (Sartorius, Германия). Для измерения pH использовали иономер «Эксперт-рН» (Россия). Центрифугирование образцов плазмы крови осуществляли на центрифуге CM-50 SkiLine (ELMI, Латвия). Для дозирования использовали автоматические дозаторами 10-100 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл с пределом допускаемой погрешности измерения не более  $\pm 5\%$  (LABMATE, Польша). Фракционирование белков плазмы крови проводили на колонках 24x300 мм на хроматографе Аксиома-Дебют (АО «БиоХимМак СТ») с детектором УФ-280 нм.

### Сорбционные материалы и их характеристики:

DEAE Sepharose CL-6B (Cytiva), 6% агароза. Размер частиц – 65-155 мкм. Размер пор 90 нм. Диапазон рабочего pH – 3-

9. Емкость по белку – 170 мг/мл (HSA – 68 кДа).

Relisorb DA 400 (Resindion, Италия). Полиметакрилат. Слабый анионит. Размер частиц – 50-150 мкм. Размер пор 90 нм. Диапазон рабочего pH – 1-14. Емкость по белку – 30 мг/см<sup>3</sup> (HSA – 68 кДа).

ChromSpeed Q103 (Mitsubishi, Япония). Полиметакрилат. Сильный анионит. Размер частиц – 60 мкм. Размер пор 50 нм. Диапазон рабочего pH – 1-14. Емкость по белку – 100 мг/см<sup>3</sup> (IgG – 170 кДа).

ChromSpeed S103 (Mitsubishi, Япония). Полиметакрилат. Сульфокатионит. Размер частиц – 60 мкм. Размер пор 50 нм. Диапазон рабочего pH – 1-14. Емкость по белку – 100 мг/см<sup>3</sup> (IgG – 170 кДа).

Диасфер-АК-ДЕАЕ (Биохиммак СТ, Россия). Полиметакрилат. Слабый анионит. Размер частиц – 100-250 мкм. Размер пор 100 нм. Диапазон рабочего pH – 1-14. Емкость по белку – 35 мг/см<sup>3</sup> (HSA – 68 кДа).

Диасфер-АК-СП (Биохиммак СТ, Россия). Матрица – Полиметакрилат. Сульфокатионит. Размер частиц – 40-120 мкм. Размер пор 60 нм. Диапазон рабочего pH – 1-14. Емкость по белку – 50 мг/см<sup>3</sup> (HSA – 68 кДа).

Основные характеристики исследованных сорбентов представлены в таблице 1.

**Аналитическая высокоэффективная жидкостная хроматография.** ВЭЖХ-анализ в режиме эксклюзионной хроматографии проводили на хроматографе Smartline (Knauer, Германия) с детектированием при длине волны 280 нм, петля 20 мкл. Использовали колонку 300x10 мм



для эксклюзионной хроматографии белков Superdex 200 10/300 GL (Cytiva). Предел эксклюзии  $1.3 \times 10^6$ . Оптимально работает в диапазоне масс 10000-600000 Дальтон.

ВЭЖХ анализ проводили в следующих рекомендованных элюентах:

Superdex 200 10/300 GL: 50 мМ натрий-фосфат, содержащий 0.15 М NaCl и 0.1% азida натрия, pH 7.2. Скорость элюирования 0.75 см<sup>3</sup>/мин.

Молекулярные массы иммуноглобулинов G и M значительно отличаются: IgG – 150 кД (рI 6.1-8.5); IgM – 950 кД (рI 6.6), что позволяет легко их разделять в режиме высокоеффективной эксклюзионной хроматографии. Иммуноглобулин A 150 кД (рI 7.3) характеризуется образованием димеров (300 кД), что также способствует его отделению от IgG в анализе методом эксклюзионной хроматографии.

**Препаративная хроматография.** Хроматографию проводили в ацетатных и фосфатных буферных системах с УФ детектированием при длине волны 280 нм. Использовали колонки размером 24x300 мм. Элюирование осуществляли ступенчатым градиентом хлорида натрия.

**Радиальная иммунодиффузия.** Радиальную иммунодиффузию по Манчини проводили с использованием набора реагентов D-тест-G, A, M, НПО «Микроген», Россия с использованием пластин иммунодиффузных для количественного определения IgG, IgA, IgM человека.

**Иммуноэлектрофорез.** Чистоту выделенных фракций белков определяли с помощью иммуноэлектрофореза. Электрофорез проводили при силе тока 13 мА и напряжении 100В в течение 1.5 ч. (Bio Rad POWER PAC 300). Для окрашивания белков использовали раствор красителя амидочерного 10Б.

## Обсуждение результатов

Предварительные исследования новой технологической схемы показали, что иммуноглобулины A и M находятся в осадке после растворения осадка A по

Кону и центрифугирования (фракция I), осадке на фильтре после проведения вирусной инактивации и предварительной фильтрации сырья перед нанесением на первую колонну с гидрофобным сорбентом (фракция II) и на колонне с ДЭАЕ сорбентом (фракция III) (рис. 1 и табл. 2).

Из таблицы видно, что на сорбенте (фракция III) концентрируется более 96% IgA и около 50% IgM. При этом отсекаются агрегаты иммуноглобулинов и белков, а также ассоциаты IgM с вирусами, оставаясь во фракциях (I и II).

Важно отметить, что мы не ставили задачу выделения индивидуальных иммуноглобулинов A и M как это было в случае с иммуноглобулином G. В соответствии с требованиями к комплексному препарату необходимо было изучить возможность наработки иммуноглобулинов A и M или их смеси с контролируемым содержанием полимеров, фрагментов и иных белков плазмы крови.

Ориентируясь на характеристики препарата «Пентаглобин» (Германия, «Биотест Фарма») [8], основные характеристики разрабатываемого препарата можно определить следующим образом:

- Концентрация IgG – 50-70%
- Концентрация IgM – 15-25%
- Концентрация IgA – 15-25%
- Количество полимеров IgM, IgG, IgA – не более 5%
- Сторонние белки плазмы – не более 15%
- Фрагменты – не более 2%
- Чистота на ИЭФ – не более 2-х дополнительных линий на форограмме

Мы сразу поставили более жесткие рамки по содержанию полимеров (5%), тогда как в «Пентаглобине» они нормируются в пределах 10%, так как полимеры, как правило, определяют большую часть побочных эффектов.

Элюат, получаемый с ДЭАЕ колонны с использованием 20мМ раствора ацетата

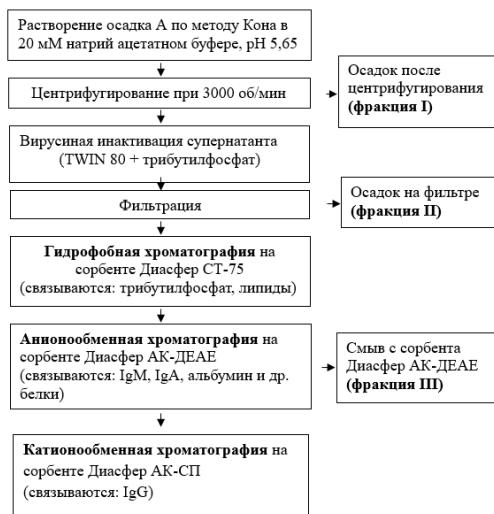


Рис. 1. Технологическая схема получения иммуноглобулина G  
 Fig. 1. Technological scheme for the production of immunoglobulin G

Таблица 2. Содержание иммуноглобулинов в различных боковых фракциях технологической схемы получения иммуноглобулина G

Table 2. The content of immunoglobulins in various side fractions of the technological scheme for obtaining immunoglobulin G

Фракция	Объем (дм <sup>3</sup> )	Концентрация, мг/см <sup>3</sup>			Содержание, г		
		IgA	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM
Фракция I	30.8	0.31	5.8	1.25	9.54	178.6	38.5
Фракция II	16.0	0.5	5.8	1.25	2.0	23.2	5.0
Фракция III	8.2	36	10.9	5.31	295.2	89.0	43.5
Итого:					306.7	290.8	87.0

аммония и 1 M NaCl в рамках технологического процесса получения иммуноглобулина G содержит значительное количество агрегатов (рис. 2). Необходимо снизить количество агрегатов и посторонних белков при сохранении соотношения IgA и IgM в пределах от 1:1.6 до 1.6:1. Очевидно, что суммарное их содержание (30-50%) нормируется простым добавлением IgG, который получается в рамках основной технологии переработки осадка A.

Поскольку в технологическом процессе получения иммуноглобулина G колонна с DEAE сорбентом отсоединяется и регенерируется независимо, мы оптимизировали условия смыва иммуноглобулинов A и M. Изучение условий элюирования колонны растворами с концентрацией хлорида натрия 0.075; 0.1; 0.2; 0.3 и 1M показало, что наиболее эффективным является предварительная про-

мывка колонны 0.075 M буферным раствором с pH 5.65, который удаляет более 60% полимеров с последующим смывом иммуноглобулинов 0.3 M раствором с тем же pH.

Дальнейшая очистка наиболее продуктивно может быть решена с помощью ионообменной хроматографии [9-11]. Для оптимизации этого подхода мы изучили ряд анионо- и катионообменников, отличающихся природой матрицы, структурными характеристиками и ионообменной емкостью (табл. 1). В качестве элюентов исследованы Na-ацетатные и Na-фосфатные буферные растворы с диапазоном pH от 5.0 до 7.4. Элюирование вели ступенчатым градиентом NaCl. От 2.5 до 15% шаг ступени был 2.5%, а далее 5%. Такой подход, как правило, позволяет в широких пределах варьировать селективность. В таблице 3 представлены характеристики буферных систем.

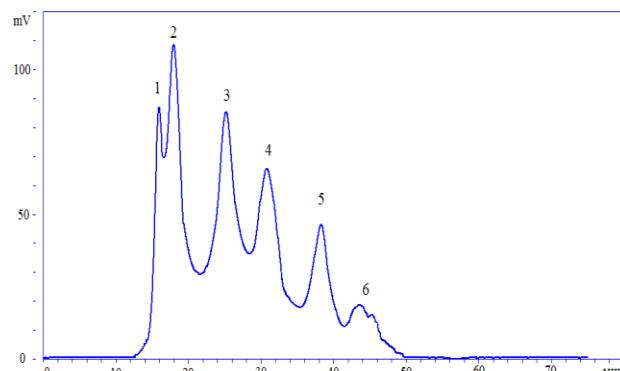


Рис. 2. Хроматограмма элюата с ДЕАЕ колонны 1М буферным раствором с pH 5.65.

Fig. 2. Chromatogram of the eluate from the bottom of the column with 1M buffer solution with pH 5.65

Таблица 3. Характеристики буферных растворов, использованных для ионообменной хроматографии иммуноглобулинов

Table 3. Characteristics of buffer solutions used for ion exchange chromatography of immunoglobulins

Состав буфера	pH буфера	Электропроводность буфера, мS	pH образца	Электропроводность образца, мS
20мM NaAc	5.0	1.58	4.99	1.2
20мM NaAc	5.65	1.62	5.64	1.15
20мM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6.8	1.65	6.8	1.1
20мM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7.4	1.64	7.4	1.2

Контроль за составом выделяемых фракций вели комплексом методов. Фракции анализировали на общее содержание белка, полимеров, агрегатов и фрагментов эксклюзионной ВЭЖХ. Радиальной иммунодиффузией определяли концентрацию иммуноглобулинов, а по разности между общим содержанием белка и содержанием иммуноглобулинов оценивали количество других белков.

На основании результатов анализа значительного числа фракций на содержание агрегатов и полимеров мы пришли к выводу, что предложенный нами путь выделения иммуноглобулинов А и М эффективен, и позволяет получать продукт с меньшим, чем в Пентаглобине содержанием этих примесей. При этом количественный и качественный состав фракций существенно зависит от сорбента.

Эксперименты показали недостаточную селективность у сорбентов ChromSpeed S 103 и Q 103. На этих сорбентах белки элюируются уже при низкой концентрации соли, что не позволяет

эффективно отделить иммуноглобулины от полимеров, агрегатов и других белков.

Изучение сорбента Диасфер-АК-ДЕАЕ показало, что при элюировании буферными растворами NaCl 100 и 200 мМ. требованиям по содержанию агрегатов отвечают несколько фракций. Однако содержание иммуноглобулинов А и М в этих фракциях слишком низкое 26% по IgM и 40% по IgA.

Катионнообменный сорбент Диасфер-АК-СП при низких значениях pH не проявляет селективности в отделении агрегатов от иммуноглобулинов. При высоких значениях pH белки практически не сорбируются и большая часть иммуноглобулинов элюируется в начальном объеме. Эта фракция при pH 6,8 содержит 52% IgM, 61% IgA и 7% полимеров. Эта фракция уже может представлять интерес для получения комплексного препарата.

Сорбент DEAE Sepharose CL-6B показал хорошие результаты при pH 5.0, 6.8 и

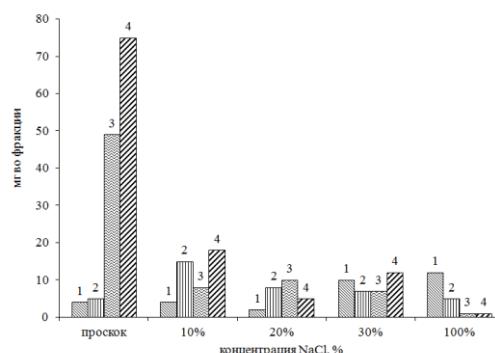


Рис. 3. Состав фракций при разделении смеси на сорбенте Relisorb DA 400 при pH 7.4.  
 1 – агрегаты, 2 – сторонние белки, 3 – IgM; 4 – IgA.

Fig. 3. Composition of fractions during separation of the mixture on the sorbent Relisorb DA 400 at pH 7.4. 1 – aggregates, 2 – sided proteins, 3 – IgM; 4 – IgA.

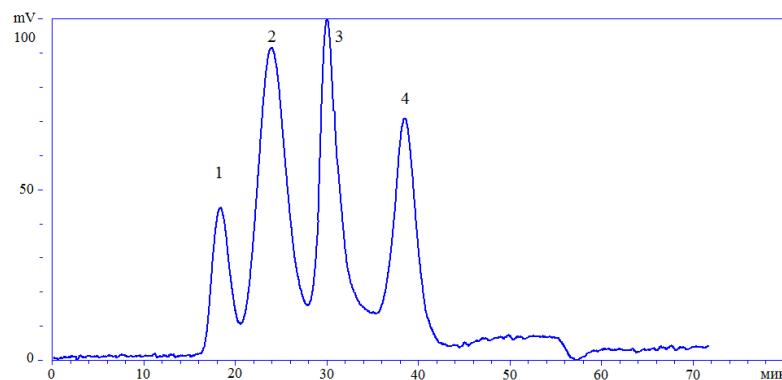


Рис 4. Хроматограмма сформированной смеси комплексного иммуноглобулина.  
 Колонна Superdex 200 10/300 GL. Элюент: 50 mM натрий-фосфат, содержащий 0,15 M NaCl и 0.1% азida, pH 7.2. Скорость элюирования 0.75 см<sup>3</sup>/мин. 1 – IgM, 2 – IgA, 3 – IgG, 4 – альбумин.

Fig. 4. Chromatogram of the formed mixture of complex immunoglobulin. Superdex 200 10/300 GL column. Eluent: 50 mM sodium phosphate containing 0.15 M NaCl and 0.1% azide, pH 7.2. Elution rate 0.75 cm<sup>3</sup>/min. 1 – IgM, 2 – IgA, 3 – IgG, 4 – albumin.

Таблица 4. Содержание IgA и IgM, а также полимеров (П) и сторонних белков (Б) во фракциях на сорбенте Relisorb DA 400 при pH 7,4

Table 4. The content of IgA and IgM, as well as polymers (N) and third-party proteins (B) in fractions on the sorbent Relisorb DA 400 at pH 7.4

Фракция	Полимеры, %	Сторонние белки, %	IgM, мг/фр	IgA, мг/фр
Просок	4	5	49	75
10%	4	15	8	18
20%	2	8	10	5

7.4. В последнем случае (pH 7.4) возможно объединение первых трех фракций. В результате этого можно получить удовлетворительные выходы по иммуноглобулинам – порядка 60% при низком содержании полимеров.

Наилучшие показатели по выходу (70% для IgA и 80% для IgM) достигнуты на сорбенте Relisorb DA 400 при pH 7.4 при объединении первых трех фракций (рис. 3 и табл. 4).

Иммуноэлектрофорез данной фракции перед добавлением иммуноглобулина G

демонстрирует наличие четких полос иммуноглобулинов М и А.

Фракция по результатам РИД содержит 8.2 мг/см<sup>3</sup> иммуноглобулина А, 6.9 мг/см<sup>3</sup> иммуноглобулина М. После добавления иммуноглобулина G до достижения концентрации в 16 мг/см<sup>3</sup> G сформированная смесь проанализирована эксклюзионной ВЭЖХ (рис. 4).

Ориентировочный материальный баланс свидетельствует о том, что из одной технологической загрузки (170 литров плазмы или 8.5-9.5 кг осадка А) получается 43-48 г IgM и 80-100 г IgA, что составляет 30% IgA и 35% IgM из расчета на среднее содержание иммуноглобулинов в плазме крови. Полученный результат достаточен для обеспечения производства комплексного иммуноглобулинового препарата и не требует дополнительных источников плазмы.

## Заключение

Разработан новый метод получения комплексного иммуноглобулинового препарата, содержащего иммуноглобулины А, М и G. Метод основан на использовании в качестве источника иммуноглобулинов А и М боковой фракции, образующейся при реализации технологии получения высокоочищенного, свободного от вирусов иммуноглобулина G.

Оптимизированы процессы элюирования фракции иммуноглобулинов IgA и IgM с колонны с DEAE сорбентом, используемой в технологии очистки IgG и условия последующей очистки смеси IgA и IgM от посторонних примесей.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет известных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.

## Список литературы/References

- 1.RU, 2467783, C2. Karasev V. S., Bochkova O. P., Staroverov S. M., Krasil'nikov I. V., Nikolaeva A. M. 2010-07-30. (In Russ.)
2. Di L. An update on the importance of plasma protein binding in drug discovery and development. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2021; 16(12): 1453-1465.
3. Goryainova O. S., Ivanova T. I., Rutovskaya M. V., Tillib S.V. A Method for the Parallel and Sequential Generation of Single-Domain Antibodies for the Proteomic Analysis of Human Blood Plasma. *Molecular Biology*. 2017; 51:855-864.
4. Laursen I. A. et al. Development, manufacturing and characterization of a highly purified, liquid immunoglobulin g preparation from human plasma. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2014; 41(3): 205-212.
5. Schaller J, Gerber S, Kaempfer U, Lejon S, Trachsel C. Human blood plasma proteins: structure and function. John Wiley & Sons. 2008: 151-155.
6. Cohn E. J., Gurd F. R.N., Surgenor D.M., Barnes B.A., Brown R.K., Derouaux G., Gillespie J. M., Kahnt F. W., Lever W. F., Lin C.H., Mittelmann D., Mouton R. F., Schrnid K. and Uroma E. A system for the separation of the components of human blood: Quantitative procedure for the separation of the protein components of human plasma. *J. amer. chem. SOC.* 1950; 72: 465-476.
7. Kistler P., Nitschmann Hs. Large scale production of human plasma fractions. *VoxSang.* 1962; 7: 414-424.
8. McCulloch L. et al. Treatment with IgM-enriched intravenous immunoglobulins enhances clearance of stroke-associated bacterial lung infection. *Immunology*. 2022; 167(4): 558-575.
9. Buchacher A., Iberer G. Purification of intravenous immunoglobulin G from human plasma—aspects of yield and virus safety. *Biootechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*. 2006; 1(2): 148-163.



10. Mateljak Lukačević S. et al. Quality-related properties of equine immunoglobulins purified by different approaches. *Toxins*. 2020; 12(12): 798.

11. Wysor S. K. et al. In-line buffer exchange in the coupling of Protein A chromatography with weak cation exchange chromatography for the determination of charge variants of immunoglobulin G derived from Chinese hamster ovary cell cultures. *Journal of Chromatography A*. 2024; 1718: 464722.

## Информация об авторах / Information about the authors

**В.С. Карапев** – к.б.н., старший научный сотрудник Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, АО «Биохиммак СТ» и Института физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина, Москва, Россия

**О.П. Бочкова** – к.б.н., старший научный сотрудник Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова и АО «Биохиммак СТ», Москва, Россия

**С.М. Староверов** – заведующий лабораторией Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, д.х.н., генеральный директор АО «БиоХимМак СТ», Москва, Россия

**А.В. Иванов** – к.фарм.наук, главный научный сотрудник «НПО «Микроген», Пермский филиал, НПО «Биомед», Москва, Россия

**И.С. Пыцкий** – к.х.н., заведующий лабораторией физико-химических основ хроматографии и хромато-масс-спектрометрии Института физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина, Москва, Россия

**А.К. Буряк** – директор проф., д.х.н., член-корреспондент РАН, директор ФГБУН Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина, Москва, Россия

**V.S. Karasev** – Ph.Doc, (biology) Senior Researcher, Chemical Department Lomonosov State University and JSC “Biochemmack S&T” and Institute of Physical chemistry and electrochemistry named after A.N.Frumkin”, Moscow, Russian Federation, e-mail: karasev@bcmst.ru

**O.P. Bochkova** – Ph.Doc, (biology) Senior Researcher, Chemical Department Lomonosov State University and JSC “Biochemmack S&T”, Moscow, Russian Federation, e-mail: bochkova@bcmst.ru

**S.M. Staroverov** – Dr.Sci.. Head of the laboratory Chemical Department Lomonosov State University and General director JSC “Biochemmack S&T”, Moscow, Russian Federation, e-mail: staroverov@bcmst.ru

**A.V. Ivanov** – PhD in Pharmaceutical Sciences, Chief Researcher, NPO Mikrogen, Perm branch, NPO Biomed, Moscow, Russian Federation e-mail: a.v.ivanov@mikrogen.ru

**I.S. Pytskii** – head of chromatography and mass-spectrometry laboratory, Institute of Physical chemistry and electrochemistry named after A.N.Frumkin”, Moscow, Russian Federation

**A.K. Buryak** – Director of the institute of Physical chemistry and electrochemistry named after A.N.Frumkin”, Corresponding member of RAS, Moscow, Russian Federation e-mail: ak-buryak@mail.ru

Статья поступила в редакцию 09.09.2024; одобрена после рецензирования 11.10.2024; принята к публикации 16.10.2024.

The article was submitted 09.09.2024; approved after reviewing 11.10.2024; accepted for publication 16.10.2024.