

بهینه‌سازی الزامات سنجش فعالیت ضد کمپلمانی به منظور کنترل کیفی محصول ایمونوگلوبولین: یک مطالعه ایرانی در مقیاس پایلوت

سیما محمدی بیدهندی^۱، مهدی باقری^۱، هاشم خرسند محمدپور^۲، سودابه بنازاده^۳، علی اکبر پورفتح‌اله^۴، پرویز کوخایی^۵، افسانه آقایی^۶

چکیده

سابقه و هدف

یکی از عوارض جانبی تجویز ایمونوگلوبولین، فعال شدن سیستم کمپلمان است که با غلظت بالای تجمعات و پلیمرهای بزرگ در فرآیند تولید ارتباط دارد. سنجش فعالیت آنتی‌کمپلمانی (ACA) در کنترل کیفیت دارویی اهمیت ویژه‌ای دارد و معیاری برای فعال شدن خود به خودی سیستم کمپلمان در فرآورده‌های ایمونوگلوبولینی تهیه شده از پلاسمای انسانی می‌باشد که بر اساس روش مرجع و طبق الزامات فارماکوپه انجام می‌شود.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، ابتدا آزمون ACA براساس فارماکوپه اروپا راه‌اندازی و سپس ACA در دو محصول متفاوت ایمونوگلوبولینی به دست آمده از روش تغییر یافته کوهن، به نام روش الف و یا روش ب، اندازه‌گیری و مقایسه شد. اندازه‌گیری بر اساس توانایی ایمونوگلوبولین برای اتصال غیراختصاصی به کمپلمان و جلوگیری از لیز گلبول‌های قرمز حساس شده گوسفند می‌باشد. بنابراین ایمونوگلوبولین با کمپلمان خوکچه هندی انکوبه و سپس باقی‌مانده کمپلمان تیترو به صورت درصد بیان گردید.

یافته‌ها

مقادیر ACA در دو محصول (روش الف و یا روش ب) در طی دو روز متوالی و هر روز هشت بار تکرار، به ترتیب CH50/mg protein 0.08 ± 0.04 و 0.07 ± 0.04 در مقایسه با IVIG تجاری (0.07 ± 0.04) تعیین شد. طبق فارماکوپه اروپا، مقدار مجاز ACA در IVIG، $1 \text{ CH50/mg IgG} \leq$ تعریف شده است.

نتیجه‌گیری

اندازه‌گیری‌های کمی و کیفی ایمونوگلوبولین به همان اندازه تحقیق و توسعه در فرآیندهای پالایش پلاسما ارزشمند است. با راه‌اندازی آزمون ACA، تجزیه و تحلیل ACA در طول فرآیند تولید و نیز در مراحل اعتبارسنجی فرآورده‌های ایمونوگلوبولینی امکان‌پذیر شده است.

کلمات کلیدی: ایمونوگلوبولین، کنترل کیفیت، پلاسما

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۳۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۱۰

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد ایمنی‌شناسی - دانشگاه علوم پزشکی سمنان - سمنان - ایران
- ۲- کارشناس ارشد بیوشیمی - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
- ۳- کارشناس ارشد بیوشیمی - شرکت پیشرو تشخیص فردآور - تهران - ایران
- ۴- PhD ایمنی‌شناسی - استاد دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس - تهران - ایران
- ۵- PhD ایمنی‌شناسی - استاد بیمارستان دانشگاه کارولینسکا - سولنا - استکهلم - سوئد
- ۶- مؤلف مسئول: PhD ایمنی‌شناسی - دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران - صندوق پستی: ۱۴۶۶۵-۱۱۵۷

مقدمه

در حال حاضر ایمونوگلوبولین داخل وریدی (IVIG) به عنوان یک داروی بیولوژیک، شامل طیف گسترده‌ای از آنتی‌بادی‌ها و برای مدیریت اشکال مختلف نقایص ایمنی و یا خودایمنی، بیماری‌های عفونی و یا التهابی با هدف استفاده می‌شود (۱).

از منظر تاریخی، فرآیندهای پالایش پلاسما انسانی در دهه ۱۹۴۰ میلادی منجر به تولید ایمونوگلوبولین انسانی و سایر پروتئین‌های پلاسما شد (۲). اولین تایید بالینی برای مصرف ایمونوگلوبولین مشتق شده از پلاسما، به پیشگیری از عفونت‌های باکتریایی خاص و سپس به آگاماگلوبولینمی ارثی توصیف شده توسط بروتون، محدود بود (۳). تلاش برای تجویز دوزهای بالاتر ایمونوگلوبولین عضلانی (IMIG)، منجر به تزریق همان محصول عضلانی به صورت داخل وریدی گردید که متعاقب آن در بیماران عوارض جانبی به وجود آمد (۴، ۵). به منظور کاهش اثرات جانبی، محصول ایمونوگلوبولین داخل وریدی (IVIG) فرموله و معرفی گردید. با این حال، واکنش سریع شوک آنافیلاکتیک در بیماران مشاهده می‌شد (۴). بروز این عوارض به تجمعات (Aggregated IgG) موجود در کنسانتره IVIG نسبت داده شد (۶).

در آغاز دهه ۱۹۶۰، واکنش‌های نامطلوب مربوط به فعالیت تجمعات آنتی‌کمپلمانی (ACA، anti-complementary activity) برای اولین بار توسط براندان (Barandun) گزارش شد (۵). بر همین اساس، علی‌رغم گزارش‌هایی مبنی بر عدم ارتباط بین فعالیت آنتی‌کمپلمانی و واکنش‌های نامطلوب در بیماران، ایمونوگلوبولین G (IgG) پلیمریزه شده (Polymer IgG) و تجمعات به عنوان یکی از دلایل اصلی واکنش‌های نامطلوب در بیماران، به دلیل فعال‌سازی غیر اختصاصی سیستم کمپلمان معرفی گردید (۶).

علاوه بر آن، ناخالصی‌هایی مانند پروتئازها نیز دخیل بودند. برای جلوگیری از تشکیل و یا از بین بردن

فعالیت ضد کمپلمانی IgG، تلاش‌های بسیاری در جهت تیمار آنزیمی محصول انجام گرفت، هم‌چنین تغییرات شیمیایی و روش‌های رسوبی توسط سازندگان در طول سال‌ها مورد بررسی قرار گرفت (۷). بنابراین، سنجش فعالیت آنتی‌کمپلمان (ACA) به عنوان یکی از جنبه‌های مهم و الزامات کنترل کیفیت دارویی در محصولات ایمونوگلوبولین مورد توجه بود (۸).

نیاز به سنجش ACA در چنین محصولاتی در سال‌های اخیر اهمیت بیشتری پیدا کرده است، در درجه اول به دلیل ضرورت انجام مراحل غیرفعال‌سازی ویروسی، نظیر عملیات حرارتی، که در فرآیند تولید محصولات پلاسمایی ممکن است باعث تشکیل تجمعات و ایجاد ACA شود. علاوه بر این، عوامل دیگری مانند فرمولاسیون محصول، زمان نگهداری و سایر شرایط بر تمایل به تشکیل تجمعات تاثیر می‌گذارد (۹).

سنجش فعالیت ضد کمپلمان در محصولات ایمونوگلوبولین به عنوان روش مرجع برای اندازه‌گیری ACA برای اولین بار توسط فارماکوپه اروپا (EP) در سال ۱۹۹۵ بر اساس لیز گلبول‌های قرمز گوسفندی پوشیده شده با آنتی‌بادی (SRBC) با واسطه کمپلمان به کار گرفته شد (۱۰). بر این اساس، مقدار مشخصی از محصول ایمونوگلوبولین باید با مقدار مشخصی از کمپلمان خوکچه هندی انکوبه شود. پس از انکوبه شدن، بقایای کمپلمان با استفاده از آنتی‌بادی ضد گلبول‌های قرمز (همولیزین) و SRBC حساس شده تیتراژ می‌شود (۶).

از آنجایی که به موازات تحقیق و توسعه در صنعت پلاسما، وجود آزمون‌های کیفی و کمی معتبر مربوط، در طول فرآیند تولید و نیز در مراحل اعتبار-سنجی فرآورده‌های ایمونوگلوبولینی، امری اجتناب ناپذیر می‌باشد، راه‌اندازی آزمایش استاندارد تایید شده برای ACA برای دو محصول به دست آمده در مقیاس آزمایشی از دو روش تولید ایمونوگلوبولین مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، فرآیند پالایش پلاسما با دو روش مختلف تغییر یافته کوهن انجام شد. دو محصول IgG به دست آمده از فرآیندهای پالایش متفاوت تحت روش‌های خالص‌سازی یکسان قرار گرفت. بنابراین ابتدا آزمون ACA راه‌اندازی و سپس سنجش و مقایسه ACA انجام شد.

تهیه ایمونوگلوبولین G:

دو فرآیند مختلف تهیه ایمونوگلوبولین در مقیاس آزمایشی با تغییرات اندکی در روش کوهن طراحی گردید (۲). در روش الف ابتدا رسوب کرایو خارج شد و سپس خمیر فراکشن I، خمیر فراکشن II+III و در نهایت خمیر فراکشن II (FII) در غلظت‌های مختلف اتانول، pH، قدرت یونی و دما رسوب داده شد. در روش ب، پس از رسوب کرایو، فراکشن I+II+III به طور هم‌زمان در یک مرحله رسوب داده شد و سپس فراکشن I+II+III برای حصول به خمیر فراکشن II تحت غلظت‌های مختلف اتانول، pH، قدرت یونی و دما قرار گرفت. پس از آن بر روی خمیر فراکشن II غنی از IgG حاصل هر دو روش، به صورت جداگانه فرآیندهای کروماتوگرافی جهت دستیابی به خلوص بیشتر انجام شد. برای این که خمیرهای FII به دست آمده با روش الف و ب برای خالص‌سازی آماده شوند، به طور جداگانه دیافیلتر و اولترافیلتر شدند. فرآیندهای کروماتوگرافی با استفاده از ژل‌های تبادل یونی، Q Sepharose FF (فارماسیا، سوئد) و CM-Sepharose FF (فارماسیا، سوئد) و Sephacryl S-300 (فارماسیا، سوئد) به عنوان فیلتر ژل انجام شد. توزیع اندازه مولکولی برای تعیین پلیمر/الیگومر و دایمر/مونومر توسط کروماتوگرافی مایع (Waters HPLC، ایالات متحده، ستون TSK-3000 SWXL، 6*300 میلی‌متر، TSKgel پیش ستونی 6*40 SWXL میلی‌متر) انجام شد. آزمایش‌های کمی و کیفی لازم بر روی هر دو نوع محصول انجام گرفت.

سنجش ACA:

جهت سنجش میزان ACA در ایمونوگلوبولین، مقدار مشخصی از ایمونوگلوبولین با مقدار مشخصی از کمپلمان خوکچه هندی انکوبه گردید. پس از انکوباسیون مقدار کمپلمان باقی مانده با استفاده از همولایزین و گلبول قرمز گوسفند تیترا شد. گلبول قرمز گوسفند ابتدا با همولایزین (آنتی‌بادی ضد اریتروسیت‌ها یا آمبوسپتور) حساس گردید.

مقدار ACA در دو محصول ایمونوگلوبولین و در مقایسه با IVIG تجاری در بازار ایران تعیین شد. برای انجام آزمایش، گلبول قرمز گوسفند (SRBC)، همولایزین و کمپلمان از مؤسسه رازی ایران تهیه شد. برای آماده‌سازی SRBC، گلبول‌های قرمز گوسفند، چهار بار با بافر باربیتال ژلاتین برای حذف گلبول‌های قرمز لیز شده شستشو شدند. برای تهیه این بافر ابتدا بافر باربیتال استوک و محلول ژلاتین استوک تهیه شد و سپس چهار حجم از محلول ژلاتین به یک حجم محلول استوک باربیتال اضافه گردید (۱۱). گلبول‌های قرمز گوسفند پس از باز شدن ویال، در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ هفته قابلیت نگهداری دارند. هر هفته قبل از استفاده میزان همولیز در مایع رویی ویال اندازه‌گیری و در صورت عدم همولیز ویال مورد استفاده قرار می‌گیرد. گلبول قرمز گوسفند ۵٪ برای تیتراسیون همولیزین تهیه شد و اندازه‌گیری جذب مایع رویی در طول موج ۵۴۱ نانومتر انجام شد و درصد همولیز محاسبه گردید. رقتی که در آن افزایش مقدار همولیزین هیچ تغییر آشکاری در درصد همولیز ایجاد نمی‌کرد، به عنوان حداقل واحد همولیتیک (One Minimal Hemolytic Unit) یا (MHU^۱) در یک میلی‌لیتر در نظر گرفته شد. رقت بهینه همولیتیک همولیزین برای تهیه SRBC حساس شده ۲ MHU/mL تعیین شد. سریال رقت کمپلمان با محلول بافر ژلاتین تهیه و با SRBC حساس شده تیترا شد. جذب مایع رویی در طول موج ۵۴۱ نانومتر خوانده شد و درصد همولیز محاسبه گردید.

CH50/mg protein 0.466 ± 0.07 در مقایسه با
CH50/mg protein (شرکت بیوتست) 0.486 ± 0.07
این مقادیر الزامات
فارماکوپه اروپا را برآورده می نمود.

بحث

کنترل کیفی محصولات دارویی تهیه شده از
پلاسمای انسانی به همان اندازه تولید این مشتقات
دارویی اهمیت دارد. بنابراین پس از اقدامات اولیه
برای تهیه محصول ایمونوگلوبولینی مشتق از پلازما
و به هدف کنترل کیفی محصول تولید شده،
راه اندازی آزمون ACA مد نظر قرار گرفت. ابتدا
کمپلمان خوکچه هندی، گلبول قرمز گوسفند،
آنتی بادی ضد اریتروسیته و بافرها تهیه شد. سپس با
انجام تیتراسیون های مختلف برای به دست آوردن
تیرهای بهینه آنتی بادی ضد اریتروسیته برای تهیه
گلبول قرمز گوسفند حساس شده و نیز تیتراسیون
کمپلمان برای حصول به CH50، انجام سنجش
امکان پذیر گردید. سنجش بر روی نمونه ها در مقایسه
با نمونه کنترل در حد مجاز قرار داشت (مقدار مجاز
 $1 \text{ CH50} / \text{mg IgG} \leq$) و الزامات فارماکوپه اروپا و
بریتانیا را برآورده می نمود (۱۱).

فعالیت ضد کمپلمان یکی از اثرات ناخواسته
ایمونوگلوبولین های انسانی را به علت فعال شدن
خود به خودی سیستم کمپلمان مشخص می کند. به
طور کلی پایین بودن مقدار ACA از ایجاد عوارض
جانبی احتمالی به علت وجود تجمعات، جلوگیری
می کند. روش سنجش بر اساس توانایی
ایمونوگلوبولین به اتصال غیر اختصاصی به کمپلمان،
در غیاب حضور کمپلکس آنتی ژن- آنتی بادی و در
نتیجه ممانعت از لیز گلبول های قرمز حساس شده
گوسفند می باشد (۱۲).

محصولات اولیه IVIG که حاوی تجمعات
ایمونوگلوبولین و یا پلیمرهای بزرگ بودند، در
بیماران واکنش های نامطلوب و سریع همراه با شوک
آنافیلاکتیک ایجاد می کردند (۸). فعال شدن و مصرف

واحد فعالیت همولیتیک کمپلمان (CH50،
Complement Activity Hemolytic Unit) مقدار
کمپلمانی است که می تواند از کل مجموع 5×10^8
SRBC حساس شده، مقدار $2/5 \times 10^8$ حساس شده را لیز کند. به عبارت دیگر CH50 ۱
فعالیت کمپلمانی است که باعث لیز ۵۰ درصد از
SRBC های حساس در شرایط واکنش مشخص
شود. بنابراین با استفاده از بافر باربیتال ژلاتین، رقت
کمپلمان با CH50/mL ۱۰۰ تهیه شد. آزمایش
بر روی هر دو محصول ایمونوگلوبولین انجام شد و
یک محصول تجاری از IVIG به عنوان شاهد (IVIG
از پلاسمای ایرانی ساخت شرکت بیوتست) در نظر
گرفته شد. ۱۰ میلی گرم محصول ایمونوگلوبولین با
CH50 ۲۰ کمپلمان انکوبه شد و کمپلمان باقیمانده
تیترا شد. ACA به عنوان درصد مصرف کمپلمان
متناسب با شاهد به عنوان ۱۰۰٪ بیان شد. سپس
مقدار ACA محاسبه شد. در دو روز مختلف،
آزمایش های هشت بار انجام شد.

یافته ها

در بررسی خلوص با روش الکتروفورز استات
سلولز، خلوص ایمونوگلوبولین در هر دو محصول
حدود ۱۰۰٪ تعیین شد. میزان IgM کمتر از ۰/۵٪ و
IgA کمتر از ۱/۲٪ در هر دو محصول گزارش
گردید. توزیع اندازه مولکولی توسط HPLC بررسی
گردید و میزان پلیمرها و تجمعات کمتر از ۰/۵٪ و
دیمر/ مونومر بیش از ۹۹٪ در هر دو محصول
گزارش شد. نتیجه ACA با فرمول زیر محاسبه و
ACA به صورت واحد همولیتیک فعالیت
کمپلمان (CH50/mg IgG) بیان گردید (۱۱). طبق
فارماکوپه اروپا، مقدار مجاز ACA در IVIG، کمتر یا
مساوی یک ($1 \text{ CH50} / \text{mg IgG} \leq$) تعریف شده است.

$$\text{ACA CH 50/ mg Protein} = \frac{\text{Complement } \left(\frac{\text{CH50}}{\text{mL}} \right) - \text{Sample } \frac{\text{CH50}}{\text{mL}}}{\text{protein } \frac{\text{mg}}{\text{mL Sample}}}$$

مقادیر ACA در دو محصول روش های الف و ب
به ترتیب CH50/mg protein 0.486 ± 0.08 و

کمپلمان به حضور تجمععات و یا پلیمرها در محصول IgG نسبت داده شد که بدون هیچ گونه تداخل آنتی ژنی باعث ایجاد تغییراتی در قسمت ثابت Fc (constant fragment/crystallizable region) مولکول شده و عوارض جانبی نامطلوب و همولیز با واسطه کمپلمان ایجاد می کرد (۵، ۱۳). ویژگی های فیزیکی تشکیل تجمععات و هم چنین غلظت تجمععات در محصولات IVIG در میزان ACA مؤثر است (۶). مطالعه های اولیه راماسامی و فاروجیا در سال ۱۹۹۷ نشان داد که ACA تحت تاثیر روش تشکیل تجمععات قرار می گیرد. آن ها نشان دادند که محصولات IVIG در صورتی که در pH اسیدی مثلاً در محدوده ۴ تا ۶۰ درجه سانتی گراد حرارت داده شوند، تجمععاتی را تشکیل می دهند که به طور ضعیف به کمپلمان متصل می شوند، در حالی که اگر محصول در pH خنثی مثلاً در محدوده ۷ حرارت داده شود، تجمععاتی ایجاد می کند که میزان ACA بالایی را نشان می دهد بنابراین اگر چه توزیع اندازه مولکولی و روش HPLC، درصد تجمععات را تخمین می زند ولی باز هم نمی تواند بازتابی از مقدار ACA باشد (۸). با این حال، لازم است هم تجزیه و تحلیل توزیع وزن مولکولی توسط HPLC و هم سنجش ACA انجام شود تا مشخصات محصول به طور کامل مشخص شود (۶). مشکلات متعددی برای راه اندازی سنجش ACA وجود دارد. بوچاچر و همکاران هم چنین نشان دادند که معرف ها و شرایط، تاثیر قابل توجهی بر انجام آزمایش دارند. نتایج آن ها نیز با یافته های راماسامی در سال ۱۹۹۷ همسو بود که نشان داد ویژگی فیزیکی تجمععات بر نتیجه اندازه گیری ACA مؤثر است و پلیمرها و تجمععات IgG در صورتی باعث افزایش ACA می شوند که در محیط های خاص از نظر pH تشکیل شده باشند (۶).

بنابراین اگر چه پایین بودن مقدار ACA از ایجاد عوارض جانبی احتمالی به علت وجود تجمععات، جلوگیری می کند، اما محتوای پلیمرها و اندازه تجمععات بر میزان ACA تاثیر می گذارد (۶).

بر هم کنش IVIG با کمپلمان ترکیبی پیچیده از هر دو اثرات فعال سازی و مهارتی است (۱۴). مطالعه ها نشان داده است که حتی مقادیر اندک تجمععات بر اساس ماهیت تشکیل آن ها، مثلاً تشکیل تجمععات در شرایط خنثی، می تواند منجر به اتصال به سیستم کمپلمان شود. در مقابل، تجمععاتی که در شرایط اسیدی تشکیل می شوند، به راحتی به سیستم کمپلمان متصل نمی شوند (۱۵).

در تمامی فارماکوپه ها نظیر فارماکوپه انگلستان (BP) و نیز فارماکوپه اروپا (EP) و هم چنین مقررات سازمان بهداشت جهانی (WHO) در مورد تهیه داروهای مشتق از پلاسما، الزامات خاصی در خصوص فرآورده های IVIG تهیه شده از پلاسما انسانی از جمله مقادیر پلیمر و فعالیت ضد کمپلمان وجود دارد (۱۶، ۱۷).

همان طور که قبلاً توضیح داده شد، راه اندازی آزمایش ACA می تواند تحت تاثیر عوامل مختلفی باشد. معرف های ACA مانند SRBC، بافر ژلاتین و همولیزین عوامل تعیین کننده در نتایج سنجش می باشد. از آن جایی که مقادیر مختلف ACA برای یک نمونه واحد با سری ساخت های مختلف اندازه گیری شده است، کیفیت سری ساخت کمپلمان نیز به طور قابل توجهی برای اعتبارسنجی در نظر گرفته می شود. به همین دلیل پارامترهایی مانند ترکیب بافر، همولیزین و روش آماده سازی گلوله های قرمز گوسفند و کمپلمان خوکچه هندی، پارامترهای حیاتی در تجزیه و تحلیل نتایج می باشند (۶).

در انجام این آزمایش وجود تخصص و مهارت فنی ویژه نقش مهمی را بازی می کند. در مطالعه های میکا و همکاران نشان داده شده بود که فعالیت ضد کمپلمان IgG می تواند از طریق پیت کردن در طول آماده سازی رقت های سریال تا ۲۰ برابر افزایش یابد، پس بنابراین حتی پیت کردن مکرر باعث افزایش قابل توجه فعالیت ضد کمپلمان IVIG و تفسیر نامناسب سنجش می شود (۱۸، ۱۹).

نتیجه‌گیری

بستگی دارد. سنجش ACA به عنوان یکی از الزامات تولید و عرضه محصولات IVIG در فارماکوپه‌های مختلف مثلاً در فارماکوپه اروپا (EP) قید گردیده است که باید به طور معمول برای هر سری ساخت محصولات ایمونوگلوبولینی انجام شود، بنابراین با راه‌اندازی این آزمون، تجزیه و تحلیل ACA در طول فرآیند تولید و نیز در طی مراحل اعتبارسنجی فرآورده‌های ایمونوگلوبولینی امکان‌پذیر گردیده است.

تشکر و قدردانی

این مقاله با کد اخلاق IR.TMI.REC.1394.41 مجوز گرفت. از مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون و دانشگاه علوم پزشکی سمنان که حمایت مالی از این پروژه را بر عهده داشته است، قدردانی می‌گردد.

استانداردسازی سنجش ACA، برای ارزیابی‌های کیفی محصولات ایمونوگلوبولین، به همان اندازه تحقیق و توسعه در فرآیندهای تولید ارزشمند است و به همین دلیل به موازات اقبال در توسعه صنعت پالایش پلاسما و با همان جدیت باید مورد توجه قرار گیرد. از آن جایی که در سال‌های اخیر تلاش‌های وافر برای رسیدن به خودکفایی در زمینه داروهای مشتق از پلاسما و به ویژه ایمونوگلوبولین‌ها مطرح بوده است، در این مطالعه بر آن شدیم که یکی از آزمون‌های بسیار مهم در کنترل کیفی محصولات ایمونوگلوبولینی راه‌اندازی شده و با نمونه‌های ایمونوگلوبولینی تهیه شده در این پروژه مورد آزمایش قرار گیرد. راه‌اندازی این سنجش با مشکلات عدیده‌ای مواجه است و به شدت به سری ساخت کمپلمان، همولیزین، گلوبول قرمز گوسفند و نیز ترکیب محلول بافر مورد استفاده

References:

- 1- Arumugham VB, Rayi A. Intravenous Immunoglobulin (IVIG). 2022 Jul 4. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022.
- 2- Cohn EJ, Strong LE, Hughes W, Mulford D, Ashworth J, Melin Me, et al. Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins. IV. A System for the Separation into Fractions of the Protein and Lipoprotein Components of Biological Tissues and Fluids. J Am Chem Soc 1946; 68(3): 459-75.
- 3- Bruton OC. Agammaglobulinemia. Pediatrics 1952; 9(6): 722-8.
- 4- Farrugia A, Poulis P. Intravenous immunoglobulin: regulatory perspectives on use and supply. Transfus Med 2001; 11(2): 63-74.
- 5- Barandun S, Kistler P, Jeunet F, Isliker H. Intravenous administration of human γ -globulin. Vox Sang 1962; 7(2): 157-74.
- 6- Buchacher A, Schluga P, Müllner J, Schreiner M, Kannicht C, Weinberger J. Anticomplementary activity of IVIG concentrates—important assay parameters and impact of IgG polymers. Vox Sang 2010; 98(3p1): e209-e18.
- 7- Knezevic-Maramica I, Kruskall MS. Intravenous immune globulins: an update for clinicians. Transfusion 2003; 43(10): 1460-80.
- 8- Ramasamy I, Tran E, Farrugia A. Measurement of anticomplementary activity in therapeutic intravenous immunoglobulin preparations. Biologicals 1997; 25(1): 87-92.
- 9- Prince A, Horowitz B, Horowitz M, Zang E. The development of virus-free labile blood derivatives—a review. Eur J Epidemiol 1987; 3(2): 103-18.
- 10- European Pharmacopeia: Human normal immunoglobulin for intravenous administration. Strasbourg Cedex, France: European Pharmacopeia 6.3; 2009. p. 4166-8.
- 11- European Pharmacopoeia. 10th ed. Council of Europe, 67075 Strasbourg Cedex, France: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe (EDQM); 2019. p. 216-8.
- 12- Krivykh M, Kornilova O, Bunyatyan N, Kudasheva ÉY. Optimization of the Conditions for Assay of the Anti-Complement Activity of Human Immunoglobulin Preparations for Intravenous Administration. Pharmaceutical Chemistry Journal 2015; 49(7): 473-6.
- 13- Padmore RF. Hemolysis upon intravenous immunoglobulin transfusion. Transfus Apher Sci 2012; 46(1): 93-6.
- 14- Basta M. Ambivalent effect of immunoglobulins on the complement system: activation versus inhibition. Mol Immunol 2008; 45(16): 4073-9.
- 15- Eibl MM, Ahmad R, Wolf HM, Linnau Y, Gotz E, Mannhalter JW. A component of factor VIII preparations which can be separated from factor VIII activity down modulates human monocyte functions. Blood 1987; 69(4): 1153-60.

- 16- British Pharmacopoeia, Blood-related products, Normal Immunoglobulin for Intravenous Use. British Pharmacopoeia (BP). IV2020. p. 613-5.
- 17- WHO Expert Committee on Biological Standardization. World Health Organ Tech Rep Ser 1994; 840: 1-218.
- 18- Miekka SI, Gozze I. Anticomplementary activity of human immunoglobulin G. I. Mechanism of the artifactual increase in anticomplementary activity of IgG during the assay. Vox Sang 1975; 29(2): 101-23.
- 19- Krivykh MA, Kornilova OG, Bunyatyan ND, Kudasheva ÉY. Optimization of the Conditions for Assay of the Anti-Complement Activity of Human Immunoglobulin Preparations for Intravenous Administration. Pharmaceutical Chemistry Journal 2015; 49(7): 473-6.

Original Article

Improvement of anticomplementary activity assay for the quality control of immunoglobulin product: an Iranian pilot scale study

Mohammadi Bidhendi S.¹, Bagheri M.¹, Khorsand Mohammadpour H.², Banazadeh S.³, Pourfathollah A.A.⁴, Kokhaie P.⁵, Aghaie A.²

¹Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

²Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

³Fardavar Companies Group, Tehran, Iran

⁴Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

⁵Karolinska University Hospital Solna, Stockholm, Sweden

Abstract

Background and Objectives

One of the side effects of immunoglobulin administration is the activation of the complement system related to the high concentration of aggregates/large polymers in the production process. Measuring anticomplementary activity (ACA) is important in pharmaceutical quality control and is a criterion of spontaneous activation of complement system in immunoglobulin products prepared from human plasma.

Materials and Methods

In this experimental study, ACA was established based on the European Pharmacopoeia (EP) and ACA was measured and compared in two immunoglobulin products obtained by two modified Cohn's methods A or B. The measurement is based on the ability of immunoglobulin for binding to complement and prevent the lysis of sensitized sheep red blood cells (SRBC). Therefore, immunoglobulin was incubated with guinea pig complement and then the remaining complement was titrated by CH50 method and expressed as a percentage.

Results

ACA values in two products in the two methods of A and B and in two consecutive days and eight times each day were determined to be 0.486 ± 0.08 and 0.466 ± 0.07 CH50/mg protein, respectively; compared to commercial IVIG (Biotest Company) that was 0.486 ± 0.07 . ACA activity was measured as less than ≤ 1 CH50 /mg IgG, which was in accordance with the requirements of the pharmacopoeia.

Conclusions

Quantitative and qualitative immunoglobulin measurements are as valuable as research and development in plasma purification processes. With the launch of the ACA test, ACA analysis has become possible during the production process as well as in the validation stages of immunoglobulin products.

Key words: Immunoglobulin, Quality Control, Plasma

Received: 22 Aug 2022

Accepted: 1 Nov 2022

Correspondence: Aghaie A., PhD of Immunology. Associate Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.

P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 82052183; Fax: (+9821) 88601599

E-mail: aghaie.a@gmail.com