

تهیه ماده حد واسط مناسب برای تولید ایمونوگلوبولین تزریقی وریدی از پلاسمای انسانی

افسانه آقائی^۱، دکتر علی اکبر پورفتح‌اله^۲، سیده زهرا بطحانی^۳، دکتر سید محمد مودنی^۴، هاشم خرسند محمدپور^۵،
دکتر حوری رضوان^۶، سودابه بنازاده^۷، بهزاد ادیبی مطلق^۸، دکتر سید کامران موسوی حسینی^۹، دکتر محمدعلی جلیلی^{۱۰}

چکیده

سابقه و هدف

پلاسمای انسان ماده‌ای حیاتی و منحصر به فرد است که حاوی پروتئین‌های مهم نظیر آلبومین، ایمونوگلوبولین، فاکتورهای انعقادی و غیره می‌باشد و مصارف دارویی دارد. فرآیند تخلیص ایمونوگلوبولین از پلاسما به روش اصلی پالایش با اتانل کوهن انجام می‌شود و محصول پایه، فرکشن II می‌باشد. جهت دستیابی به فرکشن II با شرایط مناسب برای استفاده به عنوان ماده اولیه در خلص سازی ایمونوگلوبولین تزریقی وریدی، از روش تغییر یافته کوهن استفاده گردید. هدف از تهیه این ماده حد واسط، استفاده از آن برای مراحل بعدی تخلیص و ویروس زدایی جهت تولید ایمونوگلوبولین تزریقی وریدی بوده است.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی (experimental) بود. به منظور تولید خمیر فرکشن II، پروتئین‌های مختلف پلاسما با استفاده از اتانل در غلظت‌های متفاوت و در شرایط کنترل شده همراه با تنظیم دما، pH و قدرت یونی رسوب داده شد. در طی مراحل مختلف، فرآیند پالایش نمونه‌های تولید شده به منظور ارزیابی فرآیند تولید مورد آزمایش قرار گرفت و نتایج حاصل از هر مرحله تولید با یکدیگر و نیز با پلاسما به عنوان ماده اولیه مقایسه گردید.

یافته‌ها

نتایج به دست آمده حاکی از بازده بالا (۵/۲ gr/kg plasma) و خلوص مناسب (بالای ۹۰ درصد) فرکشن II مطابق استاندارد فارماکوپه به دست آمده بود به نحوی که سایر پروتئین‌های ضروری پلاسما که می‌تواند برای تهیه دیگر فرآورده‌های پلاسمایی مورد استفاده قرار گیرند نیز در شرایط مطلوب حفظ شدند. فرکشن II به دست آمده از نظر مقدار فعال کننده پری‌کالیکرین مطابق استاندارد فارماکوپه بود. در طی چند سری کاری انجام شده، ساختار پروتئین تکرار پذیری خوبی را نشان داد که با استانداردهای استفاده شده نیز مطابقت داشت.

نتیجه‌گیری

فرکشن II به دست آمده یک ماده حد واسط مناسب برای تولید ایمونوگلوبولین تزریقی وریدی می‌باشد که مقدار تجمعات و همچنین میزان فعال کننده پری‌کالیکرین آن در حد ناچیز است. از آنجایی که ساختار محصول به دست آمده در حد مطلوب است می‌توان از این روش برای تهیه فرکشن II در مقیاس نیمه صنعتی و حتی صنعتی استفاده نمود.

کلمات کلیدی: ایمونوگلوبولین تزریقی وریدی، پالایش به روش کوهن، ساختار مولکولی

تاریخ دریافت: ۱۴/۶/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۴/۹/۲۳

۱- دانشجوی PhD ایمونولوژی دانشگاه تربیت مدرس - مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران و شرکت پالایش و پژوهش خون

۲- مؤلف مسؤول: PhD ایمونولوژی - استاد دانشگاه تربیت مدرس - مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران - صندوق پستی ۱۴۱۱۵-۱۱۱

۳- PhD بیوشیمی - دانشیار دانشگاه تربیت مدرس

۴- PhD ایمونولوژی - دانشیار دانشگاه تربیت مدرس - مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران و شرکت پالایش و پژوهش خون

۵- کارشناس ارشد بیوشیمی - مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران و شرکت پالایش و پژوهش خون

۶- PhD بیوشیمی - استاد مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

۷- PhD شیمی دارویی - استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران و شرکت پالایش و پژوهش خون

۸- PhD شیمی دارویی - دانشیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران و شرکت پالایش و پژوهش خون

مقدمه

پلاسمای انسان ماده‌ای حیاتی و منحصر به فرد است که حاوی بیش از ۲۰۰ ترکیب بیوشیمیایی می‌باشد. در این میان برخی از پروتئین‌های مهم نظیر آلبومین، ایمونوگلوبولین‌های مختلف، فاکتورهای انعقادی و ضد انعقادی مصارف دارویی داشته و جداسازی آن‌ها در داروسازی کاربرد فراوان یافته است. فرآیند تخلیص ایمونوگلوبولین‌ها از پلاسمای انسان در مقیاس وسیع اولین بار در سال ۱۹۴۰ توسط کوهن (Cohn) و همکارانش ارائه گردید (۱، ۲). در روش‌های اولیه که از اتانل سرد جهت رسوب‌گیری پروتئین‌ها استفاده می‌شد، ایمونوگلوبولین به دست آمده جهت تزریق عضلانی مناسب بود و تزریق وریدی آن عوارض متعددی ایجاد می‌نمود که علت اصلی آن وجود مولکول‌های به هم چسبیده (aggregate) ایمونوگلوبولین در این محصولات بود (۳).

امروزه اکثر فرآورده‌های ایمونوگلوبولین به روش اصلی پالایش با اتانل کوهن و روش تغییر یافته آن کیسلر-نیشمن (Kistler-Nichman) تهیه می‌گردند که محصول پایه فرکشن II می‌باشد (۴).

در مورد برخی از فرآورده‌های تزریق وریدی، از روش‌های شیمیایی و یا هضم آنزیماتیک با پپسین استفاده شده که نیمه عمر محصول به دست آمده کوتاه بوده است. در جهت رفع این نقص برخی از تولید کنندگان از کروماتوگرافی تعویض یونی و برخی دیگر از pH اسیدی استفاده نموده اند (۵-۹).

به طور کلی هدف اصلی از روش‌های تهیه پروتئین‌ها از پلاسما، افزایش بازدهی و کاهش هزینه است، در عین حال روش انتخابی باید امکان تخلیص مواد را به گونه ای فراهم کند که فعالیت بیولوژیک کافی و مؤثر برحسب استانداردهای جهانی را دارا باشد. علاوه بر این، بسیار مهم است که روش‌های انتخابی نسبت به تغییرات جزئی مقاوم بوده و از قابلیت تکرار پذیری بالا برخوردار باشند (۱۰، ۱۱).

در مطالعه حاضر هدف اصلی دستیابی به ماده حدواسط با شرایط مناسب جهت استفاده به عنوان ماده اولیه در خالص سازی ایمونوگلوبولین تزریق وریدی با

استفاده از روش کوهن و استفاده از تغییراتی در جهت افزایش بازدهی، کاهش چسبندگی مولکولی و افزایش تکرارپذیری بوده است. بالاخص تلاش براین بوده که این کار در حجم‌های بالاتر از مقیاس متعارف آزمایشگاهی صورت پذیرد تا اولاً تکرارپذیری آن معنی دارتر شود و ثانیاً در صورت لزوم به حجم‌های تولیدی در مقیاس صنعتی تعمیم یابد.

اثر این روش تغییر یافته بر ساختار مولکولی ایمونوگلوبولین‌های تخلیص شده نیز با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی (HPLC و CD) مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه که از نوع تجربی (experimental) بود، از پلاسمای تازه منجمد (Fresh Frozen Plasma, FFP) تهیه شده در سازمان انتقال خون استفاده گردید که آزمایش‌های روتین شامل anti-HIV، HBsAg و anti-HCV با روش الیزا روی آن انجام گرفت و تایید شد. به دلیل عدم افزایش یک نوع خاص از ایزوآگلوتینین‌های خونی، پلاسما از گروه‌های مختلف خون انتخاب و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

مراحل پالایش پلاسما:

در پالایش پلاسما از اتانل ۹۶ درجه سانتی‌گراد به عنوان رسوب دهنده در همراهی با تنظیم pH و دما برای رسوب بخش‌های مختلف پروتئین موجود در پلاسما مطابق با روش کوهن تغییر یافته، استفاده شده است:

الف - تهیه رسوب کرایو

به منظور پیش ذوب (prethawing) پلاسمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد، کیسه‌های پلاسما به مدت یک شب در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. کیسه‌های پلاسمایی پس از ضد عفونی و شستشو با آب مقطر بریده، خرد شده و به تانک پالایش منتقل گردیدند. سرعت همزن و دمای تانک پالایش متناسب با ذوب پلاسما کنترل و تنظیم شد. پس از ذوب پلاسما، کرایو در دمای صفر تا ۴ درجه سانتی‌گراد توسط سانتریفوژ از پلاسما جدا گردید.

جداسازی رسوب‌های ایجاد شده در فرآیند پالایش توسط سانتریفوژ ژوئن KR422 به مدت یک ساعت در ۴۰۰۰g و در دماهای منفی متناسب با مرحله رسوب‌گیری انجام شد.

روش‌های سنجش

اندازه‌گیری پروتئین: میزان پروتئین در نمونه‌های مختلف فرآیند پالایش با روش بیوره با استفاده از دستگاه اتوآنالیزر اتوماتیک هیتاچی ۹۰۲ تعیین گردید.

اندازه‌گیری آلبومین: مقدار آلبومین در نمونه‌های مختلف فرآیند پالایش با روش بروموکرزول گرین با استفاده از دستگاه اتوآنالیزر اتوماتیک هیتاچی ۹۰۲ مشخص شد.

اندازه‌گیری ایمونوگلوبولین G: تعیین مقدار IgG با استفاده از کیت نفلومتر مینی-نف IgG انسانی (بیرمنگام انگلستان) و دستگاه نفلومتر مینی نف انجام شد.

اندازه‌گیری فعال‌کننده پری کالیکرین: الف - تخلیص پری کالیکرین (PK) از پلاسماهای انسانی: پلاسماهای انسانی در کیسه دیالیز ریخته شده و به مدت ۲۴ ساعت در برابر بافرتریس pH=۸ حاوی ۵۰ µg/ml پلی برن دیالیز شد. در طی مدت دیالیز، چندین بار بافر تعویض گردید. پلاسماهای دیالیز شده روی ستون پلاستیکی ۳۰cm×۲/۵ cm حاوی DE-52 (whatman DEAE cellulose) برده شد. فرکشنی که به سلولز باند نمی‌شود حاوی پری کالیکرین می‌باشد. فرکشن‌های حاصله توسط جذب UV در طول موج ۲۸۰nm ردیابی شد.

لوله‌های محتوی جذب بالاجمع آوری و با هم مخلوط شده، سپس در حجم‌های موردنظر تقسیم و در فریزر نگهداری گردید. مراحل تخلیص در حرارت اتاق انجام گرفت و کلیه وسایل استفاده شده برای جداسازی پلاستیکی بود.

ب - اندازه‌گیری فعال‌کننده پری کالیکرین در محصول تولید شده: فعال‌کننده پری کالیکرین موجود در محصول

ب - رسوب فرکشن I

رسوب فرکشن I حاوی فیبرینوژن از پلاسماهای فاقد کرایو (Cryo Poor Plasma, CPP) در pH خنثی (۷/۱ ± ۰/۱) و دمای ۱ ± ۱- درجه سانتی‌گراد با استفاده از بافر سدیم استات ۴/۸ مولار با pH=۴ و با غلظت ۸ تا ۱۰ درصد اتانل انجام گرفت. هم‌زمان با افزودن سدیم استات و اتانل، از کمک فیلترهایفلو سوپرسل برای برداشت فعال‌کننده پری کالیکرین (PKA) استفاده گردید. خمیر فرکشن I توسط سانتریفوژ از مایع رویی (Supernatant) I جدا گردید.

ج - رسوب فرکشن II+III

برای رسوب فرکشن II+III از اتانل ۲۰ تا ۲۵ درصد در pH خنثی (۶/۸ ± ۰/۱) و دمای ۱ ± ۶- درجه سانتی‌گراد استفاده گردید. زمان لازم برای تشکیل رسوب به محصول داده شد و سپس خمیر فرکشن II+III توسط سانتریفوژ جدا گردید. خمیر II+III حاصل در ۷۰- درجه سانتی‌گراد منجمد شد.

د - رسوب فرکشن II

خمیر فرکشن II+III حاوی گاماگلوبولین‌ها (IgA, IgM, IgG) فاکتورهای انعقادی و آلفا و بتا گلوبولین‌ها است، بنابراین ابتدا با حل خمیر فرکشن II+III در pH اسیدی (۵/۱ ± ۰/۱) و در دمای ۱ ± ۵- درجه سانتی‌گراد که قدرت یونی آن از ۱ ms/cm به ۱/۷ ms/cm رسانده شد، با استفاده از اتانل ۱۵ تا ۲۰ درصد، شرایطی فراهم گردید که ایمونوگلوبولین G به شکل محلول درآید اما دیگر ناخالصی در فرکشن III به صورت رسوب باقی بماند.

سپس مایع رویی III مجدداً تحت تیمار اتانل ۲۰ تا ۲۵ درصد قرار گرفته و فرکشن II حاوی IgG در pH ایزوالکتریک (۷/۱ ± ۰/۱) و در دمای ۱ ± ۷- درجه سانتی‌گراد ایمونوگلوبولین G رسوب داده شد.

برای جلوگیری از واسرشتگی (denaturation) در پروتئین، افزودن بافرها و الکل به آرامی و تحت شرایط مداوم هم‌زدن انجام گرفت.

۵۱۱l با غلظت پروتئینی کمتر از ۵ گرم درصد و با شدت جریان ۰/۵ ml/min بود. پروتئین‌ها توسط اندازه گیری جذب نوری در ۲۸۰ نانومتر پیگیری شدند.

یافته‌ها

نتایج الکتروفورز سلولز استات و میزان پروتئین و آلبومین فرکشن‌ها در جدول ۱ خلاصه شده است.

جدول ۱: نتایج الکتروفورز سلولز استات و میزان پروتئین و آلبومین در فرکشن‌های مختلف

آزمایش نمونه	الکتروفورز سلولز استات (درصد)						
	آلبومین (گرم درصد) پروتئین (گرم درصد)	Alb	1α	2α	β	γ	
پلازما (FFP)	۴/۳	۵۷/۷	۲/۱	۸/۰	۱۱	۲۱	
I	۳/۵۷	۵۵/۹	۲/۵	۸/۹	۱۳/۴	۱۹/۳	
مایع رویی II+III	۲/۸۸	۸۰/۴	-	۱۲/۹	-	۶/۷	
خمیر حل شده II+III (۱۰:۱)	۰/۶۲	۱۴/۵	-	-	۲۲/۹	۶۲/۸	
مایع رویی III	۰/۰۷	-	-	-	-	-	
مایع رویی II	۰/۱	-	-	-	-	-	
خمیر حل شده II (۱:۲)	۰/۳۷	۹/۴	-	-	-	۹۰/۶	

تولید شده با روش آنزیمی اندازه گیری گردید. در این روش پری کالیکرین توسط PKA به کالیکرین تبدیل می شود که می تواند پارانیتروانیلین (PNA) موجود در کروموزن S-2302 (سوند و کروموزنیکس) را آزاد کند. آزاد شدن PNA در دمای ثابت متناسب با مقدار کالیکرین ایجاد شده در محلول می باشد. این ماده رنگی است و سرعت تجزیه آن به طریق اسپکترومتری اندازه گیری شد و غلظت PKA به وسیله مقایسه بایک محلول استاندارد تعیین گردید.

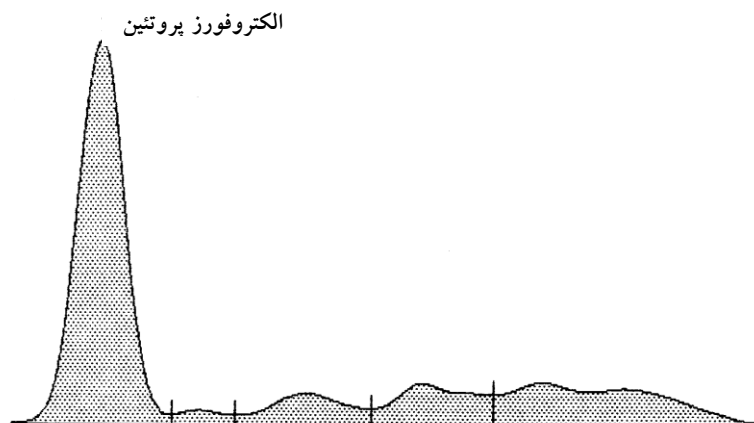
الکتروفورز سلولز استات: با استفاده از دستگاه Helena Pc. 24 فرانسه و Junior 24 Helena Scanner با استفاده از ورقه‌های سلولز استات ۳ mm TITAN III ۶۰×۷۶، روی نمونه‌های مختلف به دست آمده در فرآیند پالایش انجام گرفت.

طیف سنجی دو رنگ نمایمی دورانی (Spectroscopy dichroism Circular): با استفاده از دستگاه J-810 جاسکو در طول موج‌های ۱۸۵-۳۵۰ nm، ساختار دوم و سوم خمیر فرکشن II تهیه شده تعیین گردید. برای انجام مقایسه، دو نمونه تجاری ایمونوگلوبولین داخل وریدی از شرکت بیوتست و کدرون نیز هم زمان با نمونه‌های خمیر فرکشن II تعیین ساختار گردیدند. غلظت ۲/۵ mg/ml برای بررسی ساختار سوم تهیه شد.

الکتروفورز PAGE: بدون حضور مواد احیا کننده روی نمونه‌های مختلف به دست آمده در فرآیند پالایش با استفاده از ژل تراکم کننده ۳٪ و ژل جدا کننده ۷/۵٪ توسط دستگاه فارماسیا متصل به سیستم سرمایش انجام گرفت.

توزیع وزن مولکولی (HPLC): آنالیز وزن مولکولی با استفاده از ستون ژل کروماتوگرافی TSK G3000 sw روی نمونه فرکشن II انجام شد. پروتئین‌ها در بافر سدیم فسفات و سولفات با pH = ۶/۸ جدا شدند. حجم نمونه

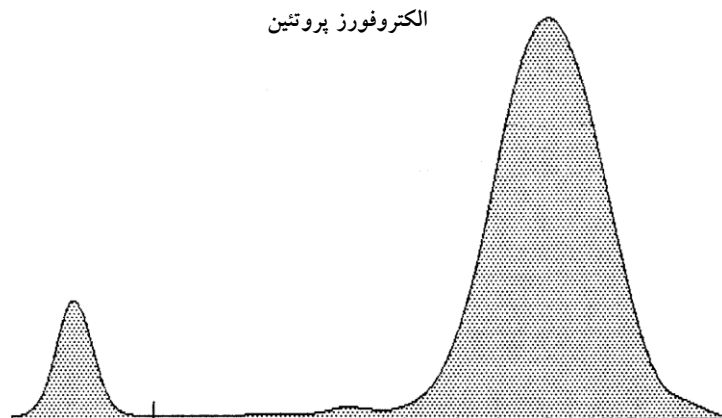
الف:



فرکشن	درصد	محدوده نرمال	G/DL	
آلبومین	۵۷/۷	۵۳/۰	۶۳/۰ -	۳/۲
آلفا ۱	۲/۱	۱/۵	۴/۵ -	۰/۱
آلفا ۲	۸/۰	۶/۰	۱۲/۰ -	۰/۶
بتا	۱۰/۸ L	۱۱/۰	۱۷/۰ -	۰/۶
گاما	۲۱/۴ H	۱۲/۰	۲۰/۰ -	۰/۷

۱/۳۶ میزان آلبومین به گلوبولین

ب:



فرکشن	درصد
آلبومین	۹/۴
گاما	۹۰/۶

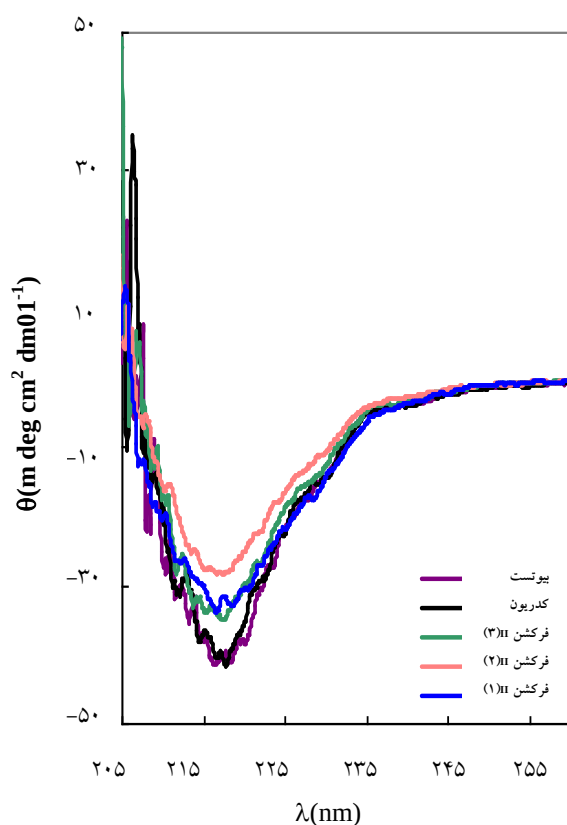
۰/۱۰ میزان آلبومین به گلوبولین

شکل ۱: الکتروفورز سلولز استات الف - پلاسما ب - فرکشن II میزان آلبومین، گاماگلوبولین و دیگر اجزای پروتئینی در پلاسما به ترتیب ۵۵۷/۷، ۲۱/۴ و ۲۹/۹ درصد بوده است که پس از پالایش پلاسما این میزان در رسوب II به ۹/۴ و ۹۰/۸ درصد در مورد آلبومین و گاماگلوبولین رسیده است.

نتایج الکتروفورز سلولز استات پلاسما (FFP) و خمیر فرکشن II در شکل ۱ نشان داده شده است.

میزان IgG موجود در فرکشن II با روش نفلومتری ۱۱/۵ گرم درصد تعیین گردید در حالی که IgG موجود در پلاسما (FFP) مقدار ۱/۲۵ گرم درصد را نشان می داد. میزان فعال کننده پری کالیکرین در فرکشن II با غلظت پروتئینی ۵ گرم درصد ۱۰/۴ IU/ml تعیین گردید که طبق دستورالعمل فارماکوپه اروپایی میزان PKA کمتر از IU/ml ۳۵ برای فرآورده تزریقی با غلظت پروتئینی ۳ گرم درصد قابل قبول می باشد.

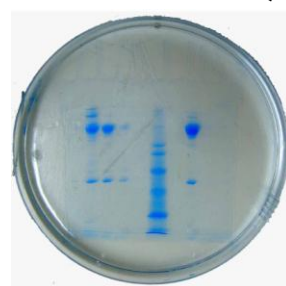
نتایج مربوط به الکتروفورز SDS-PAGE روی فرکشن های مختلف در طی پالایش پلاسما از FFP تا تهیه فرکشن II با روش رنگ آمیزی کوماسی بلو در شکل ۲ آورده شده است.



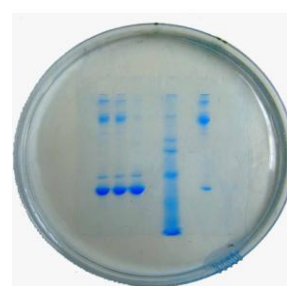
شکل ۳: ساختار دوم پروتئین ها توسط دستگاه طیف سنجی دو رنگ نمایی دورانی در سه سری کاری مجزا در مقایسه با نمونه های تجاری نتایج مشابهی را نشان داده است

بازده حاصل از انجام فرآیند پالایش بر روی ۳ سری متوالی (هر سری ۴۰۰۰ گرم پلاسما) در جدول ۳ خلاصه شده است.

ب:



الف:



شکل ۲: الکتروفورز PAGE (از چپ به راست)

الف - پلاسما - مایع رویی I - مایع رویی II+III - مارکر - خمیر II+III
ب - خمیر II+III - مایع رویی III - مایع رویی II - مارکر - خمیر II

در حالی که میزان پلی مرکتر از ۵ درصد برای فرآورده تزریقی ایمونوگلوبولین قابل قبول می باشد، HPLC انجام شده روی خمیر فرکشن II میزان ۰/۶۹٪ پلی مر و ۹۹/۳٪ منومر را نشان داد. بررسی ساختاری فرکشن II توسط دستگاه طیف

جدول ۲: ساختار دوم پروتئین‌های فرکشن II در سه سری
کار متوالی انجام شده و نمونه‌های کنترل

نمونه (درصد)	سری اول	سری دوم	سری سوم	سری IV	کلین
ساختار دوم پروتئین	خبر II سری اول	خبر II سری دوم	خبر II سری سوم	خبر II سری IV	
مارپیچ آلفا (α -Helix)	۳/۴۰	۱/۱۰	۲/۲۰	۴/۰۲	۲/۲۰
صفحات بتا (β -sheet)	۷۳/۸۰	۸۱/۲۰	۷۷/۹۰	۷۲/۴	۷۸/۲۰
چرخش بتا (β -Turn)	۳/۴۰	۰/۰۰	۰/۹۰	۴/۰۲	۰/۷۰
پیچش تصادفی (Random Coil)	۱۹/۳۰	۱۷/۶۰	۱۹/۰۰	۱۹/۰۲	۱۸/۸۰

جدول ۳: بازده محصولات حاصل از فرآیند پالایش بر روی سه سری متوالی

بازده	سری اول (g/kg plasma)	سری دوم (g/kg plasma)	سری سوم (g/kg plasma)	میانگین (g/kg plasma)
نمونه				
رسوب کرایو	۸/۳۸	۸/۷۸	۸/۹۵	۸/۷۰
رسوب فرکشن I	۱۹/۰۰	۱۸/۳۳	۸/۴۸	۱۸/۶۰
رسوب فرکشن II+III	۷۷/۰۸	۷۶/۳۵	۷۵/۱۸	۷۶/۲۰
رسوب فرکشن III	۸۰/۳۰	۸۲/۱۳	۸۱/۷۸	۸۱/۴۰
رسوب فرکشن II	۴۵/۵۳	۴۵/۳۳	۴۶/۵۸	۴۵/۸۰

بحث

روش‌های رایج در جهت تولید گاماگلوبولین تزریقی وریدی با استفاده از روش پالایش کوهن — اونکلی (Cohn-oncley) که از فرکشن II این فرآیند به عنوان ماده

حد واسط استفاده می کنند، دارای عوارض بسیار مانند شوک آنافیلاکتیک به دلیل وجود ایمونوگلوبولین‌های به هم چسبیده، افت فشارخون و انقباض عروقی به دلیل مقادیر فراوان PKA بوده است (۱۱،۱۲).

تولیدکنندگان مختلف از روش‌های گوناگون در جهت کاهش این عوارض استفاده نموده‌اند که احتیاج به هضم آنزیماتیک یا استفاده از مواد شیمیایی داشته است. در این مطالعه سعی بر آن بوده که با حداقل استفاده از مواد شیمیایی اضافی و تنها با تغییر غلظت الکل و pH، به فرکشن II مناسب برای استفاده در تولید IVIg دست یافت. با استفاده از توانایی رسوب‌گیری پروتئین‌ها در شرایط خاص می‌توان دور از pH ایزوالکتریک یک پروتئین آن را کاملاً به صورت محلول نگه داشت. از آن جایی که نقطه ایزوالکتریک ایمونوگلوبولین G در حد خنثی است، در این روش از pH اسیدی و غلظت یونی پایین برای رسوب دیگر پروتئین‌ها غیر از ایمونوگلوبولین G استفاده گردید و این شرایط به منظور جلوگیری از پلیمریزاسیون مولکول‌های IgG بسیار مناسب بود، به طوری که فرکشن II حاصله با استفاده از این شرایط حاوی کمتر از ۱٪ پلی‌مر بود. در حالی که در ایمونوگلوبولین تهیه شده معمول، میزان پلیمر در فرکشن II بین ۳ تا ۹ درصد می‌باشد که فقط جهت تزریق عضلانی مناسب است.

استفاده از pH اسیدی برای رسوب‌گیری فرکشن II+III در مطالعه دیگری توسط لینگ (Lebing) و همکارانش در تولید IVIg با روش کروماتوگرافی و کاپریلات نیز گزارش شده است (۱۱).

در این مطالعه میزان فعال کننده پری کالیکرین در فرکشن II حاصل در حدود یک سوم حد مجاز است و خلوص گاماگلوبولین به دست آمده که در واقع مرحله حدواسط است، بیش از ۹۰٪ می‌باشد. به عبارت دیگر ماده حدواسط به دست آمده با روش فعلی با بازدهی ۵/۲ گرم به ازای هر کیلوگرم پلاسما، ماده‌ای بسیار خالص و با شرایط مناسب جهت تهیه ایمونوگلوبولین تزریقی وریدی است. تکرار پذیری روش بسیار عالی بوده است به طوری که با ۳ سری متوالی پالایش بر روی مجموعه‌های مختلف پلاسما نتایجی تقریباً مشابه به دست آمده است.

نتیجه گیری

نتایج به دست آمده در این مطالعه نشانگر آن است که با استفاده از pH و غلظت مناسب الکل و غلظت یونی پایین، فرکشن II یا ایمونوگلوبولین نیمه تخلیص شده‌ای حاصل می‌شود که پلیمر و PKA بسیار پایین دارد و در کوتاه‌ترین زمان (حداکثر زمان از FFP تا تهیه فرکشن II ۲۸ ساعت) فرکشن II با بازدهی بالا و خلوص مطلوب تولید می‌شود. ساختار مولکول تغییر نمی‌کند و کمیت و کیفیت دیگر پروتئین‌ها نیز در نظر گرفته می‌شود. بنابراین دستیابی به ماده حدواسط حاوی ایمونوگلوبولین ناخالص میسر می‌شود که پس از آن این ماده تحت تأثیر فرآیند تخلیص و ویروس زدایی قرار گرفته و محصول نهایی ایمونوگلوبولین تزریق وریدی از آن تولید می‌گردد.

تشکر و قدردانی

به این وسیله از آقای فومنی مدیرعامل شرکت پالایش و پژوهش خون، خانم‌ها صدیقه چابک‌پی و صدیقه نوروزنیا در بخش تحقیقات شرکت پالایش و پژوهش خون و دیگر همکاران که در این تحقیق ما را یاری نمودند کمال سپاسگزاری را داریم. بودجه این تحقیق توسط مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران تأمین گردیده است.

بالاخره مطالعات ساختاری انجام گرفته به وسیله دستگاه طیف سنجی دو رنگ نمایی دورانی (Circular dichroism spectroscopy) نشان می‌دهد که روش مورد استفاده، تغییراتی در ساختار مولکولی ایمونوگلوبولین‌ها ایجاد نمی‌نماید و ساختار دوم و سوم خمیر فرکشن II تولید شده در حد طبیعی می‌باشد.

نکته حایز اهمیت دیگر در ارتباط با روش تعریف شده در مطالعه حاضر، انجام فرآیند پالایش در سیستم تقریباً بسته آزمایشگاهی و نیز دمای بسیار پایین (حداکثر ۸- درجه سانتی‌گراد) است که امکان آلودگی میکروبی در محصول و در نتیجه ایجاد پیروژنیسیته در محصول را کاهش می‌دهد.

همچنین از آن جایی که یکی از اهداف اصلی کار در حجم‌های بالا، (Scale up) این روش بوده‌است، تلاش بر این بوده که ماده اولیه مناسب خمیر فرکشن II تهیه گردد که بتوان با تخلیص بیشتر محصول، در کارهای آینده ایمونوگلوبولین تزریق وریدی تولید نمود، علاوه بر این دیگر پروتئین‌های پلاسما که می‌توانند برای تهیه دیگر فرآورده‌های دارویی مورد استفاده قرار گیرند، نه تنها از لحاظ کیفیت بلکه از لحاظ کمیت نیز حفظ شوند.

References :

- 1- Cohn EJ, Strong Le, Hughes WL, Mulford DJ, Ashworth JN, Melin M, *et al.* Preparation and properties of serum and plasma proteins . JAm Chem Soc 1946;68:459-475.
- 2- Oncley JL, Elin M, Richert DA. The separation of the antibodies , isoagglutinins prothrombin, plasminogen and beta lipoproteins into subfractions of human plasma. J Am Chem Soc 1949;71:541-550.
- 3- Chidwick K, Matejtschuk P, Gascoigne E, Briggs N, More JE, Dash CH, *et al.* Clinical experience with a new solvent detergent –treated intravenous immunoglobulin free of hypotensive effects. Vox sang, 1999;77: 204-209.
- 4- Kistler P, Nitschmann HS. Large scale production of human plasma fraction . Vox Sang 1962; 7: 414-424.
- 5- Stephan W. Undegraded human immunoglobulin for intravenous use. Vox Sang 1975;28: 422-37.
- 6- Mashuo Y, Tomibe S, Matgawa K, Ohtsu A . Development of an intravenous gammaglobulin with FC activities. Preparation and characterization of S-sulfonated human gamma globulin. Vox Sang 1977;32:175-81.
- 7- Hagenbeek A, Brummelhuis GJ, Ponkers AH, Agenbeek A, Brummelhuis GJ, Donkers A, *et al.* Rapid clearance of CMV IgG after repeated , infusion of human immunoglobulin in bonemarrow transplant patients. J Infect Dis 1987;155:897-902.
- 8- Ooper JA, Momkariou S, Liv Rash CR. Stabilised gamma globulin concentrate . US patent No. 4: 439,421,1984.
- 9- Sisti AM, Vitali MS, Manfredi MJ, Zar Zur JA. Preparation of lyophilized and liquid intravenous immunoglobulin G: development and Scale-up . Vox Sang 2001; 80: 216-224.
- 10- WHO requirement for the collection , processing and quality control of blood, blood components and plasma derivatives. WHO , TRS, 1992: 840.
- 11- Lebing W, Remington KM, Schraier C, Poul H. Properties of a new IVIg produced by virus inactivation with caprylate and column chromatography . Vox Sang 2003; 84:193-20.
- 12- Burnouf T. Integration of chromatography with traditional plasma protein fractionation methods. Bioseparation 1991;1:383-396.

Preparation of an intermediate product suitable for production of IVIg

Aghaie A.^{1,2,4} (MS), Pourfathollah A.A.^{1,2} (PhD), Bathaie S.Z.³ (PhD), Moazzeni S.M.^{1,4} (PhD), Khorsand Mohamad Pour H.⁴ (MS), Rezvan H.⁴ (PhD), Banazadeh S.⁴ (PhD), Adibi B.⁴ (MS), Mosavi M.K.⁴ (PhD), Jalili M.A.⁴ (PhD)

¹ Immunology Department, Tarbiat Modarres University

² Iranian Blood Transfusion Organization -Research Center

³ Biochemistry Department, Tarbiat Modarres University

⁴ Iranian Blood Research and Fractionation Center

Abstract

Background and Objectives

Human plasma is a valuable and unique material containing vital proteins such as albumin, immunoglobulin, and coagulation factors which have pharmaceutical applications. The most current process for purification of immunoglobulin is the Cohn fractionation procedure using ethanol. The basic material for production of immunoglobulin in this procedure is fraction II. In the present study, Cohn fractionation was modified appropriately in order to achieve fraction II with a quality suitable for production of intravenous immunoglobulin.

Materials and Methods

Various plasma proteins were precipitated using varying concentrations of ethanol under controlled physiochemical conditions such as temperature, pH and ionic strength. The fractionation products as well as the resulting fraction II were tested and analyzed.

Results

The results demonstrate that the modified procedure used can result in a pure fraction II with high yield. The procedure was also suitable for all other plasma proteins. The purified fraction II contained acceptable PKA levels according to specifications of pharmacopoeia. The protein structure was also within normal limits. The repeatability of the modified procedure reported was acceptable.

Conclusions

The fraction II obtained in the modified Cohn procedure was a suitable intermediate product to be used in production of intravenous immunoglobulin. The PKA levels as well as the protein aggregation were minimal, and the quality of fraction II was standard. The results showed that the present modified Cohn procedure can be easily scaled up to industrial and semi-industrial levels. The resulting fraction II can be used as an intermediate in production of IVIg.

Key words: Intravenous immunoglobulin, Cohn fraction, Molecular conformation
SJIBTO 2006; 3(2): 101-110

Received: 11 Sep 2005

Accepted: 14 Dec 2005

Correspondence: Pourfathollah A.A., PhD of Immunology. Tarbiat Modarres University
P.O.Box: 14155-111, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88011001; Fax: (+9821) 88013030
E-mail: Pourfa@modares.ac.ir