خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۹ شماره ۴ زمستان ۱۴۰۱ (۲۹۱-۲۸۴)

مقاله پژوهشی

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]، علی‌اکبر 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 تیتر و 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 ۰/۰۸ ± ۰/۴۸۶ و ۰/۰۷ ± ۰/۴۶۶ در مقایسه با IVIG تجاری(۰/۰۷ ± ۰/۴۸۶) تعیین شد. طبق فارماکوپه اروپا، مقدار مجاز ACA در IVIG، CH50/mg IgG 1 ≤ تعریف شده است.

نتیجه گیری

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

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-06-11]

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 پلاسمای 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(۵، ۴). 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(anti- ACA ، 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 از 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 آنتی بادی(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 تیتر می‌شود(۶).

از آن جایی 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.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-06-11]

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 (HPLC Waters، ایالات متحده، ستون TSK-G3000 ، SWXL ، 300*6 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 تیتر 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)، همولیزین 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 (MHU۱) در یک میلی‌لیتر در نظر گرفته شد. رقت بهینه همولیتیک همولیزین برای تهیه SRBC حساس شده MHU/mL ۲ تعیین شد. سریال رقت کمپلمان با محلول بافر ژلاتین تهیه و با SRBC حساس شده تیتر شد. جذب مایع رویی در طول موج ۵۴۱ نانومتر خوانده شد و درجه همولیز محاسبه گردید.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-06-11]

واحد فعالیت همولیتیک کمپلمان(CH50 ، Complement Activity Hemolytic Unit) مقدار کمپلمانی است که می‌تواند از کل مجموع ۵×۱۰^{۸} SRBC حساس شده، مقدار $۲/۵ \times ۱۰^{۸}$ SRBC حساس شده را لیز کند. به عبارت دیگر ۱ CH50 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 ۱۰۰ CH50/mL تهیه شد. آزمایش ACA 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 میلی‌گرم محصول ایمونوگلوبولین با ۲۰ CH50 کمپلمان انکوبه شد و کمپلمان باقیمانده تیتر شد. ACA به عنوان درصد مصرف کمپلمان متناسب با شاهد به عنوان ٪۱۰۰ بیان شد. سپس مقدار ACA محاسبه شد. در دو روز مختلف، آزمایش‌های هشت بار انجام شد.

یافته‌ها

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 CH50/mg IgG ≥) تعریف شده است.

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

مقادیر ACA در دو محصول روش‌های الف و ب به ترتیب ۰/۴۸۶ ± ۰/۰۸ CH50/mg protein و ۰/۴۶۶ ± ۰/۰۷ CH50/mg protein در مقایسه با IVIG تجاری(شرکت بیوتست) CH50/mg protein ۰/۴۸۶ ± ۰/۰۷ تعیین شد. این مقادیر الزامات فارماکوپه اروپا را برآورده می‌نمود.

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 پلاسما و به هدف کنترل کیفی محصول تولید شده، راه‌اندازی آزمون ACA مد نظر قرار گرفت. ابتدا کمپلمان خوکچه هندی، گلبول قرمز گوسفند، آنتی‌بادی ضد اریتروسیتی و بافرها تهیه شد. سپس با انجام تیتراسیون‌های مختلف برای به دست آوردن تیترهای بهینه آنتی‌بادی ضد اریتروسیتی برای تهیه گلبول قرمز گوسفند حساس شده و نیز تیتراسیون کمپلمان برای حصول به CH50، انجام سنجش امکان‌پذیر گردید. سنجش بر روی نمونه‌ها در مقایسه با نمونه کنترل در حد مجاز قرار داشت(مقدار مجاز 1 CH50 /mg IgG ≥) و الزامات فارماکوپه اروپا و بریتانیا را برآورده می‌نمود(۱۱).

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

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

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-06-11]

کمپلمان به حضور تجمعات و یا پلیمرها در محصول IgG نسبت داده شد که بدون هیچ‌گونه تداخل آنتی‌ژنی باعث ایجاد تغییراتی در قسمت ثابت Fc (constant fragment/cyrstallizable region) مولکول IgG شده و عوارض جانبی نامطلوب و همولیز با واسطه کمپلمان ایجاد می‌کرد(۱۳، ۵). ویژگی‌های فیزیکی تشکیل تجمعات و هم‌چنین غلظت تجمعات در محصولات IVIG در میزان ACA مؤثر است(۶). مطالعه‌های اولیه راماسامی و فاروجیا در سال ۱۹۹۷ نشان داد که ACA تحت تاثیر روش تشکیل تجمعات قرار می‌گیرد. آن‌ها نشان دادند که محصولات IVIG در صورتی که در pH اسیدی مثلاً در محدوده ۴ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شوند، تجمعاتی را تشکیل می‌دهند که به طور ضعیف به کمپلمان متصل می‌شوند، در حالی که اگر محصول در pH خنثی مثلاً در محدوده ۷ حرارت داده شود، تجمعاتی ایجاد می‌کند که میزان ACA بالایی را نشان می‌دهد بنابراین اگر چه توزیع اندازه مولکولی و روش HPLC ، درصد تجمعات را تخمین می‌زند ولی باز هم نمی‌تواند 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 راه‌اندازی سنجش ACAوجود دارد. بوچاچر و همکاران هم‌چنین نشان دادند که معرف‌ها و شرایط، تاثیر قابل توجهی بر انجام آزمایش دارند. نتایج آن‌ها نیز با یافته‌های راماسامی در سال ۱۹۹۷ همسو بود که نشان داد ویژگی فیزیکی تجمعات بر نتیجه اندازه‌گیری ACA مؤثر است و پلیمرها و تجمعات IgG در صورتی باعث افزایش ACA می‌شوند که در محیط‌های خاص از نظر pH تشکیل شده باشند(۶).

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

بر هم‌کنش IVIG با کمپلمان ترکیبی پیچیده از هر دو اثرات فعال‌سازی و مهاری است(۱۴). مطالعه‌ها نشان داده است که حتی مقادیر اندک تجمعات بر اساس ماهیت تشکیل آن‌ها، مثلاً تشکیل تجمعات در شرایط خنثی، می‌تواند منجر به اتصال به سیستم کمپلمان شود. در مقابل، تجمعاتی که در شرایط اسیدی تشکیل می‌شوند، به راحتی به سیستم کمپلمان متصل نمی‌شوند(۱۵).

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

همان طور که قبلاً توضیح داده شد، راه‌اندازی آزمایش ACA می‌تواند تحت تاثیر عوامل مختلفی باشد. معرف‌های ACA مانند SRBC ، بافر ژلاتین و همولیزین عوامل تعیین کننده در نتایج سنجش می‌باشد. از آن جایی که مقادیر مختلف ACA برای یک نمونه واحد با سری ساخت‌های مختلف اندازه‌گیری شده است، کیفیت سری ساخت کمپلمان نیز به طور قابل توجهی برای اعتبارسنجی در نظر گرفته می‌شود. به همین دلیل پارامترهایی مانند ترکیب بافر، همولیزین و روش آماده‌سازی گلبول‌های قرمز گوسفند و کمپلمان خوکچه هندی، پارامترهای حیاتی در تجزیه و تحلیل نتایج می‌باشند(۶).

در انجام این آزمایش وجود تخصص و مهارت فنی ویژه نقش مهمی را بازی می‌کند. در مطالعه‌های میکا و همکاران نشان داده شده بود که فعالیت ضد کمپلمان IgG می‌تواند از طریق پیپت کردن در طول آماده‌سازی رقت‌های سریال تا ۲۰ برابر افزایش یابد، پس بنابراین حتی پیپت کردن مکرر باعث افزایش قابل توجه فعالیت ضد کمپلمان IVIG و تفسیر نامناسب سنجش می‌شود(۱۹، ۱۸).

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-06-11]

نتیجه‌گیری

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 وافری 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، گلبول قرمز گوسفند و نیز ترکیب محلول بافر مورد استفاده 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.

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.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-06-11]

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.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-06-11]

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2022;19 (4): 284-291

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]

[1]Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran
[2]Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran
[3]Fardavar Companies Group, Tehran, Iran
[4]Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[5]Karolinska 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*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-06-11]