

# خون

فصلنامه علمی پژوهشی  
دوره ۳ شماره ۲ تابستان ۸۵ (۱۱۰-۱۱۱)

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

افسانه آقائی<sup>۱</sup>، دکتر علی اکبر پورفتح‌الله<sup>۲</sup>، سیده زهرا بطحائی<sup>۳</sup>، دکتر سید محمد موذنی<sup>۴</sup>، هاشم خرسند محمدپور<sup>۵</sup>، دکتر حوری رضوان<sup>۶</sup>، سودابه بنازاده<sup>۷</sup>، بهزاد ادبی مطلق<sup>۸</sup>، دکتر سید کامران موسوی حسینی<sup>۹</sup>، دکتر محمدعلی جلیلی<sup>۱۰</sup>

### چکیده

#### ساقه و هدف

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

#### مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی (experimental) بود. به منظور تولید خمیر فرکشن II، پروتئین‌های مختلف پلاسمای با استفاده از اتانول 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 پلاسمای اولیه مقایسه گردید.

#### یافته‌ها

نتایج به دست آمده حاکی از بازده بالا (plasma gr/kg ۵/۲) و خلوص مناسب (بالای ۹۰ درصد) فرکشن II مطابق استاندارد فارماکوپه به دست آمده بود به نحوی که سایر پروتئین‌های ضروری پلاسمای 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 پری کالیکرین 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 تزریق وریدی می‌باشد که مقدار تجمعات و همچنین میزان فعال کننده پری کالیکرین 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 تزریق 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 مسئول: PhD ایمونولوژی - استاد دانشگاه تربیت مدرس - مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران - صندوق پستی ۱۱۱-۱۱۱-۱۴۱۱۵
- ۳- PhD بیوشمی - 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 بیوشمی - مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران و شرکت پالایش و پژوهش خون
- ۶- PhD بیوشمی - 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 نظر 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 ارایه گردید<sup>(۱)</sup>. 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) می‌باشد<sup>(۲)</sup>.

امروزه اکثر فرآورده‌های ایمونوگلوبولین به روش اصلی پالایش با اتانل کوهن و روش تغییر یافته آن کیسلر-نیشمن (Kistler-Nichman) تهیه می‌گردد که محصول پایه فرکشن II می‌باشد<sup>(۳)</sup>.

در مورد برخی از فرآورده‌های تزریق وریدی، از روش‌های شیمیایی و یا هضم آنزیماتیک با پیسین 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<sup>(۴)</sup>.

به طورکلی هدف اصلی از روش‌های تهیه پروتئین‌ها از پلاسمما، افزایش بازدهی و کاهش هزینه است، در عین حال روش انتخابی باید امکان تخلیص مواد را به گونه‌ای فراهم کند که فعالیت بیولوژیک کافی و مؤثر بر حسب استانداردهای جهانی را دارد. علاوه بر این، بسیار مهم است که روش‌های انتخابی نسبت به تغییرات جزئی مقاوم بوده و از قابلیت تکرار پذیری بالا برخوردار باشند<sup>(۵-۶)</sup>.

در مطالعه حاضر هدف اصلی دستیابی به ماده حد واسط 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 تعیین یابد.

اشر 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 روئین شامل HBsAg, anti-HIV و anti-HCV با روش الیزا روی آن انجام گرفت و تایید شد. به دلیل عدم افزایش یک نوع خاص از ایزوآگلوتینین‌های خونی، پلاسمما از گروه‌های مختلف خون انتخاب و در دمای -۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

**مراحل پالایش پلاسمما:**

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

الف - تهیه رسوب کرایو

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

جداسازی رسوب‌های ایجاد شده در فرآیند پالایش توسط سانتریفوژ ژوئن KR422 به مدت یک ساعت در  $4^{\circ}\text{C}$  و در دمای منفی مناسب با مرحله رسوب گیری انجام شد.

### روش‌های سنجش

اندازه گیری پروتئین : میزان پروتئین در نمونه‌های مختلف فرآیند پالایش با روش بیوره با استفاده از دستگاه اتوآنالیزر اتوماتیک هیتاچی  $902^{\circ}\text{C}$  تعیین گردید.

اندازه گیری آلبومین : مقدار آلبومین در نمونه‌های مختلف فرآیند پالایش با روش بروموزول گرین با استفاده از دستگاه اتوآنالیزر اتوماتیک هیتاچی  $902^{\circ}\text{C}$  مشخص شد.

اندازه گیری ایمونوگلوبولین G : تعیین مقدار IgG با استفاده از کیت نفلومتر مینی‌نف IgG انسانی (بیرمنگام انگلستان) و دستگاه نفلومتر مینی‌نف انجام شد.

اندازه گیری فعال کننده پری کالیکرین : الف - تخلیص پری کالیکرین (PK) از پلاسمای انسانی: پلاسمای انسانی در کیسه دیالیز ریخته شده و به مدت  $24^{\circ}\text{C}$  ساعت در برابر بافرتریس  $8^{\circ}\text{C}$  pH=۸  $50\text{ }\mu\text{g/ml}$  پلی برن دیالیز شد. در طی مدت دیالیز، چندین بار بافر تعویض گردید. پلاسمای دیالیز شده روی ستون پلاستیکی  $2/5\text{ cm} \times 30\text{ cm}$  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  $280\text{ nm}$  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 - اندازه گیری فعال کننده پری کالیکرین در محصول تولید شده : فعال کننده پری کالیکرین موجود در محصول

### ب - رسوب فرکشن I

رسوب فرکشن I حاوی فیبرینوژن از پلاسمای فاقد کرایو (CPP) Cryo Poor Plasma در pH خشی ( $\text{pH} = 7/1 \pm 0/1$ )، و دمای  $1^{\circ}\text{C}$ -۱ درجه سانتی‌گراد با استفاده از بافر سدیم استات  $4/8\text{ Molar}$  با  $\text{pH}=4$  و با غلظت ۸ تا ۱۰ درصد اتانل انجام گرفت. هم زمان با افزودن سدیم استات و اتانل، از کمک فیلتر هایفلو 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  $20^{\circ}\text{C}$  تا  $25^{\circ}\text{C}$  درصد در pH خشی ( $\text{pH} = 6/8 \pm 0/1$ ) و دمای  $1^{\circ}\text{C}-6^{\circ}\text{C}$  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  $70^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد منجمد شد.

### د - رسوب فرکشن II

خمیر فرکشن II+III حاوی گاماگلوبولین‌ها (IgA, IgG, IgM) فاکتورهای انعقادی و آلفا و بتا گلوبولین‌ها است، بنابراین ابتدا با حل خمیر فرکشن II+III در pH  $5 \pm 0/1$  درجه سانتی‌گراد که قدرت یونی آن از  $1\text{ ms/cm}$  به  $1/7\text{ ms/cm}$  رسانده شد، با استفاده از اتانل  $15^{\circ}\text{C}$  تا  $20^{\circ}\text{C}$  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  $20^{\circ}\text{C}$  درصد قرار گرفته و فرکشن II حاوی IgG در pH ایزووالکتریک ( $\text{pH} = 7/1 \pm 0/1$ ) و در دمای  $1^{\circ}\text{C}-7^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد ایمونوگلوبولین G رسوب داده شد. برای جلوگیری از واسرشتن (denaturation) در پروتئین، افزودن بافرها والکل به آرامی و تحت شرایط مداوم همزدن انجام گرفت.

۵۰۰ 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

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

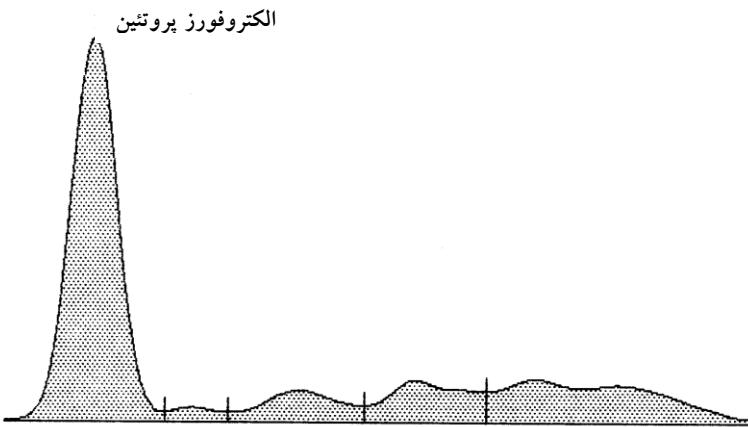
تولید شده با روش آنزیمی اندازه گیری گردید. در این روش پری کالیکرین توسط PKA به کالیکرین تبدیل می‌شود که می‌تواند پارانیتروآنیلین (PNA) موجود در کروموزن ۲۳۰۲ - S (سوئد و کروموزنیکس) را آزاد کند. آزاد شدن PNA در دمای ثابت مناسب با مقدار کالیکرین ایجاد شده در محلول می‌باشد. این ماده رنگی است و سرعت تجزیه آن به طریق اسپکترومتری اندازه گیری شد و غلظت PKA به وسیله مقایسه با یک محلول استاندارد تعیین گردید.

الکتروفورز سلولز استات: با استفاده از دستگاه استفاده از ورقه‌های سلولز استات Helena Scaner Jr 24 mm TITAN III، روی نمونه‌های مختلف به دست آمده در فرآیند پالایش انجام گرفت.

طیف سنجی دو رنگ نمایی دورانی (Spectroscopy dichroism Circular) (با استفاده از دستگاه J-810 Jasco در طول موج‌های ۳۵۰-۱۸۵ nm) تهیه شده تعیین گردید. برای انجام مقایسه، دو نمونه تجاری ایمونوگلوبولین داخل وریدی از شرکت بیوتست و کدرونیون نیز هم زمان با نمونه‌های خمیر فرکشن II تعیین ساختار گردیدند. غلظت ۰/۵ 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 متراکم کننده ۰/۳٪ و ژل جدا کننده ۰/۵٪ توسط دستگاه فارماتسیا متصل به سیستم سرماشی انجام گرفت.

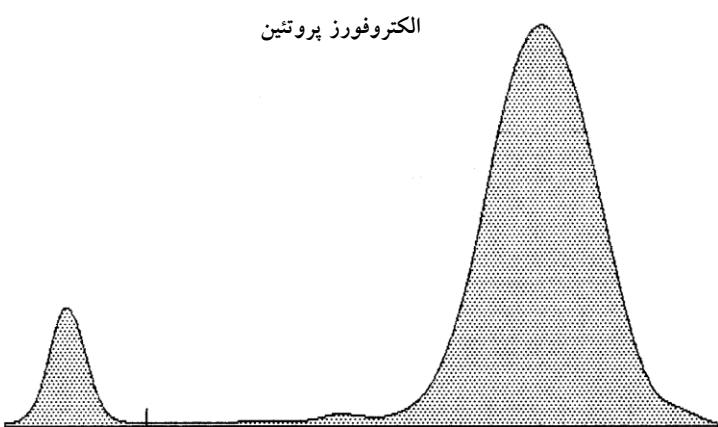
توزیع وزن مولکولی (HPLC): آنالیزوزن مولکولی با استفاده از ستون ژل کروماتوگرافی TSK G3000 sw روی نمونه فرکشن II انجام شد. پروتئین‌ها در بافر سدیم فسفات و سولفات با pH = ۶/۸ جدا شدند. حجم نمونه



الف:

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

۱۳۶ میزان آلبومین به گلوبولین



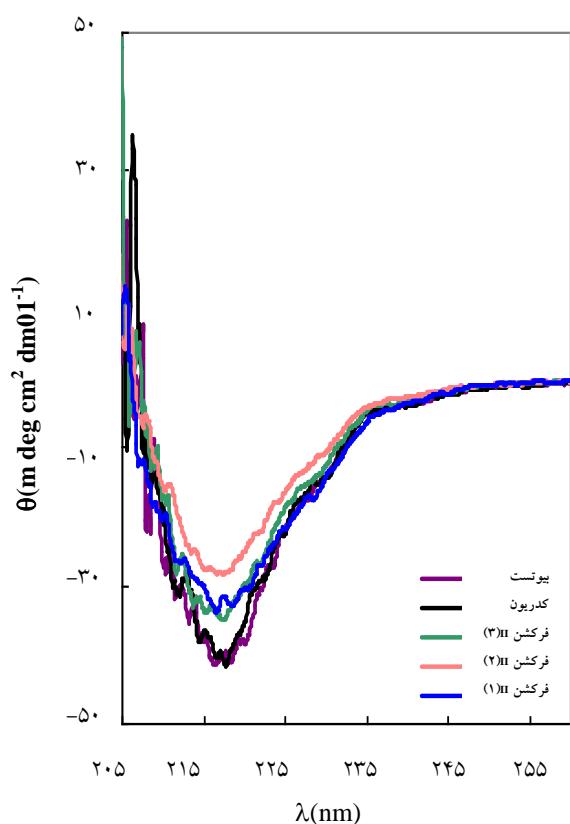
ب:

فرکشن	درصد
آلومین	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 پلاسمای نرمال به ترتیب  $557/7$ ،  $557/4$  و  $29/9$  درصد بوده است که پس از پالایش پلاسما این میزان در رسوب II به  $9/4$  و  $90/8$  درصد در مورد آلبومین و گاماگلوبولین رسیده است.

سنجه دو رنگ نمایی دورانی (CD) نشانگر وجود درصد بسیار زیادی از صفحات بتا در ساختار ثانویه خمیرهای به دست آمده است که در مقایسه با نمونه‌های تجاری ایمونوگلوبولین داخل وریدی، نتایج مشابهی را نشان می‌داد. خمیرهای II به دست آمده مختلف از نظر ساختار، تکرار پذیری خوبی را نشان دادند. نتایج مربوط به ساختار دوم در شکل ۳ و جدول ۲ آورده شده‌است (نتایج مربوط به ساختار سوم ذکر نشده‌است).



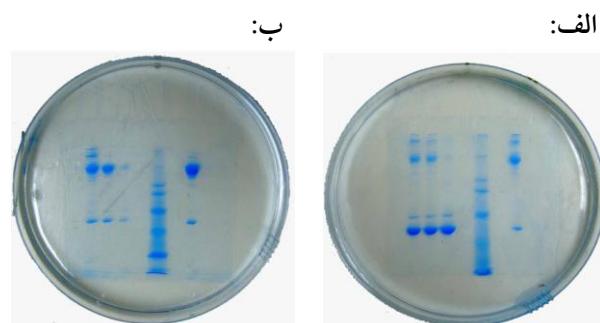
شکل ۳: ساختار دوم پروتئین‌ها توسط دستگاه طیف سنجی دو رنگ نمایی دورانی در سه سری کاری مجزا در مقایسه با نمونه‌های تجاری نتایج مشابهی را نشان داده است.

بازده حاصل از انجام فرآیند پالایش برروی ۳ سری متواالی (هر سری ۴۰۰۰ گرم پلاسمما) در جدول ۳ خلاصه شده است.

نتایج الکتروفورز سلولزاستات پلاسمما (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 پلاسمما (FFP) مقدار ۱/۲۵ گرم درصد را نشان می‌داد. میزان فعال کننده پری‌کالیکرین در فرکشن II با غلظت پروتئینی ۵ گرم درصد ۱۰/۴ IU/ml تعیین گردید که طبق دستورالعمل فارماکوپیه اروپایی میزان PKA کمتر از ۳۵ IU/ml برای فرآورده تزریقی با غلظت پروتئینی ۳ گرم درصد قابل قبول می‌باشد.

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



شکل ۲: الکتروفورز PAGE (از چپ به راست)  
الف - پلاسمما - مایع رویی I - مایع رویی II+III - مارکر - خمیر II+III  
ب - خمیر III - مایع رویی III - مایع رویی II - مارکر - خمیر II

در حالی که میزان پلی مرکمتر از ۵ درصد برای فرآورده تزریقی ایمونوگلوبولین قابل قبول می‌باشد، HPLC نتایج شده روی خمیر فرکشن II میزان ۰/۶۹٪ پلی مر و ۰/۹۹٪ منومر را نشان داد.

بررسی ساختاری فرکشن II توسط دستگاه طیف

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

تولید کنندگان مختلف از روش های گوناگون در جهت کاهش این عوارض استفاده نموده اند که احتیاج به هضم آنزیماتیک یا استفاده از مواد شیمیایی داشته است. در این مطالعه سعی برآن بوده که با حداقل استفاده از مواد شیمیایی اضافی و تنها با تغییر غلظت الكل و pH، به فرکشن II مناسب برای استفاده در تولید IVIg دست یافت. با استفاده از توانایی رسوب گیری پروتئین ها در شرایط خاص می توان دور از pH ایزو الکتریک یک پروتئین آن را کاملاً به صورت محلول نگه داشت. از آنجایی که نقطه ایزو الکتریک ایمونوگلوبولین G در حد خشی است، در این روش از pH اسیدی و غلظت یونی پایین برای رسوب دیگر پروتئین ها غیر از ایمونوگلوبولین G استفاده گردید و این شرایط به منظور جلوگیری از پلیمریزاسیون مولکول های IgG بسیار مناسب بود، به طوری که فرکشن II حاصله با استفاده از این شرایط حاوی کمتر از ۱٪ پلی مر بود. در حالی که در ایمونوگلوبولین تهیه شده معمول، میزان پلیمر در فرکشن II بین ۳ تا ۹ درصد می باشد که فقط جهت تزریق عضلانی مناسب است.

استفاده از pH اسیدی برای رسوب گیری فرکشن II+III در مطالعه دیگری توسط لبینگ (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 حد بواسطه است، بیش از ۹۰٪ می باشد. به عبارت دیگر ماده حد بواسطه به دست آمده با روش فعلی با بازدهی ۵/۲ گرم به ازای هر کیلوگرم پلاسمای ماده ای بسیار خالص و با شرایط مناسب جهت تهیه ایمونوگلوبولین تزریق وریدی است. تکرار پذیری روش بسیار عالی بوده است به طوری که با ۳ سری متوالی پالایش بر روی مجموعه های مختلف پلاسمای نتایجی تقریباً مشابه به دست آمده است.

جدول ۲ : ساختار دوم پروتئین های فرکشن II در سه سری کار متوالی انجام شده و نمونه های کنترل

نمونه (درصد) ساختار دوم پروتئین	آبی فرکشن II فرکشن II فرکشن II فرکشن II فرکشن II فرکشن II	سری سوم فرکشن II فرکشن II فرکشن II فرکشن II فرکشن II فرکشن II	سری سوم فرکشن II فرکشن II فرکشن II فرکشن II فرکشن II فرکشن II	سری سوم فرکشن II فرکشن II فرکشن II فرکشن II فرکشن II فرکشن II	سری سوم فرکشن II فرکشن II فرکشن II فرکشن II فرکشن II فرکشن II
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

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

### بحث

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

### 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 حدواتسط 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 مدیر عامل 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 dichrosim 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 حائز 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 پیروژنیسیتی در محصول را کاهش می‌دهد.

همچنین از آن جایی که یکی از اهداف اصلی کار در حجم‌های بالا، (Scale up) این روش بوده است، 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 پلاسمایی 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 . J Am 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 hypotensiv 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 characteri sation 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 paterients. J Infect Dis 1987;155:897-902.
- 8- Ooper JA, Momkarious 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, Schrainer 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.<sup>1,2,4</sup>(MS), Pourfathollah A.A.<sup>1,2</sup>(PhD), Bathaie S.Z.<sup>3</sup>(PhD), Moazzeni S.M.<sup>1,4</sup>(PhD), Khorsand Mohamad Pour H.<sup>4</sup>(MS), Rezvan H.<sup>4</sup>(PhD), Banazadeh S.<sup>4</sup>(PhD), Adibi B.<sup>4</sup>(MS), Mosavi M.K.<sup>4</sup>(PhD), Jalili M.A.<sup>4</sup>(PhD)**

<sup>1</sup> Immunology Department, Tarbiat Modares University

<sup>2</sup> Iranian Blood Transfusion Organization -Research Center

<sup>3</sup> Biochemistry Department, Tarbiat Modares University

<sup>4</sup> 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 Modares University  
P.O.Box: 14155-111, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88011001; Fax: (+9821) 88013030  
E-mail: [Pourfa@modares.ac.ir](mailto:Pourfa@modares.ac.ir)