Archive of SID

تهیه ایمونوگلوبولین Anti-Rh D به روش کروماتوگرافی تعویض یونی در مقیاس نیمه صنعتی

*دکتر عبدالرضا وارسته، دکتر مریم هاشمی، دکتر بی بی صدیقه فضلی بزاز، دکتر علی قضاوی ،
دکتر عبدالعظیم بهرامی، دکتر عباسعلی امیدی، دکتر حسین عرفائی، دکتر علی حسنی،
دکتر عباس طباطبائی، دکتر عبدا.. بهرامی.
*مرکز تحقیقات ایمونولوژی، مرکز تحقیقات علوم داروئی، پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

خلاصه

اکثر فراورده های ایمونوگلوبولینی به روش ترسیب با الکل (روش کوهن) تهیه می شوند و فقط به طریق عضلانی قابل تزریق می باشند. در این تحقیق، تهیه فراورده آنتی-D قابل تزریق به صورت وریدی، با روش کروماتوگرافی تعویض یونی ودر مقیاس نیمه صنعتی مورد بررسی قرار می گیرد.

روش کار شامل جذب پروتئین های پلاسما به جز آنتی-D بر روی ستون DEAE -sephadex A50 ، شستشوی آنتی-D از ستون با بافر فسفات ۲۵ میلی مولار pH=۷/۵، تغلیظ آنتی D خارج شده از ستون با سیستم اولترافیلتراسیون، اضافه کردن مواد پایدار کننده، عبور از فیلتر ۰/۲μm و در نهایت لیوفیلیزه کردن فراورده می باشد.

نتایج آنالیز فراورده نشان داد که فراورده اساسا" حاوی IgG مونومر می باشد و دارای میزان اگریگیشن، فراگمنتیشن و فعالیت آنتی کمپلمانتری قابل قبول می باشد. مقادیرIgA و IgM نیز کمتر از ۱۰μg/ml می باشد. در بررسی پایداری فراورده، مشاهده گردیدکه با نگهداری فراورده به مدت ۴ هفته در دمای ۳۷°C نیز، تغییرات میزان آنتی - D در حد قابل قبولی می باشد. نتایج تست استریلیتی، پیروژنیسیتی و سمیت نیز مطابق با استاندارد USP است.

با توجه به میزان IgA و فعالیت آنتی کمپلمانتری پائین، می توان گفت که فراورده قابل تزریق به صورت وریدی می باشد.

کلمات کلیدی : آنتی -D ، کروماتوگرافی تعویض یونی، تخلیص

مقدمه

آنتی-D جهت پیشگیری از تولید آنتی بادیهای آنتیD در افراد Rh^- که در معرض گلبولهای قرمز Rh^+ قرار گرفته اند، استفاده می شود. کاربرد اصلی این دارو پیشگیری از بیماری همولیتیک Rh در نوزادان است(۵).

فراورده ایمونوگلوبولین آنتیD ممکن است به روش ترسیب، با استفاده از حلالهای آلی (مانند ترسیب با الکل)، یا نمک های خنثی تهیه شود (۱۵). فراورده تولید شده توسط این روش ها به خاطر فعالیت آنتی کمپلمانتری بالا، فقط به طریق عضلانی قابل تزریق می باشد(۱۰). در روش ترسیبی فراورده نهایی حاوی پروتئین های دیگر پلاسما به خصوص IgA و IgM می باشد و بازدهی روش نیز کمتر از ۵۰ درصد است (۳).

در سال ۱۹۶۴، Baumstark روش تهیه IgG با استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی را مطرح نمود(۱). سپس Hoppe و همکاران (۱۱)، این روش را برای تهیه فراورده آنتی-D برای تزریق به صورت وریدی به کار بردند. آنان ابتدا از ژلDEAE -sephadex A50 به عنوان تعویض گر یونی و روش ترسیب با الکل برای تغلیظ فراورده استفاده نمودند. سپس دومین مرحله را تغییر داده و از سیستم اولترافیلتراسیون برای تغلیظ استفاده کردند. بازدهی این روش

www.SID.ir

Archive of SID

حدود ۹۰٪ می باشد وفراورده دارای مقادیر اندك اگریگیشن ، فراگمنتیشن و فعالیت آنتی کمپلمانتری است.

در این تحقیق، تولید نیمه صنعتی فراورده آنتی D از پلاسما، به عنوان یك فراورده وریدی به روش کروماتوگرافی تعویض یونی، بررسی می گردد.

مواد و روش کار

منبع اولیه استخراج آنتیD

برای تهیه آنتی D از پلاسمای مادران Rh منفی که در زایمانهای قبلی به علت وجود جنین Rh^+ سیستم دفاعی آنان تحریك و آنتی بادی ضد سیستم Rh ساخته اند، استفاده گردید. پلاسمای مورد نیاز این طرح از طریق پلاسما فریز درمانی در سازمان انتقال خون مشهد تهیه شد. از لحاظ میزان آلودگیهای ویروسی HBS-Ag ، HIV ، HCV و HTLV-1 مورد بررسی قرار گرفت. کیت مورد استفاده کیت organon می باشد.

تخلیص آنتی D

در یك سیکل کاری برای تخلیص آنتیD از ۱۰۰۰ میلی لیتر پلاسما، از ۲۵۰ گرم ژل DEAE -sephadex A50 استفاده شد. آماده سازی طبق دستورالعمل شرکت سازنده(Pharmacia Biotech) انجام گردید و ژل با حجم نهایی ۱۰ لیتر در داخل ستون ۱۲۷ cm × ۵۹cm پك شد. پروتئین های خارج شده از ستون با اندازه گیری جذب آنان در ۲۸۰ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفت مراحل کروماتوگرافی در دمای محیط و در اتاق تمیز انجام گردید. تمامی وسایل توسط اتوکلاو (۱۲۱°C به مدت ۱۵ دقیقه)، ویا فور (۲۰۰°C، به مدت یك ساعت) استریل شدو کلیه محلولها توسط آب مقطر (عاری از هرگونه پیروژن) تهیه شد. برای شروع کار، ابتدا ستون کروماتوگرافی در معرض سود ۰/۱M به منظور پیروژن زدائی به مدت ۷۲ ساعت قرار گرفت. پس از آن توسط آب مقطر استریل شستشو داده شد. در مرحله بعد، ژل سفادکس اتوکلاو شده، تحت شرایط استریل در داخل ستون قرار گرفت. بعد از پك شدن، با عبور ۱۰۰ لیتر بافر فسفات ۲۵ میلی مولار pH=۷/۵، ژل متعادل گردید. بعد از آماده سازی ستون، پلاسمای فاقد کرایو، با یك حجم آب مقطر دوبار تقطیر، رقیق و برروی ستون قرار گرفت. ستون با بافر فسفات ۲۵ میلی مولار pH=۷/۵ شستشو داده شد. آنتی D به ژل متصل نشده واز ستون خارج می گردد. سپس آنتی D خالص شده توسط دستگاه اولترافیلتراسیون (کارتریج ۳۰ KD، USA-Millipore) تا ایجاد تیتر مناسب آنتیD تغلیظ شد. IgG تغلیظ شده توسط مواد پایدار کننده مناسب فرموله گردید و در مرحله بعد، نمونه تغلیظ شده به منظور ویروس زدائی و میکروب زدائی توسط فیلتر VIRESOLو ۰/۲μ m فیلتر شد. در نهایت مقدار مناسبی آنتی D در ویالها قرار داده شد (۳۰μ g) و توسط دستگاه لیوفیلیزاتور (Labconco-USA) لیوفیلیزه گردید.

آنالیز فراورده آنتی D

فراورده آنتی D از لحاظ میزان اگریگیشن و فراگمنتیشن توسط روش ژل فیلتراسیون با سفادکس200-G (۱۳)، مقدار IgG، IgA و IgM با روش SRID (۷)، میزان پروتئین تام با روش برادفورد(۴)، خلوص با تکنیك SDS-PAGE (۲۰)، مقدار آنتی D با تکنیك هماگلوتیناسیون غیر مستقیم (۱۲، ۱۸)، فعالیت آنتی کمپلمانتری (۸)، استریلیتی، پیروژنیسیتی وسمیت (۱۹)، الکتروفورز استات سلولز توسط بافر باربیتال pH =۸/۶ (۱۷)، مقدار رطوبت(۱۹)، pH و مقادیر آنتی بادیهای A ، B، C و E (۱۶)، مورد بررسی قرار گرفت. پایداری فراورده نهایی نیز با قراردادن آن در ۳۷°C به مدت ۴ هفته ارزیابی گردید(۵).

نتایج

نتایج نشان داد که تست استریلیتی، پیروژنیسیتی و سمیت فراورده آنتی D مطابق با استانداردهای BP و USP می باشد. تیتر آنتی بادیهای C,B,Aو E نیز در حد قابل قبولی پائین است.

www.SID.ir

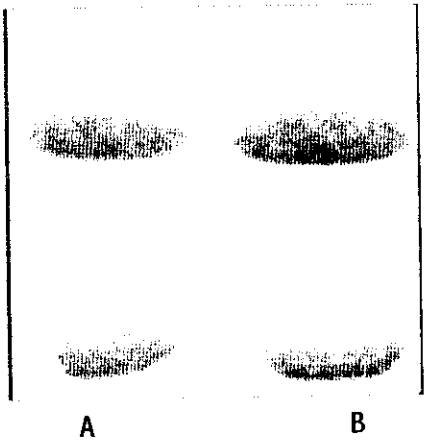
Archive of SID

جدول ۱ : نتایج آنالیز فراورده آنتی D تهیه شده توسط ستون DEAE -sephadex A50

نوع آزمایش	نتیجه آزمایش	محدوده مجاز
پروتئین تام	۷/۵ mg/ml	حداکثر ۷۱ میلی گرم درهر آمپول
نسبت IgG به پروتئین	۱/۲۶	۰/۷-۱/۲
pH	۷/۲	۶/۴-۷/۶
اگریگیشن	٪۲/۳	کمتر از ٪۵
فراگمنتیشن	٪۲/۵	کمتر از ٪۵
فعالیت آنتی کمپلمانتری	۴/۵mg IgG/ml	بیش از ۱mg IgG/ml
ایمونوگلوبولین A	کمتر از ۱۰ µg/ml	حداکثر ۴۰ µg/ml
ایمونوگلوبولین M	کمتر از ۱۰µg/ml	حداکثر ۴۰ µg/ml
الکتروفورز	۹۸	بیش از ۹۵ درصد دربانداگاما
آنتی A	۱:۶۴	حداکثر تیتر ۱:۱۲۸
آنتی B	۱:۳۲	حداکثر تیتر ۱:۱۲۸
آنتی C	۱:۱۲۸	حداکثر تیتر ۱:۵۱۲
آنتی E	۱:۸	حداکثر تیتر ۱:۱۶
تست استریلیتی	مطابق استاندارد	مطابق استانداردUSP
تست پیروژن	مطابق استاندارد	مطابق استاندارد USP
سمیت	مطابق استاندارد	مطابق استاندارد USP
رطوبت باقیمانده	۲/۵درصد	کمتر از ۳ درصد
زمان حلالیت	کمتر از دو دقیقه	کمتر از ۱۰ دقیقه

مقدار رطوبت فراورده ٪۱/۳ می باشد. الکتروفورز فراورده آنتیD نشان داد که فراورده از خلوص بالائی برخوردار است (شکل ۱) و مقادیر اگریگیشن و فراگمنتیشن به ترتیب ٪۲/۵ و ٪۲/۳ می باشد (شکل ۲). الکتروفورز برروی استات سلولز نیز نشان داد که فراورده حاوی ٪۹۸ IgG می باشد. مقادیر IgAو IgM کمتر از ۱۰ µg/ml آنتی D در هر ویال است. با قرار دادن فراورده در ۳۷°C به مدت ۴ هفته، ٪۱۰ تغییرات در میزان آنتی D مشاهده گردید. فعالیت آنتی کمپلمانتری فراورده، معادل ۴/۵ mg IgG/ml/CH50 اندازه گیری گردید.

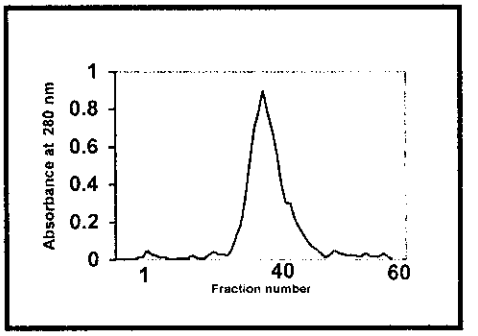
خلاصه نتایج آنالیز یك بچ فراورده آنتیD در جدول شماره ۱ مشخص شده است.



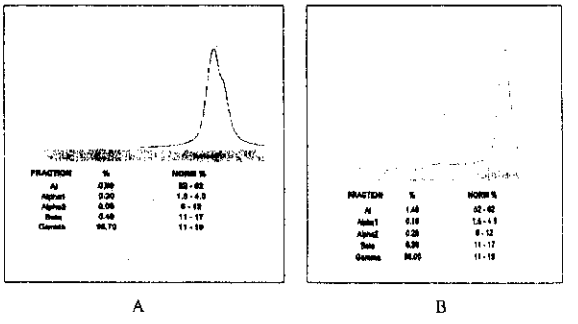
شکل ۱ : الکتروفورز SDS-PAGE نمونه استاندارد (A) و نمونه تهیه شده (B) آنتی D

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲ : ژل فیلتراسیون فراورده آنتی D تهیه شده بر روی سفادکس G-200 . قطر ستون ۱۵ mm، حجم ستون ۲۰۰ml سرعت $3ml.cm^{-2}.h^{-1}$، بافر شستشو دهنده بافر فسفات ۲۵ میلی مولار pH=۷/۵



شکل ۳: الکتروفورز استات سلولز استاندارد (A) و فراورده تهیه شده (B) آنتی D

بحث و نتیجه گیری

محدودیت اصلی اکثر فراورده های آنتی D موجود برای استفاده بالینی این است که قابل تزریق به صورت وریدی نمی باشند. تزریق وریدی فراورده به خصوص زمانی که مقادیر بالائی سلولهای خونی Rh^+ به فرد Rh^- تزریق گردد، سودمند می باشد.

اخیراً مطالعات (۲، ۶) به سمت تهیه آنتی بادیهای منوکلونال آنتی D به جای آنتی بادیهای پلی کلونال حاصل از پلاسمای افراد داوطلب ایمونیزه شده پیش می رود. که علت اصلی آن، مشکلات ناشی از ایمونیزاسیون افراد داوطلب برای ایجاد تیتر مناسب آنتی D می باشد.

این نوع آنتی بادی مونوکلونال، فعلاً جهت اهداف تشخیصی به کار می رود و مصرف بالینی ندارد. و در حال حاضر آنتی-D تهیه شده از پلاسما مورد استفاده قرار می گیرد. مطالعات قبلی (۳، ۱۱) نشان داد که آنتی D تهیه شده به روش کروماتوگرافی تعویض یونی، فراورده ای است با خلوص و تیتر بالای آنتی D که دارای مقادیر اندك اگریگیشن و فراگمنتیشن می باشد. این فراورده به خاطر فعالیت آنتی کمپلمانتری پائین نیز برای تزریق وریدی مناسب است. نتایج این تحقیق نشان داد که در روش ستون کروماتوگرافی تعویض یونی برای تخلیص آنتی D، بازدهی حداقل ۶۰٪ می باشد وفراورده حاصل نیز، از خلوص مناسبی برخورداراست. در تحقیقات قبلی(۹)، با استفاده از این روش بازدهی ۷۵-۶۲٪ محاسبه گردید. میزان IgA فراورده نیز به روش SRID کمتر از ۱۰ µg/ml اندازه گیری شد که ۷۰ برابر کمتر از IgA فراورده های تهیه شده به روش کوهن می باشد(۹). اگریگیشن فراورده های تهیه شده در روش کوهن ۲۰٪ است که حدوداً ۱۰ برابر بیشتر از اگریگیشن فراورده آنتی D موجود می باشد(۹).

برای تزریق وریدی فراورده آنتی D، میزان فعالیت آنتی کمپلمانتری باید بیشتر از ۴ mg/ml IgG باشد در حالی که در روش کوهن فعالیت آنتی کمپلمانتری کمتر از ۱mg/ml است(۲۰). هر ویال حاوی ۳۰ µg/ml آنتی D می باشد که مقدار آنتی D با استفاده از پلاسمای با تیتر بالا نیز می تواند افزایش یابد.

فراورده تهیه شده به خاطر فعالیت آنتی کمپلمانتری و میزان IgA پائین قابل تزریق به صورت وریدی است و نهایتاً می توان از این روش برای تهیه سایر فراورده های وریدی IgG نیز استفاده نمود.

www.SID.ir

Archive of SID

تشکر و قدر دانی

به این وسیله از حمایت های مالی معاونت پژوهشی وزارت بهداشت و درمان و معاونت پژوهشی مشهد که با اختصاص بودجه لازم انجام این تحقیق را میسر ساخته اند وسازمان انتقال خون خراسان، جهت تهیه پلاسمای مورد نیاز، تشکر و قدردانی می شود.

References

1. Baumstark J. S., Laffin R. J., Baradwll W. A., 1964, A preparative method for separation of 7s γ- globulin from human serum, Arch. Biochem. Biophys., 108: 514-522.
2. Bellard, *et al.*, 1998, Human monoclonal anti-rhesus (D) antibodies and cell lines producing it, US patent No. 5,851,524.
3. Bowman J. M. *et al.*, 1980, WinRho: Rh immune globulin prepared by ion exchange for intravenous use, Can. med. Assoc. J., 123 (6): 1121-27.
4. Bradford M. N., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle dye binding, Analyt. Biochem., 72: 248-54.
5. British Pharmacopiea, HMWO, London, 1993, 1171-1173.
6. De Burgh, *et al.*, 1996, Human anti-RH (D) monoclonal antibodies, cell line and methods of use of antibodies in immunoassays, US patent No. 5,496,548.
7. Fahey T. L. *et al.*, 1965, Quantitative determination of serum immunoglobulins in agar- antibody plates, J. Immun., 94: 84-90.
8. Fisher G. B., Deutsch H. F., 1970, Immunoglobulin components in crystalline ceruloplasmin and anticomplementry activity. Vox Sang.,18: 349-65.
9. Friesen A. D. , Bowman J. M., Bees W. C. H., 1985, Coulmn ion exchange chromatographic production of human immune serum globulin for intravenous use. Vox Sang., 48:201-212.
10. Frommhagen L. H. *et al.*, 1962, The role of aggregated-globulin in the anticomplementry activity of human and animal sera, J. Immunol., 89:336-43.
11. Hoppe H. H. *et al.*, 1973, Prevention of Rh-immunization, Modified production of IgG anti-Rh for intravenous application by IEC, Vox Sang. 25: 308-16.
12. Mollison P. L., Blood Transfusion in Clinical Medicine, 8th Ed., Black Well, Oxford, 1987, 482-533.
13. Painte R. H., 1970, Observation on the preparation and testing of stable and unstable immune serum globulin preparation, Progr. Immunobiol. Standard., 4: 81-5.
14. Reynolds J. E. F. *et al.*, Martindale: The Extra Pharmacopeia, 31th Ed., Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, London, 1996, 1612-1613.
15. Rudman S. V., Text Book of Blood Banking and Transfusion Medicine, Saunders company, London, 1995.
16. Scgyktze H. E. *et al.*, Molecular Biology of Human Proteins, Elsevier, Amsterdam, 1966, 236-304.
17. Stryer l., Biochemistry, 4th Ed., WH Freeman and Company, New York, 1995.
18. Turner C. E., 1999, Thrope S. J., Brasher M. D. R., Anti-Rh D activity of commercial intravenous immunoglobulin preparations, Vox. Sang., 76: 55-58.
19. United States Pharmacoppeia. United States Pharmacopeia, USP 23, NF 18, 23rd Ed., Convection Company, 1995, 1681-1843
20. Weber K. *et al.*, 1969, The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis, J. Biol. Chem., 244:4406-12.

www.SID.ir

Archive of SID

16. Scgyktze H. E. *et al*., Molecular Biology of Human Proteins, Elsevier, Amsterdam, 1966, 236-304.
17. Stryer l., Biochemistry, 4th Ed., WH Freeman and Company, New York, 1995.
18. Turner C. E., 1999, Thrope S. J., Brasher M. D. R., Anti-Rh D activity of commercial intravenous immunoglobulin preparations, Vox. Sang., 76: 55-58.
19. United States Pharmacoppeia. United States Pharmacopeia, USP 23, NF 18, 23rd Ed., Convection Company, 1995, 1681-1843
20. Weber K. *et al.,* 1969, The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis, J. Biol. Chem., 244:4406-12.