مجله علوم پایه پزشکی ایران، جلد ۱۰، شماره۱، بهار ۱۳۸۶، ۷٤ - ۶۶
تاریخ دریافت: ۸۵/۱۲/۵ - تاریخ پذیرش: ۸۶/۵/۲

# بررسی پارامتر های موثر در تغلیظ فرآورده ایمونوگلوبولین Anti-Rh(D) توسط سیستم اولترافیلتراسیون

[۱]مریم هاشمی، [۲] محمود رضا جعفری، [۳]نرجس باران زاده، *[۴]عبدالرضاوارسته

## چکیده

### هدف

ایمونوگلوبولین Anti-Rh (D) جهت پیشگیری از تولید آنتی بادی های Anti-Rh در افراد با Rh منفی که در معرض گلبولهای قرمز Rh مثبت قرارگرفته اند؛ استفاده می شود. فرایندهای تخلیص و آماده سازی این نوع فراورده تاثیر مستقیم بر طول عمر آن دارد. از طرفی با توجه به آن که محلولهای رقیق پروتئینی خارج شده از ستونهای کروماتوگرافی به علت اتصال به سطوح و تجزیه به زیر واحدهای متشکله، پایدار نیستند؛ لذا معمولا بعد از استخراج نیاز به تغلیظ دارند. هدف از این مطالعه تغلیظ فرآورده Anti-Rh(D) با استفاده از سیستم اولترافیلتراسیون و بررسی شرایط مناسب برای فرایند تغلیظ است.

### مواد و روش کار

جهت مطالعه پارامترهای مختلف موثر در تغلیظ ایمونوگلوبولین Anti-Rh(D) توسط روش اولترافیلتراسیون، مقدار ml ۱۰۰ فرآورده خالص شده، به همراه گلایسین M ۰/۳ و غلظت های مختلف سوکروز(mM۹۰و۶۰،۳۰) به وسیله سیستم Minitan-S که فیلتر آن از نوع Polysulfon با cut off معادل ۳۰۰۰۰ دالتون است؛ به مدت ۵۰ دقیقه و تا حجم ml ۲۷، تغلیظ شد. روش جریان آب تمیز جهت تعیین سرعت مناسب پمپ، روش برادفورد جهت تعین پروتئین تام موجود در محلولی که از فیلتر عبور کرده، روش SRID (Single Radial Immunodiffusion) جهت بررسی میزان IgG تام نمونه، قبل و بعد از تغلیظ، ژل فیلتراسیون برای بررسی میزان مولکولهای IgG تجمع یافته و شکسته شده و روش ELAT (Enzyme-Linked Antiglobulin Test) جهت تعیین میزان IgG اختصاصی(D) Anti-Rh مورد استفاده قرار گرفت.

### نتایج

نتایج نشان داد که تحت شرایط ذکر شده، تقریباً مقدار بسیار ناچیزی پروتئین از فیلتر عبور می کند که می توان از آن صرف نظر نمود. غلظت IgG تام نیز قبل و بعد از تغلیظ تقریبا یکسان است. در روش ژل فیلتراسیون و با استفاده از ستون سفادکس G-200، میزان مولکول های تجمع یافته و شکسته شده در نمونه تغلیظ شدهIgG، به ترتیب ۲/۳ و ۲/۵ درصد و IgG مونومرنیز، ۹۵ درصد به دست آمد. بررسی میزان Anti-Rh (D) نمونه های اولترافیلتر شده تحت فرمولاسیونهای مختلف توسط روش ELAT نیز، بیانگر آن بود که در نمونه تغلیظ شده و بدون فرمولاسیون Anti-Rh (D) به میزان ۸/۲٪ کاهش یافته است. در فرمولاسیون هائی که حاوی M ۰/۳گلایسین و۳۰، ۶۰ و ۹۰ mM سوکروز در بافر سدیم- پتاسیم فسفات mM ۲۵ pH ۷/۵ است به ترتیب ۱/۶٪، ۰/۷٪ و ۲/۳٪ کاهش در میزان Anti-Rh (D) مشاهده شد.

### نتیجه گیری

با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه، که سیستم اولترافیلتراسیون تحت شرایط ذکر شده برای تغلیظ Anti-Rh(D) روشی مناسب است. به منظور جلوگیری از دناتوراسیون پروتئین تحت فشار سیستم اولترافیلتراسیون در طی فرایند تغلیظ، مطلوب است که پایدارکننده هائی همچون گلایسین و سوکروز را قبل از عمل تغلیظ به فراورده اضافه نمود.

**کلمات کلیدی:** Anti-Rh(D)، اولترافیلتراسیون، فعالیت بیولوژیکی، ELAT، پایداری، ایمونوگلوبولین.

۱ – دانشجوی PhD بیوتکنولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
۲ – دانشیار داروسازی صنعتی، گروه فارماسیوتیکس و مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
۳ – دکترای عمومی داروسازی
٤ – دانشیار ایمونولوژی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
* نویسنده مسئول: تلفن: ۷۱۱۲٤۱۰– ۰۵۱۱، varasteha@mums.ac.ir



Archive of SID
www.SID.ir

## مقدمه

فراورده Anti-Rh(D) که در واقع یک نوع ایمونوگلوبولین G است، به صورت داخل عضلانی و یا وریدی برای جلوگیری از تولید آنتی بادی های Anti-Rh در افراد با Rh منفی در هنگام تماس با گلبولهای قرمز Rh مثبت استفاده می شود. کاربرد اصلی این دارو، پیشگیری از بیماری همولیتیک Rh در نوزادان است (۱). به طور کلی در تهیه فراورده های ایمونوگلوبولین وریدی، روش مورد استفاده باید سبب تولید فراورده ای گردد که حداقل مشخصات ایمن بودن از لحاظ ویروسی، عدم از دست دادن فعالیت بیولوژیک و قابل تحمل بودن از لحاظ بالینی را دارا باشد (۲). روش های مختلفی جهت جداسازی فراورده های پروتئینی از پلاسما وجود دارد که از جمله می توان به استفاده از نمکهای معدنی مانند سولفات آمونیوم، استفاده از حلالهای آلی و یا انواع مختلف روشهای کروماتوگرافی اشاره نمود. در روشهای رسوبی امکان تجمع مولکولهای پروتئینی زیاد است؛ ولی در روش کروماتوگرافی به علت فعالیت ضد کمپلمانی پائین و تجمع اندک مولکولهای ایمونوگلوبولین، فراورده های تولید شده، قابلیت تزریق از طریق وریدی را دارند (۳). شایان ذکر است که در روش کروماتوگرافی، محلولهای رقیق پروتئینی پس از تخلیص نیاز به تغلیظ دارند. افزایش غلظت پروتئین، احتمال جذب غیراختصاصی آنها را به سطوح ظروف مورد استفاده و همچنین تجزیه آنها را کاهش می دهد. از طرفی جهت عرضه این فرآورده پروتئینی به بازار با دوز مناسب، عمل تغلیظ ضروری است (۴).

اولترافیلتراسیون به دلیل مزایائی از جمله، اثرات جانبی کمتر بر فعالیت بیولوژیکی مولکولهای پروتئینی، سرعت بازیافت (recovery) بالا، اندک بودن تجهیزات مورد نیاز و عدم تاثیر بر pH و قدرت یونی محلول، روش برتر در تغلیظ پروتئین محسوب می شود (۵). این روش علاوه بر تغلیظ در جداسازی پروتئین ها نیز کاربرد وسیعی دارد (۷،۶).

با توجه به این که اولترا فیلتراسیون، تغلیظ نمونه را با اعمال یک فشار خاص انجام می دهد، امکان دناتوراسیون پروتئین ها تحت تاثیر این فشار وجود دارد. بنابراین استفاده از مواد پایدارکننده مختلف می تواند پایداری پروتئین مورد نظر را در طی فرایند تغلیظ تامین نماید (۸).

هدف از این تحقیق، تغلیظ فرآورده Anti-Rh(D) با استفاده از سیستم اولترافیلتراسیون و بررسی شرایط مناسب در طی فرایند تغلیظ، جهت افزایش پایداری ملکول Anti-Rh(D) است.

## مواد و روش کار

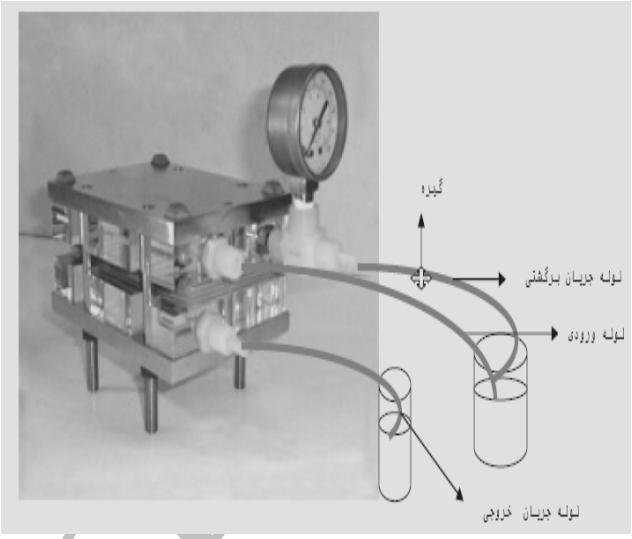
**تهیه ایمونوگلوبولین Anti-Rh(D):** نمونهAnti-Rh(D) مورد استفاده در این مطالعه جهت تغلیظ از یک سری Anti-Rh(D) خالص شده توسط روش کروماتوگرافی تعویض یونی در بخش ایمونوبیوشیمی مرکز تحقیقات ایمونولوژی، پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، تهیه گردید. به طور خلاصه، روش تخلیص شامل جذب پروتئین های پلاسما به جز Anti-Rh(D) بر روی ستون DEAE-Sephadex A50 و شتسشو ستون با بافر فسفات pH ۷/۵ ۲۵mM می باشد. تحت این شرایط Anti-Rh(D) از ستون خارج شده و برای تغلیظ توسط دستگاه اولترافیلتراسیون مورد استفاده قرار گرفت (۹).

**آزمایش جریان آب تمیز:** این آزمایش جهت تعیین سرعت مناسب برای ایجاد یک جریان پایه در فیلتر های تمیز سیستم اولترافیلتراسیون استفاده می شود. به این ترتیب که لوله های فیلتر جریان برگشتی و ورودی سیتم را در داخل بشرآب مقطر گذاشته و با استفاده از یک گیره فشاری، لوله جریان برگشتی فشرده شده، تا فشار ورودی معادل ۸۰Kpa ایجاد شود و سپس با استفاده از یک استوانه مدرج سرعت جریان بر جسب میلی لیتر در دقیقه در لوله جریان خروجی اندازه گیری می شود (شکل ۱). سپس از این سرعت جریان برای فرایند تغلیظ استفاده می گردد (۵).



Archive of SID

www.SID.ir




شکل ۱: آزمایش جریان آب تمیز در سیتم اولترافیلتراسیون Minitan-S ، سرعت جریان فیلتراز طریق اندازه گیری سرعت در لوله جریان خروجی و با استفاده از یک استوانه مدرج، محاسبه می شود.

**تغلیظ نمونه توسط سیستم اولترافیلتراسیون:** جهت مطالعه تاثیر پارامترهای مختلف در تغلیظ ایمونوگلوبولین Anti-Rh(D) در طی فرایند اولترافیلتراسیون، ۱۰۰ml فرآورده خالص شده، توسط سیستم Minitan-S که فیلتر آن از نوع Polysulfon با cut off معادل ۳۰۰۰۰ دالتون می باشد، در فشار kpa ۸۰ به مدت ۵۰ دقیقه و تا حجم ml ۲۷ تغلیظ گردید. این پروتئین تغلیظ شده در مطالعات بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

**تعیین میزان پروتئین تام:** برای تعیین میزان پروتئین تام در محلول عبور کرده از فیلتر اولترافیلتراسیون، در طی فرایند تغلیظ، از روش برادفورد استفاده گردید. در این روش، محلول BSA (سرم آلبومین گاوی) به عنوان استانداردانتخاب شد (۸).

**تعیین میزان IgG تام:** از این روش به منظور بررسی میزان IgG تام، قبل و بعد از تغلیظ استفاده شد (۸). به این منظور از کیت های معمول اندازه گیری IgG تام سرم انسان به روش SRID (Single Radial Immunodiffusion) استفاده گردید. آزمایش طبق دستور شرکت سازنده این کیت ها (بیوژن مشهد) انجام شد.سپس با توجه به قطر هاله رسوبی تشکیل شده برای هر یک از نمونه ها و نمودار استاندارد، میزان غلظت هر یک از نمونه ها تعیین شد.

**بررسی مولکولهای IgG تجمع یافته و یا شکسته شده توسط ژل فیلتراسیون:** جهت تعیین میزان ملکولهای IgG تجمع یافته (aggregated) و یا شکسته شده (fragmented) در نمونه تغلیظ شده، از یک ستون حاوی سفادکس G-200 استفاده گردید. ۱ میلی لیتر از این نمونه بر روی ستون قرار داده شد و سپس ستون با بافر فسفات حاوی ۰/۱ مولار کلرور سدیم شستشو گردید. خروجی ستون، به صورت فراکسیون های ۳ میلی لیتری جمع آوری و جذب نوری آنان در۲۸۰ نانومتر قرائت گردید. سپس منحنی جذب های خوانده شده در برابر شماره فراکسیون رسم شده و در نهایت با اندازه گیری سطح زیر منحنی های به دست آمده درصد میزان ملکولهای تجمع یافته و یا شکسته شده محاسبه می شود (۸).

**روش تهیه فرمولاسیونهای Anti-Rh(D) جهت انجام اولترافیلتراسیون:** جهت بررسی تاثیر پایدارکننده های متفاوت بر روی پایداری Anti-Rh(D) در طی فرایند اولترافیلتراسیون، فرمولاسیون های نمونه Anti-Rh(D) در بافر سدیم- پتاسیم فسفات ۲۵ mM ۷/۵ pH، مطابق جدول ۱ تهیه و اولترافیلتراسیون با شرایط یکسان انجام شد.

جدول ۱: اجزاء فرمولاسیون های مختلف جهت انجام اولترافیلتراسیون نمونه Anti-Rh(D) در بافر سدیم- پتاسیم فسفات ۲۵ mM ۷/۵ pH

| فرمولاسیون | گلایسین | سوکروز |
|---|---|---|
| ۱ | ۰/۳ M | ۳۰mM |
| ۲ | ۰/۳ M | ۶۰mM |
| ۳ | ۰/۳ M | ۹۰mM |
| ٤ | بدون فرمولاسیون | |

سپس در نمونه های تغلیظ شده حاوی این فرمولاسیون ها، میزان Anti-Rh(D) طبق روش ذکر شده در ذیل (تست ELAT) تعیین گردید.



Archive of SID
www.SID.ir

**روش تعیین میزان *IgG* اختصاصی (Anti-Rh(D)**: به منظور بررسی این نکته که آیا مونومر های موجود، فعال می باشند یا خیر، میزان(Anti-Rh (D با استفاده از روش(Enzyme-Linked Antiglobulin Test) ELAT که قبلا گزارش شده بود، محاسبه گردید. به طور خلاصه روش کار به صورت زیر می باشد: به ۱۰۰µl از گلبول قرمز۱۰٪ با Rh مثبت مقدار ۱۰۰µl از محلول استاندارد Anti-Rh(D) یا نمونه های Anti-Rh(D) اضافه شد. سپس ۲۰۰µl از IgG ضد Anti-Rh(D) کونژوگه به آلکالن فسفاتاز به همه لوله ها افزوده گردید. در مرحله بعد، سوبسترای تازه تهیه شده حاوی پارانیتروفنیل فسفات به آنها اضافه و جذب مایع روئی توسط دستگاه الایزاریدر در طول موج ۴۰۵ nm خوانده شد. در نهایت با ترسیم منحنی بر اساس جذب های نوری محلولهای استاندارد، میزان Anti-Rh(D) نمونه ها مشخص می شود (۱۰).

**روش آماری:** برای مقایسه بین نمونه اولیه و نمونه تغلیظ شده و همجنین مقایسه بین فرمولاسیون های مختلف، از T test استفاده گردید. مقادیر p معادل ۰/۰۵ یا کوچکتر از آن از نظر آماری معنی دار (significant) در نظر گرفته شد.

## نتایج

### بررسی نتایج آزمایش جریان آب تمیز

از این آزمایش برای تعیین یک سرعت جریان پایه ای برای فیلتر های تمیز استفاده می شود. با توجه به این که فشار مناسب جهت تغلیظ پروتئین ها ۸۰kpa می باشد، بنابراین در این فشار، در سیتم Minitan-S مورد استفاده در این مطالعه، سرعت جریان فیلتراز طریق اندازه گیری سرعت در لوله جریان خروجی و با استفاده از یک استوانه مدرج، ml/min ۱/۵ محاسبه شد. از این سرعت جریان، برای فرایند تغلیظ استفاده می گردد.

### بررسی نتایج تعیین میزان پروتئین تام

در سیستم های اولترافیلتراسیون، اساس کار تغلیظ به صورتی طراحی شده است که در طی فرایند تغلیظ، پروتئین مورد نظر نباید از فیلتر مورد استفاده عبور کند.

بنابراین از تست برادفورد جهت بررسی وجود یا عدم وجود پروتئین تام در محلول عبور کرده از فیلتر استفاده گردید. نتایج نشان داد که میزان پروتئین رد شده بسیار ناچیز (mg/dl ۰/۵–۰/۲) می باشد (p>۰/۰۵).

### بررسی نتایج تعیین میزان IgG تام

این تست جهت اندازه گیری IgG موجود در نمونه، قبل و بعد از تغلیظ انجام شد. با توجه به منحنی استاندارد، غلظت IgG نمونه قبل از تغلیظ mg/dl ۱۸۸۳ و بعد از تغلیظ به میزان ۳/۷ برابر، mg/dl ۶۹۵۸ به دست آمد که این نتیجه تقریبا با مقدار کاهش حجم نمونه نیز مطابقت دارد و فقط حدود ۰/۱۵٪ کاهش در میزان IgG مشاهده می شود (p>۰/۰۵).

### نتایج مربوط به میزان مولکول های تجمع یافته و شکسته شده IgG

در روش ژل فیلتراسیون و با استفاده از ستون سفادکس G-200 میزان مولکول های تجمع یافته و شکسته شده IgG را به ترتیب ۲/۳ و ۲/۵ درصد نشان داد و ۹۵ درصد نمونه مربوط به IgG مونومر بود (نمودار ۲) که این مقدار در حد قابل قبولی (کمتر از ۳ درصد) جهت تزریق داخل وریدی می باشد.

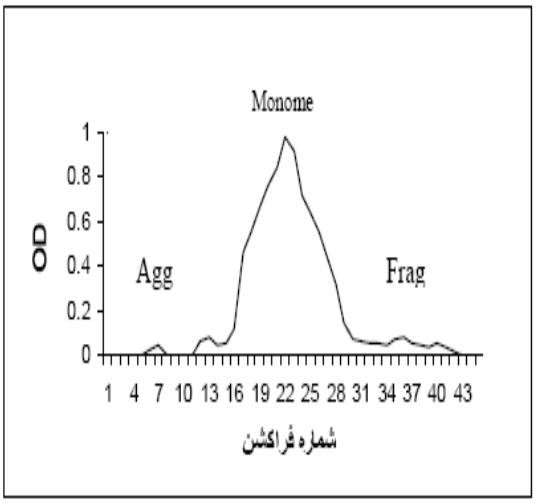
### بررسی نتایج تست ELAT

جهت بررسی میزان Anti-Rh(D) در نمونه های تغلیظ شده و اولیه تست ELAT انجام شد که یک روش حساس و دقیق می باشد. در این روش یک رابطه خطی بین میزان آنتی بادی باند شده به اریتروسیت و دانسیته نوری وجود دارد که به عنوان تخمینی از غلظت Anti-Rh(D) فعال منظور می شود. پس از خواندن جذب نمونه ها در طول موج ۴۰۵ nm، منحنی استاندارد با رسم جذب استانداردها در مقابل رقت (Anti-Rh(D آنها به دست می آید (نمودار ۳). بنابراین غلظت Anti-Rh(D) موجود در نمونه ها، با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه می شود.

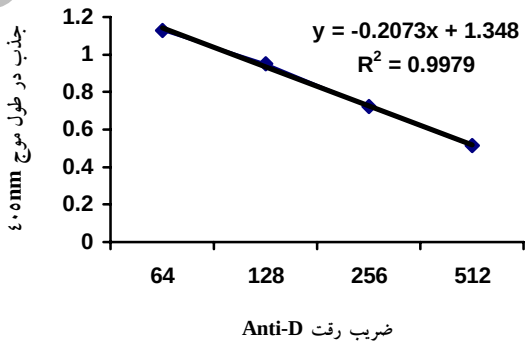


Archive of SID

www.SID.ir

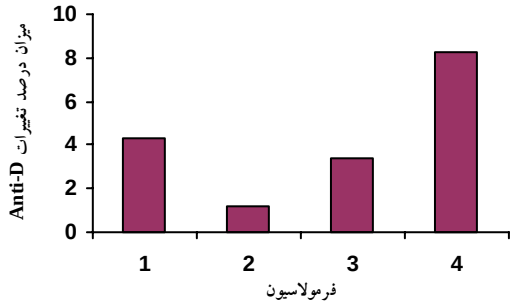



نمودار ۲: بررسی میزان مولکول های تجمع یافته و شکسته شده IgG توسط روش ژل فیلتراسیون بر روی ستون سفادکس G-200، قطر بستر:۱۵ میلی متر، حجم بستر: حدود ۲۰۰ میلی لیتر، سرعت جریان: $3ml.cm^{-2}.h^{-1}$ محلول شتشو: بافر سدیم- پتاسیم فسفات ۲۵ mM pH ۷/۵.




نمودار ۳: نمودار استاندارد روش ELAT بر اساس جذب استانداردهادر طول موج ٤٠٥ nm در مقابل رقت های مختلف Anti-Rh (D)

نتایج نشان داد که میزان Anti-Rh(D) در نمونه تغلیظ شده و بدون فرمولاسیون (فرمولاسیون ۴) به میزان ۴/۳٪ کاهش یافته است. در فرمولاسیو ن های ۱، ۲، ۳ نیز به ترتیب ۲/۳٪، ۰/۷٪ و ۱/۶٪ کاهش در میزان Anti-Rh(D) مشاهده گردید (نمودار ۴). بنابراین در فرمولاسیون ۲ کمترین کاهش در میزان Anti-Rh (D) مشاهده می شود($p<0/05$).




نمودار ٤: درصد تغییرات میزان Anti-Rh(D) درفرمولاسیون های مختلف بعد از تغلیظ نمونه توسط سیستم اولترافیلتراسیون. هر عدد بیانگر متوسط آن ±SD می باشد.

## بحث

ایمونوگلوبولین های وریدی کاربرد های های متفاوتی دارند از جمله می توان به اختلالات نقص سیستم ایمنی اولیه و ثانویه و بیماریهای اوتوایمیون همچون ترمبوسیتوپنی پورپورا و مولتیپل اسکلروزیس اشاره نمود (۱۱). هر چند که مکانیسم دقیق این فراورده در این نوع بیماریها به طور کامل مشخص نمی باشد ولی احتمال می رود که ایمونوگلوبولین های وریدی سبب مسدود کردن رسپتور های FC ماکروفاژها و سایر سلولهای افکتور شده و ظرفیت فاگوسیتوز کردن این سلولها را کاهش دهد (۱۲). همچنین ممکن است که با تعدادی از رسپتور های غشائی سلولهای T،B و منوسیت ها که در واکنش های خودی شرکت می کنند، واکنش داده و سبب کاهش تولرانس های خود ایمنی گردند. ایمونوگلوبولین های وریدی در واکنش های التهابی سیستمیک همچون آسم نیز به کار برده می شوند که احتمالا اثرات کاربردی خود را از طریق کاهش تولید پیش فاکتور های التهابی مانند TNF-α، INF-γ و اینترلوکین ها انجام می دهند (۱۱، ۱۲). ایمونوگلوبولین Anti-Rh(D) نیز جهت پیشگیری از تولید آنتی بادی های Anti-Rh در افراد Rh منفی که در معرض گلبولهای قرمز Rh مثبت قرارگرفته اند استفاده می شود (۱). استفاده از روش های مناسب جهت تهیه فراورده های ایمونوگلوبولین



Archive of SID
www.SID.ir

وریدی به این علت مورد توجه قرار گرفت که در صورت وجود ملکولهای تجمع یافته ایمونوگلوبولین در فراورده، امکان بروز عوارض جانبی شدید از جمله شوک آنافیلاکسی وجود دارد که این امر به خاطر فعال کردن سیتم کمپلمان و نیز آزادسازی هیستامین به میزان فراوان توسط مولکولهای تجمع یافته می باشد (۱۳).

در مقایسه با روشهای دیگر تهیه ایمونوگلوبولین از جمله روش کوهن (ترسیب ایمونوگلوبولین ها توسط الکل)، روش کروماتوگرافی تعویض یونی به علت ایجاد فراورده ای با فعالیت ضد کمپلمانی پائین و کاهش تجمع مولکولهای ایمونوگلوبولین، روشی مناسبی برای ایجاد فراورده های قابل تزریق از لحاظ وریدی می باشد (۹).

با توجه به آن که محلولهای رقیق پروتئینی خارج شده از ستونهای کروماتوگرافی به علت اتصال به سطوح و تجزیه به زیر واحدهای متشکله پایدار نیستند لذا، معمولا پروتئینها بعد از استخراج نیاز به تغلیظ دارند (۴). روشهای مورد استفاده برای تغلیظ پروتئینها معمولا شامل ترسیب، دیالیز تحت شرایط خلا، Freezedrying و اولترافیلتراسیون می‌باشد (۳). اولترافیلتراسیون به دلیل مزایائی از جمله اثرات جانبی کمتر روی فعالیت بیولوژیکی مولکولهای پروتئینی، سرعت عمل بالا، اندک بودن تجهیزات مورد نیاز و عدم تاثیر بر pH و قدرت یونی محلول، روش برتر در تغلیظ پروتئین به خصوص در مقیاس صنعتی محسوب می شود (۵). هدف از این مطالعه تغلیظ فرآورده Anti-Rh(D) به عنوان یک ایمونوگلوبولین قابل تزریق به صورت وریدی، با استفاده از سیستم اولترافیلتراسیون و بررسی تاثیر پارامترهای مختلف در طی فرایند تغلیظ ایمونوگلوبولین Anti-Rh (D) بود.

برای این منظور، فرآورده خالص شده، توسط سیستم Minitan -S که فیلتر آن از نوع Polysulfon با cut off حدود ۳۰۰۰۰ دالتون می باشد، تحت فرمولاسیونهای مختلف تغلیظ گردید.

در اولترافیلتراسیون، برای تغلیظ پروتئین ها معمولا غشائی استفاده می شود که cut off آن ۶-۳ برابر کمتر از وزن مولکولی پروتئین باشد (جدول۲).

جدول ۲: cut off مورد استفاده برای وزن های مولکولی مختلف در سیستم اولترا فیلتراسیون.

| فیلتر سیستم اولترافیلتراسیون Cut off (MWCO) | وزن مولکولی پروتئین (کیلو دالتون) |
|---|---|
| 1 k | 3 k -10 k |
| 3 k | 10 k -20 k |
| 5 k | 15 k -30 k |
| 10 k | 30 k -90 k |
| 30 k | 90 k -180 k |
| 50 k | 150 k -300 k |
| 100 k | 300 k -900 k |
| 300 k | 900 k -1800 k |
| 1000 k | >3000 k |

بنابراین با توجه به این که وزن مولکولی ایمونوگلوبولین Anti-Rh(D)، ۱۵۰KD می باشد، فیلتر Polysulfon با cut off حدود ۳۰۰۰۰ دالتون، برای این کار مناسب تشخیص داده شد. انتخاب غشاء از جنس پلی سولفون نیز به این دلیل می باشد که جذب پروتئین آنان پایین می باشد. فشار مناسب جهت تغلیظ پروتئین ها ۸۰kpa می باشد (۵). هنگامی که فشار ۸۰kpa باشد سرعت جریان فیلتر، ml/min ۱/۵ است به این ترتیب یک نمونه ۱۰۰ میلی لیتری در مدت حداکثر ۵۰ دقیقه تا حد ۲۷ میلی لیتری می تواند تغلیظ شود و این نهایت حجمی است که توسط این سیستم می توان تغلیظ نمود. تحت شرایط ذکر شده، مشاهده گردید که مقدار ناچیزی از پروتئین (کمتر از mg/dl ۰/۵) از فیلتر رد می شود که می توان از این مقدار صرف نظر کرد ($p>0/05$). همچنین مشخص گردید که نمونه ها بعد از تغلیظ، میزان IgG آنان نیز حدوداً ۳/۷ برابر تغلیظ شده است که این نتیجه با مقدار کاهش حجم نمونه نیز مطابقت دارد ($p>0/05$).

در این تحقیق، در روش ژل فیلتراسیون و با استفاده از ستون سفادکس G-200 میزان مولکول های تجمع یافته و شکسته شده IgG در طی فرایند اولترافیلتراسیون و تحت شرایط



Archive of SID

www.SID.ir

مناسب، به ترتیب ۲/۳ و ۲/۵ درصد و IgG مونومر، ۹۵ درصد به دست آمد. بر اساس فارماکوپه انگلستان، نواحی مربوط به IgG مونومر نباید کمتر از ۸۵ درصد کل نواحی کروماتوگرام باشد و نواحی مربوط به اگریگیتها و فراگمنتها نیز نباید بیشتر از ۱۰ و ۵ درصد باشد. این مقادیر جهت تزریق داخل وریدی کمتر از ۳ درصد است. بنابراین در تغلیظ فرآورده Anti-Rh(D) با استفاده از سیستم اولترافیلتراسیون و بدون فرمولاسیون میزان مولکول های تجمع یافته و شکسته شده IgGدر حد قابل قبولی می باشد.

به منظور بررسی این مطلب که آیا مونومرهای حاصل فعال می باشند یا خیر از تست ELAT استفاده شد. نتایج نشان می دهد که میزان Anti-Rh(D) در نمونه تغلیظ شده و بدون فرمولاسیون به میزان ۴/۳٪ کاهش یافته است.

در مورد تاثیر پایدارکننده های مختلف بر روی پایداری ایمونوگلوبولین در طی فرایند تغلیظ توسط سیستم اولترافیلتراسیون نیز تحقیقات کمی صورت گرفته است. در یک تحقیق، توسط سیستم اولترافیلتراسیون، محلولهای ایمونوگلوبولین G با فرمولاسیون های مختلف از جمله MGlycin (pH ۵) ۰/۳ M، MGlycine (pH ۵) ۰/۳ M و NaCl ۰/۱۵ M تغلیظ شد. مشاهده گردید که فعالیت آنتی کمپلمان تمامی محلولها بعد از تغلیظ تقریبا یکسان است هر چند که میزان کدورت در محلولی که حاوی Glycine (pH ۵) ۰/۳ M می باشد کمترین مقدار را دارد (۲، ۱۴). در مطالعه ای دیگر، در تغلیظ آنتی بادی مونوکلونال توسط سیستم اولترافیلتراسیون، میزان تجمع ملکولها و کدورت، بدون فرمولاسیون و نیز با استفاده از اکسیپیانت اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که در هر دو نمونه میزان مولکولهای تجمع یافته و کدورت تقریبا یکسان می باشد (۱۵). در تغلیظ پروتئین توسط اولترافیلتراسیون مهمترین استرس، دناتوراسیون در اثر فشار می باشد. به دنبال فشار حاصل از اولترافیلتراسیون، چین خوردگی پروتئین باز شده و گروههای آب گریز آن در معرض محیط قرار می گیرند که در این حالت پروتئین از لحاظ ترمودینامیکی ناپایدار می باشد. اسید های آمینه و کربوهیدارت ها به ویژه سوکروز و گلایسین برای پایدار کردن پروتئین ها در برابر فشارهای وارده بر آنها به کار می روند. مکانیسم عمل این پایدار کننده ها، حذف- دهیدراتاسیون ترجیحی می باشد به این ترتیب که با خارج شدن از اطراف پروتئین و جایگزین شدن مولکول های آب به جای آنها، گروههای آب دوست با آب برای رسیدن به پایداری، واکنش داده و گرههای آب گریز نیز در داخل مولکول پروتئین مدفون می شوند و به این ترتیب پروتئین ساختمان سه بعدی خود را به دست می آورد. در این تحقیق نیز، از سوکروز و گلایسین به عنوان پایدارکننده تحت شرایط ذکر شده، استفاده گردید (۴، ۱۶). بنابراین فرمولاسیون هائی حاوی گلایسین ۰/۳ M و غلظت های مختلف سوکورز (۹۰mM-۶۰-۳۰) در بافر سدیم- پتاسیم فسفات ۲۵ mM، pH ۷/۵ تهیه گردید. انتخاب این بافر نیز به این علت بود که خالص سازی Anti-Rh(D) توسط ستون کروماتوگرافی تحت همین شرایط انجام شد (۸) و همچنین تحقیقات قبلی نشان داده بود که فراورده Anti-Rh (D) در بافر فسفات با pH ۷/۵ از پایداری مناسب برخوردار می باشد (۹، ۱۷).

تحت شرایط ذکر شده نتایج نشان دادکه در تست ELAT در فرمولاسیو ن های ۱، ۲ و ۳ نیز به ترتیب ۱/۶٪، ۰/۷٪ و ۲/۳٪ کاهش در میزان Anti-Rh(D) مشاهده گردید.

## نتیجه گیری

از این تحقیق می توان نتیجه گرفت که جهت تغلیظ Anti-Rh(D) تخلیص شده دربافر سدیم- پتاسیم فسفات ۲۵mM pH ۷/۵ به وسیله سیستم اولترافیلتراسیون در فشار ۸۰kpa، فیلتر Polysulfone، با cut off حدود ۳۰۰۰۰ دالتون، Minitan-S، تقریباً هیچ پروتئینی از فیلتر رد نشده است و بیش از ۹۵٪ مولکول به صورت مونومر می باشد. با این



Archive of SID
www.SID.ir

حال، میزان (Anti-Rh(D در نمونه تغلیظ شده و بدون فرمولاسیون به میزان۴/۳٪ کاهش یافته است در صورتی که در فرمولاسیون هائی حاوی گلایسین M ۰/۳ و غلظت های مختلف سوکورز (۹۰mM -۶۰-۳۰) در بافر سدیم- پتاسیم فسفات mM ۲۵ pH ۷/۵، به ترتیب ۱/۶٪، ۰/۷٪ و ۲/۳٪ کاهش در میزان (Anti-Rh(D مشاهده گردید. بنابراین به منظور تهیه فراورده (Anti-Rh(D به فرم لیوفیلیزه و یا مایع با فرمولاسیون های مختلف، مطلوب است که گلایسین M ۰/۳ و سوکروز (۳۰mM) قبل از عمل تغلیظ به فراورده اضافه و بقیه پایدارکننده های مورد نیاز به منظور پایداری فراورده در حین نگهداری، بعد از تغلیظ استفاده گردد.

## تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد که حمایت مالی این تحقیق را به عهده داشته اند تشکر می شود.

Archive of SID



www.SID.ir

## References


1. Lee D, Contreras M, Robson SC, Rodeck CH, Whittle MJ. Guidelines for the use of Anti-Rh (D); immunoglobulin for Rh prophylaxis. J Obstet Gynaecol 1998; 105:129–134.
2. Sisti AM, Vitali MS, Manfredi MJ, Zarzur JA. Preparation of lyophilized and liquid intravenous immunoglobulin G: development and scale-up. Vox Sang 2001; 80:216-224.
3. Walsh G. Protein Biochemistry and Biotechnology. John Wiley & Sons, LTD; 2002. 3:107-115.
4. Banga A K. Therapeutic peptides and proteins: formulations processing and delivery system. USA: Thechonomic publishing co. Ino; 1995. 81-122.
5. Pharmacia, Biotech export bio directory, 1999, 456-498.
6. Ghosh R. Fraction of biological macromolecules using carrier phase ultrafiltration. Biothecnol Bioenge 2001 74: 1-11.
7. Wan Y, Ghosh R, Cui ZF. High-resolution plasma protein fractionation using ultrafiltration. Desalination 2002; 144: 301-306.
8. Weier DM. 1986, Handbook of experimental immunology.Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1986.
9. Varasteh AR, Hashemi M, Fazly Bazzaz BS, Ghazavi A. Large- scale Production of Anti-Rh(D) immunoglobulin by Ion Exchange Chromatography. IJBMS 2001; 4:16-21.
10. Sankian M, Hashemi M, Varasteh A R. Anti-Rh(D) quantification by an Enzyme-linked antiglobulin test : A comparison study of two method. IJBMS 2004; 7:18-22.
11. Negi VS, Elluru S, Siberil S, Graff-Dubois S, Mouthon L, Kazatchkine MD, Lacroix-Desmazes S, Bayry J, Kaveri SV. Intravenous immunoglobulin: an update on the clinical use and mechanisms of action. J Clin Immunol 2007; 27:233-45.
12. Karen Y Stokes, Neil Granger. Gaining more from gamma globulins. Circulation, 2005; 112: 1918-1920.
13. Amy S, Rosenberg. Effects of protein aggregates: An immunologic perspective. AAPS J 2006; 8: E501-E507.
14. Meireles M, Aomar P, Sanchez V. Albumin denaturation during ultrafiltration: effects of operating conditions and consequences on membrane folding. Biothecnol Bioeng 1991; 38:528-534.
15. Cromwell ME, Hilario E, Jacobson F. Protein Aggregation and Bioprocessing. AAPS J 2006; J8 (3): E572-E579.
16. Lam XM, Deswin JQ. Antibody formulation. US.Patent & trade mark Office: 2001. 6,171,586.
17. Varasteh A.R, Hashemi M, Jafaari MR, Moghadassi Risseh M. Formulation of Anti D immunoglobulin preparation. IJBMS 2004; 7: 11-16.


Archive of SID



www.SID.ir