خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۳ شماره ۲ تابستان ۸۵ (۱۱۰-۱۰۱)

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

افسانه آقائی[۱]، دکتر علی اکبر پورفتح‌اله[۲]، سیده زهرا بطحائی[۳]، دکتر سید محمد موذنی[۴]، هاشم خرسند محمدپور[۵]، دکتر حوری رضوان[۶]، سودابه بنازاده[۵]، بهزاد ادیبی مطلق[۵]، دکتر سید کامران موسوی حسینی[۷]، دکتر محمدعلی جلیلی[۸]

چکیده

سابقه و هدف

پلاسمای انسان ماده‌ای‌حیاتی 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 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 روش ها

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.

یافته ها

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.

نتیجه گیری

فرکشن II به دست آمده یک ماده حد واسط مناسب برای تولید ایمونوگلوبولین تزریق وریدی می باشد 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 : ۸۴/۶/۲۰
تاریخ پذیرش : ۸۴/۹/۲۳

۱- دانشجوی PhD ایمونولوژی دانشگاه تربیت مدرس- مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران و شرکت پالایش و پژوهش خون
۲- مؤلف مسؤول : PhD ایمونولوژی ـ استاد دانشگاه تربیت مدرس - مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران ـ صندوق پستی ۱۱۱-۱۴۱۱۵
۳- PhD بیوشیمی ـ دانشیار دانشگاه تربیت مدرس
۴- PhD ایمونولوژی ـ دانشیار دانشگاه تربیت مدرس- مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران و شرکت پالایش و پژوهش خون
۵- کارشناس ارشد بیوشیمی ـ مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران و شرکت پالایش و پژوهش خون
۶- PhD بیوشیمی ـ استاد مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۷- PhD شیمی دارویی ـ استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران و شرکت پالایش و پژوهش خون
۸- PhD شیمی دارویی ـ دانشیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران و شرکت پالایش و پژوهش خون

Archive of SID
www.SID.ir

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 ارایه گردید(۲، ۱). 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 می گردند که محصول پایه فرکشن II می باشد (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 بوده‌است. در جهت رفع این نقص برخی از تولید کنندگان از کروماتوگرافی تعویض یونی و برخی دیگر از pH اسیدی استفاده نموده اند (۹-۵) .

به طورکلی 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 جزیی مقاوم بوده و از قابلیت تکرار پذیری بالا برخوردار باشند(۱۱، ۱۰).

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 روش ها

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 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 ، پلاسما از گروه‌های مختلف خون انتخاب ودر دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید .

مراحل پالایش پلاسما :

در پالایش پلاسما از اتانل ۹۶ درجه سانتی‌گراد به عنوان رسوب دهنده درهمراهی با تنظیمpH 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 ضدعفونی 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.

Archive of SID
www.SID.ir

ب – رسوب فرکشن I

رسوب فرکشن I حاوی فیبرینوژن از پلاسمای فاقد کرایو(Cryo Poor Plasma , CPP) در pH خنثی(۰/۱ ± ۷/۱ = pH) ، 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. 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 ۲۰ تا ۲۵ درصد در pH خنثی(۰/۱ ± ۶/۸ = pH) 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 (۰/۱ ± ۵ = pH) 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 (۰/۱ ± ۷/۱ =pH) و در دمای ۱ ± ۷– درجه سانتی‌گراد ایمونوگلوبولین G رسوب داده شد.

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

جداسازی رسوب‌های ایجاد شده در فرآیند پالایش توسط سانتریفوژ ژوئنKR422 به مدت یک ساعت در ۴۰۰۰g و در دماهای منفی متناسب 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 ۹۰۲ تعیین گردید.

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

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

اندازه گیری فعال کننده پری کالیکرین : الف ـ تخلیص پری کالیکرین (PK) از پلاسمای انسانی: پلاسمای انسانی در کیسه دیالیز ریخته شده و به مدت ۲۴ ساعت در برابر بافرتریس ۸ =pH حاوی ۵۰ µg/ml پلی برن دیالیز شد. در طی مدت دیالیز، چندین بار بافر تعویض گردید. پلاسمای دیالیز شده روی ستون پلاستیکی ۲/۵ cm×۳۰cm حاوی DE-52 (whatman DEAE cellulose) برده‌شد. 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 – اندازه گیری فعال کننده پری کالیکرین در محصول تولید شده : فعال کننده پری کالیکرین موجود درمحصول

Archive of SID
www.SID.ir

تولید شده با روش آنزیمی اندازه گیری گردید . در این روش پری کالیکرین توسط PKA به کالیکرین تبدیل می شود که می تواند پارانیتروآنیلین (PNA) موجود درکروموژن S – 2302 (سوئد و کروموژنیکس) 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 Scaner و با استفاده از ورقه‌های سلولز استات mm TITAN III ۶۰×۷۶، روی نمونه‌های مختلف به دست‌آمده در فرآیند پالایش انجام گرفت.

طیف سنجی دو رنگ نمایی دورانی (Spectroscopy dichroism Circular): با استفاده از دستگاه J-810 جاسکو در طول موج‌های nm ۳۵۰–۱۸۵، ساختار دوم و سوم خمیر فرکشن II تهیه شده تعیین گردید. برای انجام مقایسه، دو نمونه تجاری ایمونوگلوبولین داخل وریدی از شرکت بیوتست و کدریون نیز هم زمان با نمونه‌های خمیر فرکشن II تعیین ساختار گردیدند. غلظت mg/ml ۲/۵ 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 ۳٪ و ژل جدا کننده ۷/۵٪ توسط دستگاه فارماسیا متصل به سیستم سرمایش انجام گرفت .

توزیع وزن مولکولی (HPLC) : آنالیزوزن مولکولی با استفاده ازستون 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 5µl با غلظت پروتئینی کمتر از ۵ گرم درصد و با شدت جریان ml/min ۰/۵ بود. پروتئین‌ها توسط اندازه گیری جذب نوری در ۲۸۰ نانومتر پیگیری شدند.

یافته‌ها

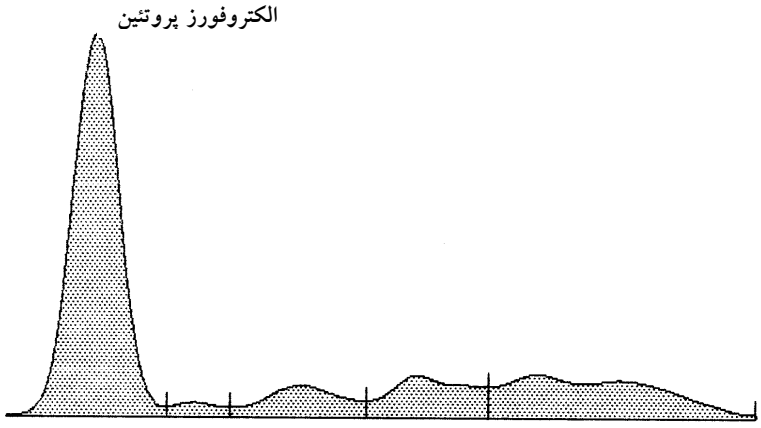
نتایج الکتروفورز سلولز استات و میزان پروتئین و آلبومین فرکشن‌ها در جدول ۱ خلاصه شده است .

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

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

Archive of SID
www.SID.ir

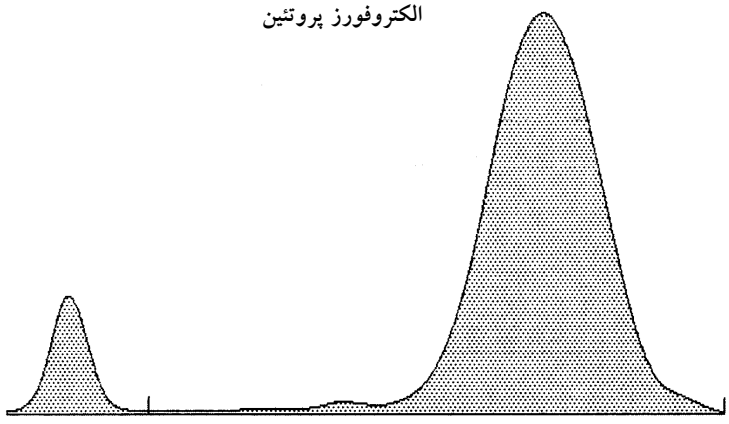
الف:



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

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 ـ پلاسما ب ـ فرکشن II میزان آلبومین، گاماگلوبولین و دیگر اجزای پروتئینی در پلاسمای نرمال به ترتیب ۵۵۷/۷، ۲۱/۴ و ۲۹/۹ درصد بوده‌است که پس از پالایش پلاسما این میزان در رسوب II به ۹/۴ و ۹۰/۸ درصد در مورد آلبومین و گاماگلوبولین رسیده‌است.

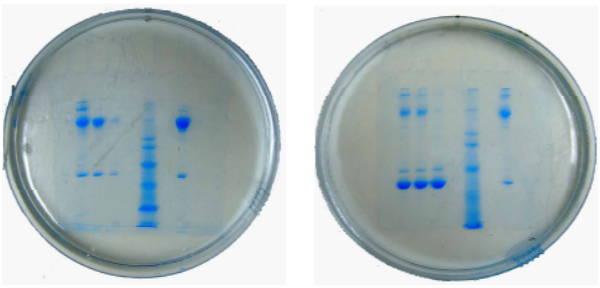
www.SID.ir

نتـایج الکتروفـورز سلولزاسـتات پلاسـما (FFP) و خمیـر فرکشن II در شکل ۱ نشان داده شده است .

میزان IgG موجـود در فرکـشن II بـا روش نفلـومتری ۱۱/۵ گرم درصد تعیین گردید در حالی که IgG موجود در پلاسما (FFP) مقدار ۱/۲۵ گـرم درصـد را نـشان مـی داد. میزان فعال کننده پـری‌کـالیکرین در فرکـشن II بـا غلظـت پروتئینی ۵ گرم درصد IU/ml ۱۰/۴ تعیین گردید که طبـق دستورالعمل فارماکوپه اروپایی میزان PKA کمتـر از IU/ml ۳۵ برای فرآورده تزریقی با غلظت پروتئینی ۳ گرم درصـد قابل قبول می‌باشد.

نتـــایج مربـــوط بـــه الکتروفـــورز SDS-PAGE روی فرکشن‌های مختلف در طی پالایش پلاسما از FFP تا تهیـه فرکشـن II بـا روش رنـــگ‌آمیزی کوماسی بلو در شکل ۲ آورده شده است.

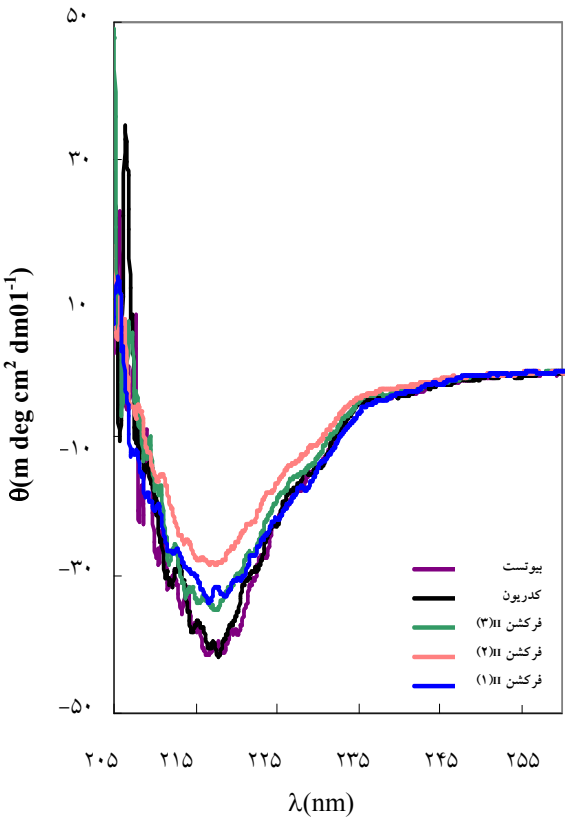
الف: **ب:**



شکل ۲: الکتروفورز PAGE (از چپ به راست)
الف ـ پلاسما ـ مایع رویی I ـ مایع رویی II+III ـ مارکر ـ خمیـر II+III
ب ـ خمیر II+III ـ مایع رویـی III ـ مـایع رویـی II ـ مـارکر ـ خمیر II

در حالی‌که میزان پلی مرکمتر از ۵ درصدبرای فـرآورده تزریقـی ایمونوگلوبـولین قابـل قبـول مـی باشـد ، HPLC انجام‌شده روی خمیر فرکـشن II میـزان ۰/۶۹ ٪ پلـی‌مـر و ۹۹/۳٪ منومر را نشان داد .

بـررسی ساختـاری فـرکشن II توسـط دستگـاه طیـف سنجی دو رنگ نمایی دورانی (CD) نشانگر وجـود درصـد بسیار زیادی از صفحات بتا در ساختار ثانویه خمیرهای بـه دست آمـده اسـت کـه در مقایـسه بـا نمونـه‌هـای تجـاری ایمونوگلوبولین داخل وریدی، نتایج مشابهی رانشان می‌داد. خمیرهای II به دست آمده مختلف از نظر سـاختار، تکـرار پذیری خوبی را نشان دادند . نتایج مربوط بـه سـاختار دوم در شکل ۳ و جدول ۲ آورده شده‌است (نتـایج مربـوط بـه 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 داده‌است

بازده حاصل از انجام فرآینـد پـالایش بـرروی۳ سـری متوالی(هرسری ۴۰۰۰ گرم پلاسـما) در جـدول ۳ خلاصـه شده است .

www.SID.ir
of SID

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

نمونه (درصد) / ساختار دوم پروتئین	خمیر II سری اول	خمیر II سری دوم	خمیر II سری سوم	بیوتست	کادریون
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 / نمونه	سری اول (g/kg plasma)	سری دوم (g/kg plasma)	سری سوم (g/kg plasma)	میانگین (g/kg plasma)
رسوب کرایو	۸/۳۸	۸/۷۸	۸/۹۵	۸/۷۰
رسوب فرکش 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 تزریق وریدی با استفاده از روش پالایش کوهن ــ اونکلی (Cohn-oncley) که ازفرکشن 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 انبساط 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 برآن بوده که با حداقل استفاده از مواد شیمیایی اضافی و تنها با تغییر غلظت الکل و pH ، به فرکشنII 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 از۱٪ پلی مر 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 رسوب گیری فرکشن II+III درمطالعه 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 حدواسط است، بیش از ۹۰٪ می باشد. 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 تزریق 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.

Archive of SID
www.SID.ir

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

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 پیروژنیسیتی در محصول را کاهش می دهد.

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 می توانند برای تهیه دیگر فرآورده‌های دارویی مورد استفاده قرار گیرند، نه تنها از لحاظ کیفیت بلکه از لحاظ کمیت نیز حفظ شوند.

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 کوتاه ترین زمان (حداکثر زمان از FFP تا تهیه فرکشن II ۲۸ ساعت) فرکشن II با بازدهی بالا و خلوص مطلوب تولید می‌شود. ساختار مولکول تغییر نمی کند و کمیت و کیفیت دیگر پروتئین‌ها نیز در نظر گرفته می شود. بنابراین دستیابی به ماده حدواسط حاوی ایمونوگلوبولین ناخالص میسر می شود 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 ازآقای 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.

Archive of SID
www.SID.ir

References :

1- Cohn EJ, Strong Le, Hughes WL, Mulford DJ, Ashwotrh 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 lipopraties 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 trad itittional plasma protein fractionation methods. Bioseparation 1991;1:383-396.

Archive of SID

www.SID.ir

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*

Archive of SID
www.SID.ir