خون
دوره ۵ شماره ۲ تابستان ۸۷ (۸۸-۸۱)

تخلیص ایمونوگلوبولین داخل وریدی از خمیر فرکشن II

دکتر افسانه آقایی[۱]، دکتر علی‌اکبر پورفتح‌اله[۲]، دکتر سیده زهرا بطحایی[۳]، دکتر سید محمد مؤذنی[۴]، هاشم خرسند محمدپور[۵]

چکیده

سابقه و هدف

فرآورده‌های ایمونوگلوبولین داخل وریدی(IVIG) در درمان اختلالاتی هم چون نقص‌های ایمنی اولیه و ثانویه، اتوایمیون، سیستماتیک التهابی و نیز در بیماری‌های عفونی به صورت موثر کاربرد دارد و حال حاضر از پرمصرف‌ترین اجزای پلاسمایی در جهان محسوب می شود. افزودن مراحل متعدد به فرآیند تولید IVIG که به منظور تخلیص بیشتر صورت می‌گیرد، باعث کاهش بازدهی و افزایش هزینه‌های ساخت می‌شود. لذا تولیدکنندگان همواره در صدد ارایه روش‌های مقرون به صرفه با در نظر گرفتن حفظ کیفیت و ایمنی مصرف هستند. در این مطالعه نه تنها مسیر تهیه فرآورده نهایی با حفظ کیفیت کوتاه‌تر شده، بلکه ایمنی محصول نیز با انجام پاستوریزاسیون به عنوان روش ویروس‌زدایی تامین گردیده است.

مواد وروش‌ها

بررسی انجام شده از نوع تجربی بود. از پلاسمای تازه منجمد شده(FFP) به عنوان ماده اولیه و با روش رسوب دادن با اتانل در سرما(روش Cohn)، خمیر فراکشن II(غنی از IgG) تهیه گردید. جهت تخلیص و با استفاده از فیلتراسیون، ناخالصی‌های غیر محلول حذف شد. قبل از انجام ویروس‌زدایی، محلول پروتئینی دیافیلتر و پس از افزودن پایدار کننده پاستوریزاسیون گردید. محلول پاستوریزه شده مجدداً دیافیلتر و سپس اولترافیلتر گردید و پس از فیلتراسیون در شرایط استریل فرآورده IgG نهایی تهیه شد.

یافته‌ها

کنترل کیفی محصول نهایی نشان داد که فرآورده IVIG به دست آمده با روش پیشنهادی، از خلوص ۱۰۰٪ برخوردار می‌باشد. میزان پلیمر پس از انجام پاستوریزاسیون و در محصول نهایی کمتر از یک درصد تعیین گردید. هم چنین با انجام آزمایش طیف‌سنجی دو رنگ نمایی، ساختار دوم و سوم مولکول IgG روش پیشنهادی در مقایسه با محصولات تجاری IVIG بررسی شد که نتایج مشابه و قابل قبولی را ارایه نمود. بازده محصول با انجام آزمایش نفلومتری محاسبه شد، که محصول ۳۹/۱٪ IgG از پلاسمای اولیه به دست آمد.

نتیجه گیری

نتایج آزمایش‌ها بر روی محصول نهایی از نظر خلوص نشان داد که روش تخلیصی به کارگرفته شده علیرغم کوتاه شدن فرآیند در مقایسه با روش‌های رایج، بسیار مطلوب می‌باشد. روش پیشنهادی پتانسیل‌های لازم برای هر دو مقوله مربوط به تولید مقرون به صرفه با حفظ کیفیت و ایمنی مصرف را از خود نشان داد که با انجام آزمایش‌های تکمیلی این روش، امکان به اجرا در آوردن آن در مقیاس صنعتی وجود دارد.

کلمات کلیدی: پلاسما، تخلیص، ایمونوگلوبولین داخل وریدی، فراکشن II کوهن

تاریخ دریافت: ۸۶/۱۲/۷
تاریخ پذیرش: ۸۷/۶/۵

۱ـ مؤلف مسؤول: PhD ایمنی‌شناسی ـ استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون و شرکت پالایش و پژوهش خون ـ صندوق پستی: ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵
۲ـ PhD ایمنی‌شناسی ـ استاد دانشگاه تربیت مدرس و مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۳ـ PhD بیوشیمی ـ دانشیار دانشگاه تربیت مدرس
۴ـ PhD ایمنی‌شناسی ـ استاد دانشگاه تربیت مدرس
۵ـ کارشناس ارشد بیوشیمی ـ مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران و شرکت پالایش و پژوهش خون

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

ایمونوگلوبولین داخل وریدی(IVIG) انسانی در اواخر دهه ۱۹۷۰ عمدتاً در جهت درمان بیماران مبتلا به هیپوگاماگلوبولینمی ارثی استفاده می‌شد. در سال ۱۹۸۱ با کشف خواص تعدیل ایمنی غیر قابل انتظار IVIG که می‌توانست به طور موثری«پورپورای ترومبوسیتوپنی ایمیون» را درمان کند، فهرست مصارف IVIG به سرعت رشد نمود و سبب افزایش تقاضای جهانی در مصرف این فرآورده گردید. کمبود محصول IVIG برای اولین بار در جهان در اواخر دهه ۱۹۹۰ بروز نمود. در اوایل دهه ۱۹۹۰ مقادیر مورد نیاز IVIG برای بیماران نقص ایمنی در مقایسه با تقاضای بالای دو محصول اصلی پالایش آن زمان یعنی فاکتور هشت(FVIII) و آلبومین، به صورت محسوسی کمتر بود(۱). در بین سال‌های ۱۹۸۴ تا ۲۰۰۴، تقاضای جهانی برای IVIG از ۷/۴ به ۵۵ تن در سال رسید. با افزایش تقاضای IVIG از ۲۰٪ در سال ۱۹۹۷ و ۳۰٪ در سال ۱۹۹۸، کمبود جهانی IVIG شروع شد(۲).

پالایش پلاسما در اکثر پالایشگاه‌های دنیا به روش کوهن ـ اونکلی(Cohn-Oncley) و با استفاده از روش‌های رسوب‌دهی انجام می‌شود. در این روش شرایط فیزیکوشیمیایی دقیق و کنترل شده‌ای بر روی فرآیند تولید و از طریق پارامترهایی همچون دما، pH ، قدرت یونی، غلظت پروتئین و الکل اعمال می‌گردد. اغلب تولیدکنندگان جهت تخلیص بیشتر پروتئین، مراحلی نظیر کروماتوگرافی به پروسه تولید الحاق می‌نمایند. در تخلیص پروتئین، روش کروماتوگرافی به صورت اختصاصی عمل می‌کند اما بازده جداسازی پروتئین‌ها از فرکشن‌های پلاسما توسط کروماتوگرافی حداقل حدود ۱۰ درصد کاهش می‌یابد. هم چنین به کارگیری روش کروماتوگرافی معایبی نظیر نگهداری بهداشتی ستون‌ها پس از اتمام کار و گران بودن رزین‌های خاص دارد. روش‌های ذکر شده به دلیل کاهش بازدهی و طولانی شدن پروسه تخلیص، توانایی لازم برای برطرف نمودن نیاز به مشتقات درمانی حاصل از پلاسما، هم چون IVIG با توجه به تقاضای رو به افزایش آن را ندارد(۳).

در حال حاضر دلایل متعددی برای اعمال تغییر در نحوه تولید IVIG در دنیا وجود دارد. این تغییرات در جهت کم کردن زمان تولید، استحکام بیشتر روش غیر فعال‌سازی ویروس، افزایش بازدهی IVIG از پلاسما، بهتر کردن توزیع زیر گروه‌های IgG ، بهبودی در خلوص به همراه کاهش میزان IgA ، IgM و آلبومین صورت می‌گیرد(۴).

تقاضای رو به افزون ایمونوگلوبولین وریدی و مصارف بالینی جدید آن موجب شد که موضوع بازدهی از اهمیت بیشتری برخوردار شود تا شاید با بهبود بازیافت IgG از پلاسمای انسانی، از بحران ناشی از کمبود IVIG کاسته شود. به طور کلی اخیراً بر ساخت فرآورده جدیدی از IVIG تاکید شده که فرآیندهای کارآمدتری در جهت بازدهی IgG از پلاسما داشته باشد(۵).

برای یافتن راهی جدید و پیشرفته، یک تلاش هماهنگ در صنعت پلاسما برای سرعت بخشیدن به روش پالایش پلاسما و تخلیص IgG با بازدهی و خلوص بالا صورت گرفته است، در ضمن این که عملکردهای بیولوژیکی پروتئین مورد نظر نیز مختل نگردیده است(۳). با مطالعه‌های انجام شده و تجربیات به دست آمده توسط نویسندگان این پژوهش در زمینه تولید IVIG ، طراحی جدیدی در راستای تخلیص این محصول انجام گرفت. هدف از انجام این مطالعه دست‌یابی به یک روش کوتاه در تهیه IVIG بود که امکان تولید آن در حجم انبوه و با هزینه کم و ایمنی بالا امکان‌پذیر باشد. در روش طراحی شده خمیر فراکشنII به عنوان ماده حد واسط برای تهیه IVIG مورد استفاده قرار گرفت و ناخالصی‌های مورد انتظار در خمیر فراکشنII در شرایط کنترل شده pH و غلظت یونی در طی مراحل متعدد رسوب داده شد و سپس فرآورده با استفاده از پایدار کننده مناسب پاستوریزه و در فرمولاسیون مایع و با حفظ ساختار طبیعی تهیه گردید. از نکات برجسته روش ارایه شده این است که فرآورده نهایی فقط با انجام فیلتراسیون و نیز دیا/اولترافیلتراسیون تهیه گردید که علاوه بر کوتاه‌تر شدن چشمگیر فرآیند، که به تبع آن افزایش بازدهی و کاهش هزینه ساخت را در برداشت، کیفیت محصول به دست آمده نیز در مقایسه با محصول تجاری مشابه، برابری می‌نمود.

Archive of SID
www.SID.ir

مواد و روش ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. در طی فرآیند پالایش از پلاسمای تازه منجمد شده(FFP)، خمیر فراکشن II تهیه گردید. جهت دست‌یابی به خمیر فراکشنII از پلاسما، از روش کوهن(Cohn) با ایجاد تغییراتی استفاده گردید. بنابراین ابتدا رسوب کرایو حاوی فاکتور انعقادی VIII در دمای مناسب تهیه و سپس به ترتیب خمیر فراکشنI ، خمیر فراکشن II+III و در نهایت خمیر فراکشنII با استفاده از درصدهای متفاوت الکل در pH و غلظت یونی متفاوت رسوب داده شد(۶).

مراحل تخلیص خمیر فراکشن II :

خمیر فراکشنII (غنی از IgG) حاصل از پالایش در آب مقطر ۴ °C ، با غلظت ۷ گرم درصد پروتئین حل و pH آن با استفاده از بافر استات به ۶/۵ رسانده شد. سوسپانسیون مذکور در دمای ۴ °C به مدت یک ساعت در حال چرخش قرار گرفت و سپس ۱۲ ساعت بدون چرخش در همان دما نگهداری و متعاقباً از پره فیلتر متعادل شده با بافر(Sarterious AP filter) عبور داده شد. پس از فیلتراسیون، pH را به ۴/۵ رسانده و به مدت یک ساعت در حال چرخش در دمای ۴ °C قرار گرفت و مجدداً با فیلتر سارتریوس ۰/۲۲ میکرون، فیلتر و سپس بر علیه آب مقطر ۴°C دیافیلتر گردید.

برای انجام دیافیلتراسیون و نیز اولترافیلتراسیون از دستگاه اولترافیلتراسیون فارماسیا مجهز به کاست ۱۰۰ KD با سطح موثر ۰/۱ متر مربع استفاده گردید. برای جلوگیری از تغییرات ساختاری مولکول پروتئینی در حین دیا/اولترافیلتراسیون، تمامی مراحل در دمای پایین‌تر از ۱۵ °C انجام و محلول پروتئینی در حین ورود بافر و یا تغلیظ آن، در حال چرخش ملایم و مداوم کنترل شده قرار گرفت.

برای انجام پاستوریزاسیون و برای حفظ ساختار پروتئین در طی پاستوریزاسیون، سوربیتول(Merk) به میزان ۳۰ درصد(w/w) و گلیسین(Merk) با غلظت ۰/۵ مولار به محلول دیافیلتر شده اضافه و سوسپانسیون با غلظت ۱ گرم درصد پروتئین و کنداکتیویته کمتر از ۰/۳ mS/cm در pH برابر ۴/۵ پاستوریزه گردید. پاستوریزاسیون به مدت ۱۰ ساعت در بن ماری ۰/۵ ± ۶۰ °C انجام گرفت. پس از پاستوریزاسیون به منظور خارج ساختن مواد افزوده شده، مجدداً دیا/اولترافیلتراسیون انجام گرفت.

قبل از دیا/اولترافیلتراسیون، سدیم استات به عنوان نشانگر به محلول اضافه گردید تا کنداکتیویته به mS/cm ۴/۸ رسانده شود و بدین‌وسیله زمان خاتمه دیا/اولترافیلتراسیون از طریق کنترل کنداکتیویته قابل ارزیابی گردد. قبل از انجام دیافیلتراسیون، جهت حذف پروتئین‌های دناتوره شده احتمالی نامحلول، ابتدا محلول پاستوریزه شده از فیلتر عبور داده شد.

دیافیلتراسیون تا رسیدن به کنداکتیویته ۰/۸ mS/cm ادامه یافت و سپس اولترافیلتراسیون به منظور تغلیظ انجام گرفت. محصول با مشخصات نهایی در غلظت ۲/۵ گرم درصد، pH=۵/۴ ، سوربیتول ۵ درصد و گلیسین ۰/۵ مولار جمع‌آوری و به هود استریل بیولوژیکی منتقل و با عبور از فیلتر ۰/۲۲ میکرون سارتریوس، در شیشه‌های استریل به حجم ۵ میلی‌لیتر تقسیم شد. جهت انجام ارزیابی‌های لازم، درب ویال‌ها بسته شد(Sealed) و در یخچال ۴°C نگهداری گردید.

ارزیابی آزمایشگاهی:

محصول به دست آمده از نظر میزان پروتئین، آلبومین، pH و کنداکتیویته و PKA بررسی و مقدار IgG آن نیز جهت بررسی بازدهی محصول نسبت به پلاسمای اولیه، با استفاده از نفلومتری سنجش و محاسبه شد.

برای تعیین میزان خلوص IVIG تهیه شده، الکتروفورز سلولز استات بر روی محصول نهایی انجام گرفت. هم چنین یک نمونه تجاری IVIG (ایمونوگلوبولین تزریق وریدی ۵ گرم درصد از شرکت کدریون) به عنوان کنترل الکتروفورز شد. نتایج مربوط به الکتروفورز سلولز استات در محصولات نهایی و نیز نمونه کنترل، نشان‌دهنده خلوص ۱۰۰ درصد IgG بود.

پس از تهیه محصولات نهایی برای تعیین میزان مونومر و دایمر موجود در فرآورده و نیز برای مشخص نمودن میزان پلی‌مر و تجمعات ناخواسته ایجاد شده در فرآیند و

Archive of SID
www.SID.ir

به ویژه با انجام ویروس‌زدایی به روش پاستوریزاسیون، آزمایش کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا(HPLC) بر روی محصولات نهایی انجام گرفت.

فرآورده‌های نهایی تهیه شده در فرمولاسیون مایع در غلظت ۰/۲۵ mg/ml و ۲/۵ mg/ml به ترتیب برای بررسی ساختار دوم و سوم توسط طیف سنجی دو رنگ نمایی دورانی در بافر PBS تهیه شدند. برای بررسی ساختار دوم و سوم به ترتیب طول موج‌های ۳۰۰–۲۵۰ nm و ۲۵۰–۱۸۵ nm با فاصله طول موج ۰/۵ انتخاب گردید. طیف‌ها برای بررسی ساختاری در آنالیزهای بعدی ذخیره شدند(۷).

روش‌های سنجش:

اندازه‌گیری پروتئین و آلبومین به ترتیب با روش بیوره و برومکرزول گرین با استفاده از دستگاه اتوآنالیزر اتوماتیک هیتاچی ۹۰۲ انجام شد.

اندازه‌گیری ایمونوگلوبولین G با استفاده از کیت نفلومتر مینی‌نف IgG انسانی(بیرمنگهام ـ انگلستان) و با دستگاه نفلومتر مینی‌نف تعیین گردید.

الکتروفورز سلولز استات با استفاده از دستگاه Helena Pc.24 (فرانسه) و Helena Junior 24 Scaner و بر روی ورقه‌های سلولز استات TITAN III ۶۰ × ۷۶ mm انجام گرفت.

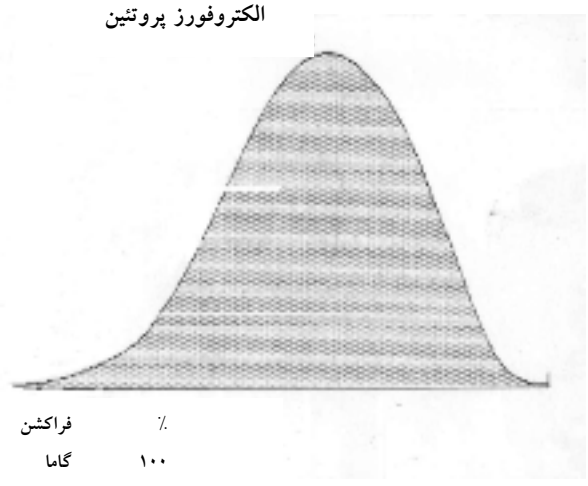
طیف سنجی دو رنگ نمایی دورانی(Spectroscopy dichroism Circular) در طول موج‌های ۳۰۰–۲۵۰ nm و ۲۵۰–۱۸۵ nm و با استفاده از دستگاه Jasco J-810 ، ساختار دوم و سوم محصول نهایی تعیین گردید. برای انجام مقایسه، نمونه تجاری ایمونوگلوبولین داخل وریدی از شرکت کدریون نیز هم زمان تعیین ساختار گردید.

الکتروفورز SDS-PAGE بدون حضور مواد احیاکننده با استفاده از ژل متراکم کننده ۳٪ و ژل جداکننده ۷/۵٪ توسط دستگاه فارماسیا متصل به سیستم سرمایش انجام گرفت.

توزیع وزن مولکولی(HPLC) با استفاده از ستون ژل کروماتوگرافی TSK G3000 SWXL انجام شد. پروتئین‌ها در بافر سدیم فسفات با pH ۶/۸ آماده‌سازی و در حجم نمونه ۵ µL با غلظت پروتئینی کمتر از ۵ گرم درصد تزریق و با سرعت ۰/۵ ml/min از ستون مذکور عبور داده شد. جذب نوری پروتئین در حین عبور از ستون، در ۲۸۰ نانومتر ثبت گردید.

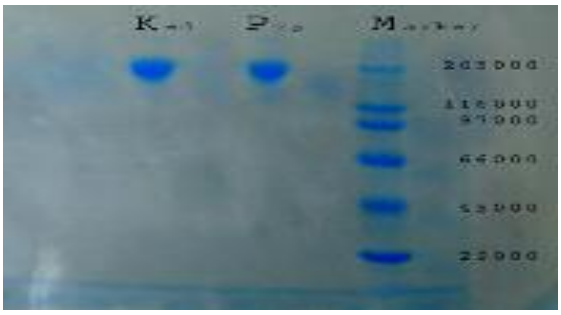
یافته ها

در آنالیز محصول نهایی میزان پروتئین و آلبومین به ترتیب ۲/۵ و ۰/۰۵ گرم درصد، pH و کنداکتیویته ۵/۴ و (mS/Cm) ۱/۲ ارزیابی شد. هم چنین میزان فعال کننده پری‌کالیکرین(PKA) در محصول نهایی با غلظت پروتئینی ۲/۵ گرم درصد IU/ml ۳/۵ تعیین گردید که طبق دستورالعمل فارماکوپه اروپایی میزان PKA کمتر از IU/ml ۳۵ برای فرآورده تزریقی قابل قبول می‌باشد. مقدار IgG موجود در محصول نهایی نیز با روش نفلومتری ۲/۵ گرم درصد تعیین گردید. الکتروفورز سلولز استات انجام گرفته جهت بررسی خلوص فرآورده، حاکی از پیک ۱۰۰٪ گاماگلوبولین می‌باشد(شکل ۱). در حالی که میزان پلی‌مر کمتر از ۵ درصد برای فرآورده تزریقی ایمونوگلوبولین قابل قبول می‌باشد، HPLC انجام شده میزان مونومر ـ دایمر را ۹۹/۱٪ و پلی‌مر را ۰/۹٪ نشان داد. باند IgG در محصول نهایی و نیز در نمونه تجاری کدریون در الکتروفورز SDS-PAGE ، در شکل ۲ نشان داده شده است. بازده محصول ۴/۶ گرم به ازای هر لیتر پلاسما محاسبه شد که نسبت به IgG پلاسمای اولیه، محصول ۳۹/۱ درصد را نشان می‌داد.



شکل ۱: الکتروفورز سلولز استات در محصول نهایی با پیک ۱۰۰٪ گاماگلوبولین

www.SID.ir
Archive of SID



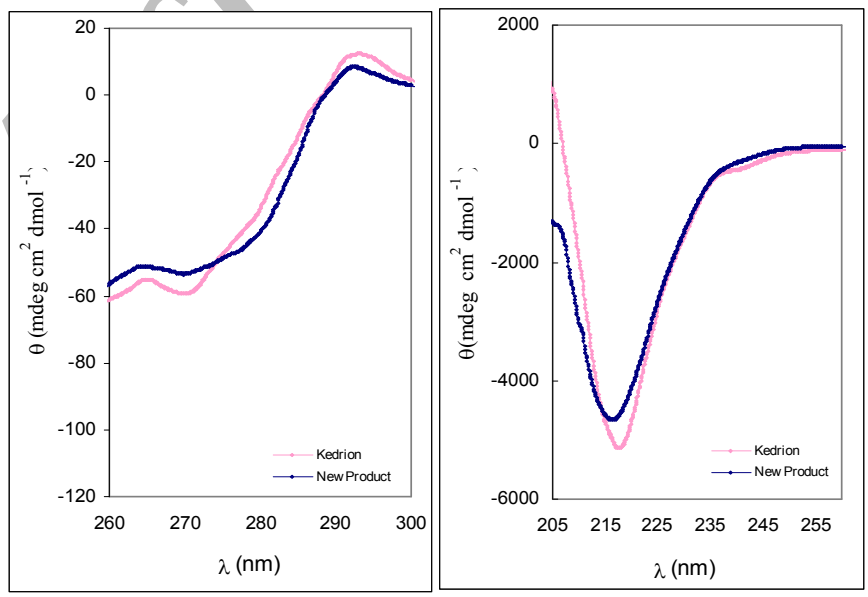
شکل ۲: الکتروفورز SDS-PAGE در محصول نهایی و نمونه کدریون با روش رنگ‌آمیزی کوماسی بلو

بررسی ساختاری توسط دستگاه طیف سنجی دو رنگ نمایی دورانی(CD) نشانگر وجود درصد بسیار زیادی از صفحات بتا در ساختار ثانویه محصول نهایی به دست آمده است. در بررسی ساختار دوم میزان صفحات بتا در محصول ۷۷٪ ارزیابی شد که در مقایسه با نمونه کنترل(ایمونوگلوبولین تزریق وریدی ۵ گرم درصد از شرکت کدریون) با میزان ۷۸٪ صفحات بتا، نتایج قابل قبول بود. ساختار سوم محصول نهایی در مقایسه با نمونه تجاری ایمونوگلوبولین داخل وریدی نتایج مشابهی را نشان می‌داد. نتایج مربوط به ساختار دوم و ساختار سوم در شکل ۳ آورده شده است.

بحث

با گذشت بیش از ۶۰ سال از پیدایش صنعت پلاسما در جهان هنوز هم انگیزه‌های متعددی برای اعمال تغییرات در روش‌های تولیدی مشتقات پلاسمایی وجود دارد که مهم‌ترین آن‌ها افزایش بازدهی، کاهش هزینه تولید و بالا بردن ایمنی محصول می‌باشد. در سال ۲۰۰۰، Tanaka و همکارانش ایمونوگلوبولین تزریق وریدی را از خمیر II+III کوهن با روش کروماتوگرافی تولید کردند. در این روش ابتدا کروماتوگرافی تعویض یونی آنیونی و سپس کاتیونی و در نهایت فیلتراسیون ژل استفاده گردید(۸). لبینگ و همکارانش نیز کاپریلات را در پروسه تخلیص همراه با کروماتوگرافی استفاده نمودند(۴). این روش‌ها با داشتن مزایا به علت هزینه بالا در مقیاس تولیدی مقرون به صرفه به نظر نمی‌رسید. در سال ۲۰۰۱، سیستی و همکارانش از خمیر فراکشن II طی مراحل متعدد فیلتراسیون و نیز دیا/اولترافیلتراسیون فرآورده IVIG را در دو فرمولاسیون مایع و لیوفیلیزه تهیه نمودند(۹).

در این روش برای برداشت مولکول‌های آسیب دیده در طی فرآیند، از پپسین استفاده گردید. بر اساس مطالعات انجام گرفته و با توجه به تجربیات نویسندگان



b **a**

شکل ۳: ساختار دوم(a) و سوم(b) محصول نهایی توسط دستگاه طیف سنجی دو رنگ نمایی دورانی در مقایسه با نمونه تجاری کدریون

Archive of SID
www.SID.ir

ایـن پـژوهش در زمینـه تولیـد IVIG و تحقیـق و بررسـی کیفیت محصول ایمونوگلوبولین در شرایط پاستوریزه شـدن و نیز مطالعات پایداری، تولید یک محصول با حفظ ساختار طبیعی و ایمنی بالا در عین حال با کوتاه‌ترین مسیر تولیدی مـی‌توانسـت بـه عنـوان یـک نقطـه عطـف در تهیـه ایمونوگلوبولین با قابلیت تزریق وریدی مطرح گـردد(۱۰). بنابراین از خمیر فراکشنII تولید شده در فرآیند پالایش به عنوان ماده اولیه استفاده و محصول نهـایی بـه شـکل مـایع تهیه گردید و در ضمن کم کردن مراحل تولیـد در مقایسـه با دیگر روش‌های رایج در دنیا، پاستوریزه کردن محلول در کمترین غلظت نمکی ممکن و غلظت بـسیار کـم پـروتئین انجام گرفـت(۹). پاستوریزاسـیون ایمونوگلوبـولین تزریـق وریدی در سال ۱۹۹۶، توسط برایدونوک و همکارانش نیـز بدون استفاده از پایدار کننده و با حفـظ شـرایط خـاص در pH اسـیدی در کمتـرین قـدرت یـونی انجـام گرفتـه بـود. مطالعات آن‌ها نشان داد که کنداکتیویته پایین مـانع تـشکیل تجمعـــات و دناتوراســـیون مولکـــول IgG در حـــین پاستوریزاسیون می‌شود و استفاده از pH اسـیدی تجمعـات باقیمانده را به مونومر، دایمر تبدیل می‌کند(۱۱).

حرارت دادن نه تنها باعث غیر فعال‌سـازی ویـروس‌هـا مـی‌شـود، بلکـه مـی‌توانـد بـه واسـطه اثـر تخریبـی بـر پـروتئین‌هـا(Denaturation) باعـث کـاهش پـروتئین‌هـای ناخواسته نظیر پری‌کالیکرین، پلاسمین، پلاسمینوژن و IgA شود که به طور طبیعی در خمیر فراکشن II کـوهن(Cohn) حضور دارند، در حالی که پایـداری غیـر معمـول مولکـول IgG در قدرت یونی پایین و در pH اسیدی مانع از تخریب مولکـول ایمونوگلوبـولین حتـی در دمـای پاستوریزاسـیون می‌شود(۱۱).

حـل خمیـر فراکـشنII در شـرایط مـذکور بـه منظـور جلوگیری از دناتوره شدن پـروتئین و بـه حـداقل رسـاندن فعالیت آنزیم‌های پروتئاز احتمالی صورت گرفت. بـا حـل خمیـر در pH نزدیـک بـه pH ایزوالکتریـک IgG(۶/۵)، بسیاری از ناخالصی‌ها و یا تجمعات ناشی از فریـز و ذوب شدن به صورت نامحلول باقی می‌ماننـد. بـا فیلتراسـیون در این مرحله ناخالصی‌ها، تجمعات، ایمونوگلوبولین‌های تغییر یافته، کمک فیلتر باقیمانده از مراحل فرآیند پالایش پلاسـما و یا باقیمانده حل نشده خمیر، فیلتـر و حـذف مـی‌شـوند. دیا/اولترافیلتراسیون یـک روش خـشن و آسـیب‌رسـان بـه مولکـول IgG اسـت، بنـابراین پارامترهـای بـسیاری نظیـر غلظت پروتئین، pH، دما، میزان و نوع پایدار کننده، شـدت جریـــان محلـــول در حـــال چـــرخش و مـــدت زمـــان دیـــا/اولترافیلتراســـیون بایـــد در نظـــر گرفتـــه شـــود. دیا/اولترافیلتراسیون انتهایی به منظور خـارج سـاختن مـواد افزوده شده و برداشت آلودگی‌های با وزن مولکـولی پـایین و نیز تغلیظ غلظت پروتئین برای رسیدن به محصول نهایی انجام گرفت. حصول IgG به میزان ۴/۶ گـرم بـه ازای هـر لیتر پلاسما، بازده خوبی را نسبت بـه روش کروماتوگرافی استفاده شده توسط تاناکا و همکارانش به میزان ۴/۳ گرم به ازای هر لیتر پلاسما نشان مـی‌داد. نتـایج HPLC بـه عنـوان یکی از مهم‌ترین نتایج، نشان‌دهنده پلی‌مر کمتر از ۱ درصد در محصول نهایی بود و آنالیز طیف‌های ساختاری محصول به دست آمده نشان می‌داد که محصول ساختار طبیعی خود را حفظ کرده است.

نتیجه‌گیری

یکی از مـشکلات تهیـه فـرآورده ایمونوگلوبـولین ایـن است که مراحـل اضـافه شـده بـرای تخلـیص بـالاتر و یـا غیرفعال‌سازی بیشتر ویروسی جهت ایمنی بالاتر محـصول، می‌تواند باعث کاهش بازده و افزایش هزینـه‌هـای سـاخت شود. در روش ذکر شده با کاهش مراحل ساخت، محصول ایمونوگلوبولین با میزان تجمعات بسیار کم و در عین حـال ساختار پروتئینی دست نخورده و طبیعی تهیه شـده اسـت. این روش پتانسیل‌های لازم برای هر دو مقوله تولید مقرون به صرفه با حفظ کیفیت و نیز ایمنـی مـصرف را دارد و بـا انجام آزمایش‌های تکمیلی، امکان بـه اجـرا درآوردن آن در مقیاس صنعتی فراهم می‌شود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از همکارانی که در این تحقیـق مـا را یـاری نمودند کمال سپاسـگزاری را داریـم. بودجـه ایـن تحقیـق توسط مرکز تحقیقـات سـازمان انتقـال خـون ایـران تـامین گردیده است.

Archive of SID
www.SID.ir

References :

1- Lemieux R, Bazin R, Neron S. Therapeutic intravenous immunoglobulins. Mol Immunol 2005;42(7):839-48.
2- Pendergrast JM, Sher GD, Callum JL. Changes in intravenous immunoglobulin prescribing patterns during a period of severe product shortages, 1995-2000. Vox Sang 2005; 89(3):150-60.
3- Li G, Stewart R, Conlan B, Gilbert A, Roeth P, Nair H. Purification of human immunoglobulin G: a new approach to plasma fractionation. Vox Sang 2002; 83(4):332-338.
4- Lebing W, Remington KM, Schreiner C, Paul HI. Properties of a new intravenous immunoglobulin (IGIV-C, 10%) produced by virus inactivation with caprylate and column chromatography. Vox Sang 2003;84(3):193-201.
5- Parkkinen J, Rahola A, von Bonsdorff L, Tolo H, Torma E. A modified caprylic acid method for manufacturing immunoglobulin G from human plasma with high yield and efficient virus clearance. Vox Sang 2006; 90(2):97-104.
6- Aghaie A, Pourfathollah AA, Bathaie SZ, Moazzeni SM, Khorsand Mohamad Pour H, Rezvan H, *et al.* Preparation of the intermediate product suitable for production of IVIg. Blood (Khoon) 2006;3: 101-10.
7- Kelly SM, Price NC. The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. Current protein and peptide science 2000;1: 349-84.
8- Tanaka K, Sawatani E, Dias GA, Shigueoka EM, Campos TC, Nakao HC, *et al*. High quality human immunoglobulin G purified from Cohn fractions by liquid chromatography. Braz J Med Biol Res 2000; 33(1):27-30.
9- Sisti AM, Vitali MS, Manfredi MJ, Zarzur JA. Preparation of lyophilized and liquid intravenous immunoglobulin G: development and scale-up. Vox Sang 2001;80(4):216-22.
10- Aghaie A, Pourfathollah AA, Bathaie SZ, Moazzeni SM, Khorsand Mohamad Pour H, Banazadeh S. Structural study on immunoglobulin G solution after pasteurization with and without stabilizer. Transfusion Medicine 2008; 18: 62-70.
11- Bridonneau P, Marcilly H, Vernois-Martin M, Goigoux P, Bourdel V, Laulan A, *et al*. Liquid pasteurization of an immunoglobulin preparation without stabilizer: effects on its biological and biochemical properties. Vox Sang 1996;70(4):203-20.

Archive of SID

www.SID.ir

Purification of intravenous immunoglobulin (IVIG) from fraction II paste

Aghaie A.[1,2](PhD), Pourfathollah A.A.[1,3](PhD), Bathaie S.Z.[3](PhD), Moazzeni S.M.[3](PhD), Khorsand Mohammad Pour H.[2](MS)

[1]*Iranian Blood Transfusion Organization -Research Center, Tehran, Iran*
[2]*Iranian Blood Research and Fractionation Company, Tehran, Iran*
[3]*Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran*

Abstract

Background and Objectives

Intravenous immunoglobulin (IVIG) preparations are used in several disorders including primary and secondary immunodeficiencies, autoimmune and systemic inflammatory diseases; it is also applied in effective therapy of infectious diseases. IVIG is currently the most widely used plasma component in the world. The addition of multiple steps to the manufacturing process of IVIG lowers the yield of IgG and raises the manufacturing costs. Therefore, manufacturers attempt to employ a cost effective method with respect to safety and quality of the product. In this study we proposed a method which not only reduced the manufacturing steps but also raised product safety by the treatment of pasteurization as a virus inactivation method.

Materials and Methods

For this experimental study, the fraction II paste (rich in IgG) was obtained from fresh frozen plasma (FFP) by the modified cold ethanol fractionation method (Cohn's method). For further purification, filtration was used to remove impurities. Before performing virus inactivation by pasteurization, protein solution was diafiltered and then the stabilizer was added. Pasteurized solution was diafiltered again and final product was prepared after sterile filtration.

Results

The quality control results of the finished product obtained by the proposed method revealed that the purity was 100% (determined by cellulose acetate electrophoresis) and the polymer amount was less than 1% (evaluated by HPLC chromatography). The secondary and tertiary structures of IgG molecule were also examined by circular dichroism spectroscopy technique and were then compared to the commercial IVIG products bringing about approximately similar and satisfactory results. The yield calculated for the initial amount of IgG of plasma was 39.1% as measured by nephelometery.

Conclusions

The high purity of the finished product confirmed that the proposed purification process was satisfactory in despite of fewer steps when compared to the current methods. Indeed, the cost-effective preparation together with quatily and safety are taken into account in the proposed method. If the complementary experiments are carried out, the proposed method can escalate at the industry scale.

Key words: Plasma, Purification, Intravenous immunoglobulin, Cohn fraction II
SJIBTO 2008; 5(2): 81-88

Received: 26 Feb 2008
Accepted: 26 Aug 2008

Correspondence: Aghaie A., PhD of Immunology. IBTO-Research Center.
P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran, Tel: (+9821)88601599 Fax:(+9821) 88601599
E-mail: *Aghaie_a@yahoo.com*

Archive of SID
www.SID.ir