

## บทความพิเศษ

# การทำ Viral inactivation และ viral removal ในผลิตภัณฑ์จากพลาสมา

ศิริวรรณ ปิ่นนพมณี

ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย

ผลิตภัณฑ์จากพลาสมา (plasma derivatives หรือ plasma products) เริ่มถือกำเนิดขึ้นในปี ค.ศ. 1940 โดย Dr. Edwin J. Cohn แห่งมหาวิทยาลัยฮาร์วาร์ด ซึ่งเป็นผู้พัฒนากระบวนการแยกโปรตีนจากพลาสมาของมนุษย์ที่เรียกว่า Cohn fractionation process เพื่อต้องการแยกอัลบูมินซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักประมาณ ร้อยละ 55 ของโปรตีนทั้งหมดในพลาสมา สำหรับใช้รักษาอาการ shock และ burns แก่ทหารในสมัยสงครามโลกครั้งที่สอง หลังจากนั้น ได้มีผลิตภัณฑ์จากพลาสมาชนิดอื่นๆ ตามมา เช่น intramuscular immunoglobulin (IMIG) ในปี ค.ศ. 1950 purified factor VIII และ factor IX ในปี ค.ศ. 1960 และ intravenous immunoglobulin (IVIG) ในปี ค.ศ. 1980 เป็นต้น<sup>1-3</sup>

ทั้งนี้เนื่องจากพบว่า เชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรค (infectious virus) สามารถปนเปื้อนมาในโลหิตและพลาสมาที่ได้รับบริจาคจากมนุษย์ได้<sup>4,5</sup> โดยเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคที่พบสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่คือ enveloped virus เชื้อไวรัสกลุ่มนี้จะมีเปลือกชั้นนอกหุ้มล้อมรอบ nucleocapsid อีกชั้นหนึ่ง ซึ่งเปลือกชั้นนอกอาจเป็นโปรตีนหรือชั้นไขมันก็ได้ เช่น hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV) และ human immunodeficiency virus (HIV) อีกกลุ่มคือ non-enveloped virus เชื้อไวรัสกลุ่มนี้จะไม่มีการหุ้มล้อมรอบมีเฉพาะ nucleocapsid เท่านั้น ซึ่งเชื้อไวรัสกลุ่มนี้จะมี ความทนทานต่อสภาพแวดล้อมสูง เช่น hepatitis E virus (HEV), hepatitis A virus (HAV) และ parvovirus B19 เป็นต้น โดยองค์การอนามัยโลกระบุว่าในพลาสมาที่ได้รับบริจาคจากมนุษย์ถ้าไม่มีการตรวจคัดกรองผู้บริจาคก่อนการรับบริจาคโลหิตหรือก่อนการรับบริจาคพลาสมา สามารถมีเชื้อไวรัสปนเปื้อนได้<sup>4</sup> (Table 1)

**Table 1** Viruses in plasma from unsorted donor blood

Virus	Prevalence in donor blood	Viral titre (GE/mL)	Calculated titre in plasma pool (GE/mL)*
Hepatitis B virus	1/10,000	$10^3 - 10^8$	$0 - 10^4$
Hepatitis C virus	1/50 - 1/100	$10^4 - 10^6$	$10^2 - 10^4$
Human immunodeficiency virus	1/1,000 - 1/10,000	$10^3 - 10^7$	$0 - 10^4$
Hepatitis A virus	1/500,000	$10^3 - 10^5$	$0 - 10^1$
Parvovirus B19	1/1,000 - 1/7,000	$10^2 - 10^{12}$	$0 - 10^9$

Assumes the pooling of 10,000 units

ดังนั้นผลิตภัณฑ์จากพลาสมาที่ผลิตจากพลาสมาของมนุษย์จะมีความปลอดภัยต่อเชื้อไวรัสได้ต้องประกอบด้วย การคัดเลือกผู้บริจาคโลหิตหรือผู้บริจาคพลาสมา (donor selection) ที่มีคุณภาพเพื่อลดความเสี่ยงในการที่จะได้รับโลหิตหรือพลาสมาที่มีเชื้อไวรัสปนเปื้อน การตรวจสอบโลหิตหรือพลาสมาที่รับบริจาครวมถึงการตรวจสอบพลาสมาในขั้นตอนเริ่มต้นของกระบวนการผลิตด้วยวิธีการทางห้องปฏิบัติการ (testing of donations and plasma pools) ที่เป็นไปตามมาตรฐานสากล เช่น วิธี nucleic acid amplification technology (NAT) เป็นต้น<sup>4</sup> และวิธีการยับยั้งการทำงานของเชื้อไวรัส (viral inactivation) หรือวิธีการกำจัดเชื้อไวรัส (viral removal) ในกระบวนการผลิต

จากข้อมูลในอดีตพบว่า มีรายงานการติดเชื้อ HBV, HCV และ HIV ในผู้ป่วยที่ได้รับบริการด้วยผลิตภัณฑ์จากพลาสมา<sup>5</sup> ส่งผลให้บริษัทผู้ผลิตผลิตภัณฑ์จากพลาสมาทำการศึกษาเพื่อพัฒนาเรื่อง viral inactivation หรือเรื่อง viral removal ในกระบวนการผลิต เพื่อให้ผลิตภัณฑ์มีความปลอดภัยเพิ่มขึ้น

การทำ viral inactivation หรือ viral removal ในกระบวนการผลิตสามารถทำได้หลายวิธี โดยกระบวนการผลิตที่ดีควรจะประกอบด้วยการทำ viral inactivation ร่วมกับการทำ viral removal ซึ่งการทำให้มีประสิทธิภาพจะต้องสามารถกำจัดหรือยับยั้งการทำงานของเชื้อไวรัสได้มากกว่าหรือเท่ากับ  $4 \log_{10}$  ขึ้นไปของปริมาณเชื้อไวรัสเริ่มต้นโดย  $1 \log_{10}$  จะเท่ากับประสิทธิภาพในการกำจัดจำนวนเชื้อไวรัสได้ร้อยละ 90 ของปริมาณเชื้อไวรัสเริ่มต้น หรือลดลงประมาณ 10 เท่า ดังนั้นการกำจัดหรือยับยั้งการทำงานของเชื้อไวรัสได้มากกว่าหรือเท่ากับ  $4 \log_{10}$  ขึ้นไป จะเท่ากับประสิทธิภาพในการกำจัดจำนวนเชื้อไวรัสได้มากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 99.99 ของปริมาณเชื้อไวรัสเริ่มต้น หรือลดลงมากกว่าหรือเท่ากับ 10,000 เท่า<sup>4,6,7</sup>

## การทำ Viral inactivation และ viral removal ในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์จากพลาสมา

การทำ viral inactivation ในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์จากพลาสมาซึ่งเป็นที่นิยมได้แก่ physical methods และ chemical methods ส่วนการทำ viral removal ในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์จากพลาสมาซึ่งเป็นที่นิยมได้แก่ precipitation, chromatography และ filtration<sup>4,6</sup>

**Viral inactivation** (การยับยั้งการทำงานของเชื้อไวรัส) ประกอบด้วย

**1. Physical method** วิธีการที่นิยมคือการใช้ความร้อนในการ inactivate เชื้อไวรัส โดยความร้อนจะทำให้ชิ้นส่วนของเชื้อไวรัสถูกแยกออกเป็นโปรตีนเดี่ยวหรือยูนิตน้อยขนาดเล็กลงที่ไม่ติดเชื้อ หรือยับยั้งการแบ่งตัวของเชื้อไวรัส หรือทำให้โครงสร้างของเชื้อไวรัสเสียหายไป วิธีการใช้ความร้อนสามารถใช้ได้ในกรณีที่โปรตีนที่ต้องการในผลิตภัณฑ์มีความคงทนต่อความร้อนสูงกว่าเชื้อไวรัส ซึ่งโดยทั่วไปในผลิตภัณฑ์จะมีการเติม stabilizers เพื่อเพิ่มความคงตัวให้แก่โปรตีนที่ต้องการในผลิตภัณฑ์<sup>7,8</sup> การใช้ความร้อนในการ inactivate เชื้อไวรัสสามารถแบ่งตามลักษณะของความร้อนที่ใช้ได้แก่ pasteurization, dry heat treatment และ steam heat treatment or vapour heat treatment<sup>4,6,7</sup>

**1.1 Pasteurization** เป็นการให้ความร้อนกับผลิตภัณฑ์ด้วยของเหลวที่อุณหภูมิ 60 ± 0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-11 ชั่วโมงอย่างต่อเนื่อง วิธีนี้มีประสิทธิภาพในการ inactivate เชื้อไวรัสชนิด enveloped virus และยังสามารถ inactivate เชื้อไวรัสชนิด non-enveloped virus ได้บางชนิด รวมถึงเชื้อ HIV, HBV และ HCV เป็นต้น<sup>4,6</sup> ประสิทธิภาพของการ inactivate เชื้อไวรัสด้วยวิธี pasteurization นี้มีความสัมพันธ์กับส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์และความเข้มข้นของ stabilizers ที่ใช้ เนื่องจาก stabilizers นอกจากจะมีคุณสมบัติในการช่วยเพิ่มความคงตัวให้กับโปรตีนที่ต้องการแล้ว แต่ก็มีคุณสมบัติในการช่วยปกป้องเชื้อไวรัสโดยเฉพาะเชื้อไวรัสชนิด non-enveloped virus ได้ด้วย ดังนั้นการพิจารณาเลือกความเข้มข้นของ stabilizers จึงเป็นสิ่งสำคัญ ควรพิจารณาเลือกความเข้มข้นของ stabilizers ที่สามารถรักษา biological activity ของโมเลกุลโปรตีนที่ต้องการให้ได้มากที่สุด ขณะเดียวกันก็สามารถ inactivate เชื้อไวรัสได้มากที่สุดด้วยเช่นกัน นอกจากนี้อีกสิ่งหนึ่งที่ต้องคำนึงถึงคือ ถึงพาสเจอร์ไรส์ โดยทุกส่วนของถึงพาสเจอร์ไรส์จะต้องได้รับความร้อนอย่างทั่วถึงและเท่าเทียมกัน เพื่อให้อุณหภูมิของผลิตภัณฑ์ขณะทำการ pasteurize คงที่<sup>9</sup> ในประเทศสหรัฐอเมริกาได้มีการแนะนำให้ใช้กระบวนการ pasteurization ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็น

ระยะเวลา 10 ชั่วโมงในผลิตภัณฑ์ albumin ตั้งแต่เดือนมิถุนายน ปี ค.ศ. 1945 ทั้งนี้มีรายงานการศึกษาพบว่า กระบวนการผลิต albumin โดยใช้กระบวนการตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์เข้ารวมกับการ pasteurization สามารถ inactivate เชื้อไวรัสตับอักเสบบีได้อย่างมีประสิทธิภาพ<sup>10</sup> และยังพบว่าหลังการทำ pasteurization 6 ชั่วโมง ไม่สามารถตรวจพบการติดเชื้อของเชื้อไวรัสชนิด enveloped virus ได้<sup>11</sup> นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาในผลิตภัณฑ์ coagulation factor concentrates ของบริษัท ZLB Behring พบว่าการทำ pasteurization ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 ชั่วโมง สามารถ inactivate เชื้อ emerging viruses เช่น west Nile virus (WNV), SARS coronavirus, avian influenza viruses และ HEV ได้อย่างมีประสิทธิภาพ<sup>12</sup>

**1.2 Dry heat treatment** เป็นการให้ความร้อนแห้งกับผลิตภัณฑ์ชนิดแห้ง (lyophilized products) ที่บรรจุในภาชนะบรรจุสุดท้าย ทั้งนี้ความสามารถในการ inactivate เชื้อไวรัสด้วยวิธี dry heat treatment มีความสัมพันธ์กับความชื้นที่เหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์ โดยเชื้อไวรัสจะมีความคงทนต่อความร้อนเพิ่มสูงขึ้นในผลิตภัณฑ์ชนิดแห้ง พบว่าในผลิตภัณฑ์ชนิดแห้งที่มีความชื้นเหลืออยู่ 0.3 เปอร์เซ็นต์ การทำ dry heat treatment จะมีประสิทธิภาพในการ inactivate เชื้อไวรัสส่วนใหญ่ได้<sup>4,5,9</sup> ในระยะแรกของการ inactivate เชื้อไวรัสด้วยการทำ dry heat treatment เป็นการให้ความร้อนแก่ผลิตภัณฑ์ชนิดแห้งที่อุณหภูมิ 60-68 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24-72 ชั่วโมงอย่างต่อเนื่อง พบว่าอุณหภูมิในช่วงนี้สามารถ inactivate เชื้อ HIV แต่ไม่เพียงพอที่จะ inactivate เชื้อ HBV และ HCV จึงได้มีการพัฒนาโดยการให้ความร้อนแก่ผลิตภัณฑ์ชนิดแห้งเพิ่มขึ้นเป็น 80 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมงอย่างต่อเนื่อง พบว่าสามารถ inactivate เชื้อไวรัสทั้งชนิด enveloped viruses และ non-enveloped viruses เช่น HBV, HCV, HIV และ HAV ได้อย่างมีนัยสำคัญ<sup>5,7,10</sup> ปัจจุบันได้มีการพัฒนาโดยการให้ความร้อนแก่ผลิตภัณฑ์ชนิดแห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที เช่น ในผลิตภัณฑ์ antihemophilic factor VIII เข้มข้นชนิดแห้ง มีการ inactivate เชื้อไวรัสด้วยการให้ความร้อนแก่ผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที ร่วมกับการทำ solvent/detergent treatment พบว่า activity ของ factor VIII ลดลงประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะทางกายภาพและทางชีวเคมีที่สำคัญของ factor VIII หลังการทำ dry heat treatment เมื่อเปรียบเทียบกับก่อนการทำ dry heat treatment และผลิตภัณฑ์ factor VIII ยังมีความคงตัวนานถึง 24 เดือนเมื่อเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังพบ

ว่าการให้ความร้อนแก่ผลิตภัณฑ์ชนิดแห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส สามารถ inactivate เชื้อไวรัสได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยพบว่าเชื้อ HAV, HIV และ Encephalomyocarditis virus (EMCV) ถูก inactivate อย่างสมบูรณ์ภายในระยะเวลา 10 นาที และพบว่าสามารถ inactivate เชื้อไวรัสได้ ดังนี้ HAV ลดได้  $\geq 5.55 \log_{10}$ , EMCV ลดได้  $\geq 5.87 \log_{10}$ , HIV ลดได้  $\geq 5.15 \log_{10}$ , Bovine herpesvirus (BHV) ลดได้  $\geq 6.13 \log_{10}$ , Bovine viral diarrhea virus (BVDV) ลดได้  $\geq 4.46 \log_{10}$  จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า การทำ dry heat treatment ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที ช่วยเพิ่มความปลอดภัยต่อเชื้อไวรัสโดยไม่ทำลายประสิทธิภาพของ factor VIII และยังมีประสิทธิภาพในการ inactivate เชื้อไวรัสชนิด non-enveloped viruses โดยเฉพาะเชื้อ HAV ซึ่งทนต่อ solvent/detergent treatment ได้<sup>13</sup>

**1.3 Stream heat treatment or vapour heat treatment** เป็นการให้ความร้อนขึ้นกับผลิตภัณฑ์ชนิดแห้งในขั้น intermediate products<sup>9</sup> ด้วยการให้ความร้อนขึ้นที่อุณหภูมิ 60-80 องศาเซลเซียส ความดัน 1,190 ถึง 1,375 mbar เป็นระยะเวลา 10 ชั่วโมงอย่างต่อเนื่อง ซึ่งจะดำเนินการในระหว่างกระบวนการทำแห้งผลิตภัณฑ์ เมื่อผลิตภัณฑ์อยู่ในรูป freeze-dried intermediate bulk ผลิตภัณฑ์จะถูกลำเลียงสู่ถังสแตนเลส และมีการปล่อยความร้อนชื้นเข้าไปอย่างช้าๆ ตามปริมาณที่คำนวณไว้จนผลิตภัณฑ์มีปริมาณน้ำประมาณ 7-8 เปอร์เซ็นต์ weight by weight (% W/W) จากนั้นผลิตภัณฑ์จะถูกลำเลียงสู่กระบอกลสแตนเลสซึ่งมีการเติมไนโตรเจนแห้งเข้าไปในกระบอกลสแตนเลสเพื่อไล่ออกซิเจนออก ต่อจากนั้นกระบอกลสแตนเลสนี้จะถูกส่งไปยังตู้ทำความร้อนที่มีตัวทำความร้อน และพัดลมเพื่อช่วยในการกระจายความร้อนให้ทั่วถึง โดยกระบอกลสแตนเลสนี้จะถูกหมุนไปทุกทิศทางจนสิ้นสุดกระบวนการให้ความร้อนขึ้น จากข้อมูลทางคลินิกบ่งชี้ว่าวิธีนี้สามารถ inactivate เชื้อไวรัสชนิด enveloped viruses ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่น HIV และ hepatitis viruses<sup>4,7</sup>

**2. Chemical methods**

**2.1 Solvent/Detergent treatment (SD treatment)**

ออกฤทธิ์โดยไปทำลายไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ของ enveloped viruses ทำให้ไวรัสไม่สามารถจับกับเซลล์ของ host ได้ การใช้ SD treatment จะไม่ส่งผลต่อโปรตีนที่ต้องการในผลิตภัณฑ์ เนื่องจากสาร SD จะไม่ผลต่อไขมันและอนุพันธ์ของไขมันเท่านั้น ดังนั้นการ inactivate เชื้อไวรัสด้วยวิธีนี้จึงสามารถ inactivate เชื้อไวรัสชนิด enveloped viruses รวมถึง WNV, HIV, HBV และ HCV ได้ แต่ไม่สามารถ inactivate เชื้อไวรัสชนิด non-enveloped virus ได้<sup>4,5,7,9,14</sup> การ

inactivate เชื้อไวรัสด้วยวิธี SD treatment ถูกพัฒนาขึ้นโดย Edward Shanbrom ซึ่งได้คิดค้นการ inactivate เชื้อไวรัสตับอักเสบโดยใช้สาร detergents เช่น Triton X-100 จากนั้นในปี ค.ศ. 1986-1987 Prince & Bernhard Horowitz และคณะ ได้พัฒนาขั้นตอนการทำ SD treatment เพื่อ inactivate เชื้อไวรัสในพลาสมา โดย SD treatment ประกอบด้วยส่วนผสมของสาร solvents เช่น tri-nbutylphosphate (TNBP) และ สาร detergents เช่น Tween 80, Triton X-100 หรือ sodium cholate เป็นต้น การผสมของสาร SD กับสารละลายพลาสมา โปรตีนในอัตราส่วนที่เหมาะสมจึงจะมีผลต่อการ inactivate เชื้อไวรัส ทั้งนี้ในการศึกษาทดลองประสิทธิภาพของการทำ SD treatment ในการ inactivate เชื้อไวรัส จะต้องเลือกสภาวะที่เป็น worst case ในการศึกษาทดลอง เช่น อุณหภูมิที่ต่ำที่สุด ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสาร SD ที่ให้ใช้ และความเข้มข้นที่สูงที่สุดของผลิตภัณฑ์ เป็นต้น จากรายงานการศึกษาพบว่าการทำ SD treatment สามารถ inactivate เชื้อ HBV, HCV และ HIV ได้อย่างมีนัยสำคัญ และอัตราส่วนผสมของ 0.3 เปอร์เซ็นต์ volume by volume (% v/v) TNBP กับ 1 เปอร์เซ็นต์ volume by volume (% v/v) Triton X-100 หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที สามารถ inactivate เชื้อไวรัสชนิด enveloped viruses ในผลิตภัณฑ์ high purity factor VIII concentrate Replenate<sup>®</sup> ได้มากกว่า 4-6 log<sub>10</sub> แต่ทั้งนี้ การ inactivate เชื้อไวรัสด้วยวิธี SD treatment จำเป็นจะต้องเพิ่มขึ้นตอนในการกำจัดสาร SD ออกจากผลิตภัณฑ์ด้วย<sup>4,5,14,15</sup>

**2.2 Acid pH / Low pH** การใช้สภาวะความเป็นกรด

ในอดีตก่อนการเกิด immunoglobulin G (IgG) aggregation และ anticomplementary activity ต่อมาจึงได้มีการพัฒนาเพื่อวัตถุประสงค์ในการ inactivate เชื้อไวรัส ซึ่งการ inactivate เชื้อไวรัสในสภาวะความเป็นกรดได้นั้นขึ้นกับปัจจัยต่างๆ เช่น pH, time, temperature, pepsin content, protein content และ solute content เป็นต้น<sup>4-7</sup> โดยเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกรดเชื้อไวรัสชนิด enveloped viruses จะถูกทำให้เสียหาย แต่ทั้งนี้พบว่าโปรตีนส่วนใหญ่ก็จะถูกทำให้เสียหายด้วยเช่นกัน ยกเว้น immunoglobulin ซึ่งมีรายงานการศึกษาการใช้ pH 4-treatment ที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส บ่มเป็นระยะเวลา มากกว่า 20 ชั่วโมง ในการเตรียม immunoglobulin พบว่าสามารถ inactivate เชื้อ HIV ได้มากกว่า 5-8 log<sub>10</sub><sup>7</sup> นอกจากนี้พบว่าการใช้สภาวะความเป็นกรดสามารถ inactivate เชื้อไวรัสชนิด enveloped viruses ได้มากกว่า 4 log<sub>10</sub><sup>16</sup> และสามารถ inactivated เชื้อไวรัสชนิด non-enveloped viruses บางชนิด เช่น human parvovirus B19 V ได้<sup>9</sup>

## Viral removal (การกำจัดเชื้อไวรัส) ประกอบด้วย

### 1. Precipitation

**1.1 Cold ethanol precipitation** การตกตะกอนด้วยเอทานอลเย็นเป็นวิธีการที่ใช้ในกระบวนการทำ plasma fractionation อย่างกว้างขวาง วิธีการตกตะกอนพลาสมาโปรตีนด้วยเอทานอลเย็นอาศัยความแตกต่างในการละลายของโปรตีนแต่ละชนิดในพลาสมาที่ไม่เท่ากัน โดยควบคุมการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ อุณหภูมิ และค่าความเป็นกรด-ด่าง ทำให้โปรตีนแต่ละชนิดตกตะกอนออกมาในลำดับขั้นที่ต่างกัน<sup>2,5</sup> ทั้งนี้พบว่า การตกตะกอนด้วยเอทานอลเย็นสามารถแยกเชื้อไวรัสที่มีขนาดใหญ่ออกจากโปรตีนที่ต้องการได้บางส่วน โดยเชื้อไวรัสที่มีโครงสร้างขนาดใหญ่มีแนวโน้มที่จะตกตะกอนออกมาในลำดับแรกของกระบวนการทำ plasma fractionation และกระบวนการทำ plasma fractionation เป็นการแยกระหว่างส่วนของตะกอนโปรตีนและส่วนของของเหลว ทำให้เชื้อไวรัสที่ถูกแยกออกไปอยู่ในส่วนของตะกอนโปรตีนหรือส่วนของของเหลว เมื่อมีการนำเฉพาะส่วนของตะกอนโปรตีนหรือส่วนของของเหลวมาใช้ในการผลิตขั้นต่อไปจึงทำให้เชื้อไวรัสถูกลดจำนวนลง แต่อย่างไรก็ดีถ้าหากอีกส่วนหนึ่งไปใช้งานก็จะมีเชื้อไวรัสอยู่ในส่วนนั้นเช่นกัน มีรายงานการศึกษาพบว่า การตกตะกอน fraction III จากตะกอน fraction II+III เพื่อให้ได้ตะกอนโปรตีนสำหรับนำไปผลิต immunoglobulin สามารถลดเชื้อไวรัสชนิด enveloped viruses และเชื้อไวรัสชนิด non-enveloped viruses ได้อย่างน้อย  $3 \log_{10}$  หรือการตกตะกอน fraction IV ซึ่งมีความเข้มข้นของแอลกอฮอล์เป็น 40 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสามารถ inactivate เชื้อ HIV ได้อย่างสมบูรณ์ และสามารถ inactivate เชื้อไวรัสชนิด enveloped viruses ได้หลายชนิดอย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่สามารถกำจัดเชื้อไวรัสชนิด non-enveloped viruses ได้อย่างมีนัยสำคัญ<sup>5</sup> ทั้งนี้ได้มีการเก็บข้อมูลจากโรงงานผลิตผลิตภัณฑ์จากพลาสมาหลายแห่ง ถึงความปลอดภัยจากเชื้อไวรัสของผลิตภัณฑ์ immunoglobulin และ albumin ที่ใช้วิธีการกำจัดเชื้อไวรัสด้วยการตกตะกอนด้วยเอทานอลเย็นพบว่า สามารถกำจัดเชื้อไวรัสได้หลายชนิด<sup>17</sup> โดยโรงงานหลายแห่งใช้วิธีการแยกส่วนของตะกอนโปรตีนและส่วนของของเหลวออกจากกันด้วยการปั่นแยก (centrifugation) ดังนั้นจึงได้มีการเสนอวิธีการในการแยกส่วนของตะกอนโปรตีนและส่วนของของเหลวออกจากกันด้วยการกรองขึ้น เพราะในการกรองจะมีการเติมสารช่วยกรอง (filter aids) เพื่อป้องกันการอุดตันของตัวกรอง นอกจากนี้สารช่วยกรองนี้ยังมีคุณสมบัติในการช่วยดูดซับเชื้อไวรัสไว้ด้วย ซึ่งเป็นการช่วยกำจัดเชื้อไวรัสออกจากส่วนของของเหลวได้อีกทางหนึ่ง แต่อย่างไรก็ดีไม่แนะนำให้ใช้วิธีการตกตะกอนด้วยเอทานอลเย็นเพื่อเป็นการ

กำจัดเชื้อไวรัสเพียงวิธีเดียวในกระบวนการผลิต เนื่องจากเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสภาวะเพียงเล็กน้อยในกระบวนการผลิตก็อาจส่งผลต่อการแยกส่วนของตะกอนโปรตีนกับส่วนของของเหลวและการแยกส่วนของเชื้อไวรัสได้ ดังนั้นควรใช้วิธีการ viral inactivation หรือ viral removal วิธีอื่นร่วมกับวิธีการตกตะกอนด้วยเอทานอลเย็น<sup>4,17</sup>

### 1.2 Polyethylene glycol (PEG) precipitation

**PEG** มีคุณสมบัติเป็นสารเฉื่อยซึ่งไม่ทำให้โปรตีนเสียสภาพและสามารถละลายน้ำได้ สารละลายที่มี PEG เป็นส่วนประกอบจะทำให้ปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับน้ำลดลง ทำให้โปรตีนตกตะกอนออกมาพร้อมกับเชื้อไวรัส เมื่อทำการแยกส่วนของตะกอนโปรตีนกับส่วนของสารละลายด้วยการปั่นแยกหรือการกรองก็เท่ากับเป็นการลดเชื้อไวรัสลงเช่นเดียวกับวิธีการตกตะกอนด้วยเอทานอลเย็นโดยทั่วไปการใช้วิธี PEG precipitation สามารถลดเชื้อไวรัสลงได้  $3-4 \log_{10}$  ซึ่งการลดเชื้อไวรัสมีความสัมพันธ์กับปริมาณของ PEG<sup>5</sup>

### 2. Chromatography

ถือเป็นขั้นตอนหนึ่งในการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ ขั้นตอน chromatography โดยทั่วไปใช้ในการกำจัดสิ่งปนเปื้อนในกระบวนการผลิต chromatography สามารถแยกโปรตีนที่ต้องการได้ โดยอาศัยความแตกต่างของลักษณะทางกายภาพเคมีของโปรตีนแต่ละชนิด การใช้ chromatography ในการทำ plasma fractionation โดยทั่วไปมี 2 แบบ คือ affinity chromatography และ ion-exchange chromatography โดย affinity chromatography อาศัย biologic ligands เช่น แอนติบอดีในการจับกับโปรตีนที่ต้องการแบบเฉพาะเจาะจง จึงใช้แยกโมเลกุลของโปรตีนที่มีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิดได้ ส่วน ion-exchange chromatography อาศัยความแตกต่างของประจุไฟฟ้าในการแยกโปรตีนที่ต้องการ ทำให้การใช้ chromatography สามารถแยกเชื้อไวรัสชนิด enveloped viruses และ non-enveloped viruses ออกจากโมเลกุลของโปรตีนที่ต้องการได้อย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามเชื้อไวรัสสามารถจับกับโมเลกุลของโปรตีนหรือเรซินได้ ดังนั้นการที่ chromatography จะสามารถกำจัดเชื้อไวรัสออกจากผลิตภัณฑ์ได้จึงขึ้นกับหลายปัจจัยได้แก่ รูปทรงทางเรขาคณิตของคอลัมน์ องค์ประกอบและอัตราการไหลของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ ขั้นตอนการล้าง intermediate องค์ประกอบของเรซิน และอายุการใช้งานของเรซิน ซึ่งปัจจัยเหล่านี้จะต้องถูกกำหนดและควบคุมอย่างเคร่งครัด นอกจากนี้เชื้อไวรัสสามารถติดแน่นกับเรซินได้ ดังนั้นการกำจัดเชื้อไวรัสออกจากเรซินรวมถึงอุปกรณ์ของ chromatography ที่ใช้ งานก็เป็นสิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึง เพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสจาก Lot การผลิตหนึ่ง ไปสู่อีก Lot การผลิตหนึ่ง ซึ่ง

เรซินที่ใช้งานส่วนใหญ่สามารถทนต่อการ inactivate เชื้อไวรัส ด้วยสารเคมีหรือวิธีทางกายภาพได้ เช่น การแช่เรซินข้ามคืนด้วย 0.1-1 N sodium hydroxide หรือ hydrochloric acid หรือสถานะการออกซิไดซ์ด้วย sodium hypochlorite หรือการใช้อุณหภูมิสูงๆ เช่น การนึ่งฆ่าเชื้อ เป็นต้น ซึ่งการเลือกวิธีการฆ่าเชื้อไวรัสนั้นขึ้นกับชนิดเรซินที่ใช้งาน<sup>4,5,9</sup>

**3. Nanofiltration** เป็นเทคนิคที่ถูกต้องออกมาเฉพาะในการกำจัดเชื้อไวรัส โดยอาศัยขนาด pore size ของตัวกรอง ซึ่ง pore size ของตัวกรองจะต้องมีขนาดเล็กกว่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเชื้อไวรัส และ pore size ของตัวกรองจะต้องมีขนาดใหญ่กว่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโมเลกุลของโปรตีนที่ต้องการ เพื่อให้โมเลกุลของโปรตีนที่ต้องการสามารถผ่านตัวกรองไปได้แต่เชื้อไวรัสจะถูกกรองไว้ อย่างไรก็ตามในผลิตภัณฑ์ที่โมเลกุลของโปรตีนที่ต้องการมีขนาดใหญ่ หรือเกิดการรวมตัวกัน (aggregates) แล้วมีขนาดใหญ่กว่าเชื้อไวรัสก็ไม่สามารถใช้วิธี nanofiltration ได้<sup>4,7</sup> เทคนิค nanofiltration จะมีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อไวรัสหรือไม่ขึ้นกับหลายปัจจัย เช่น แรงของอุทกพลศาสตร์ (hydrodynamic force) การดูดซับเชื้อไวรัสไว้บนพื้นผิวของตัวกรอง และการกำจัดเชื้อไวรัสที่ถูกจับไว้ในรูป antigen-antibody complexes หรือ lipid complexes<sup>9</sup> นอกจากนี้การใช้วิธีกำจัดเชื้อไวรัสด้วยวิธี nanofiltration ต้องมีการทดสอบความสมบูรณ์ของตัวกรอง (filter integrity test) ทั้งก่อนและหลังการใช้งานทุกครั้งตามวิธีที่บริษัทผู้ผลิตตัวกรองแนะนำ ถ้าการทดสอบความสมบูรณ์ของตัวกรองหลังการใช้งานไม่ผ่าน ผลิตภัณฑ์นั้นจะต้องผ่านขั้นตอน nanofiltration ซ้ำอีกครั้ง และตัวกรองนาโนจะใช้งานได้เพียงครั้งเดียวเท่านั้นห้ามใช้งานซ้ำ<sup>4</sup> แต่ทั้งนี้ข้อดีของการกำจัดเชื้อไวรัสด้วยวิธี nanofiltration คือ สถานะของผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องปรับความเป็นกรด-ด่าง osmolality และอุณหภูมิ เป็นผลให้คุณสมบัติทางชีวภาพของโปรตีนที่ต้องการไม่ได้รับผลกระทบอย่างมีนัยสำคัญ<sup>5</sup> และข้อดีอีกประการของวิธีการ nanofiltration คือ protein activity recovered ได้ดีถึงร้อยละ 90-95<sup>7</sup> ทั้งนี้ได้มีรายงานการศึกษา viral validations ของผลิตภัณฑ์ CRTS-Lille factor

IX และ factor XI ตาม European guidelines พบว่า ตัวกรอง BMM planova ขนาด 15 และ 35 นาโนเมตร สามารถกำจัดเชื้อไวรัสได้ 7 model viruses อย่างมีนัยสำคัญมากกว่า 5-7 log<sub>10</sub> ซึ่งไวรัส 7 model viruses นี้รวมถึง poliovirus sabin 1 และ bovine parvovirus ซึ่งเป็นไวรัสชนิด non-enveloped viruses ขนาดเล็ก<sup>18</sup> และยังมีรายงานการศึกษาพบว่าตัวกรองที่มีขนาด pore size 15 และ 35 นาโนเมตร สามารถกำจัด murine xenotropic retrovirus, Simian virus 40 (SV40) และ pseudorabies virus จากสารละลาย immunoglobulin G (IgG) และ immunoglobulin M (IgM) ได้ 6-7 log<sub>10</sub> รวมถึงเชื้อไวรัสขนาดเล็กเช่น Encephalomyocarditis virus (EMCV), HAV และ Porcine Parvovirus (PPV) สามารถถูกกำจัดด้วยวิธีการ nanofiltration ได้อย่างมีนัยสำคัญ<sup>4</sup>

จากข้อมูลการทำ viral inactivation หรือ viral removal ในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์จากพลาสมาที่กล่าวมาข้างต้นสามารถสรุปได้ ดังแสดงใน Table 2 และพบว่าผลิตภัณฑ์จากพลาสมาที่มีอยู่ในท้องตลาดเป็นส่วนใหญ่ในปัจจุบันใช้วิธีการ viral inactivation และ viral removal ในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์<sup>4</sup> ดังแสดงใน Table 3

**สรุป**

ผู้ผลิตผลิตภัณฑ์จากพลาสมาสามารถเลือกใช้วิธีการทำ viral inactivation หรือ viral removal ในกระบวนการผลิตได้หลายวิธี การเลือกวิธีที่เหมาะสมเพื่อนำมาใช้ในกระบวนการผลิตจำเป็นต้องพิจารณาถึงขนาดโมเลกุลและคุณสมบัติของโปรตีนที่ต้องการ รวมถึง activity และความคงตัวของโปรตีนหลังผ่านการทำ viral inactivation หรือ viral removal วิธีการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ของโรงงานผู้ผลิต ปริมาณและชนิดของเชื้อไวรัสที่ผู้ผลิตคำนึงถึง รวมถึงข้อดี ข้อเสีย ของการทำ viral inactivation และ viral removal แต่ละวิธีเป็นสำคัญ ทั้งนี้เพื่อให้ผลิตภัณฑ์จากพลาสมามีความปลอดภัยอย่างสูงสุด

**Table 2** Characteristics of well recognized procedures for virus inactivation and virus removal

Procedures	Treatment	Advantages
Virus inactivation	Pasteurization	- Inactivates both enveloped and some non-enveloped viruses including HAV - Relatively simple equipment
	Dry heat treatment	- Inactivates both enveloped and some non-enveloped viruses including HAV - Treatment applied on the final container
	Stream heat treatment or Vapour heat treatment	- Inactivates both enveloped and some non-enveloped viruses including HAV
	Solvent/Detergent treatment	- Very efficient against enveloped viruses - Does not denature proteins - High process recovery - Relatively simple equipment
	Acid pH / Low pH	- Effective against enveloped viruses - Relatively simple equipment
	Virus removal	Cold ethanol precipitation
Polyethylene glycol (PEG) precipitation		- Purifies protein - Does not denature proteins - Can be effective against both enveloped and non-enveloped viruses
Chromatography		- Purifies protein - Can be effective against both enveloped and non-enveloped viruses including HAV and parvovirus B19
Nanofiltration		- Effective against enveloped viruses - Can be effective against non-enveloped viruses including HAV and parvovirus B19 - Does not denature proteins - High recovery of "smaller" proteins such as coagulation factor IX - Risk of downstream contamination limited when performed just prior to aseptic filling

**Table 3** Established applications of dedicated viral inactivation and removal procedures to marketed plasma products

Product type	Treatment
Albumin	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cold ethanol precipitaion</li> <li>- Terminal pasteurization</li> </ul>
IgG	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Solvent/detergent treatment</li> <li>- Pasteurization</li> <li>- Incubation at pH 4</li> <li>- Nanofiltration (35 nm or less)</li> </ul>
Factor VIII and Factor IX	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Solvent/detergent treatment</li> <li>- Pasteurization</li> <li>- Stream-treatment</li> <li>- Nanofiltration (35 nm or less)</li> <li>- Terminal dry-heat treatment</li> </ul>
Prothrombin complex	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Solvent/detergent treatment</li> <li>- Pasteurization</li> <li>- Nanofiltration (35 nm or less)</li> </ul>
Fibrin sealant	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Solvent/detergent treatment</li> <li>- Pasteurization</li> <li>- Stream-treatment</li> </ul>
Von Willebrand factor	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pasteurization</li> <li>- Nanofiltration (35 nm or less)</li> </ul>
Factor XI	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Terminal dry-heat treatment</li> </ul>
Antithrombin III	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Solvent/detergent treatment</li> <li>- Pasteurization</li> <li>- Nanofiltration (35 nm or less)</li> </ul>
Alpha-1-proteinase inhibitor	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pasteurization</li> </ul>
C1-inhibitor	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Stream-treatment</li> </ul>
Plasma	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Solvent/detergent treatment</li> </ul>

## เอกสารอ้างอิง

1. Harvey GK, David JA. Plasma fractionation and fractionation products. In : Harvey GK, David JA, editors. *Mollison's blood transfusion in clinical medicine*, 12<sup>nd</sup> ed. New Jersey: Wiley-Blackwell. 2014:846-72.
2. History of plasma fractionation [Internet]. Connecticut: The Marketing Research Bureau. c2018- [cited 2018 Apr 8]. Available from: <https://marketingresearchbureau.com/plasma-industry/history-of-plasma-fractionation/>
3. Mousavi HK, Ghasemzadeh M. Implementation of plasma fractionation in biological medicines production. *Iran J Biotechnol*. 2016;14:213-20.
4. World Health Organization. *Guidelines on viral inactivation and removal procedures intended to assure the viral safety of human blood plasma products*. Geneva: World Health Organization; 2004.
5. Fokke T. *Viral safety of blood and plasma products*. Amsterdam: Gildeprint BV; 2007.
6. Nazari S, Jalili MA, Shahabi M, Tafti MF, Nasiri S, Mouradi M, et al. Virus reduction of human plasma-derived biological medicines. *Jundishapur J Nat Pharm Prod*. 2017;12:e13943. doi:10.5812/jjnpp.13943.
7. Rezvan H, Motallebi Z, Jalili MA, Hosseini MK, Pourfathollah AA. Safety of blood and plasma derivatives: Pathogen reducing technologies. *Med J Islam Repub Iran*. 2006;20:86-92.
8. United States Army Natick Research and Development Command Natick. *Thermal inactivation of viruses*. Massachusetts: United States Army Natick Research and Development Command Natick; 1977.
9. Nathan JR. Pathogen reduction of blood components and plasma derivatives. In: Toby LS, Jeffrey M, Edward LS, Bjarte GS, Ronald GS, editors. *Rossi's Principles of Transfusion Medicine*. New Jersey: John Wiley & Sons; 2016. p. 632-641.
10. Viral Inactivation of Blood Products for Haemophilia Therapy up to 1985 [Internet]. Edinburgh: The Penrose Inquiry. c2015 - [cited 2018 Apr 19]. Available from: [http://www.penroseinquiry.org.uk/finalreport/text/354876\\_chapter\\_23.html](http://www.penroseinquiry.org.uk/finalreport/text/354876_chapter_23.html).
11. Gröner A, Broumis C, Fang R, Nowak T, Popp B, Schäfer W, et al. Effective inactivation of a wide range of viruses by pasteurization. *Transfusion*. 2018;58:41-51.
12. Albrecht G, Wolfram S, Thomas N. Emerging viruses are inactivated by pasteurization. *Blood*. 2004;104:4111.
13. Kim IS, Choi YW, Kang Y, Sung HM, Shin JS. Dry-heat treatment process for enhancing viral safety of an antihemophilic factor VIII concentrate prepared from human plasma. *J Microbiol Biotechnol*. 2008;18:997-1003.
14. Peter H, Bjarte GS. The use of solvent/detergent treatment in pathogen reduction of plasma. *Transfus Med Hemother*. 2011;38:65-70.
15. Roberts PL. Virus inactivation by solvent/detergent treatment using Triton X-100 in a high purity factor VIII. *Biologicals*. 2008;36:330-5
16. Joe M, Heather M. Adjusting pH during viral inactivation automating the procedure via a single-use mixing platform. In: John S, editor. *The genetic engineering & biotechnology news*. New York: Mary Ann Liebert, Inc; 2013.
17. Dichtelmüller HO, Biesert L, Fabbri F, Falbo A, Flechsig E, Gröner A, et al. Contribution to safety of immunoglobulin and albumin from virus partitioning and inactivation by cold ethanol fractionation. *Transfusion*. 2011;51:1412-30.
18. Burnouf T, Burnouf-Radosevich M. Strategy of virus removal / inactivation of plasma-derived products : interest of nanofiltration as a new virus elimination method. In: Kobayashi T, Kitagawa Y, Okumura K, editors. *Animal cell technology : basic & applied aspects: proceedings of the sixth international meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (9-12 November 1993; Nagoya, Japan)*. Dordrecht: Springer; 1993. p. 17-27.