

روشی مقرون به صرفه برای تولید آلبومین انسانی با غلظت ۲۰ گرم درصد

هاشم خرسند محمدپور^۱، دکتر عیسی نورمحمدی^۲، دکتر محمدعلی جلیلی^۳، دکتر ذبیح‌اله مطلبی^۴

چکیده

سابقه و هدف

در حال حاضر آلبومین بیشترین حجم مصرفی را در میان محلول‌های زیست دارویی دارد. رایج‌ترین روش تولید صنعتی آلبومین انسانی، روش Cohn و یا پالایش پلاسما با اتانل در سرما می‌باشد. به‌منظور صرفه‌جویی در زمان، مواد و نیروی انسانی، در تولید آلبومین با غلظت ۲۰ گرم درصد، روشی دو مرحله‌ای بر اساس روش پالایش با اتانل در سرما ارایه و مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

بررسی انجام شده از نوع تجربی بوده و از پلاسمای تازه منجمد شده (FFP) به‌عنوان ماده اولیه استفاده گردیده‌است. در مرحله اول با افزودن محلول رویی ۴ (سوپرناتانت IV) به خمیر V حل شده در آب مقطر تزریقی و با تنظیم شرایط و استفاده از سانتریفوژ، محصول حد واسطی به نام خمیر Vd+I (خمیر V مترامی که در بردارنده بیشترین غلظت آلبومین و کمترین مقدار ناخالصی از نوع پروتئین، الکترولیت و اتانل است) جداسازی گردید و در مرحله دوم به‌منظور حذف ناخالصی جزئی از جنس آلفا گلوبولین‌ها، خمیر به‌دست‌آمده در آب مقطر حل شد و با انجام فیلتراسیون ژرف، محلول پروتئینی با خلوص بالا به‌دست‌آمد (HPs) که شرایط لازم برای تولید آلبومین ۲۰ گرم درصد پاستوریزه (جهت ویروس زدایی) را داشت. با این روش دو سری ساخت تولید گردید و ارزیابی کیفیت محصول نهایی مطابق با مقررات فارماکوپه صورت گرفت.

یافته‌ها

محصولات حد واسط به‌دست‌آمده در روش پیشنهادی (Vd+I و HPs) در مقایسه با محصولات حد واسط روش رایج (Vd و HPs) از نظر ظاهری و نتایج بیوشیمیایی، شباهت بسیار نزدیکی به یکدیگر داشتند. کنترل کیفی محصول نهایی برای دو سری ساخت با روش نمونه‌برداری تصادفی از ظروف شیشه‌ای پر شده صورت گرفت. به‌طوری‌که ظاهر محصول شفاف، خلوص آلبومین بیش از ۹۹ درصد، میزان اگریگیت و یا پلیمر با میانگین کمتر از ۲/۷ درصد و بازده محصول نیز 1 ± 24 گرم به ازای کیلوگرم پلاسما به‌دست‌آمد.

نتیجه‌گیری

با اجرای این روش، صرفه‌جویی چشم‌گیری در فرآیند استحصال محصولات حد واسط (خمیر Vd+I و HPs) که در مسیر تولید آلبومین انسانی با غلظت ۲۰ گرم درصد به‌کار برده می‌شوند، صورت گرفت به‌طوری‌که مدت زمان انجام کار، مصرف مواد و به‌کارگیری نیروی انسانی در مقایسه با روش‌های رایج پالایش پلاسما با اتانل در سرما (روش‌های Cohn و Kistler-Nitschmann) به بیش از ۵۰ درصد تقلیل یافت.

کلمات کلیدی: آلبومین سرم انسانی، پالایش پلاسما، فرکشن V کوهن

تاریخ دریافت: ۱۴/۶/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۴/۱۱/۲۳

۱- مؤلف مسئول: کارشناس ارشد بیوشیمی - مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران و شرکت پژوهش و پالایش خون - صندوق پستی ۱۴۶۶۵-۱۱۵۷

۲- PhD بیوشیمی - دانشیار مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران

۳- PhD شیمی دارویی - استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران و شرکت پژوهش و پالایش خون

۴- دکترای داروسازی - مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران و شرکت پژوهش و پالایش خون

مقدمه

سالیانه بیش از صدها تن آلبومین با دو غلظت متفاوت در دنیا ساخته می‌شود. غلظت ۴-۵ گرم درصدی آلبومین، یک محلول ایزوتونیک می‌باشد که در درمان جایگزینی کاهش حجم خون استفاده می‌گردد و غلظت ۲۰-۲۵ گرم درصدی آن محلولی است هیپوتونیک اما هیپرانکوتیک و در درمان بیمارانی استفاده می‌شود که اتلاف مایع داشته و قادر به دریافت مایع و الکترولیت نیستند (۱، ۲).

روش‌های متعددی بر اساس خواص فیزیکوشیمیایی و بیولوژیکی پروتئین برای تخلیص آلبومین پلاسما انسانی صورت گرفته است (۳). تولید صنعتی آلبومین بر اساس روش رسوب‌دهی با اتانل در سرما توسط کوهن (Cohn) و همکارانش در ایالات متحده آمریکا و در طی جنگ جهانی دوم (دهه ۱۹۴۰) صورت گرفت (۴، ۵). این روش بر اساس اختلاف حلالیت آلبومین با سایر پروتئین‌های پلاسما و با تنظیم پنج عامل اصلی یعنی pH، دما، غلظت اتانل، قدرت یونی و غلظت پروتئین می‌باشد. به‌طوری‌که آلبومین نسبت به دیگر پروتئین‌های پلاسما در pH پایین‌تر و با غلظت اتانل بیشتر رسوب می‌کند (۳، ۶). چند سال بعد از کار کوهن و همکارانش، در سال ۱۹۶۲ کیسلر و نیشمن (Kistler - Nitschmann) روشی با تغییرات جزئی اعمال شده در کار کوهن را ارائه نمودند (۷).

از سایر روش‌های تولید آلبومین عبارت از تخلیص با کروماتوگرافی، استفاده از هر دو روش اتانل و کروماتوگرافی و فن‌آوری نو ترکیبی می‌باشند (۸-۱۰).

اساساً رایج‌ترین روش تهیه آلبومین درمانی، هنوز براساس پالایش پلاسما با اتانل در سرما می‌باشد (۹، ۱۱). دلایل اصلی به‌کارگیری این روش عبارتند از: ۱- مراحل تولید در این روش به‌صورت مطلوبی اعتباردهی می‌گردند ۲- اتانل ارزان قیمت و کار کردن با آن آسان است ۳- اتانل متوقف‌کننده رشد باکتری است و به‌راحتی با روش دیافیلتراسیون و یا روش‌های دیگر از محصول خارج می‌شود (۱۲).

تولید آلبومین به روش پالایش پلاسما با اتانل در سرما و با غلظت ۲۰-۲۵ گرم درصد، نیازمند تخلیص بیشتر محصول حد واسطی به نام خمیر V (خمیر ۵) غنی از

آلبومین می‌باشد (۷، ۴). نظر به این‌که اجرای این مرحله از فرایند، زمان‌بر و هزینه‌ساز است لذا به‌منظور ساده‌تر کردن فرایند، یک روش دو مرحله‌ای در حد تولید نهایی با حفظ کیفیت محصول ارائه و اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. به‌طور کلی در این مطالعه برای کاهش pH ها از بافر سدیم استات ۴/۸ مولار تهیه شده به روش کوهن استفاده گردید و در تنظیم pH محلول‌های پروتئینی حاوی غلظت بالای اتانل، ابتدا با سدیم کلراید ۰/۱۵ مولار به میزان ۵ برابر رقیق شدند و سپس pH اندازه‌گیری شد تا بدینوسیله از انحراف در قرائت pH به‌علت حضور اتانل اجتناب شود. اتانل با درجه خلوص ۹۶ درصد و در دمای منفی ۱۷ درجه سانتی‌گراد به محلول‌های پروتئینی اضافه شد. تانک‌های استیل مجهز به مدار برودتی و سیستم همزن مکانیکی در آماده‌سازی و رسوب‌دادن محلول‌های پروتئینی به‌کار گرفته‌شد و با استفاده از سانتریفوژهای continuous مدل CEPA, Z 101 H با عملکرد ۱۵/۵۰۰ g جداسازی رسوب از محلول رویی صورت گرفت.

شکل ۱ روش ساخت پیشنهادی (الف) در مقایسه با روش رایج (ب) را نشان می‌دهد.

تهیه محصول حد واسط

جداسازی خمیر V متراکم (vd+I): ۷۵ کیلوگرم پلاسما مطابق با روش کیسلر - نیشمن جهت تهیه مایع رویی IV (محلول رویی به‌جای مانده از خمیری به نام IV می‌باشد که حاوی ۴۰٪ اتانل است)، پالایش و در دمای ۷- درجه سانتی‌گراد برای به‌کارگیری در مرحله بعدی در تانک نگهداری شد. مقدار ۴/۸ کیلوگرم خمیر V (این خمیر از رسوب‌دهی مایع رویی IV و جداسازی رسوب به‌دست‌می‌آید) که از قبل با روش کیسلر - نیشمن به‌دست‌آمده بود، به میزان ۵/۸ برابر وزن خمیر در آب مقطر تزریقی حل و در دمای 1 ± 3 درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت هم‌زده‌شد.

محلول رویی IV نگهداری شده در تانک، به‌طور هم‌زمان با بافر سدیم استات و در طی مدت دو ساعت به

فرمولاسیون: به منظور پایداری آلبومین در برابر حرارت به هنگام پاستوریزاسیون، سدیم کاپریلات به مقدار ۰/۱۵ میلی مول به ازای هر گرم آلبومین افزوده شد و سپس pH با استفاده از سود یک مولار بر روی ۷، تنظیم و هم چنین جهت تنظیم غلظت آلبومین و سدیم به ترتیب آب مقطر تزریقی و سدیم کلراید در حد الزام فارماکوپه افزوده شد (۱۳).

درون تانک حاوی خمیر V حل شده اضافه گردید تا pH به ۴/۷ و مقدار الکلی به ۳۰ درصد برسد. ضمن این که در حین افزایش، به تدریج دمای تانک به ۱۰- درجه سانتی گراد کاهش داده شد.

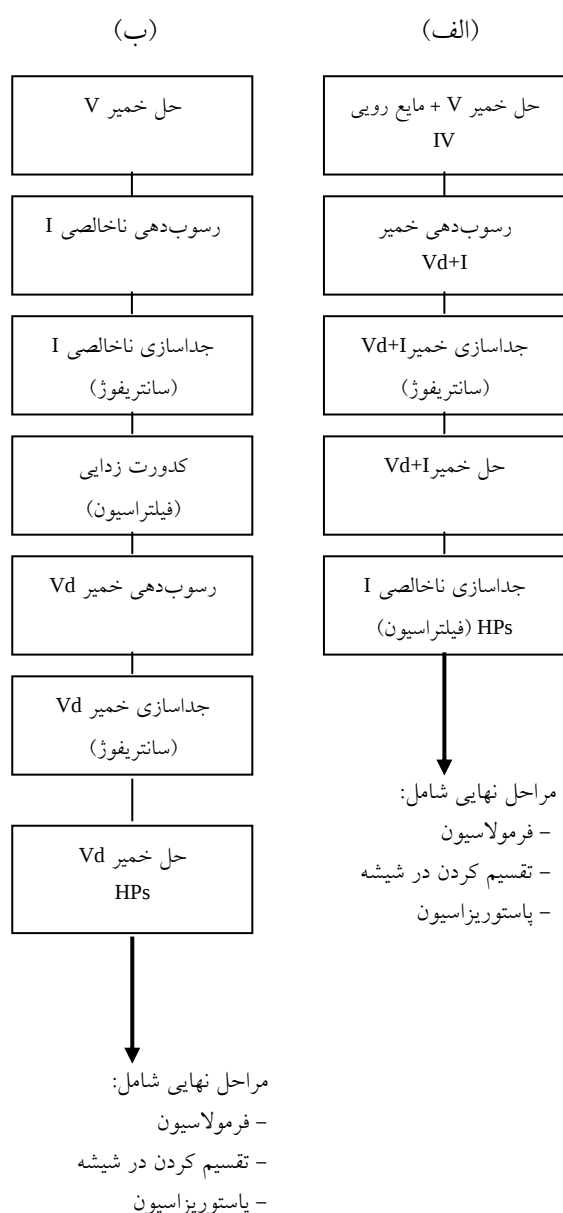
در شرایط مذکور به منظور رسوب دهی مطلوب، مخلوط به مدت ۶ ساعت در حال هم زدن نگهداری شد و سپس با استفاده از سانتریفوژ در شرایط دمایی ۱۰- درجه سانتی گراد و سرعت خروجی ۷۰ لیتر در ساعت، مقدار ۸/۳ کیلوگرم خمیر Vd+I (خمیر V متراکم با کمترین ناخالصی) جداسازی شد.

جداسازی ناخالصی پروتئینی از خمیر Vd+I تهیه HPS (High Pure Solution): به منظور حذف ناخالصی هایی هم چون آلفا گلوبولین ها، مقدار ۵/۸ کیلوگرم از خمیر به دست آمده در آب مقطر تزریقی به میزان ۲/۸ برابر وزن خمیر حل گردید تا محلول پروتئینی با غلظت ۸ گرم درصد حاصل شود. محلول مذکور در دمای صفر درجه سانتی گراد به مدت ۲ ساعت در حال هم زدن نگهداری شد و سپس جهت فیلتراسیون، با سرعت خروجی ۱۰۰ لیتر در ساعت از دستگاه فیلتر ژرف (Depth filter) مجهز به ۶ ورق فیلتر با مشخصات اشتراک برگر (Strassburger)، K3 ۴۰×۴۰ که با اتانل ۵ درصد به دمای ۲+ درجه سانتی گراد رسانیده شده بود عبور داده شد.

تهیه محصول نهایی

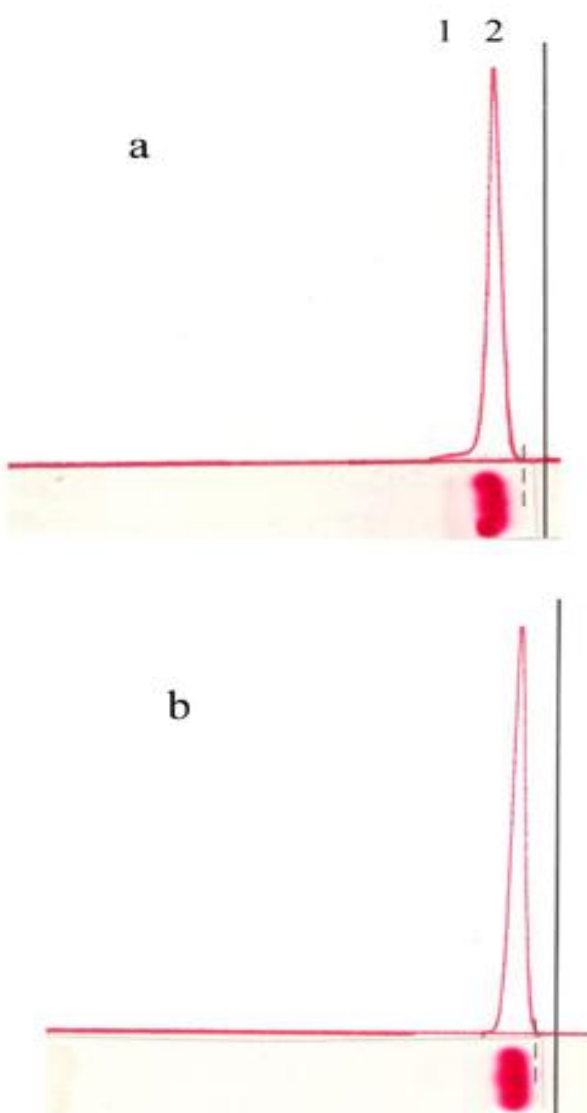
دیافیلتراسیون و اولترافیلتراسیون: با استفاده از دستگاه اولترافیلتر فیلترن مجهز به کاست های ۱۰ کیلو دالتونی سارتوکون با سطح مؤثر کلی ۱۰/۵ متر مربع، عمل دیافیلتراسیون در ابتدا با محلول سدیم کلراید ۰/۵ مولار به میزان حدوداً ۲/۵ برابر حجم و سپس از آب مقطر تزریقی به میزان حدوداً ۴ برابر حجم، در جهت حذف ناخالصی هایی همچون آلومینیوم، اتانل باقی مانده و پروتئین های دناتوره شده احتمالی با وزن مولکولی کمتر از ۱۰ کیلو دالتون استفاده گردید.

هم چنین با عمل اولترافیلتراسیون که به منظور تغلیظ صورت می گیرد غلظت محلول پروتئینی به ۲۲ گرم درصد رسانیده شد.



شکل ۱: مقایسه روش پیشنهادی (الف) و رایج (ب)

همچنین به منظور نشان دادن خلوص خمیر Vd+I قبل و بعد از فیلتراسیون ژرف که به منظور حذف ناخالصی از جنس آلفا گلوبولین ها صورت گرفت ، الکتروفورز بر روی ژل آگارز انجام گردید که این حذف ناخالصی در شکل ۲ نمایش داده شده است.



شکل ۲: الکتروفورز خمیر Vd+I. قبل از فیلتراسیون (a) پیک ۱ ناخالصی آلفا گلوبولین ها به میزان ۲/۵ درصد و پیک ۲ مربوط به آلبومین می باشد. پس از فیلتراسیون (b) ناخالصی حذف و خلوص آلبومین به بیش از ۹۹ درصد رسیده است. نمونه گذاری به حجم یک میکرولیتر و با غلظت پنج گرم درصد می باشد.

فیلتراسیون و تقسیم کردن در شیشه : محلول فرموله شده در شرایط استریل با عبور از فیلتر با اندازه منفذ ۰/۲۲ میکرون (این نوع فیلترها جهت اطمینان از استریل گردیدن محلول ها به کار می روند) وارد شیشه هایی از تیپ یک با حجم ۵۰ میلی لیتر گردید و پس از گذاردن درب پلاستیکی و درپوش فلزی ، آماده پاستوریزاسیون شد. پاستوریزاسیون: تمامی شیشه های حاوی آلبومین ۲۰ گرم درصد در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ ساعت حرارت داده شد تا بدین وسیله از احتمال انتقال ویروس های قابل انتقال از پلاسما مانند ویروس های هپاتیت و HIV ممانعت به عمل آید، ضمن این که بدین طریق پایداری ملکول آلبومین از نظر دنا توره شدن و یا تشکیل پلیمر در برابر حرارت نیز قابل بررسی می گردد (۱۴).

آزمایش های کنترل کیفی محصول نهایی: با انجام نمونه برداری تصادفی، تمامی روش های ارزیابی محصول نهایی برای دو سری ساخت، مطابق با مقررات فارماکوپه انگلستان (BP) صورت گرفت (۱۳).

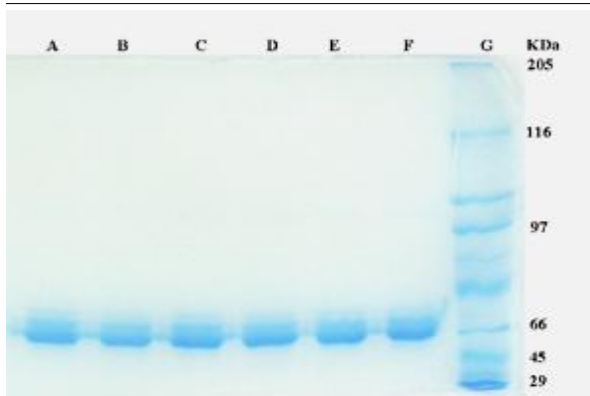
یافته ها

ارزیابی کیفیت محصول حد واسط : علیرغم کاهش عملیات در فرایند تهیه محصولات حد واسط ، مقایسه خمیر Vd+I تهیه شده به روش پیشنهادی با خمیرهای Vd و V به عنوان محصولات حد واسط ، حاکی از اختلاف محسوسی در کیفیت دو نوع خمیر Vd+I و V و شباهت بسیار نزدیکی در خمیرهای Vd+1 و Vd که با روش رسوب دهی با اتانل در سرما تهیه شده اند را نشان داد (شکل ۱ و جدول ۱).

جدول ۱: مقایسه خمیر Vd+I با خمیرهای V و Vd رایج

اختصاصات	خمیر V	خمیر Vd+I	خمیر Vd
پروتئین (درصد خمیر W/W)	۱۷/۵	۳۲	۳۲
آلبومین (درصد خمیر W/W)	۱۷/۳	۳۱	۳۲
اتانل (درصد خمیر W/W)	۲۷	۱۶/۵	۱۶/۵
کنداکتیویته (ms/cm) *	۶/۱۲	۲/۱۰	۱/۹۰

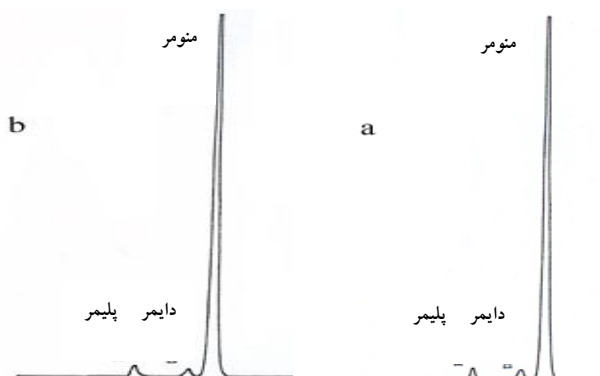
* مقادیر کنداکتیویته بر اساس حل خمیر در WFI و با غلظت پنج گرم درصد به دست آمده است.



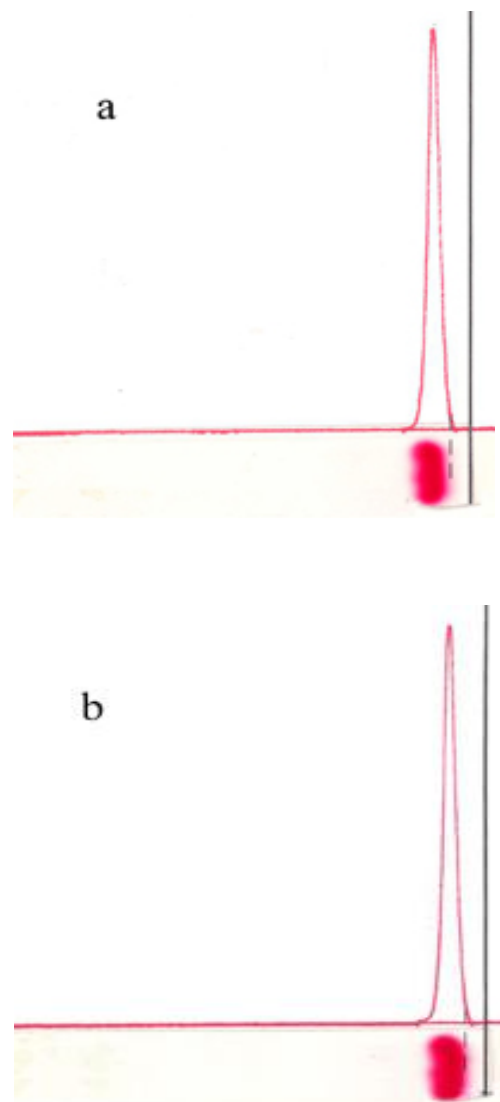
ارزیابی کیفیت محصول نهایی: کنترل کیفی آلبومین ۲۰ گرم درصد تولید شده با روش پیشنهادی با انجام آزمایش برای هر دو سری ساخت (سری ساخت‌های ۲۱ و ۲) و در ظروف نهایی صورت گرفت که نتایج کاملاً رضایت‌بخشی را در برداشت به‌طوری‌که ظاهر محلول شفاف و به رنگ زرد - سبز بود و درجه خلوص آلبومین، بیش از ۹۹ درصد را نشان داد (شکل ۳). انجام آزمایش SDS-PAGE نیز به‌منظور تأیید کیفیت محصول صورت گرفت (شکل ۴).

شکل ۴: الکتروفورز محصول نهایی (SDS-PAGE) رنگ آمیزی شده با کوماسی بلو. از A تا C روش رایج، D و E تولید شده با روش پیشنهادی، F و G به ترتیب مربوط به یک محصول تجاری و پروتئین ساینز مارکر می‌باشد. تمامی نمونه‌ها به مقدار ۷ میکروگرم نمونه‌گذاری شده‌اند.

حد مجاز حضور پلیمر و یا اگریگیت در محصول که از درجه اهمیت بالایی برخوردار است، با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا از نوع TSK gel G3000 SWXL با ستون پر شده از ژل هیدروفل سیلیکا بررسی و مقدار قابل قبول با میانگین ۲/۶۷ درصد را نشان داد (شکل ۵ و جدول ۲). ایمنی محصول از نظر عدم حضور ویروس‌های پوشش دار منتقل شونده از طریق پلاسما با روش الیزا و تبزایی و توکسیسیتی آن به‌صورت *in vivo* بررسی گردید. جدول ۲ فهرستی از نتایج را در مقایسه با الزامات فارماکوپه نشان می‌دهد (۱۴).



شکل ۵: کروماتوگرافی HPLC محصول نهایی. شکل‌های a و b به ترتیب مربوط به سری ساخت‌های ۲۱ می‌باشند. پیک‌های هر شکل از سمت چپ و به ترتیب نشانگر حضور پلیمر، دایمر و مونومر (پیک بزرگ) در محصول است.



شکل ۳: الکتروفورز محصول نهایی بر روی ژل آگارز. شکل‌های a و b به ترتیب مربوط به سری ساخت‌های ۲۱ می‌باشند که هر دو مورد خلوص بالای ۹۹ درصد را نشان می‌دهند.

جدول ۲: نتایج آزمایش‌های کیفی محصول نهایی (آلبومین پلاسمای انسانی ۲۰ گرم درصد) تولید شده با روش پیشنهادی

نتایج		الزامات فارماکوپه	نوع آزمایش
سری ساخت ۲	سری ساخت ۱		
شفاف	شفاف	شفاف	شکل ظاهری محلول
۷/۰۵	۶/۹۵	۷/۳ تا ۶/۷	pH
۲۰/۰	۱۹/۹	۲۱ تا ۱۹	غلظت پروتئین (گرم درصد)
بیش از ۹۹	بیش از ۹۹	بیش یا برابر با ۹۵	میزان خلوص (درصد)
۹۷/۸۱	۹۶/۸۵	بیش یا برابر با ۹۵	توزیع اندازه ملکولی
۲/۱۹	۳/۱۵	کمتر یا برابر با ۵	مونومر + دایمر (درصد)
۱۰/۸	۹/۴	کمتر از ۱۶۰	پلیمر یا اگریگیت (درصد)
کمتر از ۰/۰۵	کمتر از ۰/۰۵	کمتر از ۰/۰۵	سدیم (mmol/l)
اندازه‌گیری نشد	اندازه‌گیری نشد	کمتر از ۲۰۰	پتاسیم (mmol/g protein)
۱/۲	۲/۹	کمتر از ۳۵	آلومینیوم (μg/l)
۰/۰۱۶	۰/۰۲۹	کمتر از ۰/۱۵	فعالیت فعال کننده پره کالیکرین PKA (IU)
مورد قبول	مورد قبول	مورد قبول	Heme (جذب در ۴۰۳ نانومتر)
مورد قبول	مورد قبول	مورد قبول	پیروژن
مورد قبول	مورد قبول	مورد قبول	توکسیسیتی
مورد قبول	مورد قبول	مورد قبول	استریلیتی
منفی	منفی	منفی	Anti- HIV
منفی	منفی	منفی	Anti-HCV
منفی	منفی	منفی	HBsAg

بحث

در تحقیق حاضر مشخص شد در صورتی که خمیر V و مایع رویی ۴ تهیه شده به روش کیسلر- نیشمن را تحت شرایط کنترل شده با یکدیگر مخلوط نماییم، می‌توان به خمیری به نام Vd+I دست یافت که خصوصیات کاملاً متفاوتی نسبت به خمیر V رایج و شباهت‌های بسیار نزدیکی به خمیر Vd رایج را داشته باشد (جدول ۱). این ویژگی از دو جنبه در استحصال محصولات حد واسط (HPS, Vd+I) حایز اهمیت گردید.

الف) جنبه بیوشیمیایی؛ به علت تراکم بالای آلبومین در خمیر Vd+I، عملاً محبوس شدن ناخالصی‌هایی همچون اتانل، الکترولیت‌ها و دیگر پروتئین‌ها در این خمیر به حداقل مقدار ممکن رسیده که این موضوع موجب گردید تا با کمک فیلتراسیون بر روی محلول این خمیر بتوانیم

مقدار ناخالصی جزئی را نیز حذف نموده و محلول آلبومین با خلوص بالای ۹۹٪ به دست آوریم (شکل ۲ و جدول ۱). محلول اخیر در تولید آلبومین با غلظت ۲۰ گرم درصد به کار گرفته شد.

ب) جنبه اقتصادی؛ ۱) کاهش مدت زمان انجام کار در حدود ۵۰ درصد. این کاهش با توجه به شکل ۱ و در مقایسه دو روش، با حذف قسمت‌هایی از فرایند رایج صورت گرفته است، به طوری که نسبت به فرایند حل خمیر V تا رسیدن به محلول HPS، قسمت‌های رسوب‌دهی ناخالصی I و کدورت زدایی حذف شده‌اند و نسبت به مایع رویی IV تا رسیدن به محلول HPS، قسمت‌های رسوب‌دهی خمیر V از مایع رویی IV، جداسازی خمیر V، رسوب‌دهی ناخالصی I و کدورت زدایی نیز حذف گردیده‌اند. ۲) کاهش مصرف مواد به میزان ۹۰ درصد.

بیشتری هم چون سنجش آلومینیوم، اعتباردهی ویروس زدایی (بیش از نیم قرن می باشد که روش پاستوریزاسیون بر روی محصول آلبومین اعمال می گردد و تا کنون عدم موفقیتی مبنی بر انتقال ویروس از این محصول گزارش نشده است) و یا دیگر مطالعات لازم نیز قرار بگیرد، امکان بهره برداری از این روش در مقیاس صنعتی وجود دارد (۱۴، ۱).

در صورت تحقق این موضوع، نه تنها هزینه تولید آلبومین با غلظت ۲۰ گرم درصد، در روش پالایش پلاسما با اتانل در سرما به میزان قابل توجهی کاهش می یابد (محاسبه دقیق هزینه ها امری پیچیده است و نیازمند انجام محاسبات در زمینه حسابداری صنعتی می باشد)، بلکه با توجه به صرفه جویی به دست آمده در زمینه کاهش مدت زمان انجام کار، امکان افزایش تولید این محصول نیز به طور هم زمان میسر می گردد.

اتانل مورد نیاز جهت تمامی رسوب دهی ها، از اتانل موجود در مایع رویی IV (حاوی ۴۰٪ اتانل) تأمین گردید و عملاً صرفه جویی چشم گیری در مصرف این ماده بر خلاف روش های رایج کوهن و کیسلر - نیشمن حاصل شد (۶، ۳). کاهش به کارگیری نیروی انسانی در حدود ۵۰ درصد. با توجه به کاهش مدت زمان انجام کار و همچنین جایگزین نمودن فیلتراسیون به جای سانتریفوژ که عملاً کار کردن با سانتریفوژ نیازمند کار و نیروی انسانی به مراتب بیشتری نسبت به فیلتراسیون می باشد، این کاهش صورت گرفت.

نتیجه گیری

صرفه جویی های مکرر مذکور و همچنین نتایج کیفی و کمی به دست آمده از محصول نهایی (نتایج جدول ۲ و بازدهی 24 ± 1 گرم آلبومین به ازای کیلوگرم پلاسما) حاکی از آن است که در صورتی که این روش مورد بررسی

References :

- Matejtschuk P, Dash CH, Gascoigne EW. Production of human albumin solution: a continually developing colloid. *British Journal of Anaesthesia* 2000; 85: 887-895.
- Mendez CM, McClain CJ, Marsano LS. Albumin therapy in clinical practice. *Nutrition in clinical practice*. 2005; 20: 314-320.
- More JE, Harvey MJ. Purification technologies for human plasma albumin In: Harris JR, editor. *Blood Separation and plasma Fractionation*. New York: Wiley; 1991:261-306.
- Cohn EJ, Strong LE, Hughes WL Jr, Mulford DJ, Ashworth JN, Meline M, Taylor HL. Preparation and properties of serum and plasma proteins. IV. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. *J Am Chem Soc* 1946; 68: 459-475.
- McClelland DBL. Human albumin solutions. *ABC of Transfusion*. 1990 ; 300: 35-37.
- Curling JM. Albumin purification by ion exchange chromatography. In: Curling JM, editor. *Methods of plasma protein fractionation*. London: Academic press; 1980: 77-92.
- Kistler P, Nitschmann HS. Large-scale production of human plasma fractions. *Vox Sang* 1962; 7: 414-424.
- Tanaka K, Shigueoka EM, Sawatanai E, Dias GA, Arashiro F, Campos TCXB, et al. Purification of human albumin by the combination of the method of Cohn with liquid chromatography. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1998; 31: 1383-1388.
- Burnouf T, Radosevich M. Affinity chromatography in the industrial Purification of plasma proteins for therapeutic use. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 2001; 79: 575-586.
- Kang HA, Kang W, Hong WK, Kim MW, Kim JY, Sohn JH, et al. Development of expression system for the production of recombinant human serum albumin using the MOX promoter in *hansenula polymorpha* DL-1. *Biotechnology and Bioengineering* 2001; 76: 175-185.
- Burnouf T. Plasma protein purification technologies : What is next? *Transfusion Today* 2000; 42: 11-13.
- Mohr H. Production of human albumin by plasma fractionation. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 1999; 34: 773-775.
- British Pharmacopoeia. The British Pharmacopoeia Commission. Vol 2. The stationary office London 1998: 2005-2006.
- Burnouf T, Radosevich M. Reducing the risk of infection from plasma products: specific preventative strategies. *Blood Reviews* 2000; 14: 94-110.

A cost- effective process for production of human serum albumin 20%

Khorsand Mohammad Pour H.^{1,3}(MS), Nourmohammadi I.²(PhD), Jalili M.A.^{1,3}(PhD),
Motallebi Z.^{1,3}(PharmD)

¹Iranian Blood Research and Fractionation Company

²Iran University of Medical Sciences, Cellular and Molecular Research Center

³Iranian Blood Transfusion Organization-Research Center

Abstract

Background and Objectives

Albumin is currently used in greater volume than any other biopharmaceutical solution that is available. The most large- scale production of human albumin is still conducted by cohn cold ethanol fractionation (Cohn's method). In order to save the operating time, labor and material in manufacturing albumin 20%, a two-stage process was carried out based on the cold ethanol fractionation method.

Materials and Methods

For this experimental study, fresh frozen plasma (FFP) was used as a starting material. In the first stage by addition of supernatant IV to a dissolved fraction V paste, a dense fraction V paste (Vd+I) containing the highest possible albumin concentration and the least impurity (ethanol, α globulins and ionic concentration) was recovered by centrifugation; the recovered paste was then dissolved and filtered through a depth filter in order to remove α globulins as impurity. The filtrate (HPs) was suitable to produce albumin 20%. Two batches were produced and all the methods for the evaluation of the finished product were applied according to the guidelines of the British Pharmacopoeia.

Results

The quality control of the albumin 20% as a finished product from 2 batches (batches 1 and 2) in the final container produced by the proposed procedure led to satisfactory results. Appearance of the product was clear, purity over 99% , and the molecular size distribution of albumin was revealed for aggregates or polymers less than 2.7 % . The yield of albumin was 24 ± 1 gr/kg of plasma.

Conclusions

Advantages of the proposed process as compared with the routine process (Cohn & Kistler-Nitschmann methods) during the production of intermediate products (Vd+I, HPs) were remarkable savings in terms of operating time, material and manpower at about 50%.

Key words: Human serum albumin, Plasma fractionation, Cohn Fraction V
SJIBTO 2006;3(1): 37-44

Received: 11 Sep 2005

Accepted: 12 Feb 2006

Correspondence: Khorsand Mohammad Pour H., MS of Biochemistry. IBRFC; IBTO – Research Center
P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran.Tel: (+9821) 88278341; Fax : (+9821) 88276117
E-mail: hkhorsandmp@yahoo.com