

خون

فصلنامه علمی پژوهشی

دوره ۳ شماره ۱ بهار ۸۵ (۴۴-۳۷)

روشی مقرر برای تولید آلبومین انسانی با غلظت ۲۰ گرم در صد

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

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 پلاسمما با اتانل در سرما می‌باشد. به‌منظور صرف‌جویی در زمان، مواد و نیروی انسانی، در تولید آلبومین با غلظت ۲۰ گرم در صد، 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) به عنوان ماده اولیه استفاده گردیده است. در مرحله اول با افزودن محلول رویی^۴ (سوپرناتان 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 متراکمی که در بردارنده بیشترین غلظت آلبومین و کمترین مقدار ناخالصی از نوع پروتئین، الکتروولیت و اتانل است) جداسازی گردید و در مرحله دوم به‌منظور حذف ناخالصی جزیی از جنس آلفا گلوبولین‌ها، خمیر به‌دست آمده در آب مقطر حل شد و با انجام فیلتراسیون ژرف، محلول پروتئینی با خلوص بالا به‌دست آمد که شرایط لازم برای تولید آلبومین ۲۰ گرم در صد 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.

پافته‌ها

محصولات حد واسط به‌دست آمده در روش پیشنهادی (Vd+I و HPs) در مقایسه با محصولات حد واسط روش رایج (Vd و HPs) از نظر ظاهري و نتایج بیوشیمیابی، شباهت بسیار نزدیکی به یکدیگر داشتند. کنترل کیفی محصول نهایی برای دو سری ساخت با روش نمونه‌برداری تصادفی از طروف شیشه‌ای پر شده صورت گرفت. به‌طوری که 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 پلاسمما به‌دست آمد.

نتیجه‌گیری

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

کلمات کلیدی: آلبومین سرم انسانی، پالایش پلاسمما، فرکشن V کومن

تاریخ دریافت: ۱۴۰۶/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۲۳

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 سلوی 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

آلبومن می‌باشد (۴، ۷). نظر به این‌که اجرای این مرحله از فرایند، زمان‌بر و هزینه‌ساز است لذا به منظور ساده‌تر کردن فرایند، یک روش دو مرحله‌ای در حد تولید نهایی با حفظ کیفیت محصول ارایه 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 غلاظت بالای اتانل، ابتدا با سدیم کلراید ۱۵/۰ 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 گرفته شد و با استفاده از سانتریفوژهای continuous گردید و با اثبات اتانل بیشتر رسوب می‌کند (۶). چند سال بعد از کار کوهن و همکارانش، در سال ۱۹۶۲ کیسلر و نیشمن (Kistler - Nitschmann) روشهای با تغییرات جزیی رسوب از محلول رویی صورت گرفت.

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

تهیه محصول حد واسطه

جداسازی خمیر ۷ متراکم (vd+I): ۷۵ کیلوگرم پلاسمما 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 ۷ (این خمیر از رسوب‌دهی مایع رویی IV و جdasازی 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 درجه ۳ ± ۱ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت هم‌زده شد.

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

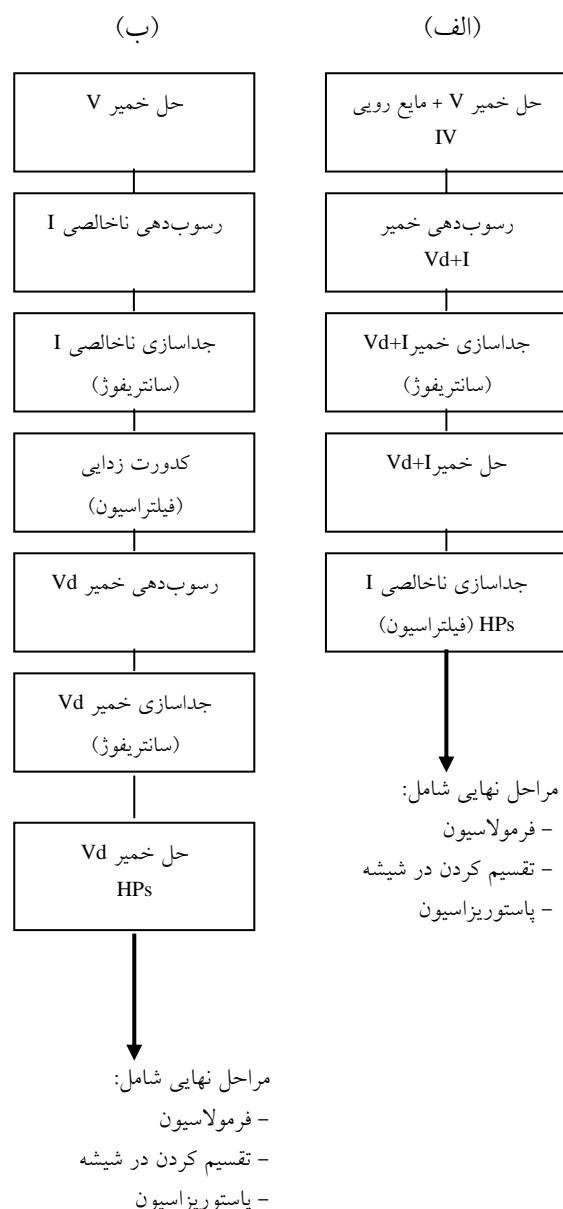
۴-۱
سالیانه بیش از صدها تن آلبومین با دو غلظت متفاوت در دنیا ساخته می‌شود. غلظت ۴-۵ گرم در صدی آلبومین، یک محلول ایزوتونیک می‌باشد که در درمان جایگزینی کاهش حجم خون استفاده می‌گردد و غلظت ۲۰-۲۵ گرم در صدی آن محلولی است هیپوتونیک اما هیپرانکوتیک و در درمان بیمارانی استفاده می‌شود که اتلاف مایع داشته و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

روش‌های متعددی بر اساس خواص فیزیکوشیمیایی و بیولوژیکی پروتئین برای تخلیص آلبومین پلاسمای 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 پلاسمما و با تنظیم پنج عامل اصلی یعنی pH، دما، غلظت اتانل، قدرت یونی و غلظت پروتئین‌های پلاسمما در pH پایین‌تر و با غلظت اتانل بیشتر رسوب می‌کند (۶). چند سال بعد از کار کوهن و همکارانش، در سال ۱۹۶۲ کیسلر و نیشمن (Kistler - Nitschmann) روشهای با تغییرات جزیی اعمال شده در کار کوهن را ارایه نمودند (۷).

از سایر روش‌های تولید آلبومین عبارت از تخلیص با کروماتوگرافی، استفاده از هر دو روش اتانل و کروماتوگرافی و فن آوری نوترکیبی می‌باشدند (۸-۱۰). اساساً رایج ترین روش تهیه آلبومین درمانی، هنوز براساس پالایش پلاسمما با اتانل در سرما می‌باشد (۱۱، ۹). دلایل اصلی به‌کارگیری این روش عبارتند از: ۱- مراحل تولید در این روش به صورت مطلوبی اعتباردهی می‌گردد -۲- اتانل ارزان قیمت و کار کردن با آن آسان است -۳- اتانل متوقف کننده رشد باکتری است و به راحتی با روش دیافیلتراسیون و یا روش‌های دیگر از محصول خارج می‌شود (۱۲).

تولید آلبومین به روش پالایش پلاسمما با اتانل در سرما و با غلظت ۲۰-۲۵ گرم در صد، نیازمند تخلیص بیشتر محصول حد واسطه به نام خمیر ۷ (خمیر ۵) غنی از

فرمولاسیون: به منظور پایداری آلبومین در برابر حرارت به هنگام پاستوریزاسیون، سدیم کاپریلات به مقدار $0/15$ میلی مول به ازای هر گرم آلبومین افزوده شد و سپس pH با استفاده از سود یک مولار بر روی 7 ، تنظیم و همچنین جهت تنظیم غلاظت آلبومین و سدیم به ترتیب آب مقطر تزریقی و سدیم کلراید در حد الزام فارماکویه افزوده شد.
(۱۳)



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

درون تانک حاوی خمیر 7 حل شده اضافه گردید تا pH به $4/7$ و مقدار الكل به 30 درصد برسد. ضمن این که در حین افزایش، به تدریج دمای تانک به $10 - 10$ درجه سانتی گراد کاهش داده شد.

در شرایط مذکور به منظور رسوب دهی مطلوب، مخلوط به مدت 6 ساعت در حال همزدن نگهداری شد و سپس با استفاده از سانتریفوژ در شرایط دمایی $10 - 10$ درجه سانتی گراد و سرعت خروجی 70 لیتر در ساعت، مقدار $8/3$ کیلوگرم خمیر Vd (خمیر $Vd+I$) مترکم با کمترین ناخالصی (جداسازی) جداسازی شد.

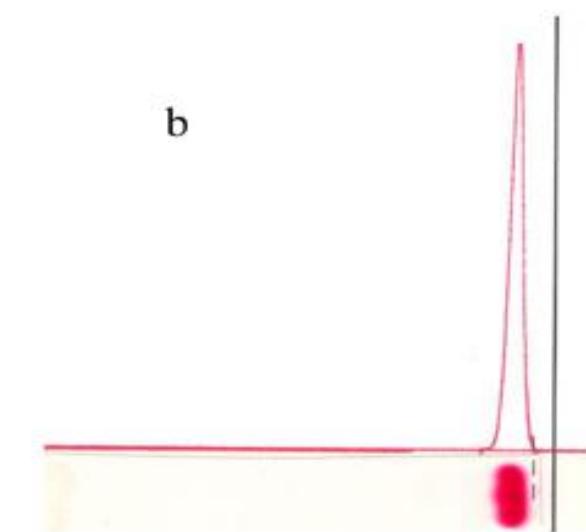
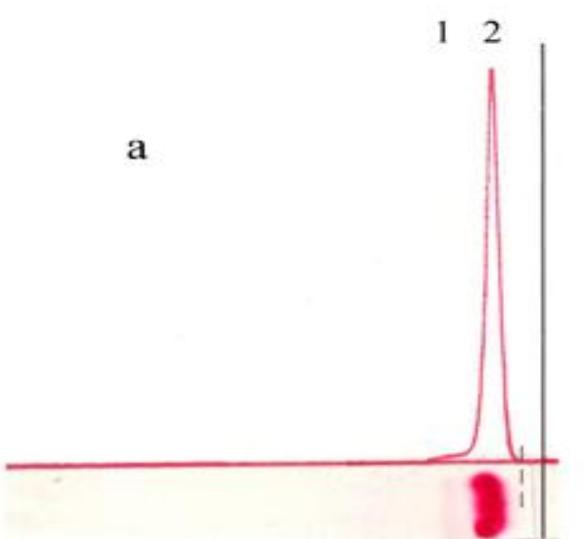
جداسازی ناخالصی پروتئینی از خمیر $Vd+I$ تهیه HPS (High Pure Solution): به منظور حذف ناخالصی هایی همچون آلفا گلوبولین ها، مقدار $5/8$ کیلوگرم از خمیر به دست آمده در آب مقطر تزریقی به میزان $2/8$ برابر وزن خمیر حل گردید تا محلول پروتئینی با غلاظت 8 گرم درصد حاصل شود. محلول مذکور در دمای صفر درجه سانتی گراد به مدت 2 ساعت در حال همزدن نگهداری شد و سپس جهت فیلتراسیون، با سرعت خروجی 100 لیتر در ساعت از دستگاه فیلتر ژرف (Depth filter) مجهز به 6 ورق فیلتر با مشخصات اشتراوس برگر (Strassburger)، $K3$ 40×40 که با اتانل 5 درصد به دمای $2 + 2$ درجه سانتی گراد رسانیده شده بود عبور داده شد.

تهیه محصول نهایی

دیافیلتراسیون و اولترافیلتراسیون: با استفاده از دستگاه اولترافیلتر فیلترون مجهز به کاست های 10 کیلو دالتونی سارتوکون با سطح مؤثر کلی $10/5$ متر مربع، عمل دیافیلتراسیون در ابتدا با محلول سدیم کلراید $0/5$ مولار به میزان حدوداً $2/5$ برابر حجم و سپس از آب مقطر تزریقی به میزان حدوداً 4 برابر حجم، در جهت حذف ناخالصی هایی همچون آلومینیوم، اتانل باقی مانده و پروتئین های دناتوره شده احتمالی با وزن مولکولی کمتر از 10 کیلو دالتون استفاده گردید.

همچنین با عمل اولترافیلتراسیون که به منظور تغليظ صورت می گیرد غلاظت محلول پروتئینی به 22 گرم درصد رسانیده شد.

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



شکل ۲: الکتروفوروز خمیر Vd+I. قبل از فیلتراسیون (a) پیک ۱ ناخالصی آلفا گلوبولین‌ها به میزان ۲/۵ درصد و پیک ۲ مربوط به آلبومین می‌باشد. 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 می‌باشد.

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 محلول‌ها به کار می‌روند) وارد شیشه‌هایی از تیپ یک با حجم ۵۰ میلی لیتر گردید و پس از گذاردن درب پلاستیکی و درپوش فلزی، آماده پاستوریزاسیون شد.

پاستوریزاسیون: تمامی شیشه‌های حاوی آلبومین ۲۰ گرم درصد در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ ساعت حرارت داده شد تا بدین وسیله از احتمال انتقال ویروس‌های قابل انتقال از پلاسما مانند ویروس‌های 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 می‌گردد (۱۴).

آزمایش‌های کنترل کیفیت محصول نهایی: با انجام نمونه برداری تصادفی، تمامی روش‌های ارزیابی محصول نهایی برای دو سری ساخت، مطابق با مقررات فارماکوپه انگلستان (BP) (صورت گرفت) (۱۳).

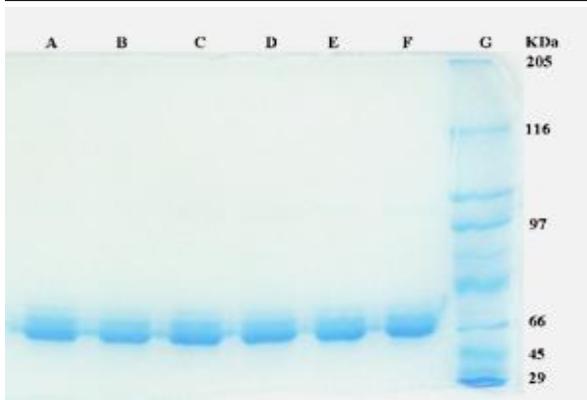
یافته‌ها

ارزیابی کیفیت محصول حدوداً ۵۰٪: 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 I و V و Vd+I و Vd+1 و Vd که با روش رسوب‌دهی با اتانول در سرما تهیه شده‌اند را نشان داد (شکل ۱ و جدول ۱).

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

			اختلافات
Vd	Vd+I	V	
۳۲	۳۲	۱۷/۵	پروتئین (درصد خمیر W/W)
۳۲	۳۱	۱۷/۳	آلبومن (درصد خمیر W/W)
۱۶/۵	۱۶/۵	۲۷	اتانول (درصد خمیر W/W)
۱/۹۰	۲/۱۰	۶/۱۲	* کنکاکیویته (ms/cm)

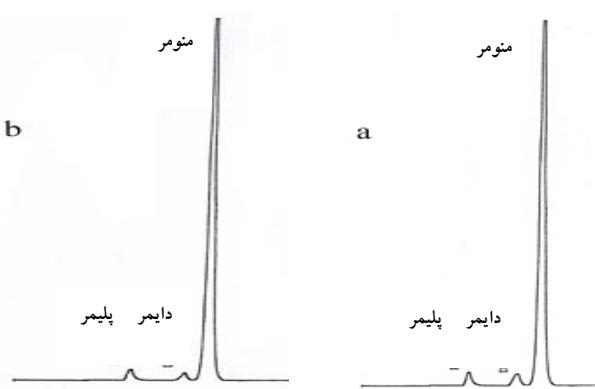
* مقادیر کنکاکیویته بر اساس حل خمیر در WFI و با غلظت پنج گرم درصد بدست آمد است.



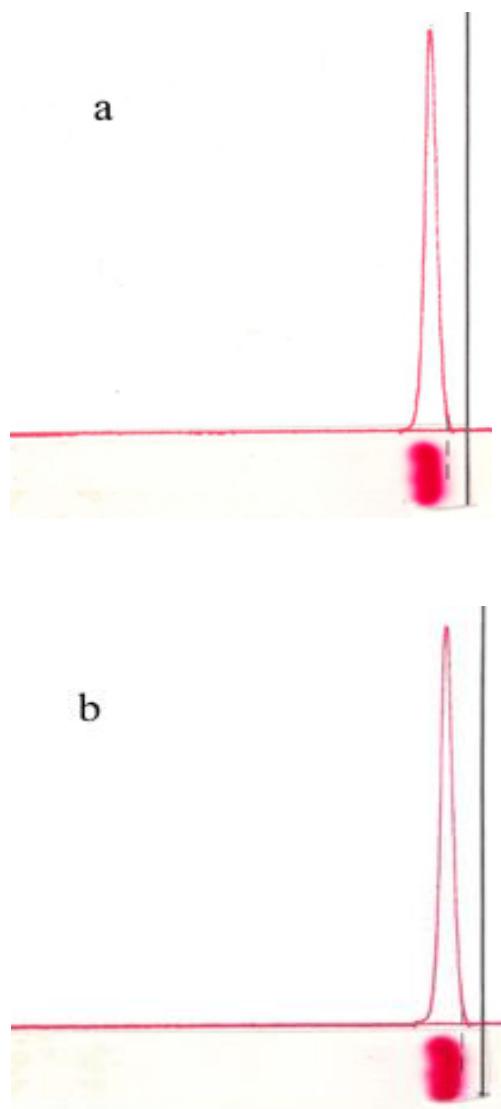
ارزیابی کیفیت محصول نهایی: کترل کیفی آلبومین ۲۰ گرم درصد تولید شده با روش پیشنهادی با انجام آزمایش برای هر دو سری ساخت (سری ساختهای ۱ و ۲) و در ظروف نهایی صورت گرفت که نتایج کاملاً رضایت‌بخشی را در برداشت به طوری که ظاهر محلول شفاف و به رنگ زرد - سبز بود و درجه خلوص آلبومین، بیش از ۹۹ درصد را نشان داد (شکل ۳). انجام آزمایش SDS-PAGE نیز به منظور تأیید کیفیت محصول صورت گرفت (شکل ۴).

شکل ۴: الکتروفورز محصول نهایی (SDS-PAGE) رنگ‌آمیزی 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 سایز مارکر می‌باشد. تمامی نمونه‌ها به مقدار ۷ میکروگرم نمونه گذاری شده‌اند.

حد مجاز حضور پلیمر و یا اگریگیت در محصول که از درجه اهمیت بالایی برخوردار است، با استفاده از روش TSK gel G3000 SWXL با ستون پر شده از ژل هیدروفیل سیلیکا بررسی و مقدار قابل قبول با میانگین ۲/۶۷ درصد را نشان داد (شکل ۵ و جدول ۲). اینمی محصول از نظر عدم حضور ویروس‌های پوشش دار منتقل شونده از طریق پلاسما با روش الیزا و تبزایی و توکسیسیتی آن به صورت *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 ۱ و ۲ می‌باشند. پیک‌های هر شکل از سمت چپ و به ترتیب نشانگر حضور پلیمر، دیمر و منومر (پیک بزرگ) در محصول است.



شکل ۳: الکتروفورز محصول نهایی بر روی ژل آگارز. شکل‌های a و b به ترتیب مربوط به سری ساختهای ۱ و ۲ می‌باشند که هر دو مورد خلوص بالای ۹۹ درصد را نشان می‌دهند.

جدول ۲: نتایج آزمایش‌های کیفی محصول نهایی (آلبومن 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	غلاظت 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	پلیمر یا اگریگیت (درصد)
۱۰۸	۹۴	کمتر از ۱۶۰	سدیم (mmol/l)
کمتر از ۰/۰۵	کمتر از ۰/۰۵	کمتر از ۰/۰۵	پتاسیم (mmol/g protein)
اندازه‌گیری نشد	اندازه‌گیری نشد	کمتر از ۲۰۰	آلومینیوم ($\mu\text{g/l}$)
۱/۲	۲/۹	کمتر از ۳۵	فعالیت فعال کننده پره کالیکرین (IU PKA)
۰/۰۱۶	۰/۰۲۹	کمتر از ۰/۱۵	Heme (جدب در ۴۰۳ نانومتر)
مورد قبول	مورد قبول	مورد قبول	پیروژن
مورد قبول	مورد قبول	مورد قبول	توکسیستی
مورد قبول	مورد قبول	مورد قبول	استریلیتی
منفی	منفی	منفی	Anti- HIV
منفی	منفی	منفی	Anti-HCV
منفی	منفی	منفی	HBsAg

مقدار ناخالصی جزیی 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 غلاظت 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، جدازی خمیر V، رسوب‌دهی ناخالصی I و کدورت زدایی نیز حذف گردیده‌اند. ۲) کاهش مصرف مواد به میزان ۹۰ درصد.

ب در تحقیق حاضر مشخص شد در صورتی که خمیر V و مایع رویی ۴ تهیه شده به روش کیسلر- نیشنمن را تحت شرایط کترول 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) حائز اهمیت گردید.

الف) جنبه بیوشیمیابی؛ به علت تراکم بالای آلبومین در خمیر Vd+I، عملآ محبوس شدن ناخالصی‌هایی همچون اتانول، الکتروولیت‌ها 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

بیشتری همچون سنجش آلمینیوم، 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). در صورت تحقیق 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 هم چنین 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 هم چنین نتایج کیفی و کمی به دست آمده از محصول نهایی (نتایج جدول ۲ و بازدهی 24 ± 1 گرم آلبومین به ازای کیلو گرم پلاسما) حاکی از آن است که در صورتی که این روش مورد بررسی

References :

- 1- Matejtschuk P, Dash CH, Gascoigne EW. Production of human albumin solution: a continually developing colloid. British Journal of Anaesthesia 2000; 85: 887-895.
- 2- Mendez CM, McClain CJ, Marsano LS. Albumin therapy in clinical practice. Nutrition in clinical practice. 2005; 20: 314-320.
- 3- 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.
- 4- 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.
- 5- McClelland DBL. Human albumin solutions. ABC of Transfusion. 1990 ; 300: 35-37.
- 6- Curling JM. Albumin purification by ion exchange chromatography. In: Curling JM, editor. Methods of plasma protein fractionation. London: Academic press; 1980: 77-92.
- 7- Kistler P, Nitschmann HS. Large-scale production of human plasma fractions. Vox Sang 1962; 7: 414-424.
- 8- 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.
- 9- 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.
- 10- 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.
- 11- Burnouf T. Plasma protein purification technologies : What is next? Transfusion Today 2000; 42: 11-13.
- 12- Mohr H. Production of human albumin by plasma fractionation. Anasthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther 1999; 34: 773-775.
- 13- British Pharmacopoeia. The British Pharmacopoeia Commission. Vol 2. The stationary office London 1998: 2005-2006.
- 14- 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)

¹*Iranian Blood Research and Fractionation Company*

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

³*Iranian 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 rountine 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