خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۳ شماره ۱ بهار ۸۵ (۴۴-۳۷)

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 استفاده‌گردیده‌است. در مرحله اول با افزودن محلول رویی۴ (سوپرناتانتIV) به خمیر V حل شده در آب مقطر تزریقی و با تنظیم شرایط و استفاده از سانتریفوژ ، محصول حد واسطی به نام خمیرVd+I (خمیر V متراکمی 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 جزیی 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 ۱ ± ۲۴ گرم به ازای کیلوگرم پلاسما به‌دست‌آمد.

نتیجه‌گیری

با اجرای این روش، صرفه‌جویی چشم‌گیری در فرآیند استحصال محصولات حد واسط (خمیرVd+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 : ۸۴/۶/۲۰
تاریخ پذیرش : ۸۴/۱۱/۲۳

۱- مؤلف مسؤول: کارشناس ارشد بیوشیمی ـ مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران و شرکت پژوهش و پالایش خون ـ صندوق پستی ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵
۲- PhD بیوشیمی ـ دانشیار مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران
۳- PhD شیمی دارویی ـ استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران و شرکت پژوهش و پالایش خون
۴- دکترای داروسازی ـ مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران و شرکت پژوهش و پالایش خون

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

سالیانه بیش از صدها تن آلبومین با دو غلظت متفاوت در دنیا ساخته می‌شود. غلظت ۵-۴ گرم درصدی آلبومین، یک محلول ایزوتونیک می‌باشد که در درمان جایگزینی کاهش حجم خون استفاده می‌گردد و غلظت ۲۵-۲۰ 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 (۲، ۱).

روش‌های متعددی بر اساس خواص فیزیکوشیمیایی و بیولوژیکی پروتئین برای تخلیص آلبومین پلاسمای انسانی صورت گرفته‌است (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 (۵، ۴). 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 (۶، ۳). چند سال بعد از کار کوهن و همکارانش، در سال ۱۹۶۲ کیسلر و نیشمن (Kistler - Nitschmann) روشی 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 فن‌آوری نوترکیبی می‌باشند (۱۰-۸، ۶).

اساساً رایج‌ترین روش تهیه آلبومین درمانی، هنوز براساس پالایش پلاسما با اتانل در سرما می‌باشد (۱۱، ۹). 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 متوقف کننده 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 ۲۵-۲۰ گرم درصد، نیازمند تخلیص بیشتر محصول حد واسطی به نام خمیر V (خمیر۵) 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 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 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 g ۱۵/۵۰۰ 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 خمیرVمتراکم(vd+I): ۷۵ کیلوگرم پلاسما مطابق با روش کیسلر ـ 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 کیسلرـ نیشمن به‌دست‌آمده‌بود، به میزان ۵/۸ برابر وزن خمیر در آب مقطر تزریقی حل و دردمای ۱ ± ۳ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت هم‌زده‌شد.

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

Archive of SID
www.SID.ir

درون تانک حاوی خمیر V حل شده اضافه گردید تا pH به ۴/۷ و مقدار الکل به ۳۰ درصد برسد. ضمن این‌که در حین افزایش، به تدریج دمای تانک به ۱۰- درجه سانتی‌گراد کاهش داده‌شد.

در شرایط مذکور به‌منظور رسوب‌دهی مطلوب، مخلوط به مدت ۶ ساعت در حال هم‌زدن نگهداری شد و سپس با استفاده از سانتریفوژ در شرایط دمایی ۱۰- درجه سانتی‌گراد و سرعت خروجی ۷۰ لیتر در ساعت، مقدار ۸/۳ کیلوگرم خمیرVd+I (خمیرV متراکم با کمترین ناخالصی) جداسازی شد.

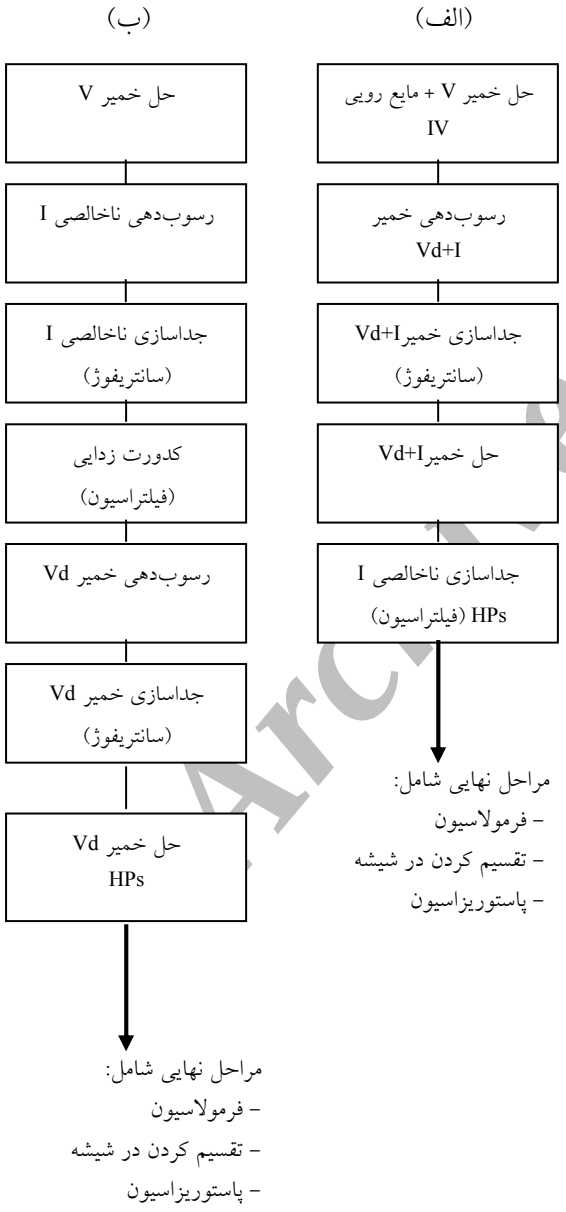
جداسازی ناخالصی پروتئینی از خمیر Vd+I تهیهHPS (High Pure Solution): به منظور حذف ناخالصی‌هایی هم‌چون آلفا گلوبولین‌ها، مقدار ۵/۸ کیلوگرم از خمیر به‌دست‌آمده در آب مقطر تزریقی به‌میزان ۲/۸ برابر وزن خمیر حل گردید تا محلول پروتئینی با غلظت ۸ گرم درصد حاصل شود. محلول مذکور در دمای صفر درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت در حال هم‌زدن 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 اشتراس برگر (Strassburger) ، K3 ۴۰×۴۰ که با اتانل ۵ درصد به دمای ۲+ درجه سانتی‌گراد رسانیده‌شده‌بود عبورداده شد.

تهیه محصول نهایی

دیافیلتراسیون و اولترافیلتراسیون: با استفاده از دستگاه اولترافیلتر فیلترون مجهز به کاست‌های 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 ناخالصی‌هایی همچون آلومینیوم، اتانل باقی‌مانده و پروتئین‌های دناتوره شده احتمالی با وزن مولکولی کمتر از ۱۰ کیلو دالتون استفاده گردید.

هم‌چنین با عمل اولترافیلتراسیون که به‌منظور تغلیظ صورت می‌گیرد غلظت محلول پروتئینی به ۲۲ گرم درصد رسانیده شد.

فرمولاسیون: به منظور پایداری آلبومین در برابر حرارت به‌هنگام 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 روی۷، تنظیم و هم‌چنین جهت تنظیم غلظت آلبومین و سدیم به‌ترتیب آب مقطر تزریقی و سدیم کلراید در حد الزام فارماکوپه افزوده‌شد (۱۳).



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

Archive of SID
www.SID.ir

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 به‌کار 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 سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ساعت حرارت داده شد تا بدین‌وسیله از احتمال انتقال ویروس‌های قابل انتقال از پلاسما مانند ویروس‌های هپاتیت وHIV ممانعت به‌عمل آید،ضمن این‌که بدین طریق پایداری ملکول آلبومین از نظر دناتوره‌شدن و یا تشکیل پلیمر در برابر حرارت نیز قابل بررسی می‌گردد(۱۴).

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

یافته‌ها

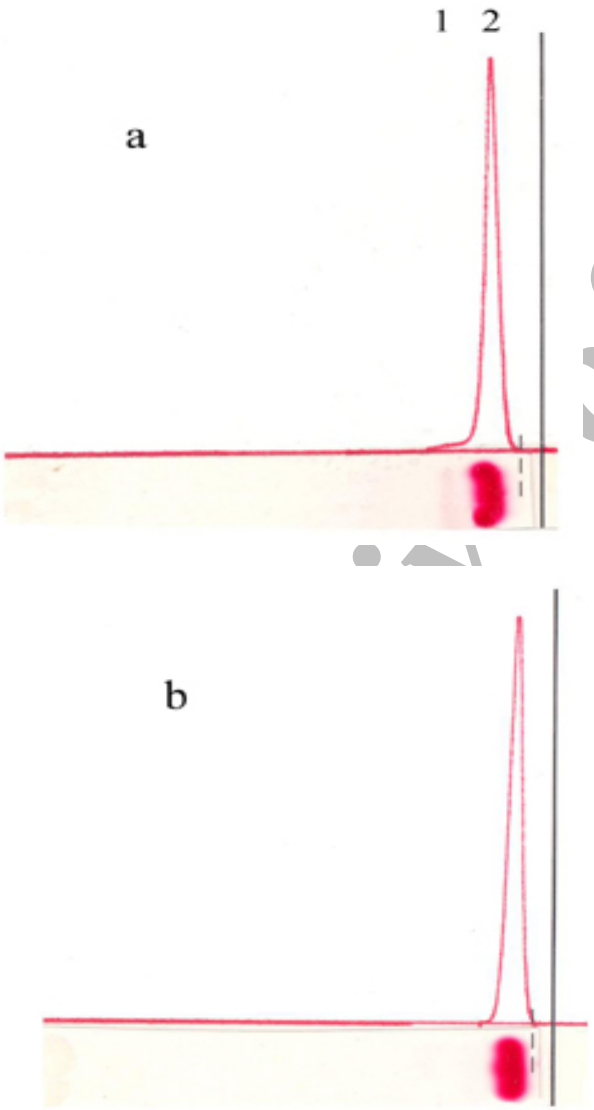
ارزیابی کیفیت محصول حدواسط : علیرغم کاهش عملیات در فرایند تهیه محصولات حد واسط ، مقایسه خمیر Vd+I تهیه شده به‌روش پیشنهادی با خمیرهای Vd و V به‌عنوان محصولات حد واسط ، حاکی از اختلاف محسوسی در کیفیت دو نوع خمیرVd+I و V و شباهت بسیار نزدیکی در خمیرهای Vd+1 و Vd که با روش رسوب‌دهی با اتانل در سرما تهیه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

جدول۱: مقایسه خمیرVd+I با خمیرهای V و Vd رایج

اختصاصات	خمیر V	خمیر Vd+I	خمیر Vd
پروتئین(درصدخمیرW/W)	۱۷/۵	۳۲	۳۲
آلبومین(درصدخمیرW/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 به‌دست آمده‌است.**

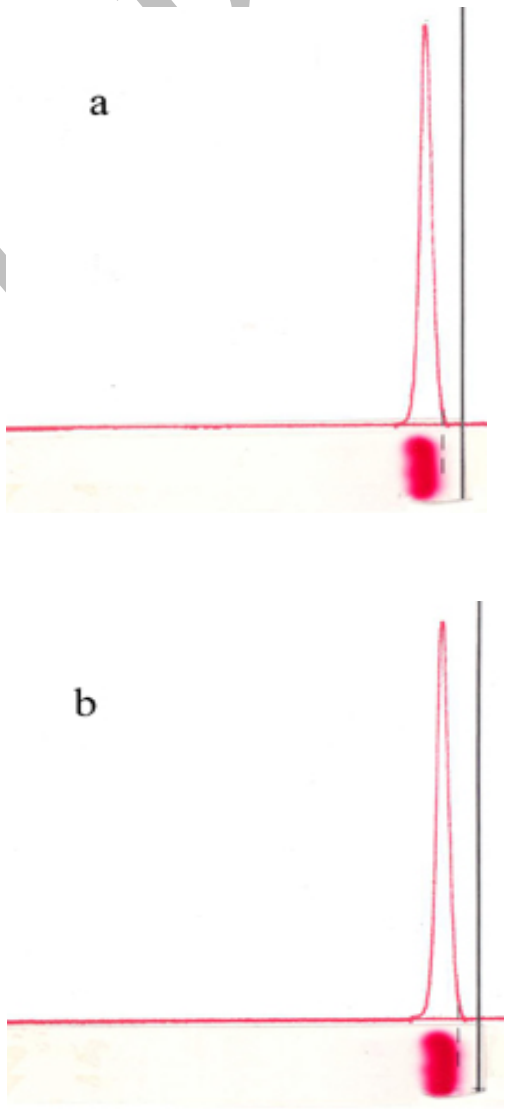
هم‌چنین به‌منظور نشان دادن خلوص خمیر Vd+I قبل و بعد از فیلتراسیون ژرف که به‌منظور حذف ناخالصی از جنس آلفا گلوبولین‌ها صورت‌گرفت ، الکتروفورز بر روی ژل آگارز انجام‌گردید که این حذف ناخالصی در شکل ۲ نمایش داده شده است.



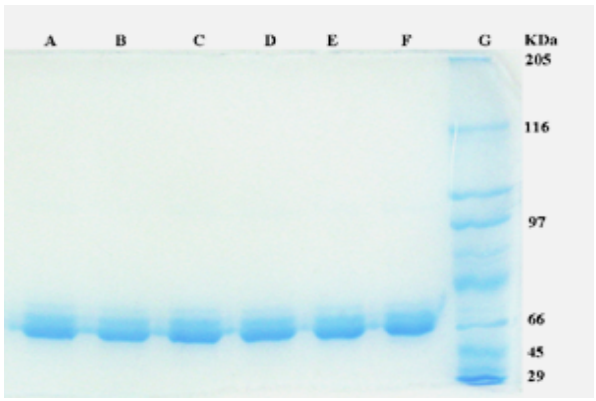
شکل۲: الکتروفورز خمیر Vd+I. قبل از فیلتراسیون (a) پیک ۱ ناخالصی آلفا گلبولین‌ها به میزان ۲/۵ درصد و پیک ۲ مربوط به آلبومین می‌باشد. پس از فیلتراسیون (b) ناخالصی حذف و خلوص آلبومین به بیش از ۹۹ درصد رسیده‌است. نمونه‌گذاری به حجم یک میکرولیتر و با غلظت پنج گرم درصد می‌باشد.

www.SID.ir

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 ۱و۲) و در ظروف نهایی صورت گرفت که نتایج کاملاً رضایت‌بخشی را در برداشت به‌طوری‌که ظاهر محلول شفاف و به رنگ زرد ـ سبز بود و درجه خلوص آلبومین، بیش از ۹۹ درصد را نشان داد (شکل۳). انجام آزمایش SDS-PAGE نیز به‌منظور تأیید کیفیت محصول صورت گرفت (شکل۴).

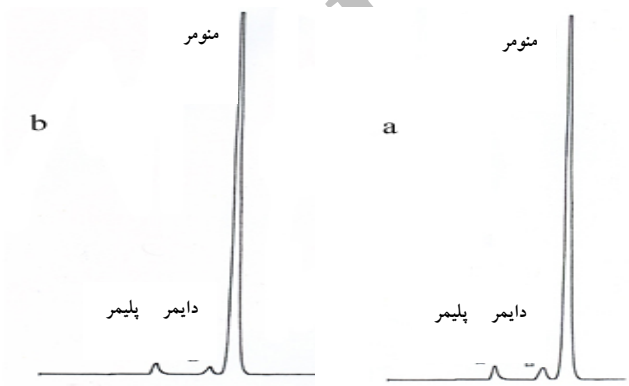


شکل ۳: الکتروفورز محصول نهایی بر روی ژل آگارز. شکل‌های a و b به ترتیب مربوط به سری ساخت‌های ۱و۲ می‌باشند که هر دو مورد خلوص بالای ۹۹ درصد را نشان می‌دهند.



شکل۴: 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 به‌ترتیب مربوط به یک محصول تجاری و پروتئین سایز 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 هیدروفیل 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).



شکل۵ : کروماتوگرافی HPLC محصول نهایی. شکل‌های a و b به‌ترتیب مربوط به سری ساخت‌های ۱و۲ می‌باشند. پیک‌های هر شکل از سمت چپ و به‌ترتیب نشانگر حضور پلیمر، دیمر و مونومر (پیک بزرگ) در محصول است.

Archive of SID
www.SID.ir

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

نوع آزمایش	الزامات فارماکوپه	نتایج	
		سری ساخت ۱	سری ساخت ۲
شکل ظاهری محلول	شفاف	شفاف	شفاف
pH	۶/۷ تا ۷/۳	۶/۹۵	۷/۰۵
غلظت پروتئین (گرم درصد)	۱۹ تا ۲۱	۱۹/۹	۲۰/۰
میزان خلوص (درصد)	بیش یا برابر با ۹۵	بیش از ۹۹	بیش از ۹۹
توزیع اندازه ملکولی مونومر + دیمر (درصد)	بیش یا برابر با ۹۵	۹۶/۸۵	۹۷/۸۱
پلیمر یا اگریگیت (درصد)	کمتر یا برابر با ۵	۳/۱۵	۲/۱۹
سدیم (mmol/l)	کمتر از ۱۶۰	۹۴	۱۰۸
پتاسیم (mmol/g protein)	کمتر از ۰/۰۵	کمتر از ۰/۰۵	کمتر از ۰/۰۵
آلومینیوم (µg/l)	کمتر از ۲۰۰	اندازه‌گیری نشد	اندازه‌گیری نشد
فعالیت فعال کننده پره کالیکرین PKA (IU)	کمتر از ۳۵	۲/۹	۱/۲
Heme (جذب در ۴۰۳ نانومتر)	کمتر از ۰/۱۵	۰/۰۲۹	۰/۰۱۶
پیروژن	مورد قبول	مورد قبول	مورد قبول
توکسیسیتی	مورد قبول	مورد قبول	مورد قبول
استریلیتی	مورد قبول	مورد قبول	مورد قبول
Anti- HIV	منفی	منفی	منفی
Anti-HCV	منفی	منفی	منفی
HBsAg	منفی	منفی	منفی

بحث

در تحقیق حاضر مشخص شد در صورتی‌که 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 خمیرVd رایج را داشته باشد (جدول۱). 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 خمیرVd+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 جزیی را نیز حذف نموده و محلول آلبومین با خلوص بالای ۹۹٪ به‌دست‌آوریم (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 گرفته‌است، به‌طوری‌که 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.

Archive of SID
www.SID.ir

اتانل مورد نیاز جهت تمامی رسوب‌دهی‌ها، از اتانل موجود در مایع رویی IV (حاوی ۴۰٪ اتانل) تأمین گردید و عملاً صرفه‌جویی چشم‌گیری در مصرف این ماده بر خلاف روش‌های رایج کوهن و کیسلر ـ نیشمن حاصل شد(۶، ۳). ۳)کاهش به‌کارگیری نیروی انسانی در حدود ۵۰ درصد. با توجه به کاهش مدت زمان انجام کار و هم‌چنین جایگزین نمودن فیلتراسیون به‌جای سانتریفوژ که عملاً کار کردن با سانتریفوژ نیازمند کار و نیروی انسانی به مراتب بیشتری نسبت به فیلتراسیون می‌باشد، این کاهش صورت گرفت.

نتیجه‌گیری

صرفه‌جویی‌های مکرر مذکور و هم‌چنین نتایج کیفی و کمی به‌دست‌آمده از محصول نهایی (نتایج جدول ۲ و بازدهی ۱±۲۴ گرم آلبومین به ازای کیلوگرم پلاسما) حاکی از آن است که در صورتی که این روش مورد بررسی بیشتری هم‌چون سنجش آلومینیوم،اعتباردهی ویروس‌زدایی (بیش از نیم قرن می‌باشد که روش پاستوریزاسیون بر روی محصول آلبومین اعمال می‌گردد و تا کنون عدم موفقیتی مبنی بر انتقال ویروس از این محصول گزارش نشده‌است) و یا دیگر مطالعات لازم نیز قرار بگیرد، امکان بهره‌برداری 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 می‌یابد (محاسبه دقیق هزینه‌ها امری پیچیده‌است و نیازمند انجام محاسبات در زمینه حسابداری صنعتی می‌باشد)، بلکه با توجه به صرفه‌جویی به‌دست‌آمده در زمینه کاهش مدت زمان انجام کار، امکان افزایش تولید این محصول نیز به‌طور هم‌زمان میسر می‌گردد.

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 or 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 Biochmical 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 Schmerather 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.

Archive of SID
www.SID.ir

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

Archive of SID

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*

www.SID.ir