مقدمه

- انسولین انسانی «پلی پپتیدی»است که دارای ۵۱ اسید آمینه است و آرایش آنها به صورت دو زنجیر می‌باشد: یکی زنجیر A با ۲۱ اسید آمینه و دیگری زنجیر B که شامل ۳۰ اسید آمینه می‌باشد. زنجیرهای A و B توسط دو پیوند «دی سولفید» بیکدیگر متصل می باشند. انسولین انسانی داردی وزن مولکولی ۵۷۳۴ ونقطه ایزوالکتریک ان ۵/۴ است.

انسولین انسانی از چهار روش مختلف بدست آمده است:

- استخراج از پانکراس انسان
- سنتز شیمیایی توسط آمینواسیدهای منفرد.
- تبدیل انسولین خوک و یا روش نیمه سنتز
- تخمیر میکروارگانسیم‌هایی که برروی آن مهندسی ژنتیکی انجام شده است.

بررسي روشها :

- روش استخراج از پانکراس انسانی عملی نیست زیرا بدست آوردن ماده اولیه بسیار مشکل است و همیشه ترس از اشاعه عوامل عفونت‌زا وجود دارد.
- روش سنتز کامل، گرچه از لحاظ فنی، اجرایی است ولی از لحاظ اقتصادی شدنی نیست زیرا بازدهی آن بسیار کم می‌باشد.

- . تهیه انسولین از انسولین خوک که آنرا روش «نیمه سنتزی» نیز می‌نامند، باعث می شود که مولکول انسولین خوک از طریق استخلاف یک آمینواسید (ترئونین) توسط "آلانین"، دقیقاً به مولکول انسولین انسانی تبدیل شود. این تکنولوژی را اول بار دانمارک بکار گرفت. در هر صورت این روش نیز خیلی گران است زیرا برای استفاده از این روش باید مقدار زیادی پانکراس خوک را در اختیار داشت.

روشهاي ديگر:

- حداقل دو روش دیگر برای تولید انسولین انسانی با استفاده از عمل تخمیر و استفاده از فناوری DNA بازترکیبی وجود دارد.
- ۱) روش دو زنجیر
- ۲) روش پروانسولین

روش دو زنجیر :

اولین فناوری موفق در بیوسنتز انسولین انسانی که مبتنی بر DNA بازترکیبی است، روش دو زنجیر است. این فناوری توسط شرکت Genentech,Inc (جنوب سانفرانسیسکو) ابداع شد و توسط شرکت Eli Lilly (ایندیانا پولیس) تکمیل گردید. هر زنجیر انسولین از یک پروتئین فیوژن «بتا گالاکتوسیداس» در Escherichia coli بدست مي‌آید. این دو زنجیر «پپتید» از مواد درون سلولی بدست مي آید سپس تصفیه شده و نهایتاً انسولین انسانی از آن حاصل مي‌شود. در مراحل بعد، «بتا گالاکتوسیداس» با «تریپ توفان» جایگزین می‌شود و در نتیجه اینکار بازدهی افزایش مي‌یابد.

روش پروانسولین :

- این روش که موسوم به روش بین سلولی ساختن پروانسولین است، باعث عدم نیاز به تخمیر جداگانه و تصفیه ای که در روش دو زنجیره مورد نیاز است، می‌گردد. در این روش پروانسولین دست نخورده بوجود می آید. تهیه پروانسولین توسط شرکت Eli Lilly به تولید تجاری رسیده است. در شکل ۱-۱۲ مراحل مختلف تبدیلات دیده می شود. سلول های E. coli به مقدار زیاد Trpo-LE-Met-proinsulin تولید می‌کنند (که عبارت از یک پپتید آمینو اسید ۱۲۱ تائی است) که بازیابی شده و قابل انحلال می‌شوند. پروانسولین از طریق شکستن میتونین، با استفاده از CNBr، بدست مي آید.

زنجیر پروانسولین وارد فرایند طولانی خاصی شده که باعث می‌گردد پیوندهای بین مولکولی دی سولفید تشکیل شود و «Cpeptid» که زنجیرهای A و B داخل پروانسولین را با یکدیگر مرتبط می‌کند، بعداً توسط آنزیم‌ها شکسته می‌شود. و انسولین انسانی بدست مي‌آید. تعدادی مرحله کروماتوگرافی و صاف کردن غشایی برای خالص کردن ماده تولید شده به کار برده می شود.

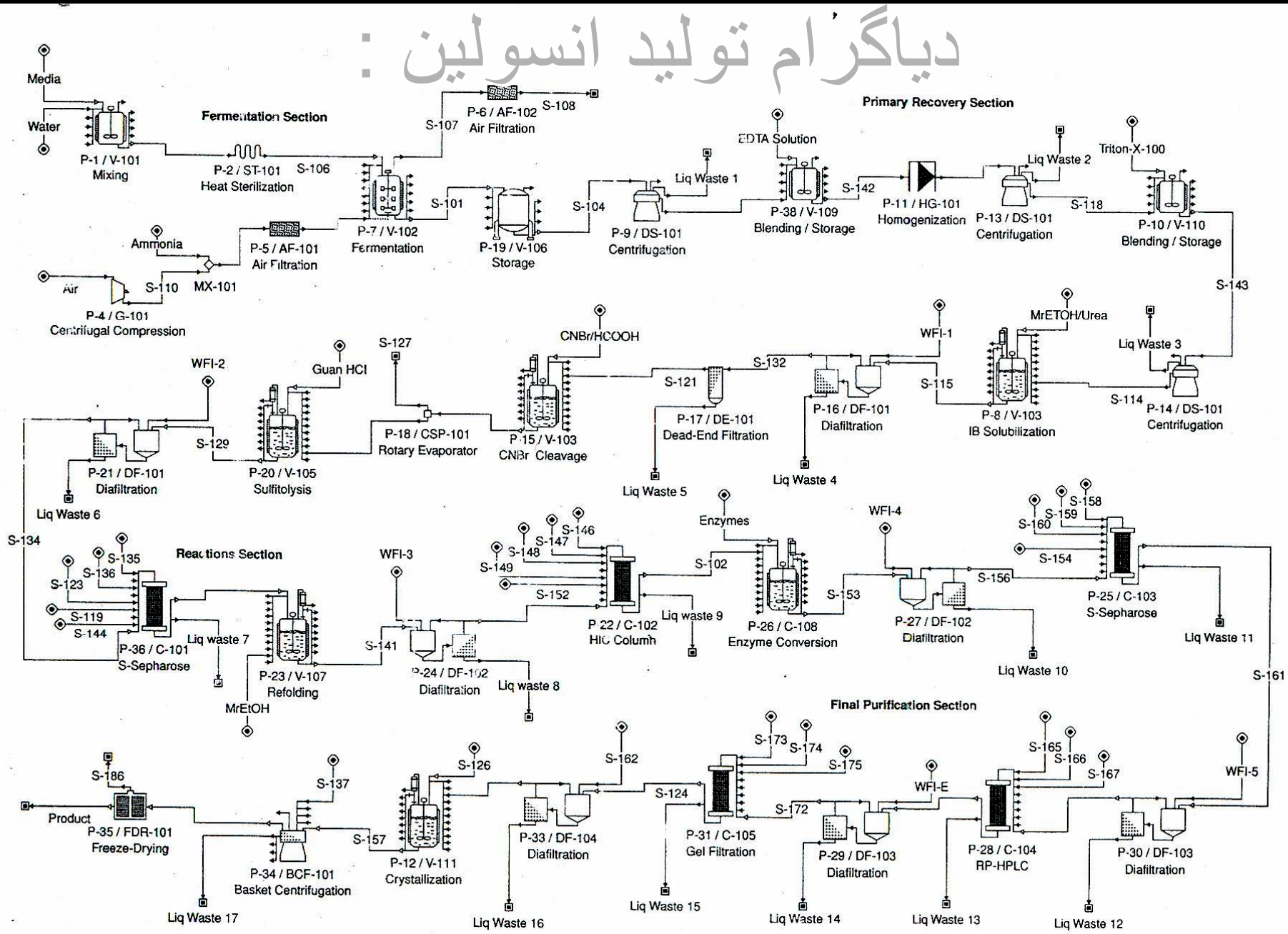
تجزیه و تحلیل بازار و مبنای طراحی :

- بازار جهانی انسولین تهیه شده از طریق سنتز به ۴-۳/۵ میلیارد دلار بالغ می‌گردد که دست اندرکاران عمده آن شرکت‌های Noro Nordisk ، Eli Lilly و Sanofi Aventis می‌باشند. بازار برای تولیدات انسولین بالاتر است زیرا این بازار شامل مخارج متفرقه منجله بسته بندی نیز می گردد. معالجه توسط انسولین به معنای استفاده از ۰/۵ گرم انسولین خالص توسط هر بیمار در یک سال می‌باشد.
- با توجه به تعداد کل بیماران دیابت در سراسر جهان (که بالغ بر ۱۵۰ تا ۲۰۰ میلیون نفر می‌باشد)، میزان انسولین خالص مورد نیاز در هر سال به ۷۵۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰۰ کیلوگرم بالغ می‌گردد.

شرح فرآیند :

۱) مراحل تولید BHI به ۴ قسمت تقسیم مي‌گردد:
۲) تخمیر
۳) بازیابی اولیه
۴) فعل و انفعال
۵) تخلیص نهایی.

دیاگرام تولید انسولین :



قسمت تخمیر:

- عمل تخمیر در یک مخزن فولاد ضدزنگ (V-101) صورت می‌گیرد و در یک دستگاه استریل کننده با گرمای ممتد، استریل می شود (St-101) . کمپرسور محوری (G-101) و صافی مطلق (AF-101) هوای استریل و آمونیاک را با نرخ ۰/۵ VVM به محفظه تخمیر وارد می‌نماید

- . یک هسته دو مرحله‌ای تخمیرکننده (که در این دیاگرام نشان داده نشده) مورد استفاده قرار می‌گیرد تا ۵۰ مترمکعب تخمیر کننده را، وارد سیستم نماید. این سلول‌ها برای تولید Trp-LE-MET-proinsulive که مقدمه انسولین است و در «بیوماس» سلولی نگهداری می شود، مورد استفاده قرار می‌گیردزمان تخمیر در مخمر تولید تقریباً ۱۸ ساعت است و درجه حرارت محیط تخمیر ۳۷ درجه سانتیگراد می‌باشد.

- غلظت نهایی E.coli در مخمر تولید تقریباً ۳۰ گرم در لیتر (وزن خشک سلول) می باشد. «Trp-LE-MET-proinsulin» به صورت بین سلولی زیاد می شود که به صورت جرم نامحلول است و این کار باعث افزایش درصدی است که در آن درصد، پروتئین توسط آنزیم‌های پروتئولیک تقلیل می‌یابد.
- در پایان عمل تخمیر مایع را تا ۱۰ درجه سانتیگراد خشک می کنند تا از تجزیه سلول‌ها جلوگیری به عمل آید.
- بعد از اینکه در قسمت تخمیر تمام مراحل انجام گرفت دستگاه را کاملاً تمیز می‌کنند تا آنرا برای انجام سری بعدی کار آماده نگهدارند.

قسمت های جریان Downstream:

- قسمت بازیابی اولیه
- قسمت فعل و انفعالات

- قسمت بازیابی اولیه:

بعد از پایان یافتن عمل تخمیر، مایع به داخل یک تانک مخصوص (v-106) انتقال می یابد که در این تانک دو قسمت مربوط به جریان بالائی و پائینی از یکدیگر جدا می‌گردند. سه دستگاه سانتریفوژ (disk-stack) که به صورت موازی با یکدیگر کار می‌کنند برای جمع آوری سلول ها به کار برده می‌شوند.

- ضریب بازیابی سلولی ۹۸٪ می باشد. لجن سلولی را با یک محلول بافر هم حجم رقیق می‌کنند و برای اینکار از یک تانک بهمزن v-109 استفاده می‌نمایند .
- بافر فوق باعث تسهیل در جدا شدن ذرات زائد از مواد درون سلولی می شوند.

- در مرحله بعدی یک دستگاه هموژن کننده ای که با فشار بالا کار می کند (HG-101) برای خرد کردن سلول‌ها و آزادسازی مواد درون سلولی به کار گرفته می شود. مایع در این محیط سه بار تحت افت فشار ۸۰۰bar قرار می‌گیرد. دمای خروجی در ۱۰ درجه سانتیگراد ثابت نگهداشته می شود .

- . این IBSها در یک فاز سنگین (با بازدهی ۹۸٪) بازیابی می شوند این کار به این دلیل امکان پذیر است که چگالی (۱/۳) و اندازه (قطر تقریباً ۱) مواد IBS تا حدودی از ابعاد زوائد ذرات بیشتر است. لجن IB که تقریباً دارای ۲۰٪ مواد جامد ۶۶٪ تریتون x۱۰۰ می‌باشد شستشو می‌شود و دوباره با استفاده از همان سانتریفوژ ها (p-14) بطور مجدد سانتریفوژ می‌گردد (D-101).

قسمت فعل و انفعالات:

- حلال سازی ذرات درون سلولی :
- محلول حاوی ذرات معلق ذرات درون سلولی در داخل یک مخزن شیشه‌ای شکل وارد می شود (v-103) و در آنجا با مخلوطی از اوره و «۲- مرکاپتو اتانول» که غلظت حداکثر هریک از آنها به ترتیب g/lit(5M) ۳۰۰ و gr/lit ۴۰ است مجاور می گردد.

- . زمان فعل و انفعال ۸ ساعت است و در پایان ضریب انحلال به ۹۵٪ می رسد ذرات درون سلولی ترکیب شده از ۸۰٪ ماده Trp-LE-MET-proinsulin و ۲۰٪ بقیه سایر پروتیئن‌ها می باشند. در پایان فعل و انفعال انحلال زایی، یک واحد صافی (DF-10) مورد استفاده قرار می‌گیرد تا «اوره» و «۲-مرکاپتواتانول» را با WFI جایگزین نماید و غلظت محلول را افزایش دهد. زمان این عملیات ۶ ساعت است و ضریب بازیابی ۹۸٪ می‌باشد.

سولفیتولیز:

- سولفیتولیز پروانسولین در راکتور (V-103) و در محیط قلیائی (PH 9-11) انجام می گیرد.
- این کار برای آشکار شدن پروانسولین، شکستن تمام پیوندهای دی سولفید و اضافه کردن SO_3 به تمام بازمانده های سولفوری سیس‌تئین‌ها می‌باشد.
- محصول مطلوب پروانسولین انسانی یا (Protein-S-sulfonate)، می‌باشد.

- . مخلوط نهایی سولفیتولیز دارای guanidine.Hcl(6M) ۵۰٪، ۰/۳۵ درصد بیکربنات آمونیم، سه درصد So3Na2 و ۱/۵ درصد S4O6Na2می‌باشد.

- زمان واکنش ۱۳ ساعت می باشد که در پایان این مدت بازدهی ۹۵٪ است.

- پس از تکمیل فعل و انفعال سولفیتولیز، محلول سولفیتولیز با WFI تعویض می‌شود تا آنکه غلظت گوانیدین هیدروکلریک به ۲۰٪ برسد. این فرایند (p-21) از «دیافیلتر» DF-101 استفاده می‌کند که تبادل بافر را بعد از انحلال‌زایی IB، کنترل می‌نماید. پروانسولین انسانی سپس با استفاده از کروماتوگرافی و با استفاده از سه ستون تعویض یون (c-101) تخلیص می گردد. (این سه ستون به صورت موازی قرار دارند). هر ستون دارای قطری برابر ۱۴۰ سانتیمتر است و عمق بستر نیز ۲۵ سانتیمتر می‌باشد.

فرضیات مربوط به اجرای این عملیات باین شرح است:

۱) ستون به مدت ۳۰ دقیقه قبل از بارگذاری، متوازن می شود
۲) ظرفیت کلی binding رزین برابر ۲۰ است
۳) حجم مایع، پنج برابر حجم ستون است
۴) حجم کل محلول ها برای شستشوی ستون ها، باز تولید و ذخیره سازی CVs ۱۵ است
۵) پروتئین مورد نظر در CVs ۱/۵ محلول بافر و با ضریب بازیابی ۹۰٪ بدست می‌آید.

ری فولدینگ (refolding):

- این عملیات باعث کاتالیز شدن جداسازی SO_3^{-2} می گردد و سپس امکان می دهد که پیوندهای دی سولفید تشکیل شود و ری فولدینگ صحیح پروانسولین به شکل طبیعی خود انجام شود. این عملیات در یک راکتور بشکه ای (V-107) انجام می‌شود. این مرحله از فرایند شامل کار با مرکاپتواتانول، ماده احیا کننده‌ای که فعل و انفعال تبادل درونی دی سولفید را آسان می سازد، می باشد. این ماده به میزان ۱/۵ مول در یک مول از SO_3^{-2} اضافه می شود. لازم است غلظت پروانسولین به کمتر از یک گرم در لیتر برسد تا اینکه از «کراس فولدینگ» مولکول پروانسولین جلوگیری به عمل آید.

- . این فعل و انفعال در حرارت ۸ درجه سانتیگراد انجام می شود که بعد از ۱۲ ساعت بازدهی آن به ۸۵٪ می‌رسد. بعد از کامل شدن مرحله «ری فولدینگ» ، عامل ری فولدینگ را با WFI تعویض می‌نماید و محصول پروتئین با استفاده از یک واحد«دیافیلتراسیون» (DF-102) تغلیظ می‌گردد که باعث بدست اوردن بازدهی ۹۵٪ (۵٪ تقلیب کننده پروتئین). حجم محلول در این مرحله حدود ۵۰۰۰L می‌باشد. سپس پروانسولین انسانی با استفاده از کروماترگرافی در یک ستون فعل و انفعال هیدروفوبیک (HIC). خالص می‌گردد .

در مورد این عملیات فرض های زیر برقرار است :

- ستون‌های بمدت ۳۰ دقیقه قبل از بارگذاری متوازن شده‌اند
- ظرفیت کل binding رزین برابر ۲۰ است.
- حجم مایع شش برابر حجم ستون می باشد.
- حجم کل محلول هایی که برای شستشو، باز تولید و ذخیره سازی بکار می رود برابر ۱۵ CVs می باشد