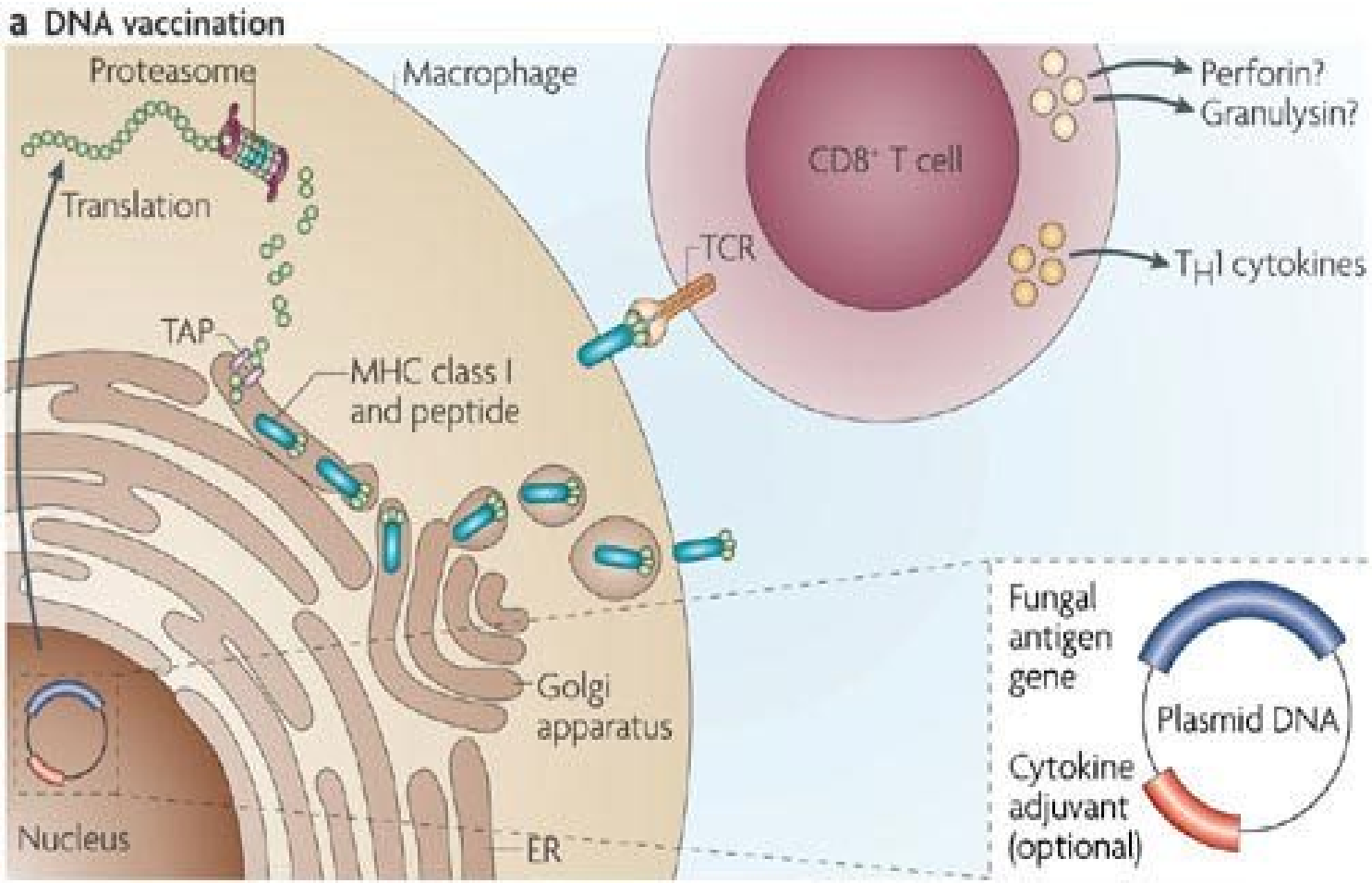
Plasmid DNA

استاد راهنما:
جناب آقاي دكتر عموعابديني

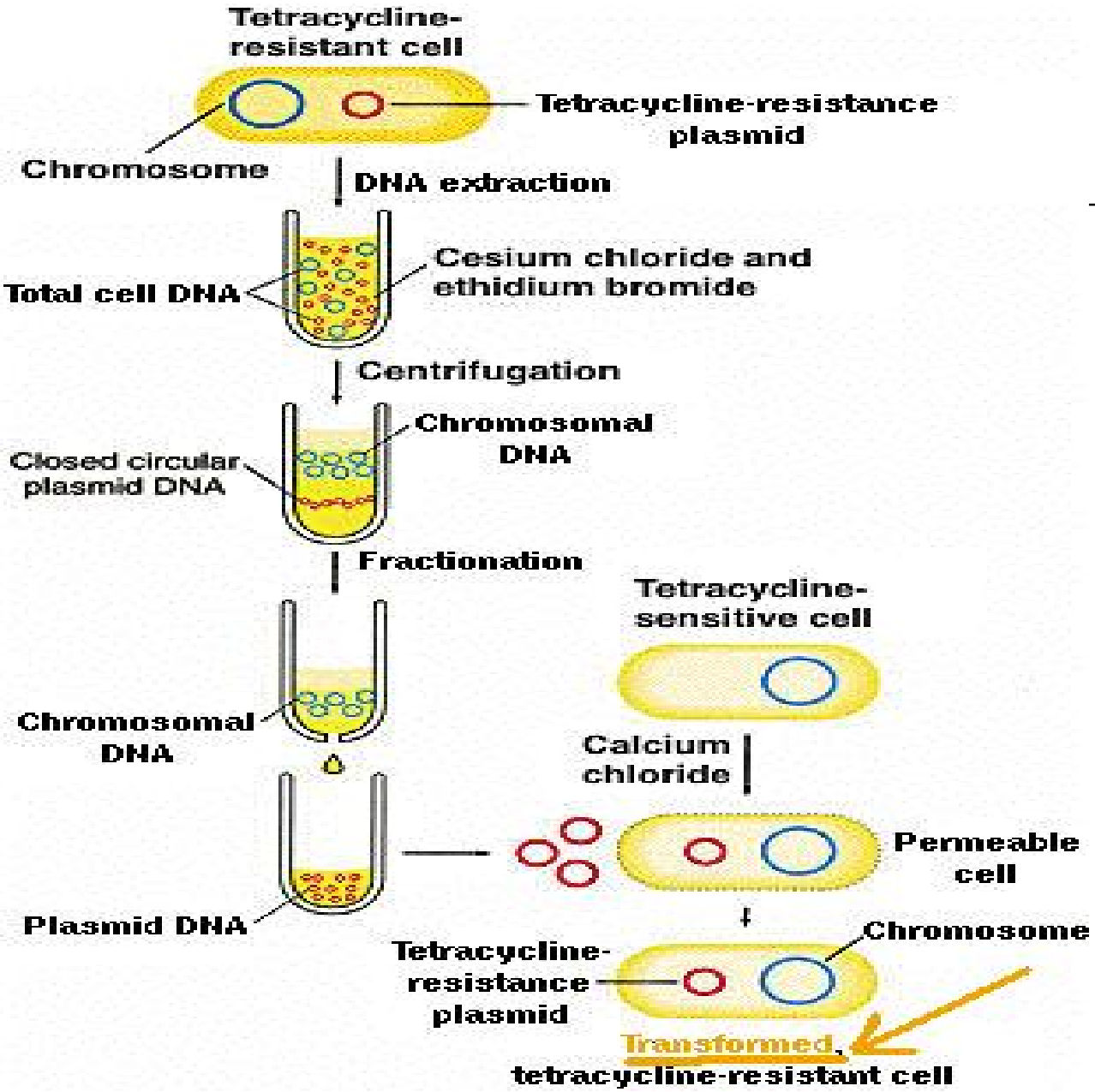
بهاره كرمي مقدم
٨١٠٤٨٣١٠٠

هيلدا فدايي خويي
٨١٠٤٨٣٢٠٢

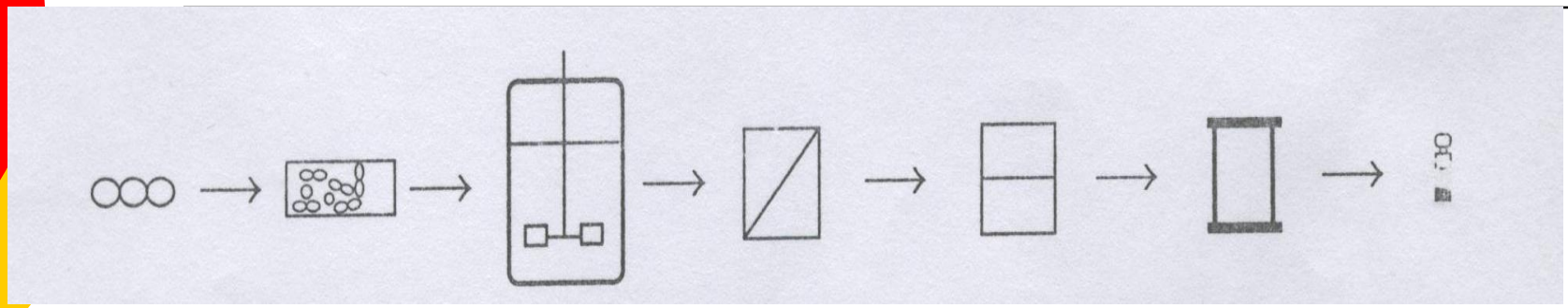
- درمان توسط ژن و واکسیناسیون **DNA**به گروه جدیدی از درمانهای مولکولی تعلق دارد که از نوکئیک اسید و عوامل پیشگیری کننده سلولها استفاده می کنند .
- مولکولهای **pDNA** حاملان بیش کروموزومی اطلاعات ژنتیکی هستند که داخل سلول هدف قرار مي گيرند.(بدون صدمه زدن)
- در باكتري و گاهي در موجودات ئوكاريوتيك


a DNA vaccination
Proteasome
Macrophage
Translation
TAP
MHC class I
and peptide
TCR
CD8+ T cell
Perforin?
Granulysin?
TH1 cytokines
Golgi
apparatus
Nucleus
ER
Fungal
antigen
gene
Plasmid DNA
Cytokine
adjuvant
(optional)

- دردرمان کامل یا واکسیناسیون یک فرد ، ممکن است به مقادیری در حد میلی گرم از **pDNA** احتیاج باشد.مشخصا ، تولید **pDNA** در مقیاسهای بزرگ احتیاج است تا خواسته میزان زیاد ژن درمانی و استفاده از واکسنهای **DNA** را که از آزمایشگاه به آزمایشهای کلینیکی و سرانجام به بازار منتقل می شود را تامین کند.


Tetracycline-resistant cell
Tetracycline-resistance plasmid
Chromosome
DNA extraction
Cesium chloride and ethidium bromide
Total cell DNA
Centrifugation
Chromosomal DNA
Closed circular plasmid DNA
Fractionation
Tetracycline-sensitive cell
Chromosomal DNA
Calcium chloride
Permeable cell
Plasmid DNA
Chromosome
Tetracycline-resistance plasmid
Transformed tetracycline-resistant cell

- پلاسمیدها در محیط طبیعی توسط میکروبهای گیاهی **Escherichicoli** با هم ترکیب می شوند.
- فرایند تولید **pDNA** یک کشت سلول در آزمایشگاه (تخمیر) و سپس با یک سری عملیات پایین دستی به صورت شکل **[15-1]** دنبال می شود.



شکل۵-۱شکل اجمالی یک نمونه از فرایند تولید pDNA

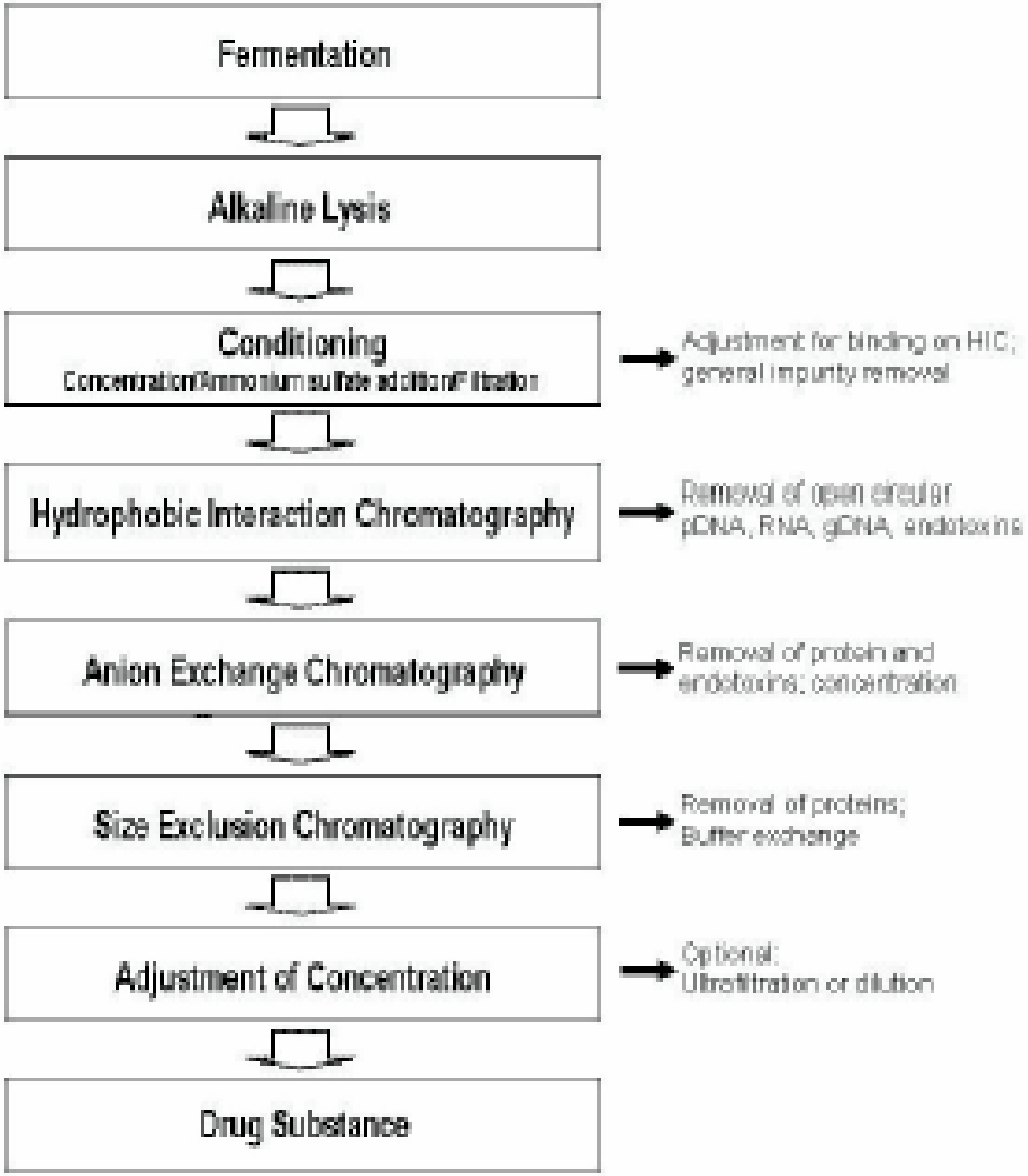
معرفی مسئله

- فرایند در مقیاس آزمایشگاهی (**Bench**)
- اکثر داده های خام تولید و خالص سازی مقیاس آزمایشگاهی با استفاده از واکسن تجربی **DNA 7067 bp**.
- این واکسن ویروس هاری را کد گذاری می کند

طراحی فرایند

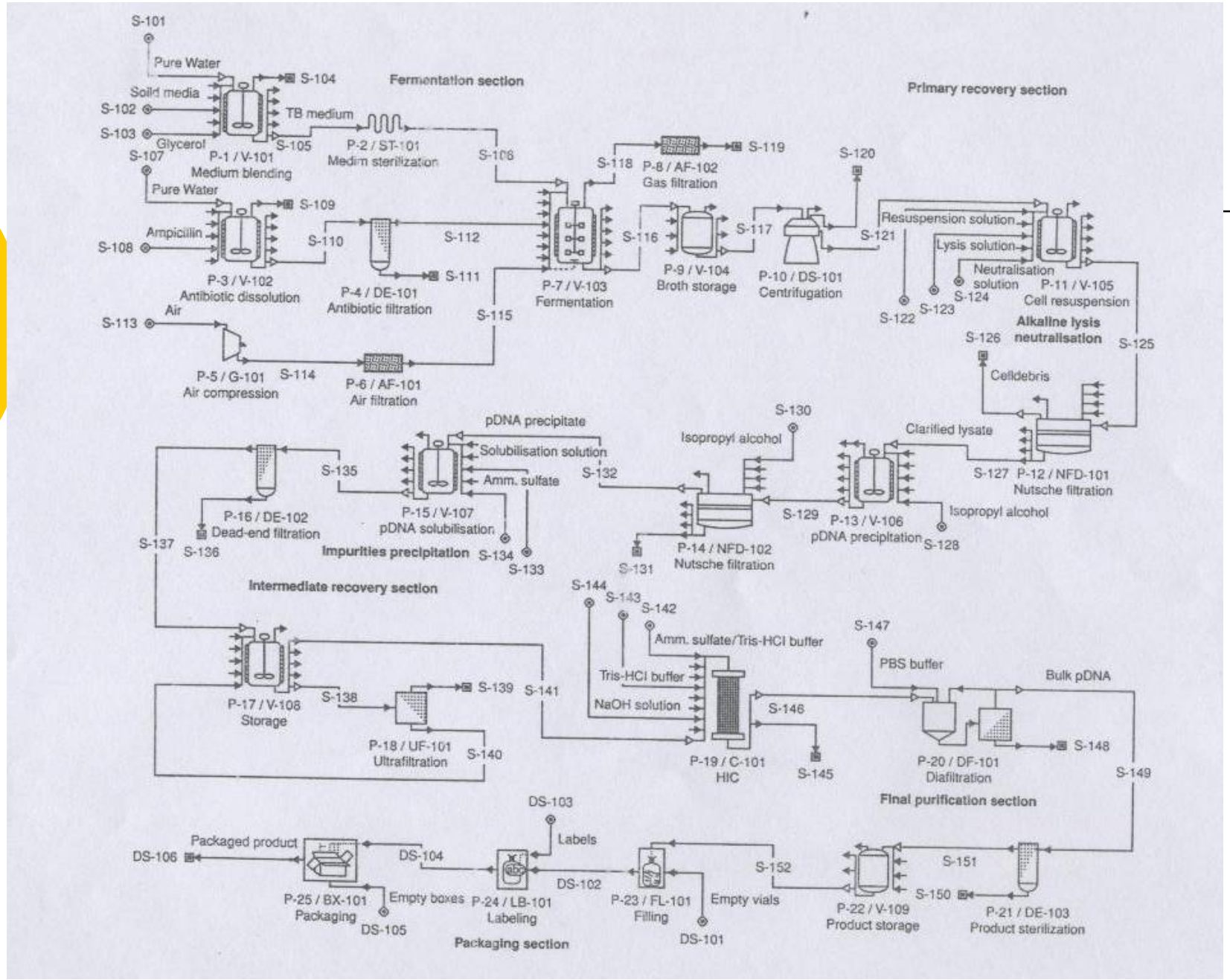
- ظرفیت حدودا ۱۴۱**gr** از **pDNA** خالص را در هر قسمت در نظر گرفته ایم.
- واحد صنعتی طراحی شده است تا ۳۳۰ روز در سال کار کند.
- ۴۸ ساعت یک قسمت دوباره راه انداخته شود.این برابر است با ۱۶۴ قسمت و ۲۳,۲ **kg** از **pDNA** در سال.

Process steps of the developed pDNA production process and their function.



شرح فرایند

- کل فرایند تولید **pDNA** به صورت شکل ۱۵-۲ می باشد.
- فرایند به ۵ قسمت تقسیم می شود:تخمیر،بازیافت اولیه،بازیافت میانی ، تصفیه نهایی و پر کردن و مرحله ی بسته بندی.
- بازده کلی بازیافت **pDNA** در هر قسمت ، حدودا ۶۵% است
- زمان هر قسمت واحد صنعتی تقریبا ۶۴ ساعت است که در هر ۴۸ ساعت هر قسمت دوباره شروع به کار می کند.


S-101
Pure Water
S-104
Fermentation section
Primary recovery section
Solid media
S-102
S-103
Glycerol
TB medium
S-105
P-2 / ST-101
Medim sterilization
S-106
S-107
P-1 / V-101
Medium blending
S-118
P-8 / AF-102
Gas filtration
S-119
S-120
Pure Water
S-109
Ampicillin
S-108
S-110
S-112
S-116
S-117
S-121
Resuspension solution
Lysis solution
Neutralisation solution
S-124
P-11 / V-105
Cell resuspension
P-3 / V-102
Antibiotic dissolution
P-4 / DE-101
Antibiotic filtration
S-111
P-7 / V-103
Fermentation
P-9 / V-104
Broth storage
P-10 / DS-101
Centrifugation
S-122
S-123
Alkaline lysis
neutralisation
S-126
S-125
Air
S-113
S-115
P-5 / G-101
Air compression
S-114
P-6 / AF-101
Air filtration
Celldebris
pDNA precipitate
Solubilisation solution
Amm. sulfate
S-135
S-132
S-130
Isopropyl alcohol
Clarified lysate
S-127
P-12 / NFD-101
Nutsche filtration
P-16 / DE-102
Dead-end filtration
S-136
S-137
P-15 / V-107
pDNA solubilisation
Impurities precipitation
S-134
S-133
S-131
P-14 / NFD-102
Nutsche filtration
S-129
P-13 / V-106
pDNA precipitation
Isopropyl alcohol
S-128
Intermediate recovery section
S-144
S-143
S-142
Amm. sulfate/Tris-HCl buffer
S-147
PBS buffer
Bulk pDNA
Tris-HCl buffer
NaOH solution
S-146
S-148
P-17 / V-108
Storage
S-138
S-139
S-141
P-18 / UF-101
Ultrafiltration
S-140
P-19 / C-101
HIC
S-145
P-20 / DF-101
Diafiltration
S-149
Final purification section
DS-103
Labels
Packaged product
DS-106
DS-104
DS-102
S-152
S-151
S-150
P-25 / BX-101
Packaging
Empty boxes
DS-105
P-24 / LB-101
Labeling
P-23 / FL-101
Filling
Empty vials
DS-101
P-22 / V-109
Product storage
P-21 / DE-103
Product sterilization
Packaging section

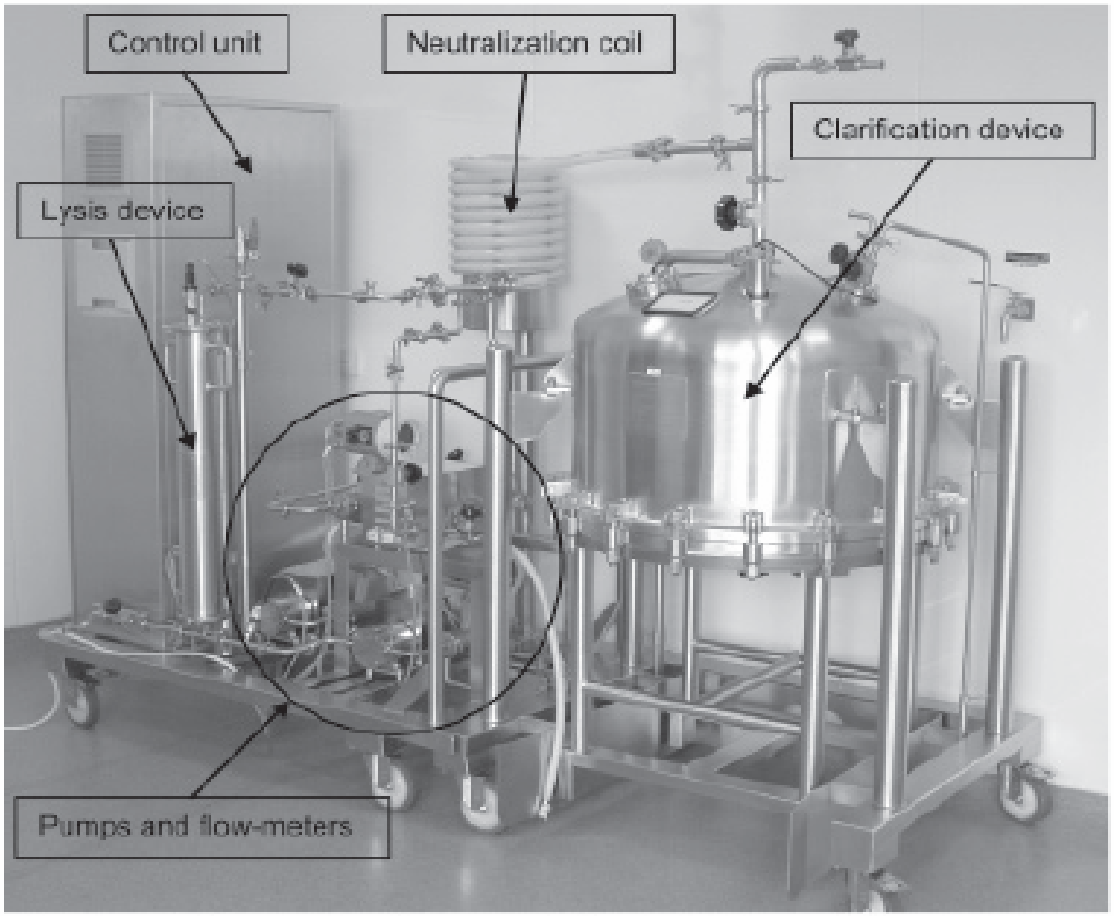


Figure 2. Automated lysis system.
System for industrial scale lysis, neutralization and clarification used for routine production of pharamaceutical-grade pDNA.

بخش واکنشهای زیستی

- محیط کشت تخمیر در یک تانک فولاد ضد زنگ
- و در یک دستگاه استریلیزه گرمایی ، استریل می شود (P-2)
- کمپرسور مرکزی (**P-5**) و فیلتر مطلق (**P-6**) هوای استریل شده برای ظرف تخمیر آماده می کند.
- ماده مایه کوبی(**inoculum**) در یک ظرف تخمیر آماده می شود که با سلولهای **E.coli** که میزبان واکنش **DNA** هستند کاشته شده است.

- محلول آمپی سیلین در یک تانک فولادی ضد زنگ آماده می شود. (**P-3**) و توسط فیلتراسیون (**p-4**) استریل می شود
- تخمیر در ظرف **V-103** انجام می شود .
- غلظت نهایی سلولها در ظرف تخمیر ، ۷ **gr/L** (وزن سلول خشک ، **DCW**) است ودر انتهای تخمیر **Broth** به مخزن نگهداری **P-9** منتقل می شود.
- پس از تکمیل تخمیر ،تجهیزات توسط بخار شسته و استریل می شوند تا برای دور بعدی آماده شوند.

شرح مدل:Bioreaction

- واکنش کلی زیر استفاده شده است تا تبدیل مواد مغذی را به توده های زیستی شامل **pDNA** شرح می دهد:

$$CH_{2.67}O+5.05CH_{1.91}O_{0.56}N_{0.23}+2.68CH_{1.795}O_{0.3}N_{0.2}$$
$$+1.96O_2 \longrightarrow 7.07CH_{1.77}O_{0.49}N_{0.24}+1.66CO_2+2.31H_2O$$

- مخمر ($CH_{1.91}O_{0.56}N_{0.23}$) ، **tryptone** ($CH_{1.795}O_{0.3}N_{0.2}$) و توده زیستی ($CH_{1.88}O_{0.49}N_{0.24}$)

- و با فرض کردن ثابت تنفسی مساوی با ۰,۸۴۵ و همچنین فرض کرده ایم که مقادیر عصاره مخمر و **tryptone** برابر هستند.
- سلولهای **E.coli** که در انتهای تخمیر بدست می آیند فرض می شود که دارای یک نوع ترکیب بر حسب بیشترین اجزا دارند۵۰% پروتئین ، ۲۰% **RNA** ، ۱۶,۷ % اندوتوکسین ، ۱,۷% **gDNA** ، و ۱۰,۹ % از دیگر اجزا
- **pDNA** ۰,۷% از وزن سلول خشک نهایی

بخش پایین دستی

- این بخش از قسمتهاي زير تشكيل شده است:
- ۱-بخش بازیافت اولیه
- ۲-بخش بازیافت میانی
- ۳-بخش تصفیه نهایی

1 - بخش بازیافت اولیه

- سلولها در یک سانتریفوژ **Disk Stack** قرار مي گيرند(**P-10**)
- ۹۸% بازده مفروض است
- در حین سانتریفوژ**Broth** حدودا ۲۰ بار از ۴۴۱۴لیتر به ۲۰۴ لیتر تغلیظ می شود

- تخریب بعدی سلول برای آزاد کردن **pDNA** است که احتمالا بحرانی ترین و مشکل سازترین واحد عملیاتی در کل فرایند پایین دستی است.
- حساسیت برشی و شیمیایی مولکولهای **pDNA** و **gDNA**علاوه بر ویسکوزیته بالای جریانهای فرایند مهمترین نگرانی در این مرحله است.
- اجزای داخلی سلول مانند **RNA** و**gDNA** ، اندوتوکسینها و پروتئینها هم آزاد می شوند.

- بعد از سانتریفوژ ،خمیر سلول ،دوباره در ۴۵۰ لیتر از محلول تعلیق،در یک تانک اختلاط معلق می شود(**P-11**) تخریب سلول با اضافه کردن همان مقدار حجم از محلول آلکالین **dodecyl sulfate (sds)** همراه با هم زدن آرام ایجاد می شود.
- باقیمانده ی سلول **gDNA** و پروتئینها با اضافه کردن ۱۸۷ لیتر از استات پتاسیم خنک شده ی **M**۳ (**PH3.5**) رسوب می کند.رسوب توسط فیلتراسیون جدا می شود.(**P-12**)

- دمای عملیات در ۴ درجه باقی می ماند.
- محصول تخریب سلولی خنثی و تصفیه شده در معرض خالص سازی بیشتر قرار می گیرد.

1 - بخش بازیافت اولیه

- **pDNA** و **gDNA** که به ترتیب بازده ۸۰ و ۶۰ درصد دارند اکثر اندوتوکسین در این مرحله جدا شده اند
- برای پروتئین و **RNA** به کاهش ۹۹و ۶۶ درصدی به ترتیب اشاره شده است.

2 - بخش بازیافت میانی

- این مرحله دو هدف دارد:تغلیظ **pDNA** و جدا کردن نا خالصیها قبل از مراحل خالص سازی نهایی .
- آب اصلي ترين ماده خام (۹۴%)
- ایزوپروپیل الکل وآمونیوم سولفات : عامل تسریع کننده براي تجمع **pDNA**
- محصول تخریب تصفیه شده به یک تانک اختلاط منتقل می شود (**P-13**) و **pDNA** با اضافه کردن ۰,۷ حجمي الکل ایزوپروپیل شسته می شود. مرحله رسوب دهی الکل ایزوپروپیل **pDNA** ، را سه برابر غلیظتر می کند با بازده ۸۶%

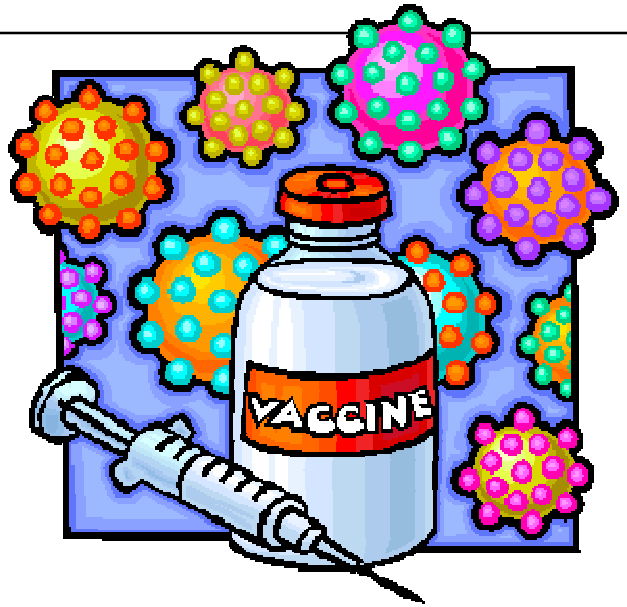
- **pDNA** به یک تانک منتقل می شود(**P-15**) و در ۳۰۰ لیتر و **mM** ۱۰ از باز **Tris.HCL** (**PH 8**) حل می شود.
- آمونیوم سولفات جامد در این محلول تحت شرایط هم زدن آرام حل می شود تا غلظت **M** ۵/۲ بدست آید تا ناخالصیهای رسوب کند. **pDNA** در این مرحله جدا نمی شود، بلکه اندوتوکسین، **gDNA**، پروتئین و**RNA** را جدا می کند و محصول نهایی فیلتر می شود.(**P-16**)
- در این مرحله حجم جریان شامل **pDNA** تقریبا خالص، ۳۶۸ لیتر است.
- یک مرحله**ultrafilteration (P-18)** وجود دارد تا غلظت **pDNA** را ۱۰ بار بیشتر کند وآماده براي عملیات کروماتوگرافی

3 - بخش تصفیه نهایی

- تصفیه نهایی بر اساس (**HIC**) کروماتوگرافی در حالت منفی
- می باشد تا ناخالصیهایی را که در مراحل تولید می شود را بگیرد. **(P-19)**
- زمینه جذب سطحی یک ژل **HIC -phenyl sepharose** تجاری است. ابعاد این ستون باید با قطر **cm** ۴۰ و ارتفاع بستر **cm** ۲۰ باشد. به عنوان یک فرض خوش بینانه ، حجم خوراک ورودی برابر است با ۳۰% از حجم بستر.

- پاکسازی ماده مرزی در یک مرحله با بافری که کم یونی است صورت می گیرد (آمونیوم سولفات)
- در انتها ،ستون تمیز می شود. بخش شامل **pDNA** در مقابل بافر **PBS** دیالیز می شود تا آمونیوم سولفات جدا شود . (**P-20**)
- ماده بدست آمده توسط میکروفیلتراسیون استریلیزه می شود (**P-21**) تا اطمینان حاصل شود که قبل از پر کردن و بسته بندی آلودگی ندارد.

بخش پر کردن و بسته بندی:



محصول توده **pDNA** (حدود ۲**mg** در ۲**mL**) در شیشه های کوچک که آرم دارند پر و بسته بندی می شود.هر بسته از محصول نهایی شامل ۳ شیشه می باشد

ارزیابي اقتصادي

فرضيات:

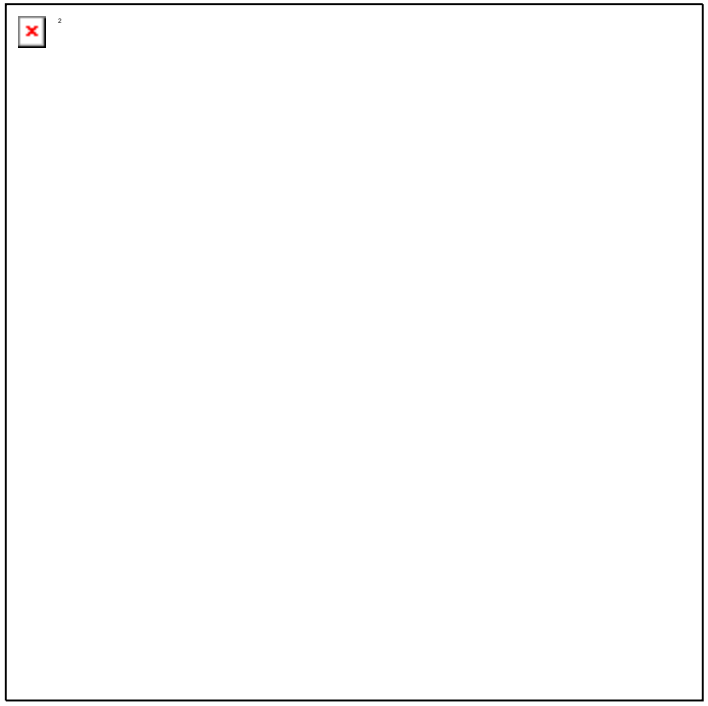
۱. كل سرمايه ثابت مستقيم بطور خطي در طول يك دوره ۱۰ ساله با فرض تخصيص۱۰درصد به محافظت پايگاه از خطر نابودي از بين ميرود.

۲. عمر پروژه ۱۵ سال است .

۳. ۲۳,۲% محصول نهايي در هر سال توليد خواهد شد.

- کل سرمايه گذاري در حدود ۲۴ ميليون دلار
- هزينه واحد توليد ۲/۲۵ دلار به ازاي ۳ شيشه محتوي ۲ ميلي گرم **pDNA** (هرکدام به قيمت **0/38** دلار به ازاي هر ميلي گرم از **pDNA**)

ريز ارقام هزينه عملياتي سالانه (AOC)



- هزينه حاصل از كل تجهيزات در حدود ۳,۶ ميليون دلار تخمين زده شده است.
- هزينه وابسته به تسهيلات ۴۵ درصد **AOC**.
- هزينه هاي آزمايشگاهي ۲۵ درصد **AOC**
- هزينه مواد قابل مصرف ۱۰ درصد **AOC**
- تصفيه ضايعات واز بين بردن آنها ۲ درصد **AOC**
- هزينه تجهيزاتي مثل الكتريسيته ، بخار و واحدهاي سرد سازي ناچيز

سرمایه مستقیم در هر قسمت فرایند (DFC):

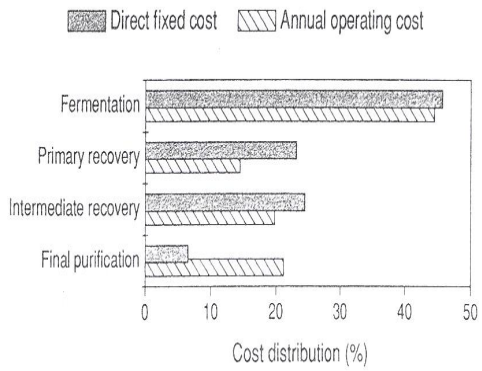


Figure 15.5 Breakdown of annual operating cost per process section

- بیشتر در بخش تخمیر
- تجهیزات جداسازي جامد - مایع (سانتریفوژ وفیلترهاي **Nutsche**)
- خالص سازي نهایي مربوط به رزین کروماتوگرافیك

ارزيابي محيطي

عواقب بالاي آمونيوم سولفات و ايزوپروپيل الكل كه روي محيط

كاهش يا حذف ايزوپروپيل الكل عواقب را در پيكربندي هاي گروه بطور قابل توجهي كم مي كند

حذف ايزوپروپيل الكل همچنين باعث حذف هزينه هاي وابسته به تصفيه ضايعات آلي متعاقب مي شود

عمليات جانشين سازگاربراي كاهش عواقب محيطي :

اولترافيلتراسيون

ميكروفيلتراسيون

بحث

يك فرآيند توليد تخمير **fed-batch** با مقدار متوسط غني نه تنها باعث افزايش هزينه بلكه افزايش مدت زمان مي شود .

خصوصيت موروثي سلول ميزبان و ساخت و ساز **pDNA** عمليات تخمير را تحت تاثير قرار مي دهد.

عوامل سود دهي به فرايند

۱. كاهش هزينه كلي مواد خام (۱۴درصد)
۲. كاهش اثرات محيطي ناشي از استفاده و از بين بردن ايزپروپيل الكل (۷۰ درصد)
۳. كاهش هزينه هاي ناشي از تصفيه و از بين بردن ضايعات مايع (۳۲ درصد)

نتايج

توليد و خالص سازي**pDNA** درماني حتي با يك فرآيند بهينه نشده قابل ترقي از نظر اقتصادي است.بهسازي فرآيند قطعا هزينه ها و عواقب محيطي را كاهش مي دهد