



Investigating the Reactor Section of the Production Process of Tissue Plasminogen Activator Using Simulation

Sh. Mojoodi¹, M. Hayati-Ashtiani^{2*}

1- M. Sc. in Chemical Engineering, University of Kashan

2- Assistant Professor of Chemical Engineering, University of Kashan

Email: hayati@kashanu.ac.ir

Abstract

Tissue Plasminogen Activator (tPA) is a recombinant protein used to treat blood clotting disorders such as heart strokes, acute myocardial, and pulmonary blockage. The process design of drug production after laboratory culture consists of two sections: reactor and separation. This research aims to investigate the reactor (fermentor) section. The reactor section has three series reactors of different sizes in which tPA cultivation and industrial production are carried out. In this research, first, a base-case simulation of the reactor section was performed by Aspen Batch Plus software, and then a retrofit was presented to remove the bottleneck of the third reactor. 14 days and 15 hours are needed in aiming to achieve the production of 80 Kg tPA/year assuming 50 batch production per year for two completely similar parallel units. The time of each batch process is reduced to about 13 days, 4 hours and 2 minutes in the retrofit design of the process to solve this problem. Reducing the time of the production process helps to increase the annual production up to 82.16 Kg tPA/year. An increase in fixed costs, etc. is inevitable in the modified case because of adding a Heat Exchanger, Hold-up Tank, and Pump.

Received: 11 February 2024

Accepted: 27 April 2024

Page Number: 97-108

Keywords:

Simulation,
Process Design,
Retrofitting,
Tissue Plasminogen
Activator

Please Cite this Article Using:

Mojoodi, Sh., & Hayati-Ashtiani, M. (2025). Investigating the Reactor Section of the Production Process of Tissue Plasminogen Activator Using Simulation. *Iranian Chemical Engineering Journal*, 24(138), 97-108, [In Persian].



بررسی قسمت راکتور فرایند تولید فعال کننده پلاسمینوژن بافتی به کمک شبیه سازی

شقایق موجودی^۱، مجید حیاتی آشتیانی^{۲*}

۱- کارشناس ارشد مهندسی شیمی، دانشگاه کاشان

۲- استادیار مهندسی شیمی، دانشگاه کاشان

پیام نگار: hayati@kashanu.ac.ir

چکیده

فعال کننده پلاسمینوژن بافتی (tPA: tissue Plasminogen Activator) نوعی پروتئین نو ترکیب است که برای درمان بیماری های حاصل از لخته خون مانند سکته قلبی، اختلالات حاد قلبی و انسداد ریوی استفاده می شود. طراحی فرایند تولید دارو پس از کشت آزمایشگاهی مشتمل بر دو بخش طراحی راکتور و سامانه جداسازی است. هدف از این پژوهش بررسی بخش راکتور است؛ بخش راکتور، سه راکتور پشت سر هم در اندازه های متفاوت دارد که کشت و تولید صنعتی tPA در آنها انجام می پذیرد. در این تحقیق، ابتدا شبیه سازی بخش راکتوری در حالت پایه با نرم افزار Aspen Batch Plus انجام شد و سپس طرح اصلاحی رفع گلوگاه راکتور سوم ارائه شد. در هدف گذاری برای رسیدن به تولید 80 Kg tPA/year با فرض 50 تولید ناپیوسته در سال برای دو واحد تولیدی (train) تولیدی کاملاً مشابه موازی به 14 روز و 15 ساعت زمان نیاز است. در طراحی اصلاحی فرایند بر طرف کردن این مشکل، زمان هر فرایند ناپیوسته به 13 روز و 4 ساعت و 2 دقیقه کاهش می یابد. کاستن از زمان فرایند تولید، به افزایش تولید سالیانه تا $82/16 \text{ Kg tPA/year}$ کمک می کند. با توجه به افزوده شدن یک مبدل، مخزن نگهداری و پمپ، افزایش هزینه های ثابت و غیره در طرح اصلاحی اجتناب ناپذیر است.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۲۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۰۸

شماره صفحات: ۹۷ تا ۱۰۸

کلیدواژه ها:

شبیه سازی،

طراحی فرایند،

طراحی اصلاحی،

فعال کننده پلاسمینوژن بافتی

* کاشان، دانشگاه کاشان، دانشکده مهندسی، گروه مهندسی شیمی

استناد به مقاله:

موجودی، شقایق، و حیاتی آشتیانی، مجید. (۱۴۰۴). بررسی قسمت راکتور فرایند تولید فعال کننده پلاسمینوژن بافتی به کمک شبیه سازی، نشریه مهندسی شیمی ایران، ۲۴(۱۳۸)، ۹۷-۱۰۸.

استفاده از فعال کننده پلاسمینوژن بافتی^۱ - که نوعی پروتئین نوترکیب^۲ است - روش درمان رایج برای حمله‌های قلبی، بیماری انسداد قلبی و سکتته به‌شمار می‌رود که به حل شدن لخته‌های خونی کمک می‌کند [۱ و ۲]. بسیاری از مرگ‌های طبیعی در دنیا به علت انسداد مغزی یا رگ‌ها رخ می‌دهد که به آن لخته‌گی^۳ اطلاق می‌شود. تزریق وریدی tPA که زنجیره‌ای از آمینواسیدها است، درمان دارویی مفید در برقراری مجدد جریان خون است [۳]. از نظر شیمیایی، لخته‌گی شامل شبکه‌ای از فیبرین است که از فیبرینوژن تشکیل شده است. به‌طور معمول، تجزیه فیبرین با پلاسمین انجام می‌شود که لخته خون را حل می‌کند [۴]. فعال کردن پلاسمینوژن به وسیله tPA، به‌صورت طبیعی پلاسمین تولید می‌کند. پلاسمین به‌تنهایی برای حل کردن لخته‌های خونی کفایت نمی‌کند [۴].

روش‌های کلی تولید پروتئین نوترکیب عبارت است از روش آزمایشگاهی شبیه‌سازی مولکولی^۴ که در تولید DNA نوترکیب کاربرد دارد و واکنش زنجیره‌ای پلیمر^۵ که روشی در زیست‌شناسی مولکولی است. روش اول، متداول‌تر است که در بردارنده مراحل انتخاب و جداسازی DNA هدف، تهیه بردار^۶ DNA مناسب، وارد کردن DNA هدف در بردار برای تولید DNA، وارد کردن DNA در میزبان مناسب، انتخاب سلول‌های میزبان تراریخت‌شده، بیان و ترکیب DNA نوترکیب هدف در میزبان، است [۵].

بیوشیمی‌دان‌ها دو روش کلی برای تولید tPA پیشنهاد کرده‌اند [۶]: روش اول، کشت سلول‌های پستانداری و روش دوم کشت سلول‌های باکتریایی است. در روش کشت سلول پستاندار، ابتدا توالی tPA-DNA در سلول‌های CHO^۸ جای‌گذاری^۹ و بیان^{۱۰} می‌شود. سپس، سلول‌های tPA-CHO حاصل - که سلول‌های منتخب و ویژه‌ای هم هستند - کپی‌های فراوانی از tPA-DNA در ژنوم یا ژنگان‌هایشان^{۱۱} (ماده ژنتیکی مجموعه ژن‌ها) جای‌گذاری و مقادیر زیادی tPA ترشح^{۱۲} می‌شود. این محصول که در مقیاس آزمایشگاهی

تولید می‌شود، در مقیاس و دمایی مشخص برای واکنش‌های زیستی استفاده می‌شود که فرایند صنعتی آن در این پژوهش بررسی شده است. در روش کشت سلول باکتری، جای‌گذاری توالی tPA-DNA در سلول‌های Escherichia coli (E. coli) است. سپس، سلول‌های باکتریایی tPA-E. coli که در آزمایشگاه کشت می‌شود، منجمد و در واکنش تخمیری^{۱۳} تلقیح می‌شود.

تولید tPA به کمک سلول‌های پستانداری در مقایسه با سلول‌های باکتریایی از برتری‌های بیشتری برخوردار است؛ از جمله این که سلول‌های CHO بازده بیشتری دارد، زیرا پیوند بین tPA و E. coli (tPA-E. coli) باید شکسته شود که این کار طراحی فرایند جداسازی را دشوار خواهد کرد، باعث کاهش بازده جداسازی خواهد شد و این که جداسازی tPA-CHO چندان آسان نیست. همچنین، در روش تولید tPA به کمک سلول‌های باکتریایی نیاز به انجام کار آزمایشگاهی برای به دست آوردن سرعت واکنش است و در مقایسه با تولید به کمک سلول‌های پستانداری، E. coli گروه‌های قندی (گلیکولایزاسیون^{۱۴}) به tPA اضافه نمی‌کند که همه موارد بر بازده جداسازی مؤثر است. ضمن آن که در داروهایی که منشأ باکتریایی دارند، باکتری برای بدن انسان جسم خارجی محسوب و باعث ایجاد حساسیت می‌شود و در صورتی که این دارو به تکرار استفاده شود، واکنش‌های شدید در بدن ایجاد می‌کند و ممکن است باعث مرگ شود [۷].

شرکت ژنتک^{۱۵} برای اولین بار در نیمه دهه ۸۰ میلادی به تولید صنعتی tPA به نام اکتیواز^{۱۶} به‌روش کشت سلول‌های پستانداری در جهان پرداخت [۶]. اکنون نسل جدید این محصول با ایمنی بالاتر، بدون احتمال خطر خون‌ریزی و مدت زمان بستری بیمارستانی کوتاه‌تر در این شرکت با نام TNK-tPA در نوع‌های مختلف تولید می‌شود [۸].

نرم‌افزارهای خانواده اسپن^{۱۷} از شرکت اسپن تک^{۱۸} که اسپن بی‌بی‌اس^{۱۹} را شامل می‌شود دارای کاربردهای متنوعی در شبیه‌سازی است [۹]. ایده‌های زیادی را می‌توان با شبیه‌سازی

1. Tissue Plasminogen Activator
2. Recombinant Protein
3. Thrombus
4. Molecular Cloning
5. Deoxyribo Nucleic Acid
6. Polymerase Chain Reaction
7. Vector
8. Chinese Hamster Ovary
9. Insert
10. Express
11. Genomes
12. Secrete

13. Fermentation
14. Glycosylation
15. Genetech
16. Activase
17. Aspen
18. AspenTech
19. Aspen BPS

فرایندهای زیستی^۱ با استفاده از نرم‌افزارها تجزیه و تحلیل کرد. نرم‌افزارهای Aspen Bio Process Simulator™ (Aspen BPSTM) و SuperPro Designer[®] (SPD) دو نرم‌افزار پرکاربردی هستند که عمدتاً محققان در پژوهش خود برای شبیه‌سازی به‌کار گرفته‌اند [۱۰]. دو فرایند ناپیوسته مختلف به‌کمک راکتورهای اختلاط کامل و کشت CHO-tPA با منشأ سلول تخمدان همستر چینی که نوعی موش است) مطالعه شد که دارای قسمت‌های کشت سلول و جداسازی tPA است. اختلاف فرایند حالت پایه (اول) با فرایند حالت دوم در روش جداسازی tPA است. نمودار جریان فرایندی طراحی دوم، سه تجهیز عملیاتی کمتر دارد که منجر به کاهش هزینه می‌شود. غالب اطلاعات مورد نیاز شبیه‌ساز BPS™ در مراجع آمده است؛ اما در شبیه‌سازی با SuperPro Designer[®] نیاز به داده‌های آزمایشگاهی نیز است. در هر نمودار جریان فرایندی، از دو راکتور با فرض ۹۹٪ خلوص از tPA و بازیابی ۴۵/۶٪ وزنی (بازیابی از تفاضل مقدار tPA ورودی ناخالص و خروجی خالص نسبت به میزان ورودی ناخالص بخش جداسازی حساب شده است) استفاده شده است. برتری SuperPro Designer[®] این است که مطالعه اقتصادی فرایندهای زیستی را در صورتی که جزئیات کمی موجود باشد، انجام می‌دهد. در طراحی دوم که سه دستگاه فرایندی حذف شده است، ستون سوانگاری (کروماتوگرافی) میل ترکیبی^۲ گران‌قیمت با ستون ارزان قیمت تبادل گر یونی^۳ جای‌گزین شده است. لذا، هزینه‌های سرمایه‌ای و عملیاتی طراحی دوم در مقایسه با طراحی پایه کمتر است. اقتصاد فرایند به غلظت کشت سلولی وابسته است و حضور سرم^۴ در هزینه‌های فرایند مؤثر است و تعویض ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی باروش تبادل یونی تأثیر قابل توجهی بر کاهش هزینه‌های فرایندی دارد.

در پژوهشی درباره تولید tPA از فیبروبلاست‌های انسانی به‌کمک راکتور زیستی دارای ستون جذب، از راکتور سرامیکی در تولید tPA با وجود سلول تارزای ریه جنین انسان (IMR-90) استفاده شد [۱۱]. وجود tPA خارج سلولی، مانعی برای تولید بیشتر محصول بود و برای برطرف کردن مشکل، استفاده از ستون آکنده پیشنهاد شد. در تحقیقی دیگر، قسمت جداسازی فرایند تولید tPA به‌کمک نرم‌افزار

اسپن‌بچ پلاس^۵ مطالعه و مشاهده شد که خشک‌کن انجمادی محدودیت زمانی ایجاد می‌کند. در طراحی اصلاحی رفع تنگنا، با موازی‌سازی عملیات واحدها و طراحی مخزن ذخیره‌ای در زمان خرابی خشک‌کن، زمان کمیته تولید از ۱۲ روز به ۷ روز و ۲۳ ساعت کاهش یافت. تحلیل اقتصادی بیان داشت که سهم هزینه‌های مستقیم ۶۱/۷۳٪ و غیرمستقیم ۳۸/۲۷٪ است که آرزینین ۹۷٪ کل هزینه مواد مصرفی را در برداشت [۱۲]. تحقیقات نشان داده است که به‌علت رشد سلول‌های tPA-CHO، محیط کشت آن‌ها بسیار متراکم می‌شود که باعث از بین رفتن محصول می‌شود؛ زیرا با رشد سلول‌ها و متراکم شدن محیط دستیابی آن‌ها به هوا، دی‌اکسید کربن و سایر مواد مغذی مورد نیاز نیز کاهش می‌یابد. لذا، از تعدادی راکتور پشت سر هم استفاده می‌شود تا زمانی که میزان کشت در راکتور اول تکمیل شد، آن را به ترتیب به راکتور دوم و راکتورهای بعدی منتقل کنند [۱۳].

هدف از انجام این پژوهش پس از توصیف فرایند بخش راکتورها یا تخمیر، شبیه‌سازی بخش راکتورها با استفاده از اسپن‌بچ پلاس به منظور تجزیه و تحلیل فرایند و ارائه طرح اصلاحی برای کاستن زمان تولید هر فرایند ناپیوسته از ۱۴ روز و ۱۵ ساعت به ۱۳ روز و ۴ ساعت و ارزیابی اقتصادی بخش راکتورهای واحد تولید tPA است. موازی‌سازی‌های مناسب مراحل یکی از نوآوری‌های این تحقیق است که منجر به کاهش زمان تخمیر در راکتورها شد. با توجه به تحلیل حالت پایه که نشان داد راکتور سوم گلوگاه^۶ فرایندی است (منظور از گلوگاه، یکی از فرایندها در زنجیره‌ای از فرایندها است؛ به‌گونه‌ای که محدودیت ظرفیت آن، ظرفیت کل زنجیره را با افزایش زمان تولید کاهش می‌دهد) در نوآوری دیگر مخزن ذخیره‌سازی و مبدل حرارتی دیگری مخصوص راکتور سوم طراحی شد تا میزان تولید افزایش یابد.

۲. روش کار

۲-۱ شرح فرایند

فرایند تخمیر واحد تولید tPA با توجه به تولید محصول با مقدار کم، عملیات واحدی ناپیوسته است که در شکل (۱) مشاهده می‌شود [۵]. در مرحله اول، HyQ PF-CHO Media (نام تجاری محیط^۷ کشت سلولی که بدون سرم و پروتئین است [۱۴])، آب، هوا و

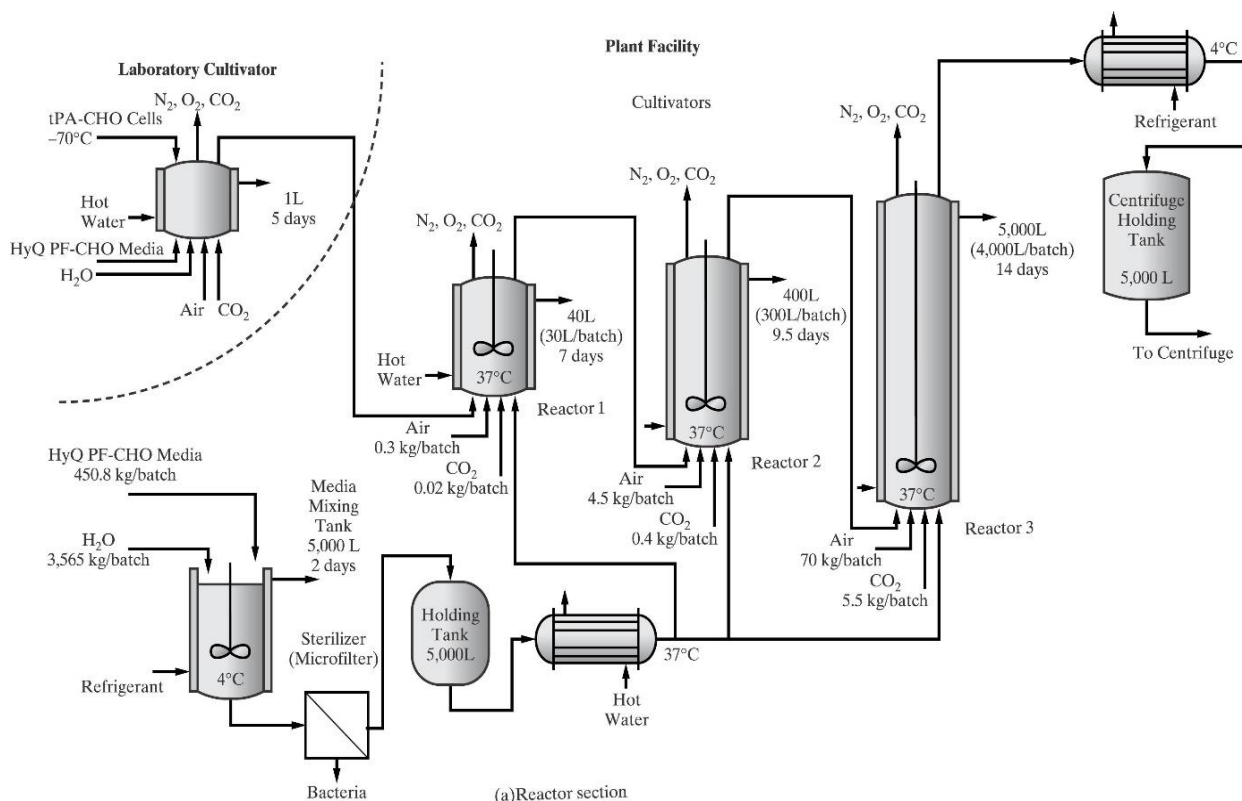
1. Bioprocess
2. Affinity Chromatography
3. Ion Exchanger

۴. سرم (serum)، سیالی مانند آب است که از بافت حیوانات (در اینجا همستر) گرفته می‌شود.

5. Aspen Batch Plus
6. Bottle-Neck
7. Media

راکتور- که کوچکترین راکتور است- در طی ۵ روز سلولها کشت می‌شوند. علاوه بر آن، دو روز دیگر به این زمان برای بارگذاری و پاکسازی اضافه شده است که در مجموع همان ۷ روز نشان داده شده در شکل (۱) است. دومین راکتور، راکتور متوسط، شامل یک مرحله ناپیوسته است که میزان تولید سلولها در مدت ۷ روز باهم افزایش یافته است. ۲/۵ روز برای بارگذاری و پاکسازی راکتور متوسط لحاظ شده است که در مجموع همان ۹/۵ روز نشان داده شده در شکل (۱) است. در نهایت، در سومین راکتور که بزرگترین راکتور است و طی ۸ روز رشد سلولها انجام شده، مانند دو راکتور قبل، زمانی برای بارگذاری و پاکسازی منظور شده است که در اینجا ۶ روز است که در مجموع همان ۱۴ روز نشان داده شده در شکل (۱) است. گازها شامل N_2 ، O_2 و CO_2 ، به طور دائم از سه راکتور خارج می‌شود. مخزنی به منظور بارگذاری و هم‌زدن محصول کشت پودری و آب در نظر گرفته شده است که این فرایند را در ۲ روز انجام دهد. ژاکتی دربرگیرنده مخزن اختلاط بود که سیال خنک کننده در آن

کربن دی‌اکسید در محیط کشت آزمایشگاهی اضافه شده است. اطلاعات موجود این مرحله شامل غلظت $tPA-CHO$ cell/mL 2×10^6 ، تعداد سلولها در کشت دهنده آزمایشگاهی $tPA-CHO$ cell/mL 2×10^3 و حداکثر غلظت قابل رشد $tPA-CHO$ cell/mL-day 0.39×10^6 بوده است که باعث تولید مقدار ناچیز $tPA/Batch$ g 0.25 در طی ۵ روز شده است. در این مرحله، به مقادیر کم و قابل چشم‌پوشی از HyQ PF- Media، آب، هوا و کربن دی‌اکسید در محیط کشت آزمایشگاهی در مقایسه با فرایند تجاری نیاز بوده است. مواد زائد تولیدی شامل زهرابه^۱، سلولهای معیوب^۲، پساب و گازهای متصاعد شده^۳ شامل N_2 ، O_2 و CO_2 ناچیز بوده است. مرحله آزمایشگاهی ۵ روز برای هر مرحله ناپیوسته^۴ تلقیح^۵ (مایه کوبی) طول کشیده و در مدت ۱ روز محتویات کشت دهنده آزمایشگاهی تخلیه شده و به قسمت راکتور رفته است. در این مرحله، تلقیح رخ می‌دهد که در آن تولید tPA و سلول در محیط کشت شامل ۳ راکتور انجام می‌شود. در اولین



شکل ۱. نمودار جریان بخش راکتور فرایند تولید tPA [۵].

Figure 1. Flowsheet of Reactor Section for the tPA Production Process [5].

1. Endotoxin
2. Cell Debris
3. Gas Emissions
4. Batch
5. Inoculum

چرخش داشت. در ادامه مخزن، میکروفیلتر و مبدل حرارتی موجود بوده‌است که با آب گرم، گرم می‌شود و پس از حذف باکتری، جریان را استریل می‌سازد. آخرین دستگاه در بخش راکتور، مخزن نگهداری بود که به منظور نگهداری محتویات مرحله ناپیوسته کشت tPA، سلول‌های tPA-CHO، زهرا به‌ها و آب به کار گرفته شده‌است. خروجی راکتور سوم تا دمای ۴ °C در مبدل پوسته و لوله‌ای که سیال خنک‌کننده در قسمت پوسته جریان دارد، خنک شده‌است. دمای زیاد (مانند دمای محیط که برای پروتئین‌ها بالا است) باعث کم شدن اثر پروتئین‌ها، خنثی شدن و تغییر ماهیت محصول خروجی راکتور سوم می‌شود.

در این پژوهش درصد بازدهی حذف (یا هدررفت) مواد اولیه و tPA محصول به‌عنوان مواد زائد از محصول نهایی tPA از رابطه (۱) حساب شد:

$$\%R = \frac{C_i - C_f}{C_i} \times 100 \quad (1)$$

که در آن R درصد وزنی حذف، C_i غلظت اولیه و C_f غلظت نهایی وزنی است.

۲-۲ مواد و تجهیزات

مطابق با شکل (۱)، مواد استفاده شده عبارت است از: محیط کشت HyQ PF-CHO، سلول‌های tPA-CHO، آب تزریقاتی^۱، هوا (اکسیژن) و دی‌اکسید کربن. دستگاه‌های به کارگمارده نیز شامل کشت‌دهنده آزمایشگاهی، راکتور در حجم‌های مختلف، مخزن اختلاط مواد، مخازن نگهداری و مبدل‌هاست.

۳-۲ شبیه‌سازی

هدف‌گذاری، برآورده کردن نیاز بازار مصرف به کمک واحدی با ظرفیت tPA/y ۸۰ Kg برای فرایند شرح داده شده در بخش ۲-۱ است. براساس اطلاعات کشت آزمایشگاهی، دو واحد موازی ناپیوسته مشابه با شکل (۱) که شامل Batch/y ۲۵ است که ۲/۲۴ Kg/Batch تولید می‌شود، استفاده می‌شود و بادر نظر داشتن هدررفت بخشی از محصول تولیدی، در نهایت به میزان ۱/۶ Kg/batch محصول تولید می‌شود.

چنان‌که در شکل (۱) پیداست تنها از یک مخزن نگهداری و یک مبدل حرارتی در خوراک‌دهی هر سه راکتور استفاده می‌شود. در اثر تخلیه مخزن نگهداری پس از مدتی، خوراک‌دهی راکتور ۱ آغاز می‌شود. پس از تخلیه مخزن، چندروزی تا آغاز خوراک‌دهی راکتور ۲ بدون استفاده باقی می‌ماند و به همین ترتیب پس از اتمام خوراک‌دهی راکتور ۲، از نو مخزن نگهداری چندروزی تا آغاز خوراک‌دهی راکتور ۳ بدون استفاده باقی می‌ماند. زمان طولانی مشغول کار بودن مخزن نگهداری قسمت خوراک‌دهی باعث می‌شود تا زمان تولید هر فرایند ناپیوسته ۱۴ روز و ۱۵ ساعت شود که باتوجه به زمان کاری ۱۴ روز برای این دستگاه، در هر فرایند ناپیوسته تولیدی^۲، این دستگاه ۱۵ ساعت بی‌کار خواهدماند. این زمان در یک سال برای ۲۵ تولید ناپیوسته، مجموعاً ۱۵ روز و ۱۵ ساعت بی‌کار می‌ماند که باتوجه به زمان کاری ۱۴ روز می‌توان یک‌بار دیگر از ظرفیت تولید راکتور ۳، باتوجه به گران‌قیمت بودن tPA استفاده کرد تا میزان تولید و در نتیجه، سود بیشتری به دست‌آید. برای این منظور، اصلاح فرایند بررسی می‌شود.

در طرح اصلاحی، برای رسیدن به هدف افزایش تولید و در نتیجه سود بیشتر، می‌توان زمان کمینه تولید هر مرحله ناپیوسته تولید را تقلیل داد یا ابعاد دستگاه‌ها را باهدف افزایش ظرفیت واحد، افزایش داد. راکتور سوم در بیشینه حجم خود عمل می‌کند و ابعاد آن غیر قابل تغییر است. برای راکتورهای اول و دوم، افزایش ابعاد باعث افزایش میزان تولید محصول، متراکم شدن آن و در نتیجه، تخریب محصول تولیدی یا محیط کشت خواهدشد. لذا، بحث تغییر ابعادی منتهی است. پس، تنها مورد تغییرپذیر، کاهش زمان کمینه چرخه است که پیش‌تر توضیح داده‌شد. لذا، برای تعریف طرح اصلاحی بر دو دستگاه گلوگاهی مخزن نگهداری و یک مبدل حرارتی خوراک‌دهی که محدودیت ظرفیت آن‌ها منجر به کاهش میزان تولید کل فرایند می‌شود، تمرکز می‌شود و سعی بر رفع این گلوگاه محدودکننده ظرفیت تولید می‌شود.

برای رفع محدودیت، به دلیل آن‌که آخرین مرحله عملیاتی این دو تجهیز به‌منظور آماده‌سازی مواد لازم برای راکتور سوم است، می‌توان یک مخزن نگهداری و یک مبدل حرارتی دیگر مخصوص راکتور سوم برای برطرف کردن ۱۵ روز و ۱۵ ساعت زمان استراحت

1. Water for Injection

2. Batch

محاسبه‌های چرخه زمانی، توسعه برآورد هزینه‌های مطالعاتی مراحل مقدماتی فرایند برای افزایش مقیاس فرایند ناپیوسته اشاره کرد.

۳. نتایج و بحث

۳-۱ تحلیل طراحی پایه و اصلاحی

تولید tPA به کمک سلول‌های پستانداری در مقایسه با سلول‌های باکتریایی از برتری‌های بیشتری برخوردار است که در قسمت مقدمه ذکر آن رفت. مواد اولیه سالیانه برای شبیه‌سازی فرایند با سلول‌های پستانداری، در جدول (۱) آمده است.

جدول ۱. مواد اولیه و مواد زائد تولیدی در طی فرایند

Table 1. Raw materials and produced waste during the process

Ingredients		Wastes	
Component	Kg/y	Component	Kg/y
tPA-CHO cells	Small	Endotoxin	0.155
HyQ PF-CHO media	22,540	Cell debris	22,860
Water	178,250	Wastewater	178,250
CO ₂	296	Gas emissions (N ₂ , O ₂ , CO ₂)	4,036
Air	3,740		

مقادیر لازم به‌ازای هر مرحله ناپیوسته در جدول (۲) قابل مشاهده است.

جدول ۲. مواد اولیه لازم برای هر مرحله ناپیوسته

Table 2. Raw materials required for each batch

Component	Kg/batch
Media	450.8
Water	3,565
Air	74.8
CO ₂	5.92

توالی tPA-DNA باید در سلول‌های CHO جای‌گذاری^۲ و بیان^۳ شود. سلول‌های tPA-CHO ای که بدین روش حاصل می‌شوند، سلول‌های منتخب ویژه‌ای هستند که کپی‌های فراوانی از tPA-DNA در ژنوم یا ژنگان‌هایشان جای‌گذاری می‌شود و مقادیر

2. Insert
 3. Express

در سال برای این راکتور در نظر گرفت که باعث افزایش تعداد مراحل ناپیوسته و در نتیجه میزان تولید خواهد شد. در طرح اصلاحی، محتویات به‌همراه آب ابتدا به مخزن نگهداری اول و بعد به مبدل اول می‌رود که از آنجا به راکتور ۱ و ۲ ارسال می‌شود. محتویات باقی‌مانده به مخزن نگهداری دوم و به‌دنبال آن مبدل حرارتی دوم که هر دو در طرح اصلاحی اضافه‌شده ارسال می‌شود تا خوراک‌دهی راکتور ۳ را انجام دهند. با این انتقال، مخزن نگهداری اول سریع‌تر خالی می‌شود و سریع‌تر می‌توان آن را برای تولید ناپیوسته مرحله بعد آماده کرد که منجر به کاهش زمان تولیدی هر مرحله می‌شود.

۳-۲ روش شبیه‌سازی و نرم‌افزار مورد استفاده

به‌منظور انجام شبیه‌سازی، پس از آن که با استفاده از نمودار جریان فرایند شکل (۱)، شرایط عملیاتی هر تجهیز وارد شد، شبیه‌سازهای فرایند ناپیوسته مانند Aspen Batch Plus (ABP) یا Aspen Batch Process Developer وظیفه موازنه جرم و انرژی را انجام می‌دهد و برنامه زمانی عملیاتی (نمودار گانت) فرایند را تولید می‌کند. بدین منظور، از سربرگ تجهیزاتی نرم‌افزار، تجهیزات نام‌برده شده در قسمت ۲-۲ انتخاب و جزئیات عملیاتی هر تجهیز براساس داده‌های موجود وارد می‌شود. این کار شامل وارد کردن مشخصات پر کردن، فراوری، تخلیه و تمیزکاری هر تجهیز است که این کار همان وارد کردن دستورالعمل^۱ خوراک‌دهی هر تجهیز برای دستیابی به دستورالعمل نهایی است. پس از آن در منوی اصلی، Run و سپس Simulate Entire Batch انتخاب می‌شود. در انتها، The entire Recipe انتخاب و OK می‌شود.

نرم‌افزار مورد استفاده برای شبیه‌سازی Aspen Batch Plus (ABP) یا Aspen Batch Process Developer، نرم‌افزار شبیه‌سازی فرایندهای زیستی صنعتی به‌ویژه قابل استفاده در صنایع دارویی است که به‌منظور مدل‌سازی همه‌جانبه فرایندهای ناپیوسته و طرح‌های اصلاحی این پژوهش استفاده شده است. محیط مدل‌سازی در این نرم‌افزار برای فرایندهای ناپیوسته دستورالعمل‌گراست و زنجیره ارزش پیشرفت فرایند داروسازی را با در نظر گرفتن ساخت، توانایی توزیع سریع محصولات جدید به بازار و هزینه‌های کم‌تر تعیین می‌کند. از برتری‌های قابل توجه این نرم‌افزار می‌توان به ارزیابی سریع انتخاب‌های فرایندی و هم‌چنین اعمال موازنه جرم،

1. Recipe

لذا، در طراحی اصلاحی مطابق با شکل ((۲-b)، تلاش شده است تا گلوگاه زمانی که با Holding Tank و Heat Exchanger در شکل ((۲-a) ایجاد شد، برطرف شود که Holding Tank of F3 و Heat Exchanger of F3 اضافه می‌شوند باعث کاهش زمان کاری Fermentor 3 و در نتیجه زمان تولیدی در هر فرایند کاهش و تعداد مراحل ناپیوسته تولید افزایش می‌یابد و افزایش محصول را به دست می‌دهد.

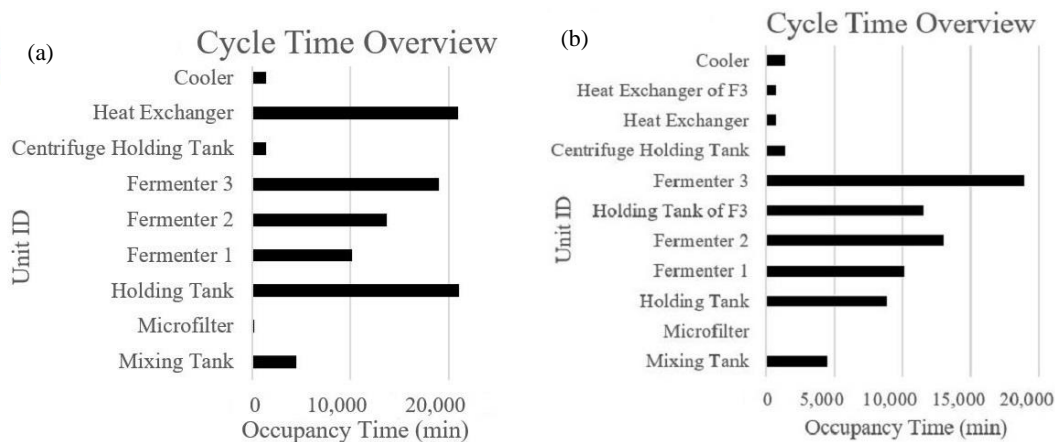
شکل (۳) نمودار گانت^۲ بخش راکتورها را که برای زمان بندی استفاده می‌شود، نشان می‌دهد و فعالیت‌های پروژه‌ای را شامل برنامه ریزی، پیگیری و کنترل پروژه تسهیل می‌کند. هر رنگ در نمودار بیانگر یک مرحله ناپیوسته تولید است که بدین ترتیب نمودار ۳ مرحله تولید ناپیوسته متوالی را نشان می‌دهد. اعداد ۱ تا ۷ در بالای نمودار تعداد روزها (در هفته) را نشان می‌دهد. در مقابل نام هر دستگاه، فاصله خالی بین هر دورنگ متفاوت نشان دهنده زمان کار نکردن (استراحت) آن دستگاه است. از مقایسه شکل ((۳-a) با ((۲-a) نتیجه این می‌شود که مبدل حرارتی و مخزن نگهداری زمان استراحت کمتری را نسبت به سایر دستگاه‌ها دارند؛ زیرا شکل ((۲-a) نشان می‌دهد که بیشترین مدت زمان کارکرد متعلق به مبدل حرارتی و مخزن نگهداری است و فاصله بین دو میله با رنگ متفاوت در نمودار شکل ((۳-a) نشان دهنده کمترین زمان استراحت برای این دو دستگاه است. باتوجه به این که دستگاه‌های با زمان استراحت کمتر گلوگاه دستگاهی هستند، دو دستگاه مذکور

بالایی tPA ترشح^۱ می‌شود. این مرحله جای گذاری tPA-DNA در واکنش (۲) خلاصه می‌شود [۵].

tPA-DNA Sequence + CHO cells → selected high expressing tPA-CHO cells (۲)

محصول این شیوه آماده سازی، آماده سازی «کاتالیزگری همگن» است. برخلاف آماده سازی کاتالیزگری همگن، در غیاب کاتالیزگر همگن قند به tPA اضافه نمی‌شود و گلیکولاز یلاسیون مشاهده نمی‌شود. در غیاب کاتالیزگر همگن مقادیر کمی tPA به مقدار ۵-۵۰ mg tPA/L-broth تولید می‌شود و فرایند جداسازی tPA بسیار پیچیده تر خواهد بود. لذا، کارایی فرایند در روش‌های دیگر از جمله حذف در غیاب کاتالیزگر همگن کاهش می‌یابد.

شکل (۲) نمودار زمان کل کارکرد دستگاه‌ها است که برای پیدا کردن زمان کارکرد هر دستگاه و همچنین مشخص کردن گلوگاه‌های فرایندی از دیدگاه زمان عمل کرد، ترسیم شده است. شکل ((۲-a) نشان دهنده زمان بندی شبیه ساز در طراحی پایه است؛ کمینه زمان لازم برای انجام مرحله ناپیوسته ۱۴ روز و ۱۵ ساعت (۲۱۰۶۰ دقیقه) است و زمان کاری هر دستگاه در فرایند ناپیوسته تولید مشخص است. مطابق با شکل ((۲-a)، مبدل حرارتی و مخزن نگهداری و سپس راکتور سوم زمان بیشتری را در مقایسه با سایر دستگاه‌ها مشغول به کار دارد. Fermentor 3 دارای بیشترین حجم خود است و امکان افزایش ظرفیت را ندارد.

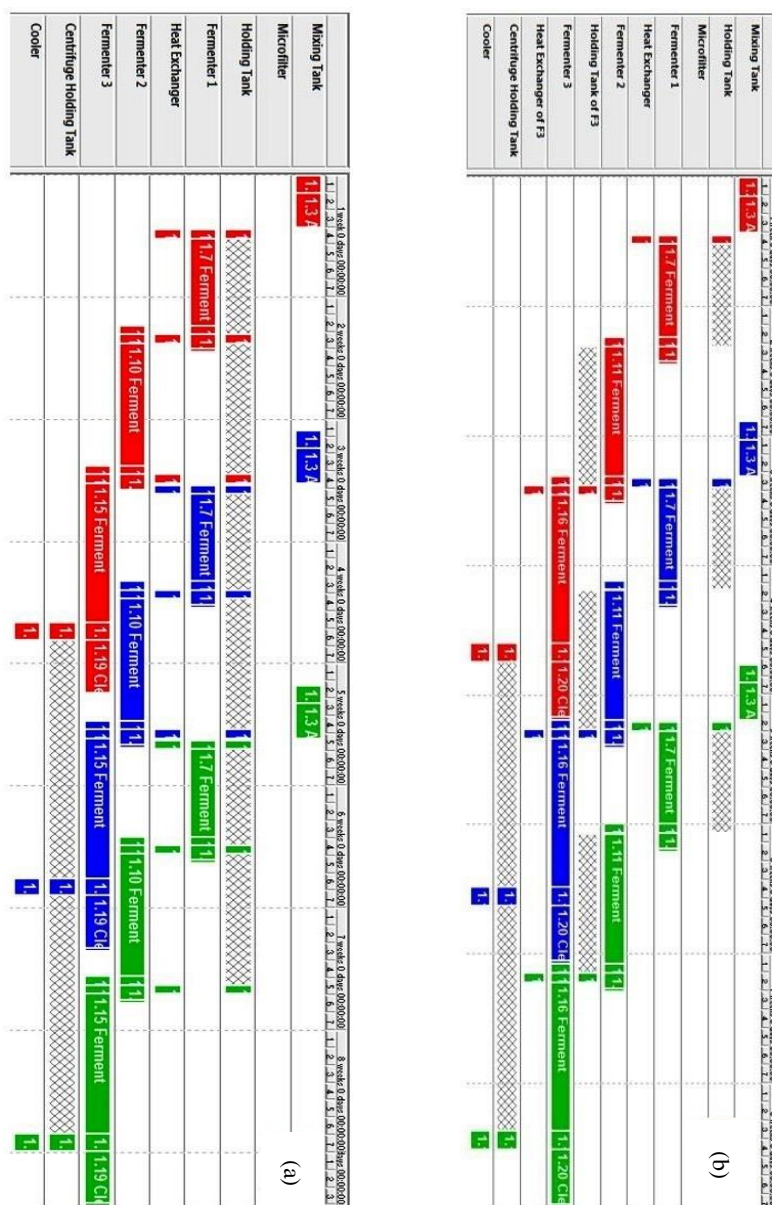


شکل ۲. زمان کل کارکرد تجهیزات فرایند (a) طراحی پایه (b) طراحی اصلاحی.

Figure 2. Total Operation Time of Process Equipment (a) Base-case (b) Retrofit Design pH=7.3.

متفاوت در نمودار شکل (۳-b) نشان دهنده کمترین زمان استراحت برای راکتور ۳ است و در نتیجه تولید بیشتر است. لذا، بر اثر طرح اصلاحی، گلوگاه دستگاهی از مبدل حرارتی و مخزن نگهداری در طراحی پایه به راکتور سوم انتقال می‌یابد که بیشترین زمان کارکرد در بین دستگاه‌ها را دارد. با وجود دستیابی به هدف طراحی که تولید بیشتر است، قرار گرفتن راکتور سوم به‌عنوان گلوگاه تجهیزاتی (فاصله زمانی استراحت کم)، به دلیل اهمیت این دستگاه در مجموعه راکتوری و امکان اختلالات زمانی (به‌علت نیاز به پاک‌سازی و گندزدایی واحد) مناسب نخواهد بود.

گلوگاه‌اند. عملیات واحدهایی که در این دو دستگاه انجام می‌شود، نسبت به سایر دستگاه‌ها چندان پیچیده یا دشوار نیست و نگرانی زیادی در قبال آن وجود ندارد؛ زیرا در صورت بروز هر نوع مشکلی - مانند نیاز به تعمیرات - نسبت به سایر دستگاه‌ها مانند راکتور سریع‌تر رفع مشکل می‌شود و واحد را با مشکل جدی مواجه نمی‌کند. مقایسه شکل (۳-a) با (۲-b) نشان می‌دهد که راکتور سوم در مقایسه با دو راکتور دیگر نیاز به زمان استراحت کمتری دارد؛ زیرا شکل (۲-b) نشان می‌دهد که بیشترین مدت زمان کارکرد در راکتورها متعلق به راکتور سوم است و فاصله بین دو میله با رنگ



شکل ۳. نمودار گانت عملیات واحدها (a) طراحی پایه (b) طراحی اصلاحی.

Figure 3. Gantt Chart of Unit Operations (a) Base-case Design (b) Retrofit Design.

لذا، تعداد مراحل ناپیوسته تولید tPA گران‌قیمت در سال به ۲۶ افزایش می‌یابد و در نتیجه، سالیانه ۴۱/۰۸ Kg محصول به‌ازای یک مجموعه^۱ و ۸۲/۱۶ Kg به‌ازای دو مجموعه موازی تولید می‌شود که بیش از هدف اولیه خواهد بود. هدف اولیه واحد تأمین ۸۰ Kg tPA/year است. باتوجه به تولید بالاتر از میزان هدف مد نظر، می‌توان با احتساب ۲۵ مرحله عملیاتی در سال، زمان یک مرحله باقی‌مانده را بین ۲۵ مرحله به اشتراک گذاشت و بدین ترتیب، ۱۴ روز و ۱۵ ساعت (۲۱۰۶۰ دقیقه) را برای هر مرحله با تولید سالیانه ۸۰ Kg tPA/year منظور کرد.

در طراحی اصلاحی، زمان شروع کار مجدد راکتور اول در مرحله بعد جلوتر کشیده می‌شود و زمان چرخه کم می‌شود. با این کار، کمینه زمان یک مرحله ناپیوسته به ۱۳ روز و ۴ ساعت و ۲ دقیقه (۱۸۹۶۲ دقیقه) کاهش خواهد یافت و حدود ۳۵ ساعت استراحت برای راکتور سوم مهیا می‌شود تا در صورت بروز اختلال، زمان کافی برای رفع اشکال مهیا باشد و میزان تولید هدف به‌دست‌آید.

محصول نهایی tPA دارای خلوص ۹۹/۷٪ وزنی است که بیانگر آن است که تقریباً تمامی مواد زائد آن حذف می‌شود. به‌عنوان مثال، ماده زائد همراه به‌صورت کامل (۱۰۰٪) در میکروفیلترها حذف می‌شود یا در ستون سوانگاری (کروماتوگرافی) میل ترکیبی ۱۰۰٪ از tPA جذب و از آب و آرژنین و سایر ناخالصی‌ها جدامی‌شود. سپس، ۸۵٪ از tPA جذب‌شده در ستون به‌وسیله محلول بافر از

رژین‌ها بازیابی می‌شود. میزان هدررفت tPA در این تحقیق ۳۳٪ (بازیابی ۶۷٪) است که از مقدار بازیابی ۴۵/۶٪ وزنی ذکرشده در تحقیقات پیشین [۱۰] بیشتر است.

مطالعات امکان‌سنجی طرح به‌کمک نرم‌افزار در جدول (۳) نشان می‌دهد که هزینه مستقیم برای هر تولید ناپیوسته در حالت پایه و اصلاحی به‌ترتیب ۵۰۴۸۶۷/۵۴ و ۵۱۶۹۵/۳۸ دلار برآورد می‌شود که شامل هزینه‌های اجاره تجهیزات، نیروی کار، سرویس‌های جانبی و مواد خام است. در طرح اصلاحی ۱۶/۵٪ افزایش در هزینه مستقیم، مشاهده می‌شود. در بین هزینه‌های مستقیم به‌ترتیب برای حالت پایه و اصلاحی، هزینه نیروی کار با ۶۴/۶٪ و ۶۴/۷٪ بیشترین و هزینه سرویس جانبی با ۱/۹٪ و ۳/۸٪ کمترین درصد از کل هزینه مستقیم را شامل می‌شود. هزینه‌های غیر مستقیم در هر تولید ناپیوسته که در بردارنده هزینه‌های اداری، بازرسی، آزمایشگاهی، توزیع و بازاریابی، تحقیق و توسعه و حق امتیاز (حقوق دولتی) است که در حالت پایه و اصلاحی به‌ترتیب ۳۱۳۰۱۷/۵۶ و ۳۲۰۵۱/۱۴ دلار برآورد می‌شود. در بین هزینه‌های غیرمستقیم به‌ترتیب برای حالت پایه و اصلاحی، هزینه اداری، بازرسی و آزمایشگاهی هرکدام با ۲۴/۲٪ بیشترین برای هر دو حالت و هزینه حق امتیاز با ۴/۸٪ کمترین درصد از کل هزینه غیر مستقیم را در هر دو حالت شامل می‌شود.

جدول ۳. هزینه‌های مستقیم و غیر مستقیم در دو حالت طراحی پایه و اصلاحی.

Table 3. Direct and indirect product costs for bas case and modified designs.

Base case		Modified case	
Direct product costs (USD/ kg of tPA)			
Equipment Rental	135,884.14	Equipment Rental	13,933.88
Labor	326,121.93	Labor	33,441.31
Utilities	9,694.63	Utilities	1,962.84
Raw Materials	33,166.32	Raw Materials	2,357.35
<i>Total</i>	504,867.03	<i>Total</i>	51,695.38
Indirect product costs (USD/ kg of tPA)			
Administrative	75,730.05	Administrative	7,754.31
Supervision	75,730.05	Supervision	7,754.31
Lab Charges	75,730.05	Lab Charges	7,754.31
Distribution & Marketing	50,486.70	Distribution & Marketing	5,169.54
Research & Development	20,194.68	Research & Development	2,067.82
Royalties	15,146.01	Royalties	1,550.86
<i>Total</i>	313,017.56	<i>Total</i>	32,051.14
Total (Direct + Indirect) product costs (USD/ kg of tPA)			
817,884.59		83,746.52	

طراحی اصلاحی با قراردادن یک مبدل حرارتی و مخزن نگهداری مجزا برای راکتور سوم، در برطرف کردن گلوگاه دستگامی و کاهش زمان چرخه گام برداشته شد که با زمان تولید در هر فرایند ناپیوسته به زمان ۱۳ روز و ۴ ساعت و ۲ دقیقه کاهش یافت که از تفاوت زمانی ایجاد شده (حدود ۲۵ روز) می توان برای افزایش میزان تولید استفاده کرد. این فرصت زمانی، زمانی امن برای استراحت راکتور سوم یا زمان تعمیراتی در صورت بروز حوادث پیش بینی نشده برای رسیدن به همان مقدار تولید ۸۰ Kg tPA/year هم می تواند باشد. در طرح اصلاحی به میزان ۱,۲۰۶,۸۸۲ دلار افزایش هزینه نسبت به طراحی حالت پایه مشاهده می شود. به منظور مطالعات آتی، بررسی سایر نرم افزارهای شبیه سازی دیگر مانند SuperPro Designer و مقایسه نتایج با Aspen Batch Plus یا استفاده از نرم افزارهای شبیه سازی مخصوص زمان بندی فرایندها مانند Schedule Pro پیشنهاد می شود.

هزینه سرمایه گذاری خرید و نصب تجهیزات و ملزومات مورد نیاز، ۱۱۵۰۷۸۰ دلار براساس جدول (۴) است که بیشترین هزینه مربوط به راکتور است. در طرح اصلاحی، ۵۴۱۰۲ دلار بابت یک مبدل، مخزن ذخیره و پمپ انتقال مواد اضافه می شود که ۴/۷٪ افزایش هزینه ثابت را نسبت به طراحی پایه نشان می دهد.

۴. نتیجه گیری

کاربرد خاص و نیاز زیاد به tPA، عوارض جانبی کمتر در مقایسه با سایر انواع فعال کننده پلاسمینوزن بافتی و زمان طلایی ۶۰ min که شرایط جلوگیری از سخته را ممکن می کند، این دارو را نسبت به سایر روش های درمان لختگی متمایز کرده است. در بررسی انجام شده که در آن به شبیه سازی حالت پایه و اصلاحی قسمت راکتورهای فرایند تولید tPA پرداخته شد، نتایج شبیه سازی نشان داد که با هدف تولید ۸۰ Kg tPA/year (سال کاری ۳۰۰ روز فرض شد) در حضور سه راکتور، ۱۴ روز و ۱۵ ساعت (۲۱۰۶۰ دقیقه) نیاز است. در

جدول ۴. هزینه سرمایه ای حالت پایه [۱۳].

Table 2. Capital cost of base case [13].

Unit ID	Description	Purchase Cost (USD)	Quantity	Total Cost (USD)	Percent Cost (%)
Base case design					
Reactor 1	40 L Fermenter	85,000	2	170,000	14.7
P4	Pump	1,595	2	3,190	0.3
Reactor 2	400 L Fermenter	125,000	2	250,000	21.7
P5	Pump	1,595	2	3,190	0.3
Reactor 3	5,000 L Fermenter	252,000	2	504,000	43.7
P6	Pump	1,595	2	3,190	0.3
T-1	Media Mixing tank	28,658	2	57,316	5
P1	Pump	1,595	2	3,190	0.3
P2	Pump	1,595	2	3,190	0.3
HX-1	Heater	6,456	2	12,912	1.1
P3	Pump	1,595	2	3,190	0.3
Hold up Tank 1		19,000	2	38,000	3.3
HX-2	Cooler	6,456	2	12,912	1.1
Hold up Tank 2	Tank after Reactor 3	19,000	1	38,000	3.3
P7	Pump	3,250	2	6,500	0.6
CT1	Tubing and Insulation	2,000	2	4,000	0.3
RFU	Refrigeration Unit	20,000	2	40,000	3
				1,152,780	100.00
Modified design					
HX-3	Heater	6,456	2	12,912	1.1
Hold up Tank 3	Tank Before HX-3	19,000	2	38,000	3.1
P8	Pump	1,595	2	3,190	0.3
				1,206,882	-

مراجع

- [1] Bose, K. (2022). Textbook on Cloning, Expression and Purification of Recombinant Proteins. Springer, Singapore, 2.
- [2] Khedr, E. M., Abdelwarith, A., Moussa, G., & Saber, M. (2023). Recombinant tissue plasminogen activator (rTPA) management for first onset acute ischemic stroke with covid -19 and non-covid-19 patients. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Disease*, 32: 1-10.
- [3] Xu, Y., Chen, D., Liu, P., Hu, Y., Peng, S., Chen, S., Li, Y., Lin, W., Jiang, L., Yuan, C., & Huang, M. (2023). A triple fusion tissue-type plasminogen activator (TriF-ΔtPA) enhanced thrombolysis in carotid embolism-induced stroke model. *International Journal of Pharmaceutics*, 637: 122878.
- [4] Raji, F., & Rahbar Kelishami, R. (2020). A Review of DNA Purification Methods: Microfluidics Systems. *Iranian Chemical Engineering Journal*, 19: 55-80.
- [5] Mojoodi, Sh., (2016). Simulating and Process Designing tissue Plasminogen Activator (tPA) Production, M. Sc. Thesis, Faculty of Engineering, University of Kashan, Kashan, Iran, [In Persian].
- [6] Seider, W. D., Seader, J. D., Lewin, D. R., & Vidalgo, S. (2016). Product and Process Design Principles: Synthesis, Analysis and Evaluation. Fourth edition, John Wiley & Sons, New Jersey, 37.
- [7] Goeddel, D. V., Kohr, W. J., Pennica, D., & Vohar, G. A. (1988). US Pat. 4766075, Genentech Inc.
- [8] Shi, G., Jianfeng Lv, Wu, W., & Zhou, R. (2024). Ipsilateral orolingual angioedema following rhTNK-tPA administration for acute ischemic stroke. *The American Journal of Emergency Medicine*, 77: 231.e1-231.e3.
- [9] Ghazizahedi, Z., & Hayati-Ashtiani, M. (2022). Investigating the Application of Heat Pump in Isomerization Unit to Decrease the Energy Consumption by Means of Pinch Technology. *Iranian Chemical Engineering Journal*, 20: 53-63, [In Persian].
- [10] Rouf, S., Douglas, P., Moo-Young, M., & Scharer, J. (2001). Computer simulation for large scale bioprocess design. *Biochemical Engineering Journal*, 8: 229-234.
- [11] Mitsuda, S., Mitsuda, N., Kobayashi, N., Suzuki, A., Itagaki, Y., Kumazawa, E., & Kawanishi, G. (1991). Tissue Plasminogen Activator (t-PA) production by human fibroblasts using a bioreactor with t-PA adsorption column. *Bioprocess Engineering*, 7: 137-140.
- [12] Barzegar, S., & Hayati-Ashtiani, M. (2024). Studying and Simulating the Separation Process of the Production Unit of Tissue Plasminogen Activator. *Iranian Chemical Engineering Journal*, 23:20-29, [In Persian].
- [13] Audette, M., Metallo, C., Nootong, K. (2000). Human tissue plasminogen activator, Department of Chemical & Biomolecular, University of Pennsylvania, USA.
- [14] Leong, D. S. Z., Tan, J. G. L., Chin, C. L., Mak, S. Y., Ho, Y. S., & Ng, S. K. (2017). Evaluation and use of disaccharides as energy source in protein-free mammalian cell cultures. *Science Reports*, 7, 45216.