

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYO BENZER İNSAN MONOKLONAL ANTİKORLARININ
ÜRETİMİNDE ÜST AKIM SÜRECİNİN OPTİMİZASYONU

ÇAĞLA KIRIMLIOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: PROF. DR. TAMER YAĞCI

TEMMUZ 2024

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜST EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYO BENZER İNSAN MONOKLONAL
ANTİKORLARININ ÜRETİMİNDE ÜST AKIM
SÜRECİNİN OPTİMİZASYONU

ÇAĞLA KIRIMLIOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM
DALI

DANIŞMAN: PROF. DR. TAMER YAĞCI

TEMMUZ 2024

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL

**OPTIMIZATIN OF UPSTREAM PROCESS FOR
BIOSIMILAR HUMAN MONOCLONAL ANTIBODIES**

ÇAĞLA KIRIMLIOĞLU

**A THESIS OF MASTER OF SCIENCE
MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS**

ADVISOR: PROF. DR. TAMER YAĞCI

JULY 2024

YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulunun 01/07/2024 tarih ve 2024/33 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 11/07/2024 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Çağla Kırımlıoğlu'nun tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Tamer Yağcı

ÜYE

: Prof. Dr. Ayten Kandilci

ÜYE

: Prof. Dr. Ceren Çıracı Muğan

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulunun

...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Biyoteknolojik ilaçlar, kompleks ve çok çeşitli olma özellikleri ile jenerik ilaçlardan ayrılırlar. Bu büyük moleküllü ilaçlar, çekirdekli veya çekirdeksiz canlı sistemlerde üretilebilirler. Biyobenzerler, orijinal biyoteknolojik ürünlerin pazardaki talebini seçeneklendirmek ve üretim maliyetini düşürmek amacıyla ortaya çıkmıştır. Amerika Gıda ve İlaç Kurumu ile Avrupa İlaç Kurumu otoriteleri, biyobenzerlerin kalite, güvenlik ve etkinlik açısından orijinal ürünlere benzemesi gerektiğini belirtmiştir. Bu çalışma, orijinal monoklonal antikör bazlı bir biyoteknolojik ilacın yerli biyobenzer üretimini hedeflemiştir ve İLKO ARGEM Biyoteknoloji Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir.

Çalışma boyunca, hedefe spesifik hücre hattı kullanılarak üst akım süreci yürütülmüştür. Erlen ölçeğindeki optimizasyon çalışmaları, medya-besiyeri taramaları, medya destekleyiciler ve konsantrasyonları, hücre ekim konsantrasyonları ve sıcaklık değişim parametrelerini inceleyerek başlatılmıştır. Optimizasyonlar sonucunda Besiyeri C ve takviye besiyeri 2 kullanılarak, 4 g/L galaktoz eklemesi ile 1.3×10^6 hücre/ml konsantrasyonunda optimum koşullar elde edilmiştir. Sıcaklık değişim noktası 33°C ve kültür verimi 3.1 g/L olarak belirlenmiştir. Ürün, otoritelerce belirlenen biyobenzerlik karakterizasyonlarına tabii tutulmuştur.

Laboratuvar ölçeğinde elde edilen optimum koşullar ile 3L ve 10L ölçek büyütme çalışmaları yürütülmüştür. Büyük ölçek çalışmalarında biyoreaktör içerisindeki pH, ortam sıcaklığı, çözünmüş oksijen seviyesi, karıştırma hızı ve güç sayısı optimize edilmiştir. Optimum koşullar 50% çözünmüş oksijen seviyesi, pH 6.95, 36.5°C ortam sıcaklığı ve güç sayısı 17 olarak belirlenmiştir.

Optimizasyon çalışmaları sonucunda, referans ürüne benzer, kalite standartlarını en yüksek verimle sağlayan, laboratuvar ölçeği ve büyük ölçek olarak hedefe spesifik bir üst akım prosesi geliştirilmiş ve optimize edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Biyobenzer, Üst Akım, Monoklonal Antikör, Ölçek Büyütme, Proses Optimizasyonu

ABSTRACT

Biotechnological drugs differ from generic drugs due to their complexity and diversity. These large molecule drugs can be produced in nucleated or non-nucleated living systems. Biosimilars have emerged to diversify the market demand for original biotechnological products and reduce production costs. The FDA (Food and Drug Administration) and EMA (European Medicines Agency) authorities have specified that biosimilars must resemble the original products in terms of quality, safety, and efficacy. This study aimed to produce a local biosimilar of an original monoclonal antibody-based biotechnological drug and was carried out at the İLKO Argem Biotechnology Center.

Throughout the study, the upstream process was conducted using a target-specific cell line. Optimization studies at the Erlen scale began with media screenings, media additives and concentrations, cell seeding concentrations, and temperature shift parameters. As a result of the optimizations, optimum conditions were achieved using Media C and Feed 2, with the addition of 4 g/L galactose and a cell seeding density of 1.3×10^6 cells/mL. The temperature shift point was 33°C, and the culture yield under optimum conditions was determined to be 3.1 g/L. The product was subjected to biosimilarity characterizations specified by the authorities.

Scale-up studies from the laboratory scale to 3L and 10L were conducted using the optimum conditions obtained. In the large-scale study, parameters such as pH, ambient temperature, dissolved oxygen level, agitation rate, and power number in the bioreactor were optimized. The optimum conditions were determined as 50% dissolved oxygen level, pH 6.95, ambient temperature of 36,5°C, and power number 17.

As a result of the optimization studies, an upstream process that meets quality standards similar to the reference product with the highest yield was developed and optimized both at the laboratory scale and large scale.

Keywords: Biosimilar, Upstream, Monoclonal Antibody, Scale-Up, Process Optimization

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim hayatım boyunca tüm tecrübesi ve katkıları ile öncelikle değerli danışmanım Prof. Dr. Tamer Yağcı'ya ve destekleri için laboratuvar arkadaşlarımdan başta Maide Şeker olmak üzere Arzu Aysan, Nurşah Ersezen, İrem Yalım Camcı'ya teşekkür ediyorum. Çalışmamda olan sonsuz katkıları ve destekleri sebebiyle Hatice Öncel, Dilan Karabulut Bıçak, Büşra Öztürk ve Tunahan Şengün önderliğinde tüm İLKO İLAÇ'a teşekkürü borç bilirim. Son olarak buralara gelmemde en büyük pay sahibi olan biricik eşim ve aileme tüm sabırları ve destekleri için çok teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı, İçeriği	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1. Teröpatik Monoklonal Antikorlar	3
2.2. Biyobenzerler	4
2.2.1. Kanser Tedavisinde Biyobenzerlerin Rolü	4
2.2.2. Biyobenzerlerin Ekonomiye Olan Katkısı	5
2.3. Genel Proses Geliştirme Adımları	6
2.3.1. Erlen Seviyesinde Üst Akım Proses Geliştirme Adımları	9
2.3.2. Biyoreaktör Seviyesinde Üst Akım Proses Geliştirme Adımları	10
3. GEREÇLER	13
3.1. Cihazlar	13
3.2. Genel Kimyasallar	13
3.3. Hücre Kültürü Besiyerleri ve Besiyeri Yardımcıları	13
3.4. Hücre Hattı	13
3.5. Sarf Malzemeler	14
4. YÖNTEMLER	15
4.1. Hücre Kültürü	15
4.2. Uzun Dönem Stabilite Çalışması	15
4.3. Kesikli Beslemeli Erlen	16
4.4. Erlen Seviyesinde Optimizasyon Çalışmaları	17
4.4.1. Besiyeri Tarama /Besiyeri – Takviye Besiyeri Kombinasyonu	17
4.4.2. Takviye Besiyeri Stratejisi	17
4.4.3. Galaktoz Konsantrasyon Çalışması	18
4.4.4. Galaktoz Düzenleyici Konsantrasyon Çalışması	18
4.4.5. Hücre Ekim Konsantrasyonu Belirleme Çalışması	18
4.4.6. Manganez Ekleme Çalışması	18
4.5. Biyoreaktör Seviyesinde Optimizasyon Çalışması	18
4.5.1. Hava Limiti Optimizasyonu	20

4.5.2. P/V Optimizasyonu	20
4.5.3. pH Kaydırması Çalışması	20
4.5.4. Oksijen Besleme Stratejisinin Belirlenmesi	20
4.6. Ölçek Büyütme Çalışması	21
4.7. Tekrarlanabilirlik Çalışması	21
4.8. CEX-Karboksipeptidaz B Uygulaması	21
4.9. CEX-N-terminal Glutamin Analizi	21
5. BULGULAR	22
5.1. Stabilite Çalışması Sonuçları	22
5.1.1. 12D8 ve 30B4 Klonlarının Stabilite Çalışması Sonuçları	22
5.1.2. 6E3 Klonun Stabilite Çalışması Sonuçları	28
5.2. İki Stabil Klon Olan 6E3 ve 12D8'in Karşılaştırılması	32
5.3. Erlen Seviyesinde Optimizasyon Çalışması Sonuçları	33
5.3.1. Erlen Seviyesinde Birinci Optimizasyon Çalışması Sonuçları	33
5.3.2. Erlen Seviyesinde İkinci Optimizasyon Çalışması Sonuçları	37
5.3.3. Erlen Seviyesinde Üçüncü Optimizasyon Çalışması Sonuçları	40
5.3.4. Erlen Çalışmalarının İstatiksel Analizi	44
5.4. Biyoreaktör Seviyesinde Optimizasyon Çalışması Sonuçları	45
5.4.1. P/V ve Hava Limit Optimizasyon Çalışması Sonuçları	45
5.5. Ölçek Büyütme Çalışması Sonuçları	47
5.6. Tekrarlanabilirlik Sonuçları	47
5.7. CEX (CpB&N-term Q) Analizi	48
6. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	50
KAYNAKLAR	52
ÖZGEÇMİŞ	57
TEZ METNİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR/SUNUMLAR	58
EKLER	59

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

MTX	: Metotreksat
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
FDA	: Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
EMA	: Avrupa İlaç Ajansı
CHO	: Çin Hamster Yumurtalık Hücresi
DHFR	: Dihidrofolat Redüktaz
Gal	: Galaktoz
HM	: Yüksek Mannoz
ACV	: Asidik Varyant
BCV	: Bazik Varyant
QP	: Spesifik üretkenlik
SA	: Sialik Asit
Gln	: Glutamin
Lys	: Lizin
PK	: Farmakokinetik
CGN	: Jenerasyon
TS	: Sıcaklık Kaydırması
RPM	: Referans Ürün Aralığı
P/V	: Güç Sayısı
DO	: Çözünmüş Oksijen
VCD	: Canlı Hücre Yoğunluğu
mAb	: Monoklonal Antikor
Cpb	: Karboksipeptidaz B
N-term Q	: N-terminal Glutamine
CEX	: Katyon Değişim Kromatografisi

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1: 12D8 ve 6E3 uzun dönem stabilitesi 15 günlük % canlılık ve canlı hücre sayısı sonuçları.	2
Şekil 2.1: Monoklonal antikorun genel yapısı.	3
Şekil 2.2: Biyobenzer pazarının büyüklüğü.	6
Şekil 2.3: Genel proses geliştirme adımları.	7
Şekil 2.4: Hücre hattı geliştirme ve üst akım sürecinin özeti.	8
Şekil 2.5: Modelleme ile çoklu erlen hesaplamaları.	10
Şekil 2.6: Biyoreaktörün ölçülerinin etkisi.	11
Şekil 2.7: Biyoreaktör bıçak tipleri.	12
Şekil 2.8: Biyoreaktörde kullanılan püskürtme aleti tipleri.	12
Şekil 4.1: Kesikli beslemeye kadar tohum kültür diyagramı.	16
Şekil 4.2: Biyoreaktör ve besleme şişeleri kurulum şeması.	19
Şekil 5.1: 12D8 ve 6E3 uzun dönem stabilitesi 15 günlük % canlılık ve canlı hücre sayısı sonuçları.	23
Şekil 5.2: 12D8 MTX +/- koşullarının 0 ve 50CGN'de canlılık ve canlı hücre sayısı sonuçları.	23
Şekil 5.3: 30B4 MTX +/- koşullarının 0 ve 50CGN'de canlılık ve canlı hücre sayısı sonuçları.	24
Şekil 5.4: 12D8 ve 30B4 klonlarının stabilite çalışmasındaki verimlilik ve spesifik üretkenlik sonuçları.	24
Şekil 5.5: 12D8 ve 30B4 klonlarının stabilite çalışmasındaki G1+G2 sonuçları.	25
Şekil 5.6: 12D8 ve 30B4 klonlarının stabilite çalışmasındaki G0, Mannoz ve Sialik % sonuçları.	26
Şekil 5.7: 12D8 ve 30B4 klonlarının stabilite çalışmasındaki yük varyantı sonuçları.	26
Şekil 5.8: 12D8 klonunun stabilite çalışmasındaki CEX analizi sonucu.	27
Şekil 5.9: 30B4 klonunun stabilite çalışmasındaki CEX analizi sonucu.	28
Şekil 5.10: 6E3 klonunun stabilite çalışmasının 15 günlük canlı hücre sayısı sonuçları.	29
Şekil 5.11: 6E3 klonunun stabilite çalışmasının 15 günlük canlılık% sonuçları.	29
Şekil 5.12: 6E3 klonunun stabilite çalışmasının verimlilik sonuçları.	30
Şekil 5.13: 6E3 klonunun stabilite çalışmasının spesifik üretkenlik sonuçları.	30
Şekil 5.14: 6E3 klonunun stabilite çalışmasının glikan sonuçları.	31
Şekil 5.15: 6E3 klonunun stabilite çalışmasının yük varyantı sonuçları.	31
Şekil 5.16: İki stabil klon olan 6E3 ve 12D8'in kesikli besleme çalışması.	32
Şekil 5.17: 6E3 klonunun 1.erlen optimizasyonunun 15 günlük canlı hücre yoğunluğu sonuçları.	33
Şekil 5.18: 6E3 klonunun 1.erlen optimizasyonunun 15 günlük canlılık sonuçları.	34
Şekil 5.19: 6E3 klonunun 1.erlen optimizasyonunun verimlilik sonuçları.	34

Şekil 5.20: 6E3 klonunun 1.erlen optimizasyonunun glikan sonuçları.	35
Şekil 5.21: 6E3 klonunun 1.erlen optimizasyonunun yük varyantı sonuçları.	36
Şekil 5.22: 6E3 klonunun 2.erlen optimizasyonunun 15 günlük canlı hücre yoğunluğu sonuçları.	37
Şekil 5.23: 6E3 klonunun 2.erlen optimizasyonunun 15 günlük canlılık sonuçları	38
Şekil 5.24: 6E3 klonunun 2.erlen optimizasyonunun verimlilik sonuçları	38
Şekil 5.25: 6E3 klonunun 2.erlen optimizasyonunun glikan sonuçları	39
Şekil 5.26: 6E3 klonunun 2.erlen optimizasyonunun yük varyantı sonuçları	40
Şekil 5.27: 6E3 klonunun 3.erlen optimizasyonunun 15 günlük canlı hücre yoğunluğu sonuçları.	41
Şekil 5.28: 6E3 klonunun 3.erlen optimizasyonunun 15 günlük canlılık sonuçları.	42
Şekil 5.29: 6E3 klonunun 3.erlen optimizasyonunun verimlilik sonuçları.	42
Şekil 5.30: 6E3 klonunun 3.erlen optimizasyonunun glikan sonuçları.	43
Şekil 5.31: 6E3 klonunun 3.erlen optimizasyonunun HM% ve SA% sonuçları.	43
Şekil 5.32: 6E3 klonunun 3.erlen optimizasyonunun yük varyant sonuçları.	43
Şekil 5.33: Tüm erlen sonuçlarının DOE programındaki 3D Surface sonuçları.	44
Şekil 5.34: Optimizasyon sonucunda seçilen erlen çalışmasının sonuçları.	45
Şekil 5.35: Biyoreaktör seviyesinde optimizasyon çalışması sonuçları.	46
Şekil 5.36: 3L'den 10L biyoreaktöre uygulanan ölçek büyütme çalışması sonuçları.	47
Şekil 5.37: Yedi farklı 10 L reaktörün tekrarlanabilirlik sonuçları.	47
Şekil 5.38: CEX analizi ile karboksipeptidaz B uygulaması.	48
Şekil 5.39: CEX analizi ile N-terminal Glutamin tespiti.	49

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1: Proses geliştirme adımlarındaki başarı ölçütleri ve hedeflenen değerler.	7
Tablo 4.1: Corning çalkalamalı erlen hacimleri ve uygun çalışma hacimleri.	16
Tablo 5.1: 6E3 klonunun uzun dönem stabilite çalışması planı.	28
Tablo 5.2: 6E3 klonunun 1.erlen optimizasyonun planı.	33
Tablo 5.3: 6E3 klonunun 2.erlen optimizasyonun planı.	37
Tablo 5.4: 6E3 klonunun 3.erlen optimizasyonun planı.	41



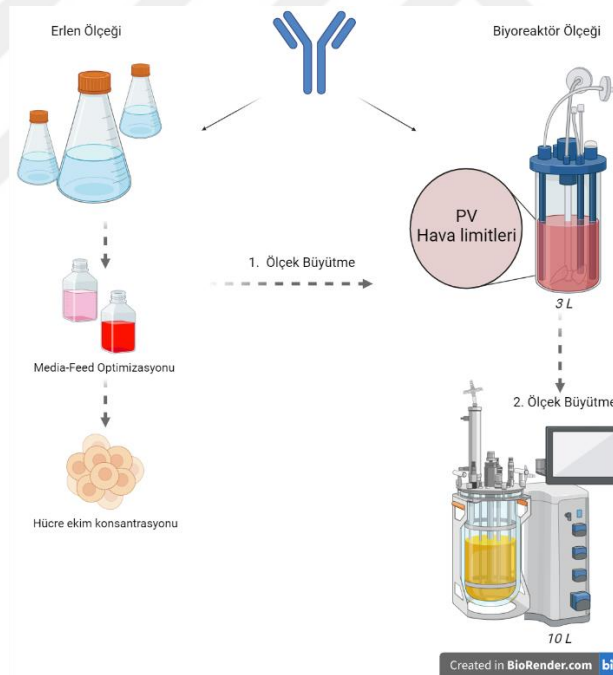
1. GİRİŞ

Biyobenzer, kalite, güvenlik ve etkinlik açısından halihazırda onaylanmış bir biyoteknolojik ürünle karşılaştırılabilen bir biyoteknolojik üründür. Ülkemizde biyoteknoloji alanında çalışmalar sürdürülmektedir fakat henüz çalışmalar yeterli seviyeye ulaşmamıştır. Bu durumun değişmesi için yenilikçi ürünlerin hedeflenmesi ve öncelikle genel olarak biyoteknolojiye ait bilgi birikiminin, yetkin kadroların artırılması ve uygun altyapıların kurulması ihtiyacı mevcuttur. Bununla birlikte, biyobenzer üretimlerinde genelde hazır ve ithal hücre hattı kullanılmakta olup, bu hücre hatları da ilacın maliyetini artırmaktadır. Bu sebeple, en başından itibaren yerli üretimi hedeflemek akılcı bir yöntem olarak görülmektedir. Bu sebeple, projede üretilecek biyobenzer monoklonal antikor ürünlerinde ILKO tarafından geliştirilmiş yerli hücre hatları kullanılacaktır. Sektörde ihtiyaç duyulan özellikle besiyeri, reçineler gibi ana hammaddelerin, plastik sarfların, maliyetli analitik kitlerin yerli olarak gerekli kalitede üretilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu girdilerin yurt dışı bağımlı olarak sağlanması, hem malzeme terminlerini kabul edilemeyecek seviyede uzatmakta hem de maliyetleri döviz endeksli olarak arttırıp, sürdürülebilirlikten uzaklaştırmaktadır. Biyoteknolojik ürünlerin ve biyobenzer ürünlerin geliştirilmesinde belirli kısımların ülkemizde yapılması mümkündür. Bu çalışma ARGE ve üretim girdilerinin yerlileştirilmesi ihtiyacına katkı sağlayacaktır.

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Projede kanser tedavisinin geleceği olan insan mAb biyobenzerlerinin İLKO Biyoteknoloji Merkezi'nde üretilmiş hücre hattı platformu kullanılarak pilot üretim altyapısının kurulması amaçlanmaktadır. Tüm protein ve mAb ürünler için uygun olan bu altyapının kullanıma hazır hale getirilmesi, diğer biyobenzerler ve devamında ülkemizi ilaç sektöründe öne geçirecek yenilikçi ürünlerin geliştirilip üretilmesine büyük katkı sağlayacaktır. Talep miktarı, endikasyonlarının ülkemizde ve dünyadaki yaygınlığı göz önünde bulundurularak belirlenmiş olan ve yerli olarak üretilmeleri ile hastalarımızın tedavisi için fayda sağlayacaktır. Projede, proses geliştirme, pilot ölçek büyütme ve üretim, etkililik ve güvenilirlik ARGE safhalarının tamamlanması

amaçlanmıştır. Çalışmada İLKO ARGEM Biyoteknoloji Merkezi tarafından üretilmiş 6E3 klonu ile üst akım proses geliştirilerek biyobenzer üretimi çalışması yapılmıştır. Erlen çalışmaları öncesinde üç farklı klona stabilite çalışması yapılmıştır. Bu klonlardan 30B4, 12D8 ve 6E3 klonuna stabilite çalışması yürütülmüştür. 6E3 klonunun yüksek verimlilik ve uygun kalitede ürün üretmesi için optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Erlen ve biyoreaktör seviyesinde yüksek verimlilikte ve uygun profilde ürün elde etmek üzere üretim koşulları optimize edilecektir. Bu amaçla, metabolit miktarları, hücre büyüme profilleri, canlılık, verimlilik, protein genel karakteri analiz edilerek, en uygun pH, oksijen, sıcaklık, besleme stratejisi koşulları belirlenecektir. Bu kapsamda 6E3 klonu için ölçek büyütme sabit güç sayısı (P/V) stratejisi kullanılarak yapıldı. 3L biyoreaktör ve 10L biyoreaktör olmak üzere ölçek büyütme denemeleri gerçekleştirilecektir. Son olarak prosesin tekrarlanabilirlik çalışmaları yapılmıştır (Şekil 1.1).

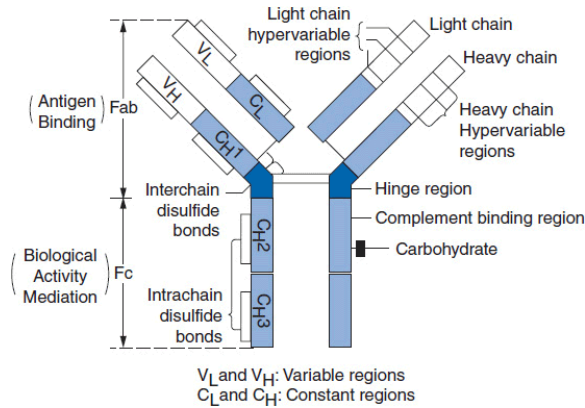


Şekil 1.1: Biyobenzer monoklonal antikor üretiminde erlen ölçeği ve biyoreaktör ölçeğinde optimizasyon ve ölçek büyütme çalışması özeti.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Terapötik Monoklonal Antikor

Monoklonal antikorlar, belirli bir hedefe spesifik olarak bağlanabilme yeteneğine sahip, laboratuvar ortamında üretilen tek bir klona sahip hücre soyundan gelen immunoglobulinlerdir [Nelson vd., 2000]. Bağışıklık sistemi tarafından doğal olarak üretilen antikorlar gibi, vücuttaki belirli varlıkları hedef alarak işlev görürler, ancak kontrollü bir laboratuvar ortamında üretilirler ve genellikle tıbbi tedavilerde kullanılırlar [Buss vd., 2012]. Monoklonal antikorlar günümüzde biyoteknoloji ve biyofarmasötik alanında yaygın olarak kullanılan moleküllerdir [Li vd., 2010]. Son zamanlarda memeli hücre kültüründe monoklonal antikor (mAb) üretimi esas olarak büyük ölçek karıştırılmalı tank reaktörlerinde ve kesikli besleme süreci ile gerçekleştirilmektedir. Terapötik proteinlerin üretiminde çoğunlukla rekombinant Çin hamster yumurtalık (CHO) hücreleri olarak adlandırılan hücreler kullanılmaktadır [Kunert ve Reinhart, 2016]. Bunun asıl sebebi kültür ortamında süspansiyon halinde kolayca büyüebilmesi ve insana benzer glikozilasyon izleri taşımasından kaynaklanır. Monoklonal antikorlar genel olarak yaklaşık 150kDA büyüklüğünde olup ağır ve hafif zincir çiftlerinden oluşan proteinlerdir. (5) Bir değişken bölge (VH), menteşe bölgesi ve üç adet sabit bölge (CH1, CH2 ve CH3) ile ağır zincirleri oluşturmaktadır. Bir değişken bölge (VL) ve bir sabit (CL) bölge ise hafif zinciri oluşturmaktadır (Şekil 2.1) [Moorthy vd., 2015].



Şekil 2.1: Monoklonal antikorun genel yapısı.

2.2. Biyobenzerler

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) tanımına göre; biyobenzer ilaç, ruhsatlı referans (orjinator) biyoterapötik ürüne kalite, güvenlik ve etkinlik açısından benzer olan üründür [Kang vd., 2023]. FDA (Food and Drug Administration) ve EMA (European Medicines Agency) otoritelerinin tanımlamalarına göre biyobenzerler mevcut FDA onaylı referans ürüne veya EMA onaylı ürüne oldukça benzeyen ve klinik olarak anlamlı farklılıkları olmayan biyolojik bir üründür [Gherghescu ve Delgado-Charro, 2021]. Biyobenzer halihazırda onaylanmış bir biyoteknolojik ürünle kalite, güvenlik ve etkinlik açısından benzer olan ürün olarak tanımlanmaktadır [Başkan, 2022; Ishii-Watabe ve Kuwabara, 2019]. Başta yapısal olmak üzere etkinlik ve farmakokinetik özellikler bakımından da biyobenzer olmaları gerekmektedir. Farmasötik form, formülasyon ve kalite parametreleri açısından referans üründen farklılıklar gerekçelendirilmelidir [Ishii-Watabe ve Kuwabara, 2019].

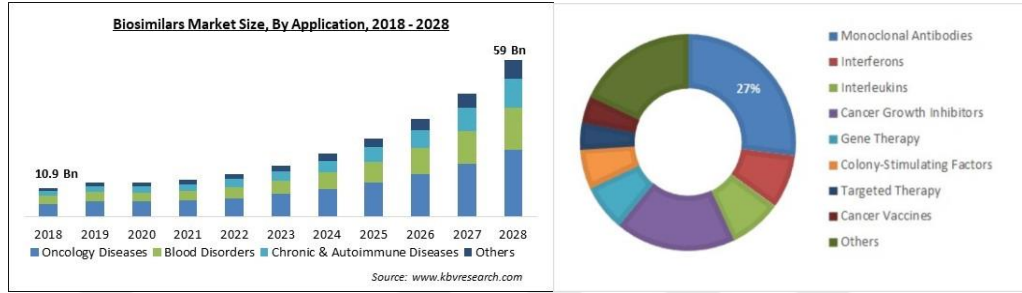
2.2.1. Kanser Tedavisinde Biyobenzerlerin Rolü

Dünya genelinde kalp ve damar rahatsızlıklarından sonra en çok can alan hastalıkların başında kanser gelmektedir. Bu açıdan kanser hastalığı için geliştirilecek teknolojiler insan sağlığı için önemli bir rol oynamaktadır. Özellikle ülkemizde kanser tedavisinde kullanılan ilaçların maliyetleri çok yüksektir, bu nedenle biyoteknolojik ürünlerden onkoloji tedavi grubunda bulunan ürünler odak noktası haline gelmiştir [Joshi vd., 2022]. İnsan monoklonal antikorunun biyobenzeri olması hedeflenen ürünlerin en yaygın endikasyonu, tüm kanserlerin %10.9-11.6'sını oluşturan küçük hücreli dışı akciğer kanseridir [Zahavi ve Weiner, 2020]. Bunun dışında melanom, Malign plevral mezotelyoma, dünya çapındaki tüm yeni kanser vakalarının 2%'sini oluşturan renal hücreli karsinom (böbrek kanseri), klasik Hodgkin lenfoma, baş ve boyun skuamöz hücre kanseri, mesane kanseri, özofagus kanseri gibi kanser hastalıkları tedavilerinde kullanılabilir [Malakar vd., 2024]. Bunun yanı sıra, bazı kanser çeşitlerinin tedavisinde, kemoterapötik ajanlar ile kombinasyon yapılarak da kullanılabilmektedir [Joshi vd., 2022].

2.2.2. Biyobenzerlerin Ekonomiye Olan Katkısı

EİS Türkiye İlaç Pazarı Ocak-Eylül 2020 yayınına göre, 2020 yılı ilk 9 ay itibarıyla biyoteknolojik ilaçlar değerinde 23,4% artış oranı ile 6.180,5 milyon TL satışa ulaşmışken, referans biyoteknolojik ürünler 21,3% artış la 5.542,1 milyon TL'ye ulaşmıştır. Biyobenzer ilaçların Türkiye'deki pazar payı 46% büyüyerek 638,4 milyon TL olarak belirlenmiştir. Her geçen gün artan biyoteknolojik ilaçların pazar payı göz önüne alındığında, biyobenzer ürün geliştirilmesi ve ticari üretimi Türkiye için kaçınılmazdır (Şekil 2.2). Ülkemizde halen biyoteknolojik ilaç ARGE çalışmaları sınırlıdır ve ARGE sürecinin bölünmez bir basamağı olan pilot ölçek çalışmaları için uygun altyapılar kısıtlıdır. Söz konusu teknolojilerin ülkemizde etkin hale gelebilmesi ve gerekli altyapıların oluşturulabilmesi ilaç sanayimiz için önemlidir. İEİS tarafından yayınlanan biyoteknolojik ilaçlar kitapçığına göre (2016) "Türkiye' de 1 kilogram biyoteknolojik ilaca ortalama 1 milyon dolar ödenmektedir ve Biyoteknolojik ilaçların küresel ilaç pazarındaki ağırlığının artışı ile birlikte ithalata bağlı bir biyoteknolojik ilaç tedarik modeli Türkiye için sürdürülebilir değildir ve yerli üretim ile desteklenmediği takdirde Türkiye'nin ilaçtan kaynaklanan cari açığının artacağı ortadadır." Yerli projeler söz konusu ürün ithalatını azaltmak ve kamu maliyesine katkıda bulunmakla birlikte hastalarımızın yerli biyoteknolojik ilaçlara daha uygun maliyetle erişimini mümkün kılarak, söz konusu sorunlara çözüm oluşturacaktır. Ülkemizin dünya biyoteknoloji sektöründe yer edinmesi ihtiyacı olmakla birlikte ülkemizdeki çalışmalar biyoteknolojideki öncü ülkelere göre henüz yeterli düzeyde değildir. Bu durumun değişmesi için yenilikçi ürünlerin de hedeflenmesi ve öncelikle genel olarak biyoteknolojiye ait bilgi birikiminin, yetkin kadroların artırılması ve uygun altyapıların kurulması ihtiyacı mevcuttur. Bununla birlikte, biyobenzer üretimlerinde genelde hazır ve ithal hücre hattı kullanılmakta olup, bu hücre hatları da ilacın maliyetini artırmaktadır. Bu sektörde ihtiyaç duyulan özellikle besiyeri, reçineler gibi ana hammadde, plastik sarfların, maliyetli analitik kitlerin yerli olarak gerekli kalitede üretilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu girdilerin yurt dışı bağımlı olarak sağlanması, hem malzeme terminlerini kabul edilemeyecek seviyede uzatmakta hem de maliyetleri döviz endekslili olarak arttırıp, sürdürülebilirlikten uzaklaştırmaktadır. Biyoteknolojik ürünlerin ve biyobenzer ürünlerin geliştirilmesinde belirli kısımların ülkemizde yapılması mümkündür. ARGE laboratuvarında ve üretim alanında yapılacak proses geliştirme ve ölçek büyütme çalışmalarına ek olarak, viral

güvenlik analizlerinin, hücre bankası karakterizasyonunun, özellikle sinomolgus maymun çalışmalarının dış partilerde hizmet olarak yaptırılması gerekmektedir. Fakat bu çalışmaların birçoğunun ülkemizde yapılması henüz mümkün değildir. Bu durum hem ürün geliştirmeyi daha maliyetli hale getirmektedir, hem de süreçleri uzatmaktadır.



Şekil 2.2: Biyobenzer pazarının büyüklüğü.

2.3. Genel Proses Geliştirme Adımları

Biyoteknolojik ilaçların üretim prosesi üst akım prosesi ve alt akım prosesi olmak üzere kültivasyon ve saflaştırma olarak ayrılmaktadır [Guajardo & Schrebler, 2024]. Üst akım prosesinde elde edilen biyobenzer ilaçlar, alt akım prosesinde ilk olarak filtrasyon/ santrifüj/ çöktürme yöntemleriyle hücre ve hücre kalıntılarından arındırılmaktadır [Liu vd., 2010; Singh vd., 2013]. Santrifüj tekniğine kıyasla filtrasyon tekniği, ölçeklenebilir oluşu ve maliyeti açısından yaygın kullanılan bir yöntemdir [Brinkmann vd., 2018]. Hücrelerinden ayrılan hasat, yakalama (capture) kromatografisi yöntemi ile kısa sürede en yüksek verimle ve en yüksek saflıkta ürün eldesini sağlamaktadır. Yakalama kromatografisi, afinite kromatografisi tekniğine dayanmaktadır. Üst akım proses teknolojisi çalışmaları, hücre kültürü uygulamaları ve biyoreaktör teknolojisi alt başlıklarını kapsamaktadır [Chen vd., 2018]. Üst akım prosesi kapsamında biyoreaktör teknolojisi hedef ürünün en yüksek verimde ve istenilen kalitede üretiminin sağlanması için kullanılmalıdır [Reddy vd., 2023]. Bu teknolojinin uygulamasında, reaktör yürütülmesinde kritik olan parametrelerin optimizasyonu yapılmalıdır. Bu aşamada, hücre büyüme hızı, reaktör karıştırma hızı, oksijen difüzyon katsayısı, motor gücü gibi parametrelerin hesaplanması gibi teknikler kullanılmaktadır [Reddy vd., 2023]. Alt akım proses teknolojileri ise kolon kromatografisi ve filtrasyon teknolojisi alt başlıklarını kapsamaktadır. Alt akım

prosesi kapsamında, kolon kromatografisi kapsamında son yıllarda ileri teknoloji ürünleri olan yüksek ürün bağlama kapasitesine ve impürite temizleme kapasitesi yüksek olan reçineler kullanılmalıdır. Filtrasyon basamaklarında ise derinlik filtresi ve çapraz akış teknikleri kullanılmaktadır [Singh vd., 2013]. Yine filtrasyon prosesleri için en son geliştirilmiş filtreler kullanılmaktadır.

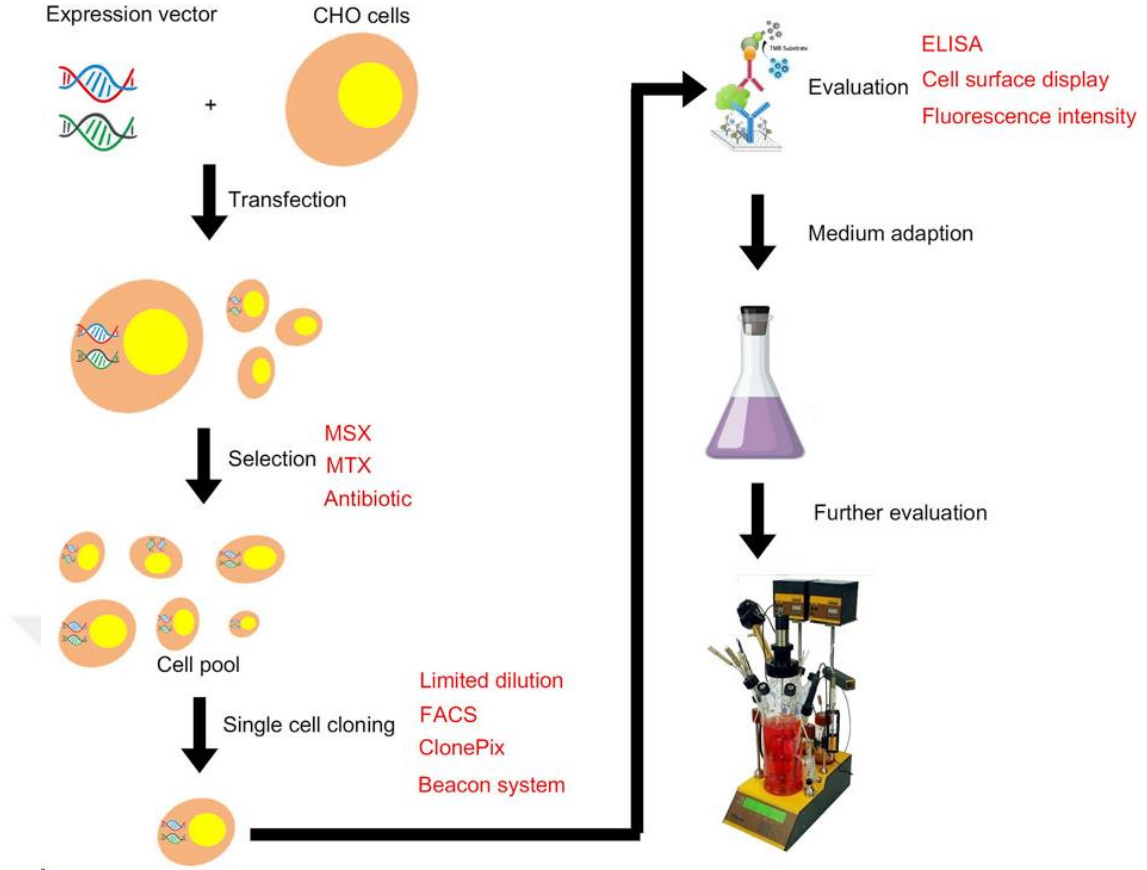
Tablo 2.1: Proses geliştirme adımlarındaki başarı ölçütleri ve hedeflenen değerler.

Başarı Ölçütü	Hedeflenen Değer
Üst akım prosesin eldesi	Verimlilik > 2g/lt. Hücre Canlılığı en az 70%
Alt akım prosesin eldesi	Verim>55%, Saflık>99%
Etkinlik, güvenlik ve farmakokinetik özelliklerin benzerliğinin in vivo hayvan ve insanda gösterilmesi	Referans ile biyobenzer
Valide pilot üretim prosesi	Verim>55%, Saflık>99%
Ölçek büyütme sonrası ürünün kalite profilini koruması	Aktivite 80%-120%, Reseptör-antijen bağlanma uygun



Şekil 2.3: Genel proses geliştirme adımları.

Bir biyobenzerin üretimi komplekstir ve birçok basamak içerdiğinden yaklaşık 8-12 yıl sürmektedir (Şekil 2.3) [Agbogbo vd., 2019].



Şekil 2.4: Hücre hattı geliştirme ve üst akım sürecinin özeti.

Hücre hattı geliştirme çalışmaları sırasında ekspresyon vektörü ve CHO hücrelerinin transfeksiyonu sonucu oluşturulan hücreler çeşitli seçimlere tabii tutularak havuzlara bölünmektedir [W. J. Xu vd., 2023]. Limitli dilüsyon ile tek klon düşürme çalışmaları yapılarak en yüksek verimi veren hücreler ile besiyeri adaptasyonuna geçilmektedir. Önce erlen seviyesinde optimizasyon ve daha sonrasında ise biyoreaktör seviyesinde optimizasyonlar ile referans ürüne benzer olan biyobenzer ürün üretilmesi amaçlanmaktadır (Şekil 2.4).

Biyofarmasötik ve biyoteknoloji sektörünün bilgi ve deneyimleriyle artan gerekli proses parametrelerinin küçük ölçekte sistematik bir çalışma ile belirlenmesini ve bu parametrelerin yüksek doğrulukla büyük ölçekli üretimlere aktarılmasını mümkün kılmaktadır [Teworte vd., 2022]. Bu bağlamda, küçük ölçekli olarak belirlenen proses parametreleri büyük ölçekli üretimlerde hayati öneme sahiptir. Başka bir deyişle, küçük ölçekte arzu edilen kritik kalite özelliklerine sahip bir ürünün üretilmesini sağlayan proses koşulları, uygun ölçek büyütme modelleri kullanılarak büyük ölçekli üretimlerdeki proses parametrelerinin belirlenmesine olanak tanır. Bu durum, aynı

kalite özelliklerine sahip ürünlerin büyük ölçeklerde de kolaylıkla üretilmesini sağlar. Bu nedenle, küçük ölçekte belirlenen proses parametreleri ile üretilen ürün, prototip olarak kabul edilir. Hücre kültürü prosesleri, belirli klonlara özgü olup yoğun bir optimizasyon süreci gerektirir. Dolayısıyla, yeni bir hücre soyunun hücre ve molekül özellikleri göz önünde bulundurularak üst akım prosesinin optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilir. Hücre büyümesi ve ürün verimliliği için uygun besi yeri ve besleme stratejilerinin seçimi, seçilen klonların stabilitesinin değerlendirilmesi, pH, sıcaklık, karıştırma hızı, oksijen miktarı ve gaz oranları gibi kritik proses parametrelerinin belirlenmesi amacıyla optimizasyon çalışmaları yapılır.

2.3.1. Erlen Seviyesinde Proses Geliştirme Adımları

Erlen seviyesinde üst akım optimizasyonu, biyoproses geliştirmede kritik bir aşamadır ve üretim verimliliğini artırmak için çeşitli stratejilerin uygulanmasını içerir. Üst akım prosesleri, mikroorganizmaların veya hücrelerin büyümesi ve biyomoleküllerin üretilmesi için gerekli olan kültür ortamı, sıcaklık, pH ve oksijen gibi parametrelerin optimize edilmesini kapsar. Bu optimizasyon süreci, biyolojik ürünlerin kalite ve miktarını önemli ölçüde etkileyebilir [Torkashvand ve Vaziri, 2017].

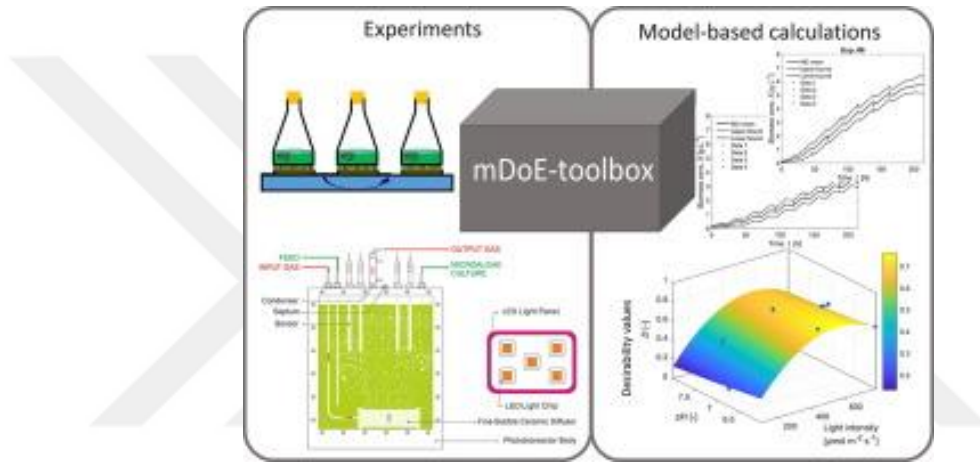
Erlen seviyesinde yapılan optimizasyon çalışmaları, laboratuvar ölçeğinde gerçekleştirilen deneylerin, biyoreaktör üretim süreçlerine uygulanabilirliğinin bir bakımdan simülasyonunu sağlar (Şekil 2.5). Bu aşamada, kültür koşullarının yanı sıra besin maddeleri, takviye besiyerleri ve diğer katkı maddelerinin en uygun konsantrasyonlarının belirlenmesi hedeflenir. Ayrıca, hücre büyüme hızları, en yüksek hücre sayısı ve ürün oluşum kinetikleri gibi biyoproses parametreleri de bu seviyede detaylı bir şekilde incelenir [Mahé vd., 2022].

Optimizasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştirilmesi, üretim maliyetlerini düşürürken, ürün saflığını ve verimini artırabilir. Bu süreçte, matematiksel modelleme ve simülasyon gibi araçlar da kullanılabilir, böylece deneysel çalışmaların sayısı ve maliyeti azaltılabilir [Wohlenberg vd., 2022]. Erlen seviyesinde elde edilen veriler, daha sonra pilot ölçek ve endüstriyel ölçek üretim süreçlerine aktarılır ve bu sayede proses geliştirme süreci hızlandırılmış olur.

Sonuç olarak, Erlen seviyesinde üst akım optimizasyonu, biyoteknoloji ve biyoproses mühendisliğinde önemli bir rol oynar ve biyolojik ürünlerin daha etkin ve verimli bir

şekilde üretilmesini sağlar. Bu optimizasyon çalışmaları hem akademik araştırmalarda hem de endüstriyel uygulamalarda geniş bir yelpazede kullanılmakta olup, biyoteknolojik yeniliklerin temelini oluşturmaktadır.

Erlen seviyesinde optimizasyon çalışması yürütülürken ağırlıklı olarak besi yeri ve supleman optimizasyonu gereklidir [Torkashvand ve Vaziri, 2017]. Kritik proses parametrelerinin belirlenmesi ve optimizasyonu son derece önemlidir. Karıştırma hızı, besiyeri ve takviye besiyeri, supleman kombinasyonu, besleme stratejisi, hücre ekim konsantrasyonu, ek suplemanlar, pH ve sıcaklık değişimi gibi parametreler kritik proses parametreleridir [Wohlenberg vd., 2022].



Şekil 2.5: Modelleme ile çoklu erlen hesaplamaları.

2.3.2. Biyoreaktör Seviyesinde Proses Geliştirme Adımları

Biyoreaktör seviyesinde üst akım optimizasyonu, biyoteknolojik üretim süreçlerinde hücre veya mikroorganizma kültürlerinin en verimli şekilde büyümesi ve ürün vermesi için gereken koşulların iyileştirilmesini içerir. Bu optimizasyon, biyoreaktörün tasarımı, işletme parametreleri ve besin bileşenlerinin dikkatlice ayarlanmasını kapsar.

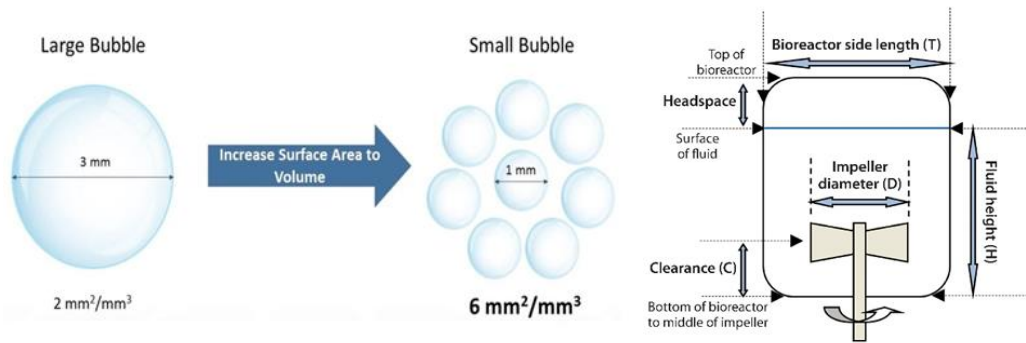
Biyoreaktör optimizasyonunun temel amacı, biyolojik sistemlerin maksimum verimle çalışmasını sağlamaktır. Bu, hücrelerin veya mikroorganizmaların ihtiyaç duyduğu ortam koşullarını en uygun hale getirmekle başlar. Sıcaklık, pH, çözünmüş oksijen ve karbondioksit seviyeleri gibi faktörler, hücre metabolizması üzerinde doğrudan etkiye sahiptir ve bu parametrelerin sürekli izlenip kontrol edilmesi gerekmektedir [Li vd., 2010]. Ayrıca, besin maddelerinin doğru miktarda ve zamanında sağlanması da kritik

öneme sahiptir. Besinlerin dengesiz verilmesi hücre büyümesini ve ürün verimini olumsuz etkileyebilir.

Biyoreaktör seviyesinde optimizasyonun bir diğer önemli bileşeni karıştırma ve havalandırmadır. Karıştırma, hücrelerin eşit şekilde beslenmesini ve atık ürünlerin ortamdan uzaklaştırılmasını sağlar. Havalandırma ise hücrelerin oksijen gereksinimlerini karşılamak için gereklidir. Hem karıştırma hem de havalandırma süreçleri, biyoreaktörün verimliliğini artırmak için dikkatlice tasarlanmalı ve optimize edilmelidir [Behera vd., 2023].

Bu optimizasyon süreçlerinde matematiksel modelleme ve simülasyon araçları sıklıkla kullanılır. Bu araçlar, deneysel çalışmaları destekleyerek süreç parametrelerinin en uygun kombinasyonlarını belirlemeye yardımcı olur. Ayrıca, biyoreaktör operasyonlarının büyük ölçekli üretime aktarılmasında riskleri azaltır ve süreç geliştirme süresini kısaltır.

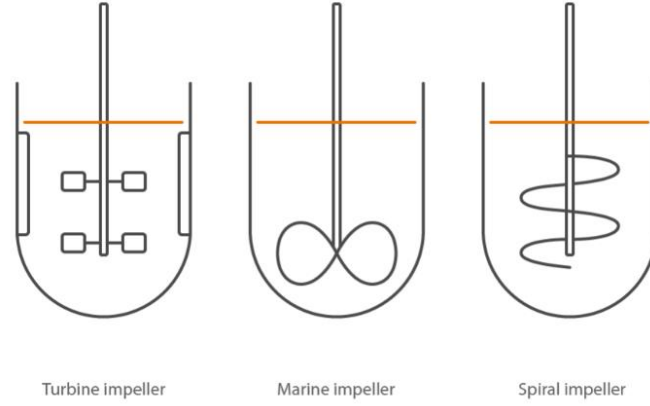
Sonuç olarak, biyoreaktör seviyesinde üst akım optimizasyonu, biyoteknolojik üretim süreçlerinde yüksek verimlilik ve kalite sağlamak için kritik bir adımdır. Biyolojik sistemlerin dinamik doğası göz önüne alındığında, bu optimizasyon sürekli bir çaba gerektirir ve biyoteknoloji alanında yapılan yenilikler, bu süreçlerin daha da geliştirilmesine olanak tanır.



Şekil 2.6: Biyoreaktörün ölçülerinin etkisi.

Biyoreaktör seviyesinde yapılan çalışmalarda reaktör geometrisi, baloncuk boyutları, oksijen transfer hızı, püskürtme aleti tipi, P/V (güç sayısı), kuru hava ve oksijen limitleri PID değerleri gibi optimizasyon parametreleri önemlidir [S. Xu vd., 2017]. Reaktör geometrisi P/V belirlenmesi oksijen transfer hızı ile proses gidişatı açısından önem taşımaktadır (Şekil 2.6). Biyoreaktörlerde üç farklı bıçak tipi bulunmakla

beraber hücre tipi ve kritik proses parametrelerine göre uygun olan bıçak proses boyunca seçilmelidir çünkü karıştırma hızı ve bıçak tipi proses boyunca etkilidir (Şekil 2.7) [Buffo vd., 2016].



Şekil 2.7: Biyoreaktör bıçak tipleri.

Püskürtme aleti (Sparger) tipi oksijen ve kuru hava ve karbondioksit gibi gazların reaktöre verilmesini sağlayan hattır [Esperança vd., 2020]. Bu sebeple püskürtme aleti tiplerini hücreler ve prosese göre doğru seçmek gerekmektedir (Şekil 2.8).



Şekil 2.8: Biyoreaktörde kullanılan püskürtme aleti tipleri.

3. GEREÇLER

3.1. Cihazlar

3L ve 15L Biyoreaktör (Applikon), pH metre (Mettler Toledo), CO₂ İnkübatör (Thermo Scientific), Vi Cell Canlılık Analizör (Beckman Coulter), Biyokimyasal Analiz Aleti (YSI), Kan Gazı Analiz Cihazı (Radiometer), Biyolojik Güvenlik Kabini (ESCO), TC20 Hücre Sayım Cihazı (Biorad), Buzdolabı (Arçelik), Tüp Kaynak Makinası (Sartorius Stedim), Tüp Mühürleme Makinası (Sartorius Stedim), Su Banyosu (Thermo Scientific), Peristaltik Pompa (Masterflex).

3.2. Genel Kimyasallar

L-glutamin (Merck 100286), D-Galaktoz (Merck), Köpük Kırıcı (Sigma), Sodyum Karbonat (Merck 106392), D-Glukoz Anhydrous Biofarma (Merck 1.37048.1000), Tripan Mavisi (Biorad), Galaktoz Düzenleyici (Fujifilm), Manganez (II) klorid tetra hidrat (Merck), HCl (Fischer Scientific), NaOH (Merck), MTX(Sigma), DMSO(Sigma).

3.3. Hücre Kültürü Besiyeri ve Besiyeri Yardımcıları

Temel Medya Ticari Besiyerleri Besiyeri A, Besiyeri B, Besiyeri C kullanılmıştır.

Takviye besiyeri olarak Feed1, Feed2 kullanılmıştır.

3.4. Hücre Hattı

İLKO İlaç Biyoteknoloji Merkezi tarafından üretilen hücre hattı kullanılmıştır.

3.5. Sarflar

125 ml Steril Erlen (Corning 431143), 250 ml Steril Erlen (Corning 431144), 500 ml Steril Erlen (Corning 431145), 1 L Steril Erlen (Corning 431147), 3 L Steril Erlen (Corning 431252), 15 ml Falkon (VWR 525-0604), Serolojik Pipet (2 ml-Corning 734-1736), Serolojik Pipet (5 ml) (Corning 734-1737), Serolojik Pipet (10 ml) (Corning 734-1738), Serolojik Pipet (25 ml)(Corning 734-1739), Serolojik Pipet (50 ml) (Corning 734-1740) , Serolojik Pipet (100 ml) (Corning 734-0355), Tozsuz Dokulu Temizleme Mendili (Kimberly Clark 21905-049), 5 L Cam Şişe (VWR 215-0057), 2 L Cam Şişe (VWR 215-1596) , 1 L Cam Şişe (VWR 215-1595), 500 ml Cam Şişe (VWR 215-1594), 500 ml Steril Plastik Şişe (Corning 28199-760), 1 L Steril Plastik Şişe (Corning 28199-762), 500 ml Şişe Kapağı Vakum Filtre, 0.22 µm (Corning 431117), 1.5 ml Tüp (VWR 211-0015), C-flex Boru (16) (Cole Parmer EW-06432-50), Silikon Boru (16) (Masterflex EW-96400-16), T Bağlantısı (Masterflex EW-40612-08), Y Bağlantısı (Masterflex EW-30614-08), 50 ml Steril Luer Lock Şırınga(613-2038), Hücre Sayım Çemberi (Biorad 1450019)

4. YÖNTEMLER

4.1. Hücre Kültürü

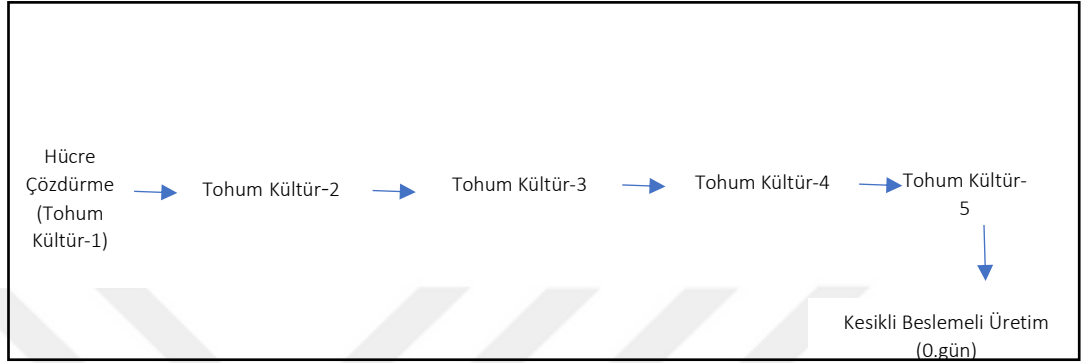
Süspansiyon CHO hücreleri çözöldükten sonra 3-4 günde bir pasajlanmalıdır. Pasajlanacak olan süspansiyon hücrelerden steril kabin altında 600 µl örnek alınır ve Vi-Cell cihazı örnek kabına konulur. Hücre yoğunluğu ve canlılığı Beckman Coulter Vi-Cell cihazında ölçölür. Hücre ekim konsantrasyonu süspansiyon CHO DG44 hücreleri için 0.5×10^6 hücre/ml'dir. 4mM L-glutamin eklenir. Pasajlanan hücreler 3-4 gün boyunca 37°C, 5% CO₂ içeren inkübatörde çalkalanarak inkübe edilir. Çalkalama hızı Chasin'in süspansiyon CHO DG44 hücreleri için 110 rpm'dir. Kesikli beslemeli erlen ve biyoreaktör çalışmaları için 5.-6. pasajda inokülasyon yapılmaktadır.

4.2. Uzun Dönem Stabillite

Uzun dönem stabillite için çalışmada üç farklı klon denendi. Bunlar 30B4, 12D8, 6E3'dür. Bu klonlar, 500nM MTX ile ve MTX olmadan 0., 30. ve 60. nesillerde bankalama yapılarak donduruldu. Her zaman basamağında 3 vial donduruldu. Daha sonra 0. ve 60. nesillerdeki bankalardan çözölerek beslemeli kesikli kültür çalışması yapılmıştır. MTX, stabilliteyi korumada etkiliyken, saflaştırma ve maliyet açısından zorluklar getirir. Bu nedenle klon MTX olmadan stabil kalırsa bu büyük bir avantaj olacaktır.

4.3. Erlen Kesikli Beslemeli Çalışma

Üretime başlamadan önce ilgili besiyerine adapte edilmiş süspansiyon CHO hücresi çözdürüldükten sonra yeterli inokulum hacmine ulaştırılmak için pasajlanarak, deney dizaynına göre 5 kez pasajlanır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: Kesikli beslemeye kadar tohum kültür diyagramı.

Hücrelerin üç dört günlük inokülasyon süresinin sonunda tohum kültürden steril kabin altında 600 µL örnek alınır ve Vi-Cell cihazı örnek kabına konulur. Hücre yoğunluğu ve canlılığı Beckman Coulter Vi-Cell cihazında ölçülür Rutinde, kesikli beslemeli kültür çalışmaları 150 ml çalışma hacminde yürütülmektedir. Süspanse kültürler için uygun erlen hacimleri **Tablo 4.1**'de verilmiştir.

Tablo 4.1 Corning Çalkalamalı Erlen Hacimleri ve Uygun Çalışma Hacimleri

Corning Çalkalamalı Erlen / <i>Corning Shaking</i>	Çalışma Hacmi / <i>Working Volume</i>
125 ml Erlenmayer Flask	20 ml-40 ml
250 ml Erlenmayer Flask	50 ml-75 ml
500 ml Erlenmayer Flask	120 ml-200 ml
1 L Erlenmayer Flask	300 ml-400 ml
3 L Erlenmayer Flask	1000 ml-1200 ml

Ölçülen hücre yoğunluğu ile hücrenin istenilen hacimde ekilebilmesi için gerekli süspanse hücre hacmi hesaplanır.

Çalışmalarda başlangıç L-glutamin konsantrasyonu 4mM, L-glutamin stok çözeltisinin konsantrasyonu ise 200mM'dır.

Kültür kabına öncelikle besiyeri sonrasında da hesaplanarak 4mM L-glutamin eklenir. Son olarak hücre süspansiyonu eklenir ve kültür 36,8°C'deki inkübatöre bırakılır.

Hücreler, son konsantrasyonları 0.5×10^6 hücre/ml olacak şekilde uygun hacimli erlene ekilir (Besiyeri taramaları veya farklı proses parametrelerinin test edileceği çalışmalarda, farklı hücre ekim konsantrasyonları da tercih edilebilir).

Hücreler, çekirdek kültür aşamasındaki ekim konsantrasyonundan farklı olarak yalnızca inokülasyon günü son konsantrasyonları istenen hücre sayısına uygun şekilde uygun hacimli erlene ekilir. Kesikli-beslemeli kültürler sıcaklık değişimi yapılacak güne kadar 36,8°C, %5 CO₂ içeren inkübatörde 120 rpm'de çalkalanarak inkübe edilir.

Proseste sıcaklık değişimi yapılabilmesi için inkübatör sıcaklığı 6. gün 36,8°C'den 33°C'ye getirilir. Sıcaklık değişimi, farklı koşulların analiz edilmesi amacı ile sıcaklık değişim zamanı logaritmik faz içinde kalacak şekildedir.

Kesikli beslemeli kültürün 0. gününden itibaren aşağıda belirtilen günlük analizler ve gerekli eklemeler üretim boyunca günün hep aynı saatinde yapılır.

4.4. Erlen Seviyesinde Optimizasyon Çalışmaları

4.4.1. Besiyeri Tarama /Besiyeri – Takviye Besiyeri Kombinasyonu

Yüksek verimlilik ve uygun kalitede ürün üretmek için besiyeri taramaları ve Besiyer-Takviye besiyeri taramaları yapıldı. Ticari Besiyeri A, Besiyeri B ve Besiyeri C ile kesikli besleme çalışmaları 15 gün boyunca sürdürüldü. Takviye Besiyeri ile Feed1 ve Feed2 kullanıldı.

4.4.2. Takviye Besiyeri Stratejisi

Takviye besiyeri 15 günlük üretim boyunca genel toplamı 20% olacak şekilde çalışma hacminin oranına göre hesaplanarak 3.gün 3 %, 5.gün 4 %, 7. Ve 9.gün 5% ve 11.gün 3 % olarak eklendi.

Bu koşul dışında verimin artırılması amacıyla 13.gün de 3% takviye besiyeri eklenmesi denendi.

4.4.3. Galaktoz Konsantrasyon Çalışması

Glikan profilinin referans ürünle benzer (rpm) aralığa girebilmesi için galaktoz eklemesi denendi. Bu amaçla 0g/L, 4g/L ve 8g/L galaktoz konsantrasyonları proste 7.gün eklenerek denenmiştir. 2.erlen optimizasyonunda takviye besiyerine galaktoz eklenerek besleme stratejisi ile denendi. Yine 2.erlen optimizasyonunda 4. ve 10. gününde 4'er g/L eklenerek denendi.

4.4.4. Galaktoz Düzenleyici Konsantrasyon Çalışması

Glikan profilinin referans ürünle benzer (rpm) aralığa girebilmesi için galaktoz yerine ticari ölçekte muadile bir ürün bulunabilmesi için hacimsel olarak 0,5(v/v%), 1(v/v%) ve 2 (v/v%) galaktoz düzenleyici 7. gününde eklendi.

4.4.5. Hücre Ekim Konsantrasyonu Belirleme Çalışması

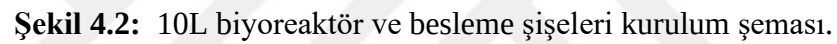
Kesikli beslemeli erlen çalışmalarında yüksek verimlilik elde etmek için optimum ekilecek hücre sayısını belirlemek için çalışma yapılmıştır. Optimizasyon çalışması kapsamında $0,6 \times 10^6$, 1×10^6 , $1,2 \times 10^6$ ve $1,3 \times 10^6$ konsantrasyonları denendi.

4.4.6. Manganez Ekleme Çalışması

Referans ürünle benzer uygun kaliteye sahip ürün elde etmek için Manganez (II) klorit tetra hidrat ekleme çalışması yapıldı. 1.erlen optimizasyon çalışması kapsamında 0 mM ve 40 mM konsantrasyonları denendi.

4.5. Biyoreaktör Seviyesinde Optimizasyon Çalışmaları

Proses başlamadan 2 gün önce Biyoreaktör 3L ve 10L Biyoreaktör Şekil 4.2'de gösterildiği şekilde kurulur. Kurulum yapılırken, pH probu kalibre edilir. 3 adet 2 L, 2 adet 500 mL ve 1 adet 5 L besleme şişesi hazırlanır (Şekil 4.2).



Otoklav sonrası bütün bağlantılar kontrol edilir, herhangi bir açıklık durumunda sterilizasyon işlemi tekrarlanır.

İnokülasyon günü biyoreaktörden örnekleme yapılır ve pH'ı ölçülür. Biyoreaktör pH'ı offline pH'a göre rekaliibre edilir. Rekalibrasyon sonrası manuel olarak CO₂ vanasının açılması yoluyla pH 7,4'e düşürülür. Tohum kültür-5 aşamasından 3 gün sonra son konsantrasyon istenen sayı olacak şekilde hesaplanan gerekli inokulum hacmi steril besleme şişesine aktarılır, tüp kaynak makinası yardımıyla besiyeri aktarma hattıyla

steril bir şekilde birleştirilir ve peristaltik pompa yardımıyla 50 ml/dakika hızla biyoreaktöre transfer edilir. pH kaskatı aktive edilir. DO kaskatı aktive edilir. Püskürtme aletinin (Sparger) hava ayarları yapılır. Manuel olarak bir ayar yapılmadan doğrudan sistem üzerinden son hacme göre gaz akışı ayarları yapılır. İnokülasyondan 2 saat sonra, biyoreaktörden steril örnekleme yapılır. 10 ml örnek alındıysa 3ml'si ile pH ölçümü yapılır. 0,6ml'si ile Vi-cell cihazında hücre canlılığı (%), yaşayan hücre konsantrasyonu (hücre/ml) belirlenir. Geriye kalan örnek 5 dakika 1100 rpm'de santrifüjlenir. Santrifüj sonrası oluşan süpernatant metabolit konsantrasyonlarını (glukoz, laktat, glutamin ve glutamat) belirlemek ve -20°C'ye stok kaldırmak için kullanılır.

Biyoreaktör seviyesinde optimizasyon çalışmalarının hepsi 3L biyoreaktör ile 15 gün boyunca kesikli beslemeli olarak yapıldı.

4.5.1. Hava Limiti Optimizasyonu

Optimizasyon kapsamında A1 ve A3 koşulu için kuru hava sınırını 0,01 vvm'e göre hesaplarken oksijeni ise maksimum bırakıldı. A2 koşulu için kuru hava limiti 200mL/dk, oksijen 100 mL/dk olarak belirlendi. A4 koşulunda ise kuru hava limiti ve oksijen limiti maksimum olarak ayarlanarak denendi.

4.5.2. P/V Optimizasyonu

P/V optimizasyonları kapsamında 14, 17 ve 22 değerleri denendi.

4.5.3. pH Kaydırması Çalışması

Sıcaklık kaydırması olarak reaktör düzeyinde sıcaklık kaydırması öncesi 6,95 belirlenirken sıcaklık kaydırması sonrası 7,05 olarak denendi.

4.5.4. Örnek Alma ve Günlük Analiz

Gün 1 ile gün 15 arasında her gün yaklaşık aynı saatte biyoreaktörden örnekleme yapılır ve hücre canlılığı (%), yaşayan hücre konsantrasyonu (hücre/ml), pH ve metabolit miktarları (g/L) ölçülür. Besleme günlerinde, biyoreaktöre besleme sırasıyla Takviye besiyeri, L-glutamin, glukoz olacak şekilde verilmiştir.

4.6. Ölçek Büyütme Çalışması

Ölçek büyütme çalışması sabit P/V güç sayısı stratejisi kullanılarak yapılmıştı. 3L'den 10'L ölçek büyütme çalışması yapıldı.

4.7. Tekrarlanabilirlik Çalışması

Ölçek büyütme çalışması sonrası 7 kez tekrarlanabilirlik için aynı koşullarda reaktör denemesi yapıldı.

4.8. CEX Karboksipeptidaz B Uygulaması

C-terminal lizin kalıntısının in vivo olarak yaklaşık bir saatlik (62 dakika) yarılanma ömrüyle hızla kaybolduğu bulunmuştur.

C terminal Lizin varyantı Karboksipeptidaz B tedavisi ile belirlendi. Reaksiyon, 200 µg Referans ürünü ve 10 µg Karboksipeptidaz B (Merck, 8039852001) (enzim: protein=1:20) ile 37°C'de 1 saatlik inkübasyon ile gerçekleştirildi.

4.9. CEX N-terminal Glutamin Analizi

Formülasyon solüsyonunda 2 hafta boyunca 40 °C sıcaklığında 2 hafta inkübe edilmiştir.

5. BULGULAR

5.1. Stabilité Çalışması Sonuçları

5.1.1. 12D8 ve 30B4 Klonlarının Stabilité Çalışması Sonuçları

Biyofarmasötik moleküllerin üretiminde, memeli hücre kültürü teknolojisi yaygın olarak kullanılmasına rağmen hala çözülmesi gereken çok sayıda sorun bulunmaktadır. CHO hücrelerindeki genetik çeşitlilik ve mutasyon oranları, klonal bir CHO hücresinin soyu, her hücre bölünmesiyle genetik olarak çeşitli hale geldiğinden, hafife alınmıştır. Ürünler biyoreaktörlerde üretim boyunca bölünerek üretildiğinden stabilite önemlidir. CHO hücrelerindeki genetik değişikliklerin kapsamı ve oranı üzerine onlarca yıllık araştırmaları gözden geçiriyoruz ve güvenilir üretim süreçleri kurarken genomik kararsızlıktaki eğilimleri en aza indiren yaklaşımlar gerekiyor. Transfeksiyondan üretilen hücre popülasyonlarının üretim boyunca en iyi ihtimalle haftalar ila aylar arasında stabil kalması gerekmektedir. Kararlı hücre popülasyonları, çeşitli alt popülasyonların seçim eğilimlerini azaltan belirli kültür koşulları altında çeşitli üretim aşamaları için seçilecek ve korunacaktır. Bu nedenle, bu çalışmanın amacı en iyi kararlı klonu seçmektir

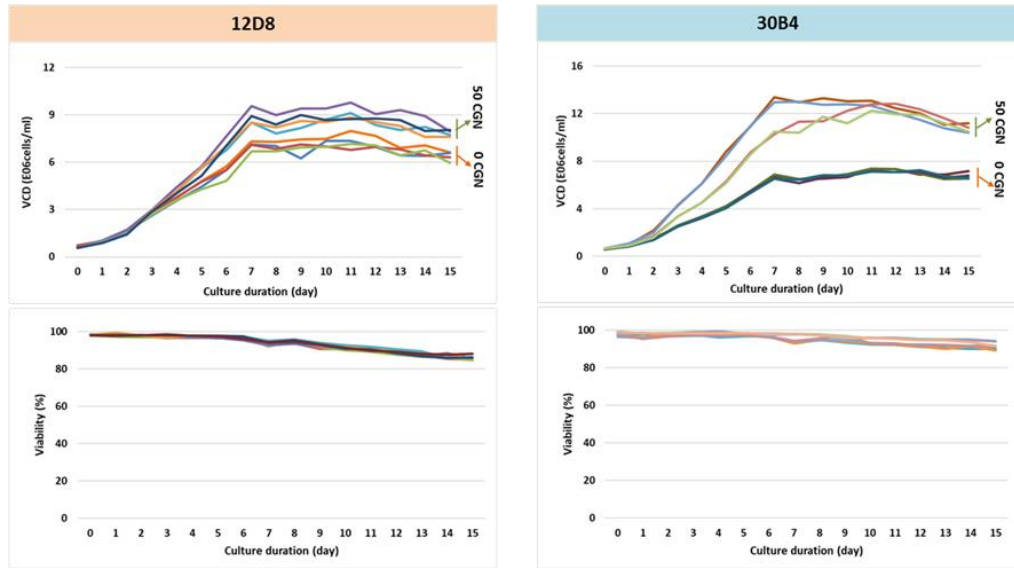
Çalışmada koşullar MTX +/- şeklinde 0 CGN ile 50 CGN'den kuruldu. Çalışmada 12D8 ve 30B4 klonu kullanıldı. Medya A ve Feed1 ile stabilite çalışması yürütüldü.

Besleme Stratejisi: % 20; 3 % @D3, 4 % @D5, 5 % @D7, 5 % @D9, 3 % @D11

Glutamin Ekleme: 4 mM @D3, 2 mM @D5, 1 mM @D7

Sıcaklık Kaydırması: 33°C @D6

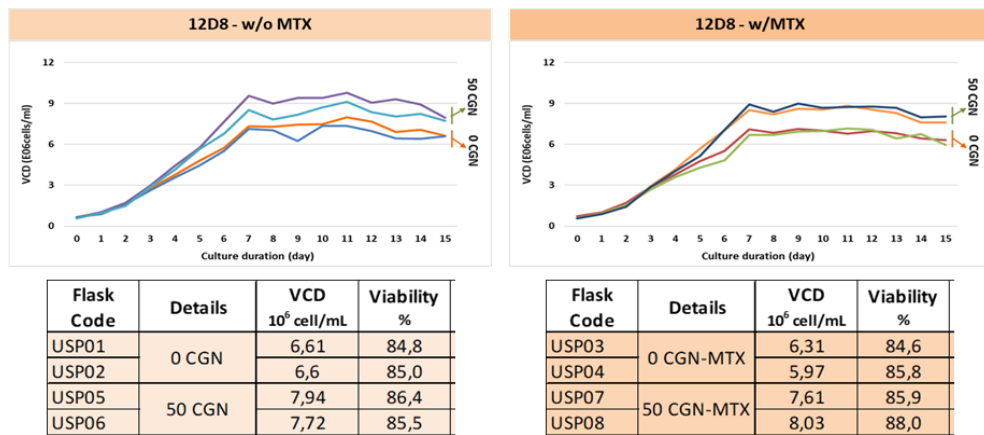
Glikoz Limit $\leq 3,5$ mg/ml



Şekil 5.1: 12D8 ve 30B4 uzun dönem stabilitesi 15 günlük % canlılık ve canlı hücre sayısı sonuçları.

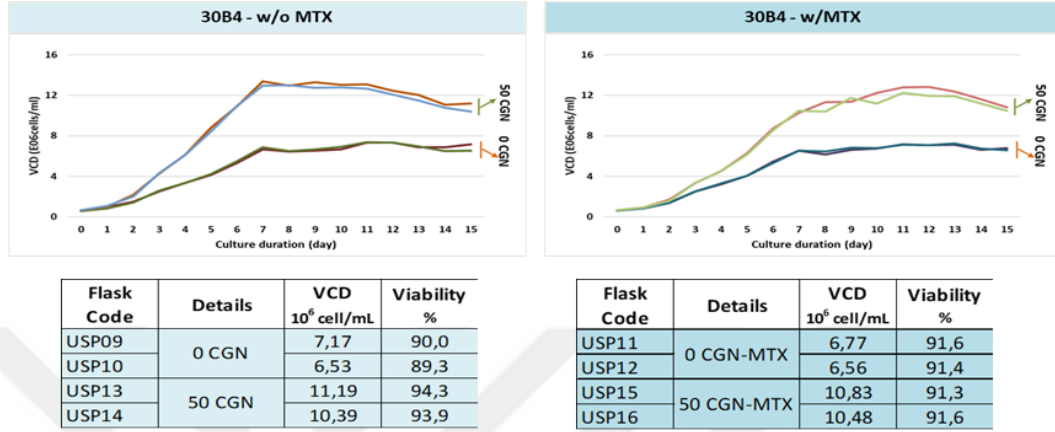
Stabilite çalışmasının sonunda hücrelerin büyüme profilleri genel olarak incelendiğinde, her iki klonun da 50 CGN’nde 0 CGN’e göre daha fazla hücre sayısına sahip olduğu bulundu. 30B4 klonunda anlamlı bir fark görülürken 12D8 için anlamlı bir fark bulunmadı. Bununla beraber MTX +/- durumunun klonların büyüme profillerinde belirgin bir fark yaratmadığı görüldü. Ayrıca, her iki klonun canlılığı da kültür süresi boyunca ve kültür süresi sonunda 80%’in altına düşmedi (Şekil 5.1).

Klonlar, MTX +/- durumuna göre ayrı ayrı incelendiğinde;



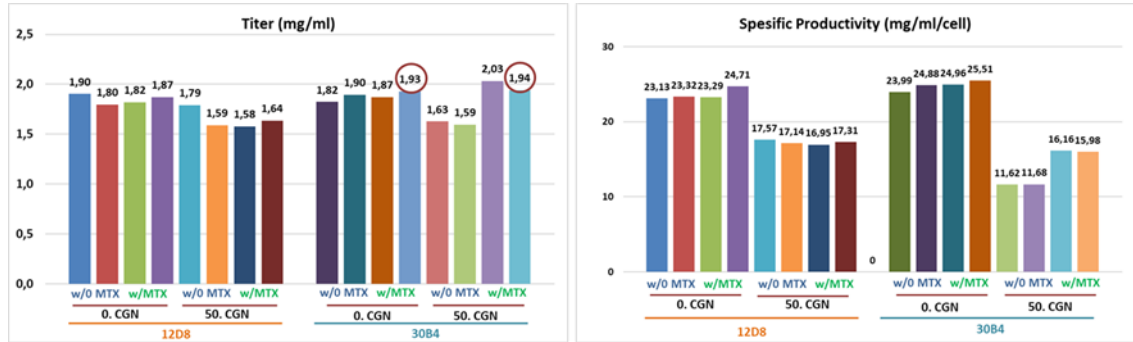
Şekil 5.2: 12D8 MTX +/- koşullarının 0 ve 50CGN’de canlılık ve canlı hücre sayısı sonuçları.

12D8 klonu için MTX +/- koşullarının her ikisinde de hücre sayılarının yaklaşık olarak benzer olduğu görüldü. Bununla beraber iki durumda da 50 CGN'deki hücrelerin canlı hücre yoğunluğunun 0 CGN'e göre daha yüksek olduğu sonucuna ulaşıldı. Her iki durumda da hücre canlılığı 80%'in altına düşmemiştir.



Şekil 5.3: 30B4 MTX +/- koşullarının 0 ve 50CGN'de canlılık ve canlı hücre sayısı sonuçları.

30B4 klonunda canlı hücre yoğunluğu 0 CGN ve 50 CGN arasında yaklaşık 56% fark görüldü. 12D8 klonundakinden ayrı olarak, bu klonda hücre canlılığının kültür süresi sonunda 90%'ın altına düşmediği sonucuna ulaşıldı. Ayrıca hücre sayısının 50 CGN'de 12D8'e göre daha fazla olduğu görüldü.



Şekil 5.4: 12D8 ve 30B4 klonlarının stabilite çalışmasındaki verimlilik ve spesifik üretkenlik sonuçları.

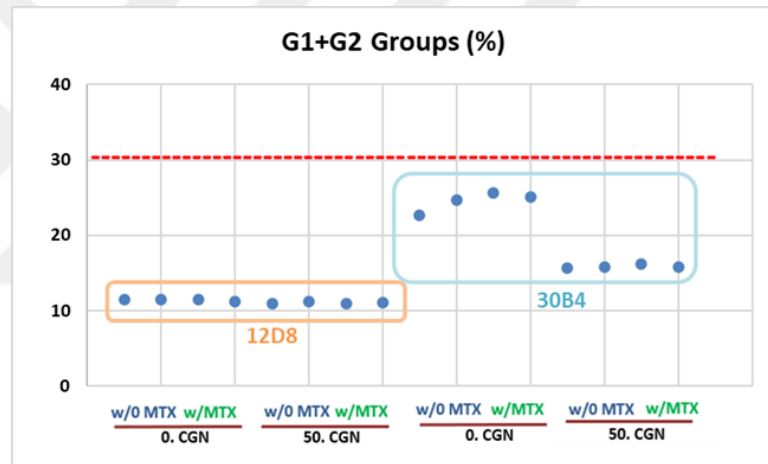
Verimlilik sonuçları incelendiğinde, 12D8 klonu için verimlilikler arasında w/o MTX koşulunda 0 CGN ile 50 CGN arasında 8,6%'lık bir fark varken, w/MTX koşulu için 13,1%'lik bir fark olduğu hesaplandı (Şekil 5.4).

30B4 klonu için ise verimlilik açısından w/o MTX koşulunda 0 CGN ile 50 CGN arasında 13,4%’lük bir fark varken w/MTX koşulu için 4,7%’lik bir fark olduğu hesaplandı.

Spesifik üretkenlik sonuçları incelendiğinde; 12D8 klonu için w/o MTX koşulunda 0 CGN ile 50 CGN arasında 25,3%’lük bir fark varken w/MTX koşulu için 28,6%’lık bir fark olduğu hesaplandı (Şekil 5.4).

30B4 klonu için ise spesifik üretkenlikleri arasında; w/o MTX koşulunda 0 CGN ile 50 CGN arasında 52,3%’lük bir fark varken, w/MTX koşulu için 36,3%’lük bir fark olduğu hesaplandı.

Spesifik üretkenlik sonuçlarına göre 30B4 klonunun stabil olmadığı görülürken, 12D8 klonu ise stabil olarak belirlendi.



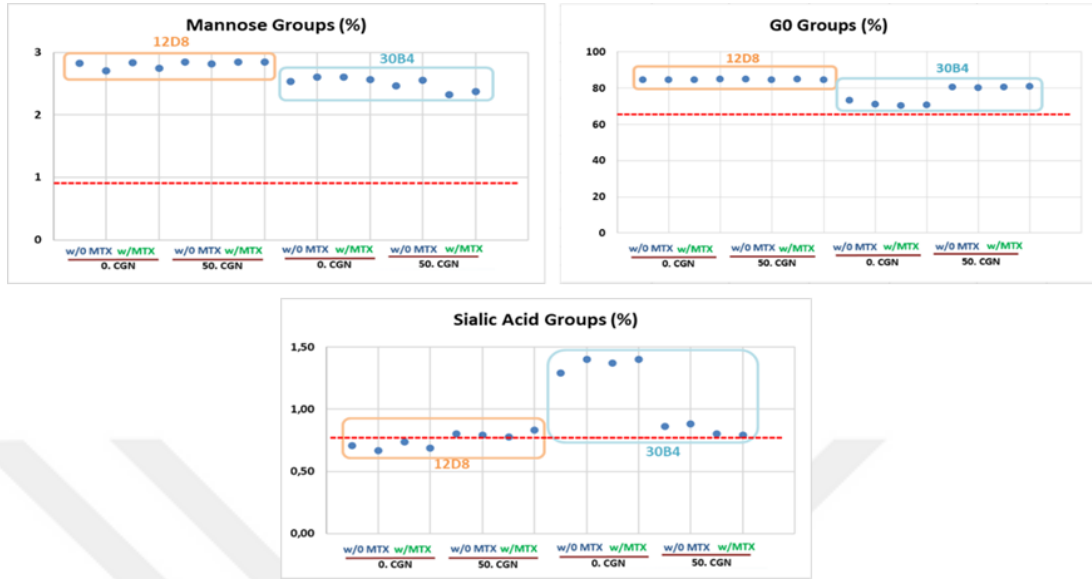
Şekil 5.5: 12D8 ve 30B4 klonlarının stabilite çalışmasındaki G1+G2 sonuçları.

Her iki klonda da MTX’in 0/50 CGN galaktozilasyon profili üzerinde etkili olmadığı sonucuna ulaşıldı.

12D8 klonunda her koşulun galaktozilasyon sonucunun benzer olduğu görüldü. Galaktozilasyon oranının, referans üründen yaklaşık olarak 63,4% daha düşük olduğu hesaplandı. 0/50 CGN ve MTX +/- parametrelerinin galaktozilasyon üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığı görüldü (Şekil 5.5).

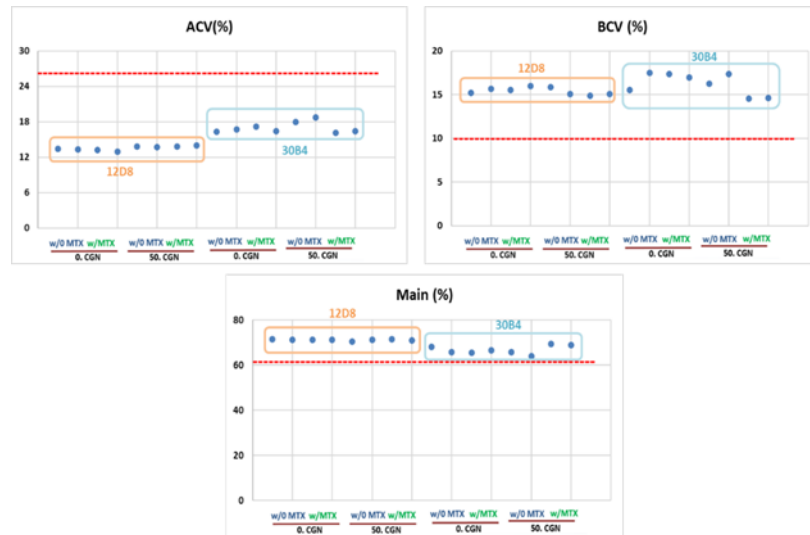
30B4 klonunda 0 CGN ve 50 CGN içindeki MTX +/- koşulunun galaktozilasyon üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığı bulundu. 0 CGN koşulunun galaktozilasyon oranı referans üründen ortalama 20% daha düşük olurken, 50 CGN koşulunun ortalama 48,4% daha düşük olduğu hesaplandı.

Yine glikan profili sonuçlarına göre 30B4 klonunun stabil olmadığı görülürken, 12D8 klonu ise stabil olarak belirlendi.



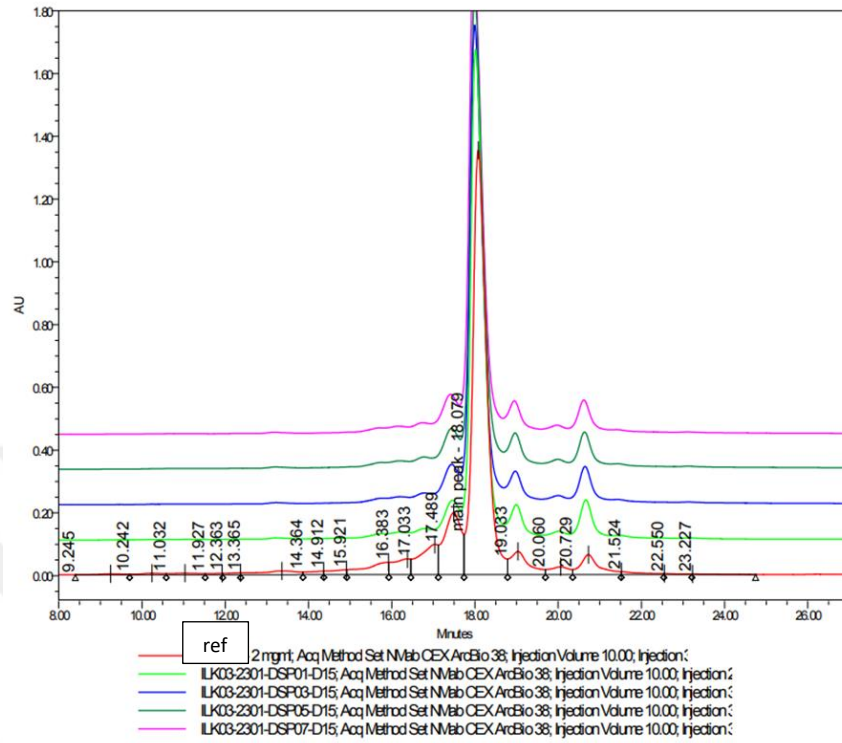
Şekil 5.6: 12D8 ve 30B4 klonlarının stabilite çalışmasındaki G0, Mannoz ve Sialik % sonuçları.

HM%, G0% ve SA%'sı için diğer profil parametreleri gibi 30B4 klonunun stabil olmadığı görülürken, 12D8 klonu ise stabil olarak belirlendi (Şekil 5.6).



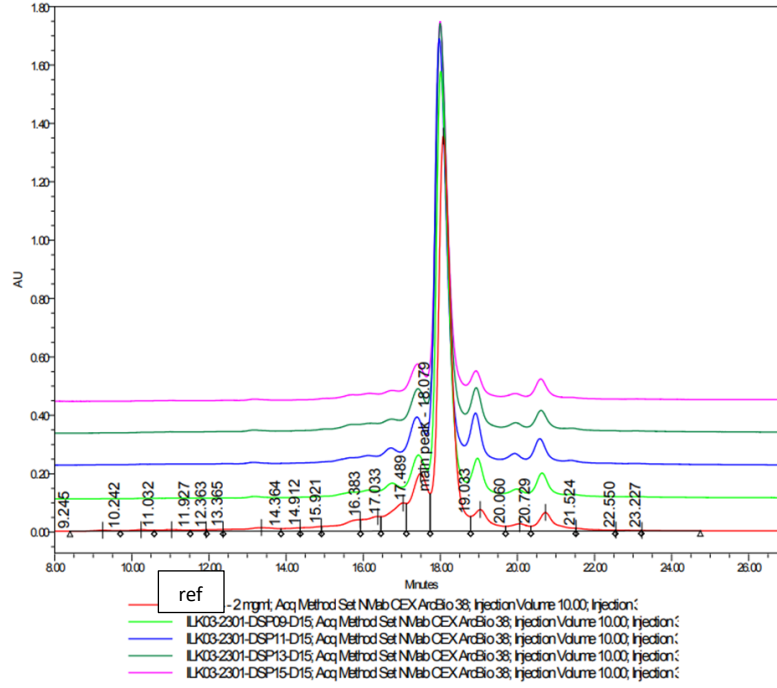
Şekil 5.7: 12D8 ve 30B4 klonlarının stabilite çalışmasındaki yük varyantı sonuçları.

Yük varyantları 12D8'in her iki jenerasyonunda yakın görülürken 30B4'de anlamlı farklar gözlemlendi (Şekil 5.7).



Şekil 5.8: 12D8 klonun stabilite çalışmasındaki CEX analizi sonucu.

12D8 klonuna ait CEX grafiği incelendiğinde; 0 CGN/50 CGN, +/- MTX koşullarının tamamının referans ürünü ile benzer pikler verdiği, herhangi bir ekstra pik oluşumunun veya kaybının izlenmediği sonucuna ulaşıldı (Şekil 5.8).



Şekil 5.9: 30B4 klonun stabilite çalışmasındaki CEX analizi sonucu.

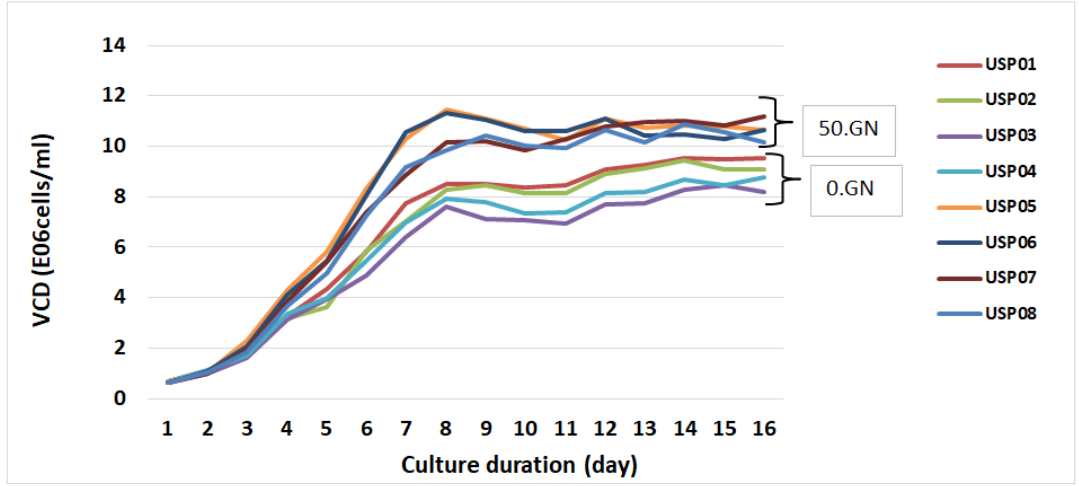
30B4 klonuna ait CEX grafiği incelendiğinde 12D8 klonunda da olduğu gibi; 0 CGN/50 CGN, +/- MTX koşullarının tamamının referans ürünü ile benzer pikler verdiği, herhangi bir ekstra pik oluşumunun veya kaybının izlenmediği sonucuna ulaşıldı (Şekil 5.9).

5.1.2. 6E3 Klonu Stabilite Çalışması

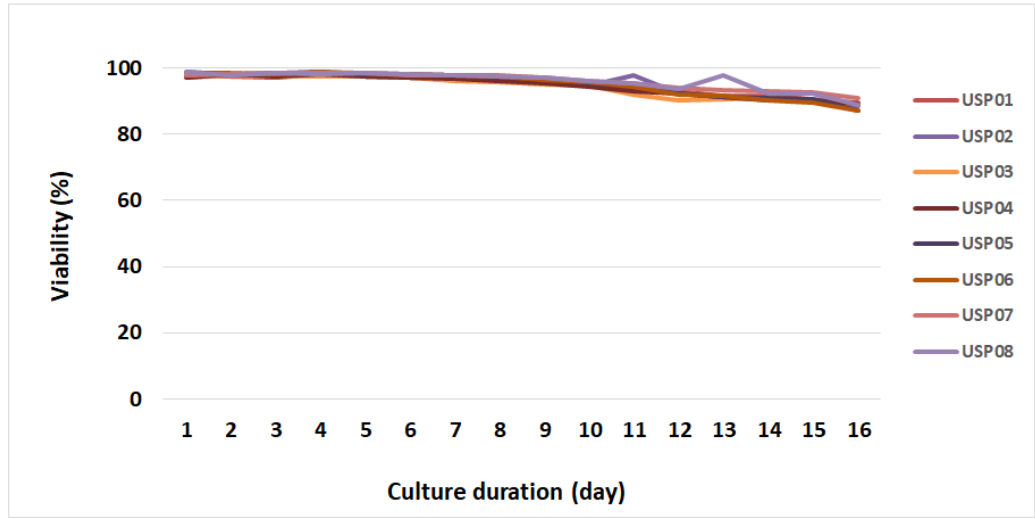
Elde edilen 6E3 klonunun bu kapsamda stabilitesi çalışıldı (Tablo 5.1).

Tablo 5.1: 6E3 klonunun uzun dönem stabilite çalışması planı.

	USP01	USP02	USP03	USP04	USP05	USP06	USP07	USP08
Klon	6E3 - OCGN		6E3-MTX-OCGN		6E3-50CGN		6E3-MTX-50CGN	
Hücre Ekim Konsantrasyonu x10 ⁶	0,6 (0,5 - 0,7)							
Besiyeri	M-M01							
Takviye Besiyeri	F-M01							
Takviye Besiyeri %	20%							
Takviye Besiyeri-1	3% @Gün3 4% @Gün5							
Takviye Besiyeri-2	5% @Gün7, Gün9 3% @Gün11							
Başlangıç Glutamin Konsantrasyonu	4mM							
Glutamin Besleme-1	4 mM@Gün3							
Glutamin Besleme-2	2 mM@Gün5							
Glutamin Besleme-3	1 mM@Gün7							
Sıcaklık Kaydırması Günü	33°C Gün6							

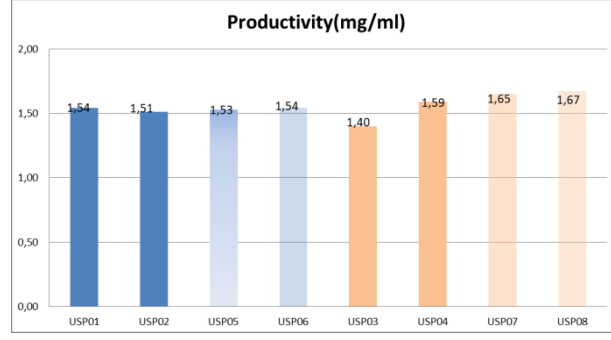


Şekil 5.10: 6E3 klonunun stabilite çalışmasının 15 günlük canlı hücre sayısı sonuçları.



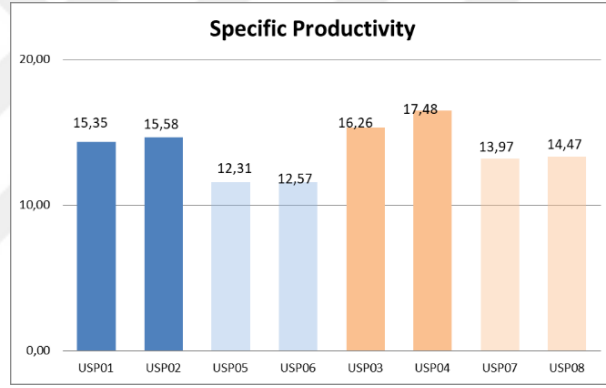
Şekil 5.11: 6E3 klonunun stabilite çalışmasının 15 günlük canlılık% sonuçları.

Stabilite çalışmasının sonunda hücrelerin büyüme profilleri genel olarak incelendiğinde, her koşulun da 50 CGN’de 0 CGN’ye göre daha fazla hücre sayısına sahip olduğu bulundu. 6E3 klonunda anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 5.10). Bununla beraber MTX +/- durumunun klonların büyüme profillerinde belirgin bir fark yaratmadığı görüldü. Ayrıca, her jenerasyon için de canlılığı da kültür süresi boyunca ve kültür süresi sonunda 85%’in altına düşmedi (Şekil 5.11).



Şekil 5.12 6E3 klonunun stabilite çalışmasının verimlilik sonuçları.

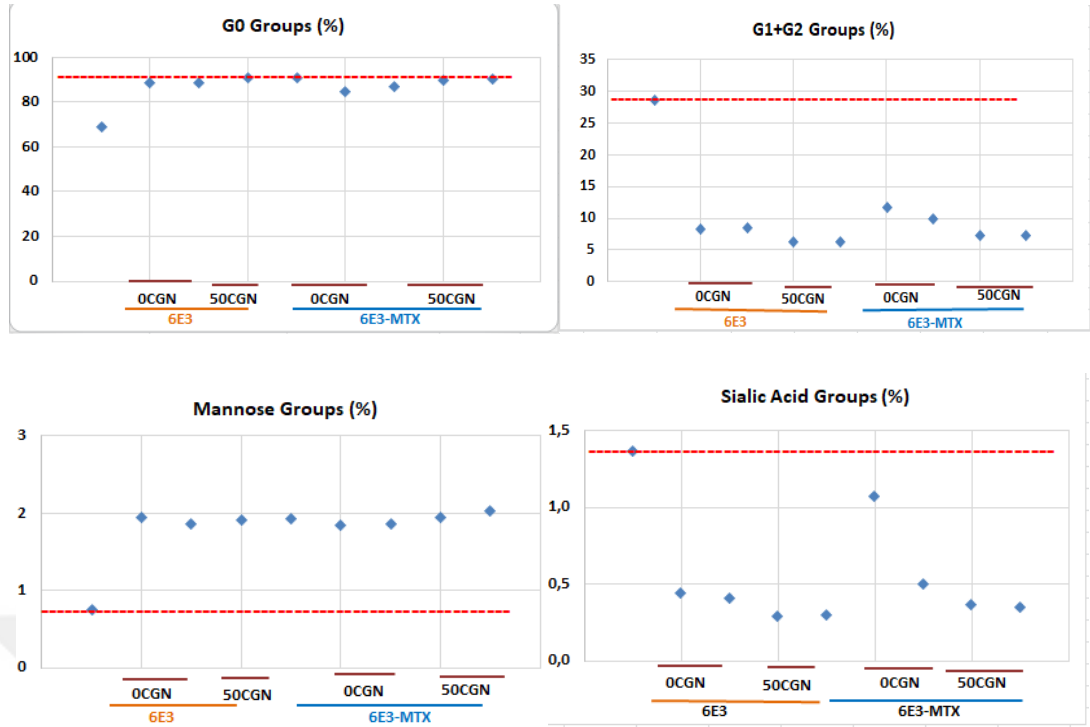
Üretkenlik sonuçları incelendiğinde, 6E3 klonu için verimlilikler arasında duplike erlenlerin ortalaması alındığında w/o MTX koşulunda 0 CGN ile 50 CGN arasında fark yokken w/MTX koşulu için 1,65%'lik bir fark olduğu hesaplandı. MTX +/- durumunun klonların verimliliğinde belirgin bir fark yaratmadığı görüldü (Şekil 5.12).



Şekil 5.13: 6E3 klonunun stabilite çalışmasının spesifik üretkenlik sonuçları.

Spesifik verimlilik sonuçları incelendiğinde, 6E3 klonu için verimlilikler arasında duplike erlenlerin ortalaması alındığında w/o MTX koşulunda 0 CGN ile 50 CGN arasında fark 19,5% olurken, w/MTX koşulu için 15,7%'lik bir fark olduğu hesaplandı. MTX +/- durumunun klonların verimliliğinde belirgin bir fark yaratmadığı görüldü (Şekil 5.13).

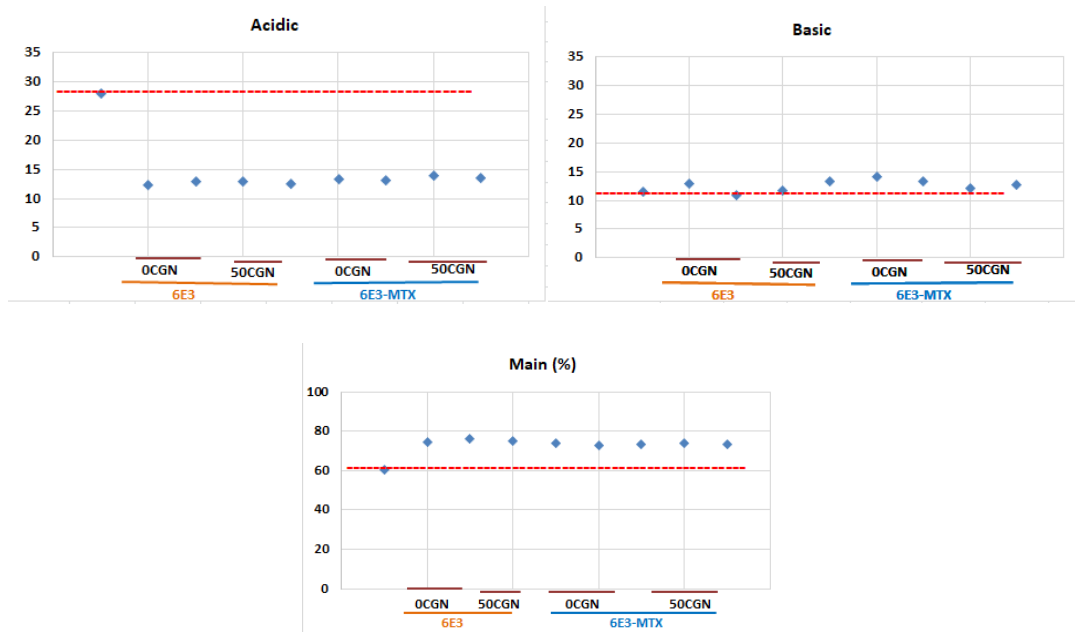
Verimlilik ve spesifik verimlilik açısından 6E3 klonunun stabil olduğu görüldü.



Şekil 5.14: 6E3 klonunun stabilite çalışmasının glikan sonuçları

6E3 klonunda MTX- durumu galaktozilasyon sonucunun benzer olduğu görüldü. 0/50 CGN ve MTX- parametrelerinin galaktozilasyon üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığı görüldü (Şekil 5.14).

Yine galaktozilasyon profili sonuçlarına göre 6E3 klonu stabil olarak belirlendi.



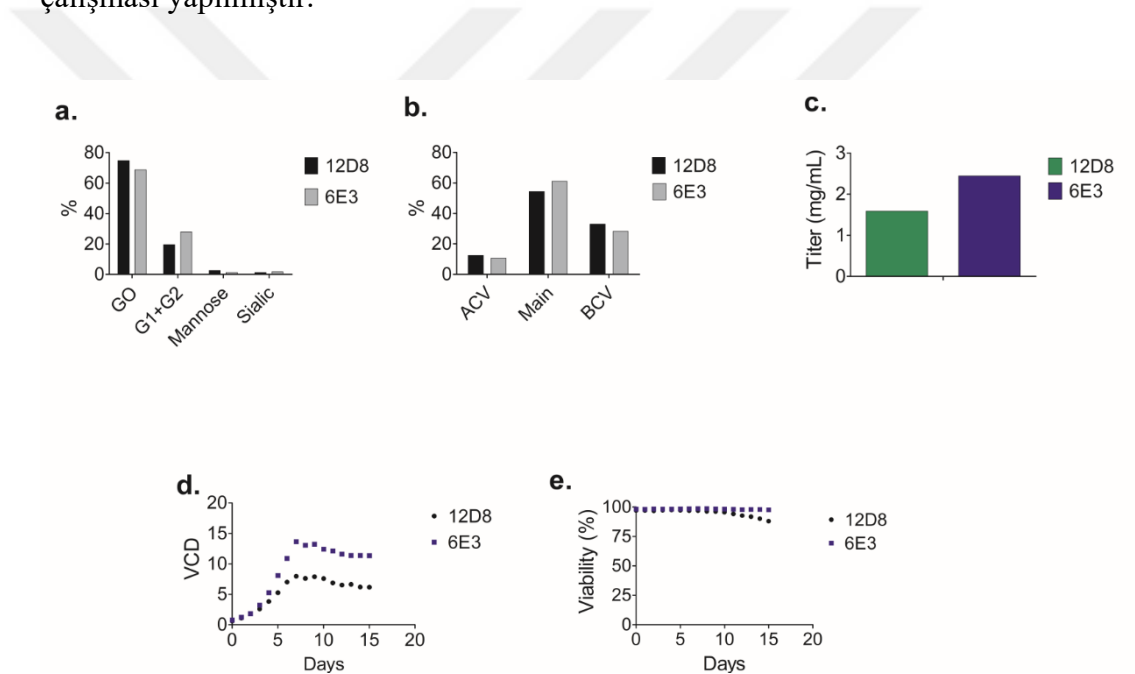
Şekil 5.15: 6E3 klonunun stabilite çalışmasının yük varyantı sonuçları.

63E klonunda her durumun yük varyant sonucunun benzer olduğu görüldü. 0/50 CGN ve MTX +/- parametrelerinin yük varyantı üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığı görüldü (Şekil 5.15).

Yük varyant sonuçlarına göre 6E3 klonu ise stabil olarak belirlendi.

5.2. İki Stabil Klon Olan 6E3 ve 12D8'in Karşılaştırılması

12D8 ve 6E3 klonunun stabil olduğu belirlendikten sonra optimizasyon çalışmalarından önce hangi klonun daha yüksek verim uygun kalitede olabileceğine bakılmıştır. Bu sebeple Besiyeri A ve takviye besiyeri Feed 1 ile kesikli besleme çalışması yapılmıştır.



Şekil 5.16: İki stabil klon olan 6E3 ve 12D8'in kesikli besleme çalışması.

Sonuçlara göre özellikle yüksek verim farkından ve glikan profilinin referans ürüne daha benzer olması sebebiyle 6E3 klonu ile optimizasyon çalışmalarına devam edilmesine karar verildi (Şekil 5.16).

5.3. Erlen Seviyesinde Optimizasyon Çalışması Sonuçları

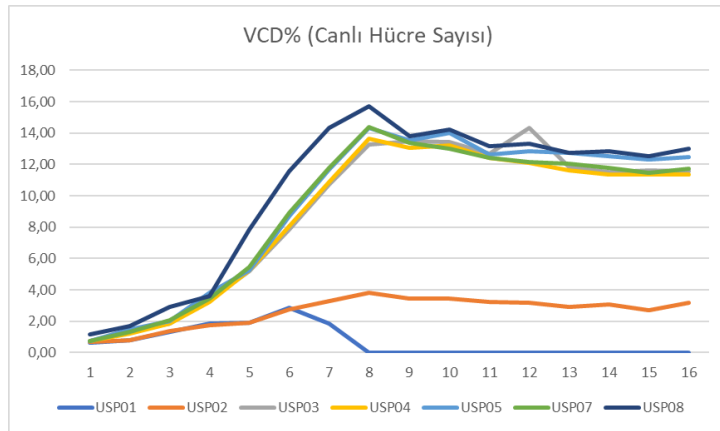
5.3.1. Erlen Seviyesinde Birinci Optimizasyon Çalışması Sonuçları

Stabil olduğu bilinen 6E3 klonu ile çoklu erlen çalışmaları yapıldı.

Besiyeri A, Besiyeri B, Besiyeri C denemeleri yapıldı takviye besiyeri olarak Feed2 kullanıldı. Galaktoz eklemeleri için 4g/L, 8g/L konsantrasyonları, manganez ekleme ve hücre ekim konsantrasyonları ile çoklu erlen denemeleri yapıldı (Tablo 5.2).

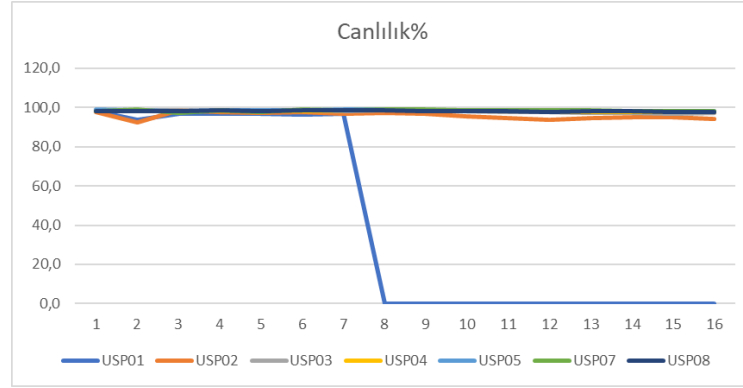
Tablo 5.2: 6E3 klonunun 1.erlen optimizasyonun planı.

		USP01	USP02	USP03	USP04	USP05	USP06	USP07	USP08
Klon		6E.3							
Hücre Ekim Konsantrasyonu x10 ⁶		0,6(0,5-0,7)							1,3
Besiyeri		Besiyeri B		Besiyeri A		Besiyeri C			
Takviye Besiyeri		FEED2							
Takviye Besiyeri gün ve stratejisi		3%@D3, D11, 4%@D5, 5% @D7@D9							
Başlangıç Glutamin Konsantrasyonu		4mM							
Glutamin Besleme-1		4mM @Gün3							
Glutamin Besleme-2		2mM @Gün5							
Glutamin Besleme-3		1mM @Gün7							
Manganez Eklemesi		-	40	-	40	-	-	40	-
Galaktoz Eklemesi		-	4g/L	-	4 g/L	-	4g/L	4g/L	8g/L
Sıcaklık Kaydırması Günü		33°C GÜN 6							
Verimlilik (mg/ml)	15.Gün	-	1,01	2,54	2,44	2,86	2,62	2,75	3,01
Spesifik Üretkenlik		-	25,75	18,36	18,06	18,06	18,50	19,71	19,20



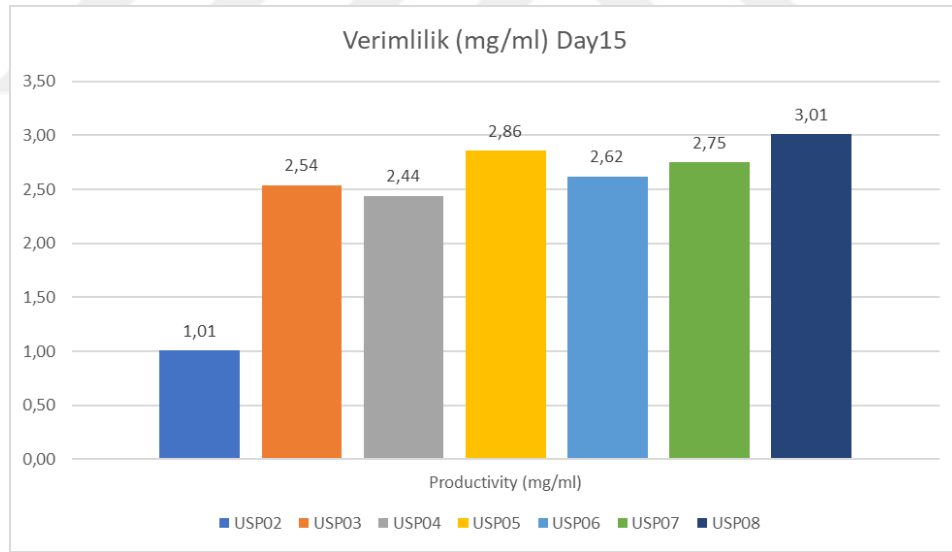
Şekil 5.17: 6E3 klonunun 1.erlen optimizasyonunun 15 günlük canlı hücre yoğunluğu sonuçları.

USP03 ve USP07 koşulu en yüksek hücre sayısına ulaşp kültür süresince en yüksek hücre sayını neredeyse korumuştur (Şekil 5.17). USP 01 koşulu düşük canlı hücre sayısı sebebiyle 6. Gün sonlandırılmıştır.



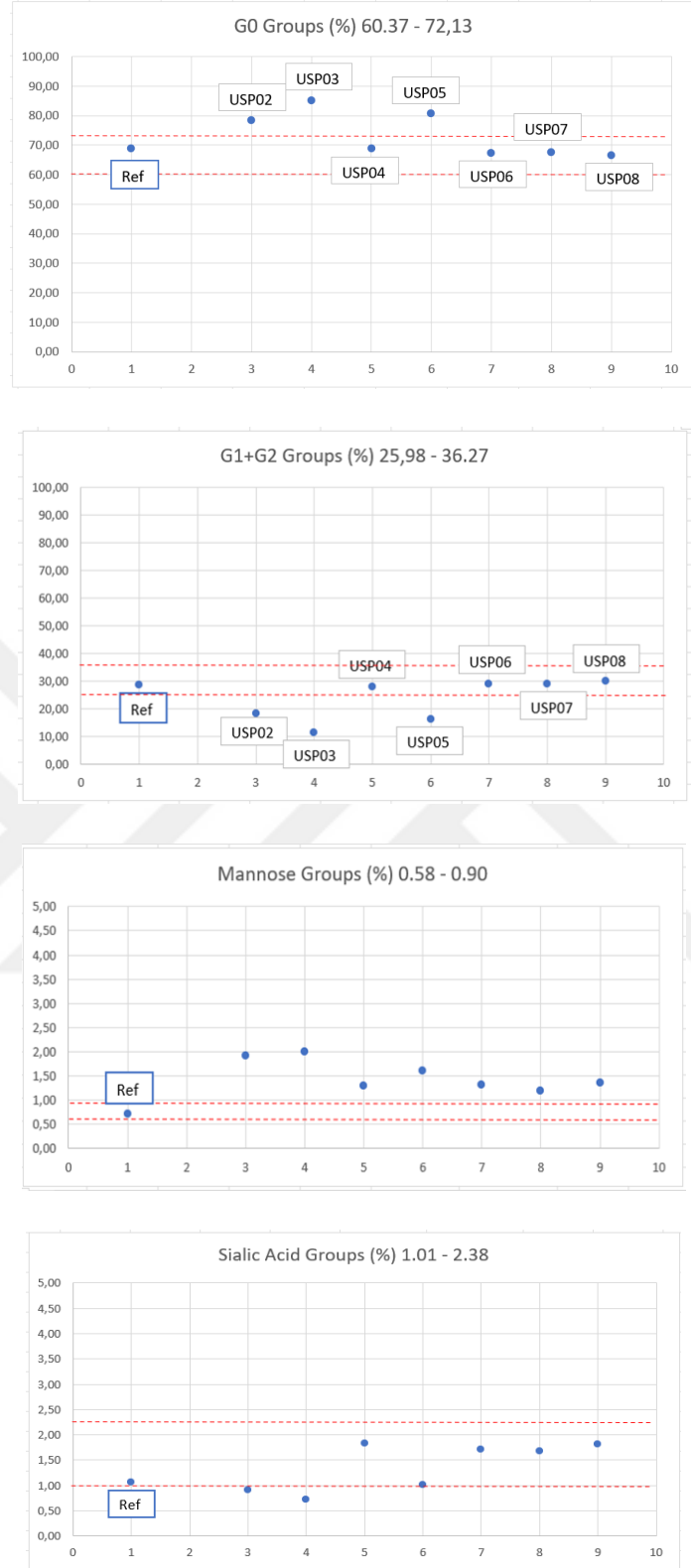
Şekil 5.18: 6E3 klonunun 1.erlen optimizasyonunun 15 günlük canlılık sonuçları.

Kültür süresi olan 15 gün boyunca USP01 koşulu hariç canlılık neredeyse hiçbir koşulda 80%'nin altına düşmemiştir (Şekil 5.18).



Şekil 5.19: 6E3 klonunun 1.erlen optimizasyonunun verimlilik sonuçları.

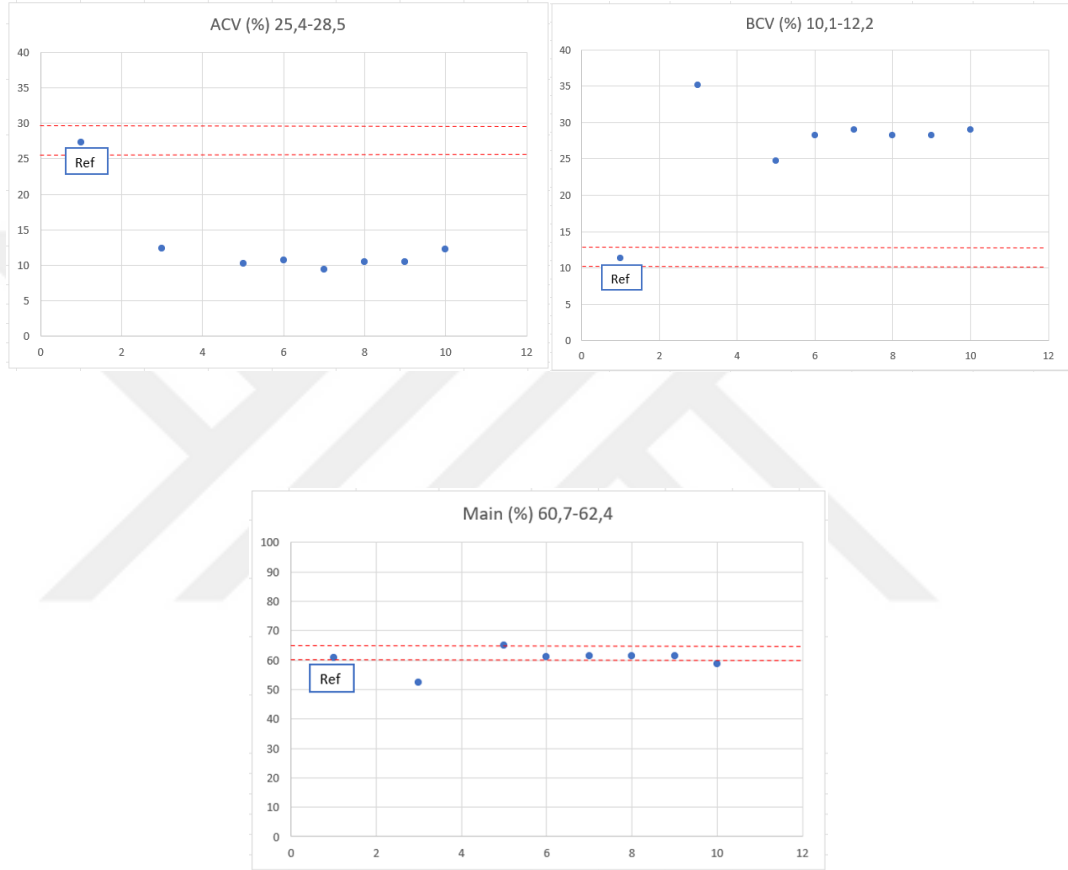
Verimlilik sonuçlarına göre 6E3 klonu ile Besiyeri C ile en iyi sonucu vermektedir. En iyi verimlilik sonucu $1,3 \times 10^6$ konsantrasyon ile ekilen ve Besiyeri C koşulu olan USP08 koşulu vermiştir (Şekil 5.19).



Şekil 5.20: 6E3 klonunun 1. erlen optimizasyonunun glikan sonuçları.

Glikan sonuçlarına göre, Manganez eklemesinin 6E3 klonunda galaktozilasyona anlamlı bir etkisi görülmemiştir ve bu çalışma ile tekrar doğrulanmıştır. Galaktoz

eklenen koşullarda beklendiği gibi galaktozilasyon referans ürüne yaklaşmıştır. 4 g/L ile 8 g/L arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Galaktozilasyon sialilasyonu da etkilemektedir. Galaktozilasyonu referans ürün aralığı sınıra yakın olan 6E3 klonu SA%’leri de aynı şekilde referans ürün aralığına yakın değerdedir. Öte yandan % SA’lerinde meydana gelen küçük yüzdesel değişimler klinik açıdan risk oluşturmamaktadır (Şekil 5.20).



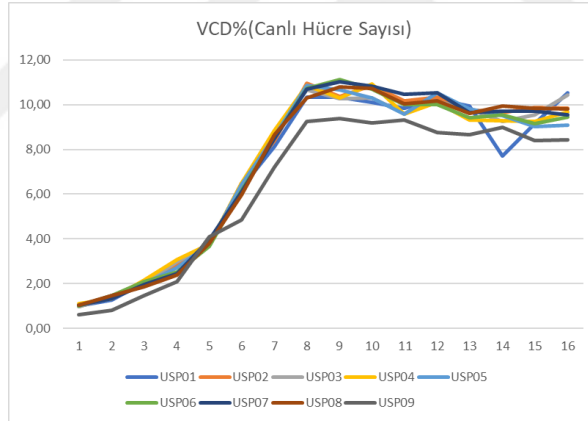
Şekil 5.21: 6E3 klonunun 1.erlen optimizasyonunun yük varyantı sonuçları.

Yük varyantı sonuçlarına göre asidik varyantlar düşükken, bazik varyantlar referans ürüne göre yüksektir. ACV düşüklüğü için, stabilite ile artırılabilir. BCV’ler için sıcaklık artışı ile Gln varyantlar düşürülebilir; karboksipeptidaz denemeleri de Lys’lerde etkili olup ACV’ye dönüşümü tetikleyebilir (Şekil 5.21).

5.3.2. Erlen Seviyesinde İkinci Optimizasyon Çalışması Sonuçları

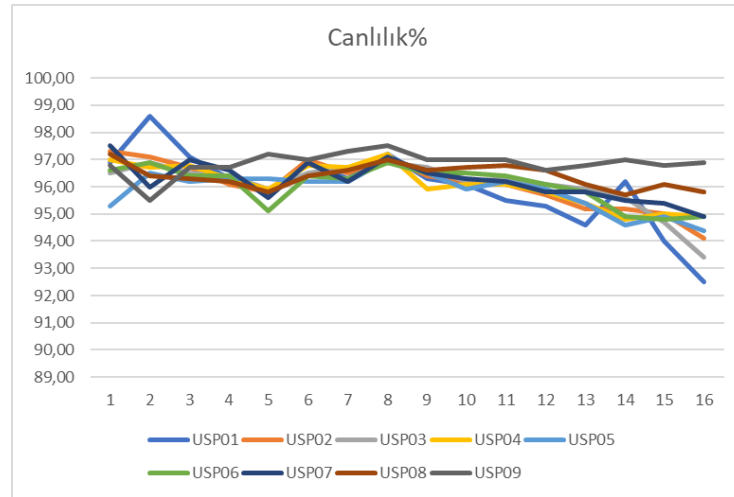
Tablo 5.3: 6E3 klonunun 2. erlen optimizasyonun planı.

		USP01	USP02	USP03	USP04	USP05	USP06	USP07	USP08	USP09
Klon		6E.3								
Hücre Ekim Konsantrasyonu x10 ⁶		1								0,6 (0,5-0,7)
Besiyeri		Besiyeri C								
Takviye Besiyeri		FEED2								
Takviye Besiyeri gün ve stratejisi		3%@Gün3, Gün11 4%@Gün5 5% Gün7@Gün9				3%@Gün3, Gün11, <u>Gün13</u> 4%@Gün5 5%Gün7@Gün9		3%@Gün3, Gün11 4%@Gün5 5% Gün7@Gün9		
Başlangıç Glutamin Konsantrasyonu		4mM								
Glutamin Besleme-1		4mM @Gün3								
Glutamin Besleme-2		2mM @Gün5								
Glutamin Besleme-3		1mM @Gün7								
Galaktoz Eklemesi		8g/L Gün7	8g/L Gün7	8g/L Gün7	8g/L Gün7	8g/L Gün7	4g/L Gün 7 + 4g/L Gün10	Cont. Gal+Feed (4)	Cont. Gal+Feed (8)	8g/L Gün7
Sıcaklık Kaydırması Günü		33°C GÜN 6								
Verimlilik (mg/ml)	15.Gün	2,16	2,24	2,14	2,20	2,08	2,07	2,21	2,23	1,92
Spesifik Üretkenlik		20,10	20,01	19,43	19,93	18,91	18,81	19,74	20,14	19,86



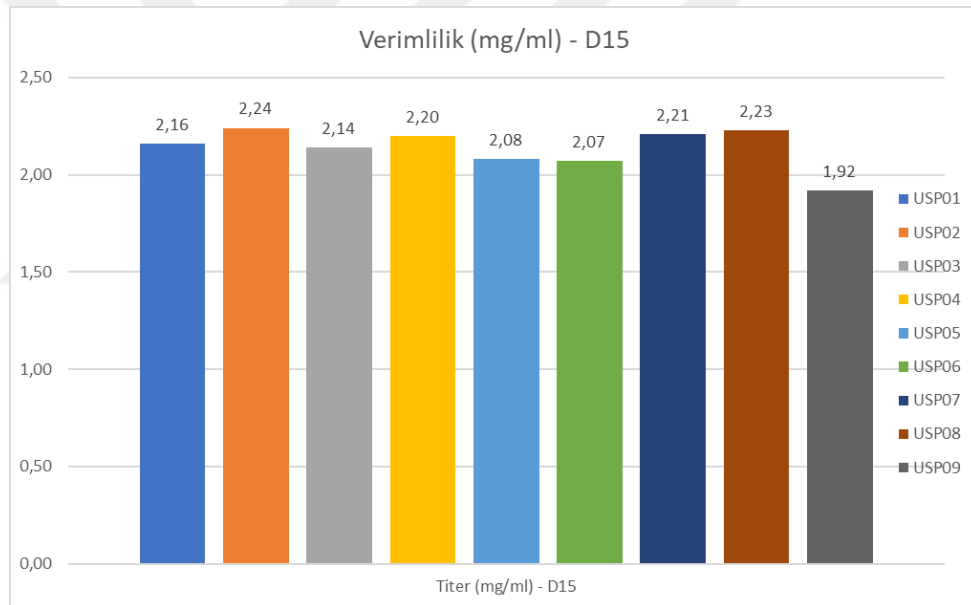
Şekil 5.22: 6E3 klonunun 2. erlen optimizasyonunun 15 günlük canlı hücre yoğunluğu sonuçları.

Canlı hücre sayısında en yüksek hücre sayılarına 8-9. Günlerde ulaşılmıştır. Pik hücre sayıları USP09 koşulunda 8 milyonken diğer koşullarda yaklaşık 11 milyon olarak ölçülmüştür (Şekil 5.22).



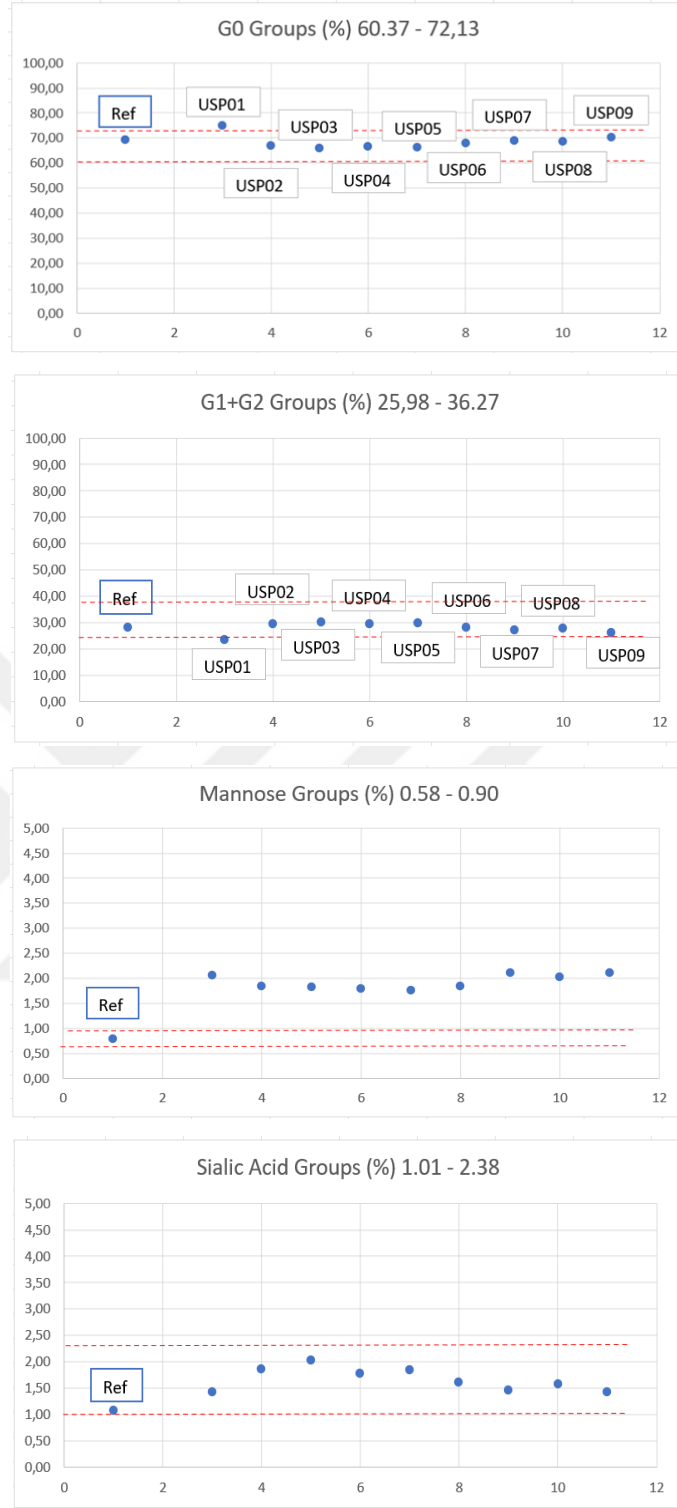
Şekil 5.23: 6E3 klonunun 2.eren optimizasyonunun 15 günlük canlılık sonuçları.

Canlılıklar tüm koşullarda 93%'ün altına düşmemiştir (Şekil 5.23).



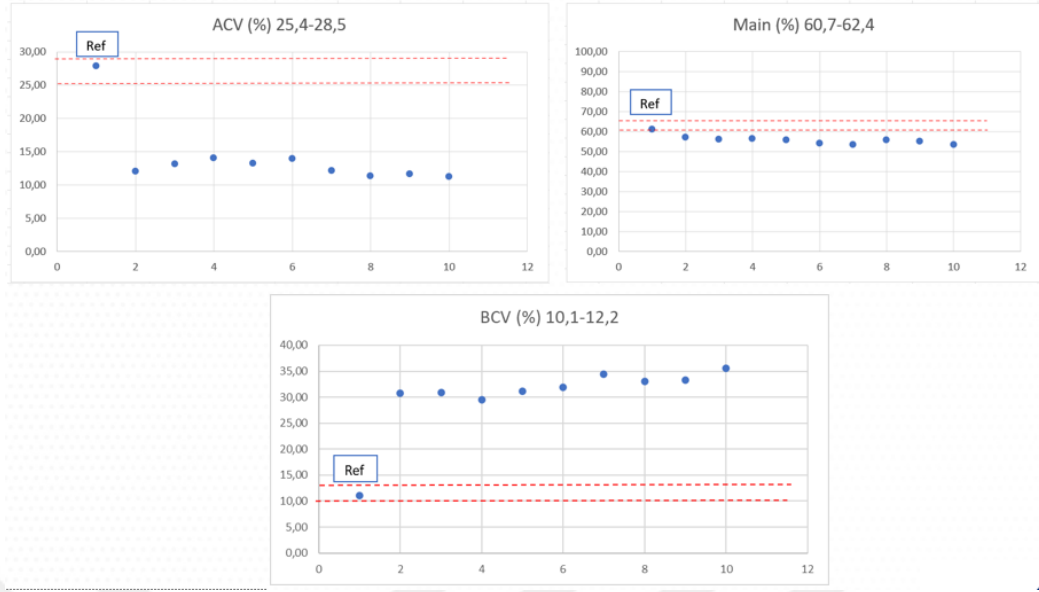
Şekil 5.24: 6E3 klonunun 2.eren optimizasyonunun verimlilik sonuçları.

Verimlilik sonuçlarına göre, en yüksek verimlilik USP02 koşunda görülmektedir. Hücre ekim konsantrasyonunun verim üzerinde etkisi olduğu görülmüştür. 13.günde takviye besiyeri eklemek verimlilik açısından olumlu bir etki sağlamamıştır (Şekil 5.24).



Şekil 5.25: 6E3 klonunun 2.eren optimizasyonunun glikan sonuçları

Glikan sonuçlarına göre 4g/L ile 8g/L arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. Galaktozun takviye besiyerine eklenerek takviye besiyeri günleri verilmesi ya da ayrı ayrı 7. gün 4g/L ve 10. gün 4g/L verilmesi de glikan açısından anlamlı bir fark görülmemiştir (Şekil 5.25).



Şekil 5.26: 6E3 klonunun 2.erlen optimizasyonunun yük varyantı sonuçları

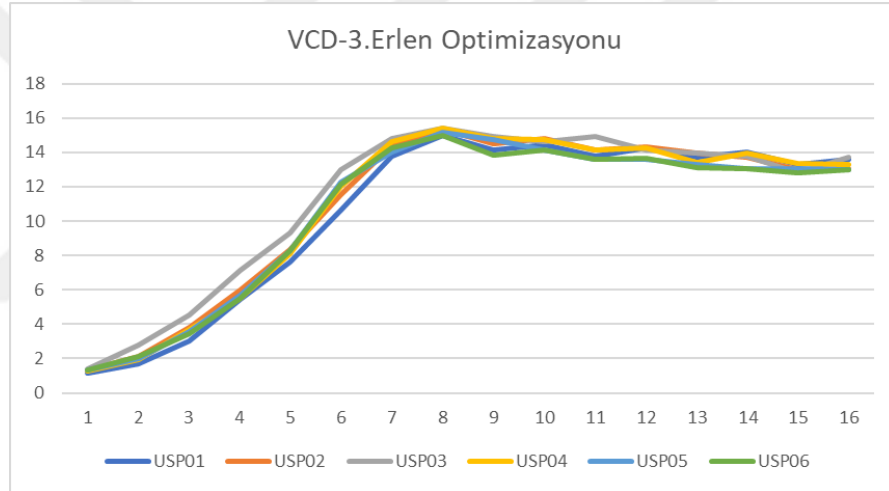
Yük varyantı sonuçlarına göre asidik varyantlar düşükken, bazik varyantlar referans ürüne göre yüksektir. ACV düşüklüğü için, stabilite ile arttırılabilir. BCV'ler için sıcaklık artışı ile Gln varyantlar düşürülebilir; karboksipeptidaz denemeleri de Lys'lerde etkili olup ACV'ye dönüşümü tetikleyebilir (Şekil 5.26).

5.3.3. Erlen Seviyesinde Üçüncü Optimizasyon Çalışması Sonuçları

Bu çalışmada önceki çalışmaları baz alınarak 6E3 klonu için belirlenen kalite ve verimliliği en iyi olan koşullar tekrarlandı. Bunun yanında galaktoz yerine kullanılacak yeni gal-düzenleyici supleman farklı konsantrasyonlarda denendi. Besiyeri olarak tüm koşullarda Besiyeri C kullanıldı. Takviye besiyeri olarak ise tüm koşullarda Feed 2 kullanıldı. Toplamda on adet çoklu erlen çalışması yapıldı (Tablo 5.4).

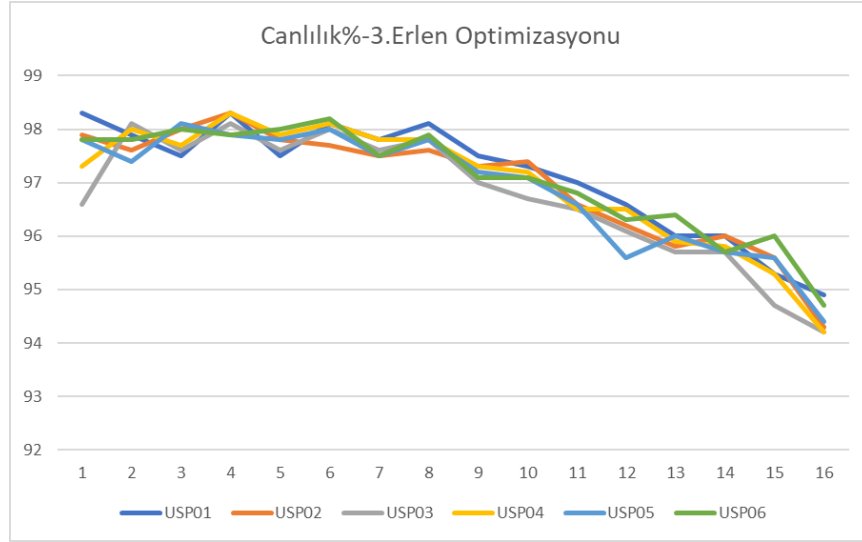
Tablo 5.4: 6E3 klonunun 3.erlen optimizasyonun planı.

	USP01	USP02	USP03	USP04	USP05	USP06
Klon	6E.3					
Hücre Ekim Konsantrasyonu x10 ⁶	1	1,2	1,35			
Besiyeri	Besiyeri C					
Takviye Besiyeri	Feed2					
Takviye Besiyeri gün ve stratejisi	3%@Gün3, Gün11,		4%@Gün5,		5% Gün7@Gün9	
Başlangıç Glutamin Konsantrasyonu	4mM					
Glutamin Besleme-1	4mM @Gün 3					
Glutamin Besleme-2	2mM @Gün 5					
Glutamin Besleme-3	1mM @Gün 7					
Galaktoz Eklemesi	4g/L 7.gün			Gal düzenleyici 0,5	Gal düzenleyici 1	Gal düzenleyici 2
Sıcaklık Kaydırması Günü	33°C @GÜN 6					
Verimlilik (mg/ml)	15.Gün	3,15	3,18	3,28	3,24	3,21
Spesifik Üretkenlik		3,13				
		3,15	3,18	3,28	3,24	3,21
		19,47	19,08	18,93	19,42	19,65
						19,35



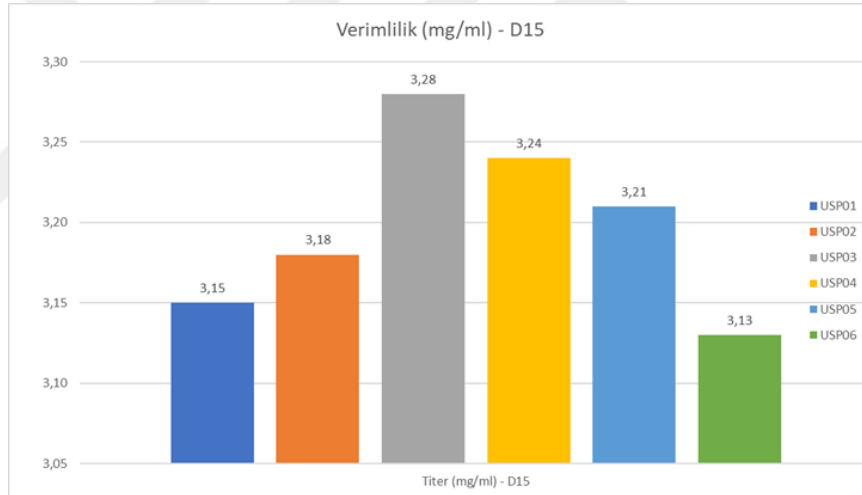
Şekil 5.27: 6E3 klonunun 3.erlen optimizasyonunun 15 günlük canlı hücre yoğunluğu sonuçları.

Canlı hücre yoğunluğu sonuçlarına göre 6E3 klonunun tüm koşullarında en yüksek canlı hücre sayısı 14-15 milyonlarda olduğu görüldü (Şekil 5.27).



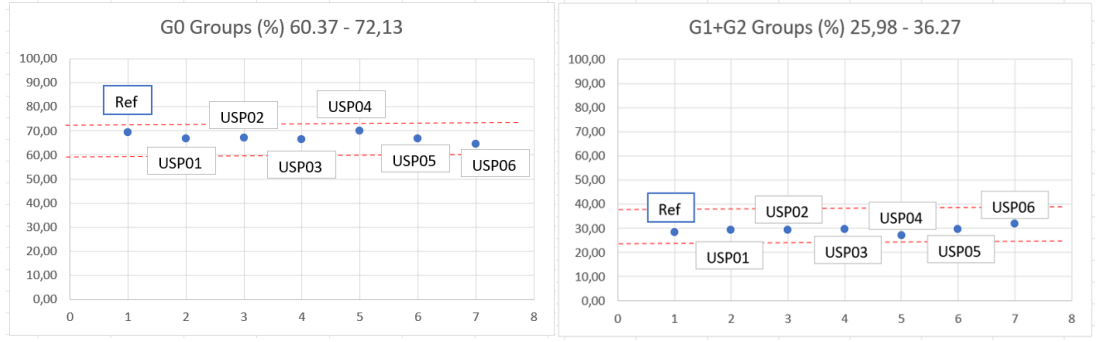
Şekil 5.28: 6E3 klonunun 3.erlen optimizasyonunun 15 günlük canlılık sonuçları.

Hücre canlılıklarının tüm koşullarda 94%'ün altına düşmediği görüldü (Şekil 5.28).



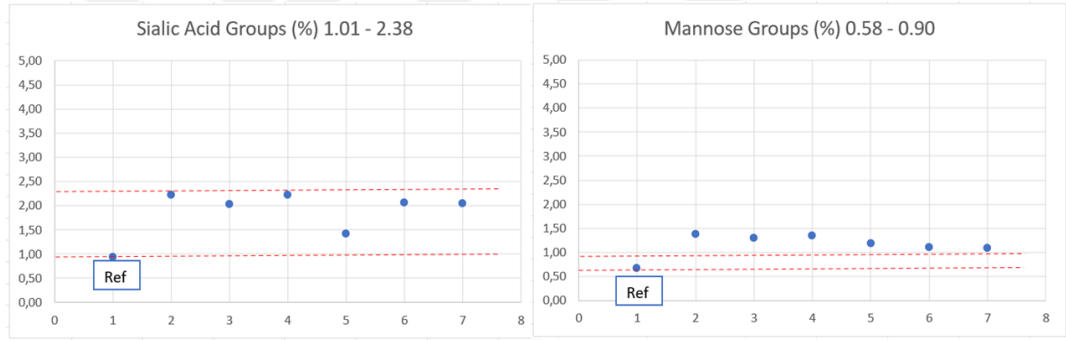
Şekil 5.29: 6E3 klonunun 3.erlen optimizasyonunun verimlilik sonuçları

Gal-düzenleyici suplemanın her iki klon içinde verimlilik açısından anlamlı bir etkisi görülmedi (Şekil 5.29).

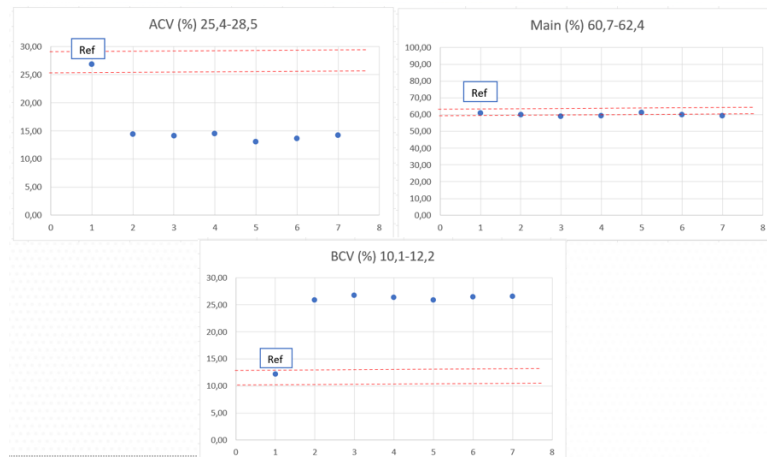


Şekil 5.30: 6E3 klonunun 3.eren optimizasyonunun glikan sonuçları.

6E3 klonu için Gal düzenleyicinin konsantrasyonu galaktozilasyon farklı etkiler gösterdi. Konsantrasyon arttıkça galaktozilasyon arttı. 4 g/L eklenen Galaktoz, 1 (h/h) konsantrasyonda kullanılan Gal-düzenleyici supleman ile benzer etkiyi sağladı (Şekil 5.30).



Şekil 5.31: 6E3 klonunun 3.eren optimizasyonunun HM% ve SA% sonuçları.

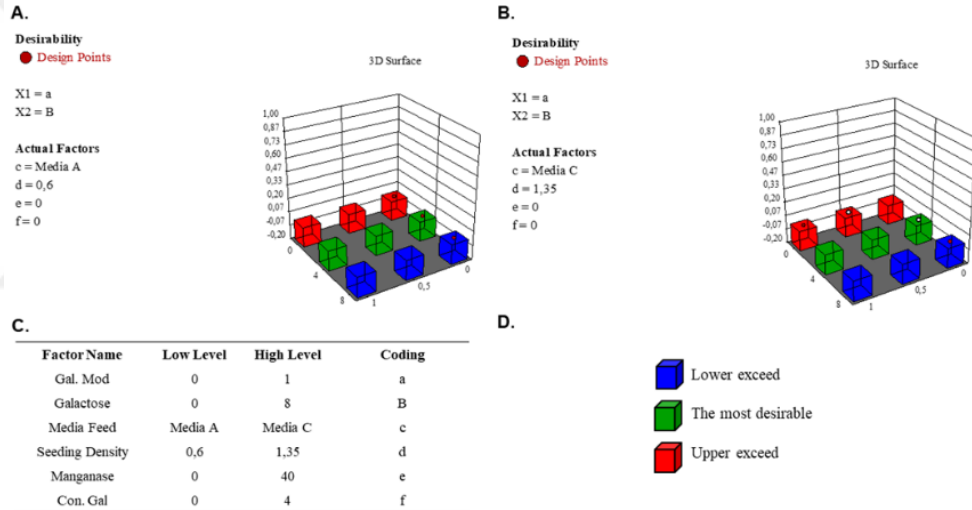


Şekil 5.32: 6E3 klonunun 3.eren optimizasyonunun yük varyant sonuçları.

6E3 klonunda asidik varyantlar düşükken, bazik varyantlar referans ürüne göre yüksektir. ACV yüksekliği için, stabilite ile artırılabilir. BCV'ler karboksipeptidaz denemeleri de Lys'lerde etkili olup ACV'ye dönüşümü tetikleyebilir (Şekil 5.32). Kalite ve verimlilik açısından uygun olan sonuçlar bu çalışmada da tekrar doğrulanmıştır.

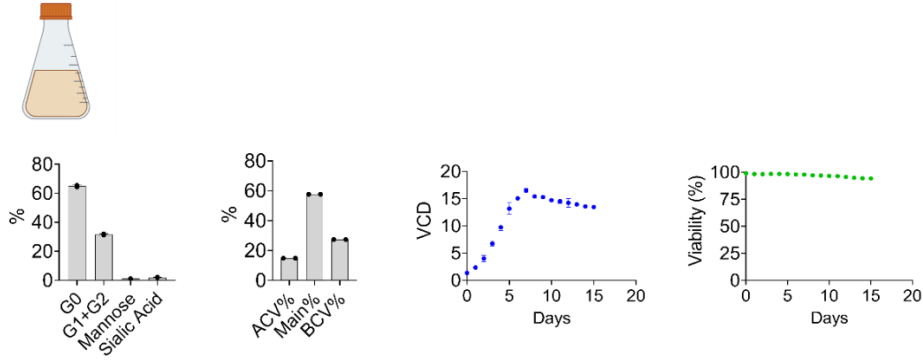
5.3.4. Erlen Çalışmalarının İstatiksel Analizi

Yapılan tüm erlen optimizasyon çalışmasının tepkilerini DOE (Design of Experiment), istatiksel analiz programına yüklendi. 3D Surface sonuçlarına göre program iki farklı koşulu optimum olarak belirledi. Bu koşullardan biri Besiyeri A ve 0,6x10⁶ diğeri ise Besiyeri C ve 1,35x10⁶ olarak belirlendi (Şekil 5.33).



Şekil 5.33: Tüm erlen sonuçlarının DOE programındaki 3D Surface sonuçları.

Çalışmalara verimlilik farkı dolayısıyla, 1,35x10⁶ hücre ekim konsantrasyonu ile Besiyeri C, 7.gün 4g/L galaktoz eklemesi kullanılarak 3,01g/L verimlilik elde edilen koşul ile biyoreaktör seviyesinde çalışmalara geçilmesine karar verildi (Şekil 5.34).



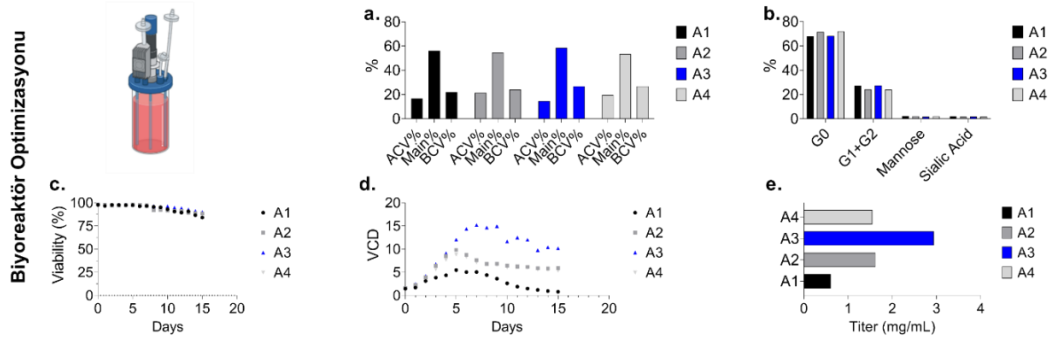
Şekil 5.34: Optimizasyon sonucunda seçilen erlen çalışmasının sonuçları.

5.4. Biyoreaktör Seviyesinde Optimizasyon Çalışması Sonuçları

5.4.1. Biyoreaktör Seviyesinde P/V ve Hava Limiti Optimizasyon Çalışması

3L reaktör düzeyinde 6E3 klonunun ölçek büyütmesi için optimizasyon çalışması yapıldı. Bu çalışmada PV, kuru hava, oksijen limit optimizasyon çalışması yapıldı. Besiyeri C kullanıldı. Takviye Besiyeri olarak ise tüm koşullarda Feed2 kullanıldı.

Kültürün 7.gününde 6E3 için 4 g/L galaktoz eklemesi yapıldı. P/V değeri 22,17 ve 14 olarak denendi. Başlangıç glutamin değeri 4 mM olarak eklendi, sonrasında 3. Gün 4 mM, 5.gün 2 mM ve 7.gün 1 mM L-glutamin eklemeleri devam etti. pH değeri sıcaklık kaydırmasından önceki 6 gün 6,95 sıcaklık kaydırması sonrası 7,05 olarak ayarlandı ve $7,05 \pm 0,35$ proses limiti verildi. A1 koşulunda P/V değeri 22 olarak ayarlandı ve kuru hava 0,01 vvm'e göre ayarlanırken, oksijen maksimum değerine ayarlandı. A2 koşulunda P/V değeri 17'ye ayarlandı ve kuru hava: 200 ml/dk oksijen 100 ml/dk olarak limitlendi. A3 koşulunda P/V değeri 17 olarak ayarlandı ve kuru hava 0,01 vvm'e göre ayarlanırken, oksijen maksimum değerine ayarlandı. A4 koşulunda ise kuru hava ve oksijen maksimum limitte bırakıldı.



Şekil 5.35: Biyoreaktör seviyesinde optimizasyon çalışması sonuçları

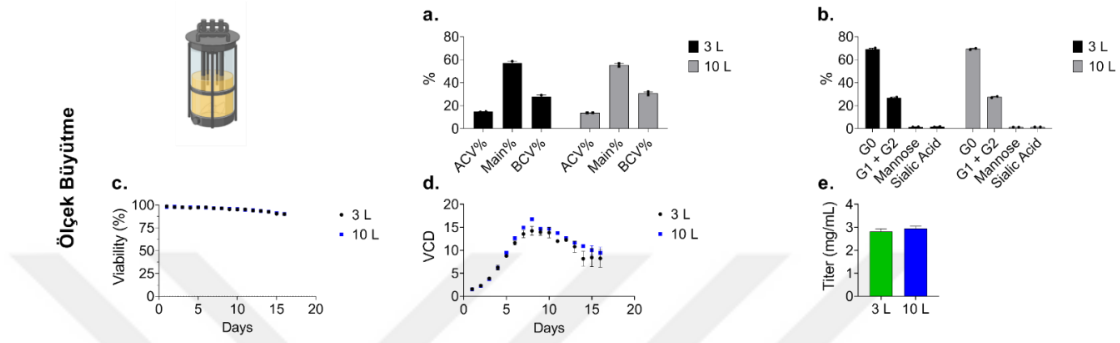
A1: PV=22 Hava limit:0,01 vvm, oksijen: maksimum, A2: PV=17 Hava limit:200, oksijen:100 ml/dk

A3: PV=17 Hava limit:0,01 vvm oksijen: maksimum, A4: PV=14 Hava limit: maksimum oksijen: maksimum

A3 koşulunda ilk defa reaktörde yaklaşık 15×10^6 hücre sayısına ulaştı ve sonrasında hafifçe düşüşe geçti. A2 ve A4 koşulu yaklaşık maksimum 10×10^6 hücre sayısına ulaşabildi (Şekil 5.35c). Kültür boyunca canlılık tüm koşullarda 87%'nin altına düşmedi. A2 ve A4 reaktör koşulları kültür süresi bittiğinde canlılık açısından daha düşük canlılığa sahip oldu (Şekil 5.35d). Bu durum gözle görülür hücre toplanmasından (clump) kaynaklanabilir. Bunun birçok sebebi olabilir. Hücre, (PV) karıştırma hızı, kuru hava ve oksijen limiti kaynaklı strese girmiştir ve bu durum yaşanmış olabilir. A3 koşulu, erlen ölçeği ile neredeyse aynı verimliliğe ulaşmıştır. Tüm prosesler boyunca reaktör ölçeğinde en yüksek verimliliğe ulaşılmıştır. A1, A2 ve A4 koşulları yüksek verimliliğe ulaşmamıştır (Şekil 5.35e). Verimlilik farkına rağmen spesifik üretkenlik değerleri birbirine yakındır. Glikan sonuçlarına göre referans ürüne en yakın A3 reaktör koşulu olmuştur. Aynı zamanda Mannoze hariç bütün referans aralıklarının içinde yer almıştır. Mannoze gruplarında referans ürün aralığına son derece yakındır. Mannoze gruplarında meydana gelen bunun gibi küçük yüzdesel değişimler klinik açıdan risk oluşturmamaktadır (Şekil 5.35b). 6E3 klonunda asidik varyantlar düşüken, bazik varyantlar referans ürüne göre yüksektir (Şekil 5.35a). CEX'de yeni bir pik tespit edilmemiştir. Bu sebeple Lysine ve N terminal glutamin sebebi olduğu düşünüldü. BCV'ler karboksipeptidaz denemeleri de Lys'lerde etkili olup ACV'ye dönüşümü tetikleyebilir.

5.5. Ölçek Büyütme Çalışmaları

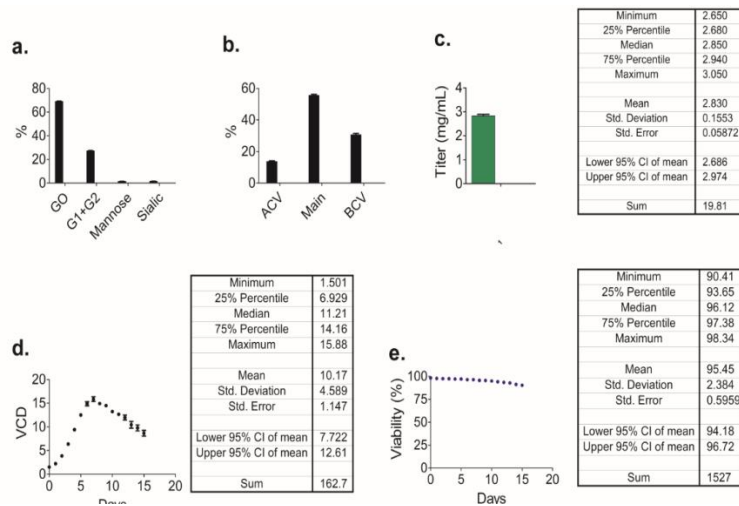
A3 reaktör koşulu kalite ve verimlilik açısından bu zamana kadar ki en iyi sonucu verdiği için devamındaki çalışmalarda bu sonucu 3 L ve 10 L ölçeğinde tekrarlamak amaçlandı. 3 L ve 10 L olmak üzere duplike 4 reaktör ölçeğinde A3 ile tamamen aynı koşullarda reaktör denmesi yapıldı.



Şekil 5.36: 3L'den 10L biyoreaktöre uygulanan ölçek büyütme çalışması sonuçları.

Ölçek büyütme sırasında (P/V) sabit güç sayısı stratejisi kullanılmıştır. Uygun kalite ve yüksek verimlilik açısından ölçek büyütme başarı ile sonuçlandırılmıştır (Şekil 5.36).

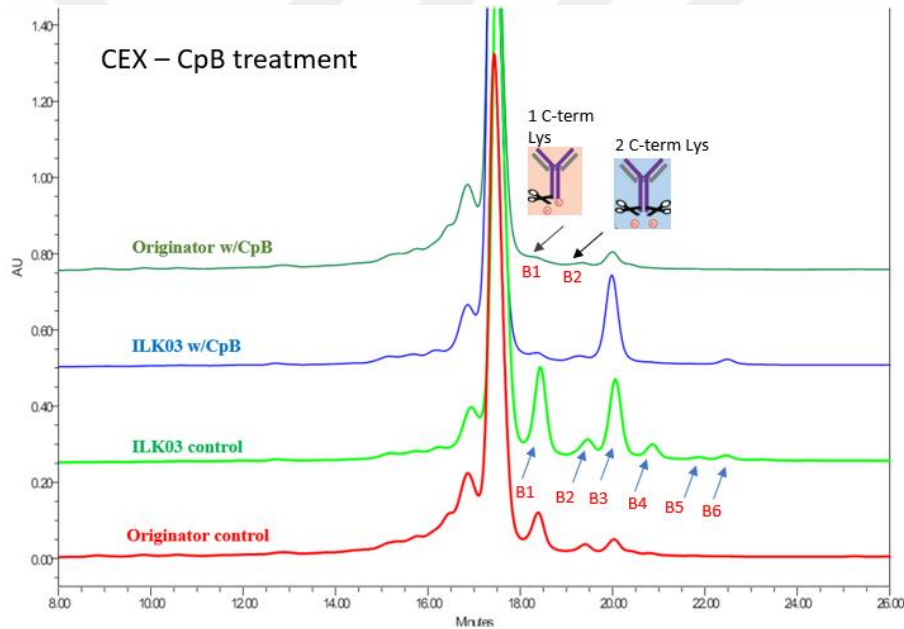
5.6. Tekrarlanabilirlik Çalışması



Şekil 5.37: Yedi farklı reaktörün tekrarlanabilirlik sonuçları ve analizleri. (GraphPad kullanıldı.)

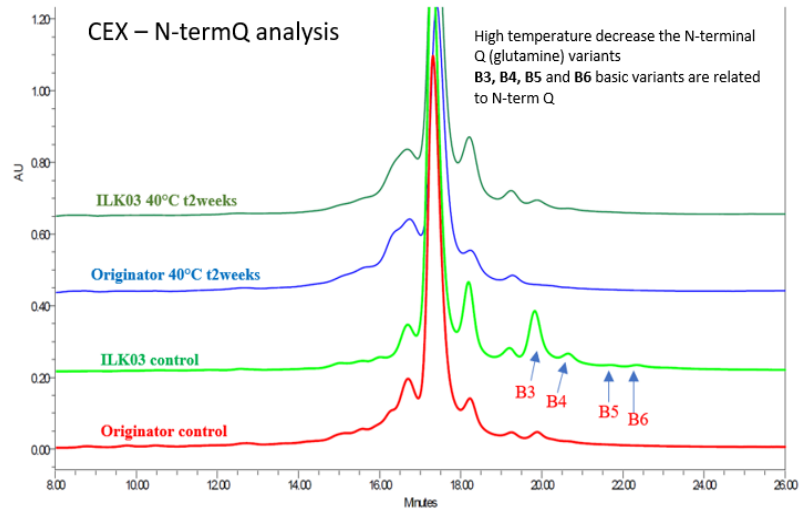
Biyoreaktör seviyesinde optimum koşullar belirlendikten sonra ölçek büyütme çalışmalarına geçildi. 10L’ de yedi farklı tekrarlanabilirlik çalışması gerçekleştirildi. 7 farklı reaktörün sonuçlarına göre glikan ve yük varyant profili birbiriyle tamamen uyumlu bulunmuştur. Verimlilik sonuçlarına göre ortalama verimlilik sonucu 2.830 g/L iken standart sapması 0.1553 değerinde olup verimlilik açısından tekrarlanabilirlik başarıyla sonuçlanmıştır (Şekil 5.37). En yüksek canlı hücre sayısı yoğunluğu 14-15 milyon civarında seyretmiştir. Canlılık sonuçlarına göre canlılık 90%’nin altına düşmemiştir. Sonuçlar birbiriyle uyumludur ve canlılık ve hücre yoğunluğu açısından da tekrarlanabilirlik başarıyla sonuçlanmıştır.

5.7. CEX (CpB&N-term Q) Analizi



Şekil 5.38: CEX analizi ile karboksipeptidaz B uygulaması.

Tüm koşullarda referans ürüne göre ACV% düşüklüğü BCV% yüksekliği görülmüştür. ACV%’nin raf ömrü süresince arttığı bilinmektedir. Karboksipeptidaz-B enzimi ile yapılan CEX yük varyant analiz sonucuna göre ilk iki bazik pikin (B1 ve B2) sırasıyla 1 C-terminal lizin ve 2 C-terminal lizin varyantları olduğu gösterilmiştir.



Şekil 5.39: CEX analizi ile N-terminal Glutamin Tespiti.

N-terminal glutamin analizinde ise 40 °C ‘de 2 hafta inkübe edilen ürünün CEX yük varyant analiz sonucuna göre B3, B4, B5, B6 piklerinin N-terminal glutamin olduğu gösterildi (Şekil 5.39).

6. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

İLKO ARGEM Biyoteknoloji Merkezi'nden yerli olarak üretilmiş bir hücre hattı kullanılması projenin ülkemize olan katma değerini arttırmaktadır ve aynı zamanda proje maliyetini de düşürmektedir. Hem gerekli altyapının devreye alınması hem de benzeri tüm ürünler için uygun hücre platformumuzu kullanılması, inovatör ve biyobenzer diğer yerli mAb'ların ve protein yapıda ilaçların da geliştirilmesinde daha hızlı yol alınmasını sağlayacaktır. Bu teknolojik avantajın ve ilk yerli biyobenzerin hedeflenmesinin, firmamıza, hastalarımıza ve ülkemizin ithalat maliyetlerine sağlayacağı katkıların yanı sıra, en büyük faydası ülkemizin marka değerini arttırmasında ve dünyada biyoteknoloji sektöründe öncü bir güç olması yolunda ilerlemesinde olacaktır. 30B4, 12D8, 6E3 klonlarının stabilite sonuçlarına göre 30B4 klonun stabil olmadığı görüldü. 12D8 ve 6E3 MTX kullanılmadan 60 GCN stabil olduğu görüldü. Stabilite çalışması ile prosesin ticari ölçeğinin 1000 L biyoreaktör seviyesinde üretime kadar stabil olduğu görülmüştür bu da ticari üretim açısından önem arz etmektedir. 12D8 ve 6E3 arasından erlen seviyesinde optimizasyon çalışmalarına daha yüksek verimlilik ve glikan profilinin referans ürüne daha yakın bulunması sebebiyle 6E3 ile devam edilmesine karar verildi.

6E3 klonu için erlen seviyesinde optimizasyon sonuçlarına göre manganezin kalite ve verimlilik açısından literatürün aksine anlamlı bir etkisi olmadığı görülmüştür. 4g/L galaktoz ve 8g/L galaktoz arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Kalitede anlamlı bir fark bulunmaması sebebiyle maliyet düşürmesi açıdan daha az miktar da galaktoz kullanılması tercih sebebidir. 4g/L galaktoz yerine 1% (v/v) ticari galaktoz düzenleyici muadil olarak belirlenmiştir. $1,3 \times 10^6$ hücre ekim konsantrasyonu, Besiyeri C, 4g/L Galaktoz konsantrasyonu koşulları ile optimum sonuç elde edilmiştir. Verimliliğin 2g/L'den 3g/L'ye optimizasyonlar sonucu arttırılması vial başına düşen maliyeti 25% düşürmüştür. Bu durum ürünün ticarileşmesi aşamasında büyük katkı sağlayacaktır.

Biyorektör seviyesinde optimizasyon sonuçlarına göre PV-17 koşulu hava limiti ise 0,01 vvm'e göre ayarlanması ile optimum sonuç elde edilmiştir. P/V ve hava limitlerinin glikan sonuçlarında anlamlı etkisi olmadığı görüldü. 3L ve 10L ölçek büyütme çalışmaları uygun kalite ve yüksek verimlilik parametreleri açısından başarı ile sonuçlanmıştır. Çalışmanın yedi kez tekrarlanabilirliği başarı ile tamamlanmıştır. Yedi kez tekrarlanabilirlik çalışmasının yapılması 10L'den sonra yapılacak daha

büyük ölçeklerin riskinin azaltılmasında önem arz etmektedir. Tüm koşullarda ortaya çıkan ACV düşüklüğü ve BCV yüksekliği literatür ile ilişkilendirilerek Lizin ve N-terminal glutamin sebepli olduğu düşünüldü. C-terminal lizinin in-vivo olarak yaklaşık saatlik (62 dakika) yarılanma ömrüyle hızla kaybolduğu bulunmuştur [Cai vd., 2011]. Karboksipetidaz-B enzimi ile yapılan CEX yük varyant analiz sonucuna göre ilk iki bazik pikin (B1 ve B2) sırasıyla 1 C-terminal lizin ve 2 C-terminal lizin varyantları olduğu gösterilmiştir. C terminal lizinlerin, ürün vücuda enjekte edildikten sonra dolaşımda bulunan hücre dışı Karboksi peptidazlar tarafından kesildiği ve dolayısıyla ürün aktivitesine ve biyobenzerliğe bir engel teşkil etmediği literatürde yaygın olarak bilinmektedir [H. Liu vd., 2014]. Sıcaklık muamelesi ile N-terminal glutaminler de B3, B4, B5, B6 olarak tespit edilmiştir. N-terminal glutaminler sıcaklığın etkisiyle pyroglutamik asitlere dönüşmektedir. Bu sebeple ürün aktivitesine ve biyobenzerliğe bir engel teşkil etmemektedir [Cao vd., 2022].

KAYNAKLAR

Agbogbo, F. K., Ecker, D. M., Farrand, A., Han, K., Khoury, A., Martin, A., McCool, J., Rasche, U., Rau, T. D., Schmidt, D., Sha, M., Treuheit, N., "Current perspectives on biosimilars", *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2019, 46, 9-10, 10295-019-02216-z. <https://doi.org/10.1007/s10295-019-02216-z>

Başkan, E. B., "Biosimilars", *Turkderm Turkish Archives of Dermatology and Venereology*, 2022, 56, 06978. <https://doi.org/10.4274/turkderm.galenos.2022.06978>

Behera, B. K., "Bioreactor (Fermenter)", *Conceptual Development of Industrial Biotechnology for Commercial Production of Vaccines and Biopharmaceuticals*, 2023, 217-243, 443-18748-3.00009-3. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-18748-3.00009-3>

Brinkmann, A., Elouafiq, S., Pieracci, J., Westoby, M., "Leveraging single-pass tangential flow filtration to enable decoupling of upstream and downstream monoclonal antibody processing", *Biotechnol. Prog.*, 2018, 34, 2, 2601. <https://doi.org/10.1002/btpr.2601>

Buffo, M. M., Corrêa, L. J., Esperança, M. N., Cruz, A. J. G., Farinas, C. S., Badino, A. C., "Influence of dual-impeller type and configuration on oxygen transfer, power consumption, and shear rate in a stirred tank bioreactor", *Biochem. Eng. J.*, 2016, 114, 114003. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.07.003>

Buss, N. A. P. S., Henderson, S. J., McFarlane, M., Shenton, J. M., De Haan, L., "Monoclonal antibody therapeutics: History and future", *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2012, 12, 5, 801. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2012.08.001>

Chen, C., Wong, H. E., Goudar, C. T., "Upstream process intensification and continuous manufacturing", *Curr. Opin. Chem. Eng.*, 2018, 22, 1006. <https://doi.org/10.1016/j.coche.2018.10.006>

Ditani, A. S., Mallick, P. P., Anup, N., Tambe, V., Polaka, S., Sengupta, P., Rajpoot, K., Tekade, R. K., "Biosimilars accessible in the market for the treatment of cancer", *J. Control. Release*, 2021, 336, 6014. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.06.014>

Esperança, M. N., Mendes, C. E., Rodriguez, G. Y., Cerri, M. O., Béttega, R., Badino, A. C., "Sparger design as key parameter to define shear conditions in pneumatic bioreactors", *Biochem. Eng. J.*, 2020, 157, 07529. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107529>

Gherghescu, I., Delgado-Charro, M. B., "The biosimilar landscape: An overview of regulatory approvals by the EMA and FDA", *Pharmaceutics*, 2021, 13, 1, 0048. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13010048>

Guajardo, N., Schrebler, R. A., "Upstream and downstream bioprocessing in enzyme technology", *Pharmaceutics*, 2024, 16, 1, 0038. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16010038>

Ishii-Watabe, A., Kuwabara, T., "Biosimilarity assessment of biosimilar therapeutic monoclonal antibodies", *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 2019, 34, 1, 1004. <https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2018.11.004>

Joshi, D., Khursheed, R., Gupta, S., Wadhwa, D., Singh, T. G., Sharma, S., Porwal, S., Gauniyal, S., Vishwas, S., Goyal, S., Gupta, G., Eri, R. D., Williams, K. A., Dua, K., Singh, S. K., "Biosimilars in oncology: Latest trends and regulatory status", *Pharmaceutics*, 2022, 14, 12, 2721. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14122721>

Kang, H. N., Wadhwa, M., Knezevic, I., Ondari, C., Simao, M., "WHO guidelines on biosimilars: Toward improved access to safe and effective products", *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2023, 1521, 1, 14965. <https://doi.org/10.1111/nyas.14965>

Kunert, R., Reinhart, D., "Advances in recombinant antibody manufacturing", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2016, 100, 8, 7388-9. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7388-9>

Li, F., Vijayasankaran, N., Shen, A., Kiss, R., Amanullah, A., "Cell culture processes for monoclonal antibody production", *mAbs*, 2010, 2, 5, 12720. <https://doi.org/10.4161/mabs.2.5.12720>

Liu, H. F., Ma, J., Winter, C., Bayer, R., "Recovery and purification process development for monoclonal antibody production", *mAbs*, 2010, 2, 5, 12645. <https://doi.org/10.4161/mabs.2.5.12645>

Mahé, A., Martiné, A., Fagète, S., Girod, P. A., "Exploring the limits of conventional small-scale CHO fed-batch for accelerated on demand monoclonal antibody production", *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 2022, 45, 2, 2657-21. <https://doi.org/10.1007/s00449-021-02657-w>

Malakar, S., Gontor, E. N., Dugbaye, M. Y., Shah, K., Sinha, S., Sutaoney, P., Chauhan, N. S., "Cancer treatment with biosimilar drugs: A review", *Cancer Innov.*, 2024, 3, 2, e115. <https://doi.org/10.1002/cai2.115>

Moorthy, B. S., Xie, B., Moussa, E. M., Iyer, L. K., Chandrasekhar, S., Panchal, J. P., Topp, E. M., "Structure of monoclonal antibodies", *AAPS Adv. Pharm. Sci. Ser.*, 2015, 19, 4939-8_6. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2543-8_6

Agbogbo, F. K., Ecker, D. M., Farrand, A., Han, K., Khoury, A., Martin, A., McCool, J., Rasche, U., Rau, T. D., Schmidt, D., Sha, M., Treuheit, N., "Current perspectives on biosimilars", *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2019, 46, 9-10, 10295-019-02216-z. <https://doi.org/10.1007/s10295-019-02216-z>

Başkan, E. B., "Biosimilars", *Turkderm Turkish Archives of Dermatology and Venereology*, 2022, 56, 06978. <https://doi.org/10.4274/turkderm.galenos.2022.06978>

Behera, B. K., "Bioreactor (Fermenter)", *Conceptual Development of Industrial Biotechnology for Commercial Production of Vaccines and Biopharmaceuticals*, 2023, 217-243, 443-18748-3.00009-3. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-18748-3.00009-3>

Brinkmann, A., Elouafiq, S., Pieracci, J., Westoby, M., "Leveraging single-pass tangential flow filtration to enable decoupling of upstream and downstream monoclonal antibody processing", *Biotechnol. Prog.*, 2018, 34, 2, 2601. <https://doi.org/10.1002/btpr.2601>

Buffo, M. M., Corrêa, L. J., Esperança, M. N., Cruz, A. J. G., Farinas, C. S., Badino, A. C., "Influence of dual-impeller type and configuration on oxygen transfer, power consumption, and shear rate in a stirred tank bioreactor", *Biochem. Eng. J.*, 2016, 114, 114003. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.07.003>

Buss, N. A. P. S., Henderson, S. J., McFarlane, M., Shenton, J. M., De Haan, L., "Monoclonal antibody therapeutics: History and future", *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2012, 12, 5, 801. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2012.08.001>

Chen, C., Wong, H. E., Goudar, C. T., "Upstream process intensification and continuous manufacturing", *Curr. Opin. Chem. Eng.*, 2018, 22, 1006. <https://doi.org/10.1016/j.coche.2018.10.006>

Ditani, A. S., Mallick, P. P., Anup, N., Tambe, V., Polaka, S., Sengupta, P., Rajpoot, K., Tekade, R. K., "Biosimilars accessible in the market for the treatment of cancer", *J. Control. Release*, 2021, 336, 6014. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.06.014>

Esperança, M. N., Mendes, C. E., Rodriguez, G. Y., Cerri, M. O., Béttega, R., Badino, A. C., "Sparger design as key parameter to define shear conditions in pneumatic bioreactors", *Biochem. Eng. J.*, 2020, 157, 07529. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107529>

Gherghescu, I., Delgado-Charro, M. B., "The biosimilar landscape: An overview of regulatory approvals by the EMA and FDA", *Pharmaceutics*, 2021, 13, 1, 0048. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13010048>

Guajardo, N., Schrebler, R. A., "Upstream and downstream bioprocessing in enzyme technology", *Pharmaceutics*, 2024, 16, 1, 0038. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16010038>

Ishii-Watabe, A., Kuwabara, T., "Biosimilarity assessment of biosimilar therapeutic monoclonal antibodies", *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 2019, 34, 1, 1004. <https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2018.11.004>

Joshi, D., Khursheed, R., Gupta, S., Wadhwa, D., Singh, T. G., Sharma, S., Porwal, S., Gauniyal, S., Vishwas, S., Goyal, S., Gupta, G., Eri, R. D., Williams, K. A., Dua, K., Singh, S. K., "Biosimilars in oncology: Latest trends and regulatory status", *Pharmaceutics*, 2022, 14, 12, 2721. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14122721>

Kang, H. N., Wadhwa, M., Knezevic, I., Ondari, C., Simao, M., "WHO guidelines on biosimilars: Toward improved access to safe and effective products", *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2023, 1521, 1, 14965. <https://doi.org/10.1111/nyas.14965>

Kunert, R., Reinhart, D., "Advances in recombinant antibody manufacturing", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2016, 100, 8, 7388-9. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7388-9>

Li, F., Vijayasankaran, N., Shen, A., Kiss, R., Amanullah, A., "Cell culture processes for monoclonal antibody production", *mAbs*, 2010, 2, 5, 12720. <https://doi.org/10.4161/mabs.2.5.12720>

Liu, H. F., Ma, J., Winter, C., Bayer, R., "Recovery and purification process development for monoclonal antibody production", *mAbs*, 2010, 2, 5, 12645. <https://doi.org/10.4161/mabs.2.5.12645>

Mahé, A., Martiné, A., Fagète, S., Girod, P. A., "Exploring the limits of conventional small-scale CHO fed-batch for accelerated on demand monoclonal antibody production", *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 2022, 45, 2, 2657-21. <https://doi.org/10.1007/s00449-021-02657-w>

Malakar, S., Gontor, E. N., Dugbaye, M. Y., Shah, K., Sinha, S., Sutaoney, P., Chauhan, N. S., "Cancer treatment with biosimilar drugs: A review", *Cancer Innov.*, 2024, 3, 2, e115. <https://doi.org/10.1002/cai2.115>

Moorthy, B. S., Xie, B., Moussa, E. M., Iyer, L. K., Chandrasekhar, S., Panchal, J. P., Topp, E. M., "Structure of monoclonal antibodies", *AAPS Adv. Pharm. Sci. Ser.*, 2015, 19, 4939-8_6. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2543-8_6

Nelson, P. N., Reynolds, G. M., Waldron, E. E., Ward, E., Giannopoulos, K., Murray, P. G., "Demystified: Monoclonal antibodies", *J. Clin. Pathol. Mol. Pathol.*, 2000, 53, 3, 111. <https://doi.org/10.1136/mp.53.3.111>

Reddy, J. V., Raudenbush, K., Papoutsakis, E. T., Ierapetritou, M., "Cell-culture process optimization via model-based predictions of metabolism and protein glycosylation", *Biotechnol. Adv.*, 2023, 67, 8179. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108179>

Safi, M., Al-Nusaif, M., Trapani, D., Mashrah, M. A., Kanesvaran, R., Alzandani, A., Al-Azab, M., Mazher, S. A., Al-Danakh, A., Liu, J., "Brain and heart-specific death in cancer patients: Population-based study", *Cancer Med.*, 2021, 10, 17, <https://doi.org/10.1002/cam4.4069>.

Singh, N., Pizzelli, K., Romero, J. K., Chrostowski, J., Evangelist, G., Hamzik, J., Soice, N., Cheng, K. S., "Clarification of recombinant proteins from high cell density mammalian cell culture systems using new improved depth filters", *Biotechnol. Bioeng.*, 2013, 110, 7, <https://doi.org/10.1002/bit.24848>.

Teworte, S., Malcı, K., Walls, L. E., Halim, M., Rios-Solis, L., "Recent advances in fed-batch microscale bioreactor design", *Biotechnol. Adv.*, 2022, 55, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107888>.

Torkashvand, F., Vaziri, B., "Main quality attributes of monoclonal antibodies and effect of cell culture components", Iran. Biomed. J., 2017, 21, 3, <https://doi.org/10.18869/acadpub.ijb.21.3.131>.

Wohlenberg, O. J., Kortmann, C., Meyer, K. V., Schellenberg, J., Dahlmann, K., Bahnemann, J., Scheper, T., Solle, D., "Optimization of a mAb production process with regard to robustness and product quality using quality by design principles", Eng. Life Sci., 2022, 22, 7, <https://doi.org/10.1002/elsc.202100172>.

Xu, S., Hoshan, L., Jiang, R., Gupta, B., Brodean, E., O'Neill, K., Seamans, T. C., Bowers, J., Chen, H., "A practical approach in bioreactor scale-up and process transfer using a combination of constant P/V and vvm as the criterion", Biotechnol. Prog., 2017, 33, 4, <https://doi.org/10.1002/btpr.2489>.

Xu, W. J., Lin, Y., Mi, C. L., Pang, J. Y., Wang, T. Y., "Progress in fed-batch culture for recombinant protein production in CHO cells", Appl. Microbiol. Biotechnol., 2023, 107, 4, <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12342-x>.

Zahavi, D., Weiner, L., "Monoclonal antibodies in cancer therapy", Antibodies, 2020, 9, 3, <https://doi.org/10.3390/antib9030034>.

ÖZGEÇMİŞ

Çağla Kırımlıoğlu, lisans eğitimini Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde aldı. ‘Hücrel Stres Koşullarında Membransız Organeller ile Flash /Casp8Ap2 Proteini Arasındaki Etkileşimin Araştırılması’ konulu lisans bitirme tezi 2209-A kapsamında TÜBİTAK tarafından desteklendi. 2022 yılında lisans eğitimini tamamladıktan sonra aynı yıl Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde yüksek lisans eğitimine başladı.



TEZ METNİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR/SUNUMLAR

Kırmıhoğlu Ç., Bıçak D., Öncel H., Öztürk B., Şengün T., Yağcı T., (2024), “İnsan Biyobenzer Monoklonal Antikorlarının Üretiminde Üst Akım Sürecinin Optimizasyonu”, 8. GTÜ Lisansüstü Araştırmalar Sempozyumu, Kocaeli, Türkiye, 30-31 Haziran. (Sözlü Sunum)



EKLER

Ek-A: Şekil Kullanımı İçin Alınan İzinler

BioRender satın alma (invoice) numarası: 3CB64429-0004

Biorender programından Lisans numarası: 779568310RT0001 ile kullanılmıştır (Şekil 1.1).

