



# EGE ÜNİVERSİTESİ

## YÜKSEK LİSANS TEZİ

### BİYOREAKTÖRDE PİLOT ÖLÇEKLİ MONOKLONAL ANTİKOR ÜRETİMİ

Duygu AYYILDIZ TAMİŞ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. S. İsmet DELİLOĞLU GÜRHAN

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 621.01.00

Sunuş Tarihi: 15.12.2010

Bornova-İZMİR

2010

**EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

**BİYOREAKTÖRDE PİLOT ÖLÇEKLİ  
MONOKLONAL ANTİKOR ÜRETİMİ**

**Duygu AYYILDIZ TAMİŞ**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. S. İsmet DELİLOĞLU GÜRHAN**

**Biyomühendislik Anabilim Dalı**

**Bilim Dalı Kodu : 621.01.00**

**Sunuş Tarihi : 15.12.2010**

**Bornova-İZMİR**

**2010**

Duygu AYYILDIZ TAMİŞ tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “Biyoreaktörde Pilot Ölçekli Monoklonal Antikor Üretimi” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 15.12.2010 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

**Jüri Üyeleri:****İmza**

<b>Jüri Başkanı</b>	<b>: Prof. Dr.</b>	.....
	<b>S. İsmet DELİLOĞLU GÜRHAN</b>	
<b>Raportör Üye</b>	<b>: Yard. Doç. Dr.</b>	.....
	<b>Feyzan ÖZDAL KURT</b>	
<b>Üye</b>	<b>: Prof. Dr.</b>	.....
	<b>Murat ELİBOL</b>	



**ÖZET****BİYOREAKTÖRDE PİLOT ÖLÇEKLİ MONOKLONAL ANTİKOR ÜRETİMİ**

AYYILDIZ TAMİŞ, Duygu

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Bölümü

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. S. İsmet DELİLOĞLU GÜRHAN

Aralık 2010, 106 Sayfa

Bu çalışmada, serumlu ve serumsuz ortamlarda (SFM) pilot ölçekli monoklonal antikor (MAb) üretimi için döner şişe (DŞ), karıştırmalı tank biyoreaktör (STR) ve tek kullanımlık biyoreaktörler gibi farklı kültür sistemleri ile çalışılmıştır. Hücre kültürü çalışmaları, *Salmonella* Enteritidis'in O-antijen spesifik MAb salgılayan hibridoma klonu (5A8) ile gerçekleştirilmiştir. Yüksek miktarda ve verimlilikte ürün alabilmek için kullanılan sistemler, hücrelerin büyüme parametreleri ve MAb verimlilikleri açısından tartışılmıştır.

STR'de MAb üretiminde 4 litreye kadar ölçek büyütme yapılmış ve hücrelerin üretim kapasiteleri reaktördeki pH, sıcaklık, çözünmüş oksijen, havalandırma ve karıştırma hızı gibi parametreler optimize edilerek değerlendirilmiştir. Hücrelerin büyüme parametrelerinin belirlenmesi için glukoz tüketimlerine, laktik asit ve amonyak üretimlerine bakılmıştır. Sistemlerdeki MAb verimliliği indirekt ELISA ile ölçülmüştür.

Bu çalışmada, 5A8 hibridoma klonunun SFM'e adapte olamadığı ve SFM ortamında düşük hücre canlılığı gösterdiği ve düşük MAb titresi elde edildiği belirlenmiştir. STR'de, DŞ'lerde elde edilenden daha yüksek MAb verimliliği elde edildiği ve membran havalandırmalı reaktörde (MHR), DŞ ve STR'deki üretimlere göre daha uzun süre hücre canlılığının korunduğu ve daha yüksek MAb titresi elde edildiği görülmüştür. En yüksek MAb konsantrasyonu statik membran reaktörde (SMR) elde edilirken, en yüksek MAb verimliliği yarı sürekli modda ve yüzey havalandırma koşullarında çalıştırılan STR'de elde edilmiştir.

**Anahtar sözcükler:** Hibridoma, monoklonal antikor, pilot ölçek, döner şişe, karıştırmalı tank biyoreaktör, tek kullanımlık biyoreaktör.



**ABSTRACT****PILOT SCALE MONOCLONAL ANTIBODY PRODUCTION IN BIOREACTORS**

AYYILDIZ TAMİŞ, Duygu

MSc in Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. S. İsmet DELİLOĞLU-GÜRHAN

December 2010, 106 pages

In this study, different cultivation systems such as roller bottles (RB), 5-L stirred tank bioreactor (STR) and disposable bioreactors were used to grow hybridomas for pilot scale production of monoclonal antibody (MAb) in either serum containing or serum free (SFM) culture conditions. For this purpose, cell culture studies were performed by using hybridoma cell line (5A8) producing O-antigen specific MAb against *Salmonella* Enteritidis. In order to get high quantity and to increase product yield these production systems were discussed in view of the growth parameters and MAb productivity.

In stirred tank bioreactor, MAb production scaled up to 4 L and production capabilities of the cells were evaluated by optimizing pH, temperature, dissolved oxygen, aeration rate and stirring speed in the reactor vessel. In order to assess the growth parameters of the cells in different production systems glucose consumption, lactate and ammonia production were determined and MAb productivities of the systems were determined by indirect ELISA.

To conclude, lack of adaptation of the cells to SFM in both RB and STR. Less MAb titer in STR compared to RB with SFM. More MAb obtained in STR with FCS supplemented medium than SFM. Higher MAb titer gained in membrane aerated system (MAS) compared to those of STR and RB. Although the highest MAb titer was obtained in the static membrane bioreactor (SMB) system, the highest productivity was obtained in STR operated as semi continuous culture with overlay aeration.

**Keywords:** Hybridoma, monoclonal antibody, pilot scale, roller bottles, stirred tank bioreactors, disposable bioreactors.





## TEŞEKKÜR

Yüksek lisansım ve tezim süresince bana güvenen, hiçbir zaman yardımını ve desteğini esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. S. İsmet Deliloğlu Gürhan'a verdiği sonsuz destek, her türlü bilgi ve deneyim için Prof. Dr. Murat Elibol hocama, yardımları ve değerli katkıları için Ar. Gör. Dr. Ayşe Nalbantsoy'a teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışma boyunca, her türlü maddi, manevi ve teknik destek veren Sayın Cem Erdem, Ömer Erdem ve tüm Sartonet Ltd. Şti. çalışanlarına, D-glukoz analizlerimizde yardımcı olan Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Eser Sözmen ve çalışma grubuna teşekkür ederim.

Tezim boyunca 108M578 no'lu proje kapsamında burs sağlayan TÜBİTAK'a ve katkılarından dolayı EBİLTEM'e, destek ve yardımlarını benden esirgemeyen tüm laboratuvar arkadaşlarıma, sevgili eşim ve aileme teşekkürü bir borç bilirim.



**İÇİNDEKİLER**

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	V
ABSTRACT.....	VII
TEŞEKKÜR.....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XVII
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	XXIII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	XXVII
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	5
2.1 Hibridoma Teknolojisi, Monoklonal Antikor Üretimi ve Önemi.....	5
2.2 Memeli Hücrelerinin Metabolizması.....	6
2.2.1 Karbon ve enerji kaynağı olarak glukoz, glutamin ve aminoasitler.....	7
2.2.2 Laktik asit ve amonyakın etkisi.....	8
2.3 Monoklonal Antikor Üretim Teknolojileri.....	9
2.3.1 Proses optimizasyonu, tasarım ve işletme parametreleri.....	11
2.3.1.1 Monoklonal antikor üretiminde biyoreaktör tasarımı.....	11
2.3.1.2 Hayvan hücreleri ve kayma gerilimi.....	19

**İÇİNDEKİLER (devam)**

	<u>Sayfa</u>
2.3.1.3 Kültür (besleme) motları.....	21
2.3.1.4 Kültür ortamı.....	24
2.3.1.5 Çevresel parametrelerin prosese etkisi.....	27
2.3.2 Proses izleme ve kontrol.....	30
2.4 Monoklonal Antikorların Saflaştırılması.....	32
3. MATERYAL ve METOT.....	35
3.1 5A8 Hibridoma Klonunun Sıvı Azottan Çıkarılarak Çözdürülmesi ve Kültürü.....	35
3.2 5A8 Hibridoma Klonunun Serumsuz Ortama Adaptasyonu.....	36
3.3 BHK An <sub>30</sub> Hücreleri ile Döner Şişelerde Ölçek Büyütme, Vibroreaktörde Süspansiyon Ortama Adaptasyon ve Karıştırmalı Biyoreaktör ile Üretim Optimizasyonu.....	36
3.3.1 BHK An <sub>30</sub> hücrelerinin çözdürülmesi ve kültürü.....	37
3.2.2 BHK An <sub>30</sub> hücreleri ile döner şişelerde ölçek büyütme.....	38
3.3.2.1 BHK An <sub>30</sub> hücrelerinin vibroreaktörde süspansiyon kültürüne adapte edilmesi.....	38
3.3.2.2 BHK An <sub>30</sub> hücreleri ile karıştırmalı tank biyoreaktörde üretim optimizasyonu.....	40

**İÇİNDEKİLER (devam)**Sayfa

3.4 Miyeloma Hücreleri ile Karıştırmalı Biyoreaktörde Üretim Optimizasyonu..	40
3.4.1 Ag8 miyeloma hücre hattının sıvı azottan çıkartılarak çözdürülmesi ve kültürü.....	41
3.4.2 Miyeloma hücrelerinin karıştırmalı tank biyoreaktörde üretimi.....	42
3.5 5A8 Hibridoma Klonunun Döner Şişelerde Üretimi.....	43
3.5.1 Döner şişelerde 5A8 hibridoma kültürünün sürdürülmesi.....	44
3.5.2 Döner şişelerde 5A8 hibridoma klonu ile monoklonal antikor üretimi.....	45
3.6 Hibridoma Klonunun Karıştırmalı Tank Biyoreaktörde Üretimi.....	47
3.6.1 5A8 hibridoma kültürünün %10 (v/v) serum içeren ortamda karıştırmalı tank biyoreaktörde devam ettirilmesi ve örnekleme.....	47
3.6.2 5A8 hibridoma klonunun %10 (v/v) FCS içeren ortamda karıştırmalı tank biyoreaktörde 0.02 vvm mikrosparger ile havalandırma ve %40 çözünmüş oksijen saturasyonunda üretimi.....	48
3.6.3 5A8 hibridoma klonunun %10 (v/v) FCS içeren ortamda karıştırmalı tank biyoreaktörde yüzey havalandırma koşullarında üretimi.....	48
3.6.4 5A8 hibridoma klonunun karıştırmalı tank biyoreaktörde makrosparger kullanımı ile serum içermeyen ortamda 4 litrede üretimi.....	50
3.6.4.1 5A8 hibridoma kültürünün %10 (v/v) serum içeren ortamda karıştırmalı tank biyoreaktörde ölçek büyütme işleminin yapılması.....	50

## İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.6.4.2 5A8 hibridoma klonunun 4L'de serum içermeyen ortamda (SFM) karıştırmalı tank biyoreaktörde kültürü.....	51
3.6.5 5A8 hibridoma klonunun stasyoner kültürde üreme kinetiğinin belirlenmesi .....	52
3.6.6 5A8 hibridoma klonunun karıştırmalı tank biyoreaktörde makrosparger kullanımı ile %10 (v/v) serum içeren ortamda 4 litrede üretimi.....	53
3.6.6.1 5A8 hibridoma kültürünün %10 (v/v) serum içeren ortamda karıştırmalı tank biyoreaktörde ölçek büyütme işleminin yapılması.....	53
3.6.6.2 5A8 hibridoma kültürünün %10 (v/v) serum içeren ortamda karıştırmalı tank biyoreaktörde 4 L'de kesikli modda üretimi.....	55
3.7 5A8 Hibridoma Klonunun Statik Membran Biyoreaktörde Kültürü ve MAb Üretimi.....	56
3.8 5A8 Hibridoma Klonunun Membran Havalandırmalı Biyoreaktörde Kültürü ve MAb Üretimi.....	57
4. BULGULAR.....	58
4.1 5A8 Hibridoma Klonunun Serumsuz Ortama Adaptasyonu.....	58
4.2 BHK An <sub>30</sub> Hücreleri ile Döner Şişelerde Ölçek Büyütme, Vibroreaktörde Süspansiyon Ortama Adaptasyon ve Karıştırmalı Biyoreaktör ile Üretim Optimizasyonu.....	58
4.2.1 BHK An <sub>30</sub> Hücrelerinin Vibroreaktörde Süspansiyon Kültüre Adapte Edilmesi .....	58

**İÇİNDEKİLER (devam)**Sayfa

4.2.2 BHK An <sub>30</sub> Hücreleri ile Karıştırmalı Tank Biyoreaktörde Üretim Optimizasyonu.....	58
4.3 Miyeloma Hücreleri ile Karıştırmalı Biyoreaktörde Üretim Optimizasyonu..	64
4.4 5A8 Hibridoma Klonunun Döner Şişelerde Üretimi.....	65
4.5 5A8 Hibridoma Klonunun %10 (v/v) FCS İçeren Ortamda Karıştırmalı Tank Biyoreaktörde Mikrosparger ile Sağlanan 0.02 vvm Havalandırma Hızı ve %40 Çözünmüş Oksijen Satürasyonunda Üretimi.....	70
4.6 5A8 Hibridoma Klonunun %10 (v/v) FCS İçeren Ortamda Karıştırmalı Tank Biyoreaktörde Yüzey Havalandırma Koşullarında Üretimi.....	71
4.7 5A8 Hibridoma Klonunun Karıştırmalı Tank Biyoreaktörde Makrosparger Kullanımı İle Serum İçermeyen Ortamda 4 Litrede Üretimi.....	72
4.8 5A8 Hibridoma Klonunun Stasyonere Kültürde Üreme Kinetiğinin Belirlenmesi.....	75
4.9 5A8 Hibridoma Klonunun Karıştırmalı Tank Biyoreaktörde Makrosparger Kullanımı ile %10 (v/v) Serum İçeren Ortamda 4 Litrede Üretimi.....	76
4.10 5A8 Hibridoma Klonunun Statik Membran Biyoreaktör ile Kültürü ve MAb Üretimi.....	79
4.11 5A8 Hibridoma Klonunun Membran Havalandırmalı Biyoreaktörde Kültürü ve MAb Üretimi.....	80
5. TARTIŞMA.....	82

**İÇİNDEKİLER (devam)**

	<u>Sayfa</u>
5.1 Monoklonal Antikor Üretiminde Üretim Sistemlerinin ve Kültür Modunun MAb Üretimine Etkisi.....	82
5.2 Kayma Geriliminin Hayvan Hücreleri Üzerine Etkisi.....	85
5.3 Kültür Ortamının Proses Etkisi.....	87
5.4 Çevresel Parametrelerin Proses Etkisi, Proses İzleme ve Kontrol'ün Kültür Üzerindeki Önemi.....	91
5.5 Sonuçların Değerlendirilmesi.....	92
6. SONUÇLAR.....	94
7. ÖNERİLER.....	95
KAYNAKLAR.....	97
ÖZGEÇMİŞ.....	105



**ŞEKİLLER DİZİNİ**

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1	Protein yapısı.....1
2.1	Hibridoma hücrelerinin metabolik yol izi.....7
2.2	Biyokütle ve ürün sentezinin şematik gösterimi.....7
2.3	Hücre kültüründe kullanılan dinamik biyoreaktörlerin şematik gösterimi .....12
2.4	Hayvan hücre kültürlerinde kullanılan oksijen sağlama sistemleri.....13
2.6	Karıştırmalı tank biyoreaktörün şematik gösterimi ..... 16
2.7	Aksiyel ve radyal akış modelleri ..... 16
2.8	Hücre kültürlerinde karıştırmalı tank biyoreaktörlerde kullanılan impeller tipleri .....17
2.10	Pluronik F68 yapısı ..... 21
2.11	Kültür modlarının prensipleri ..... 23
2.12	Hücrelerin serumsuz besi ortamına kademeli adaptasyonu ..... 26
2.13	MAB üretiminde kullanılan genel altakım işlemleri ..... 33
3.1	5A8 hibridoma klonunun inverted mikroskop altındaki görünümü ..... 35
3.2	5A8 hibridoma klonunun SFM'e adaptasyon aşamaları ..... 37

**ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)**

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.3	Düz yüzeyli döner şişelerde BHK An <sub>30</sub> hücrelerinin üretimi..... 39
3.4	Vibroreaktörde üretim ..... 39
3.5	Miyeloma (Ag8) hücresi ve hibridoma (5A8) klonunun 75 ve 175 cm <sup>2</sup> yüzeyli kültür kaplarında üretimi. ....41
3.6	Miyeloma hücreleri ile karıştırmalı biyoreaktörde üretim ..... 43
3.7	Çözünmüş oksijenin belirli seviyede ve hücrelere zarar vermeyecek şekilde PI-kontrol sistemi ile yapılan değişiklikler sonucu ortaya çıkan süreç. ....43
3.8	Miyeloma hücreleri ile yapılan üretimde pH ve pO <sub>2</sub> değerlerinde meydana gelen dalgalanmalar.....44
3.9	Döner şişelerde yapılan üretimin şematik olarak gösterimi .....44
3.10	5A8 hibridoma klonunun 3 farklı koşulda yivli yüzeyli döner şişerlerde üretimi.....45
3.11	ELISA kalibrasyon eğrisi.....47
3.12	5A8 hibridoma klonu ile karıştırmalı biyoreaktörde üretim.....48
3.13	Kullanılan makrosparger'ın otoklav sonrası fizyolojik su içersindeki görünümü.....50
3.14	5A8 hibridoma kültürünün %10 (v/v) serum içeren ortamda ...karıştırmalı tank biyoreaktörde ölçek büyütme işlemi.....50

**ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)**

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.15 5A8 hibridoma kültürünün %10 (v/v) serum içeren ortamda karıştırmalı tank biyoreaktörde ölçek büyütme işleminde 2L'den 4L'ye hacim artışı.....	55
3.16 SMR.....	56
3.17 MHR komponentleri ve 5A8 hibridoma kültürü.....	57
4.1 NaHCO <sub>3</sub> kullanımından kaynaklanan hücre morfolojilerinin değişimi .....	60
4.2 0.005 vvm havalandırma koşullarında reaktör içerisindeki hücrelerin morfolojik görünümü .....	61
4.3 Karıştırmalı tank reaktörde köpük oluşumu .....	61
4.4 3. deneme sonunda yoğun hücre ve hücre kümelerinin mikroskopik görünümü.....	63
4.5 Reaktördeki üretimin 11. gününde Ag8 miyeloma hücrelerinin mikroskop altındaki görünümü.....	65
4.6 5A8 hibridoma klonunun serumsuz ortamda döner şişelerde üretiminde zamana bağlı canlı hücre konsantrasyonu, pH ve MAb miktarının değişimi.....	67
4.7 5A8 hibridoma klonunun serumsuz ortamda döner şişelerde üretiminde zamana bağlı D-glukoz, laktik asit ve amonyak miktarının değişimi..	67
4.8 5A8 hibridoma klonunun %5 FCS içeren DMEM Ham's F/12 ortamında döner şişelerde üretiminde zamana bağlı canlı hücre konsantrasyonu, pH ve MAb miktarının değişimi.....	67

**ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)**

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.9	5A8 hibridoma klonunun %5 FCS içeren DMEM Ham's F/12 ortamında döner şişelerde üretiminde zamana bağlı D-glukoz, laktik asit ve amonyak miktarının değişimi.....69
4.10	5A8 hibridoma klonunun %10 FCS içeren DMEM Ham's F/12 ortamında döner şişelerde üretiminde zamana bağlı canlı hücre konsantrasyonu, pH ve MAb miktarının değişimi .....69
4.11	5A8 hibridoma klonunun %10 FCS içeren DMEM Ham's F/12 ortamında döner şişelerde üretiminde zamana bağlı D-glukoz, laktik asit ve amonyak miktarının değişimi.....69
4.12	5A8 hibridoma klonunun döner şişelerde ve karıştırmalı tank biyoreaktörde yüzey havalandırma koşullarında kültürü sırasında MAb üretiminin belirlenmesi için kullanılan ELISA pleytinin görünümü..71
4.13	5A8 hibridoma klonunun %10 (v/v) FCS içeren ortamda karıştırmalı tank biyoreaktörde yüzey havalandırma koşullarında üretimi sırasında zamana bağlı canlı hücre konsantrasyonu, pH ve MAb miktarının değişimi.....72
4.14	5A8 hibridoma klonunun %10 (v/v) FCS içeren ortamda karıştırmalı tank biyoreaktörde yüzey havalandırma koşullarında üretimi sırasında zamana bağlı D-glukoz, laktik asit ve amonyak miktarının değişimi.....72
4.15	5A8 hibridoma hücresinin 4 L SFM ortamında karıştırmalı tank biyoreaktörde canlı hücre konsantrasyonu ve % hücre canlılığı.....74
4.16	5A8 hibridoma klonunun 4 L SFM ortamında karıştırmalı tank biyoreaktörde canlı hücre konsantrasyonu, pH değişimi ve O:9 (LPS) Salmonella antijen spesifik MAb konsantrasyonu .....74

**ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)**

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.17	5A8 hibridoma hücresinin 4 L SFM ortamında karıştırmalı tank biyoreaktörde besi ortamındaki D-glukoz, laktik asit ve amonyak konsantrasyonlarındaki değişimler.....75
4.18	5A8 hibridoma klonunun üreme kinetiği çalışmasında canlı hücre konsantrasyonu ve MAb konsantrasyonunun zamana göre değişimi.....76
4.19	5A8 hibridoma klonunun 4 L %10 (v/v) serumlu ortamda karıştırmalı tank biyoreaktörde canlı hücre konsantrasyonu ve % hücre canlılığı..77
4.20	5A8 hibridoma klonunun 4 L %10 (v/v) serumlu ortamda STR'de canlı hücre konsantrasyonu, pH değişimi ve O:9 (LPS) Salmonella antijen spesifik MAb konsantrasyonu.....78
4.21	5A8 hibridoma klonunun 4 L %10 (v/v) serumlu ortamda karıştırmalı tank biyoreaktörde besi ortamındaki D-glukoz, laktik asit ve amonyak konsantrasyonları.....78
4.22	5A8 hibridoma klonunun SMR'de üretimi sırasında canlı hücre konsantrasyonu, pH değişimi ve O:9 (LPS) Salmonella antijen spesifik MAb yoğunluğu.....80
4.23	5A8 hibridoma klonunun MHR'de üretimi sırasında canlı hücre konsantrasyonu, pH değişimi ve O:9 (LPS) Salmonella antijen spesifik MAb konsantrasyonu.....80



## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>		<u>Sayfa</u>
1.1	Mikrobiyal kültürlerin ve hayvan hücre kültürlerinin karakteristikleri..	3
2.1	Farklı proseslerin avantaj ve dezavantajları.....	13
2.2	Sıklıkla kullanılan bazı besleme modlarının ürün verimi ve proses ekonomisi açısından karşılaştırılması.....	22
2.3	Tipik bir hücre kültürü ortamının bileşimi.....	25
2.4	Farklı hücre hatlarının literatürde yer alan oksijen tüketim hızları.....	28
2.5	Biyoreaktörlerde ölçülen ya da kontrol edilen parametreler.....	35
3.1	Reaktör bilgileri.....	49
3.2	Kontrol edilen parametreler.....	49
3.3	Ölçek büyütme sırasında reaktörün başlangıç işletme koşulları ve özellikleri.....	51
3.4	Proses kontrol sistemi.....	51
3.5	4L’de serum içermeyen ortamda (SFM) karıştırmalı tank biyoreaktörde üretim sırasında reaktörün işletme koşulları.....	52
3.6	5A8 hibridoma klonunun karıştırmalı tank biyoreaktörde makrosparger kullanımı ile %10 (v/v) serum içeren ortamda hem ölçek büyütme sırasında hem de 4 litrede üretimi boyunca prosesin işletim ve kontrol koşulları .....	54
3.7	Reaktörün işletme koşulları.....	54
3.8	5A8 hibridoma hücre kültürünün %10 (v/v) serumlu ortamda karıştırmalı tank biyoreaktörde kültürü sırasında işletme koşulları....	55

**ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)**

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.1 Vibroreaktörde üretim süresince gözlemlenen parametreler ve değerler (1. deneme).....	59
4.2 Vibroreaktörde üretim süresince gözlemlenen parametreler ve değerler (2. deneme) . . . . .	59
4.3 BHK hücreleri ile STR'de yapılan kültürde başlangıç koşulları (1. deneme) . . . . .	60
4.4 BHK hücreleri ile STR'de yapılan kültürde izlenen parametreler (1. deneme).....	60
4.5 BHK hücreleri ile STR'de yapılan kültürün başlangıç koşulları (2. deneme).....	62
4.6 BHK hücreleri ile STR'de yapılan kültürün takip çizelgesi (2. deneme).....	62
4.7 BHK hücreleri ile STR'de yapılan kültürün başlangıç koşulları (3. deneme) . . . . .	62
4.8 BHK hücreleri ile STR'de yapılan kültürün takip çizelgesi (3. deneme) . . . . .	62
4.9 BHK hücreleri ile STR'de yapılan kültürün başlangıç koşulları (4. deneme).....	63
4.10 BHK hücreleri ile STR'de yapılan kültürün takip çizelgesi (4. deneme) . . . . .	63
4.11 BHK An <sub>30</sub> ile çalışılan üretim sistemlerinin karşılaştırılması.....	64



**ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)**

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.12 Miyeloma hücreleri ile STR’de üretim sırasında takip edilen parametreler ve sonuçlar.....	65
4.13 Kontrol edilen parametrelerin optimizasyon öncesi değerleri.....	65
4.14 Kontrol edilen parametrelerde optimizasyon sonrası değerler.....	66
4.15 5A8 hibridoma klonunun yivli yüzeyli döner şişerlerde serumsuz ortamda üretim parametreleri.....	66
4.16 5A8 hibridoma klonunun yivli yüzeyli döner şişerlerde %5 FCS içeren DMEM Ham’s F/12 ortamında üretim parametreleri.....	68
4.17 5A8 hibridoma klonunun yivli yüzeyli döner şişerlerde %10 FCS içeren DMEM Ham’s F/12 ortamında üretim parametreleri.....	70
4.18 Üretim sırasında takip edilen parametreler.....	71
4.19 Üretim sırasında takip edilen parametreler.....	71
4.20 Reaktörde serumsuz ortamda 4L’de üretime geçilmeden önce %10 FCS içeren DMEM Ham’s F/12 besi ortamı içerisinde ölçek büyütme sırasında reaktör koşulları.....	73
4.21 5A8 hibridoma klonunun serum içermeyen ortamda (SFM) STR’de kültürü sırasında takip edilen parametreler.....	73
4.22 5A8 hibridoma klonunun stasyonier fazda üreme parametreler.....	75
4.23 5A8 hibridoma kültürünün %10 (v/v) serum içeren ortamda karıştırılmalı tank biyoreaktörde ölçek büyütme işleminin sırasında belirlenen parametreler.....	76

**ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)**

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.24	5A8 hibridoma kültürünün %10 (v/v) serumlu ortamda karıştırmalı tank biyoreaktörde kültürü sırasında belirlenen parametreler .....77
4.25	Kontrol 1 grubundan elde edilen sonuçlar .....78
4.26	Kontrol 2 grubundan elde edilen sonuçlar .....79
4.27	SMR ile üretim sırasında takip edilen parametreler .....79
4.28	MHR ile üretim sırasında takip edilen parametreler .....80
5.1	Üretim sistemlerinin maliyet analizi .....93

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
$^{\circ}C$	Santigrad derece
$v$	Sparger'daki gaz hızı (m/s)
$\eta$	Kolmogorov uzunluğu göstergesi
$\epsilon$	Kinetimatik vizkozite
$D$	Çap
$P$	Verimlilik
$h$	Saat
$c$	Hücre konsantrasyonu
$c_0$	Başlangıç hücre konsantrasyonu
$c_{max}$	En yüksek hücre konsantrasyonu
$c_1$	Başlangıç hücre konsantrasyonu (hüc/ml)
$c_2$	Pasajlama sonrası hücre konsantrasyonu (hüc/ml)
$pH_1$	Besi ortamı değişimi öncesi pH değeri
$pH_2$	Besi ortamı değişimi sonrası pH değeri
$\sim$	Yaklaşık

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)**

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
Ag	Gümüş
AgCl	Gümüş klorür
ATP	Adenozin trifosfat
cm <sup>2</sup>	Santimetre kare
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
dak	dakika
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol floresan boya
dCO <sub>2</sub>	Çözünmüş karbondioksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DO	Çözünmüş oksijen
DF	Diafiltrasyon
DŞ	Döner şişe
ELISA	Enzim ilintili immün test
FCS	Fötal sığır serumu
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
GF-SP	Spargerden yapılan havalandırma hızı (L/dak)
GMP	İyi üretim uygulamaları

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)**

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
HEPES	[N-2-hidroksietilpiperazin-N]etansülfonik asit
HIC	Hidrofobik interaksiyon kromatografisi
IMAC	Immobilize metal affinite kromatografisi
K	Potasyum
KCl	Potasyum klorür
L	Litre
M	Monolayer kültür
MAb	Monoklonal antikor
Max	En yüksek
MHR	Membran havalandırılmalı bioreaktör
Min	En düşük
ml	mililitre
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotid (indirgenmiş)
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotid
NaHCO <sub>3</sub>	Sodyum bikarbonat
PBS	Fosfat tamponlu tuz solüsyon

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)**

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
PEET	Polietereterketon
PEG	Polietilen glikol
PI	<i>Proportional-Integral</i>
PID	<i>Proportional-Integral-Derivative</i>
Rph	Saatteki dönüş sayısı
ROS	Reaktif oksijen türleri
RTD	Sıcaklık ölçüm cihazı
S	Süspanse kültür
SEC	Size-exclusion kromatografisi
SFM	Serum içermeyen ortam
SMR	Statik membran biyoreaktör
STR	Karıştırmalı tank biyoreaktör
rpm	Bir dakikadaki dönüş sayısı
TCA	Trikarboksilik asit
VSCEL	<i>Vertical cavity surface-emitting laser</i>
vvm	Bir dakikada reaktör hacmi başına verilen hava hacmi
vvh	Bir saatte reaktör hacmi başına verilen hava hacmi

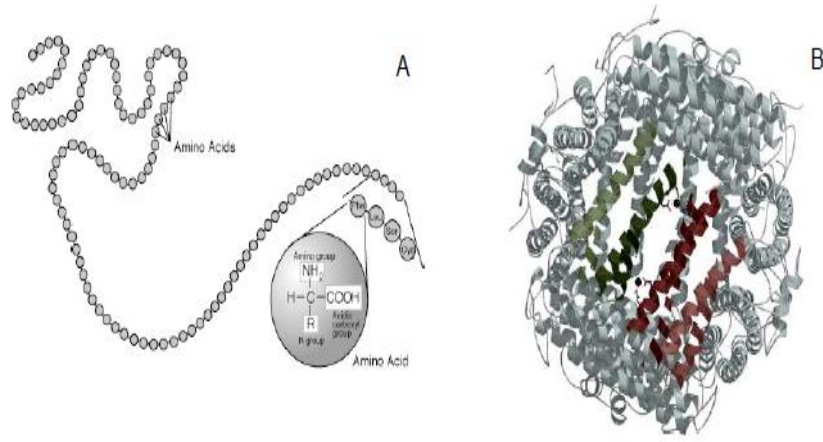
UF Ultrafiltrasyon

Y.H. Yüzey havalandırma

## 1. GİRİŞ

Farmasötik endüstrisinde, aktif farmasötik maddelerin üretilmesi için farklı prosesler kullanılmaktadır. Bu prosesler, kimyasal sentez, enzimatik dönüşüm ve bakteri, küf, maya gibi (rekombinant) mikroorganizmalar ve memeli hücrelerinin kullanımı ile yapılmaktadır (Dalm, 2007).

Aktif farmasötik madde olarak proteinler genellikle mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir. Proteinler birincil yapı olarak birbirine bağlanmış aminoasit zincirlerinden oluşmaktadır (Şekil 1.1A) (Dalm, 2007).



Şekil 1.1 Protein yapısı. (A) Amino asit iskeleti (B) Üç boyutlu yapısı (Dalm, 2007).

Ancak, insan vücudunda proteinlerin fonksiyonel olabilmesi için yalnızca aminoasit sekansları değil, bunun yanında proteinin üç boyutlu yapısı da oldukça önemlidir (Şekil 1.1B). Proteinlerin doğru kompleks yapıları için aminoasit sekanslarının yanında şeker, karboksi, metil ve fosfat grupları gibi protein olmayan yan grupların da protein zincirine bağlanması gerekmektedir. Protein olmayan yan grupların proteinlere eklenmesine posttranslasyonel modifikasyon denir. En önemli ve kompleks posttranslasyonel modifikasyon glikolizasyon olarak adlandırılan şeker gruplarının aminoasit zincirine eklenmesidir. Mayalar ve küfler proteinleri bölgesel olarak, bakteriler ise hiçbir proteini glikolize edemezken, memeli hücrelerindeki tüm ekspresyon sistemleri insanlara uygun olarak proteinleri glikolize edebilmektedir (Dalm, 2007; Coradin et al., 2003). Bu nedenle, hayvan hücreleri rekombinant yada doğal, viral aşı, monoklonal antikor (MAb), enzim, büyüme faktörü, hormon, interferonlar (Eibl, 2009) ve kan pıhtılaşma faktörü gibi kompleks biyoaktif maddelerin üretimi ve salgılanmasına



olanak sağlamakta ve pek çok kompleks molekül yalnızca hayvan hücreleri ile üretilmektedir (Coradin et al., 2003).

Bazı proteinler intrasellüler olarak üretilirler ve dolayısıyla hücre içinde birikirler. Ancak, pek çok protein glikolizasyon sonrası ortama salgılanır. Aktif farmasötik ajanların üretimi için bakteri ve maya kullanılarak yapılan üretimler ile memeli hücre kültürleri ile yapılan üretimler karşılaştırıldığında, memeli hücrelerinin kültüvasyonun çok daha kompleks, pahalı ve zaman alıcı bir süreç olduğu bilinmektedir (Dalm, 2007). Mikrobiyal kültürlerin ve hayvan hücre kültürlerinin kültür karakteristikleri Çizelge 1.1’de verilmiştir. Memeli hücreleri düşük büyüme hızına ve spesifik verimliliğe sahiptir. Dolayısıyla, uzun prosesler sonunda düşük ürün derişimi elde edilir ve kültürü özellikle bakteriyel kontaminasyonlara açık hale getirir. Ayrıca, memeli hücrelerinin kompleks besin ihtiyacı vardır, bu nedenle kültüvasyon için kullanılan dengeli besi ortamının maliyeti yüksektir ve bu da hayvan hücre kültürlerinde karşılaşılan bir başka problemdir (Dalm, 2007; Coradin et al., 2003). Bunların yanında, hayvan hücreleri, bakteri ve maya hücrelerine göre kültür koşullarına karşı oldukça hassastır ve kültür parametrelerinin değişiminin (örn., pH, sıcaklık, oksijen derişimi) düşük aralıklarda tutulması gerekmektedir ve bunun için de kompleks ve ileri teknolojide kontrol sistemlerine ihtiyaç duyulur (Dalm, 2007; Eibl, 2009). Tüm bunlardan dolayı, memeli hayvan hücrelerinin ölçek büyütme işlemleri sırasında bir takım sorunlar ortaya çıkar (Coradin et al., 2003). Sonuç olarak, yüksek hücre yoğunluklu kültürlerin sürdürülmesi karıştırma ve havalandırma sonucu ortaya çıkan mekanik etki ve gerilim kuvvetleri etkisi ile sınırlanmaktadır. Bunun sonucunda da spesifik verimlilik ve ulaşılan maksimum hücre yoğunluğu daima düşük olmaktadır (sırasıyla, 1–10 pg/hücre/saat ve  $1-5 \times 10^6$  hücre/ml). Bu durumdan dolayı, verimliliğin artırılması için kültür içindeki hücre yoğunluğunun yüksek tutulduğu hücre tutma sistemleri ve/veya perfüzyon kültürler kullanılabilir (Sinacore et al., 1989).

Hayvan hücre kültürlerinde birim verimliliğin artırılması ve böylelikle bu hücrelerden elde edilen ürünlerin fiyatlarının azaltılması günümüzde oldukça önemli bir konudur. Çünkü hayvan hücrelerinin kullanımıyla elde edilen ürünlerin verimlilikleri daha düşüktür ve dolayısıyla son ürünün klinik uygulamasında gereken miktarın elde edilmesi için çok fazla ortam kullanımına ihtiyaç duyulmaktadır (Chu and Robinson, 2003).

**Çizelge 1.1:** Mikrobiyal kültürlerin ve hayvan hücre kültürlerinin karakteristikleri (Eibl, 2009).

<b>Karakteristik</b>	<b>Mikrobiyal Kültür</b>	<b>Memeli Hücre Kültürleri</b>
<b>Büyükölük</b>	2-10 µm	10-30 µm
<b>Bireyel hücreler</b>	Sıklıkla	Bazen yüzeye tutunma
<b>İnokulasyon yoğunlukları</b>	Düşük	Yüksek (%5-10)
<b>Büyüme hızları</b>	Hızlı (td=1-2h)	Yavaş (td=20-50h)
<b>Kayma gerilimine duyarlılık</b>	Düşük	Yüksek
<b>Stabilite</b>	Stabil	Unstabil
<b>Ürün akümülasyonu</b>	Intra/ekstra selüler	Genelde ekstraselüler
<b>Kültür Ortamı*</b>	Genellikle basit	Kompleks
<b>Sıcaklık</b>	26 <sup>0</sup> -36 <sup>0</sup> C	29 <sup>0</sup> -37 <sup>0</sup> C
<b>Havalandırma*</b>	Genellikle yüksek (1-2 vvm)	Düşük (≈0.1 vvm)
<b>Köpük oluşumu*</b>	Genellikle fazla	Bazen köpüklenme
<b>pH-değeri</b>	3-8	7.0-7.4
<b>Hücre yoğunluğu</b>	Çok yüksek	Düşük-orta
<b>Ölçek büyütme</b>	Kolay	Zor

Geçen 30 yıl boyunca spesifik antijenleri tanıma ve onlara bağlanma özelliği çok iyi olan MAb'lar standart bağlama proteini olarak araştırma, tanı ve tedavi gibi pek çok uygulamada kullanılmaya başlanmıştır. İhtiyaç duyulan MAb miktarı, maliyet, geri dönüş süresi ve yasal düzenlemelere uygunluk MAb'ın

üretim amacına bağlı olarak değişen önemli faktörlerdir. Özellikle MAb'ların terapötik uygulamaları için çok fazla miktarlarına ihtiyaç vardır ancak, MAb'nin bulunabilirliği bu uygulamaları kısıtlamaktadır (Ward et al., 1999).

Ölçek büyütme kolaylığı ve potansiyeli daha yüksek olduğu için, günümüzde büyük ölçekli üretimlerde genellikle karıştırmalı tank biyoreaktörler kullanılmaktadır. Bundan dolayı da bu çalışmada, kontrol edilebilirliği, işletim kolaylığı gibi nedenlerle orta büyüklükteki MAb üretimi için karıştırmalı tank biyoreaktör tercih edilmiştir. Süspanse kültürde kullanılan ortamın biyoreaktöre besleme stratejisinin ve ortam koşullarının optimize edilmesiyle, biyoreaktörün çalışma modunun ayarlanması ve işletim parametrelerinin iyi belirlenmesi ile yüksek hücre ve MAb derişimine ulaşılması hedeflenmiştir.

## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

### 2.1 Hibridoma Teknolojisi, Monoklonal Antikor Üretimi ve Önemi

Monoklonal antikorlar, tek bir antijenik determinanta (epitopa) spesifiktirler (Peters, 1992). Hemen hemen bütün fare yada sıçan orijinli MAb'lar, viral yada bakteri antijenlerine, tümör-spesifik ve tümöre bağlı transplantasyon antijenine, lökosit farklılaşması antijenine, bir toksine vb. karşı üretilebilmektedir (Spier et al., 1990). MAb, başta hastalıkların tanı ve tedavisi olmak üzere biyomedikal araştırmalarda kullanılan önemli ajanlardır. Bu antikorlar, çalışılacak konunun etkeni ile immunize edilmiş hayvanlardan elde edilen klon yada hücre hatlarından üretilmektedir. Bu hücre hatları bağışıklanmış hayvanların B lenfosit hücrelerinin miyeloma hücreleri ile birleştirilmesi ile oluşturulmaktadır (Köhler ve Milstein 1975). Protein, karbonhidrat ve nükleik asitlerin tanımlanmasında giderek artan kullanımları için yapılan çalışmalar devam etmektedir. Günümüzde tanı ve tedavi amacıyla gebelik tanısında, birçok patojenik mikroorganizmanın belirlenmesinde, ilaçların kandaki seviyesinin ölçümünde, doku uyuşmasının incelenmesinde ve bazı tümör dokuları tarafından salgılanan antijenlerin belirlenmesinde kullanılan birçok MAb bulunmaktadır (Kontoravdi, 2007; Ward et al., 1999).

Antikor üreten *B lenfositler*, genellikle hücre kültüründe (*in vitro*) birkaç hafta içerisinde ölürlür. Bu nedenle, antikor üreten B lenfositler, hücre kültüründe uzun süre yaşamak üzere modifiye edilmelidirler. Sonsuza kadar üreme yeteneğinde olan hücre olarak tümör hücresi kullanılabilir. Fakat bu tümör hücresinin lenfositlerle homolog olması gereklidir. Bu nedenle, lenfosit tümörü yani *miyeloma* kullanılır. Antikor üreten B lenfositlerin ve sonsuz üreme yeteneğinde olan miyeloma hücrelerinin füzyonu gerçekleştirilir. B hücre ve miyeloma füzyonu sonucu oluşan ölümsüz hücre hatları hibrit özelliktedir ve *hibridoma* adını alırlar. Hibridoma hücre hatları her iki füzyon eşinin özelliklerini de taşır. *In vitro* 'da sonsuza kadar üreme ve antikor oluşturma yeteneğindedirler (Ward et al., 1999).

MAb üreten hücrelerin elde edilmesi için genellikle fare kullanılmaktadır. Bir fare dalağından yaklaşık olarak  $1 \times 10^8$  hücre (B lenfositler) elde edilir ve hibridoma teknolojisinde füzyon için yeterlidir. Kültüre füzyon öncesi, bu hücrelerle beraber miyelomaların da eklenmesi gerekir. Klasik yöntemlerde, bir

miyeloma için 10 veya 100 lenfosit gereklidir. Bu nedenle, ortama  $1 \times 10^6$  veya  $1 \times 10^7$  miyeloma konulur (Ward et al., 1999).

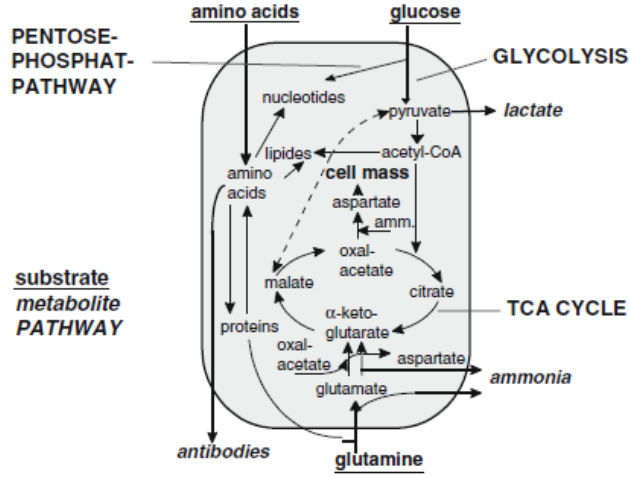
FDA (*Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi*) şu ana kadar 13 MAb nin klinik olarak kullanımını onaylamıştır. Bunlardan 2 tanesi “asites” (*in vivo*) metodu ile üretilmiştir. FDA’ ya yapılan pek çok yeni ilaç başvurusu MAb’ nin *in vitro* yöntem ile üretilmesine dayanmaktadır. FDA, Avrupa’ da: Almanya, Hollanda, İsveç, İsviçre ve İngiltere’de fare kullanımı sınırlanmıştır. Bu nedenle, günümüzde, büyük miktarlarda MAb, biyoreaktörlerde üretilmektedir (Farid, 2006).

## 2.2 Memeli Hücrelerinin Metabolizması

Hücre kültürü proseslerinin optimizasyonu için hücrelerin metabolik yol izleri hakkında temel bilgilere sahip olunması gerekmektedir. Memeli hücrelerinin metabolik yol izleri oldukça karmaşık ve değişkendir. Bunun yanında *in vitro* koşullarda memeli hücrelerinin metabolik yolları önemli şekilde değişmekte ve büyük oranda kontrolü bozulmaktadır (Gódia and Cairó 2006). Bu durum, temel karbon, azot ve enerji kaynağı olan glikoz ve glutaminin yüksek ve yetersiz tüketimi ve buna bağlı olarak laktat, amonyak ve bazı aminoasitler (alanin, glutamik asit vb.) gibi toksik metabolitlerin birikimi ile karakterizedir. Hücre metabolizmasının basitleştirilmiş şematik gösterimi Şekil 2.1’de verilmiştir. Memeli hücrelerinin metabolik yol izleri şunlardan oluşur (Eibl et. al., 2009):

- Glikolizis
- Pentoz fosfat yolağı
- Trikarboksilik asit (TCA) döngüsü
- Oksidatif fosforilasyon
- Glutaminolizis
- Diğer amino asitlerin metabolizması.

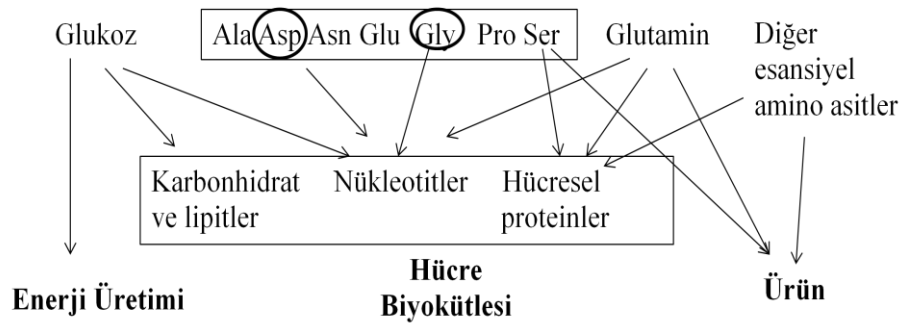
Memeli hücre metabolizmasının karmaşıklığı ve özellikle metabolizma kontrolünün bozulması hücrelerin ihtiyaç duyduğundan daha fazla özgül substrat tüketim hızlarına ulaşmasına neden olmaktadır. Bu durum hücrelerin kültürdeki performansını sınırlamaktadır. Metabolik kontrolün bozulmasını azaltmak için metabolizma mühendisliği, ortamların yeniden tanımlanması ve dengelenmesi ve optimize edilmiş biyoproses mühendisliği tasarımları gerekmektedir (Gódia and Cairó 2006).



Şekil 2.1 Hibridoma hücrelerinin metabolik yol izi (Eibl et. al., 2009).

### 2.2.1 Karbon ve enerji kaynağı olarak glukoz, glutamin ve aminoasitler

Kültüre edilen hücreler enerji gereksinimlerini glukoz ve glutamin katabolizması ile sağlarlar (Enfors and Häggström, 2000). Lösin, izolösin ve lisin gibi bazı dallanmış zincirli aminoasitlerin de bazı durumlarda enerji üretimine katıldıkları bildirilmiştir (Xie and Wang, 1994) (Şekil 2.2). Glukoz ve glutamin enerji metabolizması laktat, alanin ve amonyum iyonları gibi atık ürünlerin oluşumuna neden olmaktadır. Bu atık ürünler, üreme ve ürün oluşumu sınırlayıcısı ve ölüm indükleyici faktörlerdir (Enfors and Häggström, 2000; Ozturk et.al., 1992).



Şekil 2.2 Biyokütle ve ürün sentezinin şematik gösterimi (Xie and Wang, 1994).

Hücre kültürü ortamlarındaki glukoz derişimi 10-25 mmol/L dolaylarındadır (Gódia and Cairó 2006). Glukoz, glikolizis ile hücre sitoplâzmasında metabolize edilir ve değişken olmakla birlikte önemli bir kısmı (1.1-1.7 mol laktat/mol

glukoz) aerobik koşullar altında laktata dönüşür. Oksijenin limitli olduğu anaerobik koşullarda ise 1 mol glikoz 2 mol laktata dönüşür ve 2 ATP/glikoz oluşturulur. Glikolizis sonunda oluşan piruvat oksidatif olarak asetil-CoA'a dekarbonize olmaktadır ve TCA döngüsü ve solunum zinciri ile su ve CO<sub>2</sub>'e transforme olmaktadır. Bu yoluzi ile 1 mol glikozdan 36 mol ATP oluşmaktadır. Diğer önemli yolak ise nükleotitlerin oluşturulduğu pentoz-fosfat yolağıdır. Bu yolakta glukoz tüketim yüzdesi %15-27 arasında değişirken bazı zamanlarda oldukça düşük (%4-8) oranlarda da olabilmektedir. (Enfors and Häggström, 2000; Eibl et. al., 2009; Gódia and Cairó 2006; Legazpi et al., 2005).

1-5 mmol/L derişimlerinde kültür ortamında yer alan glutamin ise, pürin, primidin, amino şekerler ve asparajin sentezinde önemli rol oynayan bir prekürsördür (Eibl et. al., 2009). Glutamin metabolizması glutaminolizis olarak adlandırılmaktadır (Enfors and Häggström, 2000). Glutamin, glutamat ve aspartat enzimleri ile yada TCA döngüsü sırasında metabolize edilir. 1 mol glutaminin CO<sub>2</sub>'e tamamen oksidasyonu ile 21 mol ATP oluşurken; aspartat'a oksidasyonu ile 12 mol ATP; laktat oluşumunda ise 6 mol ATP oluşmaktadır. Glutamin dönüşümü sırasında oluşan ana metabolit ise amonyaktır. 1 mol glutamin yaklaşık 0.7 mol amonyak oluşturmaktadır (Enfors and Häggström, 2000; Eibl et. al., 2009; Legazpi et al., 2005).

Aminoasitler ise 0.1-0.2 mmol/L aralığında değişen derişimlerde besi ortamı içerisinde bulunur ve temelde protein sentezinde kullanılırlar. Arjinin, aspartat, sistein, histidin, izolösin, lösin, lisin, metionin, fenil alanin, prolin, serin, threonin, triptofan, tirozin ve valin aminoasitleri tamamiyle tüketilebilirirken, alanin, glisin ve glutamik asit aminoasitleri kısmi olarak üretilmektedir (Eibl et. al., 2009).

Kültür ortamı içerisindeki hücreye spesifik substrat tüketim hızlarının gerçek değerleri hücre tipine, hücrelerin durumuna ve ortamdaki substrat derişimine bağılı olarak değişmektedir.

## **2.2.2 Laktik asit ve amonyakın etkisi**

Hayvan hücre kültürü prosesindeki engellerden biri de hücre büyümesi, metabolizması ve ürün oluşumunu etkileyen laktat ve amonyak/amonyum etkisidir (Enfors and Häggström, 2000). Laktat temel olarak glukoz metabolizması sonucu üretilirken, çok az miktarlarda glutamin metabolizması ile de üretilmektedir. Amonyak ise, glutamin metabolizmasının major inhibitör atık

ürünüdür. Glutaminin kimyasal dekompozisyonu ve glutaminin glutamata metabolik deaminasyonu yada glutamatın  $\alpha$ -ketoglutarata dönüşümü ile ortama salınmaktadır (Ozturk et.al., 1992). Bu iki metabolitten laktat, daha az inhibitör etkisi gösterirken; amonyak ve amonyum iyonları 2 mM gibi çok düşük derişimlerde dahi inhibitör etkisi gösterebilmekte ve duyarlı hücrelere toksik olabilmektedir (Enfors and Häggström, 2000).

Hücre kültürlerindeki amonyak derişimi reaktör çalışma modu, hücre ve glutamin derişimi ve hüresel aktiviteye bağlıdır. Kesikli kültürlerde 2-5 mM amonyak bulunmaktadır, glutaminin reaktöre sürekli olarak eklendiği glutamin kısıtlı yarı kesikli kültürde ise daha fazla amonyak birikimi olmaktadır.

Hücre kültürü ortamlarındaki laktat konsantasyonu, glukoz derişimi, hüresel aktivite ve biyoreaktörün çalıştırılmasına bağlıdır. Kesikli kültürlerde laktatın final derişimi 35 mM'dan (3.15 g/L) fazladır. Laktatın, pH kontrolü olmayan sistemlerde, hücre büyümesini ortam asidifikasyonuna bağlı olarak inhibe ettiği bildirilmektedir. Hatta sabit pH değerinde bile hücre büyümesinin sınırlandırıldığı bildirilmektedir (Ozturk et.al., 1992). Hayvan hücrelerindeki laktat inhibisyonu mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber, laktat derişimi belirli değere ulaştığında glukoz artık kullanılmamaktadır. Buna bağlı olarak laktat inhibisyonunun nedenlerinden biri laktat dehidrogenaz reaksiyonunun ( $\text{NADH} + \text{piruvat} \rightarrow \text{NAD} + \text{laktat}$ ) hücre içi ortamdaki piruvat ve NADH derişimi ile dengeye gelmesi ve bu nedenle hücrelerin tekrar NADH oluşturması ve/veya TCA döngüsündeki piruvat'ı metabolize edememesi olabilmektedir. Laktat inhibisyonunun diğer nedenleri ise intraselüler asidifikasyon ve bazı enzimlerin inhibisyonudur (Enfors and Häggström, 2000).

### 2.3 Monoklonal Antikor Üretim Teknolojileri

Monoklonal antikorların üretimi *in vivo*, *in vitro* yada bu iki prosedürün kombinasyonu olan bir prosedür ile gerçekleştirilebilmektedir. Antikorlar hangi şekilde üretilirlerse üretilsinler onları üretecek hibridomaya ihtiyaç vardır. Genel olarak MAb; *in vitro*' da hibridomanın büyümesini destekleyen ortam içerisinde, *in vivo*' da hibridoma inokülasyonu yapılmış farelerin karın boşluğunda bulunan asitik sıvıda (karın boşluğunda toplanan sıvı) bulunur (Ward et al., 1999).

MAB üretiminde orijinal olarak murin hibridoma hücreleri kullanılmaktadır. Törepatik mürin antikorlar 1980 yılından bu yana ticari olarak bulunmaktadır



ancak immunojenik reaksiyonlara neden oldukları ve vücuttan hızlıca atıldıkları için istenilen başarıya ulaşılamamıştır. Antikorların etkinliğini artırmak için iki farklı strateji girişimi vardır; bunlardan biri murin MAb'ların Fc kısımlarının insan Fc'si ile değiştirildiği kimerik MAb üretimi diğeri ise tamamiyle insan MAb'ı üretimidir (Jain and Kumar, 2008).

Son on yılda pek çok glikolize edilmiş protein ilaç olarak kullanılmaya başlanmış ve kullanımı öncesinde klinik olarak denenmiştir. Sonuç olarak, memeli hücreleri ile potansiyel aktif farmösitik maddelerin üretimi artmıştır. Bu maddelerin büyük çoğunluğunu onkoloji (Werner, 2004) ve immünoloji (Weinberg et al., 2005) alanında kullanılan antikorlar oluşturmaktadır. MAb'ların işlevsel olabilmesi için genellikle yüksek dozlarda (0.1-1 g/uygulama) ve buna bağlı olarak fazla miktarda MAb' a ihtiyaç vardır. Bu ihtiyaçı karşılamak için ölçek ve hacimsel verimliliğin artışına gerek duyulmaktadır (Dalm, 2007; Petrides, 2000).

MAb' nin küçük bir kısmı (0,1 g'dan azı) araştırma çalışmaları için, daha fazlası (0,1–1 g) tanı kitleri ve ajanları üretiminde ve yeni MAb' nin hayvanlar üzerindeki etkisini test etmede kullanılmaktadır. "Büyük ölçekli MAb üretimi" kavramı 1 g'dan fazla olan üretimleri tanımlanmaktadır. Bu büyük miktarlar rutin tanı ve tedavi amaçlı işlemler için kullanılmaktadır (Ward et al., 1999). Üretilen MAb miktarı arttıkça, üretilen birim ürün başına sabit masraf azalacağından, *in vitro* üretim teknolojisi daha ekonomik hale gelir. Böylelikle büyük ölçekli üretimlerde maliyet azaltılmaktadır. *In vitro* üretim maliyeti; en iyi büyüme özelliği gösteren alt klonun seçilmesine, MAb üretim karakteristiğine, ortamın serum içeriğine bağlı olarak değişir. Küçük ölçekli üretimlerde *in vitro* metotların üretim maliyetleri; seçilen hücre hattına bağlı olarak, *in vivo* metodun üretim maliyetinin kabaca ½ si ile 6 katı arasında değişir. Büyük ölçekte üretimde *in vitro* sistemler; hayvan kullanımının azaltılması, daha ekonomik olması, serumsuz ortamlar kullanılması halinde yabancı antijen kontaminasyonlarının azalması nedeniyle tercih edilir. MAb üretim süresi kritik olduğunda ve küçük miktarda ürüne ihtiyaç duyulduğunda ise *in vivo* üretimin sadece altı hafta sürmesi nedeniyle *in vivo* üretim tercih edilir. *In vitro* sistemlerde üretim için gereken zaman çok değişkendir. Üretim süresi; hibridomanın kullanılan sisteme adaptasyonu için geçen zamana ve üretilecek MAb miktarına bağlı olarak değişmektedir (McArdle 1997; McArdle 1998).

### 2.3.1 Proses optimizasyonu, tasarım ve işletme parametreleri

*In vitro* hücre kültürü teknikleri protein, antikor, aşular gibi pek çok töröpötik maddelerin üretiminde anahtar rol oynamaktadır. Biyoreaktörler, hücre kültür çalışmalarının kontrollü koşullar altında yapılabildiği sistemlerdir ve düzenli olarak izlenebilmektedirler (Jain and Kumar, 2008). Biyoreaktörlerin tasarımı ile ilgili alan düzenli olarak gelişmektedir. Reaktörlerde yüksek hücre konsantrasyonlarına erişilebilmesi, monoklonal antikor gibi değerleri ürünlerin verimliliklerinin artırılması için pek çok yeni tasarımlar ve modifikasyonlar yapılmaktadır. Uygun bir biyoreaktör tasarımı, hücelere nutrient temini ve toksik metabolitlerin ortamdan uzaklaştırılması için yeterli kütle transferi, yeterli oksijen sağlanması, düşük kayma gerilimi etkisi ve immobilize kültür sistemleri yada yüzeye bağımlı hücreler için yüksek yüzey/hacim oranını mümkün kılmalıdır (Glacken et al., 1983).

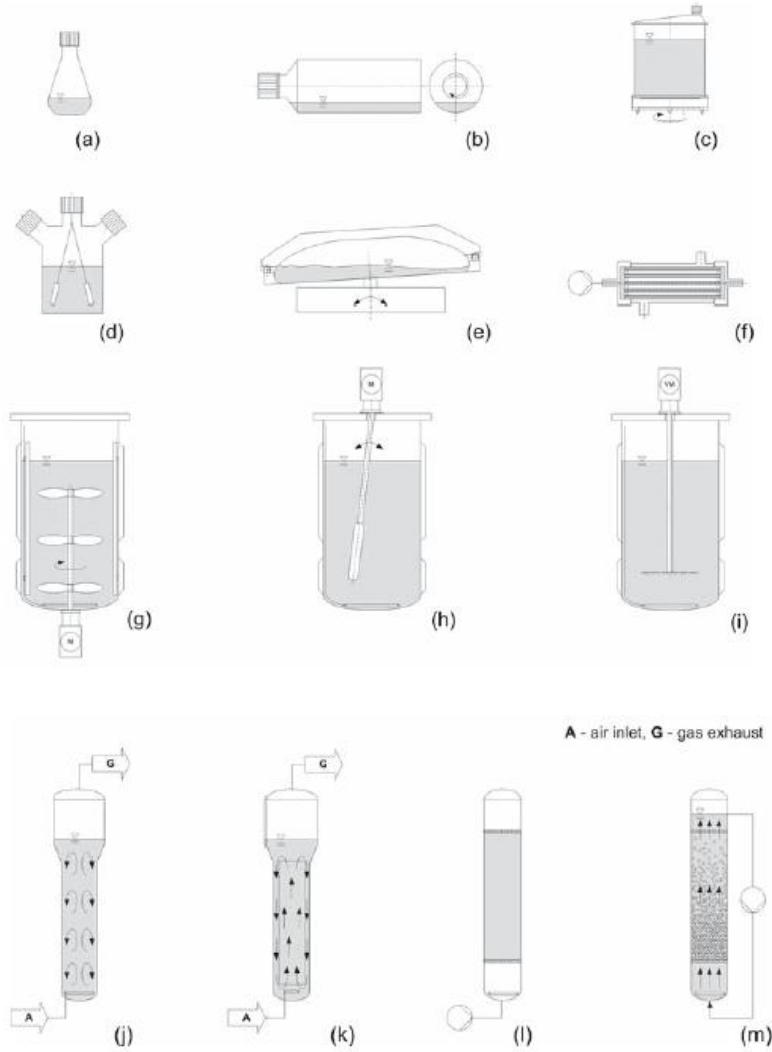
Verimliliğin ve ürün kalitesinin artırılması, ölçek büyütme sırasında karbondioksit birikiminin kontrolü gibi proses kontrol sistemlerinin geliştirilmesi, kontrol sistemindeki çöktürlara bağılı olarak prosesin optimizasyonu ve uygulamalar sırasında kontaminasyon riskinin azaltılması da hücre kültürü çalışmalarında dikkat edilmesi gereken diğler önemli unsurlardır.

#### 2.3.1.1 Monoklonal antikor üretiminde biyoreaktör tasarımı

Memeli hücre kültürlerinde pilot ve endüstriyel ölçekte kullanılan farklı biyoreaktör türleri vardır (Şekil 2.3 ve Şekil 2.5). Bunlar, karıştırmalı tank biyoreaktörler, hava kaldırmalı biyoreaktörler, tek kullanımlık biyoreaktörler, immobilize kültür biyoreaktörleri, yüksek hücre yoğunluklu kültür sistemleri ve döner hücre kültür sistemleridir (Jain and Kumar, 2008). Tüm bu sistemler farklı uygulamalar için kendine özgü avantaj ve dezavantajlara sahiptir. Biyoreaktörler, hücre büyümesi ve ürün oluşumu için devam ettirilebilir koşullarda uygun içeriğe sahip olmalıdırlar. Bir hücre kültürü reaktörünün sahip olması istenen özellikleri aşağıdaki gibi özetlenebilir (Eibl et.al., 2009):

- Hücre- hücre iletişimini sağlamalı,
- Homojen ve düşük kayma gerilimli karıştırma ve havalandırmayı sağlamalı ,
- Isı transferi için yeterli türbilans oluşmalı,
- Hava ve gazların yeterli dağılımı olmalı,

- Substrat ayrışımından kaçınılmalı,
- Proses değişkenleri ve anahtar parametreler ölçülebilmeli,
- Ölçek büyütülebilmeli,
- Uzun süreli stabilite ve sterilite sağlamalı,
- Kullanımı kolay olmalı,
- Bakımı ve işletmesi kolay olmalı.



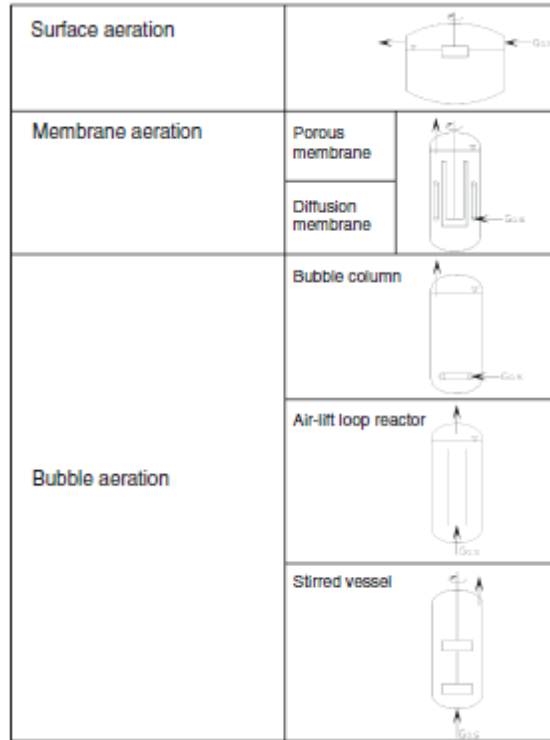
**Şekil 2.3** Hücre kültüründe kullanılan dinamik biyoreaktörlerin şematik gösterimi: (a) Shake flasklar, (b) Döner şişeler, (c) Dönen membran flask biyoreaktörler (Miniperm), (d) Spinner flasklar, (e) Dalga hareketi yapan sallamalı torba biyoreaktörler, (f) Hollow fiber biyoreaktörler, (g) Karıştırma biyoreaktörler, (h) Eksentrik hareket ile karıştırma yapılan biyoreaktörler, (i) Vibroreaktör, (j) Kabarcık kolon reaktör, (k) Hava kaldırmalı biyoreaktör, (l) Dolgulu kolon biyoreaktör, (m) Akışkanlaştırılmış yatak biyoreaktör (Eibl et. al., 2009).

Hayvan hücre kültüründe kullanılan farklı proseslerin avantaj ve dezavantajları Çizelge 2.1’de verilmiştir.

**Çizelge 2.1** Farklı proseslerin avantaj ve dezavantajları (Kretzmer 2002).

Proses tipi	Avantaj	Dezavantaj
<b>Küçük birim (küçük flasklar, döner şişeler, spinner flasklar, hollow fiber)</b>	Kullanımı kolay, laboratuvar ölçeğinden üretime ölçek büyütme ihtiyacı duyulmadan geçilir	Pek çok birim olduğu için zaman alıcıdır, proses görüntülemesi yapılamamaktadır, homojen olmayan sistemlerdir
<b>Kesikli reaktör, Kesikli-beslemeli reaktör</b>	Homojen, ölçek büyütmesi kolay, kısmen kontrol edilebilir, tükenen nutrientler yenilenebilir, pek çok ürün için kullanılabilir	Üretim boyunca farklılıklar, toksik metabolit birikimi, kültür boyunca canlılığın düşüşü görülür
<b>Perfüzyon reaktör</b>	Yüksek hücre yoğunluğuna ulaşılır, kontrol edilebilir, kültür ortamı ayarlanabilir, gerçek yatışkın durum vardır, küçük ölçeklidir	Uzun ve karmaşık bir validasyon prosedürü, prosesle oynamaya pek izin vermez, üretim tek bir ürün için yapılabilir.

Hayvan hücre kültürlerinde ortam, yüzey havalandırma, direkt havalandırma (ortama püskürtme), indirekt ve/veya membran havalandırma (difüzyon), ortam perfüzyonu, kısmi oksijen basıncının artırılması ve atmosfer basıncının artırılması gibi sistemlerinin birini ya da kombinasyonlarını kullanarak havalandırılabilir (Şekil 2.4) (Griffith, 2000; Eibl et al., 2009).



**Şekil 2.4** Hayvan hücre kültürlerinde kullanılan oksijen sağlama sistemleri (Eibl et al., 2009).

Yüzey havalandırmada, kütle transferi sıvı yüzeyinden gerçekleşir. Kütle transfer hızı etkili bir ara yüzey alanı oluşturulmalı ve ara yüzeyde ya da sıvı yüzeyine yakın bir konuma ikinci bir karıştırıcı yerleştirilmelidir. Ancak yüzey

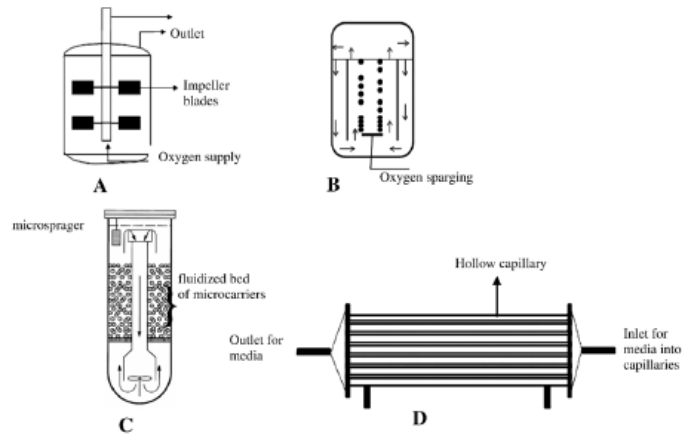
havalandırma sadece düşük yoğunluktaki hücre kültürleri ve küçük reaktörler için yeterli oksijen sağlayabilir (Eibl et al., 2009).

Direkt havalandırma ise, biyoreaktörlerde oksijen sağlayabilmek için kullanılan en yaygın ve en basit yoldur. Direkt havalandırma, kabarcıklar aracılığıyla büyük ara yüzeyler oluşturur ve yüksek oksijen transfer hızı sağlar. Direkt havalandırmanın dezavantajları, hücre hasarına ve kültürde köpük oluşumuna neden olmasıdır. Ancak pek çok hücre tipi kabarcık kolon, hava kaldırmalı veya havalandırmalı-karıştırmalı biyoreaktörlerde başarılı bir şekilde kültüre edilmiştir. Arayüzey alanı ( $a$ )  $k_{La}$  'ya etki etmektedir, dolayısıyla kabarcık boyutu küçüldükçe oksijen transfer hızı artmaktadır. Kabarcık boyutları genellikle, standart spargerlarda 4-6 mm aralığındadır ya da seramik gibi mikrospargerlarda 0.1-1 mm arasında değişmektedir. Aynı zamanda, kabarcık birleşmesi de bir başka göz önünde tutulması gereken durumdur. Sparger delikleri ya da porlarının etkisi düşük havalandırma hızlarında hücrelerin oksijenizasyonu için oldukça önemlidir. Havalandırma hızı arttırmak kabarcık birleşimine neden olduğu için havalandırma etkinliğinin ( $k_{La}/v$ ) azalmasına neden olur ve böylelikle gaz kabarcıklarından oluşan kayma geriliminin etkisini azaltmak için oksijen ile zenginleştirilmiş hava beslenmesi gerekmektedir. Özel seramik mikrospargerların kullanımı ya da gaz hızının artırılması ile homojen kabarcık boyutu ve ortam içerisinde kabarcıkların homojen dağılımı sağlanmaktadır. Bu sırada, lokal gaz tutumu azaldığı için kabarcık birleşmesi de azalmaktadır. Protein içeren ortamlarda arayüzeylerde protein olduğu için, özellikle küçük kabarcıklarda, kütle transferi engellenmektedir. Çünkü aynı zamanda köpük oluşumunda artış meydana gelmekte ve bu da kabarcık birleşimlerinin artmasına neden olmaktadır. Kütle transferi karıştırma ile arttırılabilir. Karıştırmalı reaktörlerde havakaldırılmalılara nazaran daha düşük hızlarda havalandırma yapılmalıdır. Büyük ölçekli hayvan hücresi biyoreaktörlerinde, kabarcık kolon reaktörler için gaz akış hızı 1 vvh ve havalandırmalı-karıştırmalı reaktörler için ise 0.1-0 vvh arasındadır. Bu düşük havalandırma hızları, köpük kırıcı ve kayma gerilimi koruyucu ajalarının kullanımını azaltmaktadır (Henzler and Kauling, 1993; Chisti, 2000; Varley and Birch, 1999; Doyle and Griffith, 1998, Eibl et al., 2009).

Hücre kültür ortamlarının kabarcık içermeyecek şekilde havalandırılması işlemi membran havalandırma olarak isimlendirilmektedir. Burada açık-porlu membranlar veya difüzyon membranları kullanılmaktadır. Membran havalandırmanın avantajları, hücreleri mikrosparger etkisiyle oluşan kayma gerilimine karşı koruması ve köpük oluşumunu engellemesidir. Ancak, prosesin

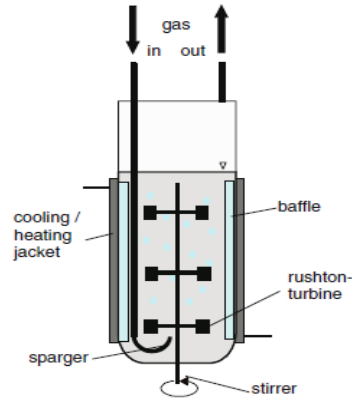
karmaşıklığı, limitli tasarım verilerinin olması, büyük membran alanına ihtiyaç duyulması ve bakımı / temizlenmesinin zor olması gibi birtakım dezavantajlara sahiptir (Henzler and Kauling, 1993; Czermak et al., 2005; Kretzmer, 2002).

*Karıştırmalı tank biyoreaktörler* kolay ölçek büyütülebilirliği, homojen sistemler olması, kontrol edilebilirliği ve oksijen sağlama ve kayma gerilimi sorunu gibi problemlerin pek çoğunun çözüldüğü bildirildiğinden pilot ve büyük ölçekli üretimlerde sıklıkla kullanılmaktadır (Chu and Robinson, 2001; Wang et al., 2005). Karıştırmalı tank biyoreaktörler (Şekil 2.6), tank, borular, vanaları pompalar ve motordan oluşmaktadır (Jain and Kumar, 2008).



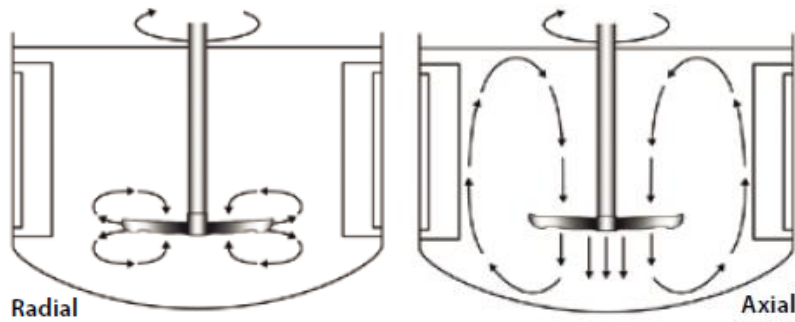
**Şekil 2.5** Monoklonal antikor üretiminde kullanılan bazı reaktörlerin şematik gösterimi: (A) Karıştırmalı tank biyoreaktör, (B) Internal draft tüp içeren hava kaldırmalı biyoreaktör, (C) Akışkanlaştırılmış yatak biyoreaktör, (D) Hollow fiber biyoreaktör. (Jain and Kumar, 2008).

Kültür ortamının uygun şekilde karıştırılması, hücrelerin, besinlerin, sıcaklığın ve pH gibi etkenlerin homojen şekilde dağılımı için oldukça önemlidir. Silindirik tank bir ya da daha fazla karıştırıcı içerebilir. Süspanse kültürlerde genellikle marin, pedal veya segmenli tipte ve aksiyel karıştırma sağlayan karıştırıcı tipleri mevcuttur (Şekil 2.7 ve Şekil 2.8). Ayrıca büyük impeller ( $D_{\text{impeller}}/D_{\text{tank}} \geq 0.5$ ), daha iyi homojenizasyon sağlarken bir yandan da hücre hasarını azaltmaktadır. Karıştırma hızı genellikle çalışma hacmine bağlı olarak 50-80 rpm arasında değişmektedir (Jain and Kumar, 2008; Eibl et al., 2009; Mirro and Voll, 2009). Ayrıca hücrelerdeki mekanik hasarı azaltmak ve daha homojen karıştırma sağlayabilmek için bıçaklar arası çap ve bıçak tipi değiştirilebilmektedir.

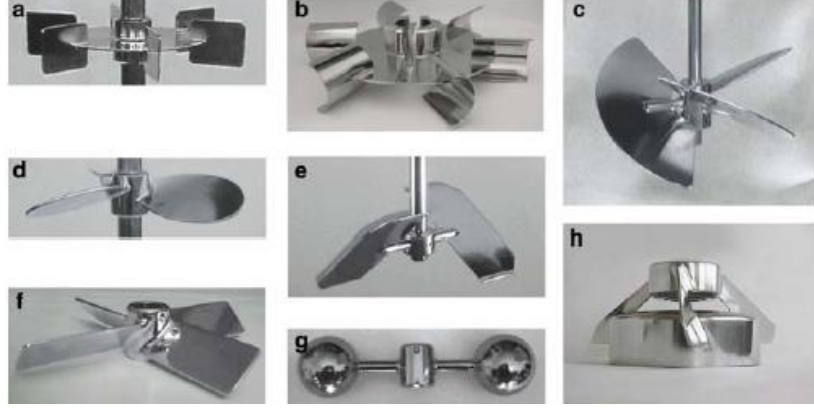


Şekil 2.6 Karıştırmalı tank biyoreaktörün şematik gösterimi (Eibl et. al., 2009).

Havalandırılmalı karıştırmalı reaktörlerde, tankın tabanına yakın konumda gaz kabarcıklarını sağlayan bir sparger bulunur. Vorteks oluşumunun engellenmesi ve karıştırma etkinliğinin artırılması için dört taneye kadar baffle konulabilir. Reaktörün ısıtılması ve soğutulması reaktör boyutuna göre değişmektedir. Spinner flask gibi çok küçük karıştırmalı tank reaktörler 37°C'de inkübatörlerde tutulurlar. Küçük ölçekli reaktörlerin ise, inkübatör dışında bir sıvı içerisinde bulunan elektriksiz ısıtıcı, tankın etrafını saran ısıtma ceketini ya da içerisinde soğuk veya sıcak suyun dolaştığı bir çift ceket sistemi (Şekil 2.6) ile ısıtma-soğutma işlemleri yapılır. Daha büyük reaktörlerde ısı transfer etkinliğini arttırmak için reaktörlerin içerisinde ısıtma-soğutma serpantinleri bulunmaktadır (Eibl et al., 2009).



Şekil 2.7 Aksiyel ve radyal akış modelleri (Mirro and Voll, 2009).



**Şekil 2.8** Hücre kültürlerinde karıştırılmalı tank biyoreaktörlerde kullanılan impeller tipleri: (a) *Rushton* türbin (b) *hollow* bıçak, (c) eğimli üç bıçak, (d) *marine* karıştırıcı, (e) eğimli iki bıçak, (f) eğimli bıçak, (g) küresel, (h) bio-m impeller (Eibl et al., 2009).

Biyoreaktörler, hava habarcıklarının sedimentasyonu veya köpüğün giderilmesinde yeterli tepe boşluğunun sağlanması için genellikle %70-80 oranında doldurulurlar. Köpük oluşumu köpük kırıcı ajanların kullanımı ya da mekanik köpük kırıcılar ile azaltılır (Eibl et al., 2009).

Laboratuvar ölçeğinde reaktör boyutları 15 L'ye kadar çıkmaktadır ve genellikle reaktörler şeffaf camdan yapılmaktadır. Bu reaktörler, temizlenmesi kolay, inert ve buhar sterilizasyonuna uygundur. Otoklavlanabilen biyoreaktörlerde cam malzeme tercih edilmektedir (Eibl et al., 2009).

Laboratuvarlarda kullanılan küçük ölçekli karıştırılmalı reaktörlerin tankı ısıya dayanıklı silika borat camlardan yapılırken büyük ölçekli üretimlerde tanklar paslanmaz çelikten yapılmaktadır (Jain and Kumar, 2008). Pilot ölçekli reaktörlerin tepe kısmı, bağlantıları ve karıştırıcıları genellikle ostenitli çelik ya da bazı durumlarda polietereketon (PEET)'den yapılmaktadır. Pilot ve üretim ölçekli reaktörlerde ostenitli çelik genellikle 316 ya da 316L çeliktir. GMP koşullarında üretim için 316L, elektroparlaklık ve kaynaşma özelliği gösterdiğinden tercih edilmektedir (Eibl et al., 2009).

Pilot ve üretim ölçekli biyoreaktörler, ortam beslemesi ve örnek alma portları, pH kontrolü için tampon çözeltilerin beslenebileceği girişler, hava, oksijen, azot ve CO<sub>2</sub> gibi gazların karışımını sağlayabilecek cihazlar, havalandırma için steril filtreler ve atık hava soğutucuları gibi bir takım ek özellikler içermektedirler. Tüm bu biyoreaktör sistemi de bir proses kontrol paneline bağlıdır.



*Hava kaldırmalı biyoreaktörler*, hayvan hücreleri ile MAb gibi tanı ve tedavi amaçlı kullanılan biyofarmösitiklerin üretiminde sıklıkla kullanılmaktadır. Hava kaldırmalı reaktörlerde karıştırmalı reaktörlerin aksine karıştırıcı bulunmamakta ve havanın draft tüpler etrafında akışı ile havalandırma ve karıştırma sağlanmaktadır. Havalandırma, karıştırmalı tanklardaki gibi hücrelere zarar verebilmektedir. Mikrotaşıyıcı kullanımının bu hasarı azalttığı bildirilmiştir (Jain and Kumar, 2008).

Karıştırmalı tank biyoreaktör (STR) ve hava kaldırmalı reaktörler yüzeye bağımlı olmayan hücreler için uygun olan ve yüksek hacimlerde düşük yoğunluklarda çalışan sistemlerdir. *Yüksek hücre yoğunluklu kültür sistemleri* ile daha yüksek hacimsel verimliliklere ulaşılabilir. Ancak bu sistemler homojen olmadıklarından, reaktör içerisinde derişim gradientleri oluşmaktadır bu nedenle sistemin izlenmesi zorlaşmakta ve dolayısıyla ölçek büyütme ekonomik olmamaktadır. *Hollow fiber biyoreaktörler, dolgulu kolon, akışkan yatak ve membran biyoreaktörler* bu sisteme ait reaktörlerdir (Jain and Kumar, 2008).

Antikor üretiminde proses gelişimini kolaylaştırmak için *tek kullanımlık biyoreaktörler* yaygınlaşmaktadır. Bu reaktörler, düşük başlangıç yatırım ve çalışma maliyetine sahip olması, validasyon gerekliliğini azaltması, ölçek büyütme kolaylığı ve çapraz kontaminasyon riskinin az olması gibi bazı önemli avantajlara sahiptirler. *Wave biyoreaktör™ (GE Healthcare, USA), cell cube (Corning, USA) ve Nunc cell factory biyoreaktör (Thermoscientific, Danimarka) ve cryogel biyoreaktörler (Electrolab, İngiltere), CeLLine biyoreaktörler (Sartorius Stedim, Almanya), SuperSpinner (Sartorius Stedim, Almanya)* tek kullanımlık reaktörlerdir (Jain and Kumar, 2008).

*Döner şişe sistemleri (roller şişeler)*, kayma gerilimine duyarlı süspanse ve monolayer memeli hücrelerinde kullanılan basit kültür düzenekleridir. Küçük hacimlerde ortam kullanıldığı için yüksek hücre yoğunluğu ve dolayısıyla yüksek ürün derişimlerine ulaşılabilir (Kretzmer, 2002; Doyle and Griffiths, 1998). Döner şişeler kolayca ölçek büyütülebildiği ve mekanik olarak rahatlıkla çalıştırılabildiği için hücre kültür endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Döner şişelerde üretim kesikli-beslemeli veya kesikli modda yapılabilir (Berson and Friederichs, 2008). Döner şişeler belirli değere (5 ve 60 rph aralığında) ayarlanmış rotasyonel hızlarda karıştırılırlar. Ticarete bu tür kültürler için 4 ile yüzlerce şişenin kültüre edilebileceği sistemler vardır ve bu şekilde büyük ölçekli üretimler yapılabilir. Şişeler borosilikat cam ya da polistiren'den yapılmaktadır ve

250 ile 2000 cm<sup>2</sup> arasında değişen yüzey alanına sahiptir (Doyle and Griffiths, 1998). 100-300 ml hacimli ayrıca hücre tipine özğü düz ya da dalgalı yüzeyli olanları da mevcuttur.

### **2.3.1.2 Hayvan hücreleri ve kayma gerilimi**

Büyük ölçeklerde, biyoreaktörlerin karıştırma ve havalandırma karakteristikleri kritiktir ve ölçek büyütmede zorluk yaşanır. Bu zorluklar:

- Fiziksel hücre hasarı ya da lizise neden olan faktörlerin oluşumu
- Zayıf karışım etkisiyle oluşan konsantrasyon gradienti
- Gaz-sıvı fazında oluşan yetersiz kütle transferi sonucunda oluşan sorunlardır.

Homojen bir hayvan hücre kültürü ortamı, hücreleri süspanse şekilde tutabilmek ve hücelere besin transferini etkili şekilde sağlayabilmek için karıştırmaya ihtiyaç duyar. Hayvan hücre kültürü reaktörlerinde homojenizasyon, dönen karıştırıcılar ile (karıştırmalı tank reaktörler) veya havalandırma (kabarcık kolon ve hava kaldırmalı reaktörler) ile sağlanır (Pol and Tramper, 1998). Ayrıca, havalandırma, büyük ölçekli hayvan hücre biyoreaktörlerinde kültür ortamı içerisine oksijen sağlanmasında kullanılan en pratik yöntemdir (Murhammer and Goochee, 1990).

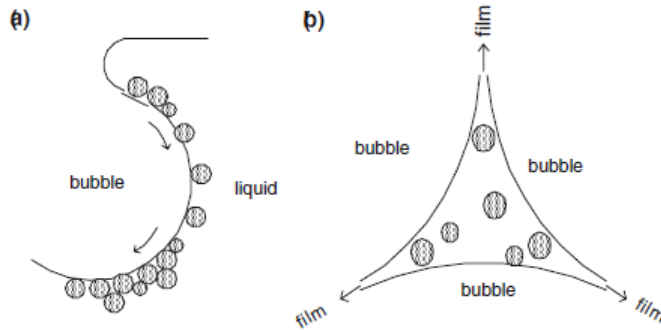
Fiziksel hücre hasarına neden olan faktörler iki mekanizmaya dayanmaktadır. Bunlardan biri hidrodinamik gerilim (sıvı akışı çizgilerinde oluşan uzamsal farklılıklar) oluşturan karıştırma; bir diğeri ise havalandırma ile oluşan kabarcık hasarıdır. Hayvan hücreleri mikrobiyal organizmalardan farklı olarak koruyucu bir hücre duvarına sahip olmadıklarından sıvı içerisindeki fiziksel kuvvetlere karşı oldukça hassastır. Laminer ve türbülent akış koşulları ile yapılan çalışmalar kayma gerilimine bağlı hücre ölümlerinin pek çok parametreye bağlı olduğunu göstermektedir. Genellikle sublethal hücre hasarı veya hücre ölümlerinin 0.5-200 N m<sup>-2</sup> kayma gerilimi arasında değişmektedir. Çalışmalarda, hücrelerin kayma gerilimlerine karşı duyarlılıklarının, kayma geriliminin şiddetine, gerilim süresine, güç dağılımına ve bunlarla birlikte, hücre hattına, anahtar nutrientlerin varlığına (e.g. serum, Pluronic F68), inhibitör etki gösteren hücre metabolitlerinin varlığına ve kültürün üreme fazına (lag ve stasyonere fazda üreyen hücreler kayma hasarına daha duyarlı olurlar) bağlı olduğu görülmüştür

(Hua et. al., 1993; Pol and Tramper, 1998; Chisti, 2000; Enfors et al., 2001; Marks, 2003; Legazpi et al., 2005; Eibl et. al., 2009).

Kayma gerilimine bağlı hücre ölümlerini tetikleyen diğer parametreler ise, viskozite, yüzey gerilimi, en küçük türbülans buręaçlarının boyu, birleşen akımların konumu ve kabarcık sürüklenmesine bağlı olarak derin vorteks oluşumudur (Pol and Tramper, 1998). Türbülent buręaçlar, hücrelerin boyutuna eşit ya da hücrelerden küçüktürler ve bu şekilde hücrelerde zarar oluşturabilirler. En küçük buręağın boyutu “*Kolmogorov eddy-length*” skalası ile hesaplanabilir. “*Kolmogorov eddy-length*” skalası birim kütle başına güç dağılımı ve kinematik vizkozitenin bir fonksiyonudur (Pol and Tramper, 1998; Murhammer and Goochee, 1990; Marks, 2003) .

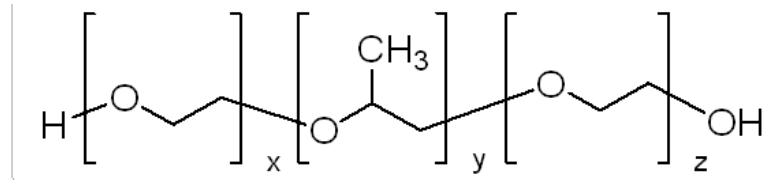
#### Kolmogorov uzunluğu göstergesi —

Havalandırmaya bağlı oluşan hücre hasarı birkaç etki nedeniyle oluşabilir. Bu hasarlar, sparger ucunda oluşan baloncuklar nedeniyle, hava kabarcıklarının ortam içerisinde yükselmesi sırasında ya da ortam sıvısının yüzeyinde oluşabilir. Ortam yüzeyinde hiç köpük oluşumu görülmeyebilir, ya da köpük tabakası oluşabilir. Havalandırma fermentasyonlarda genellikle köpük tabakası oluşur. Havalandırma etkisiyle oluşan hasarın iki nedeni olabilir. Bunlar, hücre ve gaz-sıvı ara yüzeyinde meydana gelen temas ve ortam yüzeyinde meydana gelen kabarcık patlaması sonucunda oluşan sıvı akışındaki değişikliklerdir (Şekil 2.9) (Eibl et al., 2009; Pol and Tramper, 1998; Garcia-Briones and Chalmers, 1992).



**Şekil 2.9** Köpük tabakası üzerinde meydana gelen hücre hasarı. (a) kabarcık arayüzeyine yakın hücreler, baloncukların patlaması ile oluşan büyük kayma gerilimi, (b) hem baloncukların arasında hem de etrafında oluşan ince film tabakasında kalan hücrelerde kayma gerilimi (Eibl et al., 2009).

Kültür ortamı içerisinde koruyucu polimerlerin varlığı hayvan hücrelerinin kayma gerilimine karşı korumasında etkilidir. Etkili koruma sağlayan polimerler, Pluronic F68, polietilen glikol (PEG) ve daha az sıklıkla fakat daha yüksek derişimlerde albumin ve dekstrandır (Pol and Tramper, 1998; Eibl et al., 2009; Garcia-Briones and Chalmers; Chisti 2000; Murhammer and Goochee, 1990). Dekstran dışındaki tüm polimerler belirli derecede yüzey aktif ve yüksek moleküler ağırlıklı maddelerdir (Pol and Tramper, 1998). Pluronic F68 en çok kullanılan ve araştırılan koruyucu polimerdir. Pluronic F68, polioksietilen ve poliokspropilen blok kopolimeridir (Şekil 2.10). 8358 Da mol kütlesine sahiptir ve kritik misel derişimi 9.2 g/L'dır. Molekülün merkezi poliokspropilen bloğu lipofilik özellikte ve polioksietilen bloğu ise hidrofilik özelliktedir. (Pol and Tramper, 1998; Chisti, 2000) Koruyucu mekanizmaları şu şekilde açıklanabilir: (1) hücre-kabarcık etkileşimini önler: Hızlı hareketliliğe sahip kayan kabarcıklar oluşturarak hücrelerin baloncuk yüzeyine hareketini önler ve böylelikle kabarcık patlaması sırasında oluşan jet akımda hücrelerin yakalanmasını engeller. (2) Yavaş damlacıklar halinde sabit köpük tabakasını oluşturur. (3) Hücreler ile etkileşime girer, hücrelerin etrafında yapay bir hücre duvarı oluşturur ya da onların elastik özelliklerini ya da mobilitelerini arttırarak onları kayma gerilimine karşı daha dayanıklı hale getirir (Pol and Tramper, 1998).



Şekil 2.10 Pluronic F68 yapısı (Kaynak: <http://www.sigmaaldrich.com>).

### 2.3.1.3 Kültür (besleme) motları

Tüm biyoteknolojik proseslerde, biyoreaktörlerin çalıştırılması sürekli olmayan mod (kesikli, tekrarlı-kesikli veya kesikli-beslemeli), sürekli mod (kemostat, perfüzyon) ya da diyaliz mod olarak sınıflandırılmaktadır (Şekil 2.11) (Sauer et al., 2000; Jain and Kumar, 2008; Eibl et. al., 2009). Farklı besleme modlarının karşılaştırılması Çizelge 2.2'de verilmiştir. Tekrarlı-kesikli, kesikli-beslemeli ve perfüzyon sistemleri günümüzde endüstride en çok kullanılan besleme modlarıdır (Chu and Robinson, 2001).

*Kesikli kültürlerde*, hücre büyümesi substrat ilavesi yapılmadan gerçekleştirilmektedir. İnokülasyon öncesinde yeterli miktardaki substrat (kültür

ortamı) sisteme eklenir. İnokulasyon sonrası hücreler ortamdaki substratları ve oksijeni kullanarak hücre kütlelerine ve istenilen ürüne dönüştürürler. Hücre ölümleri substrat limitasyonu ya da ortamda inhibe eden metabolitlerin birikimine bağlı olarak gerçekleşir. Kültür sırasında ortama, havalandırma için oksijen, pH kontrolü için asit yada baz veya köpük oluşumu engellemek için köpük kırıcı ilave edildiği için kesikli kültürler kapalı sistemler değildir. Kesikli kültürler, hem laboratuvar hem de endüstriyel boyutlardaki üretimlerde kullanılan basit ve güvenilir sistemlerdir. Ancak, ürün verimliliği başlangıç substrat derişimi ile sınırlanmaktadır. Ayrıca, bazı ortam komponentlerinin çözünürlüğü sınırlıdır ve ortamda çok fazla substrat olması substrat inhibisyonuna veya hücrelerin fazla substrat tüketimine bağlı olarak inhibe edici metabolitlerin ortama salınmasına neden olmaktadır. Bunların yanında, kesikli kültürler yüksek hacim spesifik verimliliği yalnızca hücre yoğunluğunun maksimum düzeye çıktığı ve substratın tamamen tüketilmediği kısa zaman periyodu içinde elde edilir (Krahe, 2003).

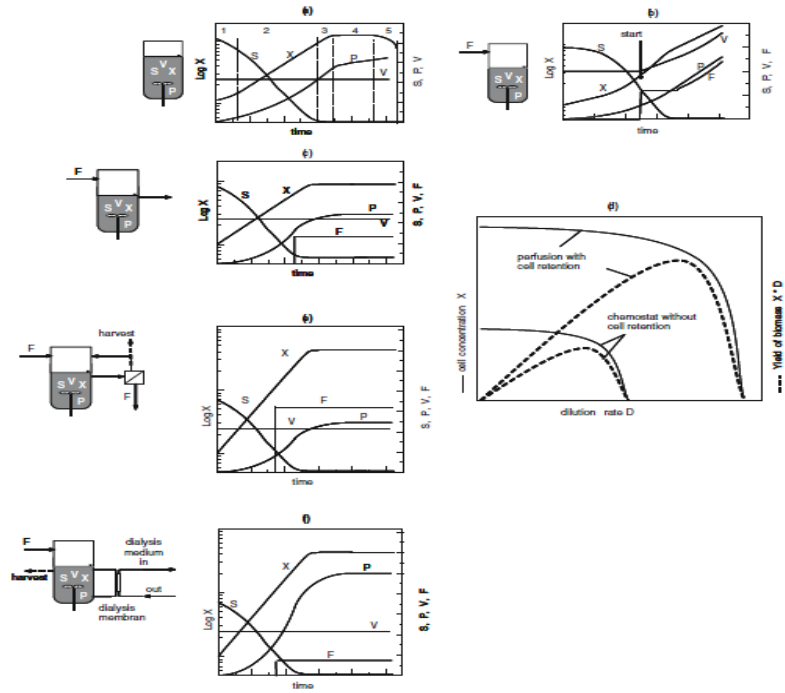
**Çizelge 2.2:** Sıklıkla kullanılan bazı besleme modlarının ürün verimi ve proses ekonomisi açısından karşılaştırılması (Ahuja, 2000).

Kültür modu	Ürün verimi	Proses manipülasyonu	Maliyet (ana para ve işgücü)	Verimlilik
<b>Kesikli</b>	Düşük	Az	Düşük	Az
<b>Tekrarlı-kesikli</b>	Düşük	Orta	Orta	Orta
<b>Perfüzyon</b>	Orta	Yüksek	Orta	Yüksek
<b>Kesikli-beslemeli</b>	Yüksek	Orta	Düşük	Az
<b>Kemostat</b>	Düşük	Orta	Düşük	Az

Kesikli proseslerin etkinliğinin artırılması için *tekrarlı-kesikli sistemler* geliştirilmiştir. Burada, ekspanansiyel fazın sonunda kültür sıvısının büyük bir bölümü alınır ve geri kalan kısım inokulum olarak kullanılır. Kültür sistemi taze ortam ile doldurulur ve bu süreç birkaç kez tekrar edilir (Eibl et al., 2009).

Kesikli kültür ile elde edilen limitli verimlilik *kesikli-beslemeli sistemler* ile aşılmaktadır. Bu kültür sistemi, başlangıçta 1/3 ya da yarısı doldurularak kesikli

kültür şeklinde başlatılır. Substat tüketildiği ya da büyümeyi sınırlayıcı değerler ortaya çıktığı zaman genellikle konsantre olarak taze ortam eklenir. Kesikli-beslemeli sistemlerde hücre ve ürün verimliliği uygun besleme protokolü ile belirgin şekilde arttırılmaktadır. Kesikli-beslemeli sistemlerin kesikli kültüre göre en büyük avantajları daha uzun büyüme fazının yaşanması ve sonuç olarak da daha yüksek hücre ve ürün derişimi ve verimliliğinin elde edilmesidir. Ancak sistem, daha zor ekipman ve kontrol sistemine ihtiyaç duymaktadır (Eibl et al., 2009).



**Şekil 2.11:** Kültür modlarının prensipleri (a) kesikli, (b) yarı kesikli, (c) kemostat, (d) kemostat ve perfüzyon sistemler için hücre yoğunluğu, verim ve dilüsyon hızı, (e) hücre tutumu ile perfüzyon sistem, (f) diyaliz sistemi (F: besleme hızı, S: substrat, V: hacim, X: hücre yoğunluğu) (Eibl et al., 2009).

*Kemostat sistemler aynı zamanda “sürekli karıştırılmalı tank reaktör”ler (CSTR) olarak da adlandırılmaktadır. Taze besi ortamı sürekli olarak sisteme beslenir ve kullanılmış olan ortam sistemden uzaklaştırılır. Bu süreçte besi ortamı hacmi sabit kalmaktadır. Harcanan ortam, hücreler dâhil olmak üzere tüm ortam bileşenlerini içermektedir. Kemostat kültüre alternatif olarak turbidostat sistemleri vardır. Bu sistemlerde de dilüsyon hızı kontrol edilerek hücre yoğunluğu sabit tutulur. Hücre yoğunluğu, substrat ve ürün derişimlerinin yatışkın değerleri ortamın ve boşaltımın akış hızlarına yani dilüsyon hızına bağlıdır. Ürün derişimi, hücre yoğunluğu ile benzerlik göstermektedir. Hücre tutulumu yapılmadan gerçekleştirilen kemostat kültür, araştırma (örn., kinetik çalışmalar) için oldukça*

önemlidir (Pörtner and Schafer, 1996). Ancak, düşük hücre ve ürün derişimleri nedeniyle üretim ölçeğinde fazla kullanılmamaktadır. Bu besleme modunun verimini arttırmak için çok-basamaklı kemostat kültürler önerilmektedir (van Lier et. al., 1994).

Sürekli kemostat kültürlerin dezavantajları, hücrelerin sistemde tutulduğu ve ortam ile sürekli olarak perfüze edildiği *perfüzyon kültürler* ile aşılabilmektedir. Bu sistemler, süspanse kültür biyoreaktöre bazı hücre tutucu araçların (örn., tutucu, dönen filtre ve santrifüj) bağlanması veya hücrelerin immobilize edilmesi ile elde edilmektedir. Bu sistemde de aynı kemostat kültürde olduğu gibi taze ortam sürekli olarak beslenmekte ve kullanılan ortam sistemden uzaklaştırılmaktadır. Ancak burada hücreler tutulduğu için daha yüksek akış hızları kullanılabilmekte ve böylelikle daha yüksek hücre ve dolayısıyla da ürün derişimlerine ulaşılabilir. Bunun yanında, taze ortam beslemesi ve ürün alımı için yapılan ortam değişimi daha rahattır. Metabolitlerin ve diğer inhibitörlerin uzaklaştırılması ve ölçek büyütme işlemi de kolaydır (Pörtner and Platas Barradas 2007; Eibl et al., 2009).

Non-poroz diyaliz membranlar, hücrelerin ve yüksek moleküler ağırlıklı komponentlerin simültane artışını sağlamaktadır. Besi ortamının transferi homojen bir fazdan membran aracılığıyla bir diğer homojen faza konsantrasyon gredienti aracılığıyla ile gerçekleşir ve "*Fick yasası*" ile açıklanır.

S moleküler akış, membran boyunca komponentlerin konsantrasyon gredienti ile  $(c_1-c_2)$  gerçekleşmektedir ve membran alanı A ve permeabilite katsayısı  $P_{mem}$  ile orantılıdır. Permeabilite katsayısı, membran tipine, spesifik komponentlere ve diğer proses parametrelerine (membranın iki yönündeki sınır tabakaya, sıvı hızına, karıştırma hızına vb.) bağlıdır. Diyaliz prosesler kesikli, kesikli-beslemeli ve sürekli modlarda çalıştırılabilir (Eibl et al., 2009).

#### **2.3.1.4 Kültür ortamı**

Monoklonal antikorlar tanı ve tedavide ayrıca biyolojik araştırmalarda oldukça sık kullanılmaktadır ve bu nedenle MAb'ların hızlı ve güvenilir şekilde üretimi önem kazanmaktadır. Buna bağlı olarak, ekonomik şekilde yüksek derişimlerde üretimlerin sağlanması amaçlanmaktadır.

Hücre kültürü için *Eagle's minimal essential medium* (MEM), *Dulbecco's enriched (modified) Eagle's medium* (DMEM), Ham's F12 ve RPMI 1640, gibi pekçok besi ortamı formülasyonu geliştirilmiştir. Çizelge 2.3, temelde besi ortamların bileşimini göstermektedir. Genellikle besi ortamları yaklaşık %5-10 arasında serum ile kullanılmaktadır. Serum kullanımı hücrelere özgül büyüme faktörleri, hormon, lipid, mineraller vs. sağlar ve ayrıca onları kayma gerilimine karşı korur. Serum içeren ortamlar bazı dezavantajlara da sahiptirler. Bunlar: (i) tam olarak tanımlanmamış bir ortam olması, (ii) serumun yüksek maliyeti, (iii) farklı zamanlarda alınan serumlar arasındaki homojenite farkı, (iv) yüksek protein içerikli olması ve bu nedenle ürün saflaştırılmasının zor olması, (v) virüs kontaminasyon riski taşımasıdır (Eibl et al., 2009; Even et. al., 2006; Pol and Tramper, 1998; Legazpi et al., 2005; Kim et al., 2006).

**Çizelge 2.3:** Tipik bir hücre kültürü ortamının bileşimi (Iscove's modification of Dulbecco's medium (IMDM) ve Ham's F12 ortamının 1:1 oranında karışımı) (Eibl et al., 2009) .

Tuzlar (mg/L)	Vitaminler (mg/L)	Aminoasitler (mg/L)	Diğer bileşenler (mg/L)
CaCl <sub>2</sub> (116.60)	biotine (0.0035)	L-alanine (4.45)	D-glucose (3151.00)
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O (0.0013)	D-Ca pantothenate (2.24)	L-asparagine-H <sub>2</sub> O (7.50)	Hypoxantine (sodium salt) (2.39)
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O (0.05)	Choline chloride (8.98)	L-arginine-HCl (147.50)	Linolic acid (0.042)
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (0.417)	Folic acid (2.65)	L-aspartic acid (6.65)	Lipolic acid (0.105)
KCl (311.80)	i-inositol (12.60)	L-cysteine HCl-H <sub>2</sub> O (17.56)	Phenol red (8.10)
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (100.00)	nicotineamide (2.02)	L-cysteine 2HCl (31.29)	Putrescine 2HCl (0.081)
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O (61.00)	Pyridoxal HCl (2.031)	L-glutamic acid (7.35)	Thymidine (0.365)
NaCl (6996.00)	riboflavin (0.219)	L-glutamine (365.00)	Na-pyruvate (55.00)
NaHCO <sub>3</sub> (1200.00)	Thiamine HCl (2.17)	Glycine (18.75)	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O (62.50)	Vitamine B12 (0.68)	L-histidine HCl-H <sub>2</sub> O (31.48)	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (134.00)		L-isoleucine (54.47)	
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (0.432)		L-lysine HCl (91.25)	
		L-methionine (17.24)	
		L-phenylalanine (35.48)	
		L-proline (15.25)	
		L-serine (26.25)	
		L-threonine (53.45)	
		L-tryptophane (9.02)	
		L-tyrosine (di-sodium salt) (55.79)	
		L-valine (25.85)	

Hibridoma fizyolojisinin belirlenmesinde ortamdaki serum miktarı oldukça önemli rol oynamaktadır. Serum derişimi direkt olarak büyüme hızını etkilemektedir. Benzer şekilde spesifik MAb üretim hızı da serum derişiminden

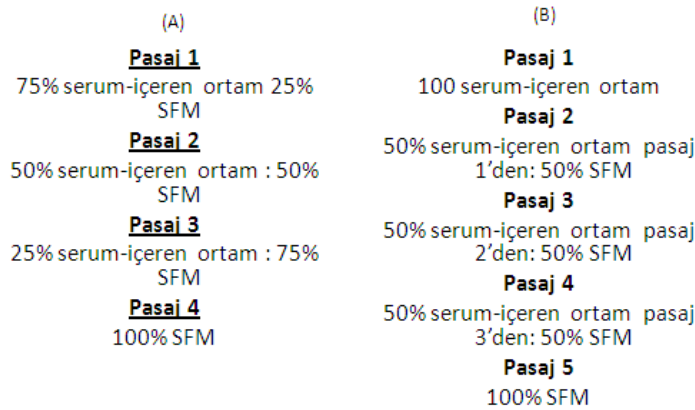


etkilenmektedir. Serum düzeyi hücre metabolizmasını ve antikor üretim miktarını etkilemektedir (Ozturk and Palsson, 1991b).

Serum kullanımı, ortama transferin, insulin, etanol amin, albumin veya fibronektin ilave edilerek azaltılabilir. Yalnız, ortam hala protein içermektedir. Bu nedenle bir sonraki basamak, demir tuzları ya da demir kompleksleri, IGF-1, kimyasal olarak tanımlı lipid konsantreleri, prekürsörler ya da diğer stimüle edici ajanlar kullanılarak protein içermeyen (*protein-free*) ortamlar oluşturulmuştur. Ancak, büyüme hızı ve verimliliğin serum içermeyen ortamlarda düşebileceği literatürde verilmiştir (Eibl et al., 2009; Ozturk and Palsson 1991b). Ayrıca hücrelerin kayma gerilimine karşı duyarlılıkları serumsuz ortamlarda artmakta ve Pluronik F68 gibi koruyucu ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır (Eibl et al., 2009; Legazpi et al., 2005). Fenol kırmızısı kullanımı ayırma saflaştırma işlemlerini zorlaştırdığından büyük ölçekli üretimlerde kullanılmamalıdır (Eibl et al., 2009).

Farklı hücre hatlarının ortam ihtiyaçları da farklıdır. Bu nedenle ticari olarak geliştirilmiş farklı serumsuz ortamlar bulunmaktadır. Hücre hatlarının serumsuz ortamda yaşamaları için onları adapte etmek hem çok zor hem de zaman alıcı bir süreçtir. Ayrıca tüm hücre hatları da serumsuz ya da proteinsiz ortama adapte edilememiştir (Even et al., 2006). Serumsuz ortama adaptasyon için farklı yöntemler geliştirilmiştir. Temelde iki yöntem vardır:

1. Direkt adaptasyon
2. Kademeli adaptasyon (Şekil 2.12)



**Şekil 2.12** Hücrelerin serumsuz besi ortamına kademeli adaptasyonu: (a) Serumlu ortamın derişimi SFM ile belirli oranlarda karıştırılarak azaltılması, (b) Şartlandırılmış ortam kullanımı (Invitrogen, 2009).

Direkt adaptasyonda hücreler doğrudan doğruya serum içermeyen ortama alınır. Bu şekilde hücrelerin adaptasyonu sağlanır. Kademeli adaptasyon ise serumlu ortamın derişimi SFM ile belirli oranlarda karıştırılarak azaltılması veya şartlandırılmış ortam kullanılması ile yapılmaktadır (Invitrogen 2009; Ozturk and Palsson, 1991a).

### **2.3.1.5 Çevresel parametrelerin prosese etkisi**

Çevresel ve fizyolojik faktörler hücre büyümesini ve metabolizmasını ve dolayısıyla da MAb üretim hızını etkilemektedir (Miller et. al., 1987; Jain and Kumar, 2008). Hücre büyümesini etkileyen farklı kültür parametreleri, pH, sıcaklık, çözülmüş oksijen, osmolarite, bazı ortam bileşenleri (Jain and Kumar 2008) ve çözülmüş karbondioksittir (Frahm et al., 2002).

Pek çok memeli hücresi 37°C ve pH 7.4’de en iyi büyüme gösterir. Kültürde sıcaklık 37°C’den aşağı düştüğünde hücrelerin büyüme hızında azalma meydana gelir. Fakat bu süreçte hücrelerde herhangi bir hasar oluşmaz. Ancak 39–40°C gibi yüksek sıcaklıklar hücrelerde ölümlere neden olurlar. Bu nedenle kültür ortamının sıcaklığının değişmemesine ve özellikle de sıcaklığın artmamasına dikkat edilmelidir (Butler 2005).

Çözülmüş oksijen, hücre canlılığı ve büyümesine etki eden en önemli parametrelerden biridir. Çözülmüş oksijen (DO) derişimi belirli limitlerin altında ve üstünde hibridoma hücrelerinin fizyolojisinde değişiklik oluşturmaktadır. Farklı hücre hatlarının literatürde yer alan oksijen tüketim hızları Çizelge 2.4’de verilmiştir. DO’in etkisi hücre hattına ve büyüme koşullarına bağlı olarak değişmektedir (Jan et al., 1997). Düşük DO derişimlerinde yavaş büyüme hızı, yüksek DO derişimlerinde sitotoksik etki görülmektedir. Bunlara rağmen oksijen yokluğunda ya da çok yüksek oksijen derişimlerinde ise hücre büyümesi görülmüştür (Ozturk and Palsson, 1990). Boraston et al.,1984, maksimum hücre veriminin %8-100 DO aralığında olduğunu gösterirken diğer çalışmalar %60 (Reuveny et al., 1986), %0.5 (Miller et al., 1987) ve %35 (Ozturk and Palsson 1990) olarak belirlemiştir (Jan et al., 1997; Jain and Kumar 2008).

Çözülmüş oksijen temelde redoks potansiyelini içeren metabolik yol izlerini etkileyerek hücrelerin metabolizmasını değiştirmektedir. Yüksek miktardaki, %80 hava saturasyonundan fazla, oksijen derişimi reaktif oksijen türlerinin (ROS) ortamda oluşmasına ve oksidatif strese neden olmaktadır. ROS,

aerobik metabolizma ile oluşmaktadır ve DNA, protein, lipid gibi makromoleküllere zarar vermektedir. Böylelikle hücre membranı zarar görmekte, hücre canlılığı düşmekte ve hücre ölümleri tetiklenmektedir (Jan et al., 1997; Ozturk and Palsson, 1991b). Murin hibridoma kültürleri %200, %300 gibi DO derişimleri içeren hiperoksit koşullarda kültüre edildiklerinde DNA kırılımlarında artış olduğu belirlenmiştir. Bunların yanında, memeli hücrelerinin belirli düzeydeki ROS'lerini spesifik antioksidan enzimleri yardımıyla tolere edebildikleri bilinmektedir. Hücrelerin yüksek oksijen derişimlerine olan toleranslarının arttırılması oksijen seviyesinin dereceli olarak arttırılması ile gerçekleştirilebilmektedir. Toleransın artması antioksidan enzim sentezlerinin up-regülasyonuna bağlıdır (Jan et al., 1997).

**Çizelge 2.4** Farklı hücre hatlarının literatürde yer alan oksijen tüketim hızları (Eyer et al., 1995).

Oksijen İhtiyacı (mmol L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ), 10 <sup>6</sup> hücre/ml konsantrasyonda	Hücre hattı	Referans
0.09–0.33	HeLa	Philips and McCarthy <sup>29</sup>
0.19–0.34	HeLa, Detroit6	Green et al. <sup>13</sup>
0.12	AH (L cell variation)	Brosemer et al. <sup>4</sup>
0.04–0.33	HeLa, lymphoma	Danes et al. <sup>7</sup>
0.06	WI-38	Cristofolo and Kritchevsky <sup>6</sup>
0.07–0.28	14 various lines	McLimans et al. <sup>23</sup>
0.20	BHK 21	Radlett et al. <sup>30</sup>
0.04	Leukocyte	Documenta Geigy <sup>8</sup>
0.17–0.50	WI-38	Balin et al. <sup>2</sup>
0.05	Lymphoblastoid	Kattinger et al. <sup>22</sup>
0.11	Liver cells	Jensen <sup>20</sup>
0.05	FS-4	Fleischaker and Sinskey <sup>11</sup>
0.209	NB1 (hybridoma)	Boraston et al. <sup>3</sup>
0.36	KS1/4 (hybridoma)	Backer et al. <sup>1</sup>
0.37–0.40	HB-32 (hybridoma)	Ramirez and Mutharasan <sup>31</sup>
0.35–0.52	Hybridoma (HFN 7.1)	Eyer <sup>9</sup>

Ortam pH'sı hücre metabolizmasını, canlılığını ve büyümesini etkileyen bir diğer parametredir. Hücre büyümesi için optimum pH, hücre hattına göre değişmekle birlikte, genellikle 7.2-7.6 aralığındadır (Ozturk and Palsson, 1991b). Glukoz ve glutamin tüketim hızları ve laktat ve amonyak üretim hızları yüksek pH düzeylerinde artmaktadır. Ortam pH'sı hücre hattına bağlı olarak oksijen tüketim hızına da etkimektedir. pH aynı zamanda MAb üretim hızına da etkiler. Bazı çalışmalar 6.8-7.2 pH aralığının MAb üretimini etkilemediğini, bazı çalışmalar pH

7.3'ün MAb üretimi için optimum olduğunu ve bazı araştırmalar ise, pH 6.8-7.7 aralığının pH 7.1-7.4 aralığından çok daha iyi olduğunu göstermiştir. Bir başka çalışma ise, antikor üretim hızının asidik koşullarda arttığını bildirmektedir (Ozturk and Palsson, 1991b).

Ortam osmolaritesi, memeli hücrelerinin in vitro kültüründe oldukça önemli bir parametredir. Osmolaritenin hücre büyümesi ve MAb verimliliğini de etkilediği belirlenmiştir. Hücre kültürü ortamı 260-320 miliosmol (mOsm) aralığında olabilecek şekilde serum osmolaritesini (290 mOsm) taklit ederek geliştirilmiştir. Hibridoma hücrelerinde hücre büyümesinin yavaşlaması ve Mab üretiminin artışı yüksek osmolaritelerde elde edilmiştir. Ortam osmolaritesi iyonik ve non-iyonik maddelerin eklenmesiyle değiştirilebilmektedir. Ortam osmolaritesini arttırmak için en çok kullanılan madde sodyum klorür'dür. Endüstriyel açıdan bakıldığında, ortama bu maddeyi eklemek üretimi arttırmak için kullanılabilinecek oldukça kolay ve ucuz bir yöntemdir (Jain and Kumar 2008; Ozturk and Palsson, 1991c).

Karbondioksit hücre kültüründe önemli rol oynamaktadır ve çözülmüş karbondioksit ( $dCO_2$ )  $CO_2$  ve  $H_2CO_3$  veya  $HCO_3^-$  formlarında ortamda bulunabilir. Ortamdaki  $CO_2$  varyasyonları, pH tamponu olarak sodyum bikarbonat kullanımı ile ortamın pH'sını etkiler. Bunun yanında  $CO_2$  varyasyonları ve bir o kadar da  $CO_2$  üretim hızı, süspansiyon memeli hücre kültürlerinde hücre büyüme hızı, ürün kalitesi ve üretim hızı, hücre içi pH ve apoptozis gibi önemli parametreleri de etkilemektedir.  $CO_2$ , hücre kültürlerinde inhibitör etki oluşturan önemli bir yan üründür. Dolayısıyla ortamda  $CO_2$  birikiminden ve fazlalığından kaçınılmalıdır. Havalandırma ile sistemden  $CO_2$  uzaklaştırılır ve böylelikle  $O_2$  ilavesi ve  $CO_2$  uzaklaştırılması arasındaki dengeye bağlı olarak daha karmaşık bir gaz alışverişine neden olur. Ortamda  $CO_2$  kısmi basıncının artması  $H_2CO_3$  miktarının artmasına neden olur ve bu nedenle pH düşer (Marks 2003; Eibl et al., 2009; Frahm et al., 2002).  $CO_2$  birikimi havalandırma sisteminin kütle transfer karakteristiğine bağlıdır.  $O_2$  ve  $CO_2$ 'nin kütle transfer katsayıları sparger kullanımında çok değişmemektedir ve  $CO_2$  birikimi çok önemli bir problem oluşturmamaktadır. Eğer mikrosparger kullanılıyorsa  $CO_2$ 'in uzaklaştırılması sorun oluşturabilir. Küçük kabarcıklar büyük kabarcıklara göre daha kolay şekilde  $CO_2$  ile doyurulurlar ve bu nedenle  $CO_2$ 'in uzaklaştırılma etkinliği düşer. Membran havalandırma kullanıldığında  $CO_2$  birikimi çok daha önemli hale gelir çünkü membran materyaline bağlı olarak  $O_2$  ve  $CO_2$ 'in kütle transfer hızları değişebilmektedir (Ozturk 1996).

### 2.3.2 Proses izleme ve kontrol

Hücre fizyolojisinin ve metabolizmasının daha iyi anlaşılması, sistemin verimliliğini etkileyen farklı proses parametrelerinin anlaşılmasını ve fark edilmesini mümkün kılmıştır. Bu durum, matematiksel modellerin ve proses kontrol için *on-line* ölçümlerin yapılabilmesinde gerekli enstrümantasyonun oluşturulmasını sağlamıştır (Jain and Kumar, 2008). Bir biyoproses sırasında en çok izlenen ve kontrol edilen parametreler, sıcaklık, pH, kısmi oksijen basıncı, kısmi karbondioksit basıncı, karıştırma ve havalandırma hızlarıdır. Bunların yanında, metabolitler ve ürünler, hücre yoğunluğu, canlılığı ve morfolojisi gibi parametreler de prosesin durumu hakkında bilgi vermektedir (Çizelge 2.5) (Jain and Kumar, 2008; Eibl et al., 2009; Butler 2005; Lin et al., 2002; Schügerl, 2001).

Sıcaklık, biyoproseslerde ve hücre kültürlerinde çok önemli bir parametredir ve çok dar bir sapma aralığı değerinde,  $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ , sabit olarak tutulmalıdır. Sıcaklıkta fazla varyasyon meydana gelmesi hücrelerin metabolizmasının yavaşlamasına (özellikle düşük sıcaklıklarda) veya hücre ölümlerine (yüksek sıcaklıklarda) neden olmaktadır. Sistemde sıcaklığı ölçmek için dirençli bir sıcaklık ölçüm cihazı (RTD) vardır. Bu cihaz metal iletken içerir ve böylelikle sıcaklık değişimlerinde direncini değiştirerek sistemin sıcaklığını ölçer. Bu sistem doğru ölçüm ve tekrarlanabilirlik için oldukça uygundur. Bir diğer ölçüm yolu ise *thermocouple* kullanımınıdır. Bu ölçüm daha ucuzdur ancak daha az doğru sonuçlar vermektedir. Ölçülen sıcaklık değeri elektriksel bir sinyal oluşturur bu sinyal seçilen ve ayarlanan sıcaklık derecesi ile karşılaştırılır. Bunun için RTD'den yada *thermocouple*'dan gelen elektriksel sinyaller amplifiye edilir ve kontrol ediciye (*controller*) gönderilir ve burada seçilen değer (*set* değeri) ile karşılaştırılır. Sistemin o anki sıcaklık değerine ve seçilen değere bağlı olarak sistemin ısıtma yada soğutma olayı devreye girer. Küçük yada büyük ölçekli reaktörlerde ısıtma-soğutma olayının doğru kontrolü PID (*proportional integral derivative*) kontrol sistemi ile sağlanır (Doyle and Griffiths, 1998; Eibl et al., 2009; Butler 2005) .

Hücreler ve metabolizmaları ortamdaki  $\text{H}^+$  iyon derişimi ve dolayısıyla da pH değişimlerine karşı oldukça duyarlıdır. Bu nedenle belirlenen pH değerinden  $\pm 0.1$  gibi dar bir aralıkta değişimlerin olması ancak pH kontrolü ile yapılabilir ve böylelikle de proses veriminin artırılması sağlanabilir (Krahe 2003). pH ölçümü için iki elektrotu ihtiyaç vardır. Bunlardan biri ölçüm elektrotu diğeri ise referans elektrotudur ve bu iki elektrot pH probunda birleştirilir. Elektrot cam membrana sahiptir ve ortam içindeki hidrojen iyonu derişiminin

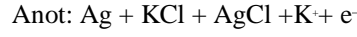
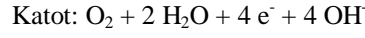
değişimi bu membran içerisinde potansiyel fark oluşturur. Bu potansiyel daha sonra referans elektrodundaki sabit potansiyel ile karşılaştırılır ve böylelikle ortamın gerçek pH'sı ölçülür. Prosese bağlı olarak kültür ortamında pH kontrolü iki yol ile yapılır. Eğer sodyum-bikarbonat içeren bir ortam kullanılıyorsa o zaman ortamın pH kontrolü CO<sub>2</sub> ile yapılır. Bunun yanında ortamda bulunan fosfatlar, örneğin bazı hücre hatları için HEPES (*[N-2-hidroksietilpiperazin-N]etansülfonik asit*) ortamın tamponlanmasında kullanılan çözeltilerdendir. pH'da meydana gelen dalgalanmayı engelleyecek şekilde ortam mutlaka bir tampon içermelidir. Bunun yanında ortamın seyreltik olmaması gerekmekte ve asit yada baz ortama verildiğinde bunun hemen kültür içerisinde dağılımı sağlanmalıdır. Aksi takdirde kötü karışıma bağlı olarak hücre ölümleri meydana gelebilir (Eibl et al., 2009; Doyle and Griffith 1998; Riley 2006; Krahe 2003).

**Çizelge 2.5** Biyoreaktörlerde ölçülen yada kontrol edilen parametreler (Eibl et al., 2009)

<b>Fiziksel</b>	<b>Kimyasal</b>	<b>Biyolojik</b>
Sıcaklık	pH	Biyokütle derişimi
Basınç	Çözünmüş oksijen	Enzim derişimi
Reaktör ağırlığı	Çözünmüş karbondioksit	Biyokütle kompozisyonu (örn., DNA, RNA, protein, ATP/ADP/AMP, NAD/NADH düzeyleri)
Sıvı düzeyi	Redoks potansiyeli	Canlılık
Köpük düzeyi	Çıkan gaz kompozisyonu	Morfoloji
Karıştırıcı hızı	İletkenlik	
Güç tüketimi	Ortam kompozisyonu (substrat, ürün, iyon derişimi vb.)	
Gaz akış hızı		
Ortam besleme hızı		
Kültür vizkozitesi		
<b>Gaz tutulumu</b>		

Sıvı ortam içerisindeki oksijen çözünürlüğü oldukça düşüktür ve dolayısıyla ortamda oksijen sınırlamaları meydana gelmektedir ve bu durum hücre büyüme hızına ve metabolizmasını etkilemektedir. Bir bar basınçta ve hava satürasyonunda, ortam sıcaklığına ve bileşimine bağlı olarak oksijenin

çözünürlüğü 6-8 mg/L'dir. Oksijen tüketim hızı kullanılan hücre hattına, büyüme hızına ve karbon kaynağına bağlı olarak değişmektedir. Hücre kültürü ortamında çözülmüş oksijeni direkt olarak ölçmek oldukça zordur. Hücre kültürü ortamlarında çözülmüş oksijen derişimi polarografik Clark-elektrotlar ile ölçülmektedir. Burada, kültür ortamı içindeki oksijen oksijen-seçici membrandan geçer ve ardından negatif olarak polarize olmuş platin elektrotta indirgenir. Bu katot elektrot bir elektrolit solüsyonu (KCl) ile gümüş anot referans elektrotuna bağlanır. Oksijenin indirgenmesi ile oluşan akımdan meydana gelen elektronlar direkt olarak ortamdaki oksijen konsantrasyonu ile orantılıdır (Eibl et al., 2009; Doyle and Griffith 1998; Ducommun et al., 2000).



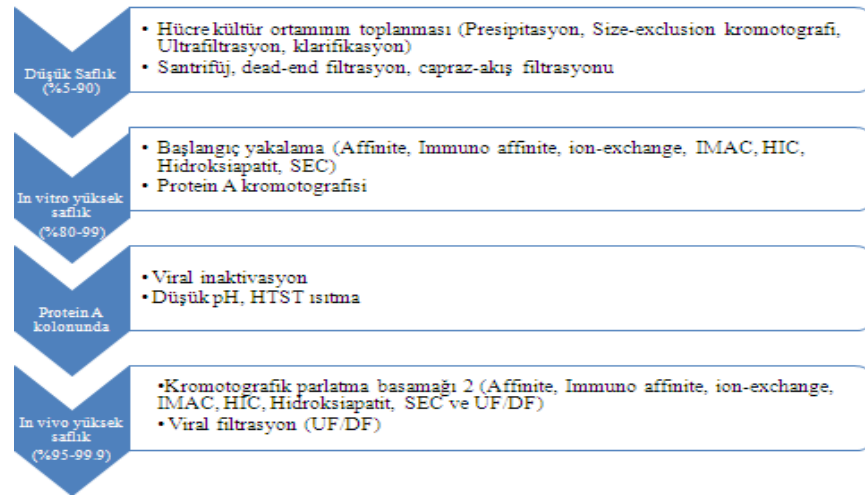
Hücre yoğunluğu ve canlılığı hem *offline* hem de *online* olacak şekilde farklı metotlar kullanılarak ölçülebilmektedir. *Offline* metotlarda hücre yoğunluğunun hesaplanması öncesinde aseptik örnekleme yapılması gerekmektedir. Örnek uygun şekilde seyreltilir ve sıklıkla hemositometri ile sayım yapılır. Tripan mavisi hücre canlılığı hesaplanmasında sıklıkla kullanılan bir boyadır. *Online* metotlarda ise fermentör içerisine yerleştirilen problardan yararlanır. *Vertical Cavity Surface-Emitting Laser* (VSCSEL) ile yapılan *online* ölçümlerde kültürün absorbanı 850 nm dalga boyunda ölçülür (TruCell2 probe, Finesse, Inc., Santa Clara, CA). Ancak bu metot kullanımı ile yalnızca toplam hücre yoğunluğu ölçümü yapılmaktadır, ölü hücre oranı belirlenmemektedir. Bunların yanında hücre canlılığı ve yoğunluğunun belirlenmesi için, Bradford-yöntemi, DNA miktarının belirlenmesi, DAPI, laktik asit, amonyak ve izoenzim analizi gibi pek çok indirekt metot vardır (Doyle and Griffith 1998; Eibl et al., 2009).

## 2.4 Monoklonal Antikorların Saflaştırılması

Monoklonal antikorların hücre kültürü ortamından etkili bir şekilde toplanması ve saflaştırılması üretim sürecinin en kritik basamağıdır ve toplam üretim maliyetinin önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. Altakım proseslerinin geliştirilmesinde göz önünde bulundurulması gereken en önemli husus saflıktır, diğer bir husus ise üretilen teröpatik ajanın ne kadar hızla klinik uygulamalara sunulabildiğidir. Ayrıca, toplam verim ve proses verimi de diğer göz önünde bulundurulması gereken hususlardır. Dolayısıyla prosesin üretimde

kullanılabilmesi için, dayanıklılık, güvenilirlik, iyi üretim proseslerine (GMP) uygunluk ve ölçek büyütülebilirlik oldukça önemlidir (Shukla et al., 2007; Low et al., 2007; Zhou and Tressel, 2005; Flatman et al., 2007; Aldington and Bonnerjea, 2007).

Üründeki safsızlıkları, prosese bağlı kontaminantlar (örn., konak hücredeki proteinler, DNA, endotoksin, süzölmüş Protein A ve bazı kültür ortamı bileşenleri) ve ürüne bağlı safsızlıklar (yüksek moleküler ağırlıklı agregatlar ve parçalanmış/düşük moleküler ağırlıktaki türler) oluşturmaktadır. Ayrıca proses, ürünün tanımlanmamış kontaminasyonlar açısından güvenli olabilmesi için virüslerden de arındırılmalıdır (Shukla et al., 2007). MAb saflaştırılması genellikle, immobilize protein A kullanımı ile ilk yakalama ve diğer kolon kullanımlarıyla kombine şekilde yapılmaktadır (Şekil 2.13) (Shukla et al., 2007; Zhou and Tressel 2005; GE Healthcare 2010; Flickinger and Drew 1999).



Şekil 2.13 MAb üretiminde kullanılan genel altakım işlemleri (Shukla et al., 2007; Zhou and Tressel 2005; GE Healthcare; Flickinger and Drew 1999).

Ülkemizde, tıbbi ve araştırma amaçlı MAb kullanımı oldukça yaygındır. Bu projede amaç, *Salmonella* Enteritidis bakterisinin O antijenine karşı MAb salgılayan hibridoma klonunu kullanılarak farklı üretim sistemlerinde MAb üretimidir. Bu nedenle hibridoma hücrelerinin döner şişe sistemi ve biyoreaktörde karşılaştırmalı üreme parametreleri, yeni koşullarda MAb üretim özellikleri belirlenmiş, optimize edilmiş ve 5 litreye kadar ölçek büyütülmüştür. Üretimin her aşamasında biyokimyasal, fiziksel ve fizyolojik parametreler belirlenmiştir. Bu çalışma ile ortam tasarımı, döner şişe ve biyoreaktör işletim parametrelerinin MAb üretimi açısından belirlenmesi, gelecekte daha başka antijenlere karşı da

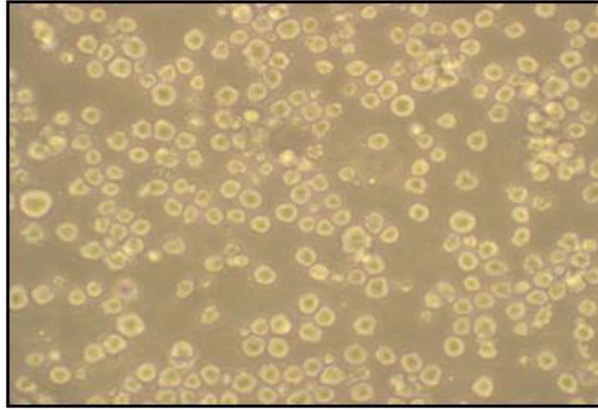


MAb üretimi gerçekleştirilebilecektir. Bu değerli ürünün üretiminin Türkiye’de bir ilk olması nedeniyle sağlık sektörüne ve ulusal ekonomiye önemli katkı sağlaması beklenmektedir.

### 3. MATERYAL ve METOT

#### 3.1 5A8 Hibridoma Klonunun Sıvı Azottan Çıkartılarak Çözdürülmesi ve Kültürü

Üretim ortamı ve koşulları: Bu çalışmada, Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü'nde doktora tezi kapsamında elde edilmiş olan Salmonella Enteritidis O antijenine karşı Mab salgılayan hibridoma klonu kullanıldı (Şekil 3.1) (Nalbantsoy, 2008; Nalbantsoy et. al., 2010a). Hücreler, %10 FCS (Hyclone, SV30160.03, Utah) ve %0.1 (v/v) gentamisin (Biochrom, A 2710, Almanya) içeren DMEM/Ham's F/12 (Hyclone, SH30010.03, Utah) besi ortamı içerisinde 25 cm<sup>2</sup> kültür kaplarında (Biochrom, Cellstar, 690175, Almanya) 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> ve %99 nemli ortamda inkübatörde (Heraeus, Almanya) üretildi. Hücrelerin canlılığının devamı ve çoğaltılması için kültür kaplarında 2-3 günde bir yarı yarıya besi ortamı değiştirildi. Tamamen çoğalan hücreler, 1:2 pasaj oranında ilk önce 75 cm<sup>2</sup> (Biochrom, Cellstar, 658175, Almanya) ardından 175 cm<sup>2</sup> (Biochrom, Cellstar, 660175, Almanya) kültür kaplarına pasajlandı.



**Şekil 3.1** 5A8 hibridoma klonunun inverted mikroskop altındaki görünümü (20x) (Olympus, Japonya).

Hücrelerin çözdürülmesi: Çözdürülecek olan ampul sıvı azottan alınarak bekletilmeden 37°C'de su banyosuna kısmen çözdürüldü. Ampul, dış yüzey sterilizasyonu için alkol ile iyice temizlendi. Laminar hava akışlı kabinde pipete çekilen 5 ml besi ortamı santrifüj tüpüne (Biochrom, Cellstar, 188271, Almanya) eklendi. Ampulün içerisine 1 ml FCS damlatılarak eklendi ve ampul içeriği pipet yardımıyla homojenize edildi. Ampul içindeki tüm süspansiyon pipetle çekilerek santrifüj tüpüne aktarıldı ve homojenizasyon işlemi tekrarlandı. Santrifüj tüpüne

aktarılan hücreler dimetilsülfoksit (DMSO)' in (Hybri-Max™, D2650, Almanya) tamamen uzaklaştırılması için 4°C' de 800 rpm'de 5 dakika santrifüj (Eppendorf, 5810R, Almanya) edildi. Santrifügasyon sonrasında oluşan supernatant döküldü. Santrifüj tüpünün içinde kalan hücre kümesi hafif parmak vuruşlarıyla homojenize edildi. Hücreler, %10 (v/v) oranında hibridoma klonlama faktörü (PAA, F05-009, Almanya) içeren 5 ml üretme vasatı ile homojenize edildikten sonra 25 cm<sup>2</sup> yüzeyli kültür kaplarına aktararak 37°C'de CO<sub>2</sub>'li inkübatörde üremeye bırakıldı.

**Pasajlama:** Kültür kabındaki süspansiyon 5A8 hibridoma klonu santrifüj tüpüne toplandı. Hücreler 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve santrifüj sonrasında elde edilen hücre kümesi uygun miktarda besi ortamı ile homojenize edilerek yukarıda belirtilen pasaj oranında kültür kaplarına dağıtıldı.

**Hücrelerin dondurularak stoklanması:** Kültür kabındaki 5A8 hibridoma klonu süspansiyonu santrifüj tüpüne toplandı. Hücreler 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve santrifüj sonrasında elde edilen hücre kümesi uygun miktardaki dondurma ortamı ile [%90 (v/v) FCS ve %10 (v/v) DMSO] homojenize edildi ve 1'er ml'lik kriyotüplere (Greiner, 123278, Almanya) dağıtıldı. Kriyotüpler 1 gece köpük kutu içerisinde -86°C'de bekletildikten sonra sıvı azot tankına alındı.

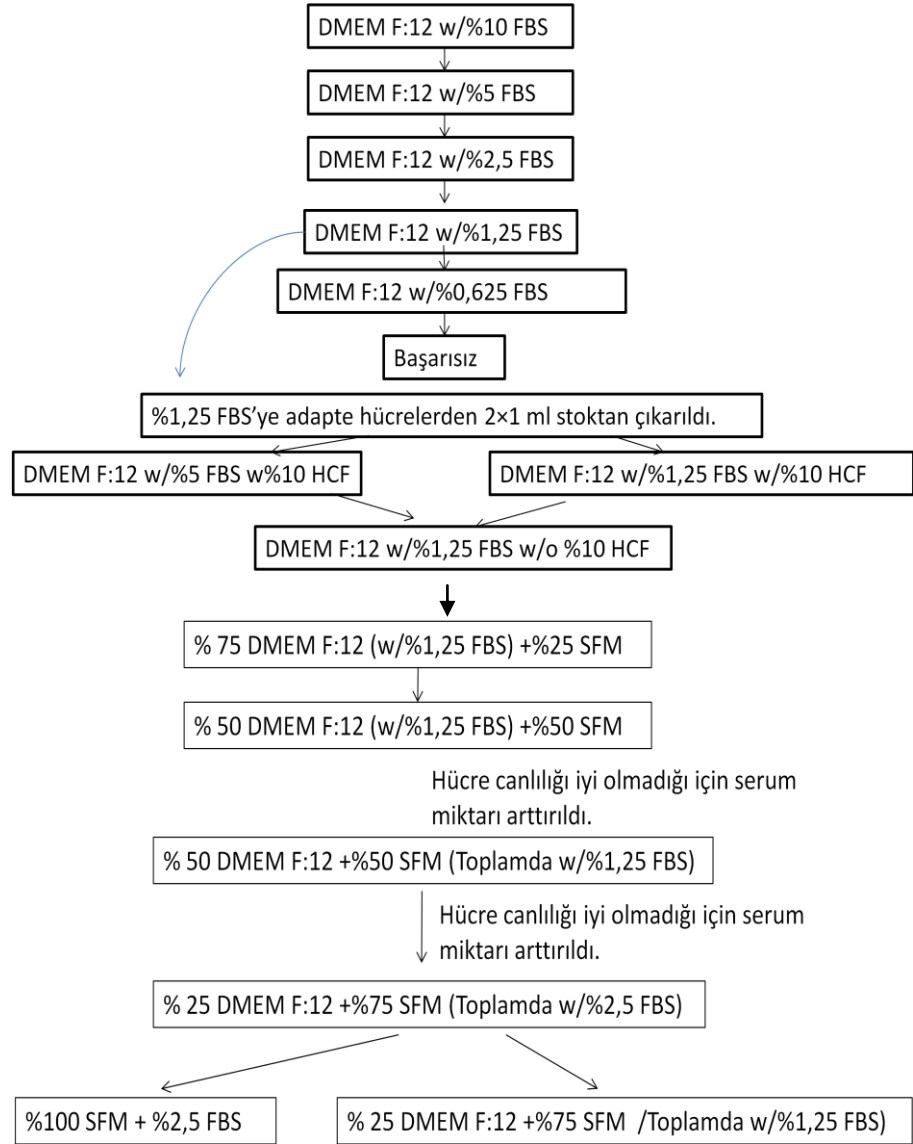
### **3.2 5A8 Hibridoma Klonunun Serumsuz Ortama Adaptasyonu**

Serum içeren ortamların teröpatik ajanların üretimlerinde oluşturduğu birtakım dezavantajlardan dolayı 5A8 hibridoma klonunun serumsuz ortamda (SFM) üreyebilmesi için adaptasyon çalışmaları yapıldı. Bu amaçla iki yöntem kullanıldı. Bunlardan birincisinde hücre üremesinde kullanılan DMEM Ham's F/12 besi ortamı içerisinde serum miktarı düşürüldü. İkincisinde ise %1,25 (v/v) FCS içeren DMEM Ham's F/12 besi ortamı ile serumsuz ortam (SFM4MAb, Hyclone, Utah) belirli oranlarda karıştırılarak adaptasyon denendi (Şekil 3.2).

### **3.3 BHK An<sub>30</sub> Hücreleri ile Döner Şişelerde Ölçek Büyütme, Vibroreaktörde Süspansiyon Ortama Adaptasyon ve Karıştırmalı Biyoreaktör ile Üretim Optimizasyonu**

BHK (*baby hamster kidney*) hücreleri ucuz besi ortamına ihtiyaç duyan ve kolay üreyebilen bir hücre hattıdır. Bu çalışmanın amacı, yüksek verim ve kalitede MAb üretimi için hibridoma hücreleriyle çalışmadan önce, reaktörün

çalışmasının anlaşılması, steril koşulların sağlanması, uygun havalandırma, karıştırma, proses süresi ve diğer ortam koşullarının kısmen standardize edilmesidir.



Şekil 3.2 5A8 hibridoma klonunun SFM'e adaptasyon aşamaları.

### 3.3.1 BHK An<sub>30</sub> klonunun çözdürülmesi ve kültürü

Üretim ortamı ve koşulları: BHK An<sub>30</sub> hücreleri (HÜKÜK, Şap Enstitüsü, Ankara, Türkiye tarafından sağlanmıştır) %10 (v/v) sığır serumu (PAA, B15-313, Almanya), %1 (v/v) L-glutamin (Biochrom, K0282, Almanya), %0.5 (v/v) gentamisin (Biochrom, A 2710, Almanya), %2 (v/v) NaHCO<sub>3</sub> (%5.5'lük NaHCO<sub>3</sub>'tan) (Merck, K30532829 216, Almanya), %10 triptoz fosfat broth içeren GMEM (Sigma, G6184, Almanya) besi ortamı içerisinde 37°C'ye ayarlanmış

CO<sub>2</sub>'siz inkübatörde (Hereaus, Almanya) üretildi. Hücre canlılığının devamı ve çoğaltılması için kültür kaplarında 2-3 gün aralıklarla besi ortamı değiştirildi. Monolayer BHK An<sub>30</sub> hücreleri %90-95 oranında kültür kabını kapladığında 1:3 oranında pasajlandı.

**Hücrelerin Çözdürülmesi:** BHK An<sub>30</sub> hücresi sıvı azottan çıkarılmadan önce besi ortamı su banyosu veya inkübatörde 37°C'ye ısıtıldı. Çözdürülecek BHK hücresini içeren ampul sıvı azottan alınarak bekletilmeden 37 °C'de su banyosuna çözdürüldü. Ampul, dış yüzey sterilizasyonu için %70'lik alkol ile iyice temizlendi. Dikey laminar hava akışlı kabinde (Heraus HS12, Almanya) 5 ml besi ortamından santrifüj tüpüne 4 ml ve ampulün içine 1 ml ilave edildi. Ampul içeriği pipet yardımıyla homojenize edildikten sonra ampul içindeki tüm süspansiyon pipetle çekilerek santrifüj tüpüne aktarıldı ve homojenizasyon işlemi tekrarlandı. Santrifüj tüpüne aktarılan hücreler DMSO'yu tamamen uzaklaştırmak için 4 °C'de 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifügasyon sonrasında oluşan üst sıvı döküldü. Santrifüj tüpünün içinde kalan hücre kümesi hafif parmak vuruşlarıyla homojenize edildi. Üzerine 5 ml üretme vasatı ilave edilen hücreler pipetle homojenize edildikten sonra 25 cm<sup>2</sup> yüzeyli kültür kabına aktarılarak 37C'de CO<sub>2</sub>'siz inkübatörde üretildi.

**Pasajlama:** Kültür kabındaki kullanılmış besi ortamı boşaltıldı ve kültür kabı bir kez tripsin (Hyclone, SH30236, Utah) ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra 2 ml/25 cm<sup>2</sup> olacak şekilde tekrar tripsin eklendi ve 37°C'de hücreler yüzeyden kalkıncaya kadar beklendi. Yüzeyden tamamen ayrılan hücreler besi ortamı ile birlikte santrifüj tüpüne toplandı. Hücreler 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve santrifüj sonrasında elde edilen hücre pelleti uygun miktarda besi ortamı ile homojenize edilerek flaslara uygun oranlarda dağıtıldı.

### 3.3.2 BHK An<sub>30</sub> hücreleri ile döner şişelerde ölçek büyütme

25 cm<sup>2</sup> T-flask'tan 75 cm<sup>2</sup> T-flask'a pasajlanan BHK An<sub>30</sub> hücreleri yüzeyi kapladıktan sonra 1×10<sup>4</sup> hücre/cm<sup>2</sup> olacak şekilde 850 cm<sup>2</sup> yüzeyli döner şişelere (Greiner Bio-one, 680 170, Almanya) her şişede 200 ml GMEM besi ortamı olacak şekilde pasajlandı. Hücreler 37°C'de CO<sub>2</sub>'siz inkübatörde inkübe edildi. Şişe iç yüzeyini kaplayan hücreler 1:3 oranında pasajlanarak ölçek büyütmede kullanıldı (Şekil 3.3).

### **3.3.2.1 BHK An<sub>30</sub> hücrelerinin vibroreaktörde süspanse kültüre adapte edilmesi**

Döner şişelerden tripsinizasyon sonrası toplanan BHK An<sub>30</sub> hücreleri, vibroreaktörde (Chemap, AG, İsviçre) (Şekil 3.4) süspanse kültüre adaptasyonda inokulum olarak kullanıldı. Başlangıç inokulum konsantrasyonu ve yapılan her pasajlama sonrasında başlangıç hücre konsantrasyonu  $4-7 \times 10^5$  hücre/ml arasında kullanıldı. Reaktörün çalıştırılması için başlangıç hacmi 1L olarak belirlendi ve hücrelerin üremesini takiben çalışma hacmi 2L'ye çıkarıldı. Bu üretim süresince yalnızca hücre konsantrasyonu ve canlılığı takip edildi.



**Şekil 3.3** Düz yüzeyli döner şişelerde BHK An<sub>30</sub> hücrelerinin üretimi.



**Şekil 3.4** Vibroreaktörde üretim.

Kültür süresince yapılan hücre sayımı ve hücre morfolojisi takibi sonunda hücre sayısının  $2 \times 10^6$  hücre/ml'e ulaşması (hücre yoğunluğunda yaklaşık 4 kat

artış) ve hücrelerin mikroskopik görünümünde morfoloji ve büyüklüklerinin homojen olarak gözlemlenmesiyle hücrelerin süspanse kültüre adapte olduğu kabul edildi. Hücrelerin süspanse kültüre 6. pasajda adaptasyon gösterdiği belirlendi. Üretimlere ait hücre sayıları, pH vb. bilgiler Çizelge 1.1 ve 1.2'de verildi.

### **3.3.2.2 BHK An<sub>30</sub> hücreleri ile karıştırmalı tank biyoreaktörde üretim optimizasyonu**

Vibroreaktörde süspanse kültüre adapte olan BHK An<sub>30</sub> hücreleri, karıştırmalı tank biyoreaktöre (Biostat® B plus, Sartorius AG, Almanya) inokulum olarak kullanılarak dört farklı üretim yapıldı. Birinci üretimde NaHCO<sub>3</sub> kullanarak havalandırma olmaksızın BHK An<sub>30</sub> üretimi denendi ve daha sonraki üretimlerde ise havalandırma hızı optimizasyonu yapıldı. Bunun için reaktör üç farklı havalandırma hızında çalışıldı; 0.005 vvm, 0.05 vvm ve 0.02 vvm.

Bu kültür şartlarında, kullanılan köpük kırıcı miktarı, pH, çözülmüş oksijen değeri, hücre sayısı ve canlılığı gibi parametreler izlendi. Belirtilen üretim koşullarında gerçekleştirilen proses sırasında mikrosparger (mikro düzeyde hava dağıtıcısı) ve serum kullanımından kaynaklanan köpük oluşumu gözlemlendi. Bu nedenle, sisteme belirli miktarlarda köpük kırıcı (*antifoam*) beslendi. Antifoam (Y-30 emulsion, Sigma, Almaya), başlangıçta %0.1 (v/v) oranında PBS içinde hazırlandı (0. saatte) ancak konsantrasyon düşük olduğu için fazla miktarda kullanıma ihtiyaç duyuldu. Bundan dolayı, köpük kırıcı, %10 (v/v) oranında PBS içinde hazırlanarak 20. saatte beslendi ve sonraki beslemelerde de bu konsantrasyon kullanıldı (Hermann et al., 2006). Ayrıca, reaktörün kendi örnek alma girişi çıkarılarak o hatta silikon hortum takıldı ve cam şişelerden yararlanılarak yeni bir besleme ve örnek alma girişi oluşturuldu. Reaktöre yapılan beslemeler ve örnek alma işlemi bu hattan bir peristaltik pompa (J.P. Selecta Percom I, İspanya) yardımı ile yapıldı ve steril koşullar sağlandı.

### **3.4 Miyeloma Hücreleri ile Karıştırmalı Biyoreaktörde Üretim Optimizasyonu**

Miyeloma hücreleri, monoklonal antikor (MAb) üretimi yapan hibridoma klonunun oluşturulmasında füzyon partneri olarak kullanılan, ucuz ve kolay üreyebilen B-lenfosit tümör hücre hattıdır. Bu hücre hattı karakteristik olarak hibridoma hücreleri ile büyük benzerlik göstermektedir. Bu çalışmanın amacı,

yüksek verim ve kalitede MAb üretimi için uygun havalandırma, karıştırma, çözülmüş oksijen değerinin optimizasyonu, süre ve diğer ortam koşullarının kısmen belirli hale getirilerek bir sonraki adım olan hibridoma hücrelerinin biyoreaktörlerde üretiminde önemli bir kaynak oluşturmaktadır.

### 3.4.1 Ag8 miyeloma hücre hattının sıvı azottan çıkartılarak çözdürülmesi ve kültürü

Üretim ortamı ve koşulları: Ag8 miyeloma hücreleri (X63AG8.653, fare, BALB/c, miyeloma, DSMZ ACC 43), %10 (v/v) FCS, %1 (v/v) L-glutamin, %0.1 (v/v) gentamisin, %2 (v/v) NaHCO<sub>3</sub>, %1 (v/v) Na-piruvat (Biochrom, L0473), %1 (v/v) HEPES (1M, Biochrom, Almanya) içeren DMEM besi ortamı (Hyclone, SH30243.01, Utah) içerisinde 37C'de CO<sub>2</sub>'li inkübatörde üretildi. Hücrelerin canlılığının devamı ve çoğaltılması için kültür kaplarında 2-3 günde bir besi ortamı yarı yarıya değiştirildi. Hücre yoğunluğu yüksek miktarlara ulaştığında 1:3 oranında pasajlama yapıldı (Şekil 3.5).



**Şekil 3.5** Miyeloma (Ag8) hücresi ve hibridoma (5A8) klonunun 75 ve 175 cm<sup>2</sup> yüzeyli kültür kaplarında üretimi.

Hücrelerin çözdürülmesi: Çözdürülecek Ag8 miyeloma hücrelesini içeren ampul sıvı azottan alınarak bekletilmeden 37°C'de su banyosunda çözdürüldü. Ampul, dış yüzey sterilizasyonu için alkol ile iyice temizlendi. Dikey laminar hava akışlı kabinde pipete çekilen 5 ml besi ortamından santrifüj tüpüne 4 ml ve ampulün içine 1 ml ilave edildi. Ampul içeriği pipet yardımıyla homojenize edildi. Ampul içindeki tüm süspansiyon pipetle çekilerek santrifüj tüpüne aktarıldı ve homojenizasyon işlemi tekrarlandı. Santrifüj tüpüne aktarılan hücreler DMSO'yu tamamen uzaklaştırmak için 4°C'de 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.



Santrifügasyon sonrasında oluşan üst sıvı döküldü. Santrifüj tüpünün içinde kalan hücre kümesi hafif parmak vuruşlarıyla homojenize edildi. Üzerine 5 ml üretim vasatı ilave edilen hücreler pipetle tekrar homojenize edildikten sonra 25 cm<sup>2</sup> yüzeyli kültür kaplarına aktarılarak 37°C’de CO<sub>2</sub>’li inkübatörde üremeye bırakıldı.

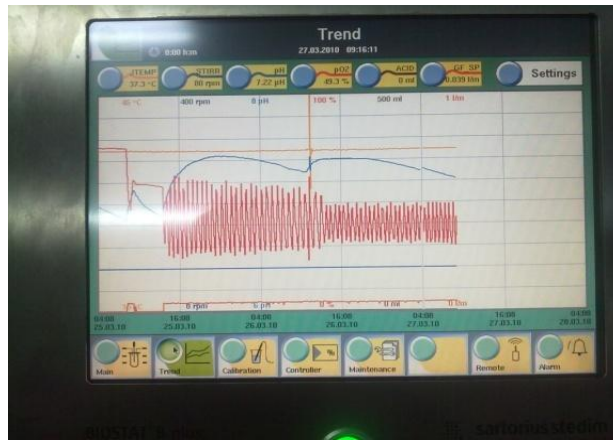
Pasajlama: Kültür kabındaki süspansiyon Ag8 miyeloma hücreleri santrifüj tüpüne toplandı. Hücreler 800 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi ve santrifüj sonrasında elde edilen hücre kümesi uygun miktarda besi ortamı ile homojenize edilerek yukarıda belirtilen pasaj oranında kültür kaplarına dağıtıldı.

### **3.4.2 Miyeloma hücrelerinin karıştırılmalı tank biyoreaktörde üretimi**

25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup> ve bunlardan pasajlanarak elde edilen 175 cm<sup>2</sup> yüzeyli kültür kaplarından elde edilen inokulum ile 1,2 L çalışma hacminde ve 6×10<sup>5</sup> hücre/ml hücre konsantrasyonunda karıştırılmalı biyoreaktör çalıştırıldı (Şekil 3.6). Proses boyunca, pH, sıcaklık, havalandırma hızı ve çözülmüş oksijen parametreleri optimize edildi. Reaktör ilk olarak 60 rpm karıştırma ve 0.02 vvm havalandırma hızında %40 çözülmüş oksijen “set” ve havanın %5 CO<sub>2</sub> hava saturasyon değerinde çalıştırıldı. Ancak bu koşullarda çözülmüş oksijen değeri %70’lere çıktığı için çözülmüş oksijen kültürün 1. gününden itibaren azot ve oksijen gazlarının karışımı ile kontrol edildi. Reaktördeki sıcaklığın belirli değerlerde tutulması için kullanılan ceket sisteminin çok yüksek sıcaklıkta su geçirerek ortam sıcaklığını sabit tutmaya çalışması ceketin hemen yakınlarında bulunan hücrelere zarar verdiğini göstermiştir. Tüm bu parametrelerin uygun değerlerde, hücrelere zarar vermeden sistemde kontrol edilebilmesi için PI-kontrol (Proportional-Integral) sisteminde “minimum”, “maksimum”, değerlerinde optimizasyon işlemi yapıldı (Şekil 3.7). Reaktör yarı-sürekli modda çalıştırıldı. Tripan mavisi (Sigma-Aldrich, T6146, ABD) ile boyama yöntemi kullanılarak Bürker hemositometrisinde hücre canlılığı ölçümü, bunun yanında ortam pH’sının ölçümü, ortamdaki çözülmüş oksijen ve kullanılan köpük kırıcı miktarı takip edildi. 24 ve/veya 48 saatte bir vasat değişimi yapıldı.



Şekil 3.6 Miyeloma hücreleri ile karıştırmalı biyoreaktörde üretim.



Şekil 3.7 Çözünmüş oksijenin belirli seviyede ve hücrelere zarar vermeyecek şekilde PI-kontrol sistemi ile yapılan değişiklikler sonucu ortaya çıkan süreç (Kırmızı çizgiler pO<sub>2</sub> değişimini göstermektedir).

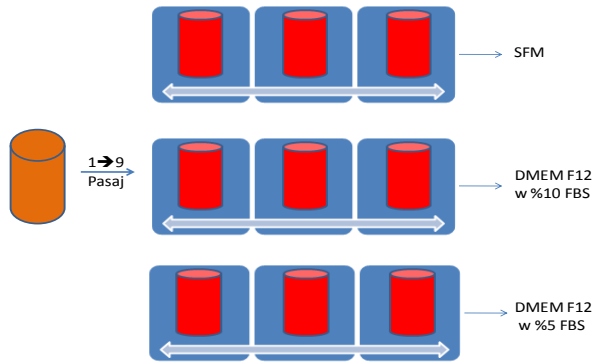
Üretim denemeleri sırasında %5 hava saturasyon değerinde ortama CO<sub>2</sub> verilmesi kullanılan havalandırma hızının düşük olması ve ortam pH'sının yeterince kontrol edilememesi nedeniyle yetersiz kaldı. Bu nedenle reaktörde pH otomatik olarak CO<sub>2</sub> kaskat sistemi ile kontrol edildi. Havalandırma hızı 0.07 vvm'e çıkarıldı. Bu koşullarda ortam pH'sı 7.0 civarlarında seyretti (Şekil 3.8) (Çizelge 4.12 ve 4.13).

### 3.5 5A8 Hibridoma Klonunun Döner Şişelerde Üretimi

Döner şişelerde üretim, hem ölçek büyütme işlemi hem de üç farklı koşulda pilot ölçekli üretim amacıyla gerçekleştirildi (Şekil 3.9). Bu şişeler ile yapılan pilot ölçekli üretimden alınan sonuçlar, karıştırmalı tank biyoreaktörden elde edilecek sonuçlar ile karşılaştırıldı.



Şekil 3.8 Miyeloma hücreleri ile yapılan üretimde pH (mavi çizgiler) ve pO2 (kırmızı çizgiler) değerlerinde meydana gelen dalgalanmalar.



Şekil 3.9 Döner şişelerde yapılan üretimin şematik olarak gösterimi.

### 3.5.1 Döner şişelerde 5A8 hibridoma hücre kültürünün sürdürülmesi

Üretim ortamı ve koşulları: Hücreler,  $7,6 \times 10^5$  hücre/ml başlangıç konsantrasyonunda, %10 (v/v) FCS ve %0.5 (v/v) gentamisin içeren 300'er ml DMEM/Ham's F/12 besi ortamı içerisinde yivli yüzeyli roller şişelerde (Greiner Bio-one, 681 170, Almanya)  $37^\circ\text{C}$ 'de %5  $\text{CO}_2$ 'li inkübatörde üretildi. Hücrelerin canlılığının devamı ve çoğaltılması için roller şişelerde besi ortamı 48 ve/veya 72 saate bir yarı yarıya değiştirildi. Maksimum hücre konsantrasyonuna ulaşan şişelerde 1:2 oranında pasajlama yapıldı.

Pasajlama: Süspansiyon 5A8 hibridoma klonunda döner şişe içerisindeki hücre süspansiyonu pipet yardımıyla santrifüj tüpüne toplandı. Hücreler 800 rpm'de 5

dakika santrifüj edildi ve santrifüj sonrasında elde edilen hücre pelleti besi ortamı ile homojenize edilerek şişelere 1:2 pasaj oranında dağıtıldı.

### 3.5.2 Döner şişelerde 5A8 hibridoma klonu ile monoklonal antikor üretimi

Üretim ortamı ve koşulları: Hücreler, maksimum hücre sayısına ulaştıklarında ( $\approx 1 \times 10^6$  h/ml) üç tekrarlı olarak, kesikli kültürde, %10 (v/v) FCS ve %5 (v/v) FCS içeren DMEM/Ham's F/12 besi ortamında ve serumsuz ortamda (SFM) yivli yüzeyli döner şişelerde 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde üretildi (Şekil 3.10).



Şekil 3.10 5A8 hibridoma klonunun 3 farklı koşulda yivli yüzeyli döner şişelerde üretimi.

Her gün pH ölçümü, canlı ve ölü hücre sayımı yapıldı. İndirekt testler için süpernatant örnekleri toplandı ve kültürün sonlandırılması sırasında kültür ortamı 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra toplanan süpernatantlar ayırma saflaştırma işlemleri ve ardından toplam üretilen MAb miktarının belirlenmesi için -86°C'de stoklandı. İndirekt testlerde laktat ve amonyak miktarının belirlenmesi hazır kitlerin (sırasıyla, Roche, r-biopharm 10139084035 ve Roche, r-biopharm 11112732035, Almanya) kullanımıyla, glikoz ölçümü ise Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda iki tekrarlı olarak gerçekleştirildi. İndirekt ELISA ile monoklonal antikor miktarı belirlendi. ELISA sonuçlarında absorbans değerlerinin mg L<sup>-1</sup> cinsinden eşdeğeri Şekil 3.11'da verilen standart eğrisinden hesaplandı (Şekil 3.10).

İndirekt ELISA'da kullanılan malzemeler:

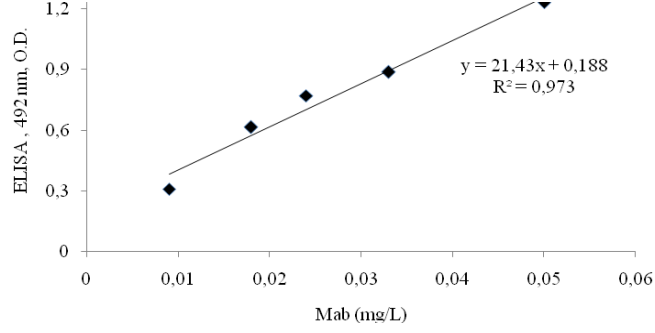
- *0.2 M PBS solüsyonu:* 1 L ultra saf su içerisinde, 28.95 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck, Almanya), 6.87 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (Merck, Almanya) ve 8,5 g NaCl (Merck, Almanya) çözüldü.
- *Yıkama solüsyonu (TPBS):* 0.2 M PBS solüsyonu ultra saf su eklenmesiyle 0.1 M olarak kullanılır ve içerisine % 0.05 (v/v) Tween 20 (Merck, Almanya) eklendi
- *Konjugat solüsyonu:* 1:1000 oranında 0.1 M PBS dilüe edilmiş Anti-mouse IgG (whole molecule) (Sigma, A5278, Almanya) solüsyonu hazırlandı.
- *Substrat solüsyonu:* 1 adet ortofenilendiamin (OPD) tableti (Sigma, ABD) 60 ml ultra saf suda çözülür ve kullanılmak üzere OPD solüsyonuna 1:2000 oranında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (%30'luk) (Merck, Almanya) eklendi.
- *Durdurma solüsyonu:* 4M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck, Almanya) ultrasaf suda hazırlandı.

İndirekt ELISA yöntemi:

1. 5 mg/5 ml olacak şekilde antijen ultra saf suda (Sartorius, Almanya), ultrasonik banyoda (Ultrasonik LC30, Almanya) çözüldü.
2. 10 µg/100µl olacak şekilde ELISA pleytinin gözleri LPS ile kaplandı ve bir gece 37°C'de inkübasyona bırakıldı (Nalbantsoy et. al., 2010b),
3. Mikropleyt gözleri 3'er kez 5'er dakika boyunca yıkama solüsyonu ile yıkandı,
4. Her göze 100'er µl örnek eklendi (serum ve pozitif kontrol 1:100 oranında 0.1 M PBS ile dilüe edildi), 1 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı,
5. Tekrar üç kez 5'er dakika yıkama yapıldı,
6. Her göze 100'er µl konjugat solüsyonu eklendi ve 1 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı,
7. Tekrar üç kez 5'er dakika yıkama yapıldı,
8. Her göze 100'er µl substrat solüsyonu eklendi ve 30 dakika 37°C'de inkübasyona bırakıldı,
9. İnkübasyon sonrasında pleylerin gözleri üzerine (boşaltma yapmadan) 50'şer µl durdurma solüsyonu eklendi,

10. 492 nm dalga boyunda UV spektrofotometrede okuma yapıldı.

Şekil 3.11, ELISA sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılmıştır.



Şekil 3.11 ELISA kalibrasyon eğrisi (Aslankaraoğlu, E., 2003).

### 3.6 Hibridoma Klonunun Karıştırmalı Tank Biyoreaktörde Üretimi

#### 3.6.1 5A8 hibridoma kültürünün %10 (v/v) serum içeren ortamda karıştırmalı tank biyoreaktörde devam ettirilmesi ve örnekleme

$6,7 \times 10^5$  hücre/ml hücre konsantrasyonundaki kültür, 1.5 L %10 (v/v) FCS, , ve %0.5 (v/v) gentamisin içeren DMEM/Ham's F/12 besi ortamı içerisinde 37C'ye ayarlanmış reaktöre beslendi (Şekil 3.12). Reaktör yarı-sürekli modda çalıştırıldı. Hücrelerin canlılığının devamı ve çoğaltılması için 2-3 günde bir hücre canlılığı ve konsantrasyonuna bakılarak uygun miktarlarda vasat değişimi yapıldı. Sayım sonrası değiştirilmek istenen besi ortamı hacmi reaktörden peristaltik pompa yardımıyla çekildi ve steril koşullarda reaktöre alındı. Alınan besi ortamı santrifüj tüplerine aktarılarak 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve hücre pelleti tekrar istenen miktarda taze besi ortamıyla homojenize edilerek steril koşullar altında reaktöre geri beslendi.



Şekil 3.12 5A8 hibridoma klonu ile karıştırmalı biyoreaktörde üretim.

### **3.6.2 5A8 hibridoma klonunun %10 (v/v) FCS içeren ortamda karıştırmalı tank biyoreaktörde 0.02 vvm mikrosparger ile havalandırma ve %40 çözünmüş oksijen satürasyonunda üretimi**

Reaktör 36.8°C sıcaklıkta, %5 CO<sub>2</sub> içeren hava satürasyonunda, %40 çözünmüş oksijen set değerinde, 60 rpm karıştırma ve 0.05 vvm havalandırma hızında çalıştırıldı (Çizelge 3.1). Prosesin kontrolü miyeloma hücreleri ile yapılan üretimden alınan sonuçlar doğrultusunda uygulandı (Çizelge 3.2).

Reaktörde her 2-3 günde bir pH ölçüldü, hücre yoğunluğu belirlendi ve çözünmüş oksijen miktarı ile köpük kırıcı kullanımı gözlemlendi. Reaktör sonlandırıldıktan sonra içindeki hücre kültürü ortamı ayırma saflaştırma işlemleri ve ardından toplam üretilen MAb miktarının belirlenmesi için -86°C'de stoklandı.

### **3.6.3 5A8 hibridoma klonunun %10 (v/v) FCS içeren ortamda karıştırmalı tank biyoreaktörde yüzey havalandırma koşullarında üretimi**

Mikrohava dağıtıcı kullanımı ile reaktör içinde köpüklenme sonucu ortaya çıkan kayma gerilimi etkisinin azaltılması ve aynı zamanda köpük kırıcı kullanımının engellenmesi amacıyla reaktör 36.8°C sıcaklıkta, 60 rpm karıştırma ve 0,2 L/min yüzey havalandırma hızında, 1,5 L çalışma hacminde ve çözünmüş oksijen değeri göz önünde bulundurulmadan çalıştırıldı. Proseste yalnızca pH, CO<sub>2</sub> ile kontrol altında tutuldu.

Çizelge 3.1 Reaktör bilgileri.

<b>pH:</b>	Zero; -41 mV
<b>Pompa:</b>	Slope 59 mV 19 ml/dak
<b>Sterilizasyon:</b>	Sıvı fazda 2L fizyolojik su ile 1 bar basınçta 121C'de 60 dak. otoklav
<b>Ceket sıcaklığı set değeri:</b>	36.8 C
<b>pH set değeri:</b>	7.00
<b>Karıştırma hızı set değeri</b>	60 rpm
<b>Havalandırma</b>	0.02 vvm
	Slope 172.6 nA;
	Zero 0.9 nA;
<b>Sterilizasyon sonrası fizyolojik su ile pO<sub>2</sub> kalibrasyonu</b>	ELEC 167.7 nA
<b>pO<sub>2</sub></b>	%100.5 (fizyolojik su)

Çizelge 3.2 Kontrol edilen parametreler.

Kontrol edilen parametreler	Set değeri	Min	Max	Xp	TI	TD	DeadB	Cmode	Kaskat sistemi
<b>pO<sub>2</sub></b>	%40	-%35	+%35	%90	70s	0s	%0.5	Auto	Gasmix
<b>Sıcaklık</b>	36.8	%0	%62	%20	300s	75	%0.0	Auto	JTemp
<b>Ceket sıcaklığı (Jtemp)</b>	Max 38C	- %100	+%10	%4	0s	0s	%0.0	Auto	-
<b>Havalandırma hızı (GF-SP)</b>	0.07 vvm	%0	%25	%90	50s	0	%0.5	Auto	-
<b>Karıştırma Hızı</b>	60 rpm	%0	%75	%150	100s	0	%0.5	Auto	-

Reaktörde her gün pH ölçümü ve hücre sayımı yapıldı, indirekt testler için süpernatant örnekleri toplandı. Proses sırasında her 48-72 saatte bir besi ortamı değişimi yapıldı ve değiştirilen hücre kültürü ortamı ayırma saflaştırma işlemleri ve ardından toplam üretilen MAb miktarının belirlenmesi için -86°C'de stoklandı.



### 3.6.4 5A8 hibridoma klonunun karıştırılmalı tank biyoreaktörde makroparger kullanımı ile serum içermeyen ortamda 4 litrede üretimi

1 mm gözenek çapına sahip tek bir gözeneği bulunan paslanmaz çelik makroparger temin edildi (Şap Enstitüsü, Ankara, Türkiye). Bu süreçten sonraki üretimlerin hepsi makroparger ile yapıldı (Şekil 3.13).



Şekil 3.13 Kullanılan makroparger'in otoklav sonrası fizyolojik su içerisindeki görünümü. Hava kabarcıkları karıştırıcıya çarpıp dağılmaktadır (sağda).

#### 3.6.4.1 5A8 hibridoma kültürünün %10 (v/v) serum içeren ortamda karıştırılmalı tank biyoreaktörde ölçek büyütme işleminin yapılması

$6 \times 10^5$  hücre/ml hücre konsantrasyonundaki kültür, 1.6 L %10 (v/v) FCS, %0.1 (v/v) gentamisin ve %1 HEPES içeren DMEM/Ham's F/12 besi ortamı içerisinde  $37^\circ\text{C}$ 'ye ayarlanmış reaktöre beslendi. Reaktör, ölçek büyütme sırasında yarı-sürekli modda çalıştırıldı. Hücrelerin canlılığının devamı ve çoğaltılması için 1-2 günde bir hücre canlılığı ve konsantrasyonuna bakılarak uygun miktarlarda vasat değişimi yapıldı. Vasat ilavesi ile de ölçek büyütme işlemi yapıldı (Şekil 3.14).



Şekil 3.14 5A8 hibridoma kültürünün %10 (v/v) serum içeren ortamda karıştırılmalı tank biyoreaktörde ölçek büyütme işlemi.

Reaktörün çalıştırılması sırasında ortam hacmiyle orantılı olarak daha homojen bir ortam ve dolayısıyla da daha etkili besin ve gaz transferlerinin yapılabilmesi için karıştırma ve havalandırma hızları artırıldı. Reaktörün başlangıç işletme koşulları, özellikleri ve proses kontrol sistemi Çizelge 3.3 ve 3.4’de verilmiştir.

**Çizelge 3.3** Ölçek büyütme sırasında reaktörün başlangıç işletme koşulları ve özellikleri.

<b>Karıştırma hızı</b>	60-100 rpm
<b>Sparger tipi</b>	Makrosparger
<b>GF-SP</b>	0,025 L/dak/1.6 L (0.016 vvm)
<b>Başlangıç hücre sayısı (h/ml)</b>	6,00E+05
<b>Başlangıç hacmi (ml)</b>	1600
<b>pO<sub>2</sub> set değeri</b>	%40
<b>pH set değeri</b>	7.00

**Çizelge 3.4** Proses kontrol sistemi

<b>Kontrol edilen parametre</b>	<b>Set değeri</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>	<b>Xp</b>	<b>TI</b>	<b>TD</b>	<b>DeadB</b>	<b>Cmode</b>
<b>pO<sub>2</sub></b>	%40	-%35	+%35	%90	70s	0s	%0.5	Auto
<b>pH</b>								Auto (CO <sub>2</sub> )
<b>Sıcaklık</b>	36.8	%0	%62	%20	300s	75	%0.0	Auto
<b>Ceket sıcaklığı (Jtemp)</b>	Max 38C	-%100	+%10	%4	0s	0s	%0.0	Auto
<b>Havalandırma hızı (GF-SP)</b>	Değişken	-	-	-	-	-	-	Auto
<b>Karıştırma Hızı</b>	60-100 ve 120 rpm	-	-	-	-	-	-	Auto

### **3.6.4.2 5A8 hibridoma klonunun 4L’de serum içermeyen ortamda (SFM) karıştırmalı tank biyoreaktörde kültürü**

Reaktörde %10 FCS içeren 4 L ortamda  $1 \times 10^6$  hücre/ml hücre konsantrasyonuna ulaşıldıktan sonra kültür reaktörden toplandı ve 800 rpm’de 5 dakika santrifüj edildikten sonra, hücre pelleti SFM (SFM4MAb, Hyclone, Utah)

besi ortamı içerisinde homojenize edildi ve 37°C'ye ayarlanmış reaktöre beslendi. Reaktör kesikli modda çalıştırıldı. Reaktörün işletme koşulları Çizelge 3.5'de verilmiştir.

Her gün pH ölçümü alındı ve steril şekilde örnekleme yaparak canlı ve ölü hücre sayımı yapıldı. 800 rpm'de 5 dakika santrifüj sonrasında toplanan süpernatant örnekleri indirekt testler ve MAb miktarının belirlenmesi için -20°C'de stoklandı. Prosesin sonlandırılmasından sonra hücre süspansiyonu 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant %0.02 (w/v) Na-azid (Sigma, ABD) ilavesinden sonra ayırma saflaştırma işlemleri için -20°C'de stoklandı.

**Çizelge 3.5** 4L'de serum içermeyen ortamda (SFM) karıştırmalı tank biyoreaktörde üretim sırasında reaktörün işletme koşulları.

Kontrol edilen parametre	Set değeri	Min	Max	Xp	TI	TD	DeadB	Cmode
pO <sub>2</sub>	%40	-%35	+%35	%90	70s	0s	%0.5	Auto
Sıcaklık	36.8	%0	%62	%20	300s	75	%0.0	Auto
Ceket sıcaklığı (Jtemp)	Max 38C	-%100	+%10	%4	0s	0s	%0.0	Auto
Havalandırma hızı (GF-SP)	Değişken	-	-	-	-	-	-	Auto
Karıştırma hızı	60-100 ve 120 rpm	-	-	-	-	-	-	Auto

### 3.6.5 5A8 hibridoma klonunun stasyoner kültürde üreme kinetiğinin belirlenmesi

SFM ortamında MAb titresinin düşük değerlerinde çıkması nedeniyle hücrelerin hala MAb üretip/üretmediklerinin kontrolü için stasyoner fazda üreme kinetiği çıkarıldı.

Üretim ortamı ve koşulları: Hücreler,  $1,13 \times 10^6$  hücre/ml başlangıç konsantrasyonunda, %10 (v/v) FCS, %1 (v/v) L-glutamin, %0.5 (v/v) gentamisin ve %1 (v/v) HEPES içeren 2'şer ml DMEM/Ham's F/12 besi ortamı içerisinde 6-gözlü pleytlere ekildi ve 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde kesikli kültürde kültüre edildi. Her gün bir gözden örnekleme yapıldı.

Her gün pH ölçümü, canlı ve ölü hücre sayımı yapıldı. İndirekt ELISA ile MAb titresinin belirlenmesi için süpernatant örnekleri toplandı ve -20°C'de stoklandı.

### **3.6.6 5A8 hibridoma klonunun karıştırılmalı tank biyoreaktörde makrosparger kullanımı ile %10 (v/v) serum içeren ortamda 4 litrede üretimi**

Stasyonier kültürden ve önceki çalışmalar elde edilen sonuçlar 5A8 hücrelerinin SFM'de başarılı bir şekilde üremediklerini ayrıca kesikli kültürde en yüksek MAb konsantrasyonuna genellikle 4. gün civarlarında ulaşıldığını göstermiştir. Bu nedenle, 4 L'de üretim %10 (v/v) serum içeren besi ortamı içerisinde de yapıldı ve reaktör içindeki ortamın, MAb kaybetmemek için, 4. gün yarısı ve 6. gün de yarısı reaktörden toplanarak proses sonlandırıldı. Hem ölçek büyütme hem de üretim boyunca prosesin işletim ve kontrol koşulları Çizelge 3.6'da verilmiştir.

Bu çalışmada iki farklı kontrol grubu oluşturuldu. Bunlardan birincisi (kontrol 1), *roller şişelerden* reaktöre geçildiği andan itibaren hiç reaktöre girmeyen ve rollerlardan 25 cm<sup>2</sup> flaska alınan örnektir. Bu örnek reaktör ile paralel çalışıldı. Reaktöre uygulanan tüm değişiklikler (besi ortamı ve/veya pasaj) bu 25 cm<sup>2</sup> flaska da uygulandı ve örnekleme yapıldı. Bu kontrol grubundan alınan sonuçlar değerlendirildi. Kontrol 1'in oluşturulmasındaki amaç hücre sayısı ya da MAb konsantrasyonunda, iki farklı üretim sisteminde (kontrol 1 ve karıştırılmalı tank biyoreaktör) bir farklılık meydana geliyorsa, bu farklılıkların kullanılan reaktör ve işletme koşullarına bağlı olduğunu göstermesiydi.

İkinci kontrol grubu ise (kontrol 2), 4L'ye ölçek büyütme yapıldıktan sonra reaktörde 4L'de %10 FCS içeren ortam ile 4-6 günlük üretime geçilmeden önce, santrifüj sonrasında 4L taze ortamda homojenize edilen hücre süspansiyonundan elde edilen kontrol grubudur. Yine 25 cm<sup>2</sup> flaskta reaktör üretimi ile paralel çalışıldı. Her gün sayım ve süpernatant örneği alındı. Bu kontrol grubu da reaktörün tasarım ve işletme parametrelerinin değerlendirilmesi için kullanıldı.

#### **3.6.6.1 5A8 hibridoma kültürünün %10 (v/v) serum içeren ortamda karıştırılmalı tank biyoreaktörde ölçek büyütme işleminin yapılması**

Üretim ortamı ve koşulları: Hücreler,  $1,2 \times 10^6$  hücre/ml başlangıç konsantrasyonunda, %10 (v/v) FCS ve %0.5 (v/v) gentamisin içeren 2 L DMEM/Ham's F/12 besi ortamı içerisinde reaktöre verildi ve 37°C'de yarı sürekli

modda ölçek büyütme işlemi yapıldı (Şekil 3.15). Hacim ile değişen reaktör koşulları Çizelge 3.7’de verilmiştir.

**Çizelge 3.6** 5A8 Hibridoma klonunun karıştırılmalı tank biyoreaktörde makrosparger kullanımı ile %10 (v/v) serum içeren ortamda hem ölçek büyütme sırasında hem de 4 litrede üretimi boyunca prosesin işletim ve kontrol koşulları.

Kontrol edilen parametre	Set değeri	Min	Max	Xp	TI	TD	DeadB	Cmode
pO2	%40	-%35	+%35	%90	70s	0s	%0.5	Auto
Sıcaklık	36.8	%0	%62	%20	300s	75	%0.0	Auto
Ceket sıcaklığı (Jtemp)	Max 38C	-%100	+%10	%4	0s	0s	%0.0	Auto
Havalandırma hızı (GF-SP)	0.05 ve 0.025 vvm	-	-	-	-	-	-	Auto
Karıştırma Hızı	60-80 rpm	-	-	-	-	-	-	Auto

**Çizelge 3.7** Reaktörün işletme koşulları.

Zaman (gün)	Çalışma hacmi (L)	Karıştırma hızı (rpm)	Havalandırma hızı (vvm)	pO2 (%)
0	2	60	0,05	40
1	2	60	0,05	40
2	3	60	0,05	40
4*	4	80	0,025	0
6*	4	80	0,025	0

\* Oksijen tüpünde ve çözünmüş oksijen probunda meydana gelen sorun nedeniyle, ölçek büyütme sırasında 4. Günden sonra ve 4L’de kesikli kültürde üretim sırasında sistemde oksijen kontrolü yapılamadı. Ayrıca, besi ortamı içerisindeki serum nedeniyle 0.05 vvm havalandırma hızında köpük oluşumu meydana geldi. 4L üretim hacminde bu havalandırma hızında köpük oluşumunu kontrol etmek ancak köpük kırıcı kullanımı ile mümkündür. Fakat köpük kırıcı kullanımı çalışmanın bir sonraki aşaması olan çapraz akış filtrasyonunda sorun çıkaracağı düşünüldü ve köpük kırıcı kullanımından kaçınıldı ve bu nedenle de havalandırma hızı 0.025 vvm’e düşürüldü.

Her 24-48 saatte bir örnekleme yapıldı. pH ölçümü, canlı ve ölü hücre sayımı yapıldı. İndirekt ELISA ile MAb titresinin belirlenmesi için süpernatant örnekleri toplandı ve -20°C’de stoklandı.



**Şekil 3.15** 5A8 hibridoma kültürünün %10 (v/v) serum içeren ortamda karıştırmalı tank biyoreaktörde ölçek büyütme işleminde 2L'den 4L'ye hacim artışı.

### 3.6.6.2. 5A8 hibridoma kültürünün %10 (v/v) serum içeren ortamda karıştırmalı tank biyoreaktörde 4 L'de kesikli modda üretimi

Reaktörde %10 FCS içeren 4 L ortamda  $1,1 \times 10^6$  hücre/ml hücre konsantrasyonuna ulaşıldıktan sonra kültür reaktörden toplandı ve 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra, hücre pelleti %10 (v/v) serum içeren DMEM/Ham's F12 besi ortamı içerisinde homojenize edildi ve 37°C'ye ayarlanmış reaktöre beslendi. Reaktör kesikli modda çalıştırıldı. Üretim boyunca köpük kırıcı kullanımından kaçınıldı. Reaktörde, pO<sub>2</sub> probunda meydana gelen arızadan dolayı çözünmüş oksijen kontrolü yapılamadı (Çizelge 3.8).

**Çizelge 3.8** 5A8 hibridoma hücre kültürünün %10 (v/v) serumlu ortamda karıştırmalı tank biyoreaktörde kültürü sırasında işletme koşulları.

Zaman (gün)	Çalışma hacmi (L)	Karıştırma hızı (rpm)	Havalandırma hızı (vvm)	Not
0	4	80	0,025	-
1	4	80	0,025	-
2	4	80	0,025	-
3	4	80	0,025	-
4	4	80	0,025	Burada 2L ortam alındı ve Na-azid eklenerek kaldırıldı. 2 L ortam 6 gündeki sonuçları görebilmek için işletme parametreleri değiştirilerek devam ettirildi.
6	2	60	0,05	-

Her gün pH ölçümü alındı ve steril şekilde örnekleme yaparak canlı ve ölü hücre sayımı yapıldı. 800 rpm'de 5 dakika santrifüj sonrasında toplanan süpernatant örnekleri indirekt testler ve Mab miktarının belirlenmesi için

-20°C’de stoklandı. Prosesin sonlandırılmasından sonra hücre süspansiyonu 3000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant %0.02 (w/v) Na-azid ilavesinden sonra ayırma saflaştırma işlemleri için -20°C’de stoklandı.

### 3.7 5A8 Hibridoma Klonunun Statik Membran Biyoreaktörde Kültürü ve MAb Üretimi

Etkili bir hücre kültürü optimum oksijen ve besin sağlanışına ayrıca ortamdaki inhibe edici toksik metabolitlerin ortamdan uzaklaştırılmasına bağlıdır. Hibridomanın statik membran biyoreaktörde (SMR) kültürü için CELLline 350® (DC-90010, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Almanya) (Şekil 3.16) kullanıldı. Bu reaktör tek kullanımlık, steril ve iki bölmeden oluşan bir kültür kabıdır. Bu iki bölme sayesinde nutrient ya da oksijen transfer problemlerinin üstesinden gelinmiş olunur. Membran içerisine çok yüksek konsantrasyonlarda hücre inokülasyonu yapılabilmekte ve dolayısıyla yüksek konsantrasyonda ürün oluşumu sağlanabilmektedir. Hücre metabolizması sonucu oluşan inhibe edici toksik metabolikler membran dışına çıkarak hücrelerden uzaklaşmaktadır. Bunun yanında, ürün hücre ile birlikte membran içinde kaldığı için çok konsantre olmaktadır. Bu nedenle de daha sonrasında çapraz akış filtrasyonu gibi ürün konsantrasyon işlemine ihtiyaç kalmamaktadır.



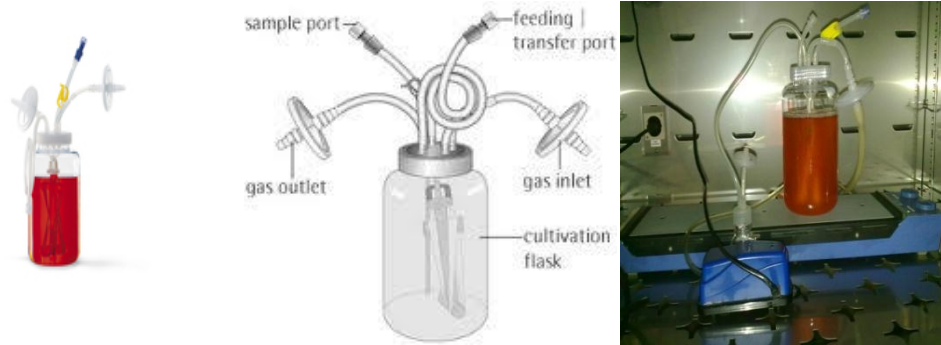
Şekil 3.16 SMR (CELLline 350®, <http://www.sartorius-stedim.com>).

Üretim ortamı ve koşulları: Yeterli hücre miktarı 100 ml’de  $6 \times 10^5$  hücre/ml konsantrasyonda olacak şekilde ayarlandı. Bu hücre süspansiyonu 800 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi ve hücre pelleti %10 (v/v) FCS ve %0.5 (v/v) gentamisin içeren 5 ml DMEM/Ham’s F/12 besi ortamı içerisinde homojenize edilerek bir şırınga yardımıyla membran içerisine verildi. Hücreler, 37°C’de CO<sub>2</sub>’li inkübatörde kesikli modda kültüre edildi.

Her 48-72 saatte bir pH ölçümü, canlı ve ölü hücre sayımı yapıldı. İndirekt ELISA ile MAb titresinin belirlenmesi için süpernatant örnekleri toplandı ve -20°C'de stoklandı.

### 3.8 5A8 Hibridoma Klonunun Membran Havalandırmalı Biyoreaktörde Kültürü ve MAb Üretimi

Bu üretimde membran havalandırmalı biyoreaktör (MHR) olarak SuperSpinner D 1000® (DF-001LS-SSb---V, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Almanya) (Şekil 3.17) kullanıldı. Bu reaktör, tek kullanımlık, steril ve laboratuvar ölçeğinde hayvan hücre kültürü için kullanılan oldukça etkili bir biyoreaktördür. MHR, kültür kabı, karıştırıcı ve membran havalandırma yapan bir sistemden oluşmaktadır. Hollow-fiber membran karıştırıcı çubuğuna sarılıdır ve çubuk manyetik parça içerir, böylelikle manyetik alan etkisiyle karışım sağlanır. Hava girişinin sağlanması için bir hava pompası kullanılır. Hava debisinin kontrolü flask yanında bulunan küçük şişe yardımıyla yapılır.



Şekil 3.17 MHR komponentleri ve 5A8 hibridoma kültürü (SuperSpinner D 1000®, <http://www.sartorius-stedim.com>).

**Üretim ortamı ve koşulları:** Kültüre 400 ml ortam ile  $8 \times 10^5$  hücre/ml hücre konsantrasyonunda başlandı ve ardından hacim 800 ml'e çıkarıldı. Hücre süspansiyonu %10 (v/v) FCS ve %0.5 (v/v) gentamisin 5 ml DMEM/Ham's F/12 besi ortamı içerisinde homojenize edilerek steril çalışma kabini içerisinde reaktöre beslendi ve hücreler, 37°C'de CO<sub>2</sub>'li inkübatörde kesikli modda kültüre edildi.

Her 48-72 saatte bir pH ölçümü, canlı ve ölü hücre sayımı yapıldı. İndirekt ELISA ile MAb titresinin belirlenmesi için süpernatant örnekleri toplandı ve -20°C'de stoklandı.



## **4. BULGULAR**

### **4.1 5A8 Hibridoma Klonunun Serumsuz Ortama Adaptasyonu**

5A8 hibridoma klonunun serumsuz ortama adaptasyonunda iki farklı yöntem kullanılmasına karşın hücrelerin serumsuz ortama adapte olamadıkları ve hem kültür kaplarında hem de reaktör sistemlerinde direkt olarak ölüm fazına geçtikleri görüldü.

### **4.2 BHK An<sub>30</sub> Hücreleri ile Döner Şişelerde Ölçek Büyütme, Vibroreaktörde Süspanse Ortama Adaptasyon ve Karıştırmalı Biyoreaktör ile Üretim Optimizasyonu**

#### **4.2.1 BHK An<sub>30</sub> Hücrelerinin Vibroreaktörde Süspanse Kültüre Adapte Edilmesi**

Kültür süresince yapılan hücre sayımı ve hücre morfolojisi takibi sonunda hücre sayısının  $2 \times 10^6$  hücre/ml'e ulaşması (4 kat fazla hücre konsantrasyonunun elde edilmesi) ve hücrelerin mikroskopik görünümünde morfoloji ve büyüklüklerinin homojen olarak gözlemlenmesiyle hücrelerin süspanse kültüre adapte olduğu kabul edildi. Hücrelerin süspanse kültüre 6. pasajda adaptasyon gösterdiği belirlendi. Her kültür basamağında belirlenen hücre sayıları, pH vb. bilgiler Çizelge 4.1 ve 4.2'de verildi.

#### **4.2.2 BHK An<sub>30</sub> Hücreleri ile Karıştırmalı Tank Biyoreaktörde Üretim Optimizasyonu**

NaHCO<sub>3</sub> kullanarak havalandırma olmaksızın (Deneme 1): BHK An<sub>30</sub> hücrelerinin (süspanse kültüre adapte) STR'de üretimi sırasında kültürün başlangıç koşulları, proses boyunca gözlemlenen parametreler ve alınan sonuçlar Çizelge 4.3 ve 4.4'de verilmiştir.

Kültürde fazla NaHCO<sub>3</sub> kullanımına bağlı olarak hücre büyümesinin azaldığı ve hücrelerin morfolojilerinde değişiklik olduğu gözlemlendi (Şekil 4.1).

**Çizelge 4.1** Vibroreaktörde üretim süresince gözlemlenen parametreler ve değerler (1. deneme)

Pasaj numarası/ Zaman (gün)	C <sub>1</sub> (hücre/ml)	C <sub>2</sub> (hücre/ml)	pH <sub>1</sub>	pH <sub>2</sub>	Çalışma Hacmi (L)	Karıştırma hızı	Havalandırma
M29 S1/0	7×10 <sup>5</sup>	-	-	-	1	7 (180 V)	Yok
S2/2	1,62×10 <sup>6</sup>	8×10 <sup>5</sup>	6,7	7,45	2	7	Yok
S2/3	-	-	-	-	2	7	Var
S3/4	4,19×10 <sup>6</sup>	1×10 <sup>6</sup>	6,65	7,4	2	7	Yok
S4/7	2×10 <sup>6</sup>	4,5×10 <sup>6</sup>	7,1	7,7	2	7	Var
S5/9	9×10 <sup>5</sup>	4,2×10 <sup>5</sup>	7,54	7,7	2	7	Yok
S5/10	-	-	-	-	2	7	Var
S6/11	2×10 <sup>6</sup>	-	7,1	-	-	-	-

\*M: Monolayer kültür; S: Süspanse kültür; c<sub>1</sub>: Başlangıç hücre konsantrasyonu (hücre/ml); c<sub>2</sub>: Pasajlama sonrası hücre konsantrasyonu (hücre/ml); pH<sub>1</sub>: Besi ortamı değişimi öncesi pH değeri; pH<sub>2</sub>: Besi ortamı değişimi sonrası pH değeri.

**Çizelge 4.2** Vibroreaktörde üretim süresince gözlemlenen parametreler ve değerler (2. deneme).

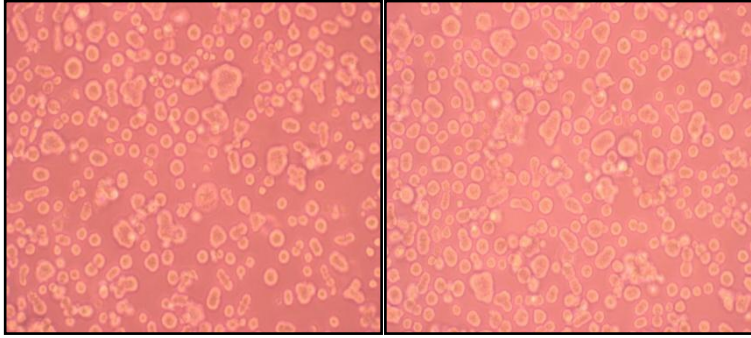
Pasaj numarası/ Kültür süresi (gün)	C <sub>1</sub> (hücre/ml)	C <sub>2</sub> (hücre/ml)	pH <sub>1</sub>	pH <sub>2</sub>	Çalışma Hacmi (L)	Karıştırma hızı	Havalandırma
M31 S1/0	5×10 <sup>5</sup>	-	-	-	1	7 (180 V)	Yok
S1/1	-	-	-	-	1	7	Var
S2/2	2,3×10 <sup>6</sup>	7×10 <sup>6</sup>	7,1	7,4	2	7	Yok
S2/3	-	-	-	-	2	7	Var
S3/4	3,5×10 <sup>6</sup>	5×10 <sup>5</sup>	7,0	7,6	2	7	Var
S4/7	3,4×10 <sup>6</sup>	5×10 <sup>5</sup>	7,0	7,5	2	7	Yok
S4/8	-	-	-	-	2	7	Var
S5/9	2,3×10 <sup>6</sup>	4×10 <sup>5</sup>	7,2	7,5	2	7	Yok
S5/10	-	-	-	-	2	7	Var
S6/11	2,2×10 <sup>6</sup>	4×10 <sup>5</sup>	7,25	7,5	2	7	Yok
S6/12	-	-	-	-	2	7	Var
S7/14	2,4×10 <sup>6</sup>	4×10 <sup>5</sup>	7,2	7,55	2	7	Yok
S7/15	-	-	-	-	2	7	Var
S8/16	1,9×10 <sup>6</sup>	6×10 <sup>5</sup>	7,2	7,55	1	7	Yok
S9/18	1,4×10 <sup>6</sup>	4×10 <sup>5</sup>	7,2	7,55	2	7	Var
S10/21	1,9×10 <sup>6</sup>	5×10 <sup>5</sup>	7,02	7,5	1	7	Yüzey havalandırma var
S11/23	1,6×10 <sup>6</sup>	4×10 <sup>5</sup>	7,05	7,5	1	7	Yok
S12/25	1,7×10 <sup>6</sup>	4×10 <sup>5</sup>	6,90	7,5	1,5	7	Var
S13/28	1,65×10 <sup>6</sup>	4×10 <sup>5</sup>	7,22	7,45	1,5	7	Yok
S14/30	1,35×10 <sup>6</sup>	-	7,2	-	1,5	7	-

**Çizelge 4.3** BHK hücreleri ile STR’de yapılan kültürde başlangıç koşulları (1. deneme).

Zaman (h)	Çalışma Hacmi (L)	C <sub>0</sub> (hücre/ml)	pH <sub>0</sub>	Havalandırma Hızı (vvm)	Karıştırma Hızı (rpm)	Karıştırıcı Yönü ve Açısı	pO <sub>2</sub> saf su (%)	pO <sub>2</sub> kültür ortamı (%)
0	2	5×10 <sup>5</sup>	6,93		200	45° / yukarı	105,2	99,1

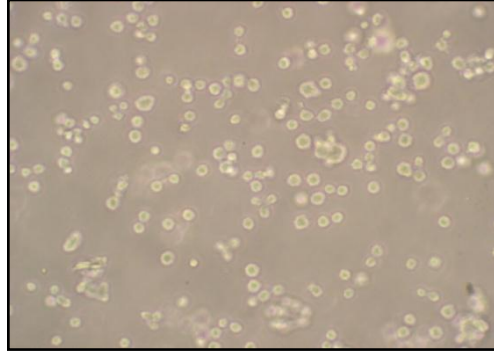
**Çizelge 4.4** BHK hücreleri ile STR’de yapılan kültürde izlenen parametreler (1. deneme).

Kültür süresi (h)	C <sub>1</sub> (hücre/ml)	C <sub>2</sub> (hücre/ml)	Çalışma hacmi (L)	Değiştirilen ortam miktarı (L)	pH	Beslenen toplam NaHCO <sub>3</sub> miktarı (ml)	% pO <sub>2</sub>	Hücre morfolojisi
14	-	-	2	-	6,73	0	29,2	-
22	-	-	-	-	7,00	-	0	-
44	1.8×10 <sup>6</sup>	5×10 <sup>5</sup>	2,25	1,5	6,95	250	0	Hücrelerin membranlarında hasar gözlemlendi.
66	-	-	-	-	6,95	326	0	-
92	1.27×10 <sup>6</sup>	5×10 <sup>5</sup>	2,4	1	6,95	460	0	Hücrelerin membran bütünlüklerini koruduğu gözlemlendi..
137	-	-	-	-	6,97	618	-	-
139	1.2×10 <sup>6</sup>	1.2×10 <sup>6</sup>	2,15	0	6,98	618	0	Hücrelerin morfolojilerinde heterojenlik ve membranlarında bozulmalar gözlemlendi.
141	-	-	-	-	6,99	618	-	-
143	-	-	-	--			-	-
160	8.2×10 <sup>5</sup>	-	-	-	7,53	618	-	-

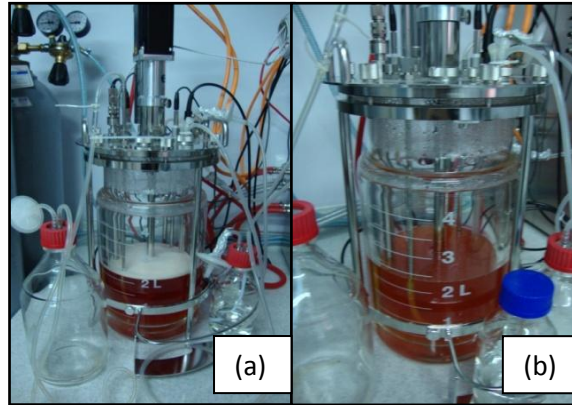
**Şekil 4.1** NaHCO<sub>3</sub> kullanımından kaynaklanan hücre morfolojilerinin değişimi.

NaHCO<sub>3</sub> kullanmadan düşük havalandırma hızında (0.01 L/min-0.005 vvm, deneme 2) BHK An<sub>30</sub> (süspanse kültüre adapte) hücrelerinin STR’de üretimi sırasında kültürün başlangıç koşulları, proses boyunca gözlemlenen parametreler ve alınan sonuçlar Şekil 4.2 ve Çizelge 4.5 ve 4.6’de verilmiştir.

Belirtilen üretim koşullarında gerçekleştirilen proses sırasında mikrosparger (mikro düzeyde hava dağıtıcısı) ve serum kullanımından kaynaklanan köpük oluşumu gözlemlendi. Bu nedenle, sisteme belirli miktarlarda köpük kırıcı (*antifoam*) beslendi (Şekil 4.3). Antifoam başlangıçta (0. saatte) %0.1 (v/v) oranında PBS içinde hazırlandı. Ancak, konsantrasyon düşük olduğu için fazla miktarda köpük kırıcıya ihtiyaç duyuldu. Bu nedenle köpük kırıcı, %10 (v/v) oranında PBS içinde hazırlanarak 20. saatte beslendi ve sonraki beslemelerde de bu konsantrasyon kullanıldı. Ayrıca, reaktörün kendi örnek alma girişi çıkarılarak o hatta silikon hortum takıldı ve cam şişelerden yararlanılarak yeni bir besleme ve örnek alma girişi oluşturuldu. Reaktöre yapılan beslemeler ve örnek alma işlemi bu hattan bir peristaltik pompa yardımı ile yapıldı ve steril koşullar sağlandı.



Şekil 4.2 0.005 vvm havalandırma koşullarında reaktör içerisindeki hücrelerin morfolojik görünümü (20X) (Olympus, Japonya).



Şekil 4.3 Karıştırma tank reaktörde köpük oluşumu (a) 0.005 vvm havalandırma hızında reaktörde gözlemlenen köpük oluşumu; (b) köpük kırıcı kullanımından sonra reaktördeki görünüm.

$\text{NaHCO}_3$  kullanmadan yüksek havalandırma hızında (0.1 L/min-0.05 vvm) (Deneme 3) BHK An<sub>30</sub> hücrelerinin STR'de üretimi sırasında kültürün başlangıç koşulları ve proses boyunca gözlemlenen parametreler ve alınan sonuçlar Çizelge 4.7 ve 4.8'de verilmiştir. Bu üretimde yoğun hücre konsantrasyonu ve reaktör

ortamında makroskobik olarak da görülebilen hücre kümeleri gözlemlendi (Şekil 4.4).

**Çizelge 4.5** BHK hücreleri ile STR’de yapılan kültürün başlangıç koşulları (2. deneme).

Zaman (h)	Çalışma Hacmi (L)	C <sub>0</sub> (hücre/ml)	pH <sub>0</sub>	Havalandırma hızı (vvm)	Karıştırma hızı (rpm)	Karıştırıcı yönü ve açısı	pO <sub>2</sub> saf su (%)	pO <sub>2</sub> hücreli ortam (%)	Eklene antifoam miktarı (ml)
0	2	4×10 <sup>5</sup>	7.11	0.005	200	45°/ yukarı	100	41.4	84

**Çizelge 4.6** BHK hücreleri ile STR’de yapılan kültürün takip çizelgesi (2. deneme).

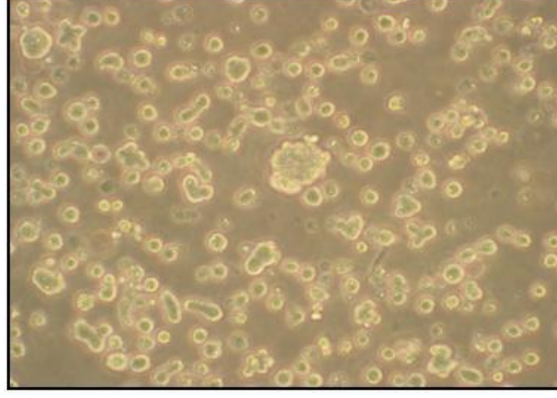
Kültür Süresi (h)	C <sub>1</sub> (hücre/ml)	C <sub>2</sub> (hücre/ml)	Çalışma Hacmi (L)	Değiştirilen ortam miktarı (L)	pH <sub>1</sub>	% pO <sub>2</sub>
2	-	-	2	-	-	35.8
44	1.07×10 <sup>6</sup>	4×10 <sup>5</sup>	2	0.25	6.87	29.5
46	-	-	2	-	6.9	28.7
72	-	-	2	-	6.9	2.2
115	-	-	2	-	6.79	6.6
122	1.74×10 <sup>6</sup>	4×10 <sup>5</sup>	2	1,5	6.77	6.6
140	-	-	2	-	7.01	13.5
166	1.26×10 <sup>6</sup>	-	2	-	6.8	9.4

**Çizelge 4.7** BHK hücreleri ile STR’de yapılan kültürün başlangıç koşulları (3. deneme).

Zaman (h)	Çalışma Hacmi (L)	C <sub>0</sub> (hücre/ml)	pH <sub>0</sub>	Havalandırma hızı (vvm)	Karıştırma hızı (rpm)	Karıştırıcı yönü ve açısı	pO <sub>2</sub> saf su (%)	pO <sub>2</sub> hücreli ortam (%)	Eklene antifoam miktarı
0	2	4×10 <sup>5</sup>	7.28	0.05	200	45°/ yukarı	100	40.9	3 ml

**Çizelge 4.8** BHK hücreleri ile STR’de yapılan kültürün takip çizelgesi (3. deneme).

Kültür süresi (h)	C <sub>1</sub> (hücre/ml)	C <sub>2</sub> (hücre/ml)	Çalışma Hacmi (L)	Değiştirilen ortam miktarı (mL)	pH <sub>1</sub>	Toplam eklene antifoam miktarı ve konsantrasyonu	% pO <sub>2</sub>
0	7.4×10 <sup>5</sup>	4×10 <sup>5</sup>	2	2000	7.05	4	25.5
24	-	-	2	-	7.43	4	20
72	5.2×10 <sup>5</sup>	4×10 <sup>5</sup>	2	500	7.36	4	18
120	8.33×10 <sup>5</sup>	-	2	-	7.25	4	16.5



**Şekil 4.4** 3. deneme sonunda yoğun hücre ve hücre kümelerinin mikroskopik görünümü (20X) (Olympus, Japonya).

NaHCO<sub>3</sub> kullanmadan orta havalandırma hızında (0.02 vvm) (deneme 4) BHK An<sub>30</sub> hücrelerinin karıştırmalı biyoreaktörde üretimi sırasında kültürün başlangıç koşulları ve proses boyunca gözlemlenen parametreler ve alınan sonuçlar Çizelge 4.9 ve 4.10'da verilmiştir.

**Çizelge 4.9** BHK hücreleri ile STR'de yapılan kültürün başlangıç koşulları (4. deneme ).

Kültür süresi (h)	Çalışma Hacmi (L)	C <sub>0</sub> (hücre/ml)	pH <sub>1</sub>	Havalandırma Hızı (vvm)	Karıştırma Hızı (rpm)	Karıştırıcı Yönü ve Açısı	pO <sub>2</sub> saf su (%)	pO <sub>2</sub> hücreli ortam (%)	Eklenecek antifoam miktarı (ml)
0	1,5	4×10 <sup>5</sup>	7.28	0.02	150	45° / yukarı	100	21	1

**Çizelge 4.10** BHK hücreleri ile STR'de yapılan kültürün takip çizelgesi (4. deneme).

Kültür Saati (h)	C <sub>1</sub> (hücre/ml)	C <sub>2</sub> (hücre/ml)	Çalışma Hacmi (L)	Değiştirilen ortam miktarı (mL)	pH <sub>1</sub>	Kümülatif antifoam miktarı (ml)	% pO <sub>2</sub>
24	-	-	2	500	6.8	1	13
72	1,63×10 <sup>6</sup>	4×10 <sup>5</sup>	2	1500	6.7	1	15
97	-	-	2	-	6.73	1	7.2
120	1,34×10 <sup>6</sup>	4×10 <sup>5</sup>	2	1400	6.79	1	8,4
167	9,8×10 <sup>5</sup>	4×10 <sup>5</sup>	2	1200	6,82	1	6,3
262	7,5×10 <sup>5</sup>	4×10 <sup>5</sup>	2	1000	6,59	1	13,2
286	1,4×10 <sup>6</sup>	-	2	-	6,6	2	11,1

BHK An<sub>30</sub> ile çalışılan üretim sistemlerinin karşılaştırılması Çizelge 4.11'de verilmiştir.

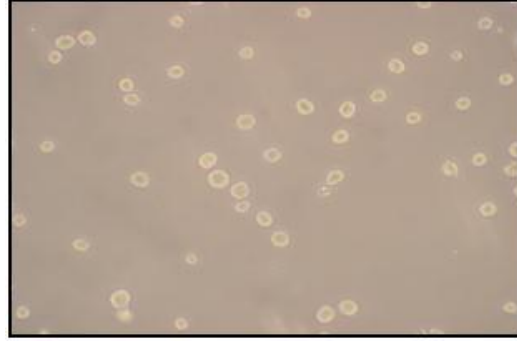
Çizelge 4.11 BHK An<sub>30</sub> ile çalışılan üretim sistemlerinin karşılaştırılması.

Sistem	Çalışma hacmi (ml)	Sistemin kültür süresi (saat)	C <sub>0</sub> (hücre/ml)	C <sub>max</sub> (hücre/ml)	*t <sub>max</sub> (gün)	Üreme hızı (Hücre/gün)
Döner sistem	850 cm <sup>2</sup> + 200 ml	-	8,50E+06	8	9,65E+07	1,10E+07
Vibroreaktör	2000	96	7,00E+05	3,50E+06	2	1,40E+06
Karıştırmalı reaktör (NaHCO <sub>3</sub> )	2000	44	5,00E+05	1,80E+06	2	1,30E+06
Karıştırmalı reaktör (0.005 vvm)	2000	122	4,00E+05	1,74E+06	3	4,47E+05
Karıştırmalı reaktör (0.05 vvm)	2000	214	4,00E+05	8,33E+05	2	2,17E+05
Karıştırmalı reaktör (0.02 vvm)	2000	72	4,00E+05	1,63E+06	3	4,10E+05

\*t<sub>max</sub>: En yüksek hücre konsantrasyonuna ulaşıncaya kadar geçen kültür süresi.

### 4.3 Miyeloma Hücreleri ile Karıştırmalı Biyoreaktörde Üretim Optimizasyonu

Miyeloma hücreleriyle STR, 60 rpm karıştırma ve 0.02 vvm (BHK ile yapılan çalışmadan elde edilen veriler doğrultusunda) havalandırma hızında, %40 çözülmüş oksijen “set” değerinde (kaskat sistemi sparger havalandırmasına bağlı) ve %5 CO<sub>2</sub> hava doyumluğunda çalıştırıldı. Ancak bu koşullarda çözülmüş oksijen değerinin %70'lere ulaşması nedeniyle, kültürün 1. gününde çözülmüş oksijenin istenilen değerlerde tutulması azot ve oksijen gazlarının karışımı ile ayarlanmaya başlandı. Reaktördeki sıcaklığın belirli değerlerde tutulması için ceket sistemi kullanıldı. Ancak, ceketten çok yüksek sıcaklıkta su geçirerek ortam sıcaklığının set değerine getirilmesi, ceketin hemen yakınlarında bulunan hücrelere zarar vermektedir. Bu parametrelerin uygun değerlerde, hücrelere zarar vermeden sistemde kontrol edilebilmesi için PI-kontrol sistemi ile optimizasyon işlemi yapıldı. Reaktörde pH'nın kontrol edilmesi kaskat sistemi olarak CO<sub>2</sub> gazı kullanıldı. (Çizelge 4.12, 4.13 ve 4.14). Bu koşullarda ortam pH'ının 7.0 civarlarında olduğu görüldü (Şekil 3.8). Üretimin son gününde yapılan örneklemede mikroskop altında incelendiğinde hücre canlılığının ve hücrelerin membran bütünlüğünün istenilen düzeyde olduğu görülmüştür. (Şekil 4.5).



**Şekil 4.5** Reaktördeki üretimin 11. gününde Ag8 miyeloma hücrelerinin mikroskop altındaki görünümü (20X) (Olympus, Japonya).

**Çizelge 4.12** Miyeloma hücreleri ile STR’de üretim sırasında takip edilen parametreler ve sonuçlar.

Kültür süresi (gün)	C (hücre/ml)	pH	Kullanılan Antifoam miktarı	Antifoam konsantrasyonu (%v/v)	pO <sub>2</sub> (%)	Değiştirilen besi ortamı miktarı (ml)
0	6,00E+05	7,57	0	0	7,6	0
1		7,21	14	0,09	44,1	0
2	2,00E+05	7,17	0	0,09	47,2	0
3	1,20E+05	7,05	13	0,14	42,4	500
4	1,77E+05	7,06	0	0,07	40,1	500
7	3,60E+05	7,15	10	0,16	40,3	500
9	1,50E+05	7,09	0	0,07	40,2	500
11	2,20E+05	7,04	0	0,07	40,5	-

**Çizelge 4.13** Kontrol edilen parametrelerin optimizasyon öncesi değerleri.

Kontrol edilen parametre	Set değeri	Min	Max	Xp	TI	TD	DeadB	Cmode
pO <sub>2</sub>	%40	-%100	+%100	%90	50s	0s	%0.5	Auto
Sıcaklık (°C)	36.8	%0	%62	%20	300s	75	%0.0	Auto
Ceket sıcaklığı (Jtemp)	-	-%100	+%100	%4	0s	0s	%0.0	Auto
Havalandırma hızı (GF-SP)	0.02 vvm	-	-	-	-	-	-	Auto
Karıştırma hızı	60 rpm	-	-	-	-	-	-	Auto

#### 4.4 5A8 Hibridoma Klonunun Döner Şişelerde Üretimi

Döner şişelerde üretim, hem ölçek büyütme işlemi hem de üç farklı koşulda (serumsuz ortam, %5 FCS ve %10 FCS içeren DMEM Ham’s F/12 besi ortamı içerisinde) pilot ölçekli üretim amacıyla gerçekleştirildi. Döner şişeler ile yapılan



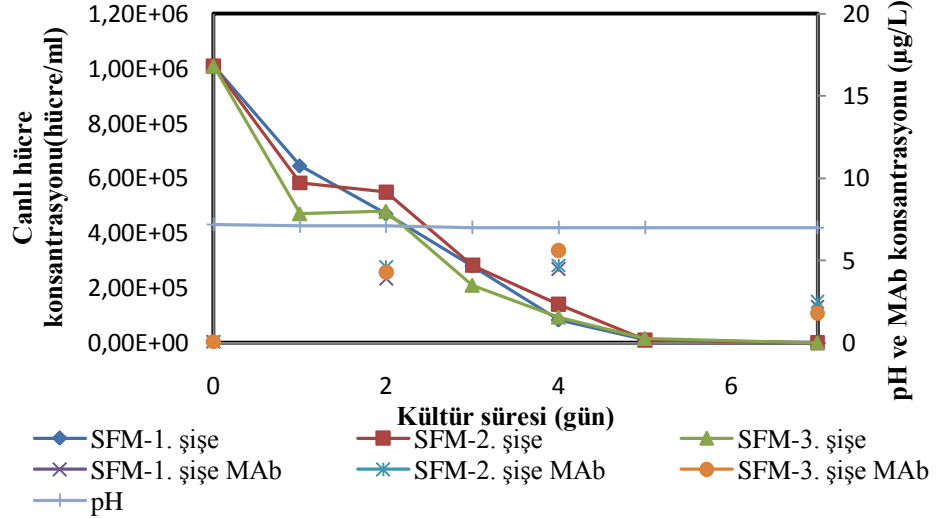
pilot ölçekli üretimden alınan sonuçlar Çizelge 4.15, 4.16 ve 4.17’de ve Şekil 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10 ve 4.11’de verilmiştir.

**Çizelge 4.14** Kontrol edilen parametrelerde optimizasyon sonrası değerler.

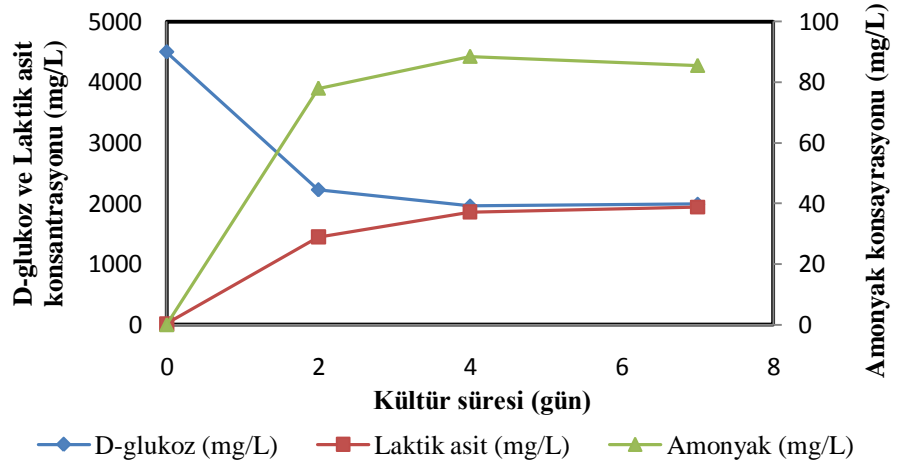
Kontrol edilen parametre	Set değeri	Min	Max	Xp	TI	TD	DeadB	Cmode
pO <sub>2</sub>	%40	-%35	+%35	%90	70s	0s	%0.5	Auto
Sıcaklık	36.8	%0	%62	%20	300s	75	%0.0	Auto
Ceket sıcaklığı (Jtemp)	Max 38C	-%100	+%10	%4	0s	0s	%0.0	Auto
Havalandırma hızı (GF-SP)	0.07 vvm	-	-	-	-	-	-	Auto
Karıştırma Hızı	60 rpm	-	-	-	-	-	-	Auto

**Çizelge 4.15** 5A8 hibridoma klonunun yivli yüzeyli döner şişerlerde serumsuz ortamda üretim parametreleri.

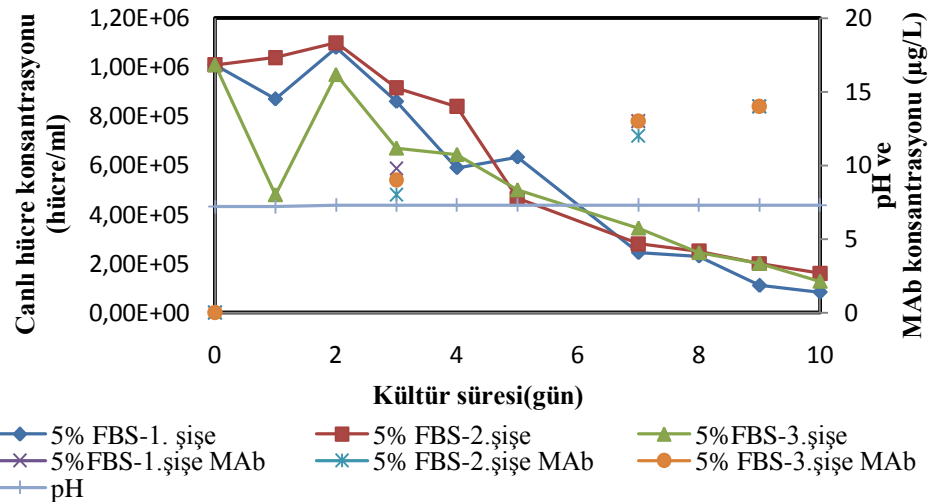
Gün	Şişe no	C <sub>canlı</sub> (hücre/ml)	C <sub>ölü</sub> (hücre/ml)	% Canlılık	pH
0	1	1,01E+06	1,23E+06	45,2	7,2
	2	1,01E+06	1,23E+06	45,2	7,2
	3	1,01E+06	1,23E+06	45,2	7,2
1	1	6,45E+05	1,10E+06	37,0	7,1
	2	5,83E+05	8,40E+05	41,0	7,1
	3	4,71E+05	8,60E+05	35,4	7,1
2	1	4,70E+05	1,14E+06	29,2	7
	2	5,50E+05	1,26E+06	30,4	7
	3	4,80E+05	1,30E+06	27,0	7
3	1	2,80E+05	1,75E+06	13,8	7
	2	2,83E+05	1,70E+06	14,3	7
	3	2,10E+05	1,45E+06	12,7	7
4	1	8,30E+04	1,75E+06	4,5	7
	2	1,40E+05	1,80E+06	7,2	7
	3	9,40E+04	1,55E+06	5,7	7
5	1	1,10E+04	2,50E+06	0,4	7
	2	1,10E+04	2,15E+06	0,5	7
	3	1,60E+04	1,55E+06	1,0	7
7	1	0,00E+00	1,85E+06	0,0	7
	2	0,00E+00	1,80E+06	0,0	7
	3	0,00E+00	2,00E+06	0,0	7



Şekil 4.6 5A8 hibridoma klonunun serumsuz ortamda döner şişelerde üretiminde zamana bağlı canlı hücre konsantrasyonu, pH ve MAb miktarının değişimi.



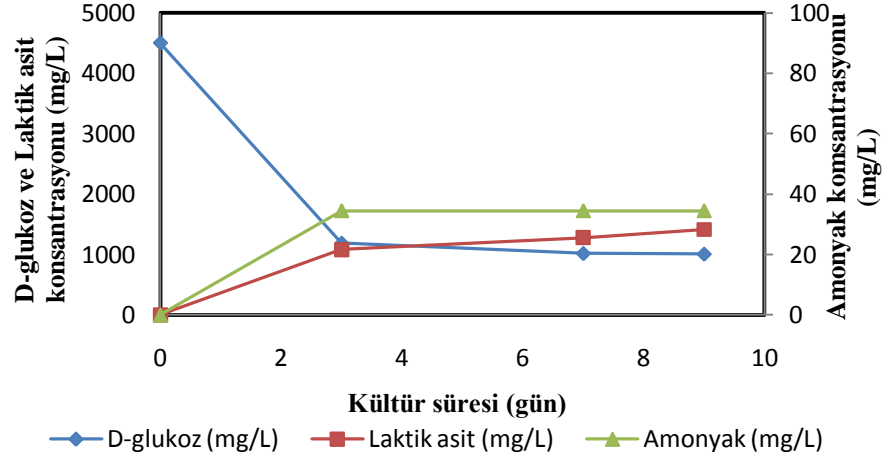
Şekil 4.7 5A8 hibridoma klonunun serumsuz ortamda döner şişelerde üretiminde zamana bağlı D-glukoz, laktik asit ve amonyak miktarının değişimi.



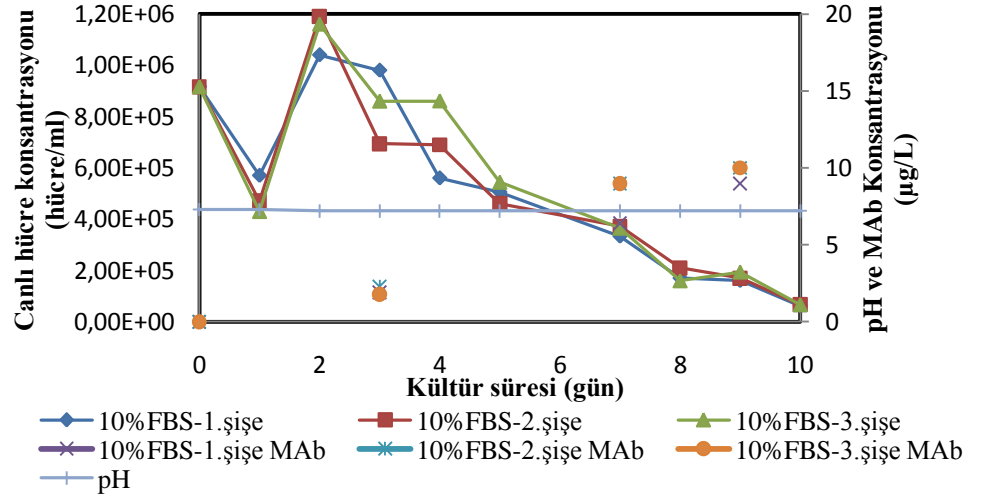
Şekil 4.8 5A8 hibridoma klonunun %5 FCS içeren DMEM Ham's F/12 ortamında döner şişelerde üretiminde zamana bağlı canlı hücre konsantrasyonu, pH ve MAb miktarının değişimi.

**Çizelge 4.16** 5A8 hibridoma klonunun yivli yüzeyli döner şişerlerde %5 FCS içeren DMEM Ham's F/12 ortamında üretim parametreleri.

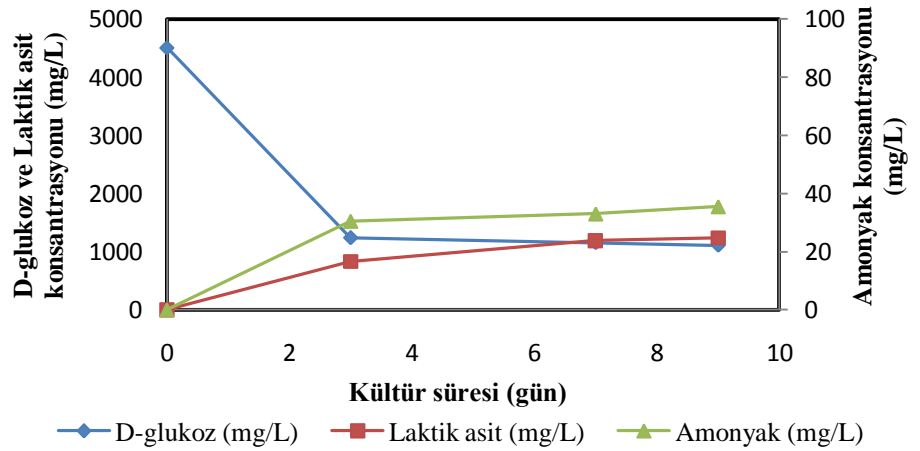
Gün	Şişe no	C <sub>canlı</sub> (hücre/ml)	C <sub>ölü</sub> (hücre/ml)	% Canlılık	pH
0	1	1,01E+06	1,23E+06	45,2	7,2
	2	1,01E+06	1,23E+06	45,2	7,2
	3	1,01E+06	1,23E+06	45,2	7,2
1	1	8,70E+05	1,08E+06	44,6	7,2
	2	1,04E+06	9,60E+05	52,0	7,2
	3	4,80E+05	7,50E+05	39,0	7,2
2	1	1,08E+06	1,16E+06	48,2	7,3
	2	1,10E+06	9,60E+05	53,4	7,3
	3	9,70E+05	1,02E+06	48,7	7,3
3	1	8,60E+05	1,65E+06	34,3	7,3
	2	9,16E+05	1,85E+06	33,1	7,3
	3	6,70E+05	1,35E+06	33,2	7,3
4	1	5,90E+05	1,55E+06	27,6	7,3
	2	8,40E+05	1,95E+06	30,1	7,3
	3	6,44E+05	1,50E+06	30,0	7,3
5	1	6,33E+05	2,60E+06	19,6	7,3
	2	4,66E+05	2,00E+06	18,9	7,3
	3	5,00E+05	2,10E+06	19,2	7,3
7	1	2,44E+05	1,90E+06	11,4	7,3
	2	2,80E+05	2,20E+06	11,3	7,3
	3	3,44E+05	1,55E+06	18,2	7,3
8	1	2,30E+05	1,45E+06	13,7	7,3
	2	2,50E+05	2,20E+05	53,2	7,3
	3	2,44E+05	1,65E+06	12,9	7,3
9	1	1,10E+05	1,20E+06	8,4	7,3
	2	2,00E+05	2,20E+06	8,3	7,3
	3	2,00E+05	2,10E+06	8,7	7,3
10	1	8,30E+04	1,45E+06	5,4	7,3
	2	1,60E+05	2,05E+06	7,2	7,3
	3	1,27E+05	2,05E+06	5,8	7,3



Şekil 4.9 5A8 hibridoma klonunun %5 FCS içeren DMEM Ham's F/12 ortamında döner şişelerde üretiminde zamana bağlı D-glukoz, laktik asit ve amonyak miktarının değişimi.



Şekil 4.10 5A8 hibridoma klonunun %10 FCS içeren DMEM Ham's F/12 ortamında döner şişelerde üretiminde zamana bağlı canlı hücre konsantrasyonu, pH ve MAb miktarının değişimi.



Şekil 4.11 5A8 hibridoma klonunun %10 FCS içeren DMEM Ham's F/12 ortamında döner şişelerde üretiminde zamana bağlı D-glukoz, laktik asit ve amonyak miktarının değişimi.

**Çizelge 4.17** 5A8 hibridoma klonunun yivli yüzeyli döner şişerlerde %10 FCS içeren DMEM Ham's F/12 ortamında üretim parametreleri.

Gün	Şişe no	C <sub>canlı</sub> (hücre/ml)	C <sub>Ölü</sub> (hücre/ml)	%Canlılık	pH
0	1	9,16E+05	1,37E+06	40,1	7,2
	2	9,16E+05	1,37E+06	40,1	7,2
	3	9,16E+05	1,37E+06	40,1	7,2
1	1	5,70E+05	8,80E+05	39,3	7,2
	2	4,71E+05	1,16E+06	28,9	7,2
	3	4,30E+05	1,10E+06	28,1	7,2
2	1	1,04E+06	1,30E+06	44,4	7,2
	2	1,19E+06	9,40E+05	55,9	7,2
	3	1,16E+06	1,56E+06	42,6	7,2
3	1	9,80E+05	2,10E+06	31,8	7,2
	2	6,94E+05	1,45E+06	32,4	7,2
	3	8,60E+05	1,55E+06	35,7	7,2
4	1	5,60E+05	2,35E+06	19,2	7,2
	2	6,90E+05	1,85E+06	27,2	7,2
	3	8,61E+05	1,80E+06	32,4	7,2
5	1	5,05E+05	2,25E+06	18,3	7,2
	2	4,61E+05	1,90E+06	19,5	7,2
	3	5,44E+05	1,95E+06	21,8	7,2
7	1	3,33E+05	2,05E+06	14,0	7,2
	2	3,72E+05	2,60E+06	12,5	7,2
	3	3,65E+05	1,55E+06	19,1	7,2
8	1	1,70E+05	1,55E+06	9,9	7,2
	2	2,10E+05	2,30E+06	8,4	7,2
	3	1,60E+05	1,80E+06	8,2	7,2
9	1	1,60E+05	2,25E+06	6,6	7,2
	2	1,70E+05	1,95E+06	8,0	7,2
	3	1,94E+05	1,60E+06	10,8	7,2
10	1	6,10E+04	1,60E+06	3,7	7,2
	2	6,70E+04	1,55E+06	4,1	7,2
	3	6,70E+04	1,70E+06	3,8	7,2

#### **4.5 5A8 Hibridoma Klonunun %10 (v/v) FCS İçeren Ortamda Karıştırmalı Tank Biyoreaktörde Mikrosparger ile Sağlanan 0.02 vvm Havalandırma Hızı ve %40 Çözünmüş Oksijen Satürasyonunda Üretimi**

5A8 hibridoma klonunun %10 (v/v) FCS içeren ortamda STR'de mikrosparger ile 0.02 vvm havalandırma ve %40 çözünmüş oksijen satürasyonunda üretimi sırasında elde edilen sonuçlar Çizelge 4.18'de verilmiştir.

Çizelge 4.18 Üretim sırasında takip edilen parametreler.

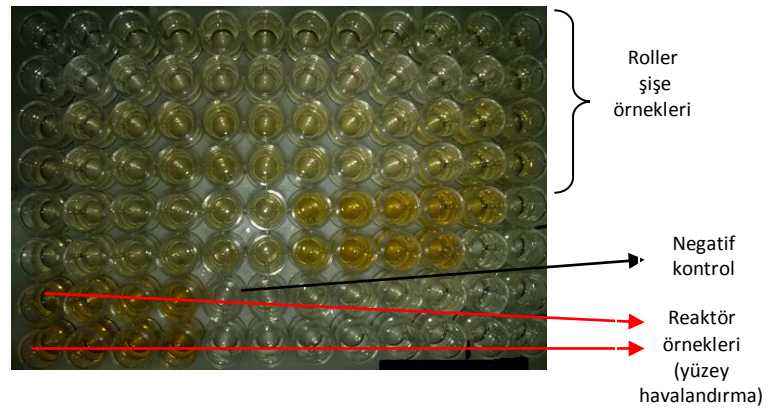
Gün	C <sub>canlı</sub> (hücre/ml)	pH	pO <sub>2</sub> (%)	Beslenen antifoam miktarı (ml)	Ortamdaki köpük kırıcı konsantrasyonu % (v/v)	Değiştirilen besi ortamı hacmi (ml)	Besi ortamı hacmi (ml)
0	6,60E+05	6,7	40,6	25	0,16	0	1500
2	1,33E+05	6,62	41,2	0	0,16	500	2000
4	0	7,02	40,3	0	0,08	700	2000

#### 4.6 5A8 Hibridoma Klonunun %10 (v/v) FCS İçeren Ortamda Karıştırmalı Tank Biyoreaktörde Yüzeysel Havalandırma Koşullarında Üretimi

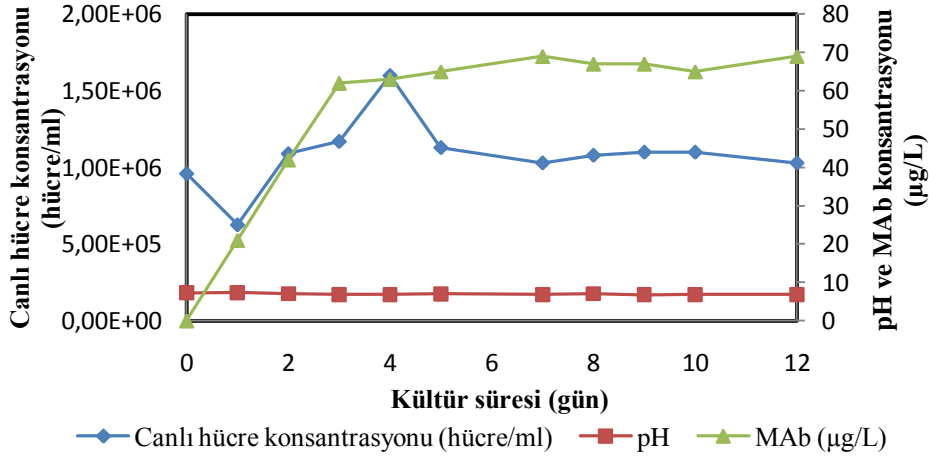
5A8 hibridoma klonunun %10 (v/v) FCS içeren ortamda STR'de yüzeysel havalandırma koşullarında üretimi sırasında takip edilen parametreler ve alınan sonuçlar Çizelge 4.19 ve Şekil 4.12, 4.13 ve 4.14'de verildi.

Çizelge 4.19 Üretim sırasında takip edilen parametreler.

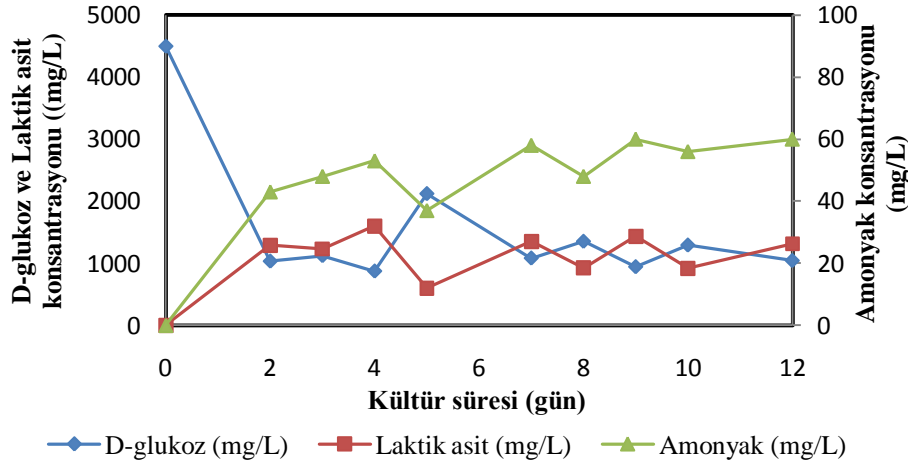
Gün	C <sub>canlı</sub> (hücre/ml)	C <sub>ölü</sub> (hücre/ml)	% Canlılık	pH
0	9,60E+05	1,40E+06	40,7	7,28
1	6,26E+05	8,80E+05	41,6	7,3
2	1,09E+06	9,80E+05	52,7	7,03
3	1,17E+06	8,30E+05	58,5	6,85
4	1,60E+06	1,50E+06	51,6	6,83
5	1,13E+06	1,02E+06	52,6	6,98
7	1,03E+06	8,50E+05	54,8	6,82
8	1,08E+06	1,35E+06	44,4	7,03
9	1,10E+06	1,00E+06	52,4	6,73
10	1,10E+06	7,25E+05	60,3	6,83
12	1,03E+06	8,50E+05	54,8	6,8



Şekil 4.12 5A8 hibridoma klonunun döner şişelerde ve karıştırmalı tank biyoreaktörde yüzeysel havalandırma koşullarında kültürü sırasında MAb üretiminin belirlenmesi için kullanılan ELISA pleytinin görünümü.



Şekil 4.13 5A8 hibridoma klonunun %10 (v/v) FCS içeren ortamda karıştırılmalı tank biyoreaktörde yüzey havalandırma koşullarında üretimi sırasında zamana bağlı canlı hücre konsantrasyonu, pH ve MAb miktarının değişimi.



Şekil 4.14 5A8 hibridoma klonunun %10 (v/v) FCS içeren ortamda karıştırılmalı tank biyoreaktörde yüzey havalandırma koşullarında üretimi sırasında zamana bağlı D-glukoz, laktik asit ve amonyak miktarının değişimi.

#### 4.7 5A8 Hibridoma Klonunun Karıştırılmalı Tank Biyoreaktörde Makrosparger Kullanımı İle Serum İçermeyen Ortamda 4 Litrede Üretimi

Mikrosparger ile yapılan üretimlerde, oluşan kayma gerilimi etkisiyle hücrelerdeki canlılığın hızla düştüğü görüldü. Yüzey havalandırma ile ise hücre canlılığının ve hücrelerin metabolik aktivitelerinin daha iyi olduğu görüldü. Fakat 4 L üretimde sadece yüzey havalandırmanın yetersiz kalacağı ve aynı zamanda mikrosparger'in da kayma gerilimi etkisi düşünülerek makrosparger kullanılmaya başlandı. Bu nedenle, 1 mm gözenek çapına sahip tek bir gözeneği bulunan paslanmaz çelik makrosparger temin edildi (Şekil 3.12). Bu süreçten sonraki

üretimlerin hepsi makrosparger ile yapıldı. Bu üretimde serumlu ortam kullanımının oluşturduğu dezavantajlardan ötürü serumsuz ortamda üretim gerçekleştirildi.

STR'de serumsuz ortamda 4L'de üretime geçilmeden önce %10 FCS içeren DMEM Ham's F/12 besi ortamı içerisinde ölçek büyütme işlemi yapıldı. Bu süreçte takip edilen parametreler ve işletme değişkenlerinde uygulanan değişiklikler Çizelge 4.20' ve Şekil 4.15, 4.16 ve 4.17'de verildi.

**Çizelge 4.20** Reaktörde serumsuz ortamda 4L'de üretime geçilmeden önce %10 FCS içeren DMEM Ham's F/12 besi ortamı içerisinde ölçek büyütme sırasında reaktör koşulları.

Kültür süresi (gün)	C <sub>Canlı</sub> (hücre/ml)	C <sub>Ölü</sub> (hücre/ml)	% Canlılık	% pO <sub>2</sub>	pH	Çalışma hacmi (L)	Havalandırma hızı (L/min) (GF:SP)	Karıştırma hızı (rpm)
0	6,00E+05	1,13E+05	84,2	42%	6,8	1,6	0,025	60
1					6,8	1,6	0,025	60
2	1,10E+06	2,00E+05	84,6	12%	6,6	1,6	0,025	60
2 (İ.S)*	5,90E+05	1,00E+05	85,5	27,2%	6,96	2	0,075	60
3**				1%		3	0,1	60
5**	9,50E+05	4,25E+05	69,1	0%	6,53	3	0,1	60
5 (İ.S)*	7,10E+05	3,18E+05	69,1	40%	6,9	4	0,1	60
7	7,00E+05	3,00E+05	70,0	40%	6,6	4	0,1	100
8	7,70E+05	6,25E+05	55,2	35%	6,57	4	0,15	120
8 (İ.S)*	6,75E+05	5,46E+05	55,3	43%	6,7	4	0,15	120
9**	9,63E+05	4,38E+05	68,8	0%	6,34	4	0,2	120
10	1,00E+06	3,35E+05	74,9	40%	6,45	4	0,2	120

İ.S\* Reaktörde hücre konsantrasyonu ve pH ölçümü sonrasında uygulanan işlemden sonra reaktör koşulları. \*\* 3., 5. ve 9. günlerde O<sub>2</sub> tüpünün bitmesi nedeniyle bir süre kültür ortamı içerisindeki çözülmüş oksijen değeri düşmüştür.

**Çizelge 4.21** 5A8 hibridoma klonunun serum içermeyen ortamda (SFM) STR'de kültürü sırasında takip edilen parametreler.

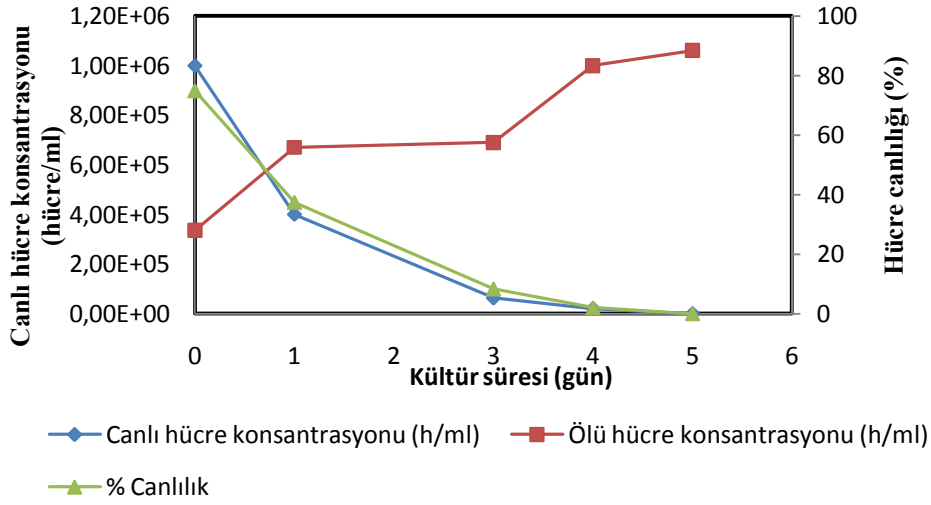
Kültür süresi (gün)	C <sub>Canlı</sub> (hücre/ml)	C <sub>Ölü</sub> (hücre/ml)	% Canlılık	pH	pO <sub>2</sub>
0	1,00E+06	3,35E+05	74,90637	7,55	35,5%
1*	4,00E+05	6,70E+05	37,38318	7,3	0,0%
3	6,25E+04	9,00E+05	6,493506	7,25	13,4%
4	2,00E+04	6,20E+05	3,125	7,29	29,40%
5	0,00E+00	1,06E+06	0	7,35	28,20%

\* SFM ortamında üretime geçildikten sonra O<sub>2</sub> tüpünde meydana gelen sorun sebebiyle ortamda O<sub>2</sub> kontrolü yapılmadan üretim gerçekleştirildi. Ortam içerisindeki oksijen yalnızca havalandırma ile sağlandı. Ayrıca hücre ölümleriyle korale şekilde O<sub>2</sub> konsantrasyonunda artış görüldü.

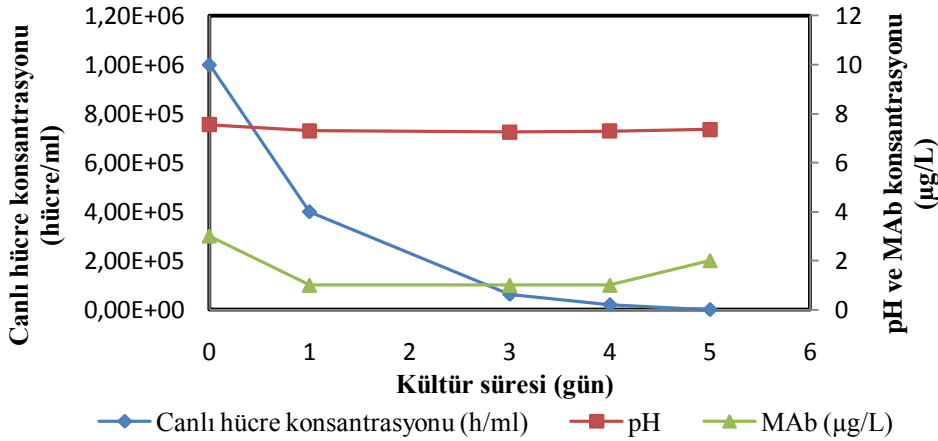
5A8 hibridoma klonunun 4 L'de serum içermeyen ortamda STR'de kültürü sırasında köpük oluşumu meydana gelmediği için (serumsuz ortam



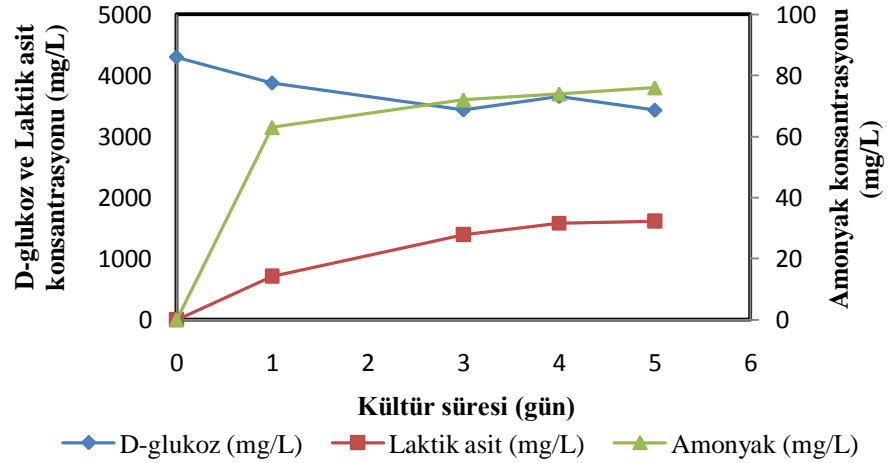
kullanıldığından) köpük kırıcı kullanımına ihtiyaç duyulmadı. Kültürde takip edilen parametreler ve alınan veriler Çizelge 4.21’de verildi.



Şekil 4.15 5A8 hibridoma hüresinin 4 L SFM ortamında karıştırmalı tank biyoreaktörde canlı hücre konsantrasyonu ve % hücre canlılığının belirlenmesi.



Şekil 4.16 5A8 hibridoma klonunun 4 L SFM ortamında karıştırmalı tank biyoreaktörde canlı hücre konsantrasyonu, pH değişimi ve O:9 (LPS) Salmonella antijen spesifik MAb konsantrasyonu.



Şekil 4.17 5A8 hibridoma hücresinin 4 L SFM ortamında karıştırılmalı tank biyoreaktörde besi ortamındaki D-glukoz, laktik asit ve amonyak konsantrasyonlarındaki değişimler.

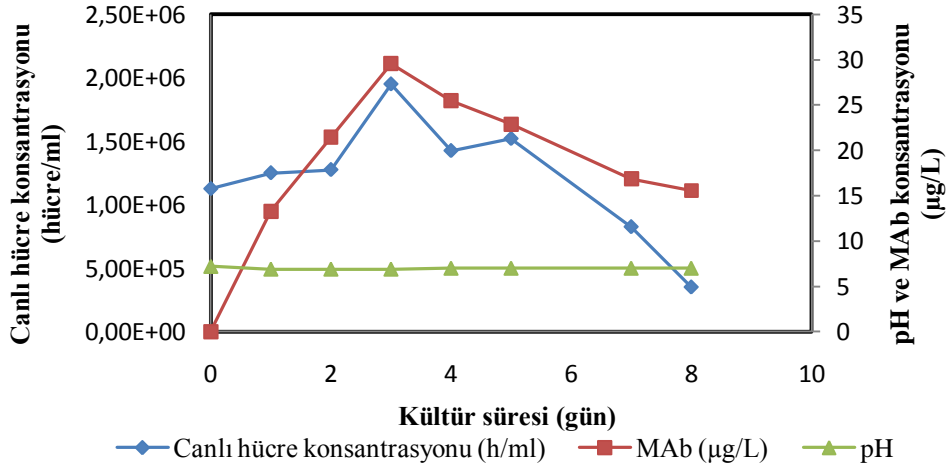
#### 4.8 5A8 Hibridoma Klonunun Stasyoner Kültürde Üreme Kinetiğinin Belirlenmesi

SFM ortamında MAb titresinin çok düşük olması nedeniyle, hücrelerin hala MAb üretilip/üretmediklerinin kontrolü için stasyoner fazda üreme kinetiği çıkarıldı. 5A8 hibridoma klonunun stasyoner fazda üremesi sırasında alınan sonuçlar Çizelge 4.22 ve Şekil 4.18’de verildi.

Çizelge 4.22: 5A8 hibridoma klonunun stasyoner fazda üreme parametreleri.

Kültür süresi (gün)	$C_{Canlı}$ (hücre/ml)	$C_{Ölü}$ (hücre/ml)	%Canlılık	pH	MAb ( $\mu$ g/L)
0	1,13E+06	1,10E+05	91,1	7,2	0
1	1,25E+06	4,75E+05	72,5	6,9	13,299
2	1,28E+06	2,00E+05	86,4	6,9	21,442
3	1,95E+06	5,00E+05	79,6	6,9	29,561
4	1,43E+06	2,65E+06	35,0	7	25,479
5	1,52E+06	2,23E+06	40,6	7	22,888
7	8,25E+05	3,30E+06	20,0	7	16,869
8	3,50E+05	1,00E+07	3,4	7	15,569
				FCS	0
				Kontrol (+) (PAb)	70

İndirekt ELISA’da (+) kontrol olarak, LPS’e karşı MAb üretiminde LPS ile immunize edilmiş farelere ait poliklonal antikor (PAb) titresi kullanıldı.



**Şekil 4.18** 5A8 hibridoma klonunun üreme kinetiği çalışmasında canlı hücre konsantrasyonu ve MAb konsantrasyonunun zamana göre değişimi.

Stasyonere kültürden alınan sonuçlar, 5A8 klonunun hala daha MAb ürettiğini ayrıca, bu çalışma ve daha önce kesikli kültürde yapılan çalışmalar en yüksek MAb üretiminin kültürün 3. ve 4. günlerinde olduğunu gösterdi.

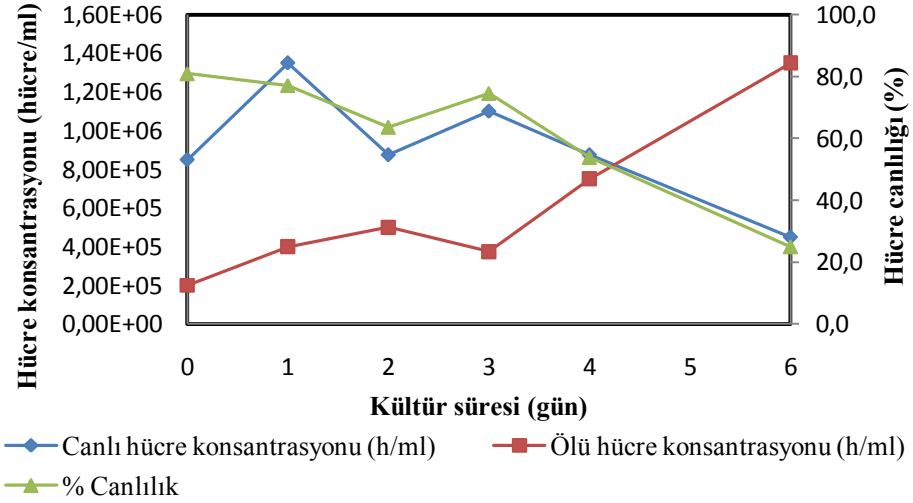
#### 4.9 5A8 Hibridoma Klonunun Karıştırmalı Tank Biyoreaktörde Makrosparger Kullanımı ile %10 (v/v) Serum İçeren Ortamda 4 Litrede Üretimi

5A8 hibridoma klonunun STR'de makrosparger kullanımı ile %10 (v/v) serum içeren ortamda 4 litrede üretimi öncesince 5A8 hibridoma hücre kültürünün %10 (v/v) serum içeren ortamda STR'de ölçek büyütme işlemi sırasında alınan sonuçlar Çizelge 4.23'de verildi.

**Çizelge 4.23** 5A8 hibridoma kültürünün %10 (v/v) serum içeren ortamda karıştırmalı tank biyoreaktörde ölçek büyütme işleminin sırasında belirlenen parametreler.

Zaman (gün)	C <sub>Canlı</sub> (hücre/ml)	C <sub>Ölü</sub> (hücre/ml)	% Canlılık	pH	MAb (µg/L)	pO <sub>2</sub> (%)
0	1,20E+06	1,75E+05	87,3	6,8	10	40
1	1,60E+06	2,50E+05	86,5	6,64	19	40
2	1,25E+06	9,37E+05	57,2	6,3	18	40
4	1,50E+06	3,40E+05	81,5	6,7	18	0
6	1,10E+06	4,00E+05	73,3	6,5	22	0

5A8 hibridoma kültürünün %10 (v/v) serum içeren ortamda STR'de 4 L'de kesikli modda üretimi sırasında alınan sonuçlar Çizelge 4.24, Şekil 4.19, 4.20 ve 4.21'de verildi.

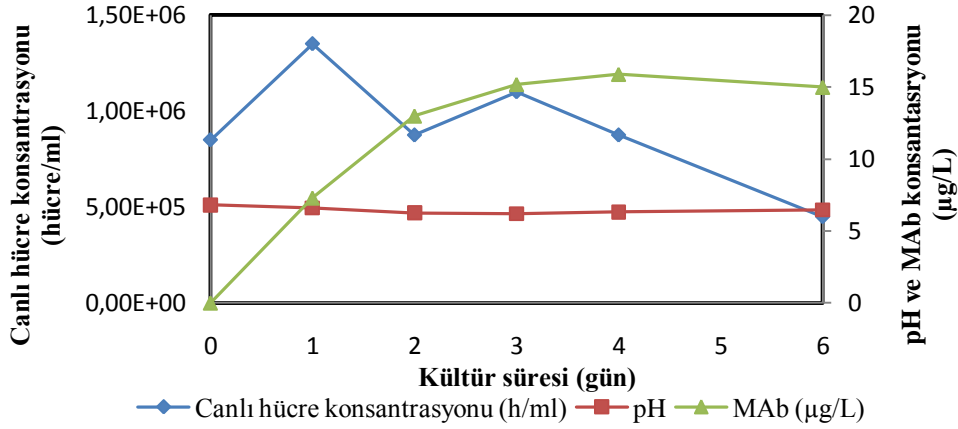


Şekil 4.19 5A8 hibridoma klonunun 4 L %10 (v/v) serumlu ortamda karıştırmalı tank biyoreaktörde canlı hücre konsantrasyonu ve % hücre canlılığı.

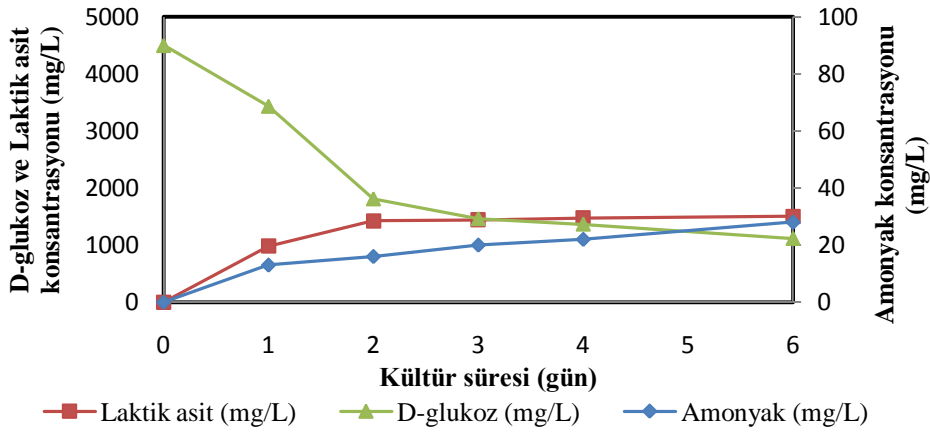
Çizelge 4.24 5A8 Hibridoma kültürünün %10 (v/v) serumlu ortamda karıştırmalı tank biyoreaktörde kültürü sırasında alınan sonuçlar.

Gün	C <sub>Canlı</sub> (hücre/ml)	C <sub>Ölü</sub> (hücre/ml)	% Canlılık	pH	MAB (µg/L)
0	8,50E+05	2,00E+05	81,0	6,82	0
1	1,35E+06	4,00E+05	77,1	6,6	7,3
2	8,75E+05	5,00E+05	63,6	6,25	13
3	1,10E+06	3,75E+05	74,6	6,2	15,2
4	8,75E+05	7,50E+05	53,8	6,32	15,9
6	4,50E+05	1,35E+06	25,0	6,47	15

Kontrol 1'den ve kontrol 2'den elde edilen sonuçlar Çizelge 4.25 ve 4.26'da verildi.



Şekil 4.20 5A8 hibridoma klonunun 4 L %10 (v/v) serumlu ortamda STR'de canlı hücre konsantrasyonu, pH değişimi ve O:9 (LPS) *Salmonella* antijen spesifik MAb konsantrasyonu.



Şekil 4.21 5A8 hibridoma klonunun 4 L %10 (v/v) serumlu ortamda karıştırmalı tank biyoreaktörde besi ortamındaki D-glukoz, laktik asit ve amonyak konsantrasyonları.

Çizelge 4.25 Kontrol 1 grubundan elde edilen sonuçlar.

Gün	C <sub>Canlı</sub> (hücre/ml)	C <sub>Ölü</sub> (hücre/ml)	% Canlılık	MAB (µg/L)
0	1,20E+06	1,75E+05	87,3	10
1	1,65E+06	1,50E+05	91,7	24
2	1,8E+06	3E+05	85,7	22
4	2,00E+06	5,00E+05	80,0	20
6*	1,70E+06	5,00E+05	77,3	39
7	2,20E+06	4,00E+05	84,6	21
8	2,50E+06	5,00E+05	83,3	24
9	2,25E+06	1,80E+06	55,6	26
10	1,98E+06	1,48E+05	93,1	30
12	1,45E+06	1,63E+05	89,9	29

\* 0. günden 6. güne kadar olan süre reaktörde ölçek büyütme sırasında, sonraki günler ise kesikli modda 4L'de üretim sırasında yapılan örnekleme sonucu elde edilen verilerdir. 7. günde MAb miktarının düşmesinin nedeni reaktör ile paralel olarak 6. günde tüm hücre süspansiyonunun toplanıp santrifüj sonrası taze ortam ile homojenize edilmesinden kaynaklanmaktadır.

**Çizelge 4.26** Kontrol 2 grubundan elde edilen sonuçlar.

Zaman (gün)	C <sub>Canlı</sub> (hücre/ml)	C <sub>Ölü</sub> (hücre/ml)	% Canlılık	MAB (µg/L)
0	8,50E+05	2,00E+05	81,0	0
1	1,20E+06	3,00E+05	80,0	8
2	2,50E+06	6,25E+05	80,0	13
3	1,98E+06	6,25E+05	76,0	17
4	1,45E+06	1,38E+06	51,3	16
6	1,60E+06	1,73E+06	48,1	20

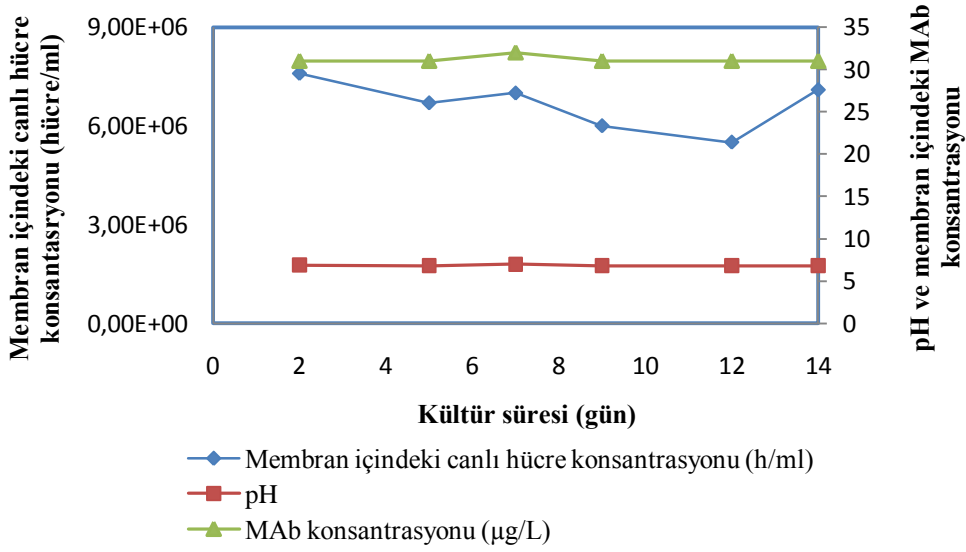
Kontrol 1 ve STR’de yapılan üretimden alınan sonuçlar karşılaştırıldığında, ölçek büyütme sırasında hücre canlılığı benzer sonuçlar verirken, üretilen MAb miktarı kontrol 1 grubunda daha fazladır. 4L’de kesikli üretime geçildiğinde de kontrol 1’de hücrelerin canlılık oranları hala yüksek iken, kontrol 2’de ve STR’de canlılık oranı daha düşüktür. Ayrıca STR’de üretilen MAb yoğunluğu her iki kontrol grubundan da düşük değerlerdedir. Bu durum reaktörün işletme parametrelerinde bir takım yanlışların olduğunu göstermektedir.

#### 4.10 5A8 Hibridoma Klonunun Statik Membran Biyoreaktör ile Kültürü ve MAb Üretimi

SMR ile üretim sırasında takip edilen parametreler ve sonuçlar Çizelge 4.27 ve Şekil 4.22’de verildi.

**Çizelge 4.27** SMR ile üretim sırasında takip edilen parametreler.

Gün	pH	Membran C <sub>Canlı</sub> (hücre/ml)	Membran C <sub>Ölü</sub> (hücre/ml)	% Canlılık	MAB (µg/L)
0	7,2	1,60E+07	0	100	33
2	6,9	7,60E+06	2,60E+06	75	31
5	6,8	6,70E+06	6,50E+06	50	31
7	7,0	1,31E+07	1,72E+07	43	32
9	6,8	6,00E+06	2,68E+07	18,3	31
12	6,8	5,50E+06	3,00E+07	15	31
14	6,8	7,10E+06	3,20E+07	18,15	31



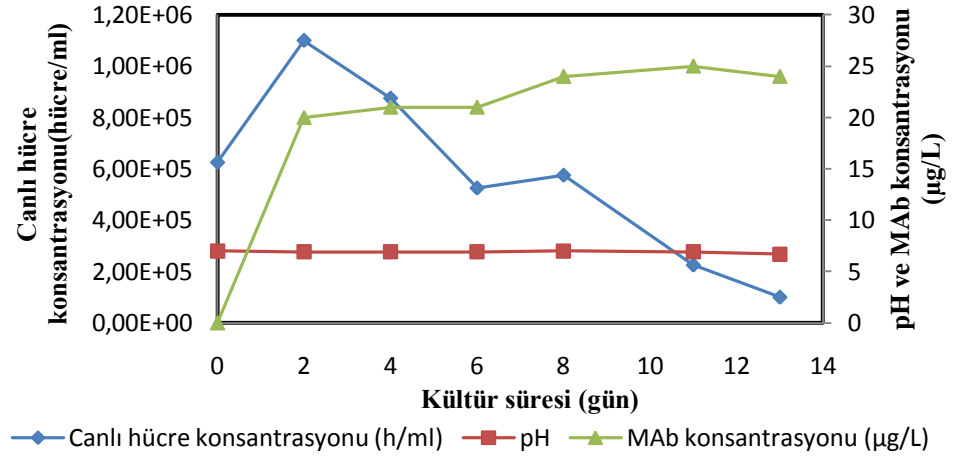
Şekil 4.22 5A8 hibridoma klonunun SMR’de üretimi sırasında canlı hücre konsantrasyonu, pH değişimi ve O:9 (LPS) *Salmonella* antijen spesifik MAb yoğunluğu.

#### 4.11 5A8 Hibridoma Klonunun Membran Havalandırmalı Biyoreaktörde Kültürü ve MAb Üretimi

MHR ile üretim sırasında takip edilen parametreler ve sonuçlar Çizelge 4.28 ve Şekil 4.23’de verildi.

Çizelge 4.28 MHR ile üretim sırasında takip edilen parametreler.

Zaman (gün)	pH	C <sub>Canlı</sub> (hücre/ml)	C <sub>Ölü</sub> (hücre/ml)	% Canlılık	Mab (µg/L)
0	7.0	6,25E+05	0,00E+00	100	0
2	6,9	1,10E+06	1,25E+05	90	20
4	6,9	8,75E+05	8,00E+05	52	21
6	6,9	5,25E+05	1,65E+06	24	21
8	7	5,75E+05	1,20E+06	32	24
11	6,9	2,25E+05	2,55E+06	8	25
13	6,7	1,00E+05	1,55E+06	6	24



**Şekil 4.23** 5A8 hibridoma klonunun MHR’de üretimi sırasında canlı hücre konsantrasyonu, pH değişimi ve O:9 (LPS) *Salmonella* antijen spesifik MAb konsantrasyonu.



## 5. TARTIŞMA

### 5.1 Monoklonal Antikor Üretiminde Üretim Sistemlerinin ve Kültür Modunun MAb Üretimine Etkisi

Antikor ya da benzeri proteinlerin üretiminde, hedef ürünün geliştirilmesinden, ölçek büyütme ve üretime kadar pek çok yöntem kullanılabilir. Bu nedenle, en yüksek verimlilikte ürün ve bunun yanında düşük maliyetli üretim için uygun kültür sisteminin ve uygun ortamın seçimi oldukça önemlidir. Üretim sistemlerinin seçiminde, kolaylığı, çalışacak kişi ve buna karşın yeni sistemlerin getirdiği maliyet oldukça önemlidir. Üretim prosesinin hem verimli, hem maliyetinin uygun olması hem de standart kalitede üretimde kullanılması için iyi kontrol edilebilir olması gerekmektedir (Kretzmer, 2002).

Bu çalışmada pilot ölçekli üretim için STR ve döner şişe sistemleri kullanılmıştır. Bu sistemlerden ve tek kullanımlık SMR ve MHR'den elde edilen sonuçlar, Şekil 4.5,4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10, 4.12, 4.13, 4.14, 4.15, 4.16, 4.17, 4.18, 4.19, 4.20, 4.21 ve 4.22'de verilmiştir. Genel olarak, kullanılan kültür sistemlerine bakıldığında (STR'de SFM üretimi hariç) en düşük hücre ve ürün konsantrasyonlarının döner şişelerde yapılan kültürlerde elde edildiği; yüksek canlı hücre ve ürün konsantrasyonlarının ise iyi kütle transfer etkinliğinin ve proses kontrolünün yapılabildiği STR'de elde edildiği görülmüştür. Döner şişe sistemlerinde düşük MAb titresi elde edilmiştir. Bunun nedeni, 1 rpm karıştırma hızının sistemde etkili kütle transferlerinin (nutrient ve oksijen-hava) gerçekleştirilmesi için yetersiz kalması, sistemde herhangi bir kontrol düzeneğinin yer almaması bununla birlikte kesikli kültür ile çalışılması olabilir. Optimum hücre büyümesi ve/veya ürün elde etmek için gerekli reaktör sistemi homojen bir çevre sağlamalı ve kolay kontrol edilebilir olmalıdır. Bu koşullar ise STR'de elde edilebilir. Bu reaktör sistemleri ayrıca süspanse hücrelerin ölçek büyütmesi sırasında da tercih edilmektedirler. Bu sistemler, biyoteknolojik proseslerdeki, pH, sıcaklık, çözünmüş oksijen gibi kritik parametrelerin ölçümüne ve kontrol edilmesine olanak sağlamaktadır. Optimum karıştırma için farklı impellerlar mevcuttur ve hücrelerin ve kültür ortamının takibi için gerekli ölçümleri yapan problarda bu sistemlere dâhil edilebilmektedir (Kretzmer 2002; Jain and Kumar, 2008). Sağladığı tüm bu avantajlardan dolayı, pilot ölçekte yüksek verimlilikte MAb üretimi için bu çalışmada STR tercih edilmiştir. Döner şişe kültürleri eritropoietin gibi özel farmositik ajanların üretiminde kullanılan

sistemlerdir. Döner şişelerdeki verimliliğin artması için kültür kabı içinde sıvı akışı ve karışımının iyileştirilmesi yönünden bazı çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar, dikey sallama hareketleriyle karıştırma hızının ve karışımın artacağını göstermiştir (Chu and Robinson, 2001). Bu tür sistemlerin kullanımı ile döner şişelerdeki verimlilik artırılabilir.

Döner şişelerde yapılan üretimlerde, 5A8 hibridoma klonunun SFM ortamlarındaki kültürlerine bakıldığında hemen ölüm fazına geçtikleri görülmüştür. Döner şişelerde %5 ve %10 FCS içeren ortamlarda yapılan üretimlerde ise hücreler ilk önce ortama adaptasyon sağlama sürecince oldukları, bu nedenle canlı hücrelerin konsantrasyonunun ilk önce düştüğü daha sonra ise arttığı ve ardından ortam bileşenleri ve kesikli kültür kullanılması nedeniyle tekrar düştüğü görülmüştür. Kesikli kültürde gaz konsantrasyonu, sıcaklık ve pH dışında başlangıç koşulları genellikle değiştirilebilir. Dutton et al., (1999)'un inokulum büyüklüğü ve şartlandırılmış ortam kullanımı ile ilgili yaptıkları çalışmada, başlangıç koşullarının süspanse kesikli kültürde MAb verimliliği ve hücre büyümesini etkilediği gösterilmiştir. Şartlandırılmış ortam oranının başlangıçta %40 olması durumunda, hücrelerin lag fazı yaşamadan ortama daha rahat adapte oldukları ve canlı hücre konsantrasyonunun arttığını bildirilmiştir. Ancak bu koşullarda spesifik ürün verimliliğinin ve konsantrasyonunun düştüğü de belirtilmiştir. Aynı çalışmada glutamin ve glukoz tüketimi ya da amonyak toksisitesinin ürün titresinde azalmaya neden olduğu belirtilmiştir. Tekrarlı-kesikli modda yapılan çalışmalarında ise, spesifik ürün verimliliğinin daha yüksek olduğu, benzer şekilde kültür sırasında besi ortamı beslemesinin kullanımı ile hem hücre yoğunluğunun hem de spesifik verimliliğin artarak hacimsel verimlilikte de artış sağladığı bildirilmiştir. Bu nedenle kesikli kültürlerin kullanımı giderek daha az kullanılmaya başlandığı Chu and Robinson (2001) tarafından yaptıkları çalışmada da belirtilmiştir. Son zamanlarda süspanse kültürlerdeki prosesler kesikli-geri beslemeli, kesikli-beslemeli veya perfüzyon kültürlerde yapılmaktadır. Bu çalışmada da kesikli kültürlerden ziyade, reaktörde ölçek büyütme sırasında olduğu gibi besi ortamı değişiminin yapıldığı (~22µg/L MAb konsantrasyonu) ya da yüzey havalandırma koşullarında yapılan üretimdeki gibi yarı-sürekli sistemlerin uygulandığı kültürlerde (~70µg/L MAb konsantrasyonu) kesikli kültürlerle göre (~15-16µg/L MAb konsantrasyonu) daha yüksek ürün titrelerine ulaşılmıştır.

Yüksek hücre yoğunluğundaki sistemlerde ve homojenizasyonunun sağlandığı sistemlerde karşılaşılan en büyük sorunlardan biri de CO<sub>2</sub> birikimine

bağlı olarak pH düşmesidir. Matsunaga et al., (2009) ortamda birikmiş olan karbondioksitin hücre büyümesini, verimliliği ve post-translasyonel modifikasyonlar sırasında polisakkarit yapısını etkilediğini göstermişlerdir. Ayrıca,  $dCO_2$ 'nin ortamdaki uzaklaştırılmasının yüzey havalandırma, ortam içerisine hava beslemesi (sparger ile) ve ortamın karıştırılması ile yapılabileceğini ancak, hacim arttığında yüzey havalandırmanın yetersiz kalacağını belirtmişlerdir. Bunun yanında, hayvan hücrelerinin ortama gaz verme ve karıştırma hızına duyarlı olması ve hemen zarar görmesi nedeniyle  $dCO_2$  birikiminin reaktörlerde kontrol edilmesinin zor olduğu vurgulanmıştır. Yüzey havalandırma üretim, T-flasklarda yapılan üretimleri taklit edebilmek amacıyla bu çalışmada denenmiş ve yüksek hücre ve ürün konsantrasyonlarına ulaşılmıştır, bu üretimde, ortamda biriken karbondioksitin süpürülüp pH'ın fazla düşmesinin engellendiği ve metabolik aktivitenin daha iyi olduğu görülmüştür.

Etkili bir hücre kültürü optimum oksijen ve besin sağlanışına ayrıca ortamdaki inhibe edici toksik metabolitlerin ortamdaki uzaklaştırılmasına bağlıdır. SMR ile yapılan üretim göstermiştir ki, membran içerisine çok yüksek konsantrasyonlarda hücre inokülasyonu yapılabilmekte ve dolayısıyla yüksek konsantrasyonda ürün oluşumu sağlanabilmektedir. Bunun nedeni hücre metabolizması sonucu oluşan inhibe edici toksik metabolitlerin membran dışına çıkarak hücrelerden uzaklaştırılmaktadır. Ayrıca, ürün hücre ile birlikte membran içinde kaldığından çok konsantre şekilde üretilebilmektedir. Bu sistemde yüksek ürün konsantrasyonuna ulaşılması nedeniyle de daha sonrasında çapraz akış filtrasyonu gibi ürün konsantrasyon işlemine ihtiyaç kalmamaktadır.

Bu çalışmada kesikli kültür koşullarında hem reaktörde yapılan ölçek büyütme işlemlerinde, hem statik kültürde üreme kinetiğinin çıkarıldığı denemelerde hem de karıştırmalı reaktörde 4L'de kesikli kültür koşullarında en yüksek hücre konsantrasyonlarına kültürün 3.- 4. günü ulaşıldığı görülmüştür. Benzer sonuçlar literatürde de bildirilmiştir. Legazpi et al., (2005) yaptıkları çalışmada hem statik hem de karıştırmalı koşullarda hücrelerin spesifik büyüme hızının 100 h inkübasyon sonrasında düştüğünü belirtmişlerdir. Bu nedenle, kesikli kültürde yapılacak olan çalışmalar kültürün ilk 4-5. gününde ve böylelikle MAb kaybı olmadan ayırma saflaştırma işlemlerine geçilebileceği düşünülmüştür.

## 5.2 Kayma Geriliminin Hayvan Hücreleri Üzerine Etkisi

Hayvan hücre kültürlerinde düşük enerji gereksinimi duyan ılımlı impellerların kullanımı ile ortam içinde karıştırma etkisiyle oluşan sıvı ve türbülans akışın dağılımı sağlanır ve böylelikle de karıştırma kaynaklı kayma gerilimi etkisi azaltılır. Kayma gerilimine neden olan bir diğer etki ise havalandırma tipi ve hızıdır (Pol and Tramper, 1998). Hücre hatları farklı havalandırma şekillerine farklı duyarlılık göstermektedir. Kabarcık içeren ortamlarda, fare hücre hatlarının türbülansa karşı insan ve böcek hücre hatlarından daha duyarlı olduğu literatürde bildirilmiştir (Czermak et al., 2005).

BHK hücreleri ile reaktörde 200 rpm karıştırma ve 0.05 vvm havalandırma hızında ve ayrıca 150 rpm karıştırma ve 0.02 vvm havalandırma hızında çalışılmıştır. Bu koşullarda kullanılan havalandırma hızları ve BHK hücrelerinin kümelenmeye eğilimli olması reaktör içinde makroskobik olarak gözlemlenebilen hücre klamplarının oluşumuna neden olmuştur (Şekil 4.4). Bunların yanına hücrelerdeki üreme hızının vibroreaktörden elde edilene göre azalmasının diğer nedenleri ise besi ortamı içerisindeki çözülmüş oksijen kısıtlanması ve reaktörün 200 rpm gibi yüksek karıştırma hızlarında çalıştırılması sonucu oluşan kayma gerilimi etkisi olabilir (Çizelge 4.11). Buna nazaran, BHK ile yapılan vibroreaktördeki üretimde, vibroreaktörün daha ılımlı bir karıştırmanın yapılması, üretim parametrelerinin daha kolay kontrol edilebilir olması, identik ve senkronize üreyen bir kültür etkisiyle daha yüksek hücre verimliliğine ulaşılmıştır.

BHK hücreleri ile yapılan çalışmada optimum havalandırma hızının 0.02 vvm olduğu görülmüş yalnız miyeloma hücrelerinin BHK hücrelerine göre kayma gerilimine karşı daha duyarlı olması nedeniyle karıştırma 60 rpm'e ayarlanmıştır. Ancak, optimizasyon sonrası proses parametrelerinin istenilen değerlerde tutulabilmesi ve kontrol edilebilmesi için havalandırma hızı 0.07 vvm'e çıkarılmıştır. Hibridoma üretimlerinde ise yeterli gaz transferinin yapılabilmesi için genellikle 0.03-0.05 vvm arasında havalandırma yapılmıştır (Eibl et al., 2009). BHK, miyeloma ve hibridoma hücrelerinin kültürü sırasında havalandırma hızının arttırılmasının asıl nedeni elbette farklı hücre hatlarının farklı oksijen konsantrasyonlarına ihtiyaç duymasıdır (Eyer et al., 1995). Farklı hücre hatlarının farklı kayma gerilim eşliğine sahip olduğu literatürde verilmiştir (Eibl et al., 2009; Pol and Tramper, 1998). Bu çalışma sırasında da, mikrosparger ile yapılan üretimlerde BHK ve miyeloma hücreleri kayma gerilimine daha dayanıklı iken hibridoma ile yapılan üretimde hücrelerdeki canlılığın hızla düştüğü görülmüştür.

Yüzey havalandırma ile hem hücrelere kayma gerilimi uygulanmadan hava verilebilmiş hem de kayma geriliminin en az etkisinin olduğu bu sistemde en yüksek MAb konsantrasyonlarına ulaşılmıştır. Fakat 4 L üretime çıkıldığında yüzey havalandırma etkisiz kalacağından ve mikrosparger'ın da kayma gerilimi etkisinden dolayı makrosparger kullanımının uygun olacağı düşünülmüştür. Bu nedenle, 1 mm gözenek çapına sahip tek bir gözeneği bulunan paslanmaz çelik makrosparger temin edilmiş ve bu süreçten sonraki üretimlerin hepsi makrosparger ile yapılmıştır. Czermak et al., (2005) çalışmasında, 50-300 µm çaplı kabarcıkların hibridomalara zarar verdiğini belirtmiştir. Makrospargerın sağladığı avantajlar bir başka çalışmada da belirtilmiştir (Christi, 2000). Christi (2000), küçük kabarcıkların (<2mm çap) hibridoma hücrelerine büyük kabarcıklara nazaran çok daha hasar verici olduğunu ve 10-20 mm çaplı büyük kabarcıkların fare-hibridoma hücreleri için ticari ölçekli üretimlerde kullanıldığını ve bunun yanında bu kabarcıkların sıvı yüzeyinde stabil köpük oluşturmadığını belirtmiştir. Bu çalışmada da makrosparger ile sürdürülen kültürlerde daha az ve stabil olmayan köpük oluştuğu görülmüş ve bu nedenle daha az köpük kırıcı kullanılmıştır.

Eğimli bıçakları olan karıştırıcılar (*pitched blade impellers*) ~45° açılı konumda bulundurulurlar ve böylelikle aksiyal ve radyal yönde simultane şekilde homojen karışım sağlarlar. Bu kombinasyon, iyi bir karıştırma ve tek yönlü marine bıçaklı karıştırıcılara göre daha yüksek oksijen transfer hızı ( $k_L a$ ) sağlar. Eğimli bıçakları olan karıştırıcılar, hücre hasarına neden olmaksızın düşük kayma gerilimi etkisi oluşturacak şekilde tasarlanmıştır. Memeli hücrelerinde, böcek hücrelerinde ve/veya süspanse ortamda yaşayan diğer kayma gerilimine duyarlı hücrelerin kültürüne ya da mikrotarıyıcılar ile yapılan çalışmalara olanak verir (Mirro and Vol, 2009; Eibl et al., 2009). Bu çalışmada da pitched blade eğimli bıçakları olan karıştırıcılar kullanılarak kayma gerilimi etkisi azaltılmaya çalışılmıştır. Bu nedenle sistemde, tasarımdan ziyade karıştırma hızının optimizasyonuna oldukça önem verilmiştir. Bu çalışmada, kültür kaplarında yapılan kontrol 1, kontrol 2 üretimlerinden ve reaktör denemelerinden alınan sonuçlar karşılaştırılmıştır. Hiç kayma gerilimine maruz kalmayan hücrelerin (kontrol 1) daha yüksek MAb ürettiği (20-22 µg/L), buna nazaran reaktöre giren hücrelerin (kontrol 2 ve reaktörde üretim) strese maruz kalması nedeniyle daha az MAb ürettiği (~16 µg/L) görülmüştür. Aynı zamanda karıştırma hızının 60 rpm'den 80 rpm'e çıkarıldığı %10 FCS içeren STR'de ölçek büyütme sırasında, üretilen MAb miktarının arttığı görülmüştür. Ancak, buna karşın 100 rpm'den yüksek hızlarda hücre canlılığının hızla düştüğü de çalışmalar sırasında

gözlemlenmiştir. Bu sonuçlarla benzer şekilde Shiragami (1997), hibridoma hücreleri ile spinner flasklarda ve petri kabında %10 FCS içeren ortamda yaptığı çalışmada, farklı karıştırma hızlarının hücre büyümesi ve ürün konsantrasyonuna olan etkisini incelemiştir. Çalışmasında çok yüksek karıştırma hızlarında da hibridomaların kültüre edilebilecekleri görülmüştür. Kültürün ilk 30-40. saatlerinde karıştırmanın antikör üretimine olan etkisi belirgindir. 180 rpm karıştırma hızında yüksek canlı hücre konsantrasyonu vermesine karşın 300 rpm'de daha fazla ürün elde edilmesinin nedeni hücrelerin membranlarına verilen zarardan dolayı hücre içi antikörlerin da hücre dışına çıkmış olabileceği durumunu akıllara getirmiştir. Petri kaplarında ise en az kayma geriliminin etkisi görülmüş ve en yüksek hücre ve ürün konsantrasyonları elde edilmiştir. Aynı çalışmada, kayma gerilimine maruz kalma süresine bağlı olarak süreyle uyumlu olarak antikör miktarının da lineer şekilde arttığı belirtilmiştir.

Czermak et al., (2005) araştırmasında kabarcık içermeyen sistemler ile yeterli oksijen sağlanabildiğini belirtmiştir. Bu sistemlerin bazı dezavantajlarının olmasının yanında havalandırma kaynaklı kayma gerilimi etkisini ortadan kaldırıldığı için yüksek verimliliklere ulaşmayı mümkün kıldığını Eibl et al., (2009) da belirtmiştir. Bu çalışmada da, membran havalandırmalı sistemlerde (SuperSpinner®) gaz baloncuğu oluşturmadan besi ortamı içinde etkili besin ve gaz transferleri oluşturulduğundan döner şişe ve STR'deki üretimlere göre daha uzun süre hücre canlılığının korunduğu ve daha yüksek MAb titresi elde edildiği görülmüştür.

Legazpi et al., (2005), mekanik karıştırma ve havalandırmaya bağlı olarak meydana gelen mekanik hasarın önlenmesinde kullanılan pluronik F68 yada köpük kırıcı gibi bazı ajanların ürün saflaştırma aşamasını daha zor ve komplike hale getirdiğini literatürde bildirmiştir. Bu nedenle çalışmada 4L'de %10 FCS içeren ortam ile STR'de yapılan üretimde köpük kırıcı kullanımından kaçınmak için daha düşük havalandırma hızlarında çalışılmıştır.

### **5.3 Kültür Ortamının Prosese Etkisi**

BHK An<sub>30</sub> hücreleri ile STR'de dört farklı üretim yapılmıştır. Birinci üretimde NaHCO<sub>3</sub> kullanarak havalandırma olmaksızın BHK An<sub>30</sub>'un STR'de üretimi sırasında hücrelerin morfolojilerindeki değişim pH probunun kalibrasyonundan kaynaklanan sapmalara bağlı olarak fazla NaHCO<sub>3</sub> kullanımından kaynaklanabilir. Kültürde fazla NaHCO<sub>3</sub> kullanımına bağlı olarak

hücre büyümesinin azaldığı ve hücrelerin morfolojilerinde değişiklik oluşturduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.1). Benzer şekilde, Ozturk and Palsson (1991c)'ın çalışmaları ortam osmolaritesinin yükselmesi durumunda hücre büyümesinin azaldığını göstermiştir. NaHCO<sub>3</sub> ortam osmolaritesini değiştirirken, antifoam kullanmanın hücrelerin morfolojisine pek fazla etkisinin olmadığı ve hücrelerin hala sağlıklı bir şekilde üreyebildiği Şekil 4.2'de görülmektedir. Alınan sonuçları destekleyecek şekilde Murhammer and Goochee (1990) yaptıkları çalışmada %0.2 (w/v) köpük kırıcı konsantrasyonunun hücre üretimini etkilemeyecek şekilde uygun olduğunu bildirmişlerdir.

Makrosparger kullanımının oksijenlenmeyi sağladığı, CO<sub>2</sub> birikimi ve dolayısıyla da pH düşüşü engellendiği bu çalışmada görülmüştür. pH düşüşü engellendiği için baz (NaHCO<sub>3</sub>) kullanımının azaltıldığı hatta ihtiyaç duyulmadığı ve buna bağlı olarak da ortamda osmotik dengenin korunduğu görülmüş ve bu üretimlerde mikrospargera göre daha uzun süre hücre canlılığı korunmuştur.

Döner şişelerde üretim sırasında SFM'deki hücrelerin doğrudan ölüm fazına geçtiği ve 7. günde tamamıyla öldükleri görülürken, %5 FCS ve %10 FCS içeren ortamda kültüre edilen hücrelerin ise belirli bir üreme kinetiği gösterdikten sonra ölüm fazına geçtikleri görülmüştür. Serum içeren ortamlarda bu davranışın görülmesinde serumun üremeyi stimüle edici etkisinin yanında aktif olarak üreyen hücrelerin adapte olduğu benzer üreme ortamına aktarılmasının da etkili olduğu düşünülmektedir.

Serum, besi ortamı içerisinde hücre büyümesini destekleyen önemli bir bileşendir. Ayrıca hücreleri kayma gerilimi etkisinden de koruyan önemli bir koruyucu ajandır (Legazpi et al., 2005; Ozturk and Palsson 1991b). STR'de'de 5A8 hibridoma hücreleri %10 FCS içeren ortamlarda yapılan kesikli ya da yarı sürekli kültürlerinde ve ölçek büyütme sırasında serumun üremeyi stimüle edici etkisi nedeniyle daha yüksek oranda hücre canlılığı saptanmıştır (Hua et. al., 1993; Pol and Tramper, 1998; Chisti, 2000; Enfors et al., 2001; Marks, 2003; Legazpi et al., 2005; Eibl et. al., 2009). Ancak, SFM içerisinde çok hassas davranan hücreler karıştırma ve havalandırmanın meydana getirdiği kayma gerilimi zararından korunamamış ve gerçekleştirilen kesikli kültürde direkt olarak ölüm fazına geçmişlerdir.

Genel olarak serumsuz kültürlerde hücrelerin kültür sistemine adaptasyonu, üremenin başlaması ve devamı için normal kültürlerden daha yüksek başlangıç

hücre konsantrasyonunun gerekliliği literatürde yer almaktadır (Doyle and Griffiths, 1998; Ozturk and Palsson, 1990b). Benzer şekilde, Voigt and Zintl (1999), 14/2/2 hibridoma ile protein içermeyen ortam ile spinner flasklarda mikrotasıyıcı olmadan yaptıkları çalışmalara bakıldığında,  $6-8 \times 10^5$  hücre/ml başlangıç hücre konsantrasyonlarında kültüre başlandığında yüksek MAb titresine ulaşıldığını göstermiştir. Bu çalışmada, 5A8 hibridoma klonu hattı için hem adaptasyon sırasında hem de döner şişelerde ve reaktörde üretim sırasında, literatürdeki çalışmalara benzer şekilde (Ozturk and Palsson, 1991a; Hua et al., 1993; Voigt and Zintl, 1999)  $6-8 \times 10^5$  hücre/ml başlangıç hücre konsantrasyonlarında çalışılmıştır. Ancak serumsuz ortama adaptasyon sırasında hücrelerin azalan serum oranıyla hücre membran gerginliği ve bütünlüğünü kaybederek büzüldükleri hatta parçalanmaya başladıkları gözlemlenmiştir. Buradan yola çıkarak kullanılan serumsuz besi ortamı içerisinde, izlenen adaptasyon yöntemleriyle hücrelerin yüksek canlılık seviyelerini koruyamadıkları ve üreyemedikleri sonucuna varılmıştır. Aynı şekilde döner şişelerde ve STR'de SFM ortamında yapılan çalışma sırasında da bu hücre hattının SFM koşullarında uzun süre canlılığını sürdürememesi serum ve başlangıç hücre sayısının üretimde önemli sınırlayıcı etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Freshney (2005), farklı hücre hatlara özgü SFM ya da protein içermeyen ortamların tasarlanması gerektiğini bildirmiştir. Literatürde, düşük serum konsantrasyonlarında (özellikle % 0-2.5) serum miktarının daha da düşürülmesinin hücrelerin büyümesini büyük ölçüde inhibe ettiği, ürün verimliliğini düşürdüğü ve kullanılan farklı kültür ortamlarında hibridoma büyümesinin ve MAb üretiminin farklı olduğu bildirilmiştir (Hua et al., 1993). Benzer şekilde, serumsuz ortama adaptasyonun başarısının kullanılan hücre hattına ve ortamın kompozisyonuna bağlı olduğu ve hibridoma hücrelerinin serumsuz ya da düşük serumlu ortama adaptasyon başarısının füzyon öncesinde miyeloma hücrelerinin adaptasyonu ile arttırılabileceği Ozturk and Palsson (1991a) tarafından bildirilmiştir. Voigt and Zintl (1999), yaptıkları çalışmada, hücre canlılığının SFM içerisinde hızla düştüğünü buna rağmen, kültürün ilk 96 saati boyunca protein içermeyen ortamda elde edilen MAb konsantrasyonunun serum içeren kültürde elde edilene göre 2.5 kat daha fazla olduğunu göstermişlerdir.

Ozturk and Palsson (1991 b) serumun etkilerini iki farklı hücre ile STR'de test ettiklerinde, serum konsantrasyonunun azalmasının hücrelerin özgül üreme hızlarını düşürmesine rağmen glukoz ve glutamin metabolizmalarında çok büyük farklılık yaratmadıklarını göstermişlerdir. Bu durum besi ortamındaki serum miktarına bağlı olarak farklı hücre hatlarının verdiği metabolik cevapların farklı



olmasıyla açıklanmıştır. Bu çalışma ile ayrıca hücre hattına göre kültür koşullarının (durgun ya da süspanse vb.) da bu davranışları etkilediği ortaya çıkmaktadır. Ducommun et al. (2001) hücre büyümesinin ve metabolizmasının farklı serum içeren ve serumsuz ortamlarda belirgin bir şekilde değişeceğini belirtirken, Ozturk and Palsson (1991a) serumsuz ortama adaptasyon sonrasında hücrelerin spesifik büyüme hızlarının, glukoz ve glutamin tüketim ve laktat ve amonyak üretim hızlarının belirsiz bir değişiklik gösterdiğini ancak MAb üretim hızlarında farklılıklar olduğunu belirtmişlerdir. Legazpi et al., (2005) memeli hücrelerinin farklı üretim koşullarında aynı üreme hızıyla nutrientleri farklı metabolize edebileceklerini belirtmiştir. 5A8 hibridoma klonunun metabolik aktivite ölçümleri ve antikor üretimi grafiklerde verilmiştir. Üretimler sırasında hızlı glukoz tüketimine bağlı olarak antikor üretimi de artmış ve antikor üretimi STR'de yüzey havalandırılmalı koşulunda 3. günden itibaren besi ortamı değişimine bağlı olarak salınımlar yaparak devam etmiştir. Döner şişelerde ise, %5 ve %10 FCS içeren ortamda kültür koşulları nedeniyle STR'de elde edilenler kadar antikor elde edilmemiş ve kesikli kültür ile çalışılmasından dolayı ortamda sürekli olarak biriken antikor konsantrasyonuna ulaşılmıştır. Döner şişelerde SFM koşullarında kültüre edilen hücrelerde MAb miktarının 4. günden sonra azalmasının nedeni ise, hücrelerin ölümüne bağlı ortam pH'sındaki değişim ve ortam sıcaklığının etkisiyle antikorların yapılarının bozulması olabilir. Serum içeren ortamlarda yapılan üretim denemeleri süresince, glukoz tüketiminin yüksek olduğu laktik asit miktarındaki değişimin de buna paralel olarak arttığı belirlenmiştir. Glukoz ve laktatın paralel olarak pik yapıp stabil düzeye geldiği, aynı zamanda miktarlarındaki değişimin de birbiriyle korelasyon gösterdiği görülmektedir. SFM ile yapılan tüm reaktör ve döner şişe üretimlerinde ise, hücre ölümleriyle korale olarak glukoz tüketiminin fazla olmadığı görülmüştür. Tüm üretimlerde ortamlardaki laktik asit miktarlarının fazla olmaması, hücrelerin glukozun büyük bir kısmını kendi yapısal işlevleri ve antikor oluşumuna harcadıklarını göstermektedir. Kültürasyon boyunca döner şişelerdeki amonyak miktarının arttığı ayrıca STR'de de amonyak üretiminin yapıldığı ve yüzey havalandırılmalı koşullarda besi ortamı değişimine bağlı olarak salınımlar gösterdiği, kesikli kültürlerde ise sürekli arttığı görülmüştür. SFM koşullarında kültüre edilen hücrelerde amonyak miktarının fazla olmasının nedeni besi ortamındaki yüksek protein içeriğinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Legazpi et al., (2005), MAb üretiminin hücre büyümesi süresinde devam ettiğini ve glukoz tüketimiyle paralel olarak arttığını ve serum içermeyen ortamda glukoz tüketiminin düşük olduğunu belirtmişlerdir. Aynı araştırmacılar, ortamda biriken amonyak ve laktatın sistemde inhibitör etki gösterdiğini de bildirmişlerdir.

Okeson ve Riley (2001), amonyağın düşük konsantrasyonlarda dahi hücre üremesini inhibe ettiğini ve spesifik büyüme oranını düşürdüğünü belirtmişlerdir. Yüzey havalandırmalı koşullarda reaktörde iki günde bir yapılan besi ortamı değişiklikleri laktat ve amonyak birikimini azaltarak hücre ve ürün konsantrasyonunda artışa izin verirken, kesikli kültürde özellikle de SFM koşullarında amonyak birikimi hücre ölümüne ve dolayısıyla da ürün konsantrasyonunun az olmasına neden olmuştur. Çalışma sonuçlarını destekleyecek yönde, Lee et al., (1997) hücre sayısındaki artışla ortam içindeki glukoz konsantrasyonunun düştüğünü ve hücre çoğalmasına paralel olarak maksimum hücre sayısına ulaşıldığında maksimum glukoz tüketiminin gerçekleştirildiğini belirtmiştir. Glukoz ve laktat konsantrasyonları ile ilgili diğer araştırmacıların bildirimleri (Aslankaraoğlu ve ark., 2003; Ozturk and Palsson 1990b; Legazpi et al., 2005) bu çalışmada elde edilen sonuçları desteklemektedir. Ozturk and Palsson (1990b), maksimum hücre sayısında antikor üretiminin de maksimum olduğunu tespit etmiştir. 5A8 hibridoma klonu ile %10 FCS içeren ortamda 4L'de STR'de yapılan üretimde ortam içerisindeki amonyak miktarı diğer üretimlere göre çok artmış ve buna bağlı olarak da pH oldukça düşmüştür. Benzer şekilde, McQueen and Bailey (1990) amonyak metabolizmasının, sitoplazmada asidifikasyona neden olduğunu ve böylelikle hücre içi pH'ı düşürerek inhibisyon mekanizması oluşturduğunu belirtmişlerdir. Bu durum amonyak etkisinin pH üzerinde önemli olduğunu göstermektedir.

#### **5.4 Çevresel Parametrelerin Proses Etkisi, Proses İzleme ve Kontrol'ün Kültür Üzerindeki Önemi**

Hücre kültürü sistemleri yalnızca nutrientlerin (örneğin, glukoz, glutamin, ve oksijen) sağlanmasına ihtiyaç duymaz, biyoreaktör içerisinde hücrelerin çevresindeki ortamın homojenitesinin bozulmaması da oldukça önemlidir.

Literatürde, ortamdaki yüksek çözünmüş oksijen konsantrasyonunun oksidatif strese neden olduğu ve düşük çözünmüş oksijen konsantrasyonunun ise hücre büyümesini etkilediği bildirilmiştir (Ozturk and Palsson 1991b). Boraston et al., (1984), maksimum hücre veriminin %8-100 DO aralığında olduğunu gösterirken diğer çalışmalar %60 (Reuveny et al., 1986), %0.5 (Miller et al., 1987) ve %35 (Ozturk and Palsson 1990) olarak belirlemiştir (Jan et al., 1997; Jain and Kumar 2008). Bu nedenle bu çalışma sırasında çözünmüş oksijen konsantrasyonu %40 hava saturasyon değerlerinde tutulmaya çalışılmıştır. Ancak, sistemde meydana gelen bazı aksaklıklardan ötürü tam bir kontrol sağlanamadığı deneyler olmuştur.

Bu çalışmada da, üretim için önemli olan parametreler PI-kontrol sisteminde optimize edildi (Şekil 3.7 ve 3.8) (Çizelge 4.12 ve 4.13). 5A8 hibridoma klonu ile özellikle yüzey havalandırma koşullarında yapılan çalışmada çözülmüş oksijen değeri oldukça düşükken bile yüksek hücre ve ürün verimi elde edilmesi kullanılan hücre hattının oksijene çok duyarlı olmadığını, ayrıca oksijenin kontrol edildiği ve edilmediği durumlar karşılaştırıldığında hücre canlılığının ortamdaki oksijen tüketiminden pek fazla etkilenmediği gözlemlenmiştir. Benzer sonuç, Miller et al., (1987)'nin yaptığı çalışmada da görülmektedir. Anaerobik koşullarda hücrelerin strese girmesi bir sekonder metabolit olan MAb'ın üretimini de arttırmış olabileceği düşünülmektedir. Proseslere genel olarak bakıldığında ortam içindeki çözülmüş oksijenden ziyade hücre canlılığı ve metabolizmasını pH'nın, karıştırma ve havalandırma hızının ve sparger tipinin ve besleme modunun etkilediği görülmektedir.

Brown and Birch (1996) pH'da meydana gelen 0.1 birim düşüşün ürün verimliliğinde %50 azalmaya neden olduğunu vurgulamışlardır. Bu nedenle sistemde iyi bir pH kontrolünün yapılması gerekmektedir (Langheinrich and Nienow, 1999). Özellikle STR'de 4 L'de %10 FCS içeren ortamda kesikli kültür ile yapılan üretimde ortama  $\text{NaHCO}_3$  beslemenin ortam osmolaritesini bozabileceği düşünüldüğünden yeterli pH kontrolü (azalmasının engellenmesi) yapılmamış ve pH çok düşmüştür. 5A8 hibridoma klonu ile elde edilen sonuçlar ile benzer şekilde, Miller et al., (1988) yaptıkları çalışmada, antikor üretiminin büyüme bağıntılı olmadığını ve yüksek antikor titrelerine spesifik büyüme hızının en az olduğu zamanlarda olduğunu, ayrıca optimum canlı hücre konsantrasyonu için pH 7.1 ve 7.4 aralığı olduğunu ve pH 6.8'in altında hücre büyümesinin çok fazla azaldığını ve yine düşük pH değerlerinde glukoz tüketiminin azaldığını göstermişlerdir.

## 5.5 Sonuçların Değerlendirilmesi

Ölçek büyütme aşaması göz ardı edilerek, bu çalışmada kullanılan üretim sistemlerinin maliyet analizi ve her sistem için verimlilik (*P*) hesaplaması yapılmıştır (Çizelge 5.1). Döner şişeler ve tek kullanımlık reaktörlerin fiyatları STR'e göre daha ucuzdur. Fakat bu üretim sistemleri, üretim boyunca her kültürde satın alınması gereken sistemlerdir. Bu nedenle, STR ilk satın alma sırasında yüksek maliyet getirirse de uzun süreli üretimlerde kullanımı daha avantajlı hale gelmektedir. Üretimlerden elde edilen verimliliklere bakıldığında, döner şişe sistemlerinde çok düşük verimlilik görülürken, her ne kadar üretim

maliyeti en yüksek olan sistem gibi görülse de en yüksek verimliliğin STR'de yüzey havalandırma koşullarında elde edildiği görülmüştür.

**Çizelge 5.1** Üretim sistemlerinin maliyet analizi.

	D.Ş. SFM	D.Ş. %5 FCS	D.Ş. 10 FCS	STR %10 FCS Y.H.	STR- %10 FCS	STR SFM	SMR %10 FCS	MHR
<b>İşletme modu</b>	Kesikli	Kesikli	Kesikli	Yarı sürekli	Kesikli	Kesikli	Kesikli	Kesikli
<b>Çalışma hacmi (L)</b>	0.3	0.3	0.3	2	4	4	0.005*	0.8
<b>~Sabit maliyet** (TL)</b>	10	10	10	114000	114000	114000	368	840
<b>~Üretim maliyeti*** (TL)</b>	35.4	15	21	560	280	467	5.5	56
<b><math>P_{MAB}</math> (<math>\mu\text{g L}^{-1}\text{gün}^{-1}</math>)</b>	1.25	1.55	1.11	23.3	3.75	0.4	16	10

D.Ş. : Döner şişe; Y.H. yüzey havalandırma.\*SMR'de yapılan üretimde inokülasyon için 5 ml ve üretim için 100 ml besi ortamı kullanılmıştır. \*\* Üretim sisteminin maliyeti. \*\*\* Bir kültür için ölçek büyüme işlemi göz önünde bulundurulmaksızın kullanılan besi ortamı için maliyet.

Bu çalışma, ülkemizde pilot ölçekli MAb üretimi için bir ilk oluşturmaktadır. Bu çalışmadan elde edilen veriler doğrultusunda planlanacak olan daha sonraki çalışmalar ile daha yüksek verimlilikte ve ucuz sistemlerin geliştirilmesi hedeflenmektedir.

## 6. SONUÇLAR

Bu çalışma süresince elde edilen veriler değerlendirildiğinde;

- 5A8 hibridoma klonunun hem T-flasklarda, hem döner şişelerde hem de STR'de SFM'e adapte olamadığı,
- 5A8 hibridoma klonunun SFM ortamında, hem döner şişelerde hem de STR'de daha düşük hücre canlılığı gösterdiği ve buna bağlı olarak bu sistemlerden düşük MAb titresi elde edildiği,
- STR'de, 80 rpm'de çalıştırılan FBS içeren ortamda, 120 rpm'de çalıştırılan SFM ortamında üretilen MAb'a göre daha yüksek MAb miktarı elde edildiği,
- MHR'de, döner şişe ve STR'deki üretimlere göre daha uzun süre hücre canlılığının korunduğu ve daha yüksek MAb titresi elde edildiği,
- En yüksek MAb konsantrasyonunun SMR sisteminde elde edildiği,
- En yüksek MAb verimliliğinin ise yarı sürekli modda ve yüzey havalandırma koşullarında çalıştırılan STR'de elde edildiği,

bulunmuştur.

## 7. ÖNERİLER

SFM içerisinde mikrotaşyıcı ile yapılan çalışmalar, serum içeren ortamda elde edilen hücre ve MAb konsantrasyonlarına ulaşıldığını göstermiştir. Bunun nedeni de serum içermeyen ortamda hücreler kayma gerilimine karşı mikrotaşyıcılar yardımıyla korunabilmesidir. Dolayısıyla SFM içerisinde yapılan üretimler mikrotaşyıcı kullanımı ile yapıldığında daha iyi sonuçlar alınabilir. Fakat orta ve büyük ölçekte üretime geçildiğinde bunun maliyeti nasıl etkileyeceği önceden belirlenmelidir.

Hem yüzey havalandırma koşullarında gerçekleştirilen üretim sırasında hem de makrosparger ile 4L'de yapılan üretimlerde kütle transfer etkinliğini arttırabilmek için kültür ortamı yüzeyine yakın bir yere ikinci bir impeller yerleştirilebilir. Ayrıca yine kütle transfer etkinliğini arttırmak ve reaktör içerisinde daha iyi homojenizasyon sağlamak için karıştırıcının bıçak çapı ve yönü değiştirilebilir.

Kesikli kültürde hücreler kısa sürede ölüm fazına geçmektedir. Daha uzun süre hücre canlılığı ve MAb üretimi için perfüzyon ya da kesikli-beslemeli kültürler gibi sistemlerinde hibridomaların davranışlarının belirlenebilmesi gerekmektedir. Ayrıca, hücrelerde apoptozisin önlenmesi amaçlı transfeksiyon çalışmaları da yapılabilir.



**KAYNAKLAR DİZİNİ**

- Ahuja S.**, 2000, Handbook of Bioseparations, California, Academic Press, 722p.
- Aldington S. and Bonnerjea J.**, 2007, Scale-up of monoclonal antibody purification processes, J Chromatogr B, 848: 64–78pp.
- Aslankaraoğlu, E., Gümüşderelioğlu, M. and Gürhan, S.I.**, 2003, Hybridoma cells immobilized on nonwoven polyester fabric discs: proliferation and monoclonal antibody production in stationary culture, J Biomater Appl, 18: 137-148pp.
- Berson R. E. and Friederichs G.**, 2008, A Self-feeding roller bottle for continuous cell culture, Biotechnol Prog, 24:154-157pp.
- Boraston, R., Thompson, P. W., Garland, S. and Birch, J. R.**, 1984, Growth and oxygen requirements of antibody producing mouse hybridoma cells in suspension culture, Develop. Biol. Stand. 55: 103–111pp.
- Butler M.**, 2005, Animal Cell Culture and Technology, Second Edition, Taylor & Francis e-Library, 299p.
- Chisti Y.**, 2000, Animal-cell damage in sparged bioreactors, TIBTECH, 18:420-432pp.
- Chu L. and Robinson D.K.**, 2003, Industrial choices for protein production by large-scale cell culture, Cur. Opin. Biotech., 12: 180–187pp.
- Coradin, T., Nassif, N. and Livage, J.**, 2003, Silica-alginate composites for microencapsulation, Appl. Microbiol. Biotechnol., 61: 429-434pp.
- Czermak P., Weber C. and Nehring D.**, 2005. A ceramic microsparging aeration system for cell culture reactors, Publication series of IBPT-University of Applied Sciences Giessen-Friedberg, 1: 1-6pp.
- Dalm M.C.F.**, 2007, *Acoustic perfusion processes for hybridoma cultures: Viability, cell cycle and metabolic analysis*, PhD thesis, Wageningen University, <http://library.wur.nl/wda/dissertations/dis4263.pdf> (Erişim tarihi: 28 Mayıs 2010)
- Doyle A. and Griffiths J. B.**, 1998, Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology, John Wiley and Sons Inc., 354p.



**KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)**

- Dulcommun P., Ruffieux P.A., Furter M.P., Marison I. and Stockar U.,** 2000, A new method for on-line measurement of the volumetric oxygen uptake rate in membrane aerated animal cell cultures, *J. of Biotechnol.*, 78:139–147pp.
- Ducommun P., Ruffieux P.A., Stockar U. and Marison I.,** 2001, The role of vitamins and amino acids on hybridoma growth and monoclonal antibody production, *Cytotech.*, 37: 65–73pp.
- Dutton R. L., Scharer J. M. and Moo-Young M.,** 1999, Hybridoma growth and productivity: effects of conditioned medium and of inoculum size, *Cytotech.*, 29: 1–10pp.
- Eibl R., Eibl D., Pörtner R., Catapano G. and Czermak P.,** 2009, *Cell and Tissue Reaction Engineering*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 363p.
- Enfors S.O. and Häggström L.,** 2000, *Bioprocess Technology Fundamentals and Applications*, Royal Institute of Technology, Stockholm, ISBN 91-7170-511-2, 294-298pp.
- Enfors S.O., Jahic M., Rozkov A., Xu B., Hecker M. and Jurgen B.,** 2001, Physiological responses to mixing in large scale bioreactors, *J. Biotechnol* 85: 175–185pp.
- Even, M.S., Sandusky, C.B. and Barnard, N.D.,** 2006, Serum-free hybridoma culture: Ethical, scientific and safety considerations, *TRENDS Biotechnol.*, 24(3):105-108pp.
- Eyer K., Oeggerli A. and Heinzlet E.,** 1995, On-line gas analysis in animal cell cultivation: II. Methods for oxygen uptake rate estimation and its application to controlled feeding of glutamine, *Biotechnol Bioeng.*, 45: 54-62pp.
- Farid S. S.,** 2006, Established bioprocesses for producing antibodies as a basis for future planning, *Adv Biochem Engin/Biotechnol.*, 101:1–42pp.
- Flatman S., Alam I., Gerard J. and Mussa N.,** 2007, Process analytics for purification of monoclonal antibodies, *J Chromatogr B.*, 848: 79–87pp.
- Flickinger M. C. and Drew S. W.,** 1999, *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation*, 1 – 5: 179-189. A Wiley-Interscience Publication John Wiley & Sons, Inc., 2844p.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Frahm B., Blank H.C., Cornand P., Oelßner W., Guth U., Lane P., Munack A., Johannsen K. and Portner R.**, 2002, Determination of dissolved CO<sub>2</sub> concentration and CO<sub>2</sub> production rate of mammalian cell suspension culture based on off-gas measurement, *J Biotechnol*, 99: 133-148pp.
- Freshney, R.I.**, 2005, *Culture of Animal Cells*, 5th Edition., Wiley-Liss, USA, 672p.
- Garcia-Briones M. and Chalmers J. J.**, 1992, Cell-bubble interactions: mechanisms of suspended cell damage, *Ann NY Acad Sci*, 219-228pp.
- GE Healthcare**, 2010, *Hollow fiber cross flow membranes for the clarification of therapeutic proteins derived from cell culture. Application Note 11-0036-44 AA.* [www.gehealthcare.com](http://www.gehealthcare.com). (Erişim tarihi: 20 Mayıs 2010).
- Griffith B.**, 2000, Scaling up of animal cell cultures, In: Masters JRW (ed) *Animal Cell Culture 3rd ed*, Oxford University Press, New York. 19–66pp.
- Glacken M.W., Fleischaker R.J. and Sinskey A.J.**, 1983, Large-scale production of mammalian cells and their products: engineering principles and barriers to scale-up, *Ann NY Acad Sci*; 413:355–72.
- Gódia F. and Cairó J. J.**, 2006, *Cell metabolism. In: Ozturk SS and Hu W-S (eds) Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-Based Therapies.*  
[http://books.google.com.tr/books?id=KIRTCpMHU28C&dq=Cell+Culture+Technology+for+Pharmaceutical+and+Cell-Based+Therapies.&printsec=frontcover&source=bn&hl=tr&ei=oRdETKm4AYGFONnVsP8M&sa=X&oi=book\\_result&ct=result&resnum=4&ved=0C CwQ6AEwAw#v=onepage&q&f=false](http://books.google.com.tr/books?id=KIRTCpMHU28C&dq=Cell+Culture+Technology+for+Pharmaceutical+and+Cell-Based+Therapies.&printsec=frontcover&source=bn&hl=tr&ei=oRdETKm4AYGFONnVsP8M&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=4&ved=0C CwQ6AEwAw#v=onepage&q&f=false) (Erişim tarihi:19 Temmuz 2010)
- Hermann J. R., Hoff S. J., Yoon K. J., Burkhardt A. C., Evans 1 R. B. and Zimmerman J. J.**, 2006, Optimization of a sampling system for recovery and detection of airborne porcine reproductive and respiratory syndrome virus and swine influenza virus, *Appl Environ Microb*, 72(7): 4811–4818pp.
- Henzler H.J. and Kauling O.J.**, 1993, Oxygenation of cell cultures, *Bioproc Eng* 9: 61–75pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)**

- Hua J., Erickson L. E., Yiin T. Y., and Giasgow L. A.,** 1993, A Review of the effects of shear and interfacial phenomena on cell viability, *Critic Rev Biotechnol*, 13(4): 305-328pp.
- Invitrogen,** 2009, “*Adaptation of Cell Cultures to a Serum-Free Medium*”, [http://www.invitrogen.com/etc/medialib/en/filelibrary/pdf.Par.2474.File.dat/Adaptation\\_CC\\_SFM\\_Y062810\\_AdatptionOfCell.pdf](http://www.invitrogen.com/etc/medialib/en/filelibrary/pdf.Par.2474.File.dat/Adaptation_CC_SFM_Y062810_AdatptionOfCell.pdf) (Erişim tarihi: 10 Eylül 2009).
- Jain E. and Kumar A.,** 2008, Upstream processes in antibody production: Evaluation of critical parameters, *Biotechnol Adv*, 26:46–72pp.
- Jan D. C. H., Petch D. A., Huzel N. and Butler M.,** 1997, The effect of dissolved oxygen on the metabolic profile of a murine hybridoma grown in serum-free medium in continuous culture, *Biotechnol Bioeng*, 54(2): 153-164pp.
- Kim D. Y., Lee J. C., Chang H. N. and Oha D. J.,** 2006, Development of serum-free media for a recombinant CHO cell line producing recombinant antibody, *Enzyme Microb Tech*, 39: 426–433pp.
- Kontoravdi C., Asprey S. P., Pistikopoulos E. N. and Mantalaris A.,** 2007, Development of a dynamic model of monoclonal antibody production and glycosylation for product quality monitoring, *Comput Chem Eng*, 31: 392–400pp.
- Krahe M.,** 2003, *Biochemical Engineering*. In *Ulmann’s Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Vol 6. VCH Publishers, Weinheim, Germany, 2301p.
- Kretzmer G.,** 2002, Industrial processes with animal cells, *Appl Microbiol Biotechnol* 59: 135–142pp.
- Kumar B. and Rao A. R.,** 2009, Oxygen transfer and shear rate in surface aerator, *Environ Technol*, 30(9): 947–951pp.
- Langheinrich C. and Nienow A. W.,** 1999, Control of pH in large-scale, free suspension animal cell bioreactors: Alkali addition and pH excursions, *Biotechnol Bioeng*, 66(3): 171-179pp.
- Lee, Y.L., Teoh, A.P. and Yap, P.K.,** 1997, Regulation of glucose and glutamine uptake and the production of monoclonal antibody in hybridoma cultures, *Enzyme Microb Techn*, 21: 429-435pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)**

- Legazpi L., Diaz J., Laca A. and Diaz M.,** 2005, Kinetic analysis of hybridoma cell culture in a protein-free medium: Substrate and agitation effects, *Biochem Eng J*, 26: 122–130pp.
- Lin J., Takagi M., Qua Y. and Yoshida T.,** 2002, Possible strategy for on-line monitoring and control of hybridoma cell culture, *Biochem Eng J*, 11: 205–209pp.
- Low D., O’Leary R. and Pujar N. S.,** 2007, Future of antibody purification, *J Chromatogr B*, 848: 48–63pp.
- Marks D. M.,** 2003, Equipment design considerations for large scale cell culture, *Cytotechnology*, 42: 21–33pp.
- Matsunaga N., Kano K., Maki Y. and Dobashi T.,** 2009, Estimation of dissolved carbon dioxide stripping in a large bioreactor using model medium, *Journal Biosci Bioeng*, 107(4): 419–424pp.
- McArdle, J.,** 1998, Alternatives to ascites production of monoclonal antibodies, *Animal Welfare Information Center AWIC Newsletter*. 8(3-4): 1-4pp.
- McArdle J.,** 1999, Consideration of the advantages and disadvantages of in vitro and ascites production of Mabs. In: *Proceedings of the production of monoclonal antibodies workshop* (in press).
- McQueen A. and Bailey J.E.,** 1990, Effect of ammonium ion and extracellular pH on hybridoma metabolism and antibody production, *Biotechnol Bioeng* 35: 1065–1077pp.
- Miller W. M., Blanch H.W. and Wilke C.R.,** 1988, A kinetic analysis of Hybridoma growth and metabolism in batch and continuous suspension culture: effect of nutrient concentration, dilution rate and pH, *Biotechnol Bioeng*, 32: 947-965pp.
- Mirro R. and Voll K.,** 2009, Which impeller is right for your cell line? A guide to impeller selection for stirred-tank bioreactors, *BioProcess International* 7(1): 52-58pp.
- Murhammer D. W. and Goochee C.F.,** 1990, Sparged animal cell bioreactors: mechanism of cell damage and pluronic F-68 protection, *Biotechnol Prog*, 6: 631-397pp.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Nalbantsoy A.**, 2008, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Gallinarum, *Salmonella* Pullorum O ve H Antijenlerine Karşı Monoklonal Antikor Üretimi, Doktora tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 280 s.
- Nalbantsoy A, Karaboz I. and Deliloglu Gurhan I.**, 2010a. Production of monoclonal antibodies in a mouse model via lipopolysaccharide conjugates with synthetic polymers specific to *Salmonella* Enteritidis O antigen, Foodborne Pathogens and Disease, DOI: 10.1089/fpd.2010.0612.
- Nalbantsoy A, Karaboz I., Ivanova R. and Deliloglu Gurhan I.**, 2010b, Isolation and purification of O and H antigens from *Salmonella* *Enteritidis* as diagnostic tool. Ann Microbiol, 60: 565–571pp.
- Okeson, C.D. and Riley, M.R.**, 2001, Glutamine replenishment and ammonia removal in hybridoma cell cultures via immobilized glutamine synthetase, Biochem Eng J, 9: 125–133pp.
- Ozturk S.S. and Palsson B.O.**, 1990, Effect of initial cell density on hybridoma growth, metabolism, and monoclonal antibody production, J Biotechnol, 16: 259-278pp.
- Ozturk S. S. and Palsson B.O.**, 1991a, Physiological changes during the adaptation of hybridoma cells to low serum and serum-free media, Biotechnol Bioeng, 37: 35-46pp.
- Ozturk S. S. and Palsson B. O.**, 1991b, Growth, metabolic, and antibody production kinetics of hybridoma cell culture: 2. Effects of serum concentration, dissolved oxygen concentration, and medium pH in a batch reactor, Biotechnol. Prog. 7: 481-494pp.
- Ozturk S. S. and Palsson B. O.**, 1991c, Effect of medium osmolarity on hybridoma growth, metabolism, and antibody production, Biotechnol Bioeng, 37: 989-993pp.
- Ozturk S. S., Riley M. R., and Palsson B. O.**, 1992, Effects of ammonia and lactate on hybridoma growth, metabolism, and antibody production, Biotechnol Bioeng, 39:418-431pp.
- Ozturk S.S.**, 1996, Engineering challenges in high density cell culture systems, Cytotechnol 22: 3-16pp.
- Peters J.H. and Baumgarten H.**, 1992, Monoclonal Antibodies, Springer-Verlag New York. 181p.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Petrides D.,** 2000, *Bioprocess Design*, <http://www.cri.or.th/en/mitthai/Announcement%20and%20Discussion%20Pages/BioprocessDesign.pdf> (Erişim tarihi: 09 Haziran 2010).
- Pol L. V.D and Tramper J.,** 1998, Shear sensitivity of animal cells from a culture medium perspective, *TIBTECH*, 16: 323-328pp.
- Portner R. and Schafer T.H.,** 1996, Modelling hybridoma cell growth and metabolism – A comparison of selected models and data, *J Biotechnol* 49: 119–135pp.
- Portner R., Platas-Barradas O.B.J., Fassnacht D., Nehring D., Czermak P. and Markl H.,** 2007, Fixed bed reactors for the cultivation of mammalian cells: design, performance and scale-up, *Open Biotechnol J*, 1: 41–46pp.
- Rueveny, S., Velez, D., Macmillan, J. D. and Miller, L.,** 1986, Factors affecting cell growth and monoclonal antibody production in stirred reactors, *J Immunol Meth*, 86: 53–59pp.
- Sauer P.W., Burky J.E., Wesson M.C., Stenard H.D. and Qu L.,** 2000, A highyielding generic fed-batch cell culture process for production of recombinant antibodies. *Biotechnol Bioeng*, 67: 585–97pp.
- Schügerl K.,** 2001, Progress in monitoring, modeling and control of bioprocesses during the last 20 years, *J Biotechnol*, 85:149–173pp.
- Sinacore S. M., Creswick, B.C. and Buehler, R.,** 1989, Entrapment and growth of murine hybridoma cells in calcium alginate gel microbeads, *Nat Biotechnol*, 7: 1275-1279pp.
- Shukla A. A., Hubbard B., Tressel T., Guhan S. and Low D.,** 2007, Downstream processing of monoclonal antibodies application of platform approaches, *J Chromatogr B*, 848: 28–39pp.
- Spier R.E. and Griffiths J.B.,** 1990, *Animal Cell Biotechnology*, Vol. 4; Academic Press, 302p.
- van Lier F.L., van Duijnhoven G.C., de Vaan M.M., Vlak J.M. and Tramper J.,** 1994, Continuous betagalactosidase production in insect cells with a p10 gene based baculovirus vector in a two-stage bioreactor system, *Biotechnol Prog*, 10: 60–64pp.
- Varley J. and Birch J.,** 1999, Reactor design for large scale suspension animal cell culture. *Cytotechnol* 29: 177–205.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)**

- Voigt A. and Zintl F.**, 1999, Hybridoma cell growth and anti-neuroblastoma monoclonal antibody production in spinner flasks using a protein-free medium with microcarriers, *J Biotechnol*, 68: 213–226pp.
- Wang D., Liu W., Han B. and Xu R.**, 2005, The bioreactor: a powerful tool for large-scale culture of animal cells, *Curr Pharm Biotechnol*; 6: 397–403pp.
- Ward P. A., Jane A., Denise F., Gerald F. G., Geistfeld J. G., Imbaratto J. W., Peterson N. C., Quimby F., Marshak-Rothstein A., Rowan A. N. and Scharff M. D.**, 1999, *A Report of the Committee on Methods of Producing Monoclonal Antibodies Institute for Laboratory Animal Research National Research Council: Monoclonal Antibody Production. National Academy Press Washington, DC*; <http://grants.nih.gov/grants/policy/antibodies.pdf> (Erişim tarihi: 28 Mayıs 2010).
- Weinberg W.C., Frazier-Jessen M.R., Wu W.J., Weir A., Hartsough M., Keegan P. and Fuchs C.**, 2005, Development and regulation of monoclonal antibody products: Challenges and opportunities. *Cancer Metast Rev*, 24: 569-584pp.
- Werner RG.**, 2004, Economic aspects of commercial manufacture of biopharmaceuticals, *J Biotechnol*, 113: 171-182pp.
- Xie L. and Wang D.I.C.**, 1994, Stoichiometric Analysis of Animal Cell Growth and Its Application in Medium Design. *Biotechnology and Bioengineering*, Pp. 1164-1174.
- Zhou J. X. and Tressel T.**, 2005, Membrane chromatography as a robust purification system for large-scale antibody production. *BioProcess Int*, 3(9): 32–37pp.

## ÖZGEÇMİŞ

### Duygu AYYILDIZ TAMİŞ

#### Kişisel Bilgiler:

Doğum Tarihi: 9 Mayıs 1985  
 Cep telefonu: 0090 555 717 41 87  
 E-mail: [duyguayyildiz@gmail.com](mailto:duyguayyildiz@gmail.com)

#### Eğitim:

##### **Ege Üniversitesi (Yüksek Lisans Eğitimi)**

2008- Biyomühendislik Anabilim Dalı/Fen Bilimleri Enstitüsü

##### **Lund Üniversitesi, İSVEÇ**

2005–2006 Biyoteknoloji Mühendisliği Bölümü (Erasmus Öğrencisi)<sup>1</sup>

##### **Ege Üniversitesi (Lisans Eğitimi)**

2003–2008 Biyomühendislik /Mühendislik Fakültesi

Derece: 85,54<sup>2</sup> (100 üzerinden)

#### Uluslararası Deneyimler:

- İsveç Lund Üniversitesi'nde Erasmus öğrencisi (15 Ağustos 2005–10 Haziran 2006).
- Almanya Leipzig Üniversitesi “Cell Technologies and Applied Stem Cell Biology” laboratuvarında staj (26 Ocak–24 Şubat 2008).

#### Katıldığı Sunum, Kongre ve Kurslar:

- BioProduction 2010, Pre-conference workshop V: Product Characterisation of Biopharmaceuticals for Regulatory Requirements; Post-conference workshop W: A Practical approach to Design Space and Do Efor Biotech. 26-29 Ekim, 2010. Barcelona, İspanya
- Vth International Bioengineering Congress. 16-19 Haziran 2010, İzmir, Türkiye.
- “Fermentasyon Eğitimi kursu”(Fermentation Short Course), 31 Mayıs-4 Haziran 2010, Bilkent Üniversitesi, UNAM Institute of Materials Science and Nanotechnology, Ankara, Türkiye.
- The 4th Internantional Student Conference on Advanced Science and Technology, ICAST 2010. 25- 26 Mayıs 2010, Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye.

<sup>1</sup> Almış olduğum dersler: Biotechnology; Protein Engineering; Separation in Biotechnology; Enzyme Technology; Green Chemistry; Biotechnology, Process and Plant Design; Gene Technology.

<sup>2</sup> İsteğiniz doğrultusunda transkriptimi sağlayabilirim.



- Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, “Deney Hayvanları Kullanımı” Kursu, 9-20 Kasım 2009, İzmir, Turkey.
- “Flow Cytometry and Confocal Cytometry; As New Cellular Pharmacology Tool” Kursu. 01-02 Ekim, 2009, Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, İzmir, Türkiye.
- “Temel Hücre Kültürü ve Kök Hücre Teknikleri” Kursu. 12-16 Ekim 2009, Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, İzmir, Türkiye
- Biotech Metu 2009 International Symposium on Biotechnology: Developments and Trends. 27-30 Eylül 2009, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Ankara, Türkiye.
- 14. Biyomedikal Mühendisliği Ulusal Toplantısı, Biyomut 2009. 20–24 Mayıs 2009
- Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Balçova, İZMİR.
- Swedish as a Foreign Language, 18-30 Ağustos 2005, Folkuniversitetet, Lund, İsveç.
- Adli Bilimlerde Güncel Gelişmeler, 22 Mart 2005, Ege Üniversitesi

#### **Burslar, Projeler, Makaleler, Poster ve Sözlü Sunumlar:**

- Ayyıldız-Tamiş D\*, Nalbantsoy A, Elibol M. and Gürhan D.İ. Monoclonal Antibody Production Capabilities of Hybridoma Originated from Ag8 Myeloma Partner in Different Bioreactor Systems. Bioproduction 2010 Conference. 26-29 Ekim 2010. Barselona,İspanya. Poster Sunumu.
- Ayyıldız-Tamiş D\*, Nalbantsoy A, Elibol M. and Gürhan D.İ. Hybridoma Culture and Pilot Scale Monoclonal Antibody Production in Different Cultivation Systems. Vth International Bioengineering Congress. 16-19 Haziran 2010, İzmir, Türkiye. Poster Sunumu.
- Ayyıldız-Tamiş D\*, Nalbantsoy A, Özen M. Ö., Selimoğlu M., Elibol M. and S. Gürhan D. İ. Animal Cell Culture Processes and Scale Up. The 4th Internantional Student Conference on Advanced Science and Technology, ICAST 2010. 25- 26 Mayıs 2010, Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye. Poster Sunumu.
- Nalbantsoy, A., Ayyıldız Tamis, D., Akgun, I.H., Ozturk-Yalcın, T., Deliloglu Gurhan, I., Karaboz, I. Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Zingiber officinalis Extracts FABAD J. Pharm. Sci., 33, 1-9, 2010.
- Orta Ölçekli MAb Üretimi ve Saflaştırması (108M578), TÜBİTAK projesi’nde proje elemanı ve bursiyeri (Mayıs 2009– Aralık 2010).
- Ayyıldız D\*., Selimoğlu M., Gürhan D. İ., Elibol M. (2009) Cultivation of Calcium Alginate Encapsulated Myeloma Cells in Bioreactors. International Journal of Natural&Engineering Sciences 3 (2): 48–53.
- Selimoğlu M, Ayyıldız Tamiş D.\*, Nalbantsoy A., Elibol M., Deliloğlu Gürhan İ. Purification of Alginate for Feasible Production of Monoclonal

Antibodies by the Immobilized Hybridoma Cells. Biotech Metu 2009 International symposium on Biotechnology: Developments and Trends. 27-30 Eylül 2009, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Ankara, Türkiye. Poster sunumu.

- Selimoğlu S.M\*, Ayyıldız D., Nalbantsoy A., Elibol M., Deliloğlu-Gürhan, İ. “Aljinat Enkapsülasyonu ile İmmobilize Edilen Hibridoma Hücrelerinden Monoklonal Antikor Üretimi”. 14. Biyomedikal Mühendisliği Ulusal Toplantısı, İzmir, 2009. Sözlü Sunum.
- Ayyıldız D\*, Selimoğlu M., Gürhan D. İ., Elibol M. Kalsiyum Aljinat Mikrokürelere Tutuklanmış Miyeloma Hücrelerinin Biyoreaktördeki Davranışı. IV. Ulusal (Uluslar arası katılımlı) Biyomühendislik kongresi, 15–18 Ekim 2008, Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye. Poster sunumu.
- Aljinat mikrokürelere enkapsüle edilmiş Ag8 Miyeloma hücrelerinin karıştırılmalı tank biyoreaktörde üretimi (EBİLTET Projesi, uygulamalı diploma tezi 2007–2008)
- Ayyıldız, D. Savunma Sistemi. Hücre 2004 Dergisi Sayı:1, Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, 2004.