GEÇİCİ KAPAK

Kapak tasarımı
devam ediyor.

BİDGE Yayınları

Sağlık ve Biyoteknolojide Biyomühendislik

Editör: ALİ CAN ÇABUKER

ISBN: -

1. Baskı
Sayfa Düzeni: Gözde YÜCEL
Yayınlama Tarihi: -
BİDGE Yayınları

Bu eserin bütün hakları saklıdır. Kaynak gösterilerek tanıtım için yapılacak kısa alıntılar dışında yayıncının ve editörün yazılı izni olmaksızın hiçbir yolla çoğaltılamaz.

Sertifika No: 71374
Yayın hakları © BİDGE Yayınları
www.bidgeyayinlari.com.tr - bidgeyayinlari@gmail.com
Krc Bilişim Ticaret ve Organizasyon Ltd. Şti.
Güzeltepe Mahallesi Abidin Daver Sokak Sefer Apartmanı No: 7/9 Çankaya / Ankara

ÖNSÖZ

Biyomühendislik, mühendislik bilimlerinin analitik yaklaşımını biyoloji, tıp ve yaşam bilimleri ile birleştirerek insan yaşamının kalitesini artırmayı amaçlayan, günümüzün en hızlı gelişen disiplinlerinden biridir.

Bilim ve teknolojide yaşanan hızlı dönüşüm, biyomühendisliği yalnızca mevcut problemlere çözüm üreten bir alan olmaktan çıkararak geleceğin sağlık sistemlerini şekillendiren stratejik bir disiplin hâline getirmiştir. Bu nedenle biyomühendislik yalnızca teknik bilgiye değil, aynı zamanda etik değerlere, sürdürülebilirlik anlayışına ve yenilikçi düşünme becerilerine de sahip olmayı gerektirmektedir.

Bu eserin hazırlanmasında bilgi ve deneyimleriyle bilim dünyasına katkı sunan tüm araştırmacılara, akademisyenlere ve meslektaşlarımıza teşekkür ederiz. Ayrıca öğrenme ve araştırma azmiyle bilimin ilerlemesine katkı sağlayan öğrencilerimize ilham vermesini ve biyomühendislik alanında yeni fikirlerin, projelerin ve teknolojilerin geliştirilmesine katkıda bulunmasını dileriz.

Bu kitabın, biyomühendislik alanında eğitim gören ve çalışan herkes için güvenilir, güncel ve kapsamlı bir başvuru kaynağı olması dileğiyle…

Dr. Öğretim Üyesi Ali Can ÇABUKER

ARTVİN ÇORUH ÜNİVERSİTESİ

İÇİNDEKİLER

VİRAL VEKTÖR ÜRETİMİNDE BİYOMÜHENDİSLİK ZORLUKLARI: GEN TEDAVİLERİNDE YÜKSEK TİTREDE ÜRETİM VE SAFSIZLIKLARIN GİDERİLMESİNE İLİŞKİN SORUNLAR 1

ÜMİT ÜREK

BÖLÜM 0

VİRAL VEKTÖR ÜRETİMİNDE BİYOMÜHENDİSLİK ZORLUKLARI: GEN TEDAVİLERİNDE YÜKSEK TİTREDE ÜRETİM VE SAFSIZLIKLARIN GİDERİLMESİNE İLİŞKİN SORUNLAR

Ümit Ürek[1]

Giriş/Introduction

Gen tedavisi tıbbi ürünleri, İleri Tedavi Tıbbi Ürünleri (ATMP'ler) kategorisi kapsamına girer. Türkiye'de ATMP'ler; gen tedavisi tıbbi ürünleri, somatik hücre tedavisi tıbbi ürünleri veya doku mühendisliği ürünleri olarak tanımlanmaktadır (Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu, 2023). Rekombinant adeno-ilişkili virüs (rAAV; yabanıl tip virüs: AAV) temelli gen tedavilerinin 200'den fazla klinik çalışmada incelendiği bildirilmiştir. (Gimpel et al., 2021); lentiviral vektörler (LV), özellikle kimerik antijen reseptörü T-hücresi (CAR-T) tedavileri gibi *ex vivo* uygulamalarda kullanılmaktadır (Perry & Rayat, 2021).

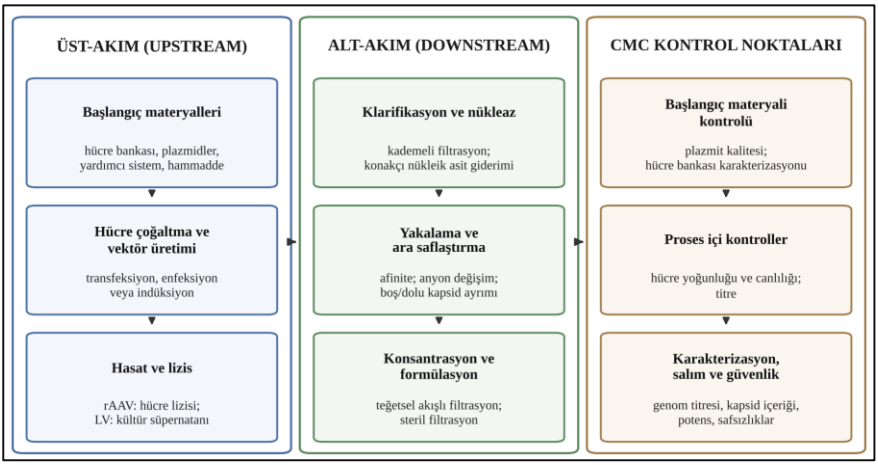
Prosedürün endüstriyel ölçeğe taşınmasındaki zorluk, büyük ölçüde ihtiyaç duyulan vektör miktarından kaynaklanmaktadır. Hemofili B üzerine yapılan ve AAV8 vektörünün kullanıldığı bir çalışmada, yüksek doz grubuna kilogram başına 2×10^{12} vektör genomu (vg/kg) uygulanmış (Nathwani et al., 2011); LV üretim

[1] Dr. Müh., Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu, İleri Tedavi Tıbbi Ürünler Birimi, ORCID: 0000-0003-3645-6571

süreçlerinden yıllık olarak elde edilmesi beklenen miktar, hasta sayısına ve dozaj miktarına bağlı olarak 10^{10} ile 10^{12} transdüksiyon birimi (TU) arasında değişebilmektedir (Perry & Rayat, 2021). vg, fiziksel genom kopyalarını, TU ise hedef hücrelerde ölçülen biyolojik transdüksiyon kapasitesini yansıtır; konsantre LV preparatlarında RNA ve kapsid proteini p24'ün ölçümüne dayanan fiziksel titrasyon değerlerinin transdüksiyon verimliliğinin zayıf göstergeleri olduğu gösterildiğinden (Geraerts et al., 2006) bu iki birim birbirine dönüştürülmemeli ve farklı vektörlerin büyüklükleri doğrudan kıyaslanmamalıdır.

Bu bölüm, üst-akım (upstream) ve alt-akım (downstream) biyomühendislik darboğazlarını, safsızlıkların (impurity) giderilmesiyle ilgili zorlukları ve Kalite Tasarımı (QbD) ile Kimya, Üretim ve Kontrol (CMC) gereksinimlerini rAAV ve LV ile sınırlı olarak incelemektedir; Şekil 1 üretim zincirinin genel akışını özetlemektedir. LV ile ilgili sayısal verilerin büyük bir kısmı tek bir derleme çalışmasından (Perry & Rayat, 2021) alınmıştır; söz konusu derlemenin kaynakçasında yer alan birincil çalışmalara dayanan bu değerler, burada ikincil bir kaynak aracılığıyla sunulmaktadır. Farklı hücre hatları, metodolojiler ve ölçekler kullanılarak elde edildiklerinden, bu veriler büyüklük derecelerine dair örnekler olarak yorumlanmalıdır.

Şekil 1. rAAV ve LV üretim zincirine dair şematik genel bakış



Viral Vektör Platformlarının Üretimi Belirleyen Özellikleri

rAAV kapsidi; VP1, VP2 ve VP3 proteinlerinden oluşan, 60 alt birimli, ikozahedral bir yapıdır (Wright, 2014) ve partikül çapı yaklaşık 25 nm'dir (Gimpel et al., 2021). Ters çevrilmiş uç tekrarlarıyla (ITR) dizileriyle çevrelenmiş ifade kasetini taşıyan vektör şablonu tüm rAAV üretim sistemlerinde bulunur ve gereklidir; rep ve cap dizileri ile yardımcı işlevler ise üretime eklenen yardımcı bileşenler (plazmidler veya virüsler) üzerinden sağlanır (Wright, 2014). Bileşenlerin sunulma biçimi platformdan platforma farklılık gösterir ve her platform kendine özgü bir safsızlık profili ortaya çıkarır; en sık rastlanan safsızlıklar arasında kusurlu partiküller, konakçı hücre ve yardımcı virüs (adenovirüs, herpes simpleks virüsü veya bakülovirüs) kaynaklı kalıntı proteinler ve plazmid, hücre ya da yardımcı virüs kökenli olup rAAV partiküllerine paketlenebilen istenmeyen (illegitimate) DNA yer alır (Penaud-Budloo et al., 2018). Boş kapsidlerin nihai ürünle yapısal benzerlik göstermesi, bunların uzaklaştırılmasını güçleştirmektedir; ayrıca, küçük DNA parçaları içeren partikülleri tamamen boş kapsidlerden ayırt etmek de kolay değildir (Wright, 2014).

LV'ler tipik olarak insan immün yetmezlik virüsü tip 1 (HIV-1) temellidir; 80–120 nm çapında küresel ve zarflı partiküllerdir, 11 kilobaza (kb) kadar transgen taşıyabilir, bölünen ve bölünmeyen hücreleri transdükte edebilirler. Biyogüvenlik gerekçesiyle viral genom 3–4 plazmide bölünmüştür ve transfer plazmidi kendini inaktive eden (SIN) tasarıma sahiptir. Zar yapısı, beraberinde bir kırılganlık da getirir: 37 °C'deki yarı ömrün 7–8 saat civarında olduğu ve 1 M sodyum klorür ile muamele edildiğinde fonksiyonel titre değerinin %50'sinin bir saat içinde kaybolduğu bildirilmiştir. Kusurlu parçacıkların, işlevsel vektörle birlikte saflaştırılabilmesi, proses kapasitesini daha da sınırlandırmaktadır (Perry & Rayat, 2021).

LV'lere hedef hücre tropizmi çoğunlukla zarf proteininin modifikasyonuyla (pseudotyping) kazandırılır ve bu seçim üretim sürecini de belirler. Altın standart olarak kabul edilen veziküler stomatit virüsü glikoproteini (VSV-G), düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) reseptörü aracılığıyla geniş bir tropizm ve yüksek işlevsel titreler sağlar; buna karşılık yüksek düzeyde ekspresyon, üretici hücre hatlarında istikrarsızlığa yol açar; insan serumunda bulunan kompleman sistemi tarafından inaktive edilir ve CAR-T tedavisi açısından önemli bir hücre popülasyonu olan dinlenme halindeki lenfositlerde reseptör ekspresyonu düşüktür. Kedi endojen retrovirüsünden türetilen RD114 zarfı, daha az sitotoksiktir ve stabil üretici hücre hatlarında kullanılabilir; RDPro türeviyle, geçici üretimde RD114'e kıyasla yaklaşık bir logaritmik birim daha yüksek bir titre değeri elde edildiği bildirilmiştir. Uygulama yöntemi, kalite önceliklerini de değiştirir: *in vivo* uygulamada ağırlık kalite ve konsantrasyon üzerindeyken, *ex vivo* uygulamada ise kalite ve verime kayar; transdüksiyon işleminde, tek kopyalı entegrasyonu sağlamak ve sitotoksisite ile tümörijenik potansiyeli sınırlamak amacıyla enfeksiyon çokluğunun (MOI) düşük tutulduğu belirtilmektedir (Perry & Rayat, 2021). Tablo 1, üretimi belirleyen iki vektörün özelliklerini karşılaştırmaktadır.

Tablo 1. rAAV ve LV'nin üretimi belirleyen temel özelliklerinin karşılaştırması

Özellik	**rAAV**	**LV**
Partikül yapısı ve boyutu	60 alt birimli ikozahedral kapsid (VP1–VP3) (Wright, 2014); çap ≈25 nm (Gimpel et al., 2021)	Zarflı küresel partikül; 80–120 nm (Perry & Rayat, 2021)
Doz ve titre birimi	vg (örneğin vg/kg) (Nathwani et al., 2011)	TU (bkz. Giriş/Introduction) (Perry & Rayat, 2021)
Başlıca ürünle ilişkili safsızlıklar	Boş kapsidler; kapsidlenmiş konakçı ve yardımcı bileşen DNA'sı; replikasyon yetkin AAV (rcAAV); enfektif olmayan ve agregat partiküller (Wright, 2014)	Fonksiyonel olmayan vektör; serbest vektör zarfları; viral agregatlar (Perry & Rayat, 2021)
Başlıca süreç darboğazı	Boş kapsidlerin ürüne yapısal benzerliği nedeniyle ayrımın güç olması (Wright, 2014)	Zarflı partikülün kırılganlığı; stabil hatlarda viral bileşen sitotoksisitesi (Perry & Rayat, 2021)
Başlıca üretim platformları	HEK293 plazmid transfeksiyonu (iki veya üç plazmid); Sf9/baculovirus; herpes simpleks virüsü (HSV) temelli sistemler (Clément & Grieger, 2016)	HEK293 veya HEK293T geçici transfeksiyonu; stabil üretici hatlar (Perry & Rayat, 2021)

Üst-Akım (Upstream) Süreçler

Üst-akım aşaması konak hücre hattının, üretim yönteminin, biyoreaktörün ve kültür ortamının seçimini kapsar. LV üretim için genellikle insan embriyonik böbrek (HEK) 293 hücreleri ya da bunların, maymun virüsü 40 (SV40) büyük T antijenini taşıyan bir türevi olan HEK293T hücreleri tercih edilir; geçici üretimde, genellikle milyon hücre başına en az 1 μg plazmid DNA kullanılır; polietilenimin (PEI) ise kalsiyum fosfat veya katyonik lipitlere kıyasla, ölçeklendirilebilir transfeksiyon için daha uygun ve maliyet etkin bir seçenek olarak kabul edilir (Perry & Rayat, 2021). rAAV'nin klinik ölçekte üretiminde en yaygın yöntem plazmid

transfeksiyonudur; geleneksel yaklaşımda vektör plazmidi ile Rep, Cap ve Ad5 işlevlerini taşıyan yardımcı plazmid eş molar kullanılır, bunun bir varyantı olan "iki yardımcılı" (two-helper) yöntemde ise AAV ve Ad5 işlevleri ayrı plazmidlerde taşınır (üçlü transfeksiyon). Bu yöntemde hücrelerin tipik olarak %80'e kadarı transfekte olur ve vektör üretimi hücre hasadında 48–72 saat arasında en yüksek düzeye ulaşır. Nitelikli bir klinik ana hücre bankasından elde edilen HEK293 hücreleri, süspansiyon kültüründe çoğalacak şekilde adapte edilmiş; PEImax kullanılarak gerçekleştirilen üçlü transfeksiyon sonrasında, ham lizatlarda 10^5 vg/hücrenin üzerinde bir verim elde edildiği bildirilmiştir. (Clément & Grieger, 2016).

Geçici transfeksiyonun maliyet ve tutarlılık açısından sahip olduğu sınırlamalar, kararlı üretici hücre hatlarına doğru bir yönelmeye yol açmıştır. Bu hatlarda viral bileşenler sürekli (konstitütif olarak) ifade edilir; herhangi bir ilave plazmid veya transfeksiyon reaktifi gerekmez; bununla birlikte, viral bileşenlerin sitotoksik etkileri nedeniyle, elde edilen titreler geçici yöntemlerle ulaşılan seviyelerin altında kalabilir; ayrıca tetrasiklin ile indüklenebilen sistemlerde, indükleyici maddenin daha sonra ortamdan uzaklaştırılması, "sızıntılı" (leaky) ekspresyon riski doğurur.(Perry & Rayat, 2021) (bildirilen titreler için bkz. Tablo 2). Büyük ölçekli LV üretimine yönelik yeni protokollerin, paketleme hatlarının ve kültür cihazlarının hedeflenen seviyeye yaklaştığı belirtilmektedir (Martínez-Molina et al., 2020). rAAV tarafında *rep* ve *cap*'i indüklenebilir ifade eden Sf9 stabil hatlarına dayalı iki bileşenli sistem geliştirilmiş, HSV temelli üretim HEK293 veya yavru hamster böbrek (BHK) hücrelerinin iki rekombinant HSV stoğuyla eş zamanlı enfeksiyonuyla sağlanmış, çoğunlukla HeLa türevi olan stabil hatların klinik kullanımını ise üç dezavantaj sınırlamıştır; enfeksiyon temelli yöntemler (adenovirüs, herpesvirüs, baculovirus) yardımcı sistemden kaynaklanan kirleticiler ve safsızlıklar için ek test gerektirir (Clément & Grieger, 2016).

Ölçek kararları hem titreyi hem safsızlık yükünü belirler. Yapışkan kaplarla çoğaltmada (scale-out) elle manipülasyon ve kontaminasyon riski artar; flask ve döner şişe kültürlerinde çözünmüş oksijen (DO) ve pH hat içi izlenip kontrol edilemez; sabit yataklı biyoreaktörler ise kültür parametrelerinin hat içi izlenmesine olanak verir. Karıştırmalı tanklarda üretici hücreleri kayma hasarından korumak esastır ve memeli hücreleri bakteri hücrelerine göre daha düşük hacimsel oksijen transfer katsayısı (kLa) gerektirdiğinden ölçek büyütme kriteri olarak birim hacim başına güç girdisi ve pervane uç hızı tercih edilir. Yüksek hücre yoğunluğu daha düşük canlılıkla ilişkilidir ve uzaklaştırılması gereken kirletici kütlesini artırır. Besiyeri alt-akıma giren ilk vektör içeren besleme akışını oluşturur; serumun çıkarılması bulaş ve tedarik endişeleri ile yüksek protein yükü nedeniyle istenir ve serumsuz besiyerlerinde karşılaştırılabilir titrelere ulaşıldığı bildirilmiştir (Perry & Rayat, 2021).

Alt-Akım (Downstream) Süreçler: Safsızlık Giderimi ve Verim İkilemi

Viral vektör safsızlıkları ürünle ilişkili (product-related) ve süreçle ilişkili (process-related) olmak üzere ikiye ayrılır. LV'de ürünle ilişkili safsızlıklar fonksiyonel olmayan vektörü, serbest vektör zarflarını ve viral agregatları; süreçle ilişkili safsızlıklar konakçı hücre proteinlerini (HCP), lipitleri ve DNA'sını (hcDNA), plazmid DNA'sını, transfeksiyon reaktiflerini, indükleyici ajanları, nükleazları ve besiyeri bileşenlerini kapsar (Perry & Rayat, 2021). rAAV'de ürünle ilişkili safsızlıklar boş kapsidler, kapsidlenmiş konakçı hücre nükleik asitleri ve yardımcı bileşen DNA'sı, replikasyon yetkin AAV (rcAAV), enfektif olmayan partiküller ile agregat, bozunmuş ve okside vektörler olarak tanımlanmış; kabul edilebilir düzeylerin belirlenmesinin dikkatli bir risk ve fizibilite değerlendirmesi gerektirdiği vurgulanmıştır (Wright, 2014).

Alt-akım, klarifikasyonla başlar; filtrelerin tutma değerleri çoğunlukla 10 ile 0,2 µm arasında kademeli (cascading) sıralanır ve steril filtrasyondaki kaybın kısmen yetersiz formülasyon ile zayıf saflaştırmadan kaynaklandığı belirtilir. Viral partiküllerle ilişkili konakçı nükleik asitleri nükleazla muamele gerektirir; hacim büyüdükçe daha fazla enzim birimi gerektiğinden maliyet artar, bazı nükleazlar magnezyum iyonu, yükseltilmiş sıcaklık ve belirli pH aralıkları ister ve enzimin kendisi ileri aşamalarda uzaklaştırılmalıdır (Perry & Rayat, 2021). Literatürde sıkça atıf yapılan kalıntı hücre substratı DNA'sı ölçütleri doz başına ≤10 ng ve ortanca DNA boyutunun ≤200 baz çifti (bç) olmasıdır; buna karşılık rAAV kapsidlerine paketlenen konakçı DNA parçalarının yaklaşık 4700 nükleotide (nt) kadar tek zincirli parçalar olarak öngörüldüğü belirtilmiştir (Wright, 2014). Bu nedenle söz konusu ölçütlerin gen tedavisi ürünlerine uygulanışı ürüne özgü olarak gerekçelendirilmelidir.

Klinik kullanıma yönelik rAAV'lerde yoğunluk temelli saflaştırmanın yerini afinite temelli yöntemler almıştır. AAV'ye özgü afinite ligandları deve familyası (camelid) hayvanlardan türetilmiş tek etki alanlı antikorlara dayanır; AVB Sepharose ile AAV9 ligandının (CSAL9) kapsidin 5 katlı simetri bölgesine farklı yönelimlerle, AAV8 ligandının (CSAL8) ise 3 katlı çıkıntının yan yüzüne bağlandığı, bu bağlanma profillerinin AAV1, AAV2, AAV5, AAV8 ve AAV9 üzerinde kriyo-elektron mikroskobuyla haritalandığı gösterilmiştir; bu nedenle yeni kapsid varyantlarının afinite kolonlarıyla saflaştırılabilirliği vektör tasarımı aşamasında dikkate alınmalıdır (Mietzsch et al., 2020). Gözenekli boncuk tabanlı reçinelerde gözenekler viral partiküller için çok küçük kaldığından iç yüzey alanına erişilemez; bu nedenle monolitler, membran adsorberler ve nanofiber fazlar gibi konvektif kütle transferine dayanan malzemeler geliştirilmiştir. LV'de anyon değişim kromatografisiyle (AEX) geri kazanımı seçilen faza ve koşullara göre belirgin biçimde değişir; yeni geliştirilen nanofiber temelli

AEX fazlarıyla yaklaşık %90 geri kazanım bildirilmiştir. Konsantrasyon ve tampon değişimi için ultrafiltrasyon/diafiltrasyon modunda çalışan teğetsel akışlı filtrasyon (TFF) kullanılır; LV'lerin dondurma-çözme döngülerine ve tampon osmolaritesine duyarlılığı formülasyon kararlarını yönlendirir (Perry & Rayat, 2021).

Boş ve dolu kapsid ayrımı rAAV'de ayrı bir sorundur. Wright (2014), yeterince saflaştırılmamış preparatların dolu vektöre göre fazla miktarda (örneğin 10 kat) boş kapsid içerebildiğini; bunların kapsid antijenine yönelik adaptif bağışıklık yanıtlarını şiddetlendirme ve hedef hücrelerdeki bağlanma bölgeleri için yarışarak doz gereksinimini yükseltme potansiyeli taşıdığını belirtmekte ve AAV2-hFIX ile AAV8-hFIX çalışmalarında kapsid-spesifik CD8+ T hücresi yanıtının dönüştürülmüş hepatositlerin temizlenmesiyle ilişkilendirildiğini aktarmaktadır. AAV8 vektörünün yüksek dozunu alan iki katılımcıdan birinde, AAV8 kapsid-spesifik T hücrelerinin saptanmasıyla ilişkili geçici ve asemptomatik bir aminotransferaz yükselmesi görülmüş, diğerinde nedeni daha az açık hafif bir karaciğer enzimi artışı gelişmiştir; kısa süreli glukokortikoid tedavisi enzim düzeylerini hızla normale döndürmüş ve transgen ifadesi korunmuştur (Nathwani et al., 2011). Doz arttıkça hem toplam kapsid antijeni hem de preparattaki boş kapsid miktarı artacağından, bu gözlemlerde boş kapsidlerin payı toplam kapsid yükünün doza bağlı etkisinden ayrıştırılamaz; boş kapsidlerin bağışıklık yanıtını artırdığı görüş bu nedenle hipotez düzeyinde kalmaktadır (yazarın değerlendirmesi). Fare modellerinde boş AAV virionlarından kapsid antijeni sunumunun doza bağlı indüklendiği gösterilmiştir (Pei et al., 2018).

Ayrımda iyon değişim kromatografisi kullanılır; bu yöntemle boş ve dolu kapsidlerin ayrılabildiği AAV2, AAV5 ve AAV6 için bildirilmiştir (Wright, 2014). Joshi et al. (2021), AAV5 için geliştirdikleri AEX yönteminde tek adımda yaklaşık 9 kat zenginleşme sağlandığını ve nihai preparatın %80 ± 5 oranında genom içeren vektör kapsidinden oluştuğunu analitik ultrasantrifüj

(AUC) ile doğrulayarak bildirmiş; optimize edilen süreci AAV6, AAV8 ve AAV9 ile de doğrulayarak %90'ın üzerinde vektör zenginleşmesi elde etmiştir (bkz. Tablo 2). Hedeflenen dolu kapsid oranını yükseltmek için ürünün daha dar bir fraksiyondan toplanması geri kazanımı düşürebileceğinden, saflık ile verim arasında denge kurmak süreç geliştirmenin merkezî optimizasyon problemlerinden biridir (yazarın değerlendirmesi).

Tablo 2. Üst-akım ve alt-akım süreçlerinde bildirilen başlıca sayısal değerler

Parametre	**Bildirilen değer**	**Bağlam**	**Kaynak**
Saflaştırılmamış hasatta LV titresi	10^6–10^7 TU/mL	Geçici transfeksiyon	(Perry & Rayat, 2021)
Süspansiyonda LV titresi	10^6 TU/mL ve altı; kademeli adaptasyonla 10^8 TU/mL	Süspansiyona adaptasyon	(Perry & Rayat, 2021)
Sabit yataklı biyoreaktör (iCELLis)	$>10^{10}$ TU	LV; perfüzyon; 4 m^2 yatak, 5,5 L hacim	(Perry & Rayat, 2021)
Perfüzyon kültürü	Kesikliye göre 15 kata kadar iyileşme; 10^{11} kümülatif TU/L'ye kadar	LV	(Perry & Rayat, 2021)
Stabil üretici hatlar	LentiPro26 ve WinPac: 10^6 TU/mL/gün; indüklenebilir 293SF-PacLV: $3{,}4\times10^7$ TU/mL/gün	LV; LentiPro26/WinPac yapışkan kültür; 293SF-PacLV süspansiyon, serumsuz, VSV-G	(Perry & Rayat, 2021)
rAAV verimi	$>10^5$ vg/hücre (ham lizat)	Süspansiyon HEK293, PEImax ile üçlü transfeksiyon	(Clément & Grieger, 2016)

Parametre	Bildirilen değer	Bağlam	Kaynak
Düşük titrenin maliyet payı	%26'ya kadar	Otolog hücre tedavisi maliyet analizi	(Perry & Rayat, 2021)
Derinlik filtrasyonu (katkı maddesiz)	>%95 titre geri kazanımı; >%85 HCP azaltımı	LV; 50 L ölçek	(Perry & Rayat, 2021)
Steril filtrasyon	%30–50 titre kaybı	LV; 0,22 µm şırınga tipi membran filtre	(Perry & Rayat, 2021)
AEX ile rAAV zenginleştirme	AAV5: ≈9 kat, %80 ± 5 genom içeren kapsid; AAV6, AAV8, AAV9: >%90 zenginleşme	rAAV; sv-AUC (AAV5, AAV8) ve optik yoğunluk (AAV6, AAV9)	(Joshi et al., 2021)

Kalite Tasarımı (QbD) ve CMC Gereksinimleri

Kalite, ürünün kendisinden önce başlangıç materyallerinin kalitesiyle şekillenir. Avrupa İlaç Ajansı'nın (EMA) gen tedavisi kılavuzu, başlangıç materyalleri başlığı altında virüs tohum bankalarını, ökaryotik hücre bankalarını, RNA veya DNA vektörleri ile plazmidleri, bakteriyel hücre bankalarını ve kompleksleştirici materyalleri ayrı ayrı ele alır (European Medicines Agency, 2018); Avrupa Birliği'nin ATMP'lere özgü İyi Üretim Uygulamaları (GMP) kılavuzunda da başlangıç ve hammaddeler ile tohum partisi ve hücre bankası sistemi ayrı bölümler hâlindedir (European Commission, 2017). Plazmidler yalnızca bir girdi değildir: paketlenmiş kalıntı DNA safsızlıklarının saflaştırılmış vektör partiküllerinde vektör genomu DNA'sının %1–8'i düzeyinde bulunduğu ve bu safsızlığın başlıca ITR içeren vektör şablonundan türediği bildirilmiştir; ITR'ye bitişik plazmid veya bakmid omurga dizilerinin ifade kasetinin yanında paketlenmesi bu gözlemi açıklayan mekanizma olarak öne sürülmektedir (Wright, 2014).

Amerika Birleşik Devletleri (ABD) Gıda ve İlaç Dairesi'nin (FDA) gen tedavisi ürünleri için araştırma amaçlı yeni ilaç

başvurularına (IND) ilişkin CMC rehberi, sunulacak bilginin ürünün güvenlik, kimlik, kalite, saflık ve güç (potens dâhil) özelliklerini desteklemesini amaçlar (U.S. Food and Drug Administration, 2020a). Viral vektörlerin heterojen doğası, hedef ürün kalite profilinin, CQA'ların ve kontrol stratejisinin erkenden tanımlandığı QbD yaklaşımını yararlı kılar; kalite risk yönetimi ile ilaç kalite sisteminin çerçevesi Uluslararası Uyumlaştırma Konseyi'nin (ICH) Q9(R1) ve Q10 kılavuzlarındadır (International Council for Harmonisation, 2008, 2023d). Beklenti düzeyinin doğru okunması önemlidir: ICH soru-cevap belgesinde Q8(R2)'de tanımlanan "geliştirilmiş" (enhanced) yaklaşımın teşvik edildiği, buna karşın tasarım alanı oluşturmanın veya gerçek zamanlı salım testi uygulamanın mutlaka beklenmediği belirtilmektedir (U.S. Food and Drug Administration, 2011b).

rAAV için virüs titresi, kapsid içeriği ve agregasyon olası CQA'lar olarak tanımlanmakta; bu özellikleri ölçen yöntemlerin sıklıkla uzun analiz süresi veya düşük verim sorunu yaşadığı vurgulanmaktadır. Standart eğri gerektirmediğinden dijital damlacık polimeraz zincir reaksiyonu (ddPCR) öne çıkmakta; kapsid içeriğinin belirlenmesinde AUC boş, kısmi dolu ve dolu kapsidlerin göreli oranını vermekte, anyon değişim kromatografisi boş ve dolu kapsidleri ayırmakta, transmisyon elektron mikroskobu fiilî referans yöntemi olarak kullanılmakta, yük saptamalı kütle spektrometrisi ise henüz geliştirme aşamasında bulunmaktadır (Gimpel et al., 2021). Düzenleyici tarafta potens ayrı bir gereklilik olarak ele alınır: FDA'nın potens testlerine ilişkin rehberi, IND veya biyolojik ürün lisans başvurusunu (BLA) destekleyebilecek potens bilgisine ilişkin öneriler sunmakta, ancak belirli test türleri önermemekte ve salım kabul kriteri belirlememektedir (U.S. Food and Drug Administration, 2011a). Analitik yöntem geliştirme ve validasyonu ICH Q14 ve Q2(R2) ile harmonize edilmiştir (International Council for Harmonisation, 2023a, 2023b).

Sistemik uygulama ayrı bir güvenlik boyutu getirir: spinal musküler atrofi tip 1'de intravenöz rAAV9 uygulanan 15 hastanın 4'ünde serum aminotransferaz düzeyleri yükselmiş ve prednizolon ile azalmıştır (Mendell et al., 2017); yüksek vektör dozlarının kompleman aktivasyonu ve karaciğer toksisitesi gibi ciddi advers etkilerle, bazı klinik çalışmalarda ise ölümlerle ilişkilendirildiği bildirilmiştir (Bradbury et al., 2023). Retroviral vektör temelli ürünlerde replikasyon yetkin retrovirüs (RCR) oluşumu ayrıca izlenir: FDA'nın Ocak 2020 tarihli nihai rehberi RCR ile replikasyon yetkin lentivirüs (RCL) terimlerini eş anlamlı sayar; üretici hücrenin ana ve çalışma hücre bankalarının, vektör süpernatan ürünü ile üretim sonu hücrelerinin ve ex vivo transdükte edilmiş hücrelerin test edilmesini, hasta izlemenin ise dozlamadan sonra 15 yıla kadar sürdürülmesini önerir (U.S. Food and Drug Administration, 2020b).

Üretim değişikliklerinin yönetimi kalite dosyasının sürekliliğini belirler. Genel ilke ICH Q5E'de ortaya konmuştur: değişiklik öncesi ve sonrası ürünün yüksek düzeyde benzer olduğu ve kalite özelliklerindeki olası farkların güvenlik ile etkinliği olumsuz etkilemediği gösterilmelidir (International Council for Harmonisation, 2004). FDA'nın Temmuz 2023 tarihli taslak rehberi bu değişikliklerin yaşam döngüsü boyunca yönetimini ele alır (U.S. Food and Drug Administration, 2023); Mayıs 2026'da yayımlanan nihai CMC esneklikleri rehberi (FDA-2026-D-4692) ise BLA'ya yönelik geliştirilmekte olan ürünlerde CMC esnekliklerinin ne zaman uygun olabileceğini ele almakta, ancak lisans için gereken CMC bilgisinin tamamını kapsamadığını belirtmektedir (U.S. Food and Drug Administration, 2026). Viral güvenlik tarafında, Kasım 2023'te Adım 4 düzeyinde kabul edilen ve 14 Haziran 2024'ten itibaren yürürlüğe giren ICH Q5A(R2), kapsamını ürüne olumsuz etki olmaksızın viral klirense uygun belirli genetik olarak mühendislenmiş viral vektör ve viral vektör türevi ürünleri içerecek biçimde genişletmiş, bu ürünler için Ek 6'yı sunmuş ve sürekli

üretimde viral güvenlik hususlarını ele almıştır (International Council for Harmonisation, 2023c).

Düzenleyici çerçeve ülkelere göre farklı belgelerde toplanır. Türkiye'de ATMP'ler, 27 Mayıs 2023 tarihli ve 32203 sayılı Resmî Gazete'de yayımlanan İleri Tedavi Tıbbi Ürünler Ruhsatlandırma Yönetmeliği kapsamındadır; yönetmeliğin 10. maddesi uyarınca ruhsat başvurusu, yönetmeliğin Ek-5'i ile Beşerî Tıbbi Ürünler Ruhsatlandırma Yönetmeliği ekindeki Ek-1'e uygun hazırlanır (Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu, 2023). Avrupa Birliği'nde ruhsat başvurusuna yönelik kalite, klinik dışı ve klinik gereklilikler EMA/CAT/80183/2014 sayılı kılavuzda toplanmıştır; kılavuz genetik olarak değiştirilmiş hücre içeren ürünleri kapsamamakla birlikte, bu hücrelerin modifikasyonunda kullanılan vektörler için ilkeleri geçerlidir (European Medicines Agency, 2018); ATMP üretimine özgü GMP gereklilikleri EudraLex Cilt 4, Kısım IV'te yer alır ve kılavuz 22 Kasım 2017'de kabul edilerek üreticilerden en geç 22 Mayıs 2018'e kadar uyum beklenmiştir (European Commission, 2017). Avrupa Farmakopesi'nde 5.14 genel bölümünün yerini, gen tedavisi tıbbi ürünlerine ilişkin gereklilikleri ortaya koyan "*Gene therapy medicinal products for human use*" (3186) genel monografı almıştır; buna eşlik eden "*Additional information on gene therapy medicinal products for human use*" (5.34) genel bölümü de yayımlanmıştır. Değişiklik, Ph. Eur. Ek 11.7 ile 1 Nisan 2025'ten itibaren uygulanmaya başlamıştır (European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, n.d.).

Sürekli Üretim ve Süreç Yoğunlaştırma Perspektifleri

Süreç yoğunlaştırmanın en çok tartışılan yolu, perfüzyon kültürünün alt-akıma doğrudan bağlanmasıdır; bu bağlantı kuramsal bir olanak olarak sunulmakta ve sabit yataklı bir sistemin hat içi TFF, klarifikasyon ve kromatografi ile birleştirilebildiği belirtilmektedir (Perry & Rayat, 2021). Düzenleyici tarafta kapsamın doğru okunması gerekir: ICH Q13 sürekli üretim için ortak bir çerçeve

sunarken kapsamını kimyasal moleküller ve terapötik proteinlerle sınırlar (International Council for Harmonisation, 2022); viral vektörlerde kullanımı doğrudan bir kapsam ilişkisinden değil, ilkelerin genişletilmesinden doğar.

Sonuç

Viral vektör üretimindeki darboğazlar, vektörün türüne göre değişiklik gösterir. rAAV söz konusu olduğunda temel zorluk, elde edilen ürün miktarı (verim) ile yapısal olarak ürüne benzeyen boş kapsidlerin, dolu kapsidlerden ayrıştırılmasındaki güçlük arasındaki dengedir. LV'de ise öne çıkan sorunlar arasında; zarla çevrili parçacıkların hassas yapısı, zar proteini seçiminin üretim süreci üzerindeki etkisi ve stabil hücre hatları kullanıldığında ortaya çıkan sitotoksisite kısıtlamaları yer alır. Giriş bölümünde değinilen miktar gereklilikleri, bu farklılıkları daha da belirginleştirir: *in vivo* rAAV uygulamaları hasta başına yüksek dozda vektör gerektirirken, *ex vivo* LV uygulamalarında kritik faktör, fonksiyonel titrenin korunmasıdır.

Üst-akım ve alt-akım kararları birbirinden bağımsız optimize edilemez; hücre yoğunluğunun artırılması, uzaklaştırılması gereken kirletici maddelerin miktarını da artırır. Ayrıca filtrasyon, nükleaz uygulaması veya kromatografi gibi sonraki her bir adım, saflıktaki artış ile verim kaybı arasında bir denge kurulmasını gerektirir. Sonuç olarak, kabul edilebilir safsızlık seviyeleri her bir ürün özelinde gerekçelendirilmeli; fiziksel ölçümler biyolojik potans tayinleriyle birlikte raporlanmalı ve ikincil kaynaklardan elde edilen tüm veriler, birincil çalışmalarla desteklenmelidir.

Beyanlar

Bu bölümde ifade edilen görüşler yazara aittir ve yazarın görev yaptığı kurumu bağlamaz. Yazar, çıkar çatışması bulunmadığını ve çalışma için finansal destek alınmadığını beyan eder.

Kaynakça/References

Bradbury, A., Markusic, D., Muhuri, M., & Ou, L. (2023). Editorial: Immunogenicity and toxicity of AAV gene therapy. *Frontiers in Immunology*, *14*, Article 1227231. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1227231

Clément, N., & Grieger, J. C. (2016). Manufacturing of recombinant adeno-associated viral vectors for clinical trials. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, *3*, Article 16002. https://doi.org/10.1038/mtm.2016.2

European Commission. (2017). *EudraLex, Volume 4: Good manufacturing practice (GMP) guidelines. Part IV: Guidelines on good manufacturing practice specific to advanced therapy medicinal products* (C(2017) 7694 final). https://health.ec.europa.eu/document/download/ad33d9dd-03f0-4bef-af53-21308ce2187d_en

European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. (n.d.). *Advancements in gene therapy: The European Pharmacopoeia's new approach*. Retrieved October 23, 2026, from https://edqm.eu/en/advancements-in-gene-therapy-the-european-pharmacopoeia-s-new-approach

European Medicines Agency. (2018). *Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products* (EMA/CAT/80183/2014). https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-quality-non-clinical-clinical-aspects-gene-therapy-medicinal-products_en.pdf

Geraerts, M., Willems, S., Baekelandt, V., Debyser, Z., & Gijsbers, R. (2006). Comparison of lentiviral vector titration methods. *BMC Biotechnology*, *6*, Article 34. https://doi.org/10.1186/1472-6750-6-34

Gimpel, A. L., Katsikis, G., Sha, S., Maloney, A. J., Hong, M. S., Nguyen, T. N. T., Wolfrum, J., Springs, S. L., Sinskey, A. J., Manalis, S. R., Barone, P. W., & Braatz, R. D. (2021). Analytical methods for process and product characterization of recombinant adeno-associated virus-based gene therapies. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, *20*, 740–754. https://doi.org/10.1016/j.omtm.2021.02.010

International Council for Harmonisation. (2004). *ICH guideline Q5E on comparability of biotechnological/biological products subject to changes in their manufacturing process (CPMP/ICH/5721/03). European Medicines Agency.* https://www.ema.europa.eu/en/ich-q5e-biotechnological-biological-products-subject-changes-their-manufacturing-process

International Council for Harmonisation. (2008). *ICH guideline Q10 on pharmaceutical quality system* (EMA/CHMP/ICH/214732/2007). European Medicines Agency. https://ema.europa.eu/en/ich-q10-pharmaceutical-quality-system

International Council for Harmonisation. (2022). *ICH guideline Q13 on continuous manufacturing of drug substances and drug products* (EMA/CHMP/ICH/427817/2021). European Medicines Agency. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-q13-continuous-manufacturing-drug-substances-drug-products-step-5_en.pdf

International Council for Harmonisation. (2023a). *ICH guideline Q14 on analytical procedure development* (EMA/CHMP/ICH/195040/2022). European Medicines Agency. https://www.ema.europa.eu/en/ich-q14-analytical-procedure-development-scientific-guideline

International Council for Harmonisation. (2023b). *ICH guideline Q2(R2) on validation of analytical procedures* (EMA/CHMP/ICH/82072/2006). European Medicines Agency. https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2r2-validation-analytical-procedures-scientific-guideline

International Council for Harmonisation. (2023c). *ICH guideline Q5A(R2) on viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin* (EMA/CHMP/ICH/804363/2022). European Medicines Agency. https://www.ema.europa.eu/system/files/documents/scientific-guideline/ich-q5ar2-guideline-viral-safety-evaluation_step-5_en.pdf

International Council for Harmonisation. (2023d). *ICH guideline Q9(R1) on quality risk management* (EMA/CHMP/ICH/24235/2006). European Medicines Agency. https://ema.europa.eu/en/ich-q9-quality-risk-management

Joshi, P. R. H., Bernier, A., Moço, P. D., Schrag, J., Chahal, P. S., & Kamen, A. (2021). Development of a scalable and robust AEX method for enriched rAAV preparations in genome-containing VCs of serotypes 5, 6, 8, and 9. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, *21*, 341–356. https://doi.org/10.1016/j.omtm.2021.03.016

Martínez-Molina, E., Chocarro-Wrona, C., Martínez-Moreno, D., Marchal, J. A., & Boulaiz, H. (2020). Large-scale production of lentiviral vectors: Current perspectives and challenges. *Pharmaceutics*, *12*(11), Article 1051. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12111051

Mendell, J. R., Al-Zaidy, S., Shell, R., Arnold, W. D., Rodino-Klapac, L. R., Prior, T. W., Lowes, L., Alfano, L., Berry, K., Church, K., Kissel, J. T., Nagendran, S., L'Italien, J.,

Sproule, D. M., Wells, C., Cardenas, J. A., Heitzer, M. D., Kaspar, A., Corcoran, S., . . . Kaspar, B. K. (2017). Single-dose gene-replacement therapy for spinal muscular atrophy. *The New England Journal of Medicine*, *377*(18), 1713–1722. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1706198

Mietzsch, M., Smith, J. K., Yu, J. C., Banala, V., Emmanuel, S. N., Jose, A., Chipman, P., Bhattacharya, N., McKenna, R., & Agbandje-McKenna, M. (2020). Characterization of AAV-specific affinity ligands: Consequences for vector purification and development strategies. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, *19*, 362–373. https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.10.001

Nathwani, A. C., Tuddenham, E. G. D., Rangarajan, S., Rosales, C., McIntosh, J., Linch, D. C., Chowdary, P., Riddell, A., Pie, A. J., Harrington, C., O'Beirne, J., Smith, K., Pasi, J., Glader, B., Rustagi, P., Ng, C. Y. C., Kay, M. A., Zhou, J., Spence, Y., . . . Davidoff, A. M. (2011). Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *The New England Journal of Medicine*, *365*(25), 2357–2365. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1108046

Pei, X., Earley, L. F., He, Y., Chen, X., Hall, N. E., Samulski, R. J., & Li, C. (2018). Efficient capsid antigen presentation from adeno-associated virus empty virions in vivo. *Frontiers in Immunology*, *9*, Article 844. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00844

Penaud-Budloo, M., François, A., Clément, N., & Ayuso, E. (2018). Pharmacology of recombinant adeno-associated virus production. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*, *8*, 166–180. https://doi.org/10.1016/j.omtm.2018.01.002

Perry, C., & Rayat, A. C. M. E. (2021). Lentiviral vector bioprocessing. *Viruses*, *13*(2), Article 268. https://doi.org/10.3390/v13020268

Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu. (2023, 27 Mayıs). *İleri tedavi tıbbi ürünler ruhsatlandırma yönetmeliği* (Resmî Gazete Sayı: 32203). https://titck.gov.tr/storage/Archive/2023/legislation/leriTedaviTbbirnlerRuhsatlandrmaYnetmelii_40792453-b89d-4a4a-82f4-72a3117c823c.pdf

U.S. Food and Drug Administration. (2011a). *Potency tests for cellular and gene therapy products: Guidance for industry*. Center for Biologics Evaluation and Research. https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/potency-tests-cellular-and-gene-therapy-products

U.S. Food and Drug Administration. (2011b). *Q8, Q9, and Q10 questions and answers (R4): Guidance for industry* (Revision 1). https://www.hhs.gov/guidance/sites/default/files/hhs-guidance-documents/FDA/9849fnl.pdf

U.S. Food and Drug Administration. (2020a). *Chemistry, manufacturing, and control (CMC) information for human gene therapy investigational new drug applications (INDs): Guidance for industry*. Center for Biologics Evaluation and Research. https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/chemistry-manufacturing-and-control-cmc-information-human-gene-therapy-investigational-new-drug

U.S. Food and Drug Administration. (2020b). *Testing of retroviral vector-based human gene therapy products for replication competent retrovirus during product manufacture and patient follow-up: Guidance for industry*. Center for

Biologics Evaluation and Research. https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/testing-retroviral-vector-based-human-gene-therapy-products-replication-competent-retrovirus-during

U.S. Food and Drug Administration. (2023). *Manufacturing changes and comparability for human cellular and gene therapy products: Draft guidance for industry*. Center for Biologics Evaluation and Research. https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/manufacturing-changes-and-comparability-human-cellular-and-gene-therapy-products

U.S. Food and Drug Administration. (2026). *Chemistry, manufacturing, and controls flexibilities for developing human cellular and gene therapy products for a biologics license application: Guidance for industry*. Center for Biologics Evaluation and Research. https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/chemistry-manufacturing-and-controls-flexibilities-developing-human-cellular-and-gene-therapy

Wright, J. F. (2014). Product-related impurities in clinical-grade recombinant AAV vectors: Characterization and risk assessment. *Biomedicines*, *2*(1), 80–97. https://doi.org/10.3390/biomedicines2010080


BİDGE