

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AKCİĞER KANSERİNE YÖNELİK TİROZİN KİNAZ
İNİHİTÖRÜ TAŞIYICI LİPİT-POLİMER HİBRİT
NANOPARTİKÜLLERİN GELİŞTİRİLMESİ,
KARAKTERİZASYONU VE İN VİTRO ETKİNLİĞİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ

Ecz. Pelinsu AKTAŞ

Farmasötik Teknoloji Programı
DOKTORA TEZİ

ANKARA

2024

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AKCİĞER KANSERİNE YÖNELİK TİROZİN KİNAZ
İNİHİTÖRÜ TAŞIYICI LİPİT-POLİMER HİBRİT
NANOPARTİKÜLLERİN GELİŞTİRİLMESİ,
KARAKTERİZASYONU VE İN VİTRO ETKİNLİĞİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ

Ecz. Pelinsu AKTAŞ

Farmasötik Teknoloji Programı
DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Betül ARICA YEGİN

İKİNCİ DANIŞMAN
Doç. Dr. İpek BAYSAL

ANKARA
2024

**AKCİĞER KANSERİNE YÖNELİK TİROZİN KİNAZ İNHİBİTÖRÜ TAŞIYICI LİPİT-POLİMER
HİBRİT NANOPARTİKÜLLERİN GELİŞTİRİLMESİ, KARAKTERİZASYONU VE İN VİTRO
ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Pelinsu AKTAŞ

Danışman: Prof. Dr. Betül ARICA YEGİN

İkinci Danışman: Doç. Dr. İpek BAYSAL

Bu tez çalışması 20.11.2024 tarihinde jürimiz tarafından "Farmasötik Teknoloji Programı" nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

- Jüri Başkanı:** *Prof. Dr. Erem BİLENSOY*
(Hacettepe Üniversitesi)
- Üye:** *Prof. Dr. İmran VURAL*
(Hacettepe Üniversitesi)
- Üye:** *Prof. Dr. Yalçın ÖZKAN*
(Sağlık Bilimleri Üniversitesi)
- Üye:** *Prof. Dr. Samiye YABANOĞLU ÇİFTÇİ*
(Hacettepe Üniversitesi)
- Üye:** *Doç. Dr. Devrim DEMİR DORA*
(Akdeniz Üniversitesi)

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN

Enstitü Müdürü

3 Aralık 2024

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

20/11/2024

Pelinsu AKTAŞ

i

¹“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokollü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.
Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir. Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında zgn olduğunu, Prof. Dr. Betül ARICA YEGİN danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığımı beyan ederim.

Ecz. Pelinsu AKTAŞ

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimin her aşamasında kıymetli yol göstericiliği, bilimsel deneyimi ve desteği ile ilerlediğim ve kendisinden çok şey öğrendiğim çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Sn. Betül ARICA YEGİN'e,

Doktora çalışmalarım boyunca değerli katkıları, destekleri ile her türlü imkânı sağlayan Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı başkanları Prof. Dr. Sn. Erem BİLENSOY ve Prof. Dr. Sn. Levent ÖNER'e,

Tez çalışmalarım sürecinde göstermiş olduğu çok kıymetli katkıları, desteği ve emekleri için çok değerli hocam Prof. Dr. Sn. Samiye YABANOĞLU ÇİFTÇİ'ye,

Tez izleme sürecimde bilgi ve birikimleri ile büyük katkısı olan değerli hocam Prof. Dr. Sn. Yalçın ÖZKAN'a,

Tez çalışmalarım kapsamında hücre kültürü çalışmalarındaki yardım ve destekleri için Doç. Dr. Sn. İpek BAYSAL'a,

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı öğretim üye ve yardımcısına,

Doktora çalışmalarım boyunca 1002-221S496 nolu proje kapsamında destek sağlayan TÜBİTAK'a,

Tez çalışmalarımı sürdürmem için beni destekleyen Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu yöneticilerine ve çalışma arkadaşlarıma,

Hayatımın her aşamasında varlıklarıyla bana her daim güç ve destek veren, sonsuz ilgi ve sevgilerini esirgemeyen bir tanecik annem Semiha KORUCU'ya, babam Mustafa KORUCU'ya ve abim Op. Dr. Alperen KORUCU'ya,

Doktora sürecinde her daim arkamda durarak bana destek veren, sevgi ve şefkatiyle yanımda olan değerli eşim Dr. Sadık Orhun AKTAŞ'a ve AKTAŞ ailesine,

En içten teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

ÖZET

Aktaş, P., Akciğer Kanserine Yönelik Tirozin Kinaz İnhibitörü Taşıyıcı Lipit-Polimer Hibrit Nanopartiküllerin Geliştirilmesi, Karakterizasyonu Ve İn Vitro Etkinliğinin Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Teknoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2024. Akciğer kanseri, erkekler ve kadınlar arasında kansere bağlı ölümlerin başında gelmekte ve tüm kanser ölümlerinin neredeyse %25'ini oluşturmaktadır. Mevcut konvansiyonel tedavilerin seçici olmaması sistemik toksisite ve çoklu ilaç direnci, tedavi başarısızlığı ve yüksek mortalite ile sonuçlanmaktadır. Bu nedenle akciğer kanseri tedavisinde yan etkisi az, hastaların yaşam kalitesini artıracak, etkin ve seçici yeni tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu tez kapsamında, bir tirozin kinaz inhibitörü olan Krizotinib ile yüklü, lipit bazlı taşıyıcı sistemler ve polimerik bazlı taşıyıcı sistemlerin bir arada kullanılmasıyla hazırlanan lipit-polimer hibrit nanopartiküller (LPHNP) ilaç taşıyıcı sistemlerin Box-Behnken deney tasarımından yararlanılarak geliştirilmesi ve optimize edilmesi; optimum formülasyonlarının karakterizasyon çalışmalarının yapılması, in vitro ortamda tedavideki etkinliklerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma ve nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanan optimum krizotinib yüklü LPHNP formülasyonlarının pasif hedeflendirmeye uygun partikül büyüklüğü (120-220 nm), polidispersite indeksi (< 0.2), zeta potansiyeli (-10 / -15 mV) sahip olduğu tayin edilmiş ve krizotinib, nanopartiküllere %70-80 ilaç yükleme etkinliği ile yüklenmiştir. *In vitro* çalışmalar ile nanopartiküllerin NCI-H2228 hücrelerinde IC_{50} değerleri belirlenmiş 48 saatlik inkübasyon sonunda ilaç yüklü nanopartiküllerin belirgin sitotoksik etki gösterdiği gösterilmiştir. Formülasyonların inhibitor etkileri gen düzeyinde RT-PCR yöntemi ile protein düzeyinde ELISA yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Formüle edilen krizotinib yüklü lipit-polimer hibrit nanopartiküllerin akciğer kanserinde etkili bir tedavi yöntemi olabileceği değerlendirilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Akciğer kanseri, lipit-polimer hibrit nanopartikül, Box-Behnken tasarımı, tirozin kinaz inhibitörü, krizotinib

Söz konusu tez TÜBİTAK tarafından 221S496 numaralı 1002 projesi kapsamında desteklenmiştir.

ABSTRACT

Aktaş, P., Development, Characterisation and Evaluation of In Vitro Efficacy of Lipid-Polymer Hybrid Nanoparticles Carrier of Tyrosine Kinase Inhibitor for Lung Cancer, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Pharmaceutical Technology Doctor of Philosophy Thesis, Ankara 2024.

Lung cancer is the top cause of cancer-related deaths for both men and women, accounting for nearly 25% of all cancer fatalities. The use of current conventional treatments for lung cancer, which lack selectivity, results in systemic toxicity, multiple drug resistance, treatment failure, and high mortality. Therefore, there is a need for new treatment approaches that are more selective, have fewer side effects, and can improve patient survival and quality of life. This thesis aims to develop and optimize lipid-polymer hybrid nanoparticulate (LPHNP) drug delivery systems, which combine lipid-based carriers with polymeric carriers, using the Box-Behnken experimental design. The goals include characterizing the optimal LPHNP formulations and evaluating their efficacy in vitro. The optimum crizotinib-loaded LPHNP formulations prepared by emulsification-solvent evaporation and nanoprecipitation method were determined to have particle size in the range of 120-220 nm, polydispersity index < 0.2 , zeta potential of $-10 / -15$ mV suitable for passive targeting. Crizotinib was loaded into the nanoparticles with a drug loading efficiency of 70-80%. In vitro studies, IC_{50} values of nanoparticles in NCI-H2228 cells were determined and it was shown that drug-loaded nanoparticles showed significant cytotoxic effect at the end of 48 hours incubation. The inhibitory effects of the formulations were assessed at the gene level using RT-PCR and at the protein level using ELISA. The formulated crizotinib-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles are considered to be a potentially effective treatment method for lung cancer.

Keywords: Lung cancer, lipid-polimer hybrid nanoparticles, Box-Behnken design, tyrosine kinase inhibitors, crizotinib.

The thesis in question was supported by TÜBİTAK (1002 project) with project number 221S496.

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|------|
| ONAY SAYFASI | iii |
| YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI | iv |
| ETİK BEYAN | v |
| TEŞEKKÜR | vi |
| ÖZET | vii |
| ABSTRACT | viii |
| İÇİNDEKİLER | ix |
| SİMGELER VE KISALTMALAR | xii |
| ŞEKİLLER | xiv |
| TABLolar | xvi |
| 1.GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 4 |
| 2.1. Akciğer Kanseri | 4 |
| 2.2. Akciğer Kanserinde Tedavi Yaklaşımları | 5 |
| 2.3. Tirozin Kinaz ve Tirozin Kinaz İnhibitörlerinin Kanserdeki Yeri | 7 |
| 2.3.1.Krizotinib | 8 |
| 2.4. Kanser Tedavisinde Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler | 10 |
| 2.5. Lipit-Polimer Hibrit Nanopartiküller | 14 |
| 2.5.1 LPHNP Hazırlama Yöntemleri | 18 |
| 2.6. Deney Tasarımı (Design of Experiment, DoE) | 20 |
| 2.6.1. Box-Behnken Tasarımı | 21 |
| 2.7. Lipit Polimer Hibrit Nanopartiküllerin Karakterizasyonları | 22 |
| 2.8. Lipit Polimer Hibrit Nanopartiküllerin Hücre Kültürü Çalışmaları | 23 |
| 2.8.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) | 23 |
| 2.8.2. Enzime Bağlı İmmünosorbent Deneyi (ELISA) | 24 |
| 3.GEREÇ VE YÖNTEM | 26 |
| 3.1. Araç ve Gereçler | 26 |
| 3.1.1. Kullanılan Kimyasal/Biyolojik Maddeler | 26 |
| 3.1.2. Kullanılan Cihazlar | 27 |
| 3.2. Yöntem | 28 |
| 3.2.1 Lipit-polimer Hibrit Nanopartiküllerin Ön Formülasyon Çalışmaları | 28 |

| | |
|--|----|
| 3.2.2 Lipit-polimer Hibrit Nanopartiküllerin Hazırlanması | 31 |
| 3.2.3 Krizotinib yüklü Lipit-Polimer Hibrit Nanopartiküllerin Hazırlanması | 34 |
| 3.2.4 Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Krizotinibin Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu | 35 |
| 3.2.5 Nanopartiküllerin Partikül Büyüklüğü Dağılımının Belirlenmesi ve Zeta Potansiyel Tayini | 38 |
| 3.2.6. Morfolojik Değerlendirme | 38 |
| 3.2.7. İlaç Yükleme Etkinliğinin Değerlendirilmesi | 39 |
| 3.2.8. <i>In Vitro</i> Salım Çalışmaları | 39 |
| 3.2.9. Lipit-Polimer Hibrit Nanopartiküllerin Stabilitate Çalışmaları | 39 |
| 3.2.10. Hücre Kültürü Çalışmaları | 40 |
| 3.2.11 Hücre Canlılık Analizi | 40 |
| 3.2.12. Krizotinib Yüklü Lipit-Polimer Hibrit Nanopartiküllerinin Gen ve Protein Düzeyinde İnhibitör Etkilerinin Değerlendirilmesi | 41 |
| 3.2.13. İstatistiksel Analiz | 43 |
| 4.BULGULAR | 44 |
| 4.1.Lipit-Polimer Hibrit Nanopartiküllerin Optimizasyonu: Box-Behnken Deney tasarımı | 44 |
| 4.2. Optimum Krizotinib Yüklü Lipit-Polimer Hibrit Nanopartiküllerin Partikül Büyüklüğü, Partikül Büyüklüğü Dağılımı ve Zeta Potansiyeli | 62 |
| 4.3. Morfolojik Değerlendirme | 65 |
| 4.4. Krizotinibin HPLC Yöntemi ile Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu | 67 |
| 4.5. Krizotinib Yüklü Lipit-Polimer Hibrit Nanopartiküllerin Enkapsülasyon Etkinliğinin Belirlenmesi | 71 |
| 4.6. Lipit-Polimer Hibrit Nanopartiküllerden <i>In Vitro</i> Krizotinib Salım Çalışmaları | 71 |
| 4.7. Krizotinib Yüklü Lipit-Polimer Hibrit Nanopartiküllerin Stabilitate Çalışmaları | 72 |
| 4.8. Krizotinib Yüklü Lipit-Polimer Hibrit Nanopartiküllerin Hücre Kültürü Çalışmaları | 75 |
| 4.8.1. Hücre Kültürü Çalışmaları | 75 |

| | |
|---|-----|
| 4.8.2 Hücre Canlılık Analizi | 76 |
| 4.9. Krizotinib Yüklü Lipit-Polimer Hibrit Nanopartiküllerinin Gen ve Protein Düzeyinde İnhibitör Etkilerinin Değerlendirilmesi | 79 |
| 4.9.1. RT-PCR Analizi | 79 |
| 4.9.2. ELISA Deneyi | 81 |
| 5. TARTIŞMA | 85 |
| 5.1. Krizotinib yüklü Lipit-Polimer Hibrit Nanopartiküllerin Hazırlanması | 85 |
| 5.2.Box-Behnken Deney Tasarımı İle Lipit-Polimer Hibrit Nanopartiküllerin Ön Formülasyon Çalışmaları ve Optimizasyonu | 86 |
| 5.3. Lipit-Polimer Hibrit Nanopartiküllerin Partikül Büyüklüğü, Partikül Büyüklük Dağılımı ve Zeta Potansiyel Değerleri | 90 |
| 5.4. Lipit-Polimer Hibrit Nanopartiküllerin Morfolojik Özellikleri | 93 |
| 5.5.HPLC ile Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu | 94 |
| 5.6. Krizotinib yüklü Lipit-Polimer Hibrit Nanopartiküllerin İlaç Yükleme Etkinliği ve <i>in vitro</i> Krizotinib Salım Çalışmaları | 95 |
| 5.7. Krizotinib yüklü Lipit-Polimer Hibrit Nanopartiküllerin Stabilité Çalışmaları | 97 |
| 5.8. Krizotinib yüklü Lipit-Polimer Hibrit Nanopartiküllerin Hücre Kültürü Çalışmaları | 98 |
| 5.9. Krizotinib Yüklü Lipit-Polimer Hibrit Nanopartiküllerinin Gen ve Protein Düzeyinde İnhibitör Etkilerinin Değerlendirilmesi | 99 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER | 103 |
| 7. KAYNAKLAR | 105 |
| 8.EKLER | 121 |
| EK- 1: Turnitin Dijital Makbuz | |
| EK- 2: Turnitin Orjinallik Raporu | |
| EK- 3: Tez Kapsamında Üretilen Yayın – 1 | |
| EK- 4: Tez Kapsamında Üretilen Yayın – 2 | |
| 9.ÖZGEÇMİŞ | 159 |

SİMGELER VE KISALTMALAR

| | |
|------------------------|--|
| °C | Santigrat Derece |
| ALK | Anaplastik Lenfoma Kinaz |
| BRAF | v-Raf murin sarkomu viral onkogen homologu B |
| cm | Santimetre |
| CO₂ | Karbon Dioksit |
| Da | Dalton |
| DCM | Diklorometan |
| DLS | Dinamik Işık Saçılımı |
| DMF | Dimetilformamit |
| DMSO | Dimetil Sülfoksit |
| DSÖ | Dünya Sağlık Örgütü |
| DSPE-PEG 2000 | 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N [amino(polyethylene glycol)-2000] |
| EGFR | Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü |
| ELISA | Enzime Bağlı Immünosorbent Deneyi |
| EMA | Avrupa İlaç Ajansı |
| EML 4 | Echinoderm Mikrotübül ile ilişkili Protein Benzeri 4 |
| EML4-ALK | Echinoderm Mikrotübül ile ilişkili Protein Benzeri 4- Anaplastik Lenfoma Kinaz |
| FBS | Fetal Sığır Serumumu |
| FDA | Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi |
| HGFR | Hepatosit büyüme faktörü |
| HPLC | Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi |
| IC₅₀ | Yarı Maksimum İnhibitör Konsantrasyon |
| ICH | Uluslararası Harmonizasyon Konseyi |
| kg | Kilogram |
| KHAK | Küçük Hücreli Akciğer Kanseri |
| KHDAK | Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri |
| KOAH | Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı |
| LOD | Saptama Sınırı |
| LOQ | Tayin Sınırı |
| LPHNP | Lipit Polimer Hibrit Nanopartiküller |
| MetOH | Metanol |
| mg | Miligram |

| | |
|----------------------|---|
| mL | Mililitre |
| mM | Milimolar |
| MTT | Metiltiyazoltetrazolyum |
| mV | Milivolt |
| nm | Nanometre |
| nM | Nanomolar |
| PBS | Fosfat Tamponu Çözeltisi |
| PCL | Polikaprolakton |
| PCR | Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| PDI | Polidispersite İndeksi |
| PEG | Polietilen Glikol |
| PGA | Poliglikolik Asit |
| PLA | Polilaktik Asit |
| PLGA | Poli(laktik-ko-glikolik asit) |
| r² | Korelasyon Katsayısı |
| RON | Nantes Kökenli Reseptör |
| ROS1 | Proto-onkogen tirozin-protein kinaz 1 |
| rpm | Dakikada Devir Sayısı |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute |
| SS | Standart Sapma |
| TEM | Transmisyon elektron mikroskobu |
| TK | Tirozin Kinaz |
| TKI | Tirozin Kinaz İnhibitörü |
| TÜBİTAK | Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu |
| UV | Ultraviyole – Kıızılötesi |
| VEGF | Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü |
| VEGFR | Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü |
| VK | Varyasyon Katsayısı |
| µg | Mikrogram |
| µL | Mikrolitre |
| µM | Mikromolar |
| µm | Mikrometre |

ŞEKİLLER

| Şekil | Sayfa |
|--|-------|
| 2.1. Krizotinib moleküler yapısı (73) | 9 |
| 2.2. NP sistemler ve tipleri (BioRender.com ile oluşturulmuştur) | 11 |
| 2.3. Polimer çekirdek ve lipit katmandan oluşan LPHNP ilaç taşıyıcı sistemi | 15 |
| 2.4. PLGA moleküler yapısı (130) | 16 |
| 2.5. PCL moleküler yapısı (130) | 17 |
| 2.6. ELISA yöntemlerinin şematik gösterimi (BioRender.com ile oluşturulmuştur) | 25 |
| 3.1. Emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi ile LPHNP hazırlanması | 32 |
| 3.2. Nanoçöktürme yöntemi ile LPHNP hazırlanması | 33 |
| 3.3. XTT deneyinin şematik gösterimi. | 41 |
| 4.1. PLGA polimeriyle nanoçöktürme yöntemi hazırlanan LPHNP formülasyonlarının kontur ve yüzey cevap grafikleri. | 47 |
| 4.2. PCL polimeriyle nanoçöktürme yöntemi hazırlanan LPHNP formülasyonlarının kontur ve yüzey cevap grafikleri. | 51 |
| 4.3. PLGA polimeri emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının kontur ve yüzey-cevap grafikleri. | 55 |
| 4.4. PCL polimeri ile emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma hazırlanan LPHNP formülasyonlarının kontur ve yüzey cevap grafikleri. | 59 |
| 4.5. PCL ile nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanan optimum Krizotinib yüklü LPHNP'lere ait partikül büyüklüğü dağılımı ve zeta potansiyel değerleri (n=3,ortalama±SS). | 63 |
| 4.6. PLGA ile nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanan optimum Krizotinib LPHNP'lere ait partikül büyüklüğü dağılımı ve zeta potansiyel değerleri (n=3, ortalama±SS). | 64 |
| 4.7. İlaç yüklü olmayan PLGA LPHNP formülasyonlarının TEM fotoğrafları (A: 100 nm, B: 100 nm ölçek). | 65 |
| 4.8. İlaç yüklü olmayan PCL LPHNP formülasyonlarının TEM fotoğrafları (A: 200 nm,B :100 nm ölçek). | 65 |
| 4.9. KR-PLGA-LPHNP formülasyonlarının TEM fotoğrafları (A: 200 nm, B: 100 nm) | 66 |
| 4.10. KR-PCL-LPHNP formülasyonlarının TEM fotoğrafları (A: 100 nm, B: 200 nm). | 66 |
| 4.11. Krizotinib etkin maddesine ait kalibrasyon doğrusu ve denklemi. (n=3, ortalama±SS). | 67 |

- 4.12. A) İlaç yüklü olmayan ve Krizonitib yüklü nanopartiküllerin kromatogramları B) 0.1mg/mL ve 0.5mg/mL Krizotinib standartlarına ait kromatogramlar. 70
- 4.13. Lipit-polimer hibrit nanopartiküllerden *in vitro* Krizotinib salım profili (n=3, ortalama±SS). 72
- 4.14. NCI-H2228 hücre hattının görüntüleri (A: 2.gün, B: 4.gün ve C ve D: 9.gün) 76
- 4.15. Krizotinib etkin maddesiyle 48 saat uygulama sonrası NCI-H2228 hücre canlılığı (n=6, ortalama±SS). 77
- 4.16. a) İlaç yüklü olmayan PLGA LPHNP formülasyonlarıyla 48 saat uygulama sonrası NCI-H2228 hücre canlılığı, b) İlaç yüklü olmayan PCL LPHNP formülasyonlarıyla 48 saat muamele sonrası NCI-H2228 hücre canlılığı (n=6, ortalama±SS). 77
- 4.17. a) KR-PLGA-LPHNP formülasyonlarıyla 48 saat uygulama sonrası NCI-H2228 hücre canlılığı, b) KR-PCL-LPHNP formülasyonlarıyla 48 saat uygulama sonrası NCI-H2228 hücre canlılığı (n=6, ortalama±SS). 78
- 4.18. NCI-H2228 hücrelerinin K-RAS gen ekspresyonlarındaki bağıl değişim (n=3, ortalama±SS) (1.Krizotinib, 2. KR-PLGA-LPHNP, 3. KR-PCL-LPHNP). 79
- 4.19. NCI-H2228 hücrelerinin RAF gen ekspresyonlarındaki bağıl değişim (* p<0.05 kontrole karşı) (n=3, ortalama±SS) (1.Krizotinib, 2. KR-PLGA-LPHNP, 3. KR-PCL-LPHNP). 80
- 4.20. NCI-H2228 hücrelerinin MEK gen ekspresyonlarındaki bağıl değişim (* p<0.05 kontrole karşı) (n=3, ortalama±SS) (1.Krizotinib, 2. KR-PLGA-LPHNP, 3. KR-PCL-LPHNP). 80
- 4.21. NCI-H2228 hücrelerinin ERK gen ekspresyonlarındaki bağıl değişim (* p<0.05 kontrole karşı) (n=3, ortalama±SS) (1.Krizotinib, 2. KR-PLGA-LPHNP, 3. KR-PCL-LPHNP). 81
- 4.22. NCI-H2228 hücrelerinde uygulama sonrası K-RAS protein düzeyleri (n=3, ortalama±SS) (1.Krizotinib, 2. KR-PLGA-LPHNP, 3. KR-PCL-LPHNP). 82
- 4.23. NCI-H2228 hücrelerinde uygulama sonrası RAF protein düzeyleri (* p<0.05 kontrole karşı) (n=3, ortalama±SS) (1.Krizotinib, 2. KR-PLGA-LPHNP, 3. KR-PCL-LPHNP). 82
- 4.24. NCI-H2228 hücrelerinde uygulama sonrası MEK protein düzeyleri (* p<0.05 kontrole karşı) (n=3, ortalama±SS). (1.Krizotinib, 2. KR-PLGA-LPHNP, 3. KR-PCL-LPHNP). 83
- 4.25. NCI-H2228 hücrelerinde uygulama sonrası ERK protein düzeyleri (* p<0.05 kontrole karşı) (n=3, ortalama±SS) (1.Krizotinib, 2. KR-PLGA-LPHNP, 3. KR-PCL-LPHNP). 83

TABLOLAR

| Tablo | Sayfa |
|--|--------------|
| 2.1. TKI etken maddeler, hedeflediği reseptörler, FDA onay yılları ve ticari isimleri (69). | 8 |
| 2.2. TKI etkin maddelerin NP ilaç taşıyıcı sistemleri. | 12 |
| 2.3. Box-Behnken tasarım matrisi (Üç düzey ve üç faktörlü) (140). | 21 |
| 2.4. Partiküllerin karakterizasyonu için parametreler ve yöntemler. | 22 |
| 3.1. Box-Behnken deney tasarımında kullanılan faktörler ve düzeyleri. | 29 |
| 3.2. Ön formülasyon çalışmalarında kullanılan formülasyon değişkenleri ve miktarları. | 30 |
| 3.3. Optimum LPHNP formülasyonlarında kullanılan polimer tipleri hazırlama yöntemleri. | 34 |
| 3.4. Box-Behnken deney tasarımı ile hazırlanan optimum LPHNP formülasyonlarının bağımsız değişken miktarları. | 34 |
| 3.5. HPLC ile miktar tayini analizindeki analiz koşulları. | 36 |
| 3.6. RT-PCR deneylerinde yararlanılan primer dizileri. | 42 |
| 4.1. PLGA ile nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanan ilaç yüklü olmayan LPHNP'lere ait partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değerleri. | 44 |
| 4.2. Box-Behnken deney tasarımının partikül büyüklüğü cevabı için ANOVA sonuçları. | 45 |
| 4.3. Box-Behnken deney tasarımının PDI cevabı için ANOVA sonuçları. | 45 |
| 4.4. Box-Behnken deney tasarımının zeta potansiyel cevabı için ANOVA sonuçları. | 46 |
| 4.5. PCL ile nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanan ilaç yüklü olmayan LPHNP'lere ait partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değerleri (n=3, ortalama±SS). | 48 |
| 4.6. Box-Behnken deney tasarımının partikül büyüklüğü cevabı için ANOVA sonuçları. | 49 |
| 4.7. Box-Behnken deney tasarımının PDI cevabı için ANOVA sonuçları. | 49 |
| 4.8. Box-Behnken deney tasarımının zeta potansiyel cevabı için ANOVA sonuçları. | 50 |
| 4.9. PLGA ile emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan ilaç yüklü olmayan LPHNP'lere ait partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değerleri (n=3, ortalama±SS). | 52 |
| 4.10. Box-Behnken deney tasarımının partikül büyüklüğü cevabı için ANOVA sonuçları. | 53 |
| 4.11. Box-Behnken deney tasarımının PDI cevabı için ANOVA sonuçları. | 53 |

| | | |
|-------|---|----|
| 4.12. | Box-Behnken deney tasarımının zeta potansiyel cevabı için ANOVA sonuçları. | 54 |
| 4.13. | PCL ile emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan ilaç yüklü olmayan LPHNP'lere ait partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değerleri (n=3, ortalama±SS). | 56 |
| 4.14. | Box-Behnken deney tasarımının partikül büyüklüğü cevabı için ANOVA sonuçları. | 57 |
| 4.15. | Box-Behnken deney tasarımının PDI cevabı için ANOVA sonuçları. | 57 |
| 4.16. | Box-Behnken deney tasarımının zeta potansiyel cevabı için ANOVA sonuçları. | 58 |
| 4.17. | LPHNP formülasyonlarına ilişkin hedef fonksiyonu değerleri. | 60 |
| 4.18. | Hedef fonksiyonu temel alınarak geliştirilen optimum nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanan PLGA LPHNP formülasyonuna ilişkin deneysel ve kestirimsel değerler (n=3, ortalama±SS). | 60 |
| 4.19. | Hedef fonksiyonu temel alınarak geliştirilen optimum nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanan PCL LPHNP formülasyonuna ilişkin deneysel ve kestirimsel değerler (n=3, ortalama±SS). | 61 |
| 4.20. | Hedef fonksiyonu temel alınarak geliştirilen optimum emülsiyon oluşturma - çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan PLGA LPHNP formülasyonuna ilişkin deneysel ve kestirimsel değerler (n=3, ortalama±SS). | 61 |
| 4.21. | Hedef fonksiyonu temel alınarak geliştirilen optimum emülsiyon oluşturma - çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan PCL LPHNP formülasyonuna ilişkin deneysel ve kestirimsel değerler (n=3, ortalama±SS). | 61 |
| 4.22. | İlaç yüklü olmayan optimum LPHNP'lerin partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değerleri (n=3, ortalama±SS). | 62 |
| 4.23. | Optimum Krizotinib yüklü LPHNP'lerin partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değerleri (n=3, ortalama±SS). | 63 |
| 4.24. | Krizotinib için HPLC yöntemi ile elde edilen % geri kazanım değerleri (n=3). | 68 |
| 4.25. | Krizotinib için HPLC yönteminde tekrarlanabilirlik değerleri (n=3). | 68 |
| 4.26. | Krizotinib için HPLC yönteminde tekrar elde edilebilirlik sonuçları (n=3). | 69 |
| 4.27. | Krizotinib yüklü lipit-polimer hibrit nanopartikül formülasyonlarının ilaç yükleme etkinlikleri (n=3). | 71 |
| 4.28. | KR-PLGA-LPHNP formülasyonlarının -18°C±2°C Stabilite Değerleri (n=3, ortalama±SS). | 73 |
| 4.29. | KR-PLGA-LPHNP formülasyonlarının 4°C±1°C Stabilite Değerleri (n=3, ortalama±SS). | 73 |

| | | |
|--------------|--|----|
| 4.30. | KR-PLGA-LPHNP formülasyonlarının $25^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ Stabilite Değerleri (n=3, ortalama \pm SS). | 73 |
| 4.31. | KR-PLGA-LPHNP formülasyonlarının $40^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ Stabilite Değerleri (n=3, ortalama \pm SS). | 74 |
| 4.32. | KR-PCL-LPHNP formülasyonlarının $-18^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ Stabilite Değerleri (n=3, ortalama \pm SS). | 74 |
| 4.33. | KR-PCL-LPHNP formülasyonlarının $4^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ Stabilite Değerleri (n=3, ortalama \pm SS). | 74 |
| 4.34. | KR-PCL-LPHNP formülasyonlarının $25^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ Stabilite Değerleri (n=3, ortalama \pm SS). | 75 |
| 4.35. | KR-PCL-LPHNP formülasyonlarının $40^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ Stabilite Değerleri (n=3, ortalama \pm SS). | 75 |
| 4.36. | Formülasyonlara ait IC_{50} değerleri. | 78 |

1.GİRİŞ

Hücrelerinin kontrolsüz ve anormal bir şekilde büyüyüp çoğalması sonucu oluşan kanser, dünya genelinde en yaygın ölüm nedenlerinden biridir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) raporlarına göre, 2040 yılında yaklaşık 30 milyon yeni kanser vakasının görüleceği ve 15.3 milyon kişinin ise kanser nedeniyle hayatını kaybedeceği öngörülmektedir (1). Akciğer kanseri, dünya genelinde hem erkeklerde hem de kadınlarda en sık teşhis edilen ikinci kanser türüdür ve kansere bağlı ölümlerin başlıca nedenidir (2). DSÖ raporlarında akciğer kanseri vakalarının 2025 yılında 2.54 milyona ulaşacağı öngörülmektedir (3). Akciğer kanserine yönelik mevcut konvansiyonel tedavi yaklaşımları cerrahi rezeksiyon, kemoterapi ve radyoterapidir. Ancak dünyada mortalitesi en yüksek ve en çok tanı alan kanser türlerinden başında gelen akciğer kanserinde mevcut konvansiyonel tedavinin yetersiz ve etkisiz kalması akciğer kanseri tedavisinde alternatif yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesini önemli kılmaktadır. Bu nedenle akciğer kanserinin tedavisinde, hastaların yaşam süresini ve kalitesini arttırmak aynı zamanda tedavide yan etkisi az, etkin ve seçici yeni tedavi yaklaşımları geliştirilmek amacıyla çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Akciğer kanserinde, kansere sebep olan mekanizmaların aydınlatılması ve yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi amacıyla yapılan çalışmalarda, tümörlerin genetik olarak oldukça heterojen ve karmaşık olduğunu ortaya çıkarılmıştır (4). Bu nedenle günümüzdeki çalışmalarda kanser hücresine spesifik hedefleme yapabilen ve bireye yönelik etkili tedavi yaklaşımlarının üzerine yoğunlaşmaktadır. Bu amaçla moleküler hedeflendirilmiş tedavi, immünoterapi, gen terapisi, hedef bölgeye etkin ilaç taşınmasını sağlayan yeni ilaç taşıyıcı sistemler çalışmaların odak noktası olmuştur (5, 6). Moleküler hedefe yönelik tedavi yaklaşımları içerisinde bulunan ve umut verici yöntemler olarak değerlendirilen tirozin kinaz inhibitörleri, monoklonal antikorlar ve anti-anjiyogenik ajanlar üzerinde yapılan çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (7, 8).

Tirozin kinazlar, proteinlerin/moleküllerin aktivasyonunu veya inaktivasyonunu moleküller arasında fosfat gruplarının transferiyle sağlayan proteinlerdir ve sinyal iletimi, hücrelerin çoğalması ve apoptozis gibi işlevleri kontrol etmektedir (9). Tirozin kinazlarda meydana gelen değişimlerin kanser gelişiminde önemli rol oynadığı bilinmektedir (10). Kanser ile ilişkili olduğu bilinen ve tedavide

hedef olarak kullanılan tirozin kinaz ailesine ait çeşitli mutasyonlar/yeniden dizilimler bilinmektedir (11, 12). Tez kapsamında, anaplastik lenfoma kinaz (ALK) reseptörünün yeniden dizilimi ile oluşan Echinoderm microtubule-associated protein-like4-anaplastik lenfoma kinaz (EML4-ALK) genine sahip küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinin tedavisinde kullanılan tirozin kinaz inhibitörü (krizotinib) yüklü lipit-polimer hibrit nanopartiküler sistemler geliştirilmekte ve *in vitro* tedavi etkinlikleri değerlendirilmektedir.

ALK reseptörü, insanlarda ALK geni ile kodlanan; hücre büyümesinden ve çoğalmasından sorumlu olan bir reseptördür (13). Tirozin kinaz aktivitesine sahip bir transmembran proteini olan ALK geninin, Echinoderm microtubule-associated protein-like4 (EML4) geni ile ters yönde birleşmesi sonucunda, EML4-ALK adlı sürekli aktif bir gen düzenlemesi meydana gelir (14). Bu durum hücrelerin kontrolsüz çoğalmasına neden olur. EML4-ALK füzyon geni küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinin yaklaşık %5'inden sorumludur ve sigara içmeyenlerde görülen akciğer kanserinin önemli nedenlerinden biridir (15).

Krizotinib, EML4-ALK pozitifliği doğrulanmış küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde kullanılmak amacıyla Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından 2011 yılında onaylanmış reseptör tirozin kinazların bir inhibitörüdür (16). Antitümör etkinliğini; ALK, Nantes kökenli reseptör (RON) ve c- Met dahil olmak üzere reseptör tirozin kinazların inhibisyonunu sağlamanın yanında kaspaz-3'ü aktive edip tümör hücrelerini apoptoza götürerek göstermektedir (17). Krizotinib, küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde potansiyel bir terapötik madde olmasına rağmen ilaca karşı gelişen direnç, krizotinibin hidrofobik özelliğinden kaynaklı düşük çözünürlüğe sahip olması ve sistemik dolaşıma geçişinin sınırlı olması formülasyon geliştirme ve klinik açıdan kullanımını kısıtlamaktadır (18, 19).

Tez kapsamında, konvansiyel tedavide görülen yetersizlikleri ve kısıtlamaları göz önünde bulundurarak tedavide etkin krizotinib yüklü lipit-polimer hibrit nanopartikül formülasyonlarının geliştirilmesi ve optimize edilmesi; optimize edilmiş formülasyonların karakterizasyon çalışmalarının gerçekleştirilmesi ve *in vitro* hücre kültürü çalışmaları ile formülasyonların tedavi etkinliklerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, Box-Behnken tasarımı kullanılarak iki farklı

polimerin (Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)/Polikaprolakton (PCL)) ve iki farklı hazırlama yönteminin (emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi ve nanoçöktürme yöntemi) lipit-polimer hibrit nanopartikül formülasyonlarına etkisi değerlendirilmiştir. Optimize edilen formülasyonların; ilaç yükleme etkinlikleri ve ilaç salım profilleri belirlenmiş, *in vitro* hücre kültürü ve hücre canlılık analizi çalışmaları ile formülasyonların tedavi etkinlikleri değerlendirilmiş, *in vitro* olarak inhibitor etkileri gen düzeyinde Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemi ve protein düzeyinde Enzime Bağlı Immünosorbent Deneyi (ELISA) yöntemi kullanılarak gösterilmiştir.

Tezin araştırma hipotezi ise, deney tasarımından yararlanılarak optimum krizotinib taşıyıcılı lipit-polimer hibrit nanopartiküllerin hazırlaması ile *in vitro* koşullarda küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde tedavide etkinliğin artırılacağı yaklaşımıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Akciğer Kanseri

Dünya Sağlık Örgütü 2024 verilerine göre, akciğer kanserinin görülme sıklığı erkeklerde prostat kanserinden ve kadınlarda meme kanserinden sonra en fazla olan kanser türü olmakla birlikte, iki cinsiyet içinde kansere bağlı ölüm nedenlerinin başında gelmektedir (20). Sigara kullanımı başta olmak üzere pasif içicilik, asbest, radon gazı gibi çevresel faktörlere maruziyet, hava kirliliği, kronik akciğer hastalıkları, epigenetik ve genetik faktörler akciğer kanserinin ortaya çıkmasında önemli risk faktörleridir (21, 22). Akciğer kanserinde sıklıkla geçmeyen öksürük, göğüs ağrısı, nefes darlığı, hırıltılı solunum, kanlı öksürük (hemoptizi), açıklanamayan kilo kaybı gibi semptomlara rastlanırken hastaların yaklaşık %10'unda asemptomatik seyir görülmektedir (23). Kanserin evresine ve tipine göre 5 yıllık sağ kalım oranları değişiklik gösterse de meme, kolorektal ve prostat kanseri gibi sık rastlanan diğer kanser türlerine göre sağ kalım oranı daha düşüktür (24, 25).

Akciğer kanseri histolojik açıdan iki ana tipe ayrılmaktadır. Akciğer kanser vakalarının yaklaşık %85'ini Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri (KHOAK) oluştururken yaklaşık %15'ünü Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (KHAK) oluşturmaktadır (26). En sık görülen KHOAK'nin üç ana alt tipi bulunmaktadır; (i) adenokarsinom KHOAK'nin % 40'ını (ii) Skuamöz (yassı) hücreli karsinom KHOAK'nin % 25-30'unu, (iii) büyük hücreli karsinom ise KHOAK'nin % 10-15'ini oluşturmaktadır (24).

Akciğer kanserinin teşhisinde sıklıkla bronkoskopi, balgam sitolojisi, ranstorasik iğne aspirasyonu ve çeşitli görüntüleme yöntemleri kullanılmakta olup teşhisin kanser tipine (KHOAK/KHAK), tümörün yerleşim bölgesine ve büyüklüğüne, metastaz durumuna ve hastanın klinik olarak durumuna bağlı olarak değiştiği bilinmektedir. Bunun yanı sıra son yıllarda nefes analizi de teşhis için kullanılmaktadır. Nefesten teşhis edilen bazı uçucu organik maddelerin (izopren, etan, aldehitler, pentan, aseton, amonyak, dimetilamin, dimetilsülfür ve etil merkaptan gibi) akciğer kanseri ile ilişkili olduğu bilinmektedir (27, 28).

Akciğer kanserinin evrelenmesinde, tümörün özellikleri (T), lenf nodu (N) ve metastaz (M) durumları dikkate alınarak “TNM evreleme sistemi” kullanılmaktadır. En son güncellenmiş 8. TNM evreleme sistemi 2017 yılında uygulanmaya başlanmıştır. Bu sisteme göre T- tümör boyutu ve yeri, N- ilgili lenf nodlarının sayısı, M- metastaz ve kanser yayılımını ifade etmektedir ve T,N ve M puanlarının kombinasyonu kullanılarak akciğer kanseri evresi belirlenmektedir (evre-IA, evre-IB, evre-IIA, evre-IIB, evre-IIIA, evre-IIIB ve evre-IV) (29). Akciğer kanserinde, kanser tipinin yanısıra kanserin evresinde tedavinin belirlenmesinde önemli olmaktadır (30).

2.2. Akciğer Kanserinde Tedavi Yaklaşımları

Akciğer kanserinin tedavisi kanserin tipine, evresine, hastanın durumuna göre belirlenmekte olup en sık başvurulmuş konvansiyonel tedavi yöntemleri cerrahi rezeksiyon, kemoterapi ve radyoterapidir (31). KHOAK tedavisinin birinci basamağında platin yapıları (sisplatin, karboplatin gibi) kemoterapötikler tek başlarına veya kombine olarak kullanılmaktadır (32). Kombine tedavide dosetaksiel, paklitaksiel, vinorelbin, gemsitabin, permektresed; platin yapıları kemoterapötikler ile birlikte kullanılmaktadır. Kombine tedavi, tedaviye yanıtın, hasta toleransının ve sağ kalım oranının artırılması; tek ilaç kaynaklı şiddetli yan etkilerin azaltılması amacıyla tercih edilmektedir (33). İkinci basamak tedavide ise permektresed, dosetaksiel ve erlotinib sistemik olarak uygulanmaktadır (34). Ancak bu kemoterapötik ilaçların selektif olmaması sistemik toksisite ve kanser hücrelerinde gelişen spontan mutasyonlar sonucu oluşan çoklu ilaç direnci (Multi Drug Resistance, MDR), tedavide başarısızlık ve yüksek mortalite ile sonuçlanmaktadır (35). Cerrahi rezeksiyon, akciğer kanserinin erken evrede teşhis edildiği metastaz olmayan sınırlı hastalara uygulanabilirken rezeksiyon sonrası kanserin tekrar etme riski bulunmaktadır (36, 37). Radyoterapi yönteminde ise yüksek dozda radyasyon uygulanması kaynaklı özofagus, kalp, omurilik gibi diğer organların da hasar alması radyasyon dozunun kısıtlanmasını gerektirmektedir (38, 39). Konvansiyonel tedavide karşılaşılan kısıtlamalar ve tedavinin mevcudiyetine rağmen yüksek ölüm oranları göz önünde bulundurulduğunda akciğer kanserinde tedavi seçeneklerinin yeterli olmadığı görülmektedir. Bu nedenle hastaların yaşam süresini ve kalitesini artıran aynı zamanda

tedavide yan etkisi az, etkili ve seçici yeni tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç duyulmaktadır (40).

Son yıllarda yapılan çalışmalar ile kanser hücrelerinin oluşmasından, kanser hücrelerinin büyümesinden ve metastazından sorumlu moleküllerin/mekanizmaların aydınlatılması mümkün olmuştur. Moleküllerin/mekanizmaların anlaşılması ve tanımlanmasıyla çeşitli hedefe yönelik tedavi yaklaşımları geliştirilmektedir. (i) İmmünoterapi, (ii) moleküler olarak hedeflendirilmiş tedavi hedefe yönelik tedavide en sık çalışılan yaklaşımlardır (41-45).

İmmünoterapi tedavisi monoklonal antikolar, kanser aşıları ve sınıflandırılmamış immünoterapi gibi uygulamaları içeren kanser hücresinin bağışıklıktan kaçmasını önlemek için hastanın kendi bağışıklık sistemini güçlendirmeyi amaçlayan bir yaklaşımdır (46). Bağışıklık sisteminin vücuttaki savaşılacak hücreleri/antijenleri ve normal hücreleri ayırmakta görevli kısımları kontrol noktaları olarak bilinmektedir. Programlanmış hücre ölümü-1 (PD-1) reseptörü ile ligandı (PD-L1) ve sitotoksik T-lenfosit antijen-4 (CTLA-4) kanser immünoterapisinde önemli rol oynayan kontrol noktalarıdır (47). Kontrol noktalarında T hücreleri için negatif sinyal üretilmesi ve üretilen sinyalin proliferasyonu, sitotoksik granüllerin salgılanması ve sitokin salınımı gibi çeşitli olaylar sonucu T hücrelerinin fonksiyonu azalmaktadır ve bu durumda tümörün büyümesi ve ilerlemesi gerçekleşmektedir. Tümörün büyümesi ve ilerlemesini engellemek amacıyla kontrol noktalarına yönelik ipilimumab (immünglobulin (Ig) G1 antikoru), nivolumab (IgG4 monoklonalanti-PD-1 antikoru), pembrolizumab (IgG4 monoklonalanti-PD-1 antikoru) ve atezolizumab (IgG1 monoklonal anti-PD-L1 antikoru) antikoları KHOAK tedavisinde kullanılan monoklonal antikolardır (48). Başka bir immünoterapi yöntemi olan aşılarda ise allojenik ve otolog tümör hücrelerinden hazırlanan antijen spesifik aşılar ve tümör hücresi aşıları içermektedir (49-51).

Akciğer kanserinde tümör biyolojisi, immünolojisi ve genomik mutasyonların ayrıntılı olarak anlaşılmasıyla hedefe yönelik tedavi önem kazanmıştır. Hedefe yönelik tedavilerden biri olan moleküler hedeflendirilmiş tedavinin esasını, kanser oluşumunda etkin olarak rolü olan yolakların belirli basamaklarında görev alan moleküllere karşı inhibitörlerin geliştirilmesi ve bu yolaktaki hedeflenen molekülün

inaktive edilmesi oluşturmaktadır (7, 52). Bu amaçla, geliştirilen tirozin kinaz inhibitörleri (TKI), tirozin kinazların katalizlediği protein fosforilasyonunu engelleyerek hücre döngüsünü durdurur ve tümör hücrelerinin apoptozuna neden olarak etki gösterir (53-56).

2.3. Tirozin Kinaz ve Tirozin Kinaz İnhibitörlerinin Kanserdeki Yeri

Kinazlar, moleküller arasında fosfat gruplarını transferiyle proteinlerin/moleküllerin aktivasyonunu veya inaktivasyonunu sağlayan proteinlerdir (57). Tirozin kinazlar, protein fosforilasyonu yapan, protein kinaz grubunda yer alan enzimlerdir ve insan genomunda kodlanan 518 protein kinaz tanımlanmıştır. Bu protein kinazlardan 90 tanesi tirozin kinaz (TK) grubuna aittir (58). TK'lar; (i) reseptör protein kinazlar (membran yerleşimli olan protein kinazlar), (ii) non-reseptör protein kinazlar (sitoplazmik yerleşimli olan protein kinazlar) olarak sınıflandırılmaktadır (59). Reseptör protein kinazlar (membran lokalize protein kinazlar) insülin reseptörü, büyüme faktörleri (EGFR, vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü (VEGFR), ALK, fibroblast büyüme faktörü reseptörü (FGFR), efrin reseptörleri (EphA, EphB) gibi 58 transmembran proteinini içermektedir. Reseptör olmayan protein kinazlar (sitoplazmik protein kinazlar) Src kinaz, Abelson murin lösemi (ABL), fokal adezyon kinaz (FAK) ve Janus kinazlar (JAK) proteinlerini içermektedir (58, 60).

TK'lerin sürekli olarak aktif olması; onkojenik sinyal iletimi, tümörün büyümesi, transformasyonu ve anjiyogenez gibi malign fenotipte hücrel olayları hızlandırmaktadır (61-64). Bu hücrel olayların hızlanmasının önüne geçmek için çeşitli TKI'ler kullanılmış ve TK'lerin aktivitelerinin engellenmesi ile kanser tedavisinin mümkün olabileceği öngörülmüş ve çalışmalar bunun üzerine odaklanmıştır (65-67). Bu amaçla geliştirilen TKI'ler, TK'lerin katalizlediği protein fosforilasyonunu engellemektedir. Engellenen protein fosforilasyonu ile hücre döngüsü durmakta ve tümör hücresi apoptoza uğramaktadır. TKI'ler bu etkileri sayesinde çeşitli kanserlerin hedefe yönelik tedavisinde kullanılmaktadır (55, 65, 68).

KHOAK'da kullanılan FDA onaylı TKI'lara Gefitinib, Erlotinib, Krizotinib, Afatinib, Seritinib, Osimertinib, Alektinib, Brigatinib, Dakomitinib, Lorlatinib, Selperkatinib, Kapmatinib olarak sayılmaktadır (69). Tablo 2.1.'de FDA onaylı TKI

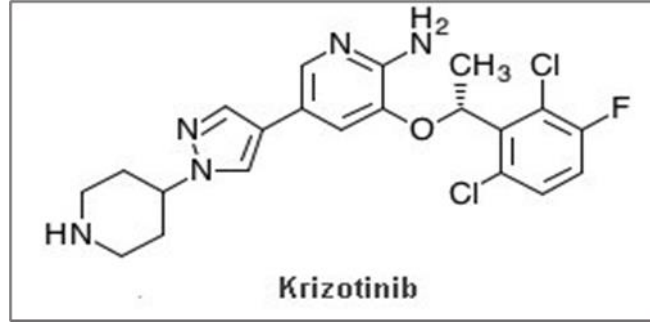
etken maddeleri, etken maddelerin inhibitör etki gösterdiği hedef reseptörleri, FDA onay yılları ve piyasa da bulunan preparatlarına ilişkin bilgiler özetlenmektedir.

Tablo 2.1. TKI etken maddeler, hedeflediği reseptörler, FDA onay yılları ve ticari isimleri (69).

| Tirozin Kinaz İnhibitörü | Hedeflenen Reseptör | FDA Onayı | Ticari ismi |
|---------------------------------|----------------------------|------------------|--------------------|
| Gefitinib | EGFR | 2003 | Irresa® |
| Erlotinib | EGFR | 2004 | Tarceva® |
| Krizotinib | ALK, c-MET, RON | 2011 | Xalkori® |
| Afatinib | EGFR, ErB (HER2/HER4) | 2013 | Giotrif® |
| Seritinib | ALK | 2014 | Zykadia® |
| Osimertinib | EGFR | 2015 | Tagrisso® |
| Alektinib | ALK | 2016 | Alecensa® |
| Brigatinib | ALK, ROS1, IGF-1 | 2017 | Alunbrig® |
| Dakomitinib | MET | 2018 | Vizimpro® |
| Lorlatinib | ALK | 2018 | Lorviqua® |
| Selperkatinib | RET | 2020 | Retsevmo® |
| Kapmatinib | MET | 2020 | Tabrecta ® |

2.3.1.Krizotinib

Krizotinib, KHOAK'de kullanılmak üzere FDA tarafından 2011 yılında onaylanmış reseptör TK'lerin inhibitörüdür (70). Krizotinibin molekül ağırlığı 450,37 g/mol'dür ve kimyasal formülü ise $C_{21}H_{22}Cl_2FN_5O$ şeklindedir (Şekil 2.1.)(71). Krizotinib suda pratikte çözünmemektedir ($\log P = 1.83$) ve intestinal permeabilitesi de düşüktür. Krizotinibin, düşük çözünürlük ve düşük permeabilitesi sebebiyle biyofarmasötik sınıflandırma sisteminde Sınıf 4 bir ilaç olarak kabul edilmektedir (72).



Şekil 2. 1. Krizotinib moleküler yapısı (73).

Krizotinib, anti tümör etkinliğini ALK, c-Met ve RON dahil olmak üzere reseptör TK'lerin inhibisyonunu sağlamasının yanında kaspaz-3'ü aktive edip tümör hücrelerini apoptoza götürerek etki gösteren bir etken maddedir. Aktif olmayan reseptör TK'ler, fosforilasyon sonucunda aktif hale geçerek hücre çoğalması, farklılaşması gibi hücresel olayları gerçekleştirmektedir. Krizotinib, mutasyona uğramış tirozin kinaz reseptörlerini hedef alarak reseptörün ATP bağlanma bölgesine bağlanmakta ve reseptörün fosforilasyonunu engellemektedir. Fosforilasyonun engellenmesi sonucunda kanser hücrelerinin büyümesi, çoğalması ve metastazı engellenebilmektedir (74-76).

Krizotinib, p-glikoprotein substratı olmasının yanısıra CYP3A4 ile metabolize edilmektedir (77). İlacın oral yoldan kullanımı sonrası plazma proteinlerine bağlanması yaklaşık %91 ve biyolojik yarılanma ömrü 29-35 saat olarak bildirilmektedir (78). Krizotinibin metabolizasyonu sonucu oluşan krizotinib laktam, ALK proteinine inhibitör etki gösterirken krizotinibin yaklaşık %53'ü feçes ile %3'ü idrar ile değişmemiş ilaç olarak atılmaktadır (79). %43 oranında oral biyoyararlanıma sahip olan krizotinibin farmakokinetiğini; bireyler arasında görülen enzimatik ve/veya metabolik farklılıklar, besin alımı ve kullanılan ilaçlar etkilemektedir (80, 81).

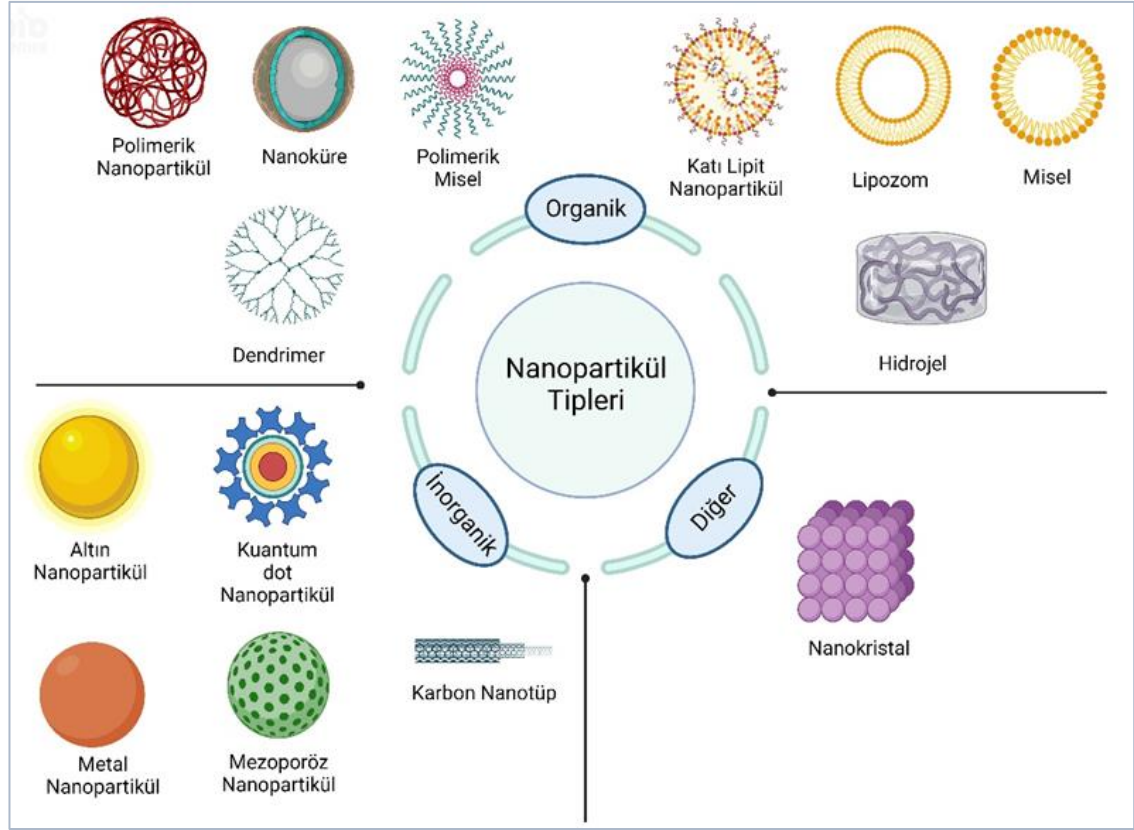
Krizotinib, KHOAK'de potansiyel bir terapötik madde olmasına karşın düşük biyoyararlanım ve gelişen ilaç direnci ilacın kullanımını kısıtlamaktadır. Hamilton ve arkadaşları krizotinib ile tedaviye başlangıç yanıtları yüksek olan hastalarda kazanılmış direnç sebebiyle tedavinin ilk 2 yılında hastalığın tekrarlama oranının arttığını ve gelişen ilaç direncinin yanısıra hastalarda yeni mutasyonların da oluştuğunu bildirmektedir (82).

2.4. Kanser Tedavisinde Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler

Günümüzde nanotaşıyıcılar ile hazırlanan ilaç taşıyıcı sistemler hastalıkların teşhis ve tedavisinde geleneksel yaklaşımların yerini almaktadır (83, 84). Nanopartiküler (NP) sistemler, 10-1000 nm arasında partikül büyüklüğüne sahip sisteme hapsedilmiş veya adsorbe edilmiş etken maddeyi kontrollü biçimde salabilen katı kolloidal partiküller sistemlerdir. NP sistemler başlıca iki ana gruba ayrılmaktadır: (i) organik nanopartiküler sistemler (polimerik yapılı nanopartiküller, lipit yapılı nanopartiküller, hibrid nanopartiküller), (ii) inorganik nanopartiküler sistemler (altın nanopartiküller, metalik nanopartiküller, kuantum dot nanopartiküler, mezoporöz silika nanopartiküler) (85) (Şekil 2.2.).

NP sistemler;

- Etken madde(ler)in etkinliğinin artırılması ve yan etkilerin/toksisitenin azaltılması,
- Etken maddelerin in vitro/ in vivo stabilitenin sağlanması/arttırması,
- Etken madde taşıma kapasitelerinin yüksek olması,
- Etken maddeyi kontrollü olarak salması,
- Hidrofobik ve/veya hidrofilik etkin maddelerin nanopartiküllere hapsedilebilmesi,
- Aktif veya pasif hedeflendirme ile istenilen hücre, doku veya organa hedeflendirilmesi sonucu tedavi etkinliğinin artması,
- Sistemlerin fizyolojik ortamda parçalanması ve parçalanma sonucu oluşan ürünlerinin toksik olmaması,
- Sterilize edilebilmeleri,
- Konvansiyol tedaviye kıyasla daha düşük ilaç dozu ile tedavinin sağlanabilmesi,
- Konvansiyonel tedaviye göre kıyasla düşük doz kullanımı sayesinde istenmeyen yan etkilerin/toksisitenin azaltılması,
- İlaça karşı direncin önlenmesi,
- Hastanın tedaviye uyuncunun artılması,
- Oral, pulmoner, parenteral veya nazal yol ile uygulanabilme gibi çok önemli üstünlüklere sahiptir (86-89).



Şekil 2.2. NP sistemler ve tipleri (BioRender.com ile oluşturulmuştur).

Literatürde, akciğer kanserinin tedavisi için TKI etken maddelerinin tek başına veya başka bir etken madde/uygulama ile kombine şekilde kullanıldığı çeşitli ilaç taşıyıcı sistemleri geliştirilmiştir. Tablo 2.2.'de kullanılan TKI etken maddeler, ilaç taşıyıcı sistemler, yapılan çalışmalar ve çalışmaların sonucu özetlenmiştir.

Tablo 2.2. TKI etkin maddelerin NP ilaç taşıyıcı sistemleri.

| Tirozin Kinaz İnhibitörü | İlaç Taşıyıcı Sistem Tipi | Yapılan çalışmalar | Sonuçlar | Ref. |
|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------|--|-------------|
| Afatinib | PLGA Polimerik NP | <i>in vitro, in vivo</i> | KRAS mutasyonlu A549, H460 hücrelerinde farmakokinetik profilde iyileşme, tümör bölgesinde birikimin ve sitotoksitenin artması. | (90) |
| Alektinib | Polimerik NP | <i>in vitro, in vivo</i> | Kademeli çift hedefli nanotaşıyıcı ile tümörün hücre alımında artma, tümörün küçülmesinin gözlenmesi ve ilacın hepatosit hasarında azalma. | (91) |
| Brigatinib | Katı Lipit NP | <i>in vitro</i> | A549 hücrelerinde hücre canlılığının azalması. | (92) |
| Brigatinib | Lipit NP | <i>in vitro</i> | H-1975 hücrelerinde sitotoksitenin artması. | (93) |
| Ceritinib | Katı Lipit NP | <i>in vitro</i> | Nanopartiküler sistem ile disollüsyonun artması. | (94) |
| Erlotinib | Dendrimer | <i>in vitro</i> | A549 hücrelerinde sitotoksik etkinin artması. | (95) |
| Erlotinib | Nanoemülsiyon | <i>in vitro, ex vivo</i> | İnhalasyon için uygun taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasıyla A549 hücrelerinde sitotoksik etkinin artması. | (96) |
| Erlotinib | Silika NP | <i>in vitro, in vivo</i> | Önemli vücut ağırlığı farkı olmadan tümöral ilaç tutulumunun artması, antitümör etkinliği ve tümör hacminin azaltılması. | (97) |
| Erlotinib | Kitozan Polimerik NP | <i>in vitro</i> | pH'a bağlı AS1411 aptamer konjugasyonu ile A549 hücrelerinde apoptoz ve sitotoksitenin artması. | (98) |

| | | | | |
|--------------------------|-------------------|--------------------------|---|-------|
| Erlotinib | Siklodekstrin NP | <i>in vitro</i> | A549 ve HepG2 hücrelerinde sitotoksik etkinin artması. | (99) |
| Gefitinib | Lipit NP | <i>in vitro</i> | A549 hücrelerinde sitotoksik etkinin artması. | (100) |
| Gefitinib + siRNA | Lipit NP | <i>in vitro</i> | A549, H-1975, PC-9 ve PC-9GR hücre hatlarında sitotoksik etkinin artması. | (101) |
| Gefitinib | Lipozom | <i>in vitro</i> | A549 ve H1299 hücrelerinde sitotoksik etkinin artması. | (102) |
| Gefitinib | Lipozom | <i>in vitro, in vivo</i> | A549 ve 16HBE hücrelerinde sitotoksik etkinin ve antitümör etkinin artması. | (103) |
| Gefitinib | Katı Lipit NP | <i>in vitro</i> | A549 hücrelerinde sitotoksik etkinin artması. | (104) |
| Gefitinib | PLGA Polimerik NP | <i>in vitro</i> | A549 hücrelerinde kitosan kaplama ile sitotoksitenin artması. | (105) |
| Gefitinib | Nanosüspansiyon | <i>in vitro</i> | 3T3, A549, SiHa ve U87 hücrelerinde sitotoksitenin artması. | (106) |
| Krizotinib | Polimerik NP | <i>in vitro, in vivo</i> | A549 hücrelerinde apoptoz ve sitotoksitenin artması, tümör büyümesinin inhibisyonu ve hepatosit hasarının azalması. | (107) |
| Krizotinib | Polimerik Misel | <i>in vitro</i> | A549 hücrelerinde apoptozun artması. | (108) |

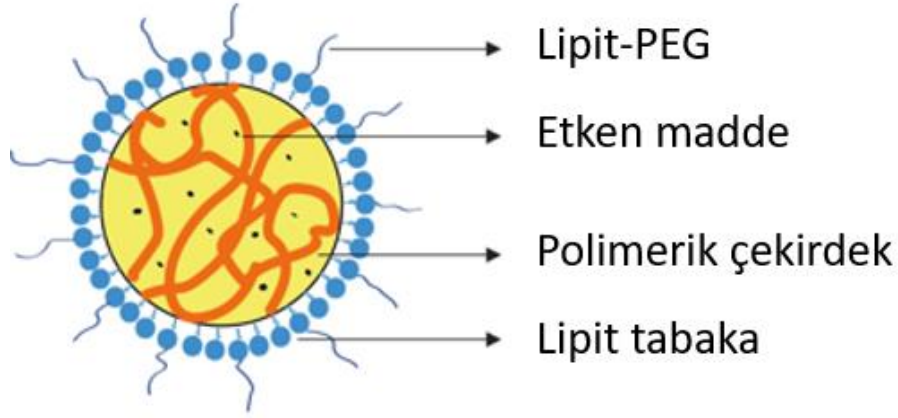
2.5. Lipit-Polimer Hibrit Nanopartiküller

Polimerik nanopartiküller ve lipozomlar nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin önemli iki alt sınıfıdır (109). Polimerik nanopartiküller içerdikleri bileşenlere ve hazırlama yöntemlerine göre iki kategoriye ayrılmaktadır. (i) Nanokapsül olarak da bilinen rezervuar sistemleri ve (ii) nanoküre olarak da bilinen matris sistemleridir (110). Nanokapsüllerde ilaç, ilacın salımını kontrol etmekten sorumlu polimerik bir zarla çevrelenen sıvı bir çekirdek içinde çözülürken nanoküreler de ilaç polimerik ağı içinde kapsüllenebilir ya da destek ve stabilite sağlayacak şekilde yüzeyine adsorbe edilebilmektedir (111, 112). Biyouyumlu polimerlerden yapılan polimerik NP; yüksek stabilite, dolaşım sisteminde uzun süre kalabilme, yüzey modifikasyonları sayesinde ilaçların kontrollü ve hedefe yönelik bir şekilde salabilme özelliklerine sahiptir (113, 114). Piyasa da PLGA polimeri ile hazırlanmış çeşitli ilaçlar bulunmaktadır. Bu ilaçlara prostat kanserinde kullanılan Leuprolit asetat içeren Lupron Depot®, Triptorelin asetat içeren Decapeptyl®, Buserelin içeren Suprecur® MP örnek olarak verilebilmektedir.

Lipozomlar, fosfolipid yapı taşlarından oluşan iki veya daha çok katmanlı veziküler yapılardır. Boyutları 25 nm - 2.5 µm aralığında değişebilen hidrofobik kuyruk yapıları ve hidrofilik başları sayesinde de hidrofilik ve hidrofobik etken maddelerin aynı anda taşınmasında sıklıkla kullanılmaktadırlar (115-117). Piyasada onay almış ve aktif olarak kullanılan Doksorubisin içeren DaunoXome®, Doxil®, Caelyx®, Lipodox®; Amfoterisin B içeren Ambisome®, Amphotec®, Abelcet®; Siklosporin içeren Neoral®; İrinotekan içeren Onivyde® gibi çeşitli lipozomal ilaç taşıyıcı sistemler bulunmaktadır. Ancak sıklıkla kullanılmaları ve tüm bu avantajlarının yanında lipozomal ilaç sistemlerin düşük stabilitelerinin olması, oksidasyona ve/veya hidrolize kolaylıkla uğrayabilmeleri gibi sakıncaları da bulunmaktadır (118, 119).

Lipit bazlı taşıyıcı sistemler ve polimerik bazlı taşıyıcı sistemlerin bir arada kullanılmasıyla hazırlanan lipit-polimer hibrit nanopartiküller (LPHNP) ilaç taşıyıcı sistemler ise sadece lipit bazlı veya polimer bazlı taşıyıcı sistemlere kıyasla son zamanlarda literatürde sıklıkla çalışılmaktadır (120, 121).

LPHNP sistemler genel olarak üç kısımdan oluşmaktadır. Bu bileşenler (i) polimerik çekirdek, (ii) lipit tabaka ve (iii) hidrofilik polimer tabakasıdır (Şekil 2.3.).



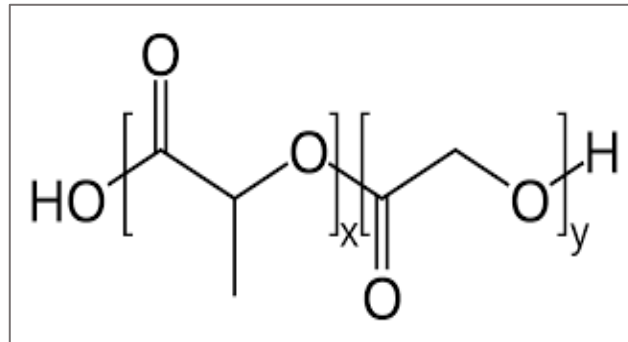
Şekil 2.3. Polimer çekirdek ve lipit katmandan oluşan LPHNP ilaç taşıyıcı sistemi.

(i) Polimerik çekirdek, mekanik olarak stabiliteyi sağlamanın yanı sıra suda çözünürlüğü düşük etken maddelerin yüksek ilaç yükleme kapasitesi ile yüklenebilmesini, etken maddelerin kontrollü salınmasını sağlamaktadır. Polimerik çekirdek için biyoyumlu, bioparçalanabilir ve non-toksik olmaları ve sıklıkla kullanılmaları sebebiyle genellikle PLGA, PCL, dekstran, albümin polimerleri tercih edilmektedir (122, 123).

(ii) Hücrelerin içerisine girişi ve biyoyumu arttıran lipit tabakası polimer çekirdek ile çevrilidir. Lipit katmanı oluşturmak için doğal veya sentetik yapıli lipitler (lesitin, soya fosfatidilkolin, dipalmitoil trimetilamonyum propan (DPTAP), dipalmitoil fosfatidilkolin (DPPC), dioleil trimetilamonyum propan (DOTAP) ve dioleil fosfoetanolamin (DOPE)) kaytonik, nötral ve anyonik fosfolipidler kullanılmaktadır.

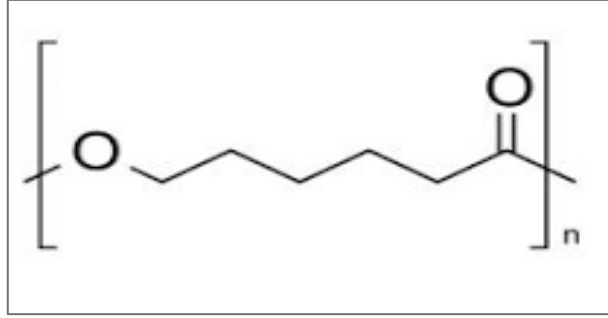
(iii) En dışta bulunan hidrofilik polimer tabakası ise nanopartiküllerin sistemik dolaşım süresini (RES hücrelerinden kaçarak) ve stabilitesini arttırmaktadır. Hidrofilik polimer tabakası için DSPE-PEG-2000 gibi lipit-PEG maddeleri kullanılmaktadır. LPHNP sistemlerde hidrofobik etkileşimler, elektrostatik etkileşimler veya Van der Waals bağları ile polimerik çekirdek ve lipit dış tabaka birbirleri ile birleşmektedir (28, 123, 124).

LPHNP ilaç taşıyıcı sistemlerin polimer çekirdeğinin hazırlanmasında biyouyumlu, biyoparçalanır ve toksik olmalarından kaynaklı olarak PLGA, PCL, dekstran, albümin polimerleri kullanılmaktadır. FDA tarafından onay alan PLGA, PGA ve PLA polimerizasyonu ile oluşan poliester, alifatik yapıya sahip bir kopolimerdir (Şekil 2.4.). PGA ve PLA monomerleri 75:25, 25:75, 50:50 (PLA:PGA) gibi değişen oranlarda bir araya gelerek PLGA kopolimeri oluşturmaktadır. PGA monomerinin degradasyonu hızlı bir polimerdir ve hidrofilik karakter göstermektedir (125). PLA monomerinin ise parçalanma hızı daha yavaştır ve hidrofobik karaktere sahiptir (126). Bu sebeple PLGA kopolimerinin yapısındaki PGA ve PLA oranına göre hidrofobik karakteri ve parçalanma hızı değişkenlik göstermektedir. 50:50 (PLA:PGA) oranındaki PLGA polimeri araştırmalarda en çok kullanılan PLGA türüdür. PLGA polimeri metabolizasyonu glikolik asit ve laktik asite dönüşerek gerçekleşmektedir. Literatürde, PLGA polimerinin vücuttan eliminasyon süresinin 1-2 ay olduğu bildirilmektedir (127). PLGA polimerinin parçalanmasını PLA ve PGA oranının yanı sıra polimerin molekül ağırlığı da etkilemektedir (128). Polimerin molekül ağırlığı arttıkça etken maddenin salımı ve parçalanma hızı azalmaktadır ve genellikle nanopartiküllerin partikül büyüklüğü de artmaktadır (129).



Şekil 2.4. PLGA moleküler yapısı (130).

LPHNP ilaç taşıyıcı sistemlerin polimer çekirdeğinin hazırlanmasında kullanılan bir diğer polimer olan PCL ise hidrofobik özellikte, yüksek permeabiliteye sahip ve biyoparçalanabilir bir polimerdir (131) (Şekil 2.5.).



Şekil 2.5. PCL moleküler yapısı (130).

LPHNP ilaç taşıyıcı sistemlerinin,

- İlaç yükleme kapasitelerinin yüksek olması,
- Kontrollü salım yapabilmeleri,
- Biyoyumluluklarının yüksek olması,
- Dolaşım sisteminde stabil olmaları,
- Antikor, folik asit gibi materyaller ile kolayca yüzey modifikasyonlarının yapılabilmesi,
- Aktif hedeflendirilebilmesinin yanında rahatlıkla pasif hedeflenebilmeleri,
- Biyoyararlanımlarının yüksek olması gibi çeşili üstünlükleri bulunmaktadır (132, 133).

Bu üstünlükleri ile teşhis amaçlı görüntülmede, aşı adjuvanu olarak, aktif hedeflendirme amacıyla, nükleik asitlerin taşınmasında, çoklu ilaç direnci gelişmiş hastalıklar için birden fazla ilacın tek bir sistemde kombine olarak taşınmasında ve kanser tedavisinde LPHNP ilaç taşıyıcı sistemler kullanılmaktadır (133-135).

Çekirdekleri ve katmanlarındaki polimer ve lipitlerin yapısal özelliklerine göre farklı tipte LPHNP ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmektedir. Polimer çekirdek ve lipit tabakadan oluşan LPHNP ilaç taşıyıcı sistemde lipit tabaka polimer çekirdeğin etrafını çevrelemektedir. Lipit tabaka ile çevrili LPHNP ilaç taşıyıcı sistemlerle sisteminin stabilitesinin artırılması, sistemden sürekli ilaç salımının sağlanması ve ilacın immün sistem tarafından uzaklaştırılmadan dolaşımında uzun süre kalabilmesi amaçlanmaktadır. Çekirdek katman tipi içi boş LPHNP ilaç taşıyıcı sistemlerde ise iç katmandaki çekirdek lipit tabaka ile çevrelenmiş, bu lipit tabakanın etrafında ise polimer tabaka bulunmaktadır. Polimer tabakanın dışında lipit ve en dışta lipit-PEG tabakası bulunmaktadır. Çok katmanlı sistem ile ilaç enkapsülasyonunun artırılması ve sistemin mikroçevreye karşı daha dayanıklı olması sağlanmaktadır. Lipozomun

polimer içerisine hapsedildiği sistemlerde lipozomun etrafını polimer çevrelemektedir. Lipozomun polimer ile çevrelendiği bu sistemlerde lipozomların sakıncalarından olan sistemden ilaç sızıntısının azaltılması ve sistemden ilaç salımının kontrollü şekilde gerçekleşmesi amaçlanmaktadır. Bir diğer LPHNP sistem ise eritrosit membranı ile çevrelenmiş polimerik ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Eritrosit membran sayesinde ilaç taşıyıcı sistemin biyouyumluluğunun artırılması, sistemin immün sistemden kaçması ve serum proteinleri ile etkileşimin azalması amaçlanmaktadır (123, 136).

2.5.1 LPHNP Hazırlama Yöntemleri

LPHNP ilaç taşıyıcı sistemler iki farklı yöntem ile hazırlanmaktadır (123).

(i) İki basamaklı yöntem

İki basamaklı yöntemde lipozom ve polimerik nanopartiküller ayrı olarak hazırlandıktan sonra lipozom ve polimerik nanopartiküller çeşitli (hidrasyon/ekstrüksiyon/sonikasyon) işlemler ile birleştirilmektedir. Bu yöntemde polimerik nanopartiküller nanoçöktürme, emülsiyon oluşturma çözücü buharlaştırma veya yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi ile hazırlanmaktadır. İki basamaklı hazırlama yönteminde LPHNP'ler iki şekilde hazırlanabilmektedir.

(i) Organik bir çözücüde çözüldürülen ve çözücüsü uçurulan lipit tabakanın üzerine nanoçöktürme, emülsiyon oluşturma çözücü buharlaştırma veya yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemlerinden biriyle hazırlanan polimerik nanopartikül süspansiyonu ilave edilmektedir.

(ii) Organik bir çözücüde çözüldürülen ve organik çözücüsü uçurulan lipit tabakanın hidrasyonu sonrasında hazırlanan polimerik nanopartikül süspansiyonunun ilave edilmektedir (133).

Her iki hazırlama yönteminde polimerik nanopartikül ve lipit tabakanın homojen olarak birleşmesi lipitin faz geçiş sıcaklığından yüksek bir sıcaklıkta inkübe edilmesi, karıştırma veya ultrasonikasyon uygulamaları ile sağlanmaktadır.

İki basamaklı yöntem, LPHNP ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında daha önceleri sıklıkla kullanılan bir yöntem olmasına rağmen hidrofilik etken maddeler ile hazırlanan LPHNP'lerde görülen düşük yükleme kapasitesi ve tek basamaklı

yöntemlere göre hazırlama yönteminin daha uzun olması gibi nedenlerle günümüzde daha az tercih edilmektedir (137).

(ii) Tek basamaklı yöntem

Tek basamaklı yöntem de lipozom ve polimerik nanopartiküller beraber hazırlanmaktadır ve iki basamaklı yöntemle göre hazırlama prosesi daha hızlıdır. Bu yöntemde lipit ve polimer aynı faz içerisinde hazırlanmaktadır. Tek basamaklı yöntemde LPHNP sistemler modifiye edilmiş emülsiyon oluşturma çözücü buharlaştırma veya nanoçöktürme yöntemleriyle nanopartiküller elde edilmektedir (123).

(i) Emülsiyon oluşturma çözücü buharlaştırma yönteminin kullanıldığı tek basamaklı yöntemde LPHNP ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında kullanılan etken maddenin hidrofilik özelliğine bağlı olarak tek veya çift emülsiyon oluşturma çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılmaktadır. Emülsiyon oluşturma çözücü buharlaştırma yöntemi hidrofobik etkin maddelerin LPHNP ilaç taşıyıcı sistemlerinin hazırlanmasında kullanılırken çift emülsiyon oluşturma çözücü buharlaştırma yöntemi hidrofilik etkin maddelerin LPHNP ilaç taşıyıcı sistemlerinin hazırlanmasında kullanılmaktadır (120).

(ii) Nanoçöktürme yönteminin kullanıldığı tek basamaklı yöntem de ise su ile karışabilen organik çözücü de polimer ve etkin maddenin çözündürülmesinin ardından sulu fazda lipit/lipit-PEG karışımının çözündürülmektedir. Sonrasında organik fazın sulu faza manyetik karıştırıcı altında damla damla ilavesiyle organik fazın sulu faza difüze olması ile polimerin çöktürülmesini sağlanmaktadır (120). Gerçekleşen hidrobik etkileşimler ile lipide ait hidrofobik kuyruk polimer ile etkileşirken lipide ait hidrofilik baş kısım sulu faza yönelerek çekirdeği çevrelemekte ve LPHNP taşıyıcı sistemler elde edilmektedir (133).

2.6. Deney Tasarımı (Design of Experiment, DoE)

Son yıllarda istatistiksel analiz yöntemlerinin ve programlarının gelişmesiyle istatistiksel analizin deneysel planlanma aşamasında gerçekleştirilmesi maliyet ve zaman verimliliği açısından önem kazanmıştır.

Konvansiyonel olarak gerçekleştiren formülasyon geliştirme çalışmalarında, her çalışma da tek bir değişken değiştirilerek diğer değişkenler sabit tutularak çalışmalar yürütülmektedir. Tek değişken üzerinden gerçekleştirilen analizlerde ise değişkenler arasında etkileşimler incelenememektedir. Bunun yanısıra gerçekleştirilen deneylerin sayısının fazla olması da zaman verimliliği ve maliyet açısından sakınca oluşturmaktadır. Deney tasarımı kullanılan çalışmalarda ise değişkenler arasında etkileşimler incelenebilmekte ve konvansiyonel formülasyon geliştirme çalışmalarından daha az deney sayısı ve daha hızlı bir şekilde formülasyonlar geliştirilebilmektedir.

Deney tasarımında öncelikli olarak sonuç için hangi değişkenlerin önemli olduğu belirlenmektedir. Önemli değişkenlerin belirlenmesinin ardından istenilen sonuçların elde edilebilmesi için değişkenler optimize edilmektedir. Bunun yanısıra bağımlı/bağımsız değişkenler arasındaki ilişkilerde incelenebilmektedir. Deney tasarımı ile problemler kolayca tanımlanabilmekte ve önlenebilmekte, daha az sayıda deneysel çalışma ile daha doğru ve hızlı sonuç alınmakta, hangi seviyenin faktörler için optimum olacağı belirlenebilmekte ve kritik parametreler tanımlanabilmektedir. Genel olarak deney tasarımları; (i) yanıt yüzey tasarımları, (ii) tam faktöriyel tasarım, (iii) kısmi faktöriyel tasarım, (iv) Plackett-Burman tasarımı olarak sınıflandırılmaktadır (138).

Yanıt yüzey tasarımları bağımsız değişkenlerin cevaplara olan etkisini ve bağlantılarını kolay ve hızlı elde etmemizi sağlayan gıda, ilaç sektörü gibi alanlarda sıklıkla kullanılan matematiksel ve istatistiksel tekniklerden oluşan tasarım şeklidir. Yanıt yüzey tasarımları da (i) Box-Behnken tasarım, (ii) Merkezi birleşik tasarım, (iii) Doehlert tasarım olarak üç alt grupta incelenmektedir.

2.6.1. Box-Behnken Tasarımı

Günümüzde Box-Behnken tasarımı ilaç sektörü ve gıda sektöründeki çalışmalarda bağımsız ve bağımlı değişkenler arasındaki ilişkinin anlaşılmasında ve çalışmalardaki koşulların optimize edilebilmesinde başarılı bir tasarım olarak uygulanmaktadır. Üç faktörlü yapılacak deney tasarımlarında Box-Behnken tasarımı diğer yanıt yüzey tasarımlarına kıyasla deney sayısı açısından verimlilik sağlayan bir tasarım yöntemidir. Box-Behnken tasarımında, yanıt fonksiyonu ile bağımsız değişkenler arasında deneysel bir ilişki kurulmaktadır. Bu tasarım optimum nanopartikül formülasyonunun elde edilebilmesine olanak sağlarken farklı değişkenlerin karakterizasyon çalışmalarının sonuçları üzerinde etkileşimli ve doğrusal etkilerini araştırmak için kullanılmaktadır (139).

Tablo 2. 3. Box-Behnken tasarım matrisi (Üç düzey ve üç faktörlü) (140).

| Deney | Faktörler | | |
|-------|----------------|----------------|----------------|
| | X ₁ | X ₂ | X ₃ |
| 1 | + | - | 0 |
| 2 | + | + | 0 |
| 3 | + | 0 | - |
| 4 | + | 0 | + |
| 5 | - | - | 0 |
| 6 | - | + | 0 |
| 7 | - | 0 | - |
| 8 | - | 0 | + |
| 9 | 0 | - | - |
| 10 | 0 | + | - |
| 11 | 0 | - | + |
| 12 | 0 | + | + |
| 13 | 0 | 0 | 0 |
| 14 | 0 | 0 | 0 |
| 15 | 0 | 0 | 0 |

(Matris de negatif değerler faktörlerin düşük düzeyini, sıfır değeri faktörler için orta düzeyini, pozitif değerler ise faktörlerin yüksek düzeylerini, ifade etmektedir.)

2.7. Lipit Polimer Hibrit Nanopartiküllerin Karakterizasyonları

LPHNP ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında yararlanılan polimer, lipit, lipit-PEG miktarları ve türleri, LPHNP hazırlanmasında kullanılan yöntemler ve ortam koşulları LPHNP ilaç taşıyıcı sistemlerin yapısını ve karakterizasyonunu etkilemektedir. Bu nedenle üretim tekrarlanabilirliği açısından bu parametreler de optimize edilerek LPHNP ilaç taşıyıcı sistemler hazırlanmalı ve karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmelidir.

LPHNP'lerin karakteristik özellikleri (partikül büyüklüğü, nanopartiküllerin homojen yapısı (polidispersite indeksi), partikül şekli, yüzey yükü (zeta potansiyel), yüzey yapısı) nanopartiküllerin ilaç yükleme etkinliği, stabilite, toksisite, *in vitro* ve *in vivo* performans gibi özelliklerini direkt olarak etkilediği bilinmektedir. LPHNP ilaç taşıyıcı sistemlerin karakterizasyonu için parametreler ve kullanılan yöntemler Tablo 2.4.'de özetlenmiştir (123).

Tablo 2. 4. Partiküllerin karakterizasyonu için parametreler ve yöntemler.

| Parametre | Kullanılan Yöntemler |
|---|---|
| Partikül büyüklüğü dağılımı ve yüzey yükü | Dinamik ışık saçılımı, Foton korelasyon spektroskopisi |
| Morfolojik yapı | Atomik kuvvet mikroskopu (AFM), Taramalı elektron mikroskopu (SEM), Transmisyon elektron mikroskopu (TEM), Konfokal laser taramalı mikroskop (CSLM), Floresans mikroskopu |
| İlaç yükleme kapasitesi | Diyaliz, Membran filtrasyon, Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) |
| İlaç salımı | Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), UV spektroskopu, Örnekleme ve ayırma yöntemi |

| | |
|----------------------|---|
| Sitotoksosite | MTT hücre yaşam deneyi, XTT hücre yaşam deneyi, ATP belirleme deneyi, Tiripan mavisıyla renklendirme |
| Stabilite | Partikül büyüklüğü,zeta potansiyel, ilaç içeriği vb. özelliklerin analizi |

2.8. Lipit Polimer Hibrit Nanopartiküllerin Hücre Kültürü Çalışmaları

LPHNP'lerin etkililiğinin ve güvenliğinin tespit edilmesi amacıyla hücre kültüründe *in vitro* olarak hücre canlılığı analizleri gerçekleştirilmiştir. Tez kapsamında hücre canlılığı ve çoğalmasının tespiti için kantitatif ve kolorimetrik bir yöntem olan XTT ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromür]) yöntemi kullanılmıştır (141). XTT yönteminde canlı hücreler tarafından sarı renkli tetrazolyum, mor renkli formazan kristallerine dönüştürülmekte ve formazan kristalleri ile oluşan rengin spektrofotometrik olarak absorbansının ölçümüyle tayin gerçekleştirilmektedir (142). Bu yöntemde, terapötik ajanların hücre üzerindeki sitotoksik ve/veya çoğalma etkilerinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (143).

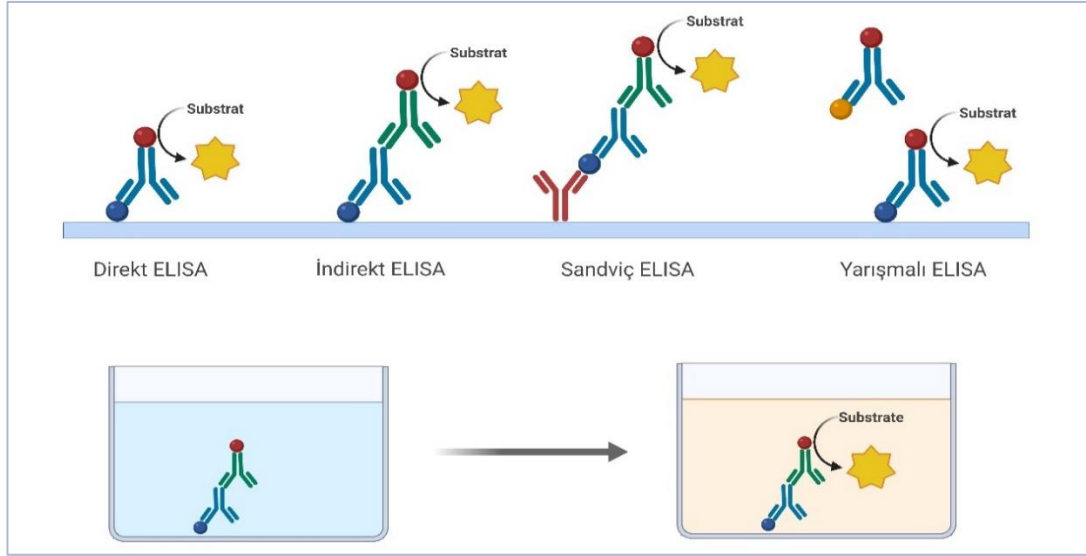
2.8.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Genlerin ekspresyon seviyelerindeki değişimin tayini akciğer kanseri de dahil olmak üzere bir çok hastalıkta önemli bir yere sahiptir. Genlerin ekspresyon seviyelerinin tayini ve takibi patolojik veya biyolojik durumların tespit edilmesinin yanı sıra hastalıkların tedavisinde de tedaviye verilen yanıtında incelenmesine olanak sağlamaktadır. Bu amaçla genlerin ekspresyon seviyelerinin tayini için (i) polimeraz zincir reaksiyonu (polymerase chain reaction, PCR), (ii) RNA dizileme (RNA Sequencing, RNAseq), (iii) hibridizasyon, (iv) DNA mikrodizilim yöntemleri kullanılmaktadır (144). 1984 yılında keşfedilmiş ve günümüzde de sıklıkla kullanılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemi genlerin ekspresyonlarını kantitatif ve kalitatif olarak tayin edilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (145). Yöntemin esasını DNA polimeraz enzimi aracılığıyla nükleik asit molekülünün belirli bir segmentinin çoğaltılması oluşturmaktadır. Günümüzde PCR yönteminin bir çok çeşidi

bulunmaktadır. PCR çeşitlerinden çalışmalarda sıklıkla kullanılan tür olan Real-Time quantitative PCR (gerçek zamanlı kantitatif, RT-qPCR) iki aşamaya sahiptir. Bu aşamalardan birincisi ters transkriptaz enzimi ile RNA'dan tamamlayıcı DNA (cDNA)'nın sentezlenmesi, ikinci aşama ise cDNA'nın standart PCR yoluyla çoğaltılmasıdır. RT-qPCR, DNA ve RNA örneklerini kantitatif ve kalitatif olarak kısa sürede analiz edebilmeye olanak sağlaması, mor ötesi ışık ya da agaroz jel elektroforezi kullanımı gibi ek uygulamalara gerek olmaması gibi üstünlüklere sahip bir PCR yöntemidir (146, 147).

2.8.2. Enzime Bağlı İmmünosorbent Deneyi (ELISA)

Uygulanan yöntemin etkinliğinin değerlendirilmesinde hedef genlerin ekspresyon düzeyleri yanında bu genlerin ifade ettiği proteinlerin de ekspresyon düzeylerinin ölçülmesi de uygulanan yöntemin etkinliğini değerlendirebilmek için önemlidir. Proteinlerin ekspresyon düzeylerinin analizinde literatürde sıklıkla pratik, düşük maliyetli ve hassas kantitatif analiz yapabilen Enzime Bağlı İmmünosorbent Deneyi (ELISA) yöntemi kullanılmaktadır (148). ELISA yöntemin esası, antijen (protein) ve antikor arasındaki spesifik bağlanmaya dayanmaktadır. ELISA yöntemi hedef proteinin (antijen) veya spesifik antikorun sabit ve katı bir yüzeye adsorpsiyon yöntemiyle sabitlenerek, ortama enzim konjuge edilmiş spesifik antikorun eklenmesi sonucu antijen-antikor bağlanmasını amaçlamaktadır. Antijene bağlanmayan antikorun ortamdaki yıkama ile uzaklaştırılması, ortama substrat eklenerek enzim-substrat reaksiyonu sonucu oluşan sinyalin florometrik, kolorimetrik ya da luminesans ölçümüne dayalı yöntemlerle tayin edilmesi aşamalarından oluşmaktadır. ELISA yönteminin antijen-antikor kombinasyonuna bağlı olarak sandviç, direkt, indirekt ve yarışmalı olarak farklı teknikleri bulunmaktadır, yöntemlere ait şematik gösterim Şekil 2.6.'da özetlenmiştir (148, 149).



Şekil 2.6. ELISA yöntemlerinin şematik gösterimi (BioRender.com ile oluşturulmuştur).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araç ve Gereçler

3.1.1. Kullanılan Kimyasal/Biyolojik Maddeler

| | |
|---|---|
| Poli (laktik asit-ko-glikolik asit) (50:50) (M _A ; 7.000-17.000 Da) | Sigma Aldrich, ABD |
| Polikaprolakton (M _A ; 14.000 Da) | Sigma Aldrich, ABD |
| Soya fosfatidilkolin | Avanti Polar Lipids, ABD |
| DSPE-PEG2000 | Avanti Polar Lipids, ABD |
| Asetonitril (LC-MS saflıkta) | Sigma-Aldrich, ABD |
| Diklorometan (DCM) | Sigma-Aldrich, ABD |
| Etanol (EtOH) | Sigma-Aldrich, ABD |
| Gen spesifik primer prob | NZYTech, Portekiz |
| ON-TARGETplus GAPD Kontrol havuzu (insan) | Dharmacon, ABD |
| RPMI 1640 Besiyeri | Biowest, ABD |
| NCI-H2228(EML4-ALK füzyon akciğer adenokarsinom) hücre hattı | CRL-5935™ ,American Type Culture Collection, ABD |
| KRAS ELISA Kiti | Fine Test, Çin |
| MEK Kinase ELISA Kiti | Fine Test, Çin |
| ERK Kinase ELISA Kiti | BT-LAB, Çin |
| RAF Kinase ELISA Kiti | BT-LAB, Çin |
| iQuant™ RNA Tayin Kiti | ABP Biosciences, ABD |
| qPCR nükleik asit boyası | SYBR Green qPCR Master Mix - (ABT, Türkiye) |
| Yüksek Kapasiteli cDNA Ters Transkripsiyon Kiti | Applied Biosystems, ABD |
| Fetal sığır serumu | Capricorn Scientific GmbH, Almanya |
| Penisilin / Streptomisin | Capricorn Scientific GmbH, Almanya |
| Saf Su (LC-MS saflıkta) | Merck, Almanya |
| Tripsin-EDTA | Sigma Aldrich, ABD |
| PBS (pH 7,4) Tabletleri | Sigma Aldrich, ABD |
| Tritan mavisi | Sigma-Aldrich, ABD |

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

| | |
|---|-------------------------|
| Hassas Terazı (XS 105) | Mettler Toledo, İsviçre |
| Hassas Terazı | Shimadzu, Japonya |
| Çok Noktalı Manyetik Karıştırıcı | Thermo Scientific, ABD |
| Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı | IKA, Almanya |
| Mikropipet | Eppendorf, Almanya |
| Partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel tayin cihazı, (Zetasizer Nano-ZS) | Malvern Instruments, UK |
| HPLC Cihazı | Dionex, Germany |
| HPLC Kolonu (Restek Roc C18 5µm, 250x4.6mm) | Restek, Fransa |
| PCR cihazı | Applied Biosystems, ABD |
| pH metre | Hanna Instruments, ABD |
| Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM), Tecnai G 2 Spirit Biotwin | FEI, ABD |
| Laminar hava akımlı hücre kültürü kabini | Clean Air, Hollanda |
| Floresan mikroskop | Leica, Almanya |
| Mikroplaka okuyucu, Versamax | BMG LABTECH, Almanya |
| Santrifüj Cihazı (FC5718R) | Ohaus, Kanada |
| Santrifüj Cihazı (Universal 320) | Hettich, Almanya |
| Ultrasonik Banyo (AL 04-12) | Advantage-Lab, İsviçre |
| Ultra Saf Su Sistemi (Milli Q) | Millipore, ABD |
| Vorteks (Vortex 4 Basic) | IKA, Çin |
| Ultrasonik Prob (Sonopuls HD 4200) | Bandelin, Almanya |
| Yatay Çalkalayıcı Su Banyosu | Mammert, Almanya |
| Qubit™ 4 Florometre | Thermo Fisher, ABD |
| UV Spektrofotometre | Shimadzu, Japonya |

3.2. Yöntem

3.2.1 Lipit-polimer Hibrit Nanopartiküllerin Ön Formülasyon Çalışmaları

Lipit-polimer hibrit nanopartiküllerin önformülasyon çalışmalarında, konvansiyonel deney tasarımlarından farklı olarak deney sayısının azaltılması ile doğru ve gerçeğe yakın sonuçların elde edilmesini sağlayan istatistiksel bir deney tasarımı olan Box-Behnken deney tasarımı kullanılmıştır. Box-Behnken deney tasarımı, yüzey cevap metodolojisine dayanmaktadır ve az sayıda faktör söz konusu olduğunda cevap değişkenlerinin optimize edilmesi amacıyla tercih edilmektedir (150-153). Tez çalışmalarında yer alan üç faktörlü Box-Behnken deney tasarımında bağımsız değişken olarak farklı polimer miktarı (X_1), lipit miktarı (X_2) ve DSPE-PEG 2000 miktarı (X_3) kullanılarak optimum formülasyon bileşenlerinin seçilmesi hedeflenmiştir. Bu tasarımda elde edilmek istenen cevap değişkenleri partikül büyüklüğü (Y_1), polidispersite indeksi (Y_2) ve zeta potansiyel (Y_3) olarak belirlenmiştir. Bağımsız değişkenler için üç farklı düzey ön çalışmalar ve literatür çalışmalarının taranması ile saptanmıştır (124, 133). Box-Behnken deney tasarımında zeta potansiyelin (-20) – (-30) mV aralığında partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi (PDI) değerinin minimum değerde (pasif hedeflendirmeye uygun partikül büyüklüğü <400 nm ve PDI <0.3) kalması amaçlanmıştır. Deney tasarımı kapsamında LPHNP'lerin hazırlanmasında kullanılan faktörler ve düzeyleri Tablo 3.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Box-Behnken deney tasarımında kullanılan faktörler ve düzeyleri.

| | Düzye | | |
|---|-----------------|----------|-------------|
| | Düşük (-1) | Orta (0) | Yüksek (+1) |
| Bağımsız Değişkenler | | | |
| X₁: Polimer miktarı (mg) | 10 | 15 | 20 |
| X₂: Lipit miktarı (mg) | 1.5 | 2.25 | 3 |
| X₃: DSPE-PEG miktarı (mg) | 0.4 | 0.6 | 0.8 |
| | Hedefler | | |
| Bağımlı Değişkenler | | | |
| Y₁: Partikül büyüklüğü (nm) | | Minimum | |
| Y₂: Polidispersite indeksi | | Minimum | |
| Y₃: Zeta Potansiyal (mV) | | -20/ -30 | |

Bağımsız değişkenlerin cevaplar üzerindeki ilişkileri Formül 3.1.'de verilen ikinci dereceden denklem ile analiz edilmiştir;

$$y = \alpha_0 + \alpha_1 X_1 + \alpha_2 X_2 + \alpha_3 X_3 + \alpha_4 X_1 X_2 + \alpha_5 X_1 X_3 + \alpha_6 X_2 X_3 + \alpha_7 X_1^2 + \alpha_8 X_2^2 + \alpha_9 X_3^2 \quad (3.1.)$$

İkinci dereceden denklemde y bağımlı değişken, X_1 , X_2 , X_3 bağımsız değişken, $\alpha_0 - \alpha_9$ regresyon katsayısını temsil etmektedir. Formülasyonu etkileyen diğer faktörler (polimerlerin molekül ağırlığı (kDa), santrifüj hızı, santrifüj süresi, sonikasyon süresi, sonikasyon gücü) bağımlı değişkenlerin cevabını etkileyeceği için sabit tutularak formülasyonlar hazırlanmıştır.

Deney tasarımının oluşturulmasında, gerçekleştirilen deneylerin randomize edilmesinde ve istatistiksel analizlerin gerçekleştirilmesi için "Design Expert®13 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, ABD)" yazılımı kullanılmış, tüm formülasyonlar üç tekrarlı hazırlanmıştır. Deney tasarımı kapsamında LPHNP'lerin hazırlanmasında kullanılan formülasyon değişkenleri ve miktarları Tablo 3.2.'de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Ön formülasyon çalışmalarında kullanılan formülasyon değişkenleri ve miktarları.

| | Polimer Miktarı (mg) | Lipit Miktarı (mg) | DSPE-PEG 2000 Miktarı (mg) |
|-----------------------|---------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------|
| Formülasyon 1 | 10 | 1,5 | 0,6 |
| Formülasyon 2 | 10 | 2,25 | 0,4 |
| Formülasyon 3 | 10 | 2,25 | 0,8 |
| Formülasyon 4 | 10 | 3 | 0,6 |
| Formülasyon 5 | 15 | 1,5 | 0,4 |
| Formülasyon 6 | 15 | 1,5 | 0,8 |
| Formülasyon 7 | 15 | 2,25 | 0,4 |
| Formülasyon 8 | 15 | 2,25 | 0,6 |
| Formülasyon 9 | 15 | 2,25 | 0,8 |
| Formülasyon 10 | 15 | 3 | 0,4 |
| Formülasyon 11 | 15 | 3 | 0,8 |
| Formülasyon 12 | 20 | 1,5 | 0,6 |
| Formülasyon 13 | 20 | 2,25 | 0,4 |
| Formülasyon 14 | 20 | 2,25 | 0,8 |
| Formülasyon 15 | 20 | 3 | 0,6 |

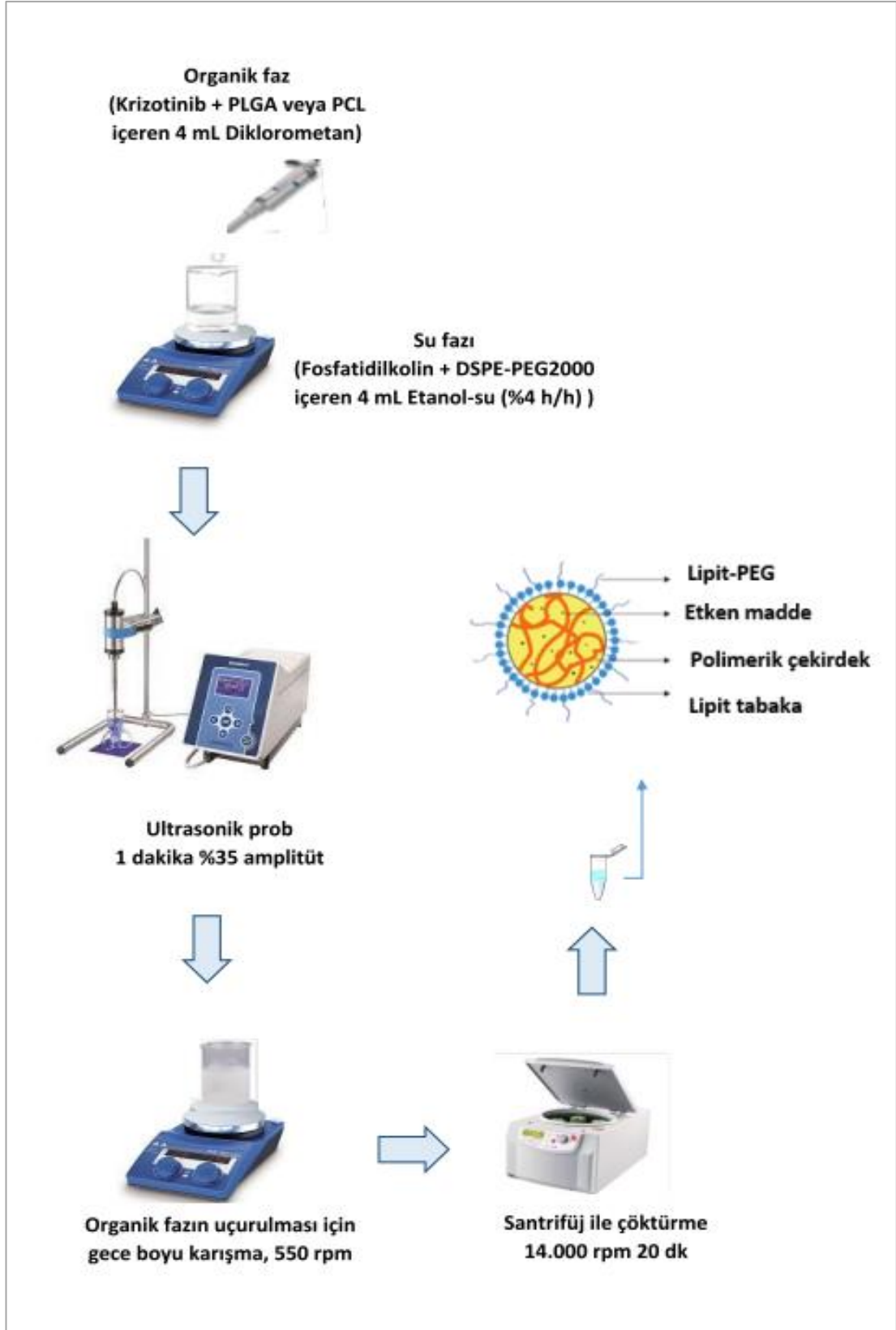
Tez kapsamında iki farklı polimer ve iki farklı hazırlama yönteminin kullanılması formülasyon bileşenlerinin oranının yanı sıra polimer cinsinin ve hazırlama yöntemlerinin formülasyonu nasıl etkilediğinin incelenmesine olanak sağlamaktadır. Bu kapsamda LPHNP formülasyonlarının hazırlanmasında en yaygın kullanılan iki yöntem a) emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi, b) nanoçöktürme yöntemi kullanılmıştır. **Emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yönteminde** etkin maddenin hidrofobik yapısı göz önünde bulundurularak Yağ/Su (Y/S) tipi emülsiyon oluşturulması ve sonrasında organik fazın ortamdaki uzaklaştırılmasıyla nanosüspansiyon elde edilirken **nanoçöktürme yönteminde** polimerin suyla karışabilen bir organik çözücüde çözündürülmesinin ardından iki fazın karıştırılması sonucu çözünmüş materyalin nanoboyutta çökmesiyle nanopartiküller elde edilmiştir (124, 135, 154). Tez çalışması kapsamında; LPHNP'ler farklı iki

polimer (PLGA ve PCL) ile ayrı ayrı iki hazırlama yöntemi (emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi ve nanoçöktürme) ile üç faktörlü Box-Behnken deney tasarımı kullanarak hazırlanmıştır.

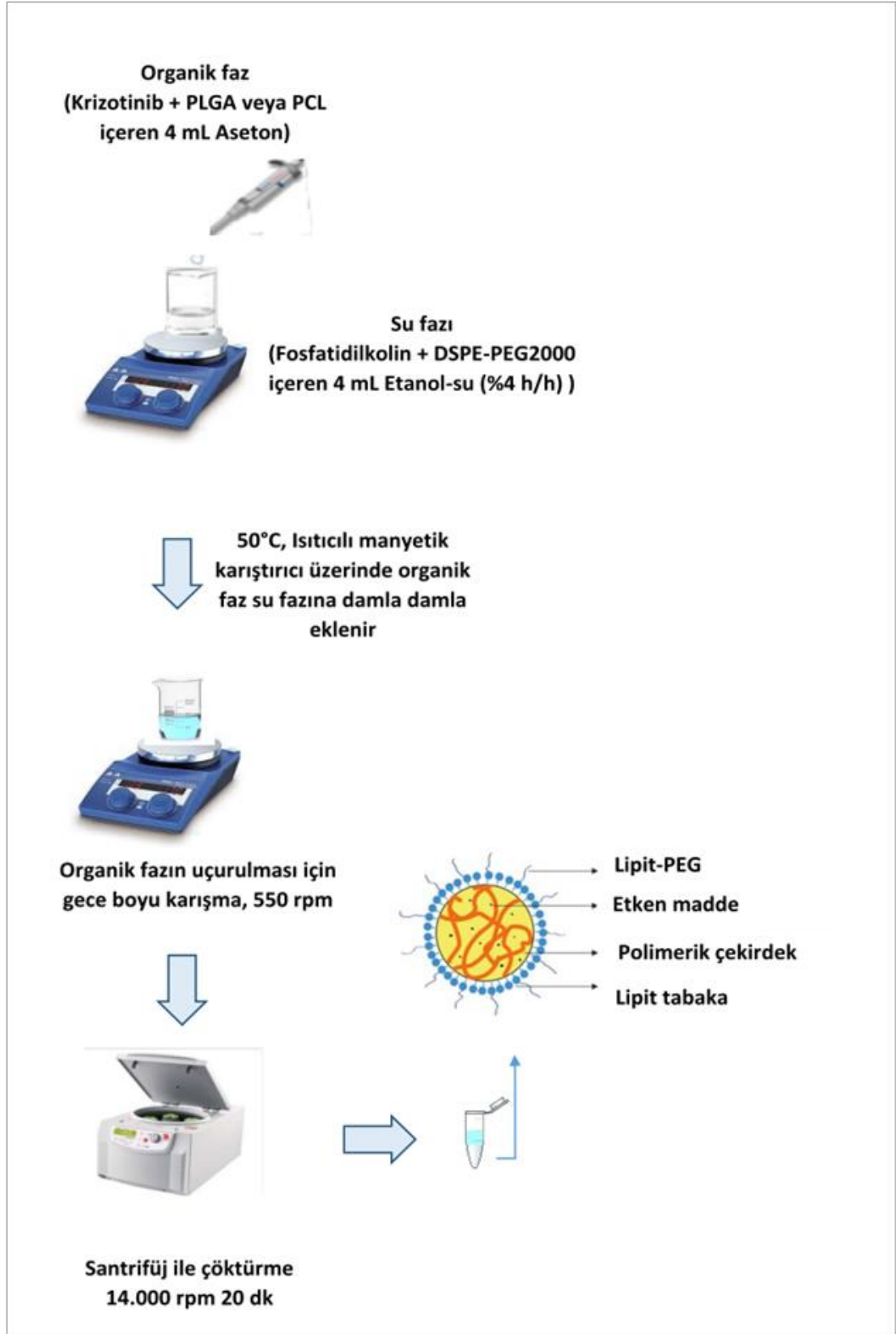
3.2.2 Lipit-polimer Hibrit Nanopartiküllerin Hazırlanması

Lipit-polimer hibrit nanopartiküllerin çekirdek kısmını hazırlamak için FDA tarafından onaylanmış biyouyumlu, biyoparçalanır ve toksik olmayan PLGA ve PCL polimerleri, lipit tabakası için soya fosfatidilkolin ve nanopartiküler sistemin uzun süre dolaşımında kalabilmesi, hedef hücrede birikimini sağlamak ve yüzey modifikasyonu ile stabilitesini arttırmak için 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyethylene glycol)-2000] (DSPE-PEG 2000) kullanılmıştır (28, 123).

Emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yönteminde organik faz olarak 4 mL diklorometan içerisinde ayrı ayrı olarak 10 mg, 15 mg ve 20 mg polimer (PLGA veya PCL); su fazı olarak 4 mL etanol-su (%4 h/h) içerisinde 1.5 mg, 2.25 mg ve 3 mg lipit (soya fosfatidilkolin) ve lipitin %25'i kadar olacak şekilde hazırlanmış stok çözeltisi içerisinden 0.4 mg, 0.6 mg ve 0.8 mg DSPE-PEG 2000'in çözünmesi sağlanmıştır. Organik fazın sulu faz ile homojen dağılması için ultrasonikasyon uygulanmış; oluşan emülsiyon gece boyunca 550 rpm de manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılarak organik faz uzaklaştırılmıştır ve takiben 14.000 rpm'de 20 dk santrifüj ile partiküller elde edilmiştir. Hazırlama işlemi üç kez tekrarlanmıştır. Şekil 3.1.'de emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi ile nanopartiküllerin hazırlanması şematize edilmiştir. **Nanoçöktürme yönteminde** emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi ile aynı şekilde ve miktarlarda hazırlanan organik (organik faz olarak aseton kullanılmıştır) ve sulu fazın; karıştırıcı üzerinde sabit bir hızda organik fazın su fazı üzerinde eklenmesi ve organik fazın uçurulmasını takiben 14.000 rpm'de 20 dk santrifüj ile partiküller elde edilmiştir. Hazırlama işlemi üç kez tekrarlanmıştır. Şekil 3.2.'de nanoçöktürme yöntemi ile nanopartiküllerin hazırlanması şematize edilmiştir.



Şekil 3.1. Emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi ile LPHNP hazırlanması.



Şekil 3. 2. Nanoçöktürme yöntemi ile LPHNP hazırlanması.

3.2.3 Krizotinib yüklü Lipit-Polimer Hibrit Nanopartiküllerin Hazırlanması

Ön formülasyon çalışmaları sonucunda belirlenen optimum formülasyon değişkenleri kullanılarak dört farklı krizotinib yüklü LPHNP formülasyonları hazırlanmıştır. Tablo 3.3.'de kullanılan polimer tipi ve hazırlama yöntemine göre optimum LPHNP formülasyonları gösterilmiştir.

Tablo 3.3. Optimum LPHNP formülasyonlarında kullanılan polimer tipleri hazırlama yöntemleri.

| | Polimer Tipi | Hazırlama Yöntemi |
|----------------------|---------------------|--|
| Formülasyon 1 | PLGA | Nanoçöktürme |
| Formülasyon 2 | PCL | Nanoçöktürme |
| Formülasyon 3 | PLGA | Emülsiyon Oluşturma-Çözücü Buharlaştırma |
| Formülasyon 4 | PCL | Emülsiyon Oluşturma-Çözücü Buharlaştırma |

Box-Benhken deney tasarımı ile her bir formülasyon için polimer, lipit ve DSPE-PEG 2000 miktarları belirlenmiştir. Tablo 3.4.'de deney tasarımı ile iki farklı hazırlama yöntemi ve iki farklı polimer ile hazırlanan optimum formülasyonların bağımsız değişken miktarları verilmiştir.

Tablo 3.4. Box-Benhken deney tasarımı ile hazırlanan optimum LPHNP formülasyonlarının bağımsız değişken miktarları.

| Polimer Tipi/Hazırlama Yöntemi | Polimer Miktarı (mg)* | Lipit Miktarı (mg)* | DSPE-PEG 2000 Miktarı (mg)* |
|---------------------------------------|------------------------------|----------------------------|------------------------------------|
| Formülasyon 1 | 12 | 1.5 | 0.7 |
| Formülasyon 2 | 10 | 1.5 | 0.6 |
| Formülasyon 3 | 17 | 1.5 | 0.6 |
| Formülasyon 4 | 14 | 1.6 | 0.8 |

* Ön formülasyon çalışmaları sonucunda elde edilen optimum formülasyonlara ait değişken miktarları

PLGA polimeri kullanılarak emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan LPHNP formülasyonlarında 17 mg polimer ve polimerin % 5'i olacak şekilde krizotinib diklorometan içerisinde çözündürülmüştür. 1.5 mg lipid ve 0.6 mg DSPE-PEG 2000 cam flakonda 4 mL etanol-su (%4 h/h) içerisinde ultrasonik banyoda ısı yardımıyla çözündürülmüştür. Daha sonra organik faz (polimer ve krizotinib maddelerini içeren dikolorometan), sulu fazın (lipitleri içeren etanol-su çözeltisi) üzerine eklenip ultrasonik homojenizatörde, buz banyosu içerisinde 90 saniye karıştırılarak Y/S tipi emülsiyon hazırlanmıştır. Organik çözücü, manyetik karıştırıcıda 550 rpm'de gece boyu karıştırma ile uçurulup; nanopartiküller soğutuculu santrifüjde 14.000 rpm'de ve 18°C'de, 20 dakika santrifüj ile çöktürüldükten sonra elde edilmiştir. PCL polimeri kullanılarak emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yönteminde PCL polimeri 14 mg, lipid 1.6 mg ve DSPE-PEG 2000 0.8 mg olacak şekilde PLGA polimeri kullanılarak emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi ile birebir aynı şekilde gerçekleştirilirken polimer olarak PLGA yerine PCL kullanılmıştır.

PLGA polimeri kullanılarak nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanan LPHNP formülasyonlarında 12 mg polimer ve polimerin %5'i krizotinib aseton içerisinde çözündürülmüştür. 1.5 mg lipid ve 0.6 mg DSPE-PEG 2000 cam flakonda 4 mL etanol-su (%4 v/v) içerisinde ultrasonik banyoda ısı yardımıyla çözündürülmüştür. Daha sonra organik faz (polimer ve krizotinib maddelerini içeren aseton), sulu fazın (lipitleri içeren etanol-su çözeltisi) üzerine 500 rpm karıştırıcı üzerinde eklenmiştir. Emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yönteminde olduğu gibi organik çözücü, manyetik karıştırıcıda 18-24 saat karıştırma ile uçurulup; nanopartiküller soğutuculu santrifüjde 14.000 rpm'de ve 18°C'de, 20 dakika santrifüj ile çöktürüldükten sonra elde edilmiştir. PCL polimeri kullanılarak nanoçöktürme yöntemi ile nanopartikül elde ederken 10 mg PCL polimeri, 5 mg lipid ve 0.6 mg DSPE-PEG 2000 kullanılmış partiküller PLGA polimeri kullanılarak nanoçöktürme yöntemi ile aynı şekilde hazırlanmıştır.

3.2.4 Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Krizotinibin Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu

Nanopartiküllerdeki krizotinib miktar tayini için, UV dedektörlü HPLC kullanılmıştır (155). Tablo 3.5.'de verilen analiz koşulları literatür çalışmalarının

modifiye edilmesiyle belirlenmiştir (155-157). HPLC yöntemi ile krizotinib miktar tayini çalışmaları etken maddenin enkapsülasyon etkinliği, *in vitro* salım çalışmalarında kullanılmıştır. Mobil faz bileşimi optimize edilerek kromatografik ayırım şartları belirlenmiştir. Ayırım C18 kolonda (250 x 4.6 mm, 5 µm) gerçekleştirilmiştir. Kolon sıcaklığı 24°C ve akış hızı 1.0 mL/dk olarak ayarlanmıştır. Mobil faz olarak metanol: %0.1 ortofosforik asit (50:50 h/h) kullanılmıştır. Enjeksiyon hacmi 20 µL olarak ayarlanmış ve UV dedektör ile tespit 264 nm'de gerçekleştirilmiştir

Tablo 3.5. HPLC ile miktar tayini analizindeki analiz koşulları.

| | |
|------------------------------|---|
| HPLC Cihazı | Dionex, Germany |
| Mobil Faz | Metanol: %0.1 ortofosforik asit (50:50 h/h) |
| Enjeksiyon Hacmi | 20 µL |
| Akış Hızı | 1 mL/dakika |
| Kolon | C ₁₈ (250x4,6 mm; Por büyüklüğü: 5 µm) |
| Kolon Sıcaklığı | 24 ± 0.5 °C |
| Dalga Boyu | 264 nm |
| Dedektör | UV |
| Analiz Türü | İzokratik (Sabit mobil faz) |
| Konsantrasyon Aralığı | 0.001 – 1 mg/mL |

“*International Conference On Harmonisation (ICH) Q2(R1) Kılavuzu*”na göre krizotinib için geliştirilen HPLC yöntemi, aşağıdaki parametrelerin ölçülmesi/hesaplanması ve değerlendirilmesiyle valide edilmiştir.

- ✓ Doğrusallık
- ✓ Doğruluk
- ✓ Kesinlik
- ✓ Seçicilik
- ✓ Duyarlılık

Doğrusallık

Belirli ölçüm aralığında elde edilen yanıtlar ile numunedeki analit konsantrasyonunun doğru orantılı olması, analitik yöntemde doğrusallığın göstergesidir. Tez çalışmamız kapsamında doğrusallık parametresi için olarak metanol: %0.1 ortofosforik asit (50:50 h/h) içerisinde krizotinibin (2 mg/ml (a/h)) stok çözeltileri hazırlanmıştır. Takiben stok çözeltilerden uygun seyreltmeler yapılarak 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 0.005, 0.001 mg/mL olan standart çözeltiler hazırlanmıştır. Standart çözeltilerin konsantrasyonlarına karşı belirlenen pik alanları arasında regresyon analizi yapılarak kalibrasyon doğrusu çizilmiş ve kalibrasyon denklemi elde edilmiştir. Sonuçlar üç tekrarlı ölçümler ile belirlenmiştir.

Doğruluk

Analitik yöntemin doğruluğu, yöntemle ölçülen değerlerin gerçek veya referans değere ne kadar yakın olduğunu göstermektedir. Kalibrasyon eğrisi üzerinde üç farklı konsantrasyon (1, 0.05, 0.001 mg/mL) için ayrı seri standartlar hazırlanmış ve bu standartların ölçümleri yapılarak doğruluk parametresi değerlendirilmiştir.

Kesinlik

Analitik yöntemin kesinliği, yöntem sırasında birbirini takip eden ölçümler arasındaki yakınlık derecesini ifade eder. Yöntemin kesinliğini belirlemek için deney içi/deneyler arası kesinlik çalışmaları yapılmaktadır. Deney içi kesinlik çalışmasında, aynı laboratuvar ve cihazlar kullanılarak gün içinde 3 farklı zaman noktasında standart çözeltiler (1, 0.05, 0.001 mg/mL) ile çalışmalar gerçekleştirilirken deneyler arası kesinlik çalışmasında, birbirini takip eden üç günde her konsantrasyon arka arkaya 3 tekrarlı olacak şekilde çalışılmaktadır. Deneyler ile elde edilen sonuçların standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplanarak parametre değerlendirilmektedir.

Seçicilik

Analitik yöntemin seçiciliği, kullanılan analiz yönteminin ortamda diğer bileşenler varlığında sadece analiz edilmesi istenen maddeyi saptama yeteneğidir. Seçicilik parametresi için LPHNP'lerin hazırlanmasında kullanılan maddelerin (polimer, lipit vb.) çözeltilerinin analizi yapılmıştır.

Duyarlılık

Analitik yöntemin duyarlılığı, analitik yöntemin saptayabileceği en küçük konsantrasyon değerleridir, saptayabilme sınırı (LOD) ve kantitatif olarak tayin edilebileceği en küçük konsantrasyon değeri (LOQ) olarak ifade edilmektedir. LOD değeri için kabul edilen sinyal/gürültü oranı 3 iken LOQ için 10'dur.

3.2.5 Nanopartiküllerin Partikül Büyüklüğü Dağılımının Belirlenmesi ve Zeta Potansiyel Tayini

Tez kapsamında hazırlanan etken madde içermeyen ve etkin madde yüklü LPHNP formülasyonlarının partikül büyüklüğü (nm), PDI ve zeta potansiyel (mV) değerleri “Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Birleşik Krallık)” ile tayin edilmiştir (25°C ölçüm sıcaklığı, 90° ışık saçılım açısı, deiyonize su dispersiyon ortamı, DTS1070 küvet) (108). LPHNP formülasyonlarının partikül büyüklüğü dağılımı ve PDI tayininde dinamik ışık saçılımından (DLS); zeta potansiyel tayininde lazer doppler elektroforezden yararlanılmıştır. Dinamik ışık saçılımında temel prensip, partiküllerin sıvı ortam içerisinde Brownian hareketi yapmasına bağlı olarak saçılan ışık şiddetindeki dalgalanmaları ölçümüdür. Lazer doppler elektroforez yönteminin temel prensibi ise değişken bir elektriksel alan altında sıvı ortam içindeki nanopartiküllerin yüklerine bağlı olarak gönderilen lazerin saçılımındaki frekans değişimlerinin ölçümüdür. LPHNP formülasyonlarına ait ölçümler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.6. Morfolojik Değerlendirme

Optimum LPHNP formülasyonlarının partikül büyüklüğü ve yüzey yapılarının karakterizasyonunda Transmisyon Elektron Mikroskopi (TEM) kullanılmıştır. Nanopartikül formülasyonlarının ultra saf su içindeki dispersiyonları, Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarı (ODTÜ MERLAB) bünyesinde dispersiyonun bir damlası (10 µL) karbon film kaplı bakır ızgara üzerine damlatılarak ve atmosfer koşullarında kuruması sağlandıktan sonra TEM cihazında (FEI Tecnai G2 Spirit BioTwin, FEI, ABD) partiküllerin görüntülemesi gerçekleştirilmiştir.

3.2.7. İlaç Yükleme Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Tez kapsamında LPHNP formülasyonlara yüklenen krizotinibin miktarının belirlenmesi amacıyla ilaç yükleme etkinliği çalışmaları yürütülmüştür. İlaç yükleme etkinliği HPLC metodundan yararlanılarak dolaylı (indirekt) yöntemle tayin edilmiştir. Krizotinib yüklü LPHNP formülasyonları Bölüm 3.2.2’de anlatıldığı şekilde hazırlandıktan sonra 14.000 rpm’de 20 dakika santrifüj ile çöktürülmüş, elde edilen süpernatandan nanopartiküllere enkapsüle olmayan krizotinibin miktar tayini HPLC metodu ile gerçekleştirilmiştir. Nanopartikül formülasyonlarının enkapsülasyon etkinliği Formül 3.2. kullanılarak hesaplanmıştır.

$$(\%)EE = \frac{(\text{Eklenen krizotinib miktarı}) - (\text{Süpernatandaki krizotinib miktarı})}{(\text{Formülasyona eklenen krizotinib miktarı})} \times 100 \quad (3.2.)$$

3.2.8. *In Vitro* Salım Çalışmaları

Krizotinib içeren LPHNP formülasyonlarının *in vitro* ortamda salım profilinin belirlenmesinde tüp yöntemi kullanılmıştır (158, 159). *In vitro* salım çalışmalarında salım ortamının sıcaklığının $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$ ’de sabit tutulduğu ısıtıcı ve yatay çalkalayıcı su banyosu kullanılmıştır. Salım ortamı olarak fizyolojik pH’yı temsil etmek amacıyla PBS (pH7.4) tamponundan yararlanılmış ve 96 saat boyunca salım deneyleri gerçekleştirilmiştir. Salım çalışmasında belirlenen zaman noktalarında (1, 2, 4, 8, 12, 24,48,72 ve 96. saat) salım ortamından 1 mL numune alınmış ve ortama 1 mL taze salım ortamı eklemiştir. Toplanan salım numunelerinin, santrifüj ile çöktürülmesinin (14.000 rpm ve 4°C ’de, 20 dakika) ardından süpernatandaki salınan krizotinib için valide edilmiş olan HPLC yöntemi ile krizotinib miktarları tayin edilmiştir.

3.2.9. Lipit-Polimer Hibrit Nanopartiküllerin Stabilite Çalışmaları

Ön formülasyon çalışmaları sonrasında belirlenen krizotinib yüklü LPHNP formülasyonlarıyla *in vitro* stabilite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. ICH (Q1C) Stabilite kılavuzu doğrultusunda PLGA ve PCL polimerleri ile hazırlanmış optimum formülasyonlar sulu dispersiyon halinde $-18^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}/60\% \text{RH} \pm 5\% \text{RH}$, $4^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ve $40^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}/75\% \text{RH} \pm 5\% \text{RH}$ ortamlarında 6 ay bekletilerek stabilite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Farklı koşullarda saklanan formülasyonların partikül büyüklüğü, PDI değeri ve zeta potansiyel değerleri ölçülmüştür. Stabilite

çalışmalarında kullanılan formülasyonların partikül büyüklüğü, PDI değerleri ve zeta potansiyel değerleri “Malvern Zetasizer Nano ZS” cihazı ile başlangıç (0. gün), 1., 2., 3., 6. aylarda tayin edilmiştir.

3.2.10. Hücre Kültürü Çalışmaları

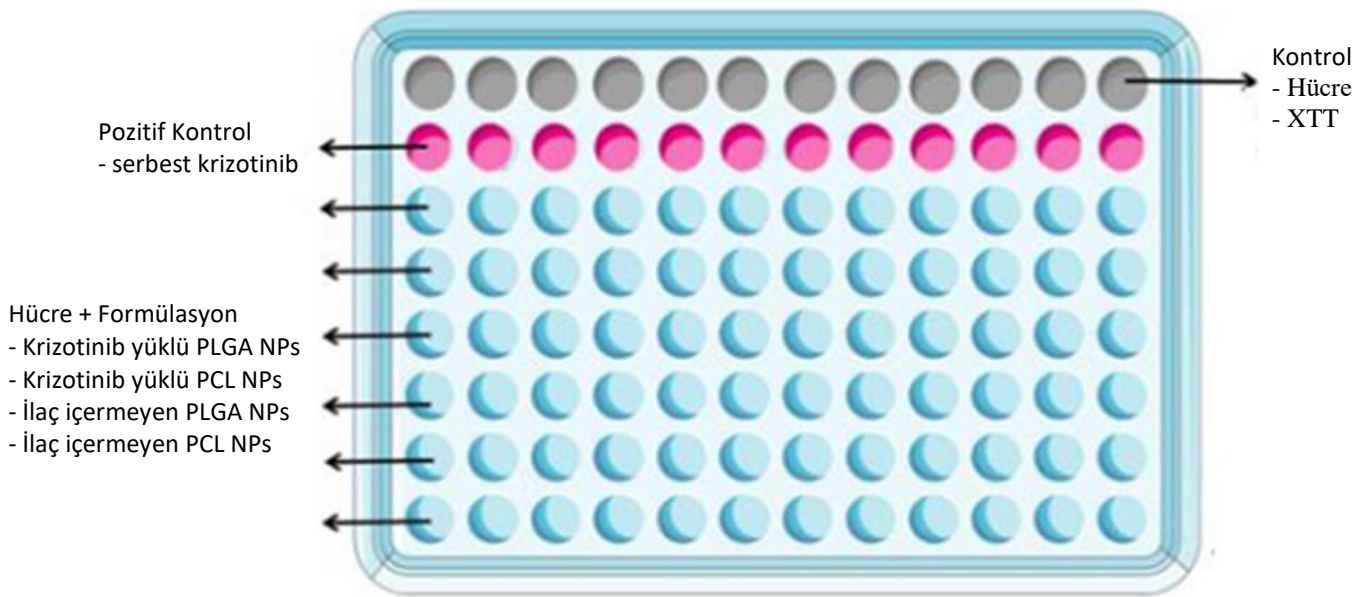
Hücre kültürü çalışmalarında kullanılmak üzere insan adenokarsinom hücresi olan NCI-H2228 (EML4-ALK füzyon akciğer adenokarsinom) hücre hattı temin edilmiştir (160-162). Hücrelerin çoğaltılmasında antibiyotiklerle desteklenen (100 U/ml penisillin, 100 U/ml streptomisin), %10 oranında fetal bovin serum (FBS) içeren RPMI besiyeri kullanılmış, 37°C’de, %5 CO₂ içeren nemli atmosferli ortamda hücreler inkübe edilmiştir. Hücreler üç günde bir (belirli yoğunluğa ulaştığı (%75-80) süre) pasajlanmıştır. Bunun için, inkübatörden çıkarılan hücreler öncelikle mikroskop altında incelenmiştir, takiben kabin altına getirilerek eski besiyeri uzaklaştırılıp PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Hücreler 2-3 ml %0.25 Trypsin-EDTA ile muamele edilip inkübatörde 1-2 dakika bekletilerek yüzeyden kalkmaları sağlanmıştır. Yüzeyden kalkan hücrelerin üzerine serumlu besiyeri ilave edilerek santrifüj tüpüne alınmış ve santrifüj edilmiştir (250 x g, 5 dakika), süpernatant atılıp taze besiyerinde resüspande edilen hücreler yeni kültür kaplarına eşit olarak dağıtılmış ve yeniden mikroskopta incelendikten sonra deneylerde kullanılmak üzere inkübatöre kaldırılmıştır (160-162).

3.2.11 Hücre Canlılık Analizi

NCI-H2228 (EML4-ALK füzyon akciğer adenokarsinom) hücreleri üzerinde etkili krizotinib dozunun (IC₅₀) saptanabilmesi için kantitatif ve kolorimetrik bir yöntem olan XTT ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromür]) yöntemi kullanılmıştır (142, 163). XTT testi ile hücrelerin % canlılık oranları tayin edilerek IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. IC₅₀ değeri, canlılığın %50 oranında inhibe edilmesi için gereken dozu ifade etmektedir. XTT yönteminde, canlı hücreler sarı renkli tetrazolyumu, mor renkli formazan kristallerine dönüştürmektedir. Oluşan renge ait absorbans ölçümü, spektrofotometrik olarak gerçekleştirilmektedir.

Tez kapsamında, 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarının her bir kuyucuğuna yaklaşık 4×10^4 - 6×10^4 hücre %10 FBS içeren RPMI ortamı içinde ekilmiş ve

hücreler 24 saat inkübe edilmiştir. Nanopartikül formülasyonları (Krizotinib yüklü ve ilaç içermeyen) ve pozitif kontrol olarak krizotinib literatür taraması sonucu belirlenen çeşitli konsantrasyonlarda hücre kültürü ortamı dilüe edilmiş ve hücreler hazırlanan çözeltiler ile 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında kuyucuk başına XTT çözeltilisinden 50 μ L eklenip 4 saat inkübasyonun ardından absorbanslar 450 nm'de mikropılaka okuyucuda okunmuş ve kontrol grubunun absorbansı ile karşılaştırılarak % hücre canlılığı hesaplanmıştır. Şekil 3.3.'de şematize edilen XTT deneyi altı tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3. 3. XTT deneyinin şematik gösterimi.

3.2.12. Krizotinib Yüklü Lipit-Polimer Hibrit Nanopartiküllerinin Gen ve Protein Düzeyinde İnhibitör Etkilerinin Değerlendirilmesi

RT-PCR Analizi

EML4-ALK geninin alt (downstream) yolağındaki RAS, RAF, MEK, ERK genlerinin ekspresyon düzeylerinin değerlendirilebilmesinde RT-PCR kullanılmıştır (162, 164). PCR analizinin esası RNA'dan tamamlayıcı DNA sentezi (geri transkripsiyon) sentezlenmesi ve devamında tamamlayıcı DNA'nın çoğaltılmasına dayanmaktadır (165). Bu kapsamda RT-PCR analizinde hücreler 6 kuyucuklu

plakalara tam besiyeri içinde yaklaşık 3×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir ve hücreler tam doluluğu ulaştıktan sonra seçilen nanopartikül formülasyonları ve etkin madde uygulanmış ve 48 saat 37°C 'de inkübe edilmiştir. Uygulama işleminin ardından, üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda ekstraksiyon kiti ile hücrelerden total RNA izole edilmiştir. Komplementer DNA (cDNA), RNA'dan ters transkriptaz kiti kullanılarak sentezlenmiş, bu işlem kit üretici firma yönergeleri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Negatif kontroller aracılığıyla örneklerde kontaminasyon olmadığı doğrulanmıştır. RT-PCR analizi, "ViiA 7 Real-Time PCR (Applied Biosystems)" sistemi ile SYBR Green PCR Master Mix ve 96 kuyucuklu plaklar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda amplifikasyon reaksiyonu hazırlanmıştır. Her deneyde çalışılan genin değeri, iç kontrol genin (housekeeping gene; GAPDH kullanılmıştır) değerine oranlanıp normalize edilmiştir (147, 165, 166). Kullanılan primer çiftlerinin sekansları Tablo 3.6.'da gösterilmiştir.

Tablo 3.6. RT-PCR deneylerinde yararlanılan primer dizileri.

| Gen | Sekans (5'→3') | Tm |
|--------------|---------------------------------|-----------|
| KRAS | F: AGCTGTATCGTCAAGGCACT | 59.1 |
| | R:AGGTACTGGTGGAGTATTTGATA GT | 58.8 |
| RAF | F: CTCTCCTACAATAGTTCAG | 48.86 |
| | R: TTCCATTTTCGCACATTGAC | 54.30 |
| MEK | F:GGTGTTC AAGGTCTCCCACAAG | 66.8 |
| | R:CCACGATGTACGGAGAGTTGCA | 69.3 |
| ERK | F: ACACCAACCTCTCGTACATCGG | 67.2 |
| | R:TGGCAGTAGGTCTGGTGCTCAA | 69.1 |
| GAPDH | F:GCATCTTCTTGTGCAGTGCC | 60.11 |
| | R:TACGGCCAAATCCGTTTACA | 59.96 |

F: İleri primerin sekansı, R: Revers primerin sekansı, Tm: erime sıcaklığı

Enzime Bağlı İmmünosorbent (ELISA) Deneyi

Hücrelere formülasyonların uygulanması sonrasında K-RAS, RAF, MEK, ERK proteinlerinin ekspresyon düzeylerinin tayini için ELISA yöntemi kullanılmıştır (167-169). Hücreler 6 kuyucuklu plakalara tam besiyeri içinde yaklaşık 3×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir. Hücrelere seçilen nanopartikül formülasyonları ve etkin madde uygulanmış; 48 saat 37°C 'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminin ardından, hücreler kit yönergesine uygun olarak toplanmış protein düzeyindeki ekspresyonlarının değişmesi ya da sabit kalması beklenen proteinlerin miktar tayinleri ELISA kitleri (KRAS ELISA Kiti, MEK Kinase ELISA Kiti, ERK Kinase ELISA Kiti,RAF Kinase ELISA Kiti) ile yapılmıştır ve ölçümler kullanılacak kitlerin üretici protokollerine uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.13. İstatistiksel Analiz

Projede elde edilen formülasyonların *in vitro* karakterizasyonunda: partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel sonuçlarının değerlendirilmesinde ve istatistiksel analizinde Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ve student t-test kullanılmıştır. *in vitro* deneylerde sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak sunulmuştur. “ $p < 0.05$ ” değeri istatistiksel açıdan anlamlı kabul edilmiştir.

4.BULGULAR

4.1.Lipit-Polimer Hibrit Nanopartiküllerin Optimizasyonu: Box-Behnken Deney tasarımı

Box-Behnken deney tasarımı ile belirlenen formülasyonlar ile hazırlanan ilaç yüklü olmayan nanopartikül formülasyonlarında bağımsız değişkenlerin (X_1 : Polimer miktarı (mg), X_2 : Lipit miktarı (mg), X_3 : DSPE-PEG miktarı (mg)) cevap değişkenleri (partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değerleri) üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Formülasyon 1' e ait partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değerleri Tablo 4.1.'de gösterilmektedir.

Tablo 4.1. PLGA ile nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanan ilaç yüklü olmayan LPHNP'lere ait partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değerleri.

| | Partikül Büyüklüğü (nm) | PDI | Zeta Potansiyel (mV) |
|----------------|------------------------------------|-------------|---------------------------------|
| Formülasyon 1 | 135.6±1.054 | 0.137±0.011 | -28.7±1.65 |
| Formülasyon 2 | 149.9±1.845 | 0.283±0.012 | -25.7±0.15 |
| Formülasyon 3 | 141.6±0.404 | 0.180±0.018 | -27.5±0.64 |
| Formülasyon 4 | 159.4±2.424 | 0.341±0.023 | -17.5±0.20 |
| Formülasyon 5 | 141.6±1.209 | 0.126±0.013 | -21.9±0.51 |
| Formülasyon 6 | 148.1±0.984 | 0.097±0.007 | -32±0.95 |
| Formülasyon 7 | 144.5±2.157 | 0.141±0.016 | -27.1±0.51 |
| Formülasyon 8 | 153.5±0.585 | 0.116±0.018 | -23.4±1.01 |
| Formülasyon 9 | 151.5±0.650 | 0.112±0.022 | -25.8±0.379 |
| Formülasyon 10 | 237.1±2.015 | 0.222±0.010 | -9.35±0.482 |
| Formülasyon 11 | 153.1±1.039 | 0.207±0.003 | -19.1±0.781 |
| Formülasyon 12 | 149.2±0.964 | 0.110±0.013 | -26.8±0.35 |
| Formülasyon 13 | 145.3±1.079 | 0.121±0.07 | -25.5±0.70 |
| Formülasyon 14 | 179.5±1.626 | 0.138±0.014 | -26±0.265 |
| Formülasyon 15 | 167.9±3.134 | 0.166±0.008 | -20.6±0.850 |

*($n=3$, ortalama±SS)

Box-Behnken deney tasarımında PLGA ile nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanan ilaç yüklü olmayan LPHNP'lere ait polimer miktarı, lipit miktarı ve DSPE-PEG 2000 miktarı bağımsız değişkenlerine karşı partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel cevap olarak kullanıldığında elde edilen istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.2.-Tablo 4.4.'de verilmiştir.

Tablo 4.2. Box-Behnken deney tasarımının partikül büyüklüğü cevabı için ANOVA sonuçları.

| | Y ₁ | | | | |
|-----------------------------------|---------------------|------------------------------|------------------|---------|---------|
| | Serbestlik Derecesi | Kareler Toplamı | Ortalama Kareler | F-Value | p Value |
| Model | 9 | 1798.35 | 199.816 | 4.79 | 0.050 |
| X₁ | 1 | 383.64 | 383.645 | 9.20 | 0.029 |
| X₂ | 1 | 766.36 | 766.361 | 18.38 | 0.008 |
| X₃ | 1 | 21.45 | 21.451 | 0.51 | 0.050 |
| X₁X₂ | 1 | 6.50 | 6.502 | 0.16 | 0.709 |
| X₁X₃ | 1 | 451.56 | 451.562 | 10.83 | 0.022 |
| X₂X₃ | 1 | 166.41 | 166.410 | 3.99 | 0.102 |
| X₁² | 1 | 0.04 | 0.037 | 0.00 | 0.977 |
| X₂² | 1 | 0.52 | 0.519 | 0.01 | 0.915 |
| X₃² | 1 | 1.68 | 1.682 | 0.04 | 0.849 |
| | | <i>R</i> ² =0.989 | | | |

Partikül büyüklüğünü tahmin etmek için oluşturulan ikinci dereceden polinom model aşağıda verilmiştir.

$$Y_1 = 126,4 - 4,11X_1 + 47X_2 - 75X_3 - 0,004X_1^2 - 0,67X_2^2 + 16,9 X_3^2 - 0,34X_1X_2 + 10,62X_1X_3 - 43X_2X_3$$

Tablo 4.3. Box-Behnken deney tasarımının PDI cevabı için ANOVA sonuçları.

| | Y ₂ | | | | |
|-----------------------------------|---------------------|------------------------------|------------------|---------|---------|
| | Serbestlik Derecesi | Kareler Toplamı | Ortalama Kareler | F-Value | p Value |
| Model | 9 | 0.0643 | 0.0071 | 15.45 | 0.004 |
| X₁ | 1 | 0.0206 | 0.0206 | 44.53 | 0.001 |
| X₂ | 1 | 0.0218 | 0.0218 | 47.20 | 0.001 |
| X₃ | 1 | 0.0008 | 0.0008 | 1.82 | 0.036 |
| X₁X₂ | 1 | 0.0054 | 0.0054 | 11.83 | 0.018 |
| X₁X₃ | 1 | 0.0036 | 0.0036 | 7.78 | 0.038 |
| X₂X₃ | 1 | 0.0009 | 0.0009 | 2.08 | 0.209 |
| X₁² | 1 | 0.0096 | 0.0096 | 20.76 | 0.006 |
| X₂² | 1 | 0.0017 | 0.0017 | 3.69 | 0.113 |
| X₃² | 1 | 0.0006 | 0.0006 | 1.45 | 0.282 |
| | | <i>R</i> ² =0.965 | | | |

PDI değrini tahmin etmek için oluşturulan ikinci dereceden polinom model aşağıda verilmiştir.

$$Y_2 = 0,993 - 0,0672X_1 - 0,016X_2 - 1,139X_3 + 0,00204X_1^2 + 0,038X_2^2 + 0,337X_3^2 - 0,00987 X_1X_2 + 0,03X_1X_3 + 0,1033X_2X_3$$

Tablo 4.4. Box-Behnken deney tasarımının zeta potansiyel cevabı için ANOVA sonuçları.

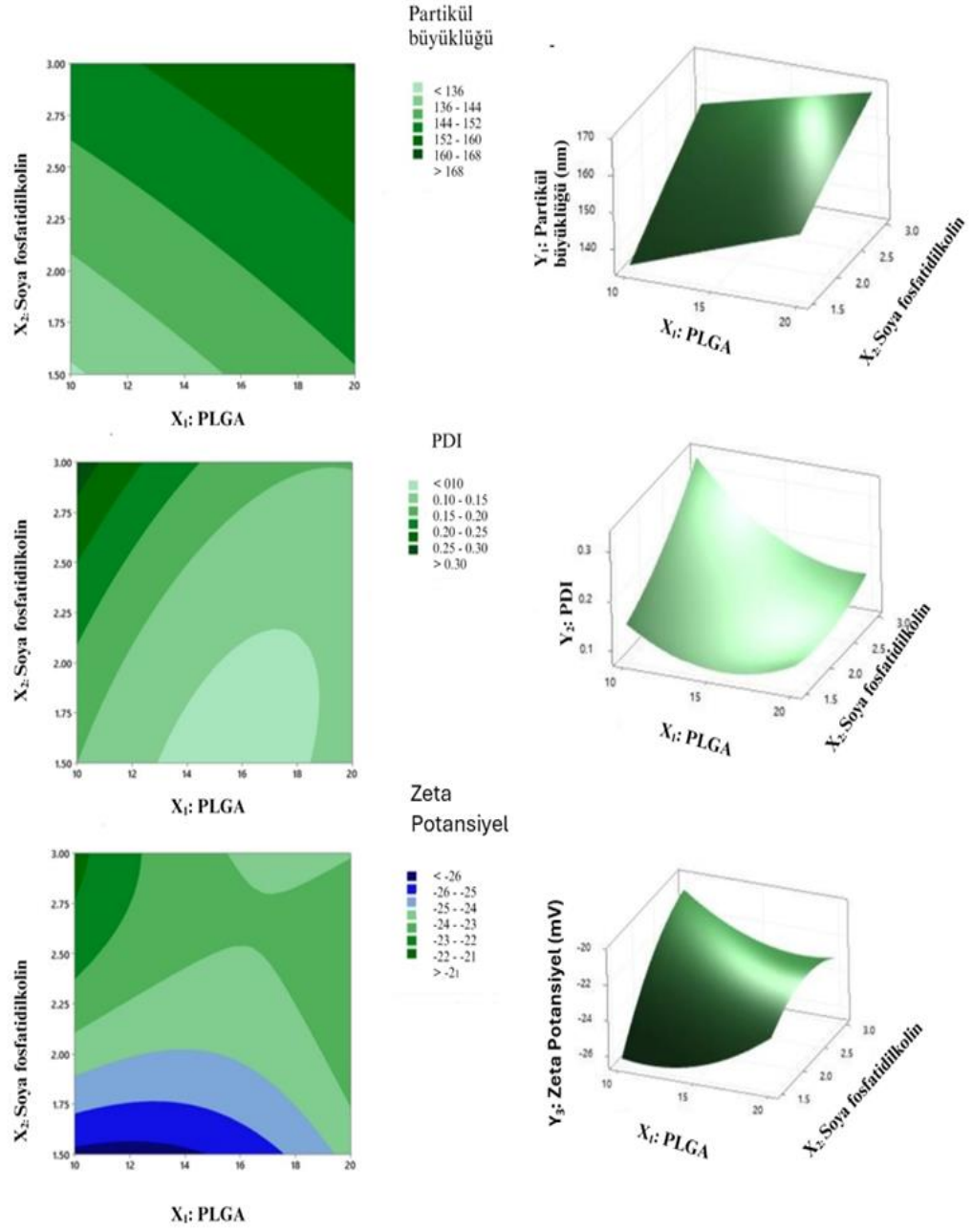
| | Y ₃ | | | | |
|-----------------------------------|---------------------|-----------------------|------------------|---------|---------|
| | Serbestlik Derecesi | Kareler Toplamı | Ortalama Kareler | F-Value | p Value |
| Model | 9 | 335.452 | 37.272 | 2.18 | 0.202 |
| X₁ | 1 | 0.031 | 0.031 | 0.00 | 0.968 |
| X₂ | 1 | 18.911 | 18.911 | 1.11 | 0.341 |
| X₃ | 1 | 8.820 | 8.820 | 0.52 | 0.505 |
| X₁X₂ | 1 | 6.250 | 6.250 | 0.37 | 0.572 |
| X₁X₃ | 1 | 0.423 | 0.423 | 0.02 | 0.881 |
| X₂X₃ | 1 | 238.702 | 238.702 | 13.97 | 0.013 |
| X₁² | 1 | 3.879 | 3.879 | 0.23 | 0.654 |
| X₂² | 1 | 3.879 | 3.879 | 0.23 | 0.654 |
| X₃² | 1 | 53.317 | 53.317 | 3.12 | 0.138 |
| | | R ² =0.897 | | | |

Zeta potansiyel değerinin tahmini amacıyla kurulan ikinci dereceden polinomial model aşağıda sunulmuştur.

$$Y_3 = -4,4 - 0,66X_1 - 15,6X_2 - 1,5X_3 + 0,0410X_1^2 - 1,82X_2^2 - 95X_3^2 - 0,333X_1X_2 + 0,33X_1X_3 + 51,5X_2X_3$$

Deney tasarımında bağımsız değişkenlerin cevaplara uyumu (model uyumu) R² değerleri ile değerlendirilmiştir. PLGA polimeriyle nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanan ilaç yüklü olmayan LPHNP formülasyonlarının partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değeri için R² değeri sırasıyla 0.989, 0.965 ve 0.897 olarak bulunmuştur.

PLGA polimeriyle nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanan LPHNP formülasyonlarının, lipit miktarı ve polimer miktarının partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değeri üzerindeki etkisini gösteren kontur ve yüzey-cevap grafikleri Şekil 4.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. PLGA polimeriyle nanoçöktürme yöntemi hazırlanan LPHNP formülasyonlarının kontur ve yüzey cevap grafikleri.

Formülasyon 2'ye ait partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değerleri Tablo 4.5.'de gösterilmektedir.

Tablo 4.5. PCL ile nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanan ilaç yüklü olmayan LPHNP'lere ait partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değerleri (n=3, ortalama±SS).

| | Partikül Büyüklüğü (nm) | PDI | Zeta Potansiyel (mV) |
|----------------|------------------------------------|-------------|---------------------------------|
| Formülasyon 1 | 212.7±1.803 | 0.120±0.033 | -36.2±0.757 |
| Formülasyon 2 | 250.9±3.179 | 0.220±0.004 | -27.3±0.404 |
| Formülasyon 3 | 195.2±0.550 | 0.117±0.022 | -41.9±0.603 |
| Formülasyon 4 | 230.8±2.809 | 0.164±0.027 | -31.7±0.760 |
| Formülasyon 5 | 274.6±2.101 | 0.131±0.021 | -31.9±0.569 |
| Formülasyon 6 | 242.8±1.039 | 0.121±0.032 | -46.4±1.060 |
| Formülasyon 7 | 244.8±0.611 | 0.162±0.010 | -36.1±0.608 |
| Formülasyon 8 | 220.2±0.721 | 0.160±0.016 | -43.6±1.150 |
| Formülasyon 9 | 257.4±1.873 | 0.157±0.017 | -37.1±0.681 |
| Formülasyon 10 | 284.8±1.550 | 0.191±0.033 | -40.0±0.200 |
| Formülasyon 11 | 262.5±0.642 | 0.170±0.019 | -44.4±0.458 |
| Formülasyon 12 | 260.8±2.571 | 0.169±0.014 | -46.5±1.210 |
| Formülasyon 13 | 267.4±2.101 | 0.184±0.008 | -41.4±2.210 |
| Formülasyon 14 | 273.1±2.747 | 0.185±0.012 | -30.4±4.710 |
| Formülasyon 15 | 268.0±1.801 | 0.180±0.020 | -33.2±1.700 |

Box-Behnken deney tasarımında PCL polimeri ile nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanan ilaç yüklü olmayan LPHNP'lere ait polimer miktarı, lipid miktarı ve DSPE-PEG 2000 miktarı bağımsız değişkenlerine karşı partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel cevap olarak kullanıldığında elde edilen istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.6.- Tablo 4.8.'de verilmiştir.

Tablo 4.6. Box-Behnken deney tasarımının partikül büyüklüğü cevabı için ANOVA sonuçları.

| | Y ₁ | | | | |
|-----------------------------------|---------------------|-----------------|------------------|---------|---------|
| | Serbestlik Derecesi | Kareler Toplamı | Ortalama Kareler | F-Value | p-Value |
| Model | 9 | 10425.5 | 1158.38 | 383.63 | <0.0001 |
| X₁ | 1 | 4036.5 | 4036.51 | 1336.81 | <0.0001 |
| X₂ | 1 | 380.9 | 380.88 | 126.14 | <0.0001 |
| X₃ | 1 | 1354.6 | 1354.60 | 448.62 | <0.0001 |
| X₁X₂ | 1 | 29.7 | 29.70 | 9.84 | 0.026 |
| X₁X₃ | 1 | 942.5 | 942.49 | 312.13 | 0.0001 |
| X₂X₃ | 1 | 22.6 | 22.56 | 7.47 | 0.041 |
| X₁² | 1 | 10.4 | 10.36 | 3.43 | 0.123 |
| X₂² | 1 | 1659.5 | 1659.47 | 549.58 | <0.0001 |
| X₃² | 1 | 2266.3 | 2266.34 | 750.57 | <0.0001 |
| | | $R^2 = 0.998$ | | | |

Partikül büyüklüğünü tahmin etmek için oluşturulan ikinci dereceden polinom model aşağıda verilmiştir.

$$Y_1 = 735 - 5,09X_1 - 159X_2 - 1074,2X_3 + 0,0670X_1^2 + 37,69X_2^2 + 619,4X_3^2 - 0,727X_1X_2 + 15,350 X_1X_3 + 15,83 X_2X_3$$

Tablo 4.7. Box-Behnken deney tasarımının PDI cevabı için ANOVA sonuçları.

| | Y ₂ | | | | |
|-----------------------------------|---------------------|-----------------|------------------|---------|---------|
| | Serbestlik Derecesi | Kareler Toplamı | Ortalama Kareler | F-Value | p-Value |
| Model | 9 | 0.0109 | 0.0012 | 5.39 | 0.039 |
| X₁ | 1 | 0.0011 | 0.0011 | 5.20 | 0.071 |
| X₂ | 1 | 0.0033 | 0.0033 | 14.87 | 0.012 |
| X₃ | 1 | 0.0022 | 0.0022 | 9.78 | 0.026 |
| X₁X₂ | 1 | 0.0002 | 0.0002 | 1.20 | 0.323 |
| X₁X₃ | 1 | 0.0027 | 0.0027 | 11.96 | 0.018 |
| X₂X₃ | 1 | 0.0001 | 0.0001 | 0.13 | 0.730 |
| X₁² | 1 | 0.0004 | 0.0004 | 1.89 | 0.228 |
| X₂² | 1 | 0.0005 | 0.0005 | 2.55 | 0.171 |
| X₃² | 1 | 0.0001 | 0.0001 | 0.54 | 0.496 |
| | | $R^2 = 0.906$ | | | |

PDI değerini tahmin etmek için oluşturulan ikinci dereceden polinom model aşağıda verilmiştir.

$$Y_2 = 0,283 - 0,0211X_1 + 0,1713X_2 - 0,604X_3 + 0,00043X_1^2 - 0,022X_2^2 + 0,144X_3^2 - 0,0022X_1X_2 + 0,026X_1X_3 - 0,0183X_2X_3$$

Tablo 4.8. Box-Behnken deney tasarımının zeta potansiyel cevabı için ANOVA sonuçları.

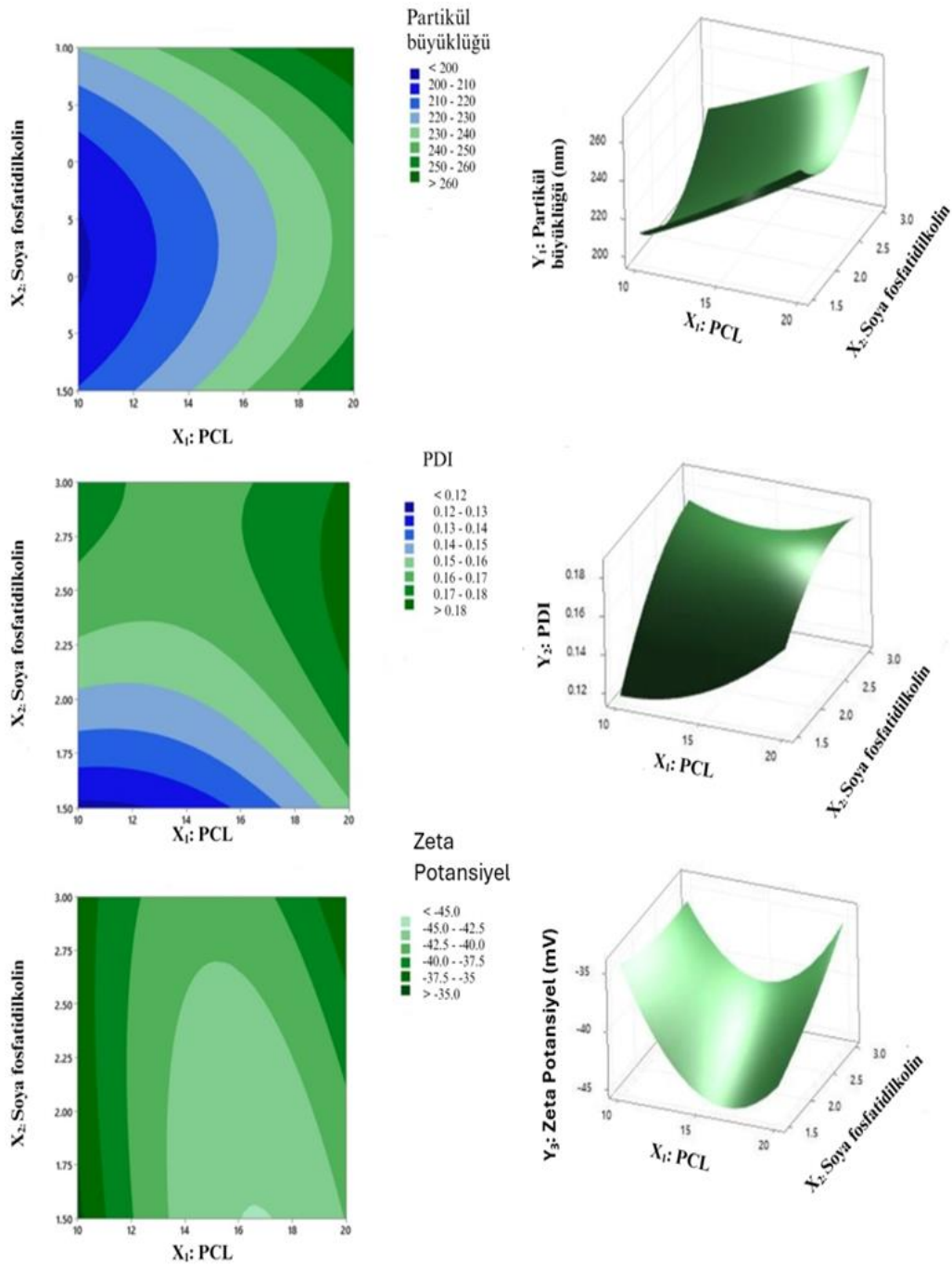
| | Y ₃ | | | | |
|-----------------------------------|---------------------|------------------------------|------------------|---------|---------|
| | Serbestlik Derecesi | Kareler Toplamı | Ortalama Kareler | F-Value | p-Value |
| Model | 9 | 463.047 | 51.450 | 2.31 | 0.185 |
| X₁ | 1 | 25.920 | 25.920 | 1.17 | 0.330 |
| X₂ | 1 | 17.111 | 17.111 | 0.77 | 0.421 |
| X₃ | 1 | 63.281 | 63.281 | 2.84 | 0.153 |
| X₁X₂ | 1 | 19.360 | 19.360 | 0.87 | 0.394 |
| X₁X₃ | 1 | 163.840 | 163.840 | 7.36 | 0.042 |
| X₂X₃ | 1 | 25.502 | 25.502 | 1.15 | 0.333 |
| X₁² | 1 | 135.707 | 135.707 | 6.10 | 0.057 |
| X₂² | 1 | 1.501 | 1.501 | 0.07 | 0.805 |
| X₃² | 1 | 19.321 | 19.321 | 0.87 | 0.394 |
| | | <i>R</i> ² =0.860 | | | |

Zeta potansiyel değerinin tahmini amacıyla kurulan ikinci dereceden polinomiyal model aşağıda verilmiştir;

$$Y_3 = 146,9 - 12,79X_1 - 22,1X_2 - 216,6X_3 + 0,2425X_1^2 + 1,1 X_2^2 + 57,2X_3^2 + 0,587X_1X_2 + 6,40X_1X_3 + 16,8X_2X_3$$

PCL polimeriyle, nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanan ilaç yüklü olmayan LPHNP formülasyonlarının partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değeri için *R*² değeri sırasıyla 0.998, 0.906 ve 0.860 olarak bulunmuştur. PLGA polimeriyle hazırlanan LPHNP formülasyonlarıyla benzer şekilde PCL polimeriyle nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanan LPHNP formülasyonlarının partikül büyüklüğü ve PDI cevaplarının modelde istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlenmiştir.

PCL polimeri ile hazırlanan LPHNP formülasyonlarının, lipit miktarı ve polimer miktarının partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değeri üzerindeki etkisini gösteren kontur ve yüzey cevap grafikleri Şekil 4.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. PCL polimeriyle nanoçöktürme yöntemi hazırlanan LPHNP formülasyonlarının kontur ve yüzey cevap grafikleri.

Formülasyon 3'e ait partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değerleri Tablo 4.9.'da gösterilmektedir.

Tablo 4.9. PLGA ile emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan ilaç yüklü olmayan LPHNP'lere ait partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değerleri (n=3, ortalama±SS).

| Formülasyon | Partikül Büyüklüğü (nm) | PDI | Zeta Potansiyel (mV) |
|--------------------|------------------------------------|-------------|---------------------------------|
| Formülasyon 1 | 217.1±0.986 | 0.222±0.007 | -13.8 ±0.451 |
| Formülasyon 2 | 237.1±2.015 | 0.222±0.010 | -9.35±0.482 |
| Formülasyon 3 | 276.4±1.769 | 0.393±0.008 | -15.3±0.252 |
| Formülasyon 4 | 253.6±6.614 | 0.311±0.024 | -13.7±0.289 |
| Formülasyon 5 | 205.4±1.387 | 0.227±0.011 | -17.2±0.306 |
| Formülasyon 6 | 221.0±3.580 | 0.222±0.170 | -5.44±0.405 |
| Formülasyon 7 | 232.8±2.329 | 0.239±0.003 | -15.6±1.450 |
| Formülasyon 8 | 219.8±1.955 | 0.227±0.009 | -19.4±0.252 |
| Formülasyon 9 | 203.6±2.354 | 0.228±0.019 | -25.1±0.404 |
| Formülasyon 10 | 220.1±1.320 | 0.193±0.009 | -14.5±0.436 |
| Formülasyon 11 | 280.5±11.50 | 0.407±0.460 | -21.3±0.850 |
| Formülasyon 12 | 229.8±1.069 | 0.241±0.012 | -23.6±1.260 |
| Formülasyon 13 | 387.6±1.305 | 0.459±0.029 | -6.17±0.132 |
| Formülasyon 14 | 290.3±4.716 | 0.378±0.028 | -13.9±0.520 |
| Formülasyon 15 | 254.7±2.318 | 0.268±0.008 | -13.0±0.503 |

Box-Behnken deney tasarımında PLGA ile emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan ilaç yüklü olmayan nanopartiküllere ait polimer miktarı, lipid miktarı ve DSPE-PEG 2000 miktarı bağımsız değişkenlerine karşı partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel cevap olarak kullanıldığında elde edilen istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.10.-Tablo 4.12.'de verilmiştir.

Tablo 4.10. Box-Behnken deney tasarımının partikül büyüklüğü cevabı için ANOVA sonuçları.

| | Y ₁ | | | | |
|-----------------------------------|---------------------|-----------------------|------------------|---------|---------|
| | Serbestlik Derecesi | Kareler Toplamı | Ortalama Kareler | F-Value | p-Value |
| Model | 9 | 25218.0 | 2802.00 | 2.75 | 0.039 |
| X₁ | 1 | 3969.4 | 3969.40 | 3.89 | 0.010 |
| X₂ | 1 | 2298.4 | 2298.42 | 2.25 | 0.014 |
| X₃ | 1 | 40.5 | 40.50 | 0.04 | 0.850 |
| X₁X₂ | 1 | 33.6 | 33.64 | 0.03 | 0.863 |
| X₁X₃ | 1 | 4664.9 | 4664.89 | 4.57 | 0.045 |
| X₂X₃ | 1 | 501.8 | 501.76 | 0.49 | 0.514 |
| X₁² | 1 | 6684.9 | 6684.93 | 6.55 | 0.051 |
| X₂² | 1 | 2047.8 | 2047.76 | 2.01 | 0.216 |
| X₃² | 1 | 4653.2 | 4653.23 | 4.56 | 0.086 |
| | | R ² =0.932 | | | |

Partikül büyüklüğünü tahmin etmek için oluşturulan ikinci dereceden polinom model aşağıda verilmiştir.

$$Y_1 = 353 - 24,4X_1 + 178X_2 - 709 X_3 + 1,702X_1^2 - 41,9 X_2^2 + 887X_3^2 - 0,77X_1 X_2 - 34,2X_2 X_3 + 75X_1 X_3$$

Tablo 4.11. Box-Behnken deney tasarımının PDI cevabı için ANOVA sonuçları.

| | Y ₂ | | | | |
|-----------------------------------|---------------------|-----------------------|------------------|---------|---------|
| | Serbestlik Derecesi | Kareler Toplamı | Ortalama Kareler | F-Value | p-Value |
| Model | 9 | 0.092540 | 0.010282 | 5.42 | 0.039 |
| X₁ | 1 | 0.004900 | 0.004900 | 2.58 | 0.169 |
| X₂ | 1 | 0.008911 | 0.008911 | 4.70 | 0.082 |
| X₃ | 1 | 0.011175 | 0.011175 | 5.89 | 0.044 |
| X₁X₂ | 1 | 0.000961 | 0.000961 | 0.51 | 0.508 |
| X₁X₃ | 1 | 0.015876 | 0.015876 | 8.37 | 0.034 |
| X₂X₃ | 1 | 0.011990 | 0.011990 | 6.32 | 0.044 |
| X₁² | 1 | 0.016637 | 0.016637 | 8.77 | 0.031 |
| X₂² | 1 | 0.004175 | 0.004175 | 2.20 | 0.198 |
| X₃² | 1 | 0.017515 | 0.017515 | 9.23 | 0.029 |
| | | R ² =0.907 | | | |

PDI değerini tahmin etmek için oluşturulan ikinci dereceden polinom model aşağıda verilmiştir.

$$Y_2 = 0,648 - 0,0285 X_1 + 0,157 X_2 - 1,756 X_3 + 0,002685 X_1^2 - 0,0598 X_2^2 + 1,722 X_3^2 - 0,00413 X_1 X_2 - 0,0630 X_1 X_3 + 0,365 X_2 X_3$$

Tablo 4.12. Box-Behnken deney tasarımının zeta potansiyel cevabı için ANOVA sonuçları.

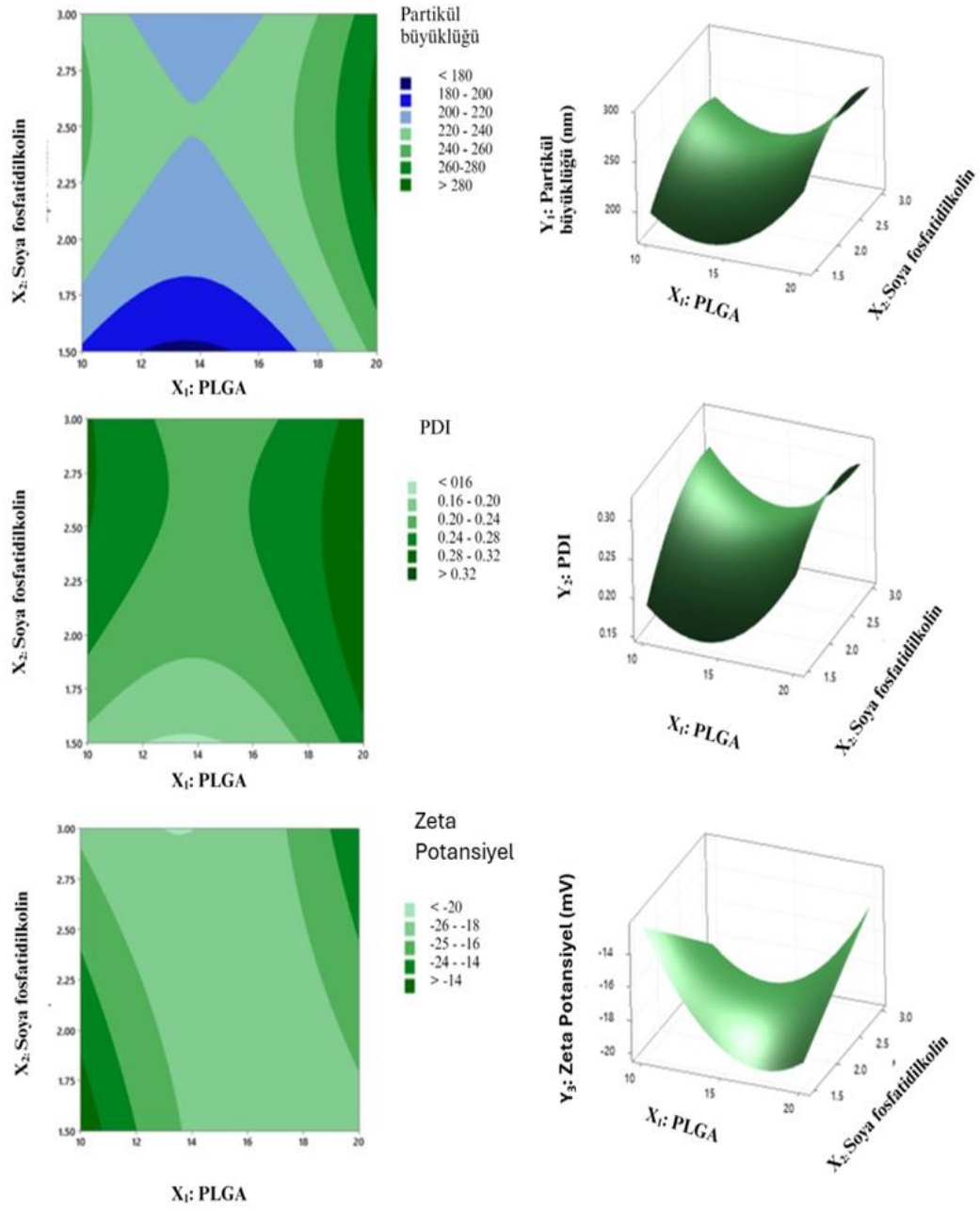
| | Y ₃ | | | | |
|-----------------------------------|---------------------|-----------------------|------------------|---------|---------|
| | Serbestlik Derecesi | Kareler Toplamı | Ortalama Kareler | F-Value | p Value |
| Model | 9 | 248.53 | 27.614 | 1.00 | 0.530 |
| X₁ | 1 | 2.55 | 2.553 | 0.09 | 0.773 |
| X₂ | 1 | 0.75 | 0.756 | 0.03 | 0.875 |
| X₃ | 1 | 9.50 | 9.504 | 0.34 | 0.583 |
| X₁X₂ | 1 | 27.52 | 27.565 | 1.00 | 0.363 |
| X₁X₃ | 1 | 0.79 | 0.792 | 0.03 | 0.872 |
| X₂X₃ | 1 | 86.11 | 86.118 | 3.12 | 0.038 |
| X₁² | 1 | 42.74 | 42.745 | 1.55 | 0.268 |
| X₂² | 1 | 0.01 | 0.002 | 0.00 | 0.992 |
| X₃² | 1 | 85.69 | 85.692 | 3.11 | 0.138 |
| | | R ² =0.743 | | | |

Zeta potansiyel değerinin tahmin amacıyla kurulan ikinci dereceden polinomial model aşağıda verilmiştir;

$$Y_3 = 38,1 - 5,50 X_1 + 7,9X_2 - 73,7X_3 + 0,136 X_1^2 - 0, X_2^2 + 120,4 X_3^2 + 0,700 X_1 X_2 - 0,45 X_1 X_3 - 30,9 X_2 X_3$$

Partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değeri için R² değeri sırasıyla 0.932, 0.907 ve 0.743 olarak bulunmuştur. R² değerleri partikül büyüklüğü, PDI cevapları için modelin uyumunun istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermiştir.

PLGA polimeriyle emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının lipit miktarı ve polimer miktarının partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değeri üzerindeki etkisinin ayrıntılı değerlendirilmesi amacıyla kontur ve yüzey-cevap grafikleri Şekil 4.3.'te gösterilmiştir.



Şekil 4.3. PLGA polimeri emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının kontur ve yüzey-cevap grafikleri.

Formülasyon 4'e ait partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değerleri Tablo 4.13.'de gösterilmektedir.

Tablo 4.13. PCL ile emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan ilaç yüklü olmayan LPHNP'lere ait partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değerleri (n=3, ortalama±SS).

| | Partikül Büyüklüğü (nm) | PDI | Zeta Potansiyel (mV) |
|----------------|------------------------------------|-------------|---------------------------------|
| Formülasyon 1 | 243.0±2.329 | 0.195±0.013 | -16.6±0.473 |
| Formülasyon 2 | 253.8 ±4.061 | 0.413±0.018 | - 27.6±1.36 |
| Formülasyon 3 | 228.0±1.054 | 0.194±0.012 | -22.8±0.153 |
| Formülasyon 4 | 278.7±2.816 | 0.287±0.039 | -13.4±0.971 |
| Formülasyon 5 | 354.8±3.430 | 0.267±0.032 | -17±0.416 |
| Formülasyon 6 | 264.6±4.860 | 0.221±0.007 | -26.2±0.900 |
| Formülasyon 7 | 298.5±3.837 | 0.303±0.032 | -13.8±0.751 |
| Formülasyon 8 | 260.1±3.113 | 0.236±0.027 | -22.1±0.252 |
| Formülasyon 9 | 241.4±2.376 | 0.236±0.002 | -26.2±0.208 |
| Formülasyon 10 | 259.6±2.421 | 0.283±0.028 | -25±2.15 |
| Formülasyon 11 | 275.5±5.537 | 0.266±0.016 | -19±0.569 |
| Formülasyon 12 | 292.8±4.654 | 0.242±0.010 | -24.3±0.231 |
| Formülasyon 13 | 300.5±3.851 | 0.270±0.012 | -15.7±1.10 |
| Formülasyon 14 | 303.1±5.479 | 0.232±0.005 | -19.1±0.265 |
| Formülasyon 15 | 317.7±4.477 | 0.243±0.009 | -15.5±0.929 |

Box-Behnken deney tasarımında PCL ile emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan ilaç yüklü olmayan LPHNP'lere ait polimer miktarı, lipid miktarı ve DSPE-PEG 2000 miktarı bağımsız değişkenlerine karşı partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel cevap olarak kullanıldığında elde edilen istatistiksel analiz sonuçları Tablo 4.14.-4.16.'da verilmiştir.

Tablo 4.14 Box-Behnken deney tasarımının partikül büyüklüğü cevabı için ANOVA sonuçları.

| | Y ₁ | | | | |
|-----------------------------------|---------------------|-----------------|------------------|---------|---------|
| | Serbestlik Derecesi | Kareler Toplamı | Ortalama Kareler | F-Value | p-Value |
| Model | 9 | 11518.7 | 1279.85 | 2.07 | 0.018 |
| X₁ | 1 | 5544.0 | 5544.04 | 8.98 | 0.030 |
| X₂ | 1 | 70.2 | 70.21 | 0.11 | 0.050 |
| X₃ | 1 | 1188.3 | 1188.28 | 1.92 | 0.224 |
| X₁X₂ | 1 | 29.2 | 29.16 | 0.05 | 0.837 |
| X₁X₃ | 1 | 201.6 | 201.64 | 0.33 | 0.592 |
| X₂X₃ | 1 | 2814.3 | 2814.30 | 4.56 | 0.086 |
| X₁² | 1 | 29.7 | 29.73 | 0.05 | 0.835 |
| X₂² | 1 | 1493.6 | 1493.59 | 2.42 | 0.181 |
| X₃² | 1 | 261.3 | 261.31 | 0.42 | 0.544 |
| | | $R^2 = 0.896$ | | | |

Partikül büyüklüğünü tahmin etmek için oluşturulan ikinci dereceden polinom model aşağıda verilmiştir.

$$Y_1 = 787 - 0,8X_1 - 260X_2 - 818X_3 + 0,113X_1^2 + 35, X_2^2 + 210 X_3^2 - 0,72 X_1X_2 + 7,1 X_1X_3 + 176,8 X_2X_3$$

Tablo 4.15. Box-Behnken deney tasarımının PDI cevabı için ANOVA sonuçları.

| | Y ₂ | | | | |
|-----------------------------------|---------------------|-----------------|------------------|---------|---------|
| | Serbestlik Derecesi | Kareler Toplamı | Ortalama Kareler | F-Value | p-Value |
| Model | 9 | 0.031372 | 0.003486 | 2.77 | 0.037 |
| X₁ | 1 | 0.001301 | 0.001301 | 1.03 | 0.356 |
| X₂ | 1 | 0.002964 | 0.002964 | 2.36 | 0.185 |
| X₃ | 1 | 0.012800 | 0.012800 | 10.17 | 0.024 |
| X₁X₂ | 1 | 0.002070 | 0.002070 | 1.65 | 0.256 |
| X₁X₃ | 1 | 0.008190 | 0.008190 | 6.51 | 0.041 |
| X₂X₃ | 1 | 0.000210 | 0.000210 | 0.17 | 0.700 |
| X₁² | 1 | 0.000521 | 0.000521 | 0.41 | 0.548 |
| X₂² | 1 | 0.000139 | 0.000139 | 0.11 | 0.753 |
| X₃² | 1 | 0.003186 | 0.003186 | 2.53 | 0.172 |
| | | $R^2 = 0.840$ | | | |

PDI değerini tahmin etmek için oluşturulan ikinci dereceden polinom model aşağıda verilmiştir.

$$Y_2 = 0,920 - 0,0303X_1 + 0,137X_2 - 1,869X_3 + 0,000475X_1^2 - 0,0109X_2^2 + 0,734X_3^2 - 0,00607 X_1X_2 + 0,0452 X_1X_3 + 0,048 X_2X_3$$

Tablo 4.16. Box-Behnken deney tasarımının zeta potansiyel cevabı için ANOVA sonuçları.

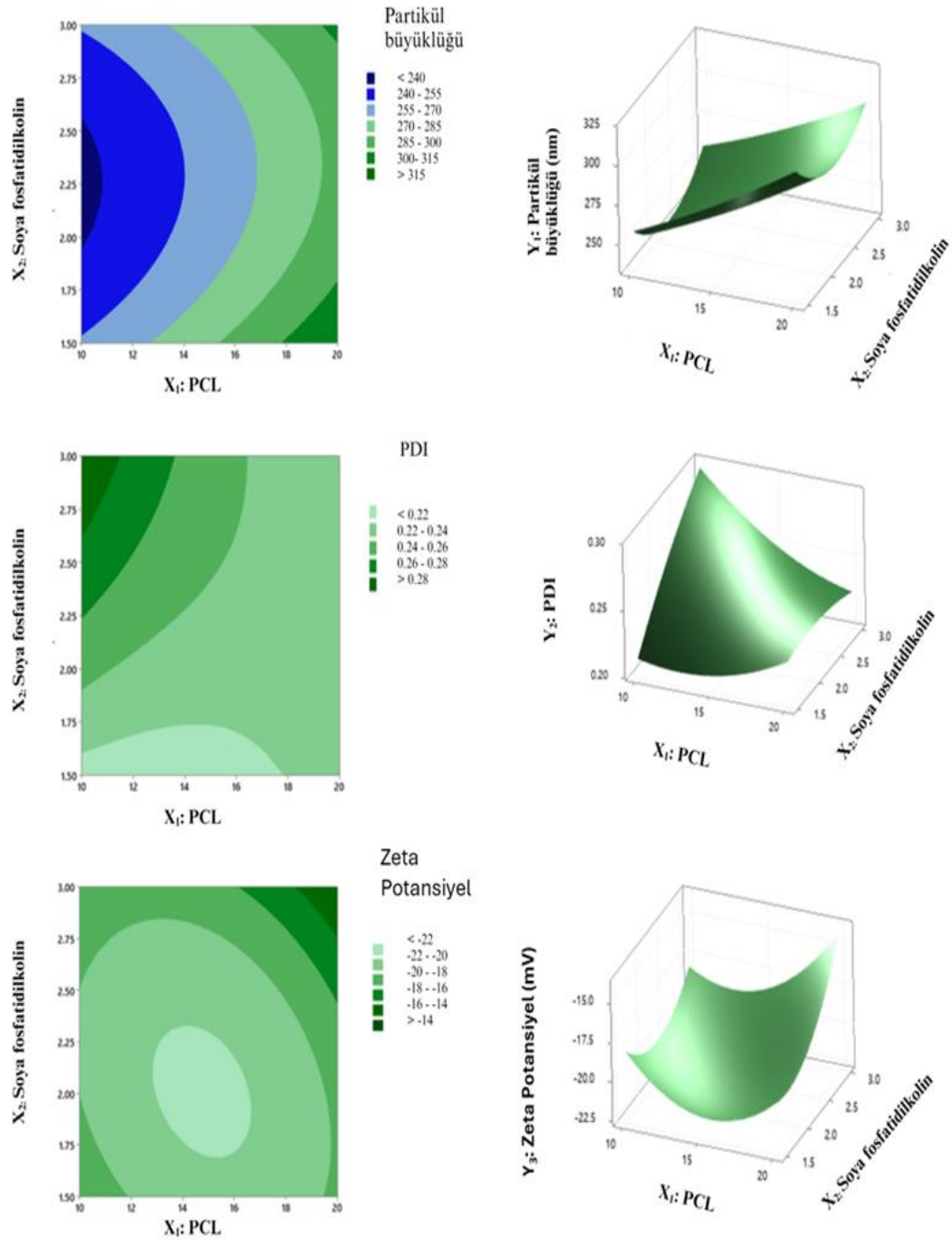
| | Y ₃ | | | | |
|-----------------------------------|---------------------|-----------------------|------------------|---------|---------|
| | Serbestlik Derecesi | Kareler Toplamı | Ortalama Kareler | F-Value | p-Value |
| Model | 9 | 156.84 | 17.427 | 0.84 | 0.615 |
| X₁ | 1 | 4.20 | 4.205 | 0.20 | 0.671 |
| X₂ | 1 | 15.68 | 15.680 | 0.76 | 0.424 |
| X₃ | 1 | 0.40 | 0.405 | 0.02 | 0.894 |
| X₁X₂ | 1 | 7.84 | 7.840 | 0.38 | 0.566 |
| X₁X₃ | 1 | 16.81 | 16.810 | 0.81 | 0.409 |
| X₂X₃ | 1 | 57.76 | 57.760 | 2.78 | 0.046 |
| X₁² | 1 | 24.48 | 24.482 | 1.18 | 0.327 |
| X₂² | 1 | 15.89 | 15.897 | 0.77 | 0.422 |
| X₃² | 1 | 11.63 | 11.633 | 0.56 | 0.488 |
| | | R ² =0.781 | | | |

Zeta potansiyel değerinin tahmini amacıyla kurulan ikinci dereceden polinomiyal model aşağıda sunulmuştur;

$$Y_3 = 26,4 - 2,56X_1 - 35,5X_2 + 25,9 X_3 + 0,103X_1^2 + 3,69X_2^2 - 44,4X_3^2 + 0,373X_1X_2 - 2,05X_1X_3 + 25,3 X_2X_3$$

PCL polimeriyle emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan ilaç yüklü olmayan nanopartikül formülasyonlarının partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değeri için R² değeri sırasıyla 0.896, 0.840 ve 0.781 olarak bulunmuştur. R² değerleri partikül büyüklüğü ve PDI cevapları için modelin uyumunun istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermiştir.

PCL polimeriyle emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan LPHNP formülasyonlarının, lipit miktarı ve polimer miktarının partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değeri üzerindeki etkisini gösteren kontur ve yüzey-cevap grafikleri Şekil 4.4.'te gösterilmiştir.



Şekil 4.4. PCL polimeri ile emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma hazırlanan LPHNP formülasyonlarının kontur ve yüzey cevap grafikleri.

Üç faktörlü Box-Benken deney tasarımından yararlanılarak belirlenen değişken miktarlar ile ilaç yüklü olmayan LPHNP'lerin hazırlanması başarıyla gerçekleştirilmiş ve bağımsız değişkenlerin bağımlı değişkenler üzerinde etkisini açıklayan matematiksel modeller kurulmuştur. Hedeflenen partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değerlerine ulaşmak için gereken bağımsız değişken miktarlarının

kombinasyonlarını gösteren tasarım aralığı oluşturulmuştur. Tasarım aralıkları, hazırlama yöntemi ve kullanılan polimere göre nanopartikül formülasyonlarının birbirinden bağımsız kendi içlerinde değerlendirilmesiyle oluşturulmuştur. Hedeflenen partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değerine sahip olabileceği öngörülen optimum formülasyonun hazırlanması amacıyla da hedef fonksiyonu (*desirability function, d*) yönteminden yararlanılmıştır (170-172). Hedef fonksiyonunda bire yakın elde edilen değer hedeflenen cevap değişkenine yaklaşıldığını; sıfıra yakın değerler ise hedeflenen cevap değişkeninden uzaklaşıldığını temsil etmektedir (173, 174).

Deney tasarımında, tasarım aralıkları oluşturulurken elde edilen bilgiler doğrultusunda optimum formülasyon bileşenlerin miktarları Tablo 3.4’de verilmiştir. Bu bileşenler ile elde edilen *d* değerleri ve kestirilen değerler ile gözlenen değerlere ilişkin veriler Tablo 4.17.-4.21.’de verilmiştir.

Tablo 4.17. LPHNP formülasyonlarına ilişkin hedef fonksiyonu değerleri.

| Formülasyon | Formülasyon 1 | Formülasyon 2 | Formülasyon 3 | Formülasyon 4 |
|-----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| <i>d</i> değeri | 0.972 | 0.947 | 0.845 | 0.882 |

Tablo 4.18. Hedef fonksiyonu temel alınarak geliştirilen optimum nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanan PLGA LPHNP formülasyonuna ilişkin deneysel ve kestirimsel değerler (n=3, ortalama±SS).

| Bağımlı değişken | Tahmin edilen | Gözlenen | Fark | Hata (%) |
|-------------------------|---------------|-------------|-------|----------|
| Partikül büyüklüğü (nm) | 137.74 | 134.0±4.063 | -3.74 | 2.8 |
| PDI | 0.104 | 0.148±0.012 | 0.044 | 3.0 |
| Zeta potansiyel(mV) | -30 | -22.9±0.780 | 7.1 | 3.1 |

Tablo 4.19. Hedef fonksiyonu temel alınarak geliştirilen optimum nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanan PCL LPHNP formülasyonuna ilişkin deneysel ve kestirimsel değerler (n=3, ortalama±SS).

| Bağımlı değişken | Tahmin edilen | Gözlenen | Fark | Hata (%) |
|-------------------------|---------------|-------------|--------|----------|
| Partikül büyüklüğü (nm) | 213.99 | 215.6±1.588 | -1.61 | 0.75 |
| PDI | 0.121 | 0.124±0.010 | -0.003 | 2.42 |
| Zeta potansiyel(mV) | -33.28 | -28.6±0.462 | 4.68 | 16.4 |

Tablo 4.20. Hedef fonksiyonu temel alınarak geliştirilen optimum emülsiyon oluşturma - çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan PLGA LPHNP formülasyonuna ilişkin deneysel ve kestirimsel değerler (n=3, ortalama±SS).

| Bağımlı değişken | Tahmin edilen | Gözlenen | Fark | Hata (%) |
|-------------------------|---------------|-------------|--------|----------|
| Partikül büyüklüğü (nm) | 242.3 | 249.9±2.228 | -6.7 | 2.68 |
| PDI | 0.215 | 0.240±0.015 | -0.025 | 10.4 |
| Zeta potansiyel(mV) | -12.3 | -10.9±0.451 | 1.4 | 12.8 |

Tablo 4.21. Hedef fonksiyonu temel alınarak geliştirilen optimum emülsiyon oluşturma - çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan PCL LPHNP formülasyonuna ilişkin deneysel ve kestirimsel değerler (n=3, ortalama±SS).

| Bağımlı değişken | Tahmin edilen | Gözlenen | Fark | Hata (%) |
|-------------------------|---------------|--------------|--------|----------|
| Partikül büyüklüğü (nm) | 242.3 | 248.2±0.90 | -5.9 | 2.37 |
| PDI | 0.302 | 0.355±0.018 | -0.053 | 14.9 |
| Zeta potansiyel(mV) | -31.26 | -32.05±0.810 | -0.79 | 2.4 |

Deney tasarımı ile belirlenen polimer, lipit ve DSPE-PEG 2000 miktarları ile ilaç yüklü olmayan optimum LPHNP formülasyonları hazırlanmıştır. Tablo 4.22.'de ilaç yüklü olmayan LPHNP'lerin partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değerleri verilmektedir.

Tablo 4. 22. İlaç yüklü olmayan optimum LPHNP'lerin partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değerleri (n=3, ortalama±SS).

| Formülasyon | Partikül Büyüklüğü (nm) | PDI | Zeta Potansiyel (mV) |
|---------------|-------------------------|-------------|----------------------|
| Formülasyon 1 | 134.0±4.063 | 0.148±0.012 | -22.9±0.780 |
| Formülasyon 2 | 215.6±1.588 | 0.124±0.010 | -28.6±0.462 |
| Formülasyon 3 | 249.9±2.228 | 0.240±0.015 | -10.9±0.451 |
| Formülasyon 4 | 248.2±0.90 | 0.355±0.018 | -32.05±0.810 |

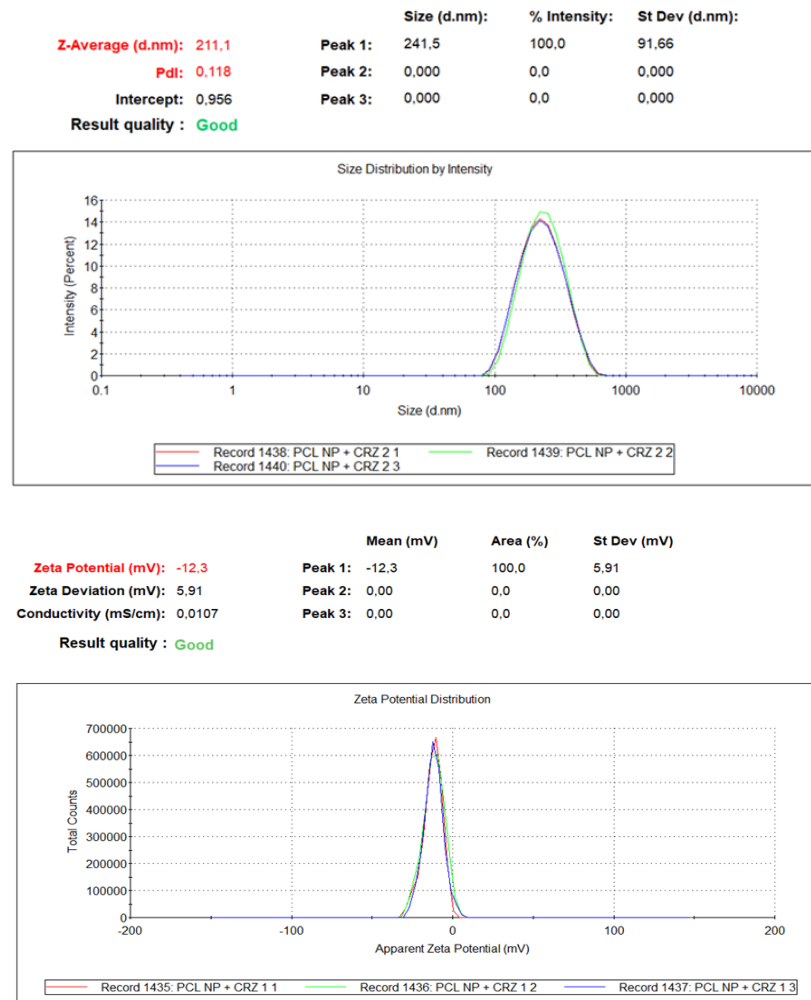
4.2. Optimum Krizotinib Yüklü Lipit-Polimer Hibrit Nanopartiküllerin Partikül Büyüklüğü, Partikül Büyüklüğü Dağılımı ve Zeta Potansiyeli

Hazırlanan ilaç yüklü olmayan LPHNP'lerin hedeflenen partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değerlere sahip olduğunun belirlenmesini takiben optimizasyon çalışmalarıyla belirlenen değişkenler ile 4 farklı optimum krizotinib yüklü LPHNP formülasyonu Bölüm 3.2.'de anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır. PLGA ve PCL polimerleri ile emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemiyle hazırlanan krizotinib yüklü LPHNP formülasyonlarında faz ayrışması gözlemlenmiş; partiküller elde edilememiştir. PLGA ve PCL polimerleri ile nanoçöktürme yöntemiyle krizotinib yüklü LPHNP formülasyonları ise başarı ile hazırlanmıştır. Nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanan optimum krizotinib yüklü LPHNP formülasyonlarına ilişkin partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel tayini sonuçları Tablo 4.23.'te verilmiştir.

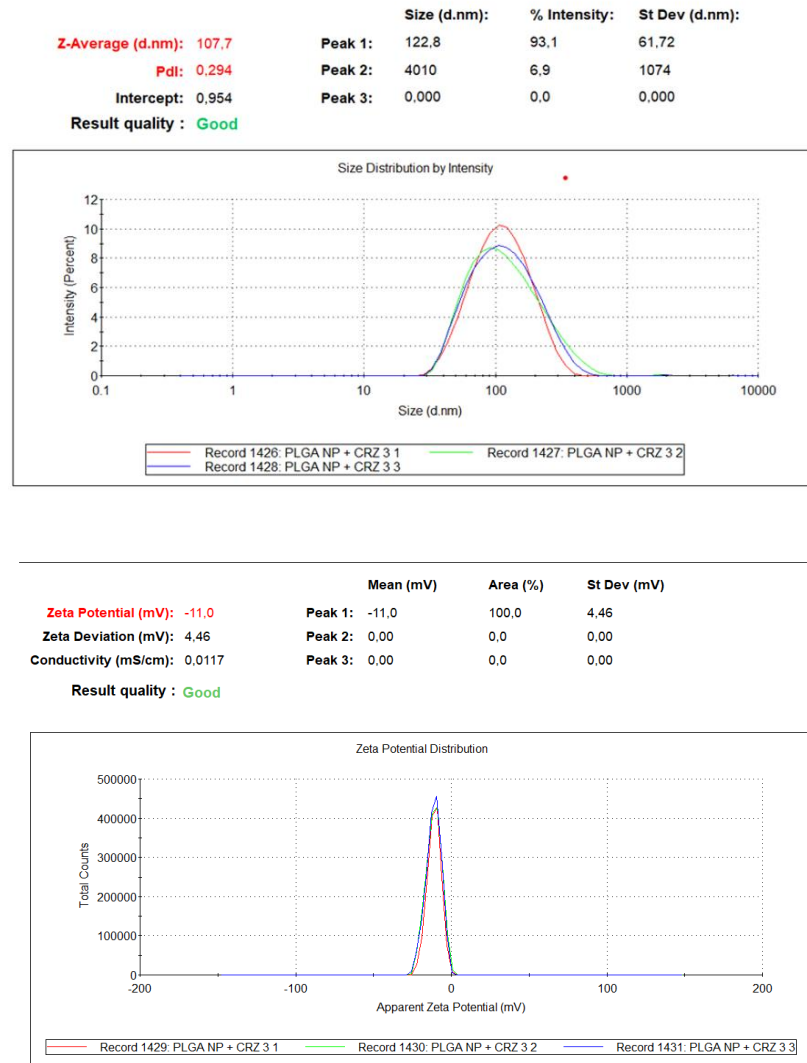
Tablo 4. 23. Optimum Krizotinib yüklü LPHNP'lerin partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değerleri (n=3, ortalama±SS).

| Polimer Tipi - Hazırlama Yöntemi | Partikül Büyüklüğü (nm) | PDI | Zeta Potansiyel (mV) |
|----------------------------------|-------------------------|---------------|----------------------|
| PLGA Nanoçöktürme | 124 ± 0.9609 | 0.225 ± 0.001 | -10.4 ± 0.327 |
| PCL Nanoçöktürme | 211.8 ± 1.701 | 0.123 ± 0.005 | - 7.55 ± 0.445 |

Şekil 4.5.-4.6.'da optimum Krizotinib yüklü LPHNP'lere ait partikül büyüklüğü dağılımları ve zeta potansiyel değerlerine örnekler verilmiştir.



Şekil 4.5. PCL ile nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanan optimum Krizotinib yüklü LPHNP'lere ait partikül büyüklüğü dağılımı ve zeta potansiyel değerleri (n=3, ortalama±SS).

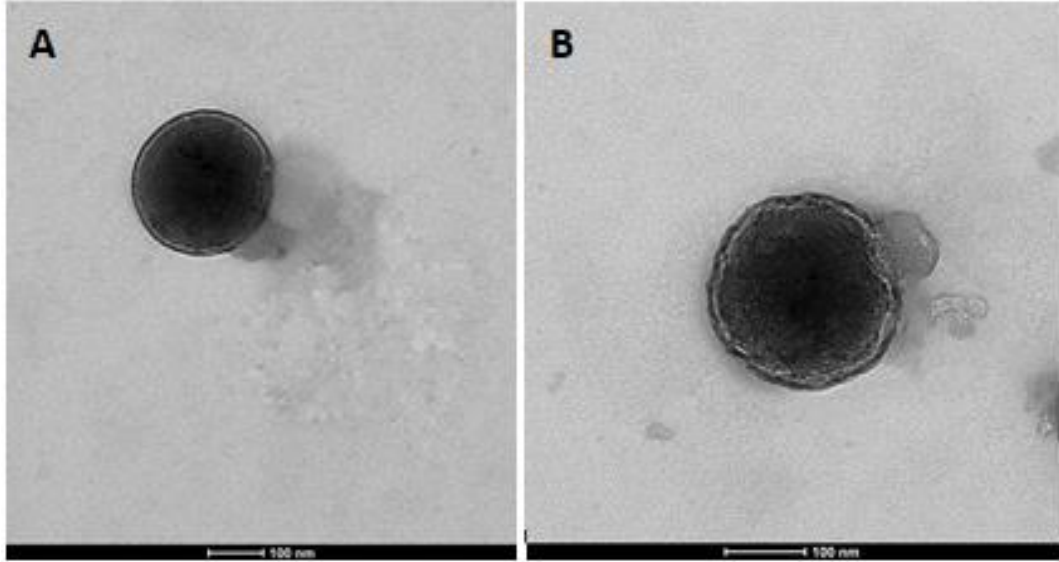


Şekil 4.6. PLGA ile nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanan optimum Krizotinin LPHNP'lere ait partikül büyüklüğü dağılımı ve zeta potansiyel değerleri (n=3, ortalama±SS).

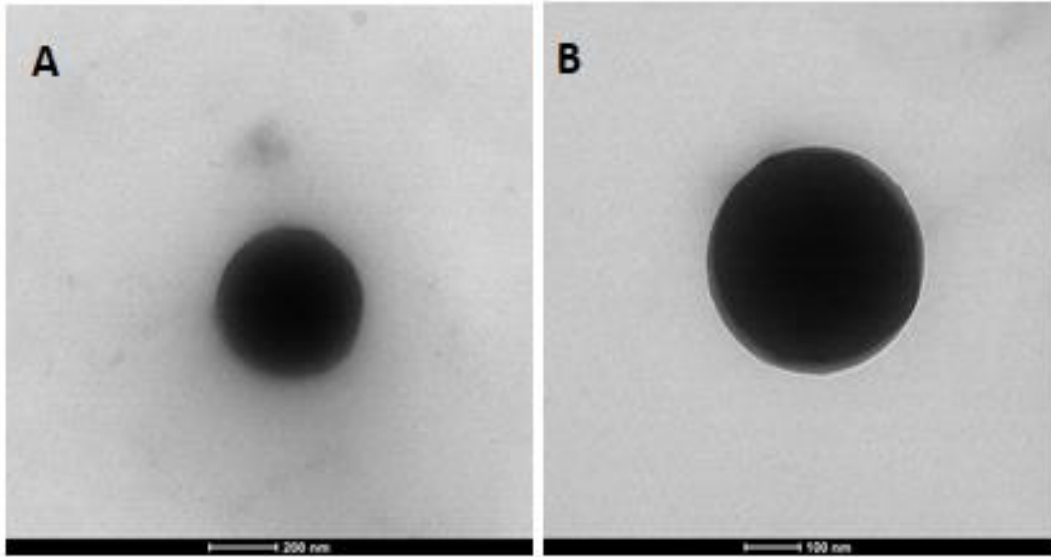
Ön formülasyon çalışmaları sonucunda PLGA ve PCL polimerleri ile nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanan krizotinin yüklü LPHNP ile tez kapsamında çalışmalara devam edilmiştir. Tezin ilerleyen kısımlarında krizotinin yüklü PLGA polimeri ile hazırlanmış LPHNP formülasyonları KR-PLGA-LPHNP, krizotinin yüklü PCL polimeri ile hazırlanmış LPHNP formülasyonları KR-PCL-LPHNP kısaltmalarıyla isimlendirilmiştir.

4.3. Morfolojik Değerlendirme

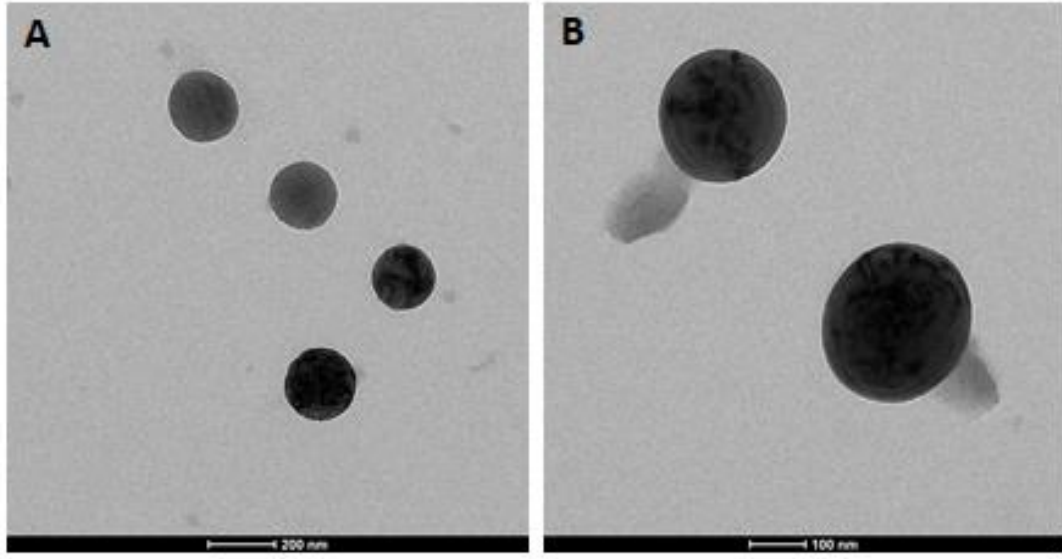
Box-Behnken tasarımı ile elde edilen optimum formülasyonlardan ilaç yüklü olmayan ve krizotinib yüklü LPHNP formülasyonlarının yüzey özellikleri TEM ile değerlendirilmiştir. Şekil 4.7.-4.10.'da krizotinib yüklü olan ve olmayan LPHNP formülasyonlarına ilişkin TEM fotoğrafları sunulmuştur.



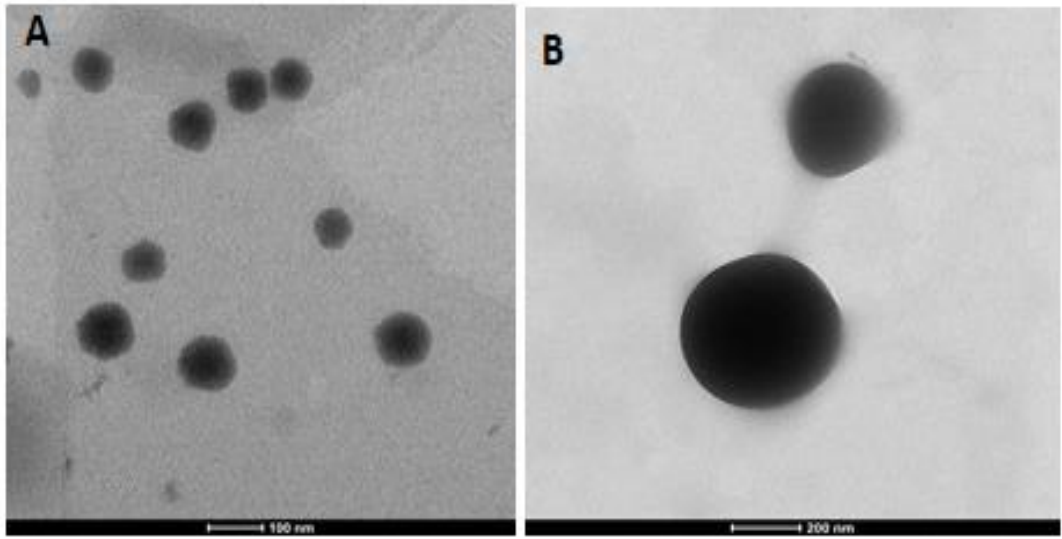
Şekil 4.7. İlaç yüklü olmayan PLGA LPHNP formülasyonlarının TEM fotoğrafları (A: 100 nm, B: 100 nm ölçek).



Şekil 4.8. İlaç yüklü olmayan PCL LPHNP formülasyonlarının TEM fotoğrafları (A: 200 nm, B : 100 nm ölçek).



Şekil 4.9. KR-PLGA-LPHNP formülasyonlarının TEM fotoğrafları A: 200 nm, B: 100 nm).



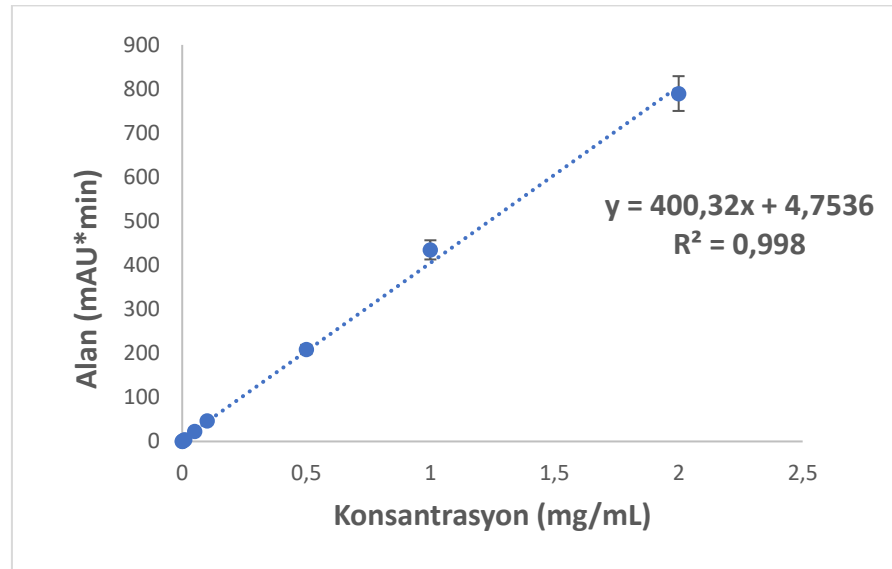
Şekil 4.10. KR-PCL-LPHNP formülasyonlarının TEM fotoğrafları (A: 100 nm, B: 200 nm).

Krizotinib yüklü ve ilaç içermeyen LPHNP formülasyonlarının TEM görüntüleri incelendiğinde nanopartiküllerin koyu renkli polimer çekirdeğini çevreleyen açık renkli fosfolipid tabakası ve partikül büyüklüğü ölçüm sonuçlarıyla benzer şekilde homojen olarak dağılım gösterdiği, agrege olmadığı, düzgün yüzeyli ve küresel yapıda olduğu görülmüştür (175).

4.4. Krizotinib HPLC Yöntemi ile Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu

Doğrusallık

Krizotinib için “3.2.4 Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Krizotinib Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu/Doğrusallık” bölümünde anlatıldığı şekilde gerçekleştirilen HPLC yönteminin doğrusallığını inceleyen analiz sonucunda konsantrasyonun fonksiyonu olarak absorbans değişiminin gösterildiği grafik ve kalibrasyon denklemi Şekil 4.11.’de verilmiştir. Krizotinib için $R^2=0.998$ olarak bulunmuştur ve yöntemin doğrusallığı gösterilmiştir.



Şekil 4.11. Krizotinib etkin maddesine ait kalibrasyon doğrusu ve denklemi. (n=3, ortalama±SS).

Doğruluk

Bölüm 3.2.4 bölümünde anlatıldığı üzere hazırlanan serilere ait % geri kazanım değerler %98 ve %100,07 aralığında bulunmuştur (Tablo 4.24.). % geri kazanım değerleri HPLC yönteminin doğruluğunu göstermiştir.

Tablo 4.24. Krizotinib için HPLC yöntemi ile elde edilen % geri kazanım değerleri (n=3).

| İlave Edilen Miktar (µg) | Hesaplanan Miktar (µg) | Ortalama Hesaplanan Miktar(µg±SS) | % Ortalama Geri Kazanım±SS |
|---------------------------------|-------------------------------|--|-----------------------------------|
| 1 | 0,98 0,99 0,98 | 0,98±0,01 | 98±2,00 |
| 50 | 49,68 50,02 49,76 | 49,82±0,18 | 99,64±0,36 |
| 1000 | 1000,50 1000,90 1000,70 | 1000,7±0,2 | 100,07±0,02 |

Kesinlik

Krizotinib etkin maddesine ait tekrar elde edilebilirlik ve tekrarlanabilirlik sonuçları Tablo 4.25.-Tablo 4.26.'da verilmiştir. Elde edilen % varyasyon katsayısı (%VK) değerleri HPLC yönteminin tekrarlanabilirlik ve tekrar elde edilebilirliği gösterilmiştir.

Tablo 4.25. Krizotinib için HPLC yönteminde tekrarlanabilirlik değerleri (n=3).

| Krizotinib Konsantrasyonu (µg/mL) | Pik Alanları | Ortalama Pik Alanı±SS | % Varyasyon Katsayısı |
|--|----------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 1 | 9.48 9.52 9.31 | 9.43±0.12 | 1,18 |
| 50 | 32.42 31.66 32.14 | 32.07±0.39 | 1,19 |
| 1000 | 457.95 460.20 458.35 | 458.83±1.20 | 0.26 |

Tablo 4.26. Krizotinib için HPLC yönteminde tekrar elde edilebilirlik sonuçları (n=3).

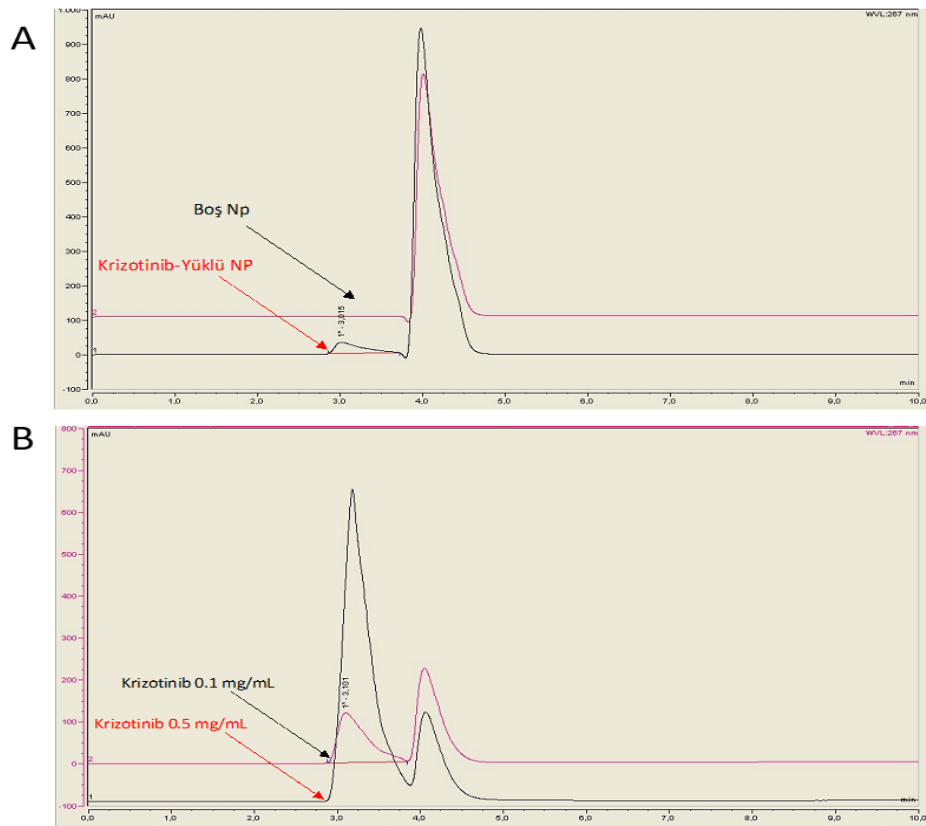
| Krizotinib | İlave Edilen Miktar (µg/mL) | Hesaplanan Miktar (µg) | Hesaplanan Miktar (µg/mL)±SS | % Varyasyon Katsayısı |
|---------------------|-----------------------------|-------------------------------|------------------------------|-----------------------|
| Gün içi | 1 | 0,98 0,99 0,98 | 0,98±0,01 | 0,60 |
| | 50 | 49,68 50,02 49,76 | 49,82±0,18 | 0,30 |
| | 1000 | 1000,50 1000,90 1000,70 | 1000,7±0,2 | 0,20 |
| Günler arası | 1 | 0,98 1,02 0,99 | 1±0,02 | 1,70 |
| | 50 | 49,74 49,92 49,90 | 49,85±0,09 | 0,20 |
| | 1000 | 1000,40 1000,70 1000,50 | 1000,5±0,15 | 0,15 |

Duyarlılık

Validasyon çalışmalarında duyarlılık parametresi için krizotinib miktar tayini yönteminde en düşük konsantrasyon (0.001 mg/mL) ile elde ettiğimiz pik ve pik alanından yararlanılmış, LOD 68,59 ng/mL, LOQ ise 162,40 ng/mL olarak tayin edilmiştir. Geliştirilen HPLC yöntemi ile krizotinib için nanogram seviyesinde doğru ve hassas şekilde ölçüm yapılabildiği gözlenmiştir.

Seçicilik

Krizotinib etkin maddesinin miktar tayini amacıyla geliştirilen HPLC yönteminde, gerçekleştirilen analizler sonucunda formülasyonda kullanılan yardımcı maddelerin krizotinibin pikleri ile girişim yapmadığı görülmüştür. Krizotinib için geliştirilen HPLC ile miktar tayini yönteminin seçici olduğu gösterilmiştir.



Şekil 4.12. A) İlaç yüklü olmayan ve Krizonitib yüklü nanopartiküllerin kromatogramları B) 0.1mg/mL ve 0.5mg/mL Krizotinib standartlarına ait kromatogramlar.

4.5. Krizotinib Yüklü Lipit-Polimer Hibrit Nanopartiküllerin Enkapsülasyon Etkinliğinin Belirlenmesi

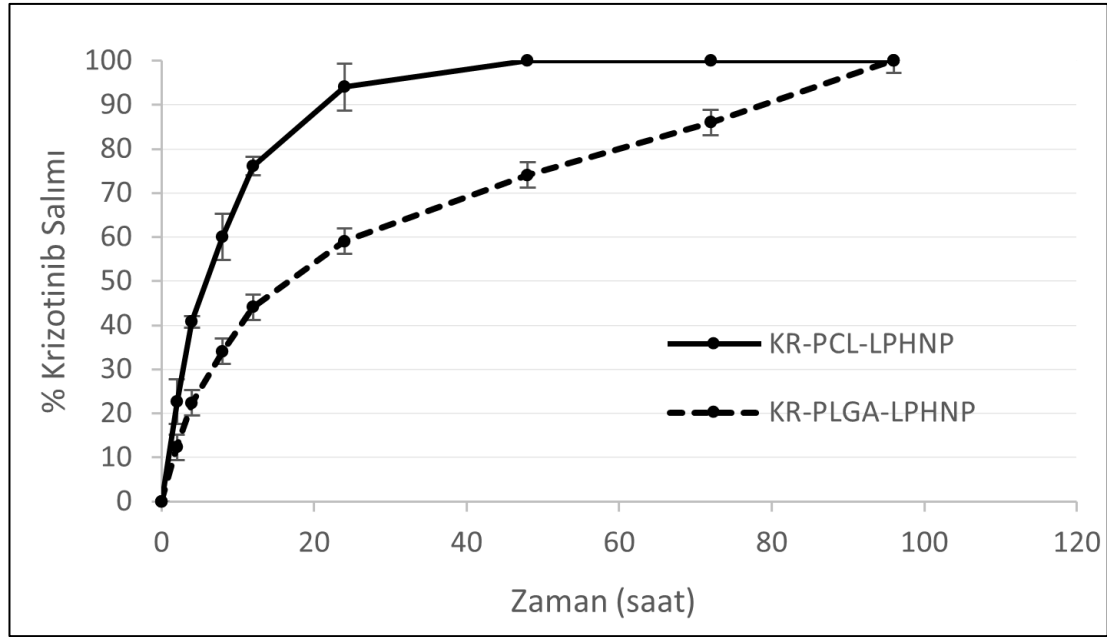
Nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanmış krizotinib yüklü LPHNP formülasyonlarına ait enkapsülasyon etkinliğine ait bulgular Tablo 4.27.'de verilmiştir. Krizotinib'in nanopartiküllere yükleme etkinliğinin belirlenebilmesinde dolaylı yöntem kullanılmıştır (108). PLGA polimeri ile hazırlanan LPHNP formülasyonlarının yaklaşık %80; PCL polimeri ile hazırlanan LPHNP formülasyonlarının ise yaklaşık %71 enkapsülasyon etkinliği elde edilmiştir.

Tablo 4.27. Krizotinib yüklü lipit-polimer hibrit nanopartikül formülasyonlarının ilaç yükleme etkinlikleri (n=3).

| Formülasyon | Krizotinib Yükleme Etkinliği (%) (Ortalama \pm SS) |
|---------------|---|
| KR-PLGA-LPHNP | 79.25 \pm 0.07 |
| KR-PCL-LPHNP | 70.93 \pm 1.81 |

4.6. Lipit-Polimer Hibrit Nanopartiküllerden *In Vitro* Krizotinib Salım Çalışmaları

Krizotinib yüklü LPHNP formülasyonlarının PBS (pH 7.4) tamponu salım ortamında 96 saat boyunca "3.3.4 *In Vitro* Salım Çalışmaları" bölümünde anlatıldığı şekilde gerçekleştirilen *in vitro* salım çalışmalarına ait salım profilleri Şekil 4.13.'de verilmiştir. Zamanın fonksiyonu olarak % kümülatif salım grafikleri incelendiğinde PLGA ve PCL polimerleri ile hazırlanmış nanopartiküllerinin ilaç salım profilleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ($p < 0.01$). PCL polimerleri ile hazırlanmış nanopartiküllerden krizotinibin yaklaşık %100'ü 48 saat içerisinde salınırken; PLGA polimerleri ile hazırlanmış nanopartiküllerden herhangi bir patlama etkisi gözlemlenmeden 96 saat içerisinde ilacın %100'ü kademeli ve kontrollü bir şekilde salındığı görülmüştür (Şekil 4.13.).



Şekil 4.13. Lipit-polimer hibrit nanopartiküllerden *in vitro* Krizotinib salım profili (n=3, ortalama±SS).

4.7. Krizotinib Yüklü Lipit-Polimer Hibrit Nanopartiküllerin Stabilite Çalışmaları

Lipit-polimer hibrit nanopartikül formülasyonlarının stabilite testleri “3.3.5 Lipit-Polimer Hibrit Nanopartiküllerin Stabilite Çalışmaları” bölümünde anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Krizotinib yüklü LPHNP formülasyonlarının stabilite çalışmaları sulu dispersiyon halinde 4 farklı sıcaklık değerinde ($-18^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$, $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}/60\% \text{RH}\pm 5\% \text{RH}$, $4^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ ve $40^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}/75\% \text{RH}\pm 5\% \text{RH}$) farklı zaman noktalarında (0. Saat, 1. Hafta, 1.ay, 2.ay,3.ay ve 6.ay) yürütülmüştür. PCL ve PLGA polimerleri ile hazırlanan LPHNP formülasyonlarının partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyelleri Bölüm 3.3.1’de anlatıldığı şekilde Malvern Zetasizer NanoZS cihazı ile ölçülmüş ve örnekler görsel açıdan incelenmiştir. Tablo 4.28.-4.35.’de stabilite çalışmalarının sonuçları verilmiştir.

Tablo 4.28. KR-PLGA-LPHNP formülasyonlarının $-18^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ Stabilite Değerleri (n=3, ortalama \pm SS).

| Zaman | Partikül Büyüklüğü (nm) | PDI | Zeta Potansiyel (mV) |
|----------|-------------------------|-------------------|----------------------|
| 1. Gün | 105.24 \pm 3.509 | 0.235 \pm 0.026 | - 12.6 \pm 1.99 |
| 1. Hafta | 108.2 \pm 7.520 | 0.369 \pm 0.056 | - 13 \pm 2.95 |
| 1. Ay | 146.1 \pm 2.363 | 0.447 \pm 0.002 | - 20.7 \pm 0.208 |
| 2. Ay | 149.7 \pm 1.159 | 0.455 \pm 0.041 | - 16 \pm 1.28 |
| 3. Ay | 180.4 \pm 8.654 | 0.494 \pm 0.003 | -18.6 \pm 0.643 |
| 6. Ay | 269.7 \pm 14.46 | 0.644 \pm 0.176 | - 0.04 \pm 0.017 |

Tablo 4.29. KR-PLGA-LPHNP formülasyonlarının $4^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ Stabilite Değerleri (n=3, ortalama \pm SS).

| Zaman | Partikül Büyüklüğü (nm) | PDI | Zeta Potansiyel (mV) |
|----------|-------------------------|-------------------|----------------------|
| 1. Gün | 105.24 \pm 3.509 | 0.235 \pm 0.026 | - 12.6 \pm 1.99 |
| 1. Hafta | 105.25 \pm 1.927 | 0.234 \pm 0.017 | - 12.3 \pm 0 |
| 1. Ay | 106.4 \pm 1.531 | 0.388 \pm 0.021 | - 20.6 \pm 1.86 |
| 2. Ay | 106.6 \pm 0.781 | 0.380 \pm 0.010 | - 16.7 \pm 0.566 |
| 3. Ay | 107.8 \pm 0.251 | 0.387 \pm 0.011 | -16.5 \pm 3.12 |
| 6. Ay | 129 \pm 1.802 | 0.464 \pm 0.025 | -18.2 \pm 1.13 |

Tablo 4.30. KR-PLGA-LPHNP formülasyonlarının $25^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ Stabilite Değerleri (n=3, ortalama \pm SS).

| Zaman | Partikül Büyüklüğü (nm) | PDI | Zeta Potansiyel (mV) |
|----------|-------------------------|-------------------|----------------------|
| 1. Gün | 105.24 \pm 3.509 | 0.235 \pm 0.026 | - 12.6 \pm 1.99 |
| 1. Hafta | 138.4 \pm 8.618 | 0.584 \pm 0.069 | - 8.88 \pm 3.42 |
| 1. Ay | 266 \pm 4.110 | 0.430 \pm 0.041 | - 11.4 \pm 1.01 |

Tablo 4.31. KR-PLGA-LPHNP formülasyonlarının $40^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ Stabilite Değerleri (n=3, ortalama \pm SS).

| Zaman | Partikül Büyüklüğü (nm) | PDI | Zeta Potansiyel (mV) |
|-----------------|-------------------------|-------------------|----------------------|
| 1. Gün | 105.24 \pm 3.509 | 0.235 \pm 0.026 | - 12.6 \pm 1.99 |
| 1. Hafta | 134.1 \pm 2.663 | 0.605 \pm 0.026 | - 11.1 \pm 0.473 |
| 1. Ay | 164.4 \pm 5.445 | 0.578 \pm 0.079 | - 11.8 \pm 1.27 |

Tablo 4.32. KR-PCL-LPHNP formülasyonlarının $-18^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ Stabilite Değerleri (n=3, ortalama \pm SS).

| Zaman | Partikül Büyüklüğü (nm) | PDI | Zeta Potansiyel (mV) |
|-----------------|-------------------------|-------------------|----------------------|
| 1. Gün | 212.7 \pm 1.815 | 0.347 \pm 0.052 | -9.53 \pm 0.324 |
| 1. Hafta | 230.9 \pm 2.173 | 0.342 \pm 0.008 | -8.03 \pm 1.33 |
| 1. Ay | 238.1 \pm 3.232 | 0.254 \pm 0.025 | -1.85 \pm 0.239 |
| 2. Ay | 238.7 \pm 0.665 | 0.375 \pm 0.002 | -1.95 \pm 0.349 |
| 3. Ay | 265.8 \pm 3.691 | 0.433 \pm 0.032 | -1.81 \pm 0.440 |
| 6. Ay | 551.9 \pm 23.04 | 0.648 \pm 0.032 | - 0.0320 |

Tablo 4.33. KR-PCL-LPHNP formülasyonlarının $4^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ Stabilite Değerleri (n=3, ortalama \pm SS).

| Zaman | Partikül Büyüklüğü (nm) | PDI | Zeta Potansiyel (mV) |
|-----------------|-------------------------|-------------------|----------------------|
| 1. Gün | 212.7 \pm 1.815 | 0.347 \pm 0.052 | -9.53 \pm 0.324 |
| 1. Hafta | 153.8 \pm 23.78 | 0.341 \pm 0.058 | -3.93 \pm 0.275 |
| 1. Ay | 155.1 \pm 1.767 | 0.289 \pm 0.033 | -1.90 \pm 0.205 |
| 2. Ay | 158.2 \pm 2.023 | 0.297 \pm 0.028 | -2.27 \pm 1.11 |
| 3. Ay | 162.5 \pm 1.819 | 0.312 \pm 0.021 | -3.17 \pm 0.235 |
| 6. Ay | 232.6 \pm 22.77 | 0.439 \pm 0.070 | -3.65 \pm 0.561 |

Tablo 4.34. KR-PCL-LPHNP formülasyonlarının $25^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ Stabilite Değerleri (n=3, ortalama \pm SS).

| Zaman | Partikül Büyüklüğü (nm) | PDI | Zeta Potansiyel (mV) |
|----------|-------------------------|-------------------|----------------------|
| 1. Gün | 212.7 \pm 1.815 | 0.347 \pm 0.052 | -9.53 \pm 0.324 |
| 1. Hafta | 265.9 \pm 2.92 | 0.374 \pm 0.023 | -2.92 \pm 0.632 |
| 1. Ay | 190.8 \pm 1.940 | 0.347 \pm 0.031 | -7.88 \pm 0.923 |

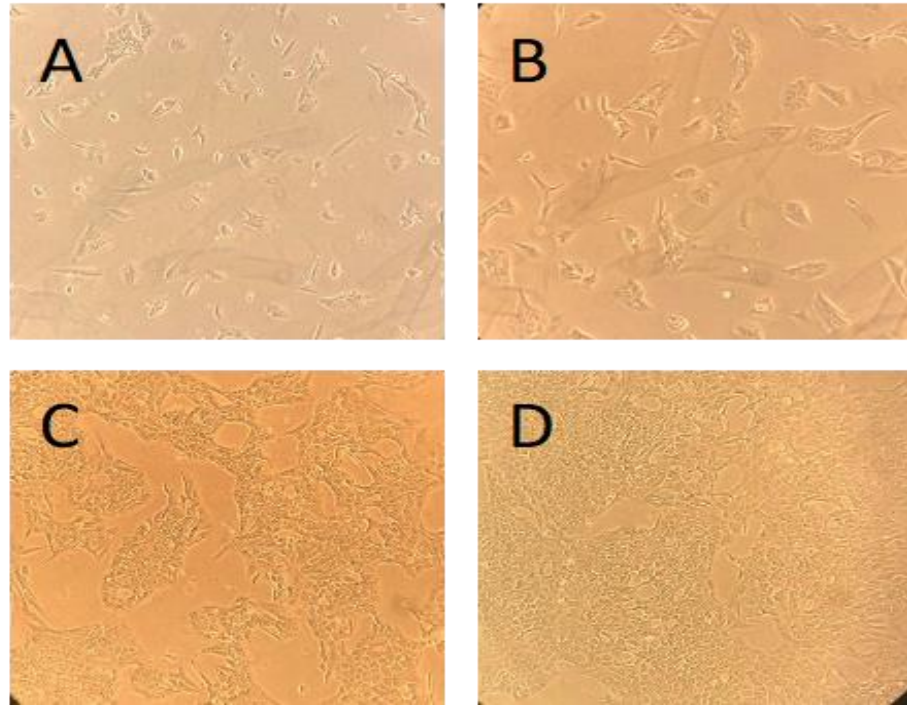
Tablo 4.35. KR-PCL-LPHNP formülasyonlarının $40^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ Stabilite Değerleri (n=3, ortalama \pm SS).

| Zaman | Partikül Büyüklüğü (nm) | PDI | Zeta Potansiyel (mV) |
|----------|-------------------------|-------------------|----------------------|
| 1. Gün | 212.7 \pm 1.815 | 0.347 \pm 0.052 | -9.53 \pm 0.324 |
| 1. Hafta | 194.9 \pm 4.352 | 0.330 \pm 0.043 | -2.39 \pm 0.159 |
| 1. Ay | 150.4 \pm 2.606 | 0.266 \pm 0.003 | -2.15 \pm 0.403 |

4.8. Krizotininb Yüklü Lipit-Polimer Hibrit Nanopartiküllerin Hücre Kültürü Çalışmaları

4.8.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

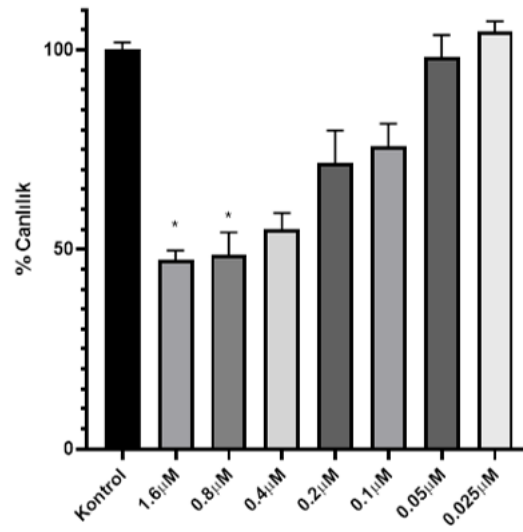
Hücre kültürü çalışmalarında kullanılmak üzere çoğaltılan insan adenokarsinom hücresi olan NCI-H2228 (EML4-ALK füzyon akciğer adenokarsinom) hücre hattının 2., 4.ve 9. gün görüntüleri Şekil 4.14.'de verilmiştir.



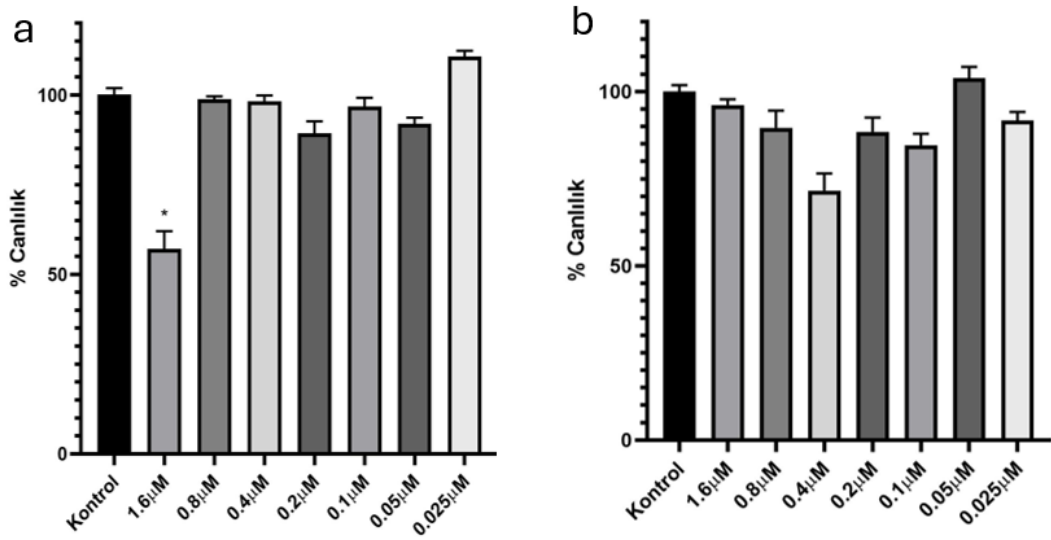
Şekil 4.14. NCI-H2228 hücre hattının görüntüleri (A: 2.gün, B: 4.gün ve C ve D: 9.gün)

4.8.2 Hücre Canlılık Analizi

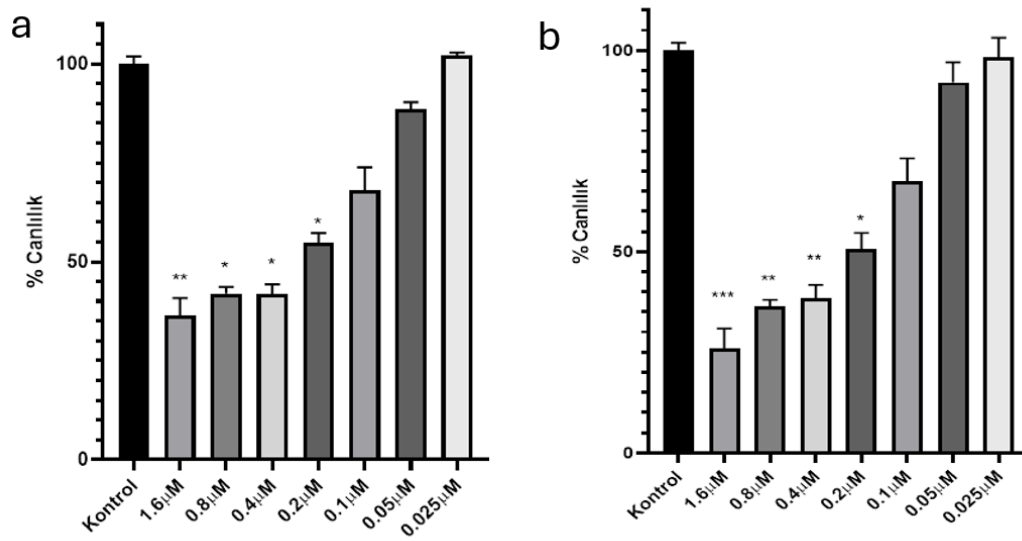
Lipit-polimer hibrit nanopartiküllerin NCI-H2228 (EML4-ALK füzyon akciğer kanseri) hücre hatlarının proliferasyonu üzerindeki etkilerinin saptanabilmesi için; 0.025 μM - 0.05 μM - 0.1 μM - 0.2 μM - 0.4 μM -0.8 μM ve 1.6 μM konsantrasyonlarında (7 farklı konsantrasyon değeri) KR-PCL-LPHNP formülasyonlarının, KR-PLGA-LPHNP formülasyonlarının, ilaç içermeyen PCL LPHNP formülasyonlarının, ilaç içermeyen PLGA LPHNP formülasyonlarının ve etken maddenin 48 saat boyunca inkübasyon sonrası XTT yöntemi ile elde edilen hücre canlılığı verileri Şekil 4.15.-4.17.'de sunulmuştur (162, 176-179).



Şekil 4.15. Krizotinib etkin maddesiyle 48 saat uygulama sonrası NCI-H2228 hücre canlılığı (n=6, ortalama±SS).



Şekil 4.16. a) İlaç yüklü olmayan PLGA LPHNP formülasyonlarıyla 48 saat uygulama sonrası NCI-H2228 hücre canlılığı, b) İlaç yüklü olmayan PCL LPHNP formülasyonlarıyla 48 saat muamele sonrası NCI-H2228 hücre canlılığı (n=6, ortalama±SS).



Şekil 4.17. a) KR-PLGA-LPHNP formülasyonlarıyla 48 saat uygulama sonrası NCI-H2228 hücre canlılığı, b) KR-PCL-LPHNP formülasyonlarıyla 48 saat uygulama sonrası NCI-H2228 hücre canlılığı (n=6, ortalama±SS).

Tablo 4.36. Formülasyonlara ait IC₅₀ değerleri.

| Formülasyon | IC ₅₀ * Değeri (μM) | Log IC ₅₀ Değeri |
|---------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| KR-PCL-LPHNP | 0.2946 | -0.5308 |
| KR-PLGA-LPHNP | 0.3658 | -0.4368 |
| Serbest Krizotinib | 0.7101 | -0.1487 |

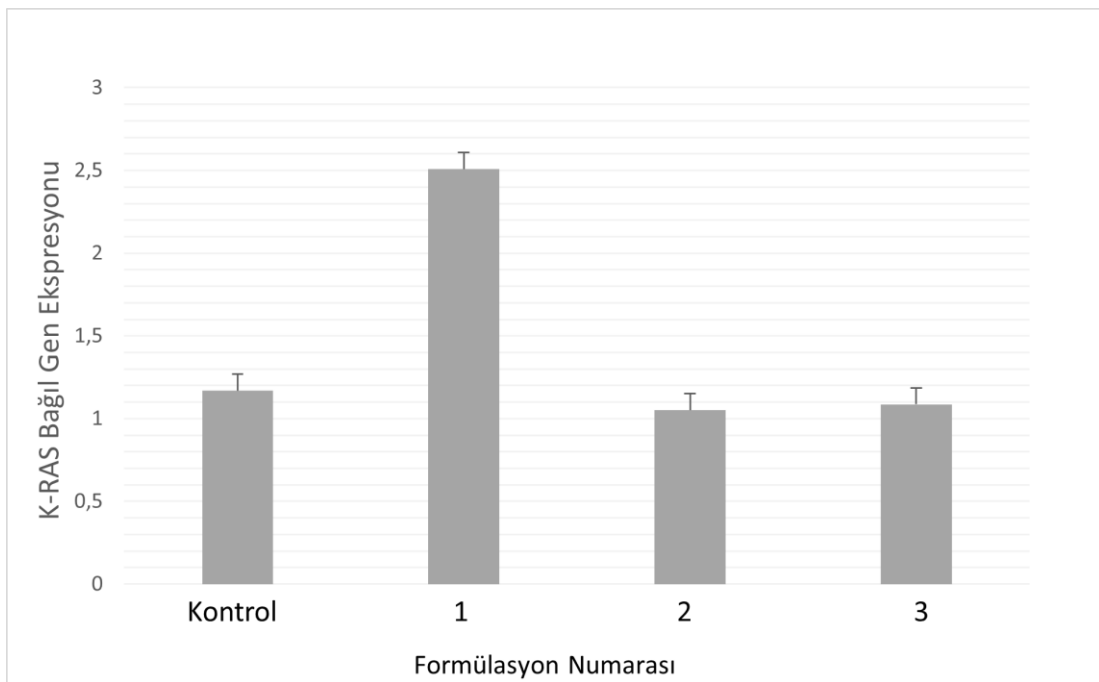
*IC₅₀: Hücrelerin %50 canlılık gösterdiği inhibisyon konsantrasyonu

Hücre canlılığı analizinde, formülasyonların hücrelerle 48 saat inkübasyonundan sonra KR-PCL-LPHNP ve KR-PLGA-LPHNP formülasyonların da canlılığı azaltmasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmamıştır (p>0.05). KR-PCL-LPHNP ve KR-PLGA-LPHNP formülasyonları ile serbest krizotinib karşılaştırıldığında ise LPHNP formülasyonlarının serbest krizotinibe göre istatistiksel açıdan anlamlı daha etkin bir sitotoksikite gösterdiği görülmüştür (p<0.05). İlaç içermeyen LPHNP formülasyonlarının ise hücrelerle 48 saat inkübasyon istatistiksel olarak anlamlı bir sitotoksik etki göstermediği gözlemlenmiştir.

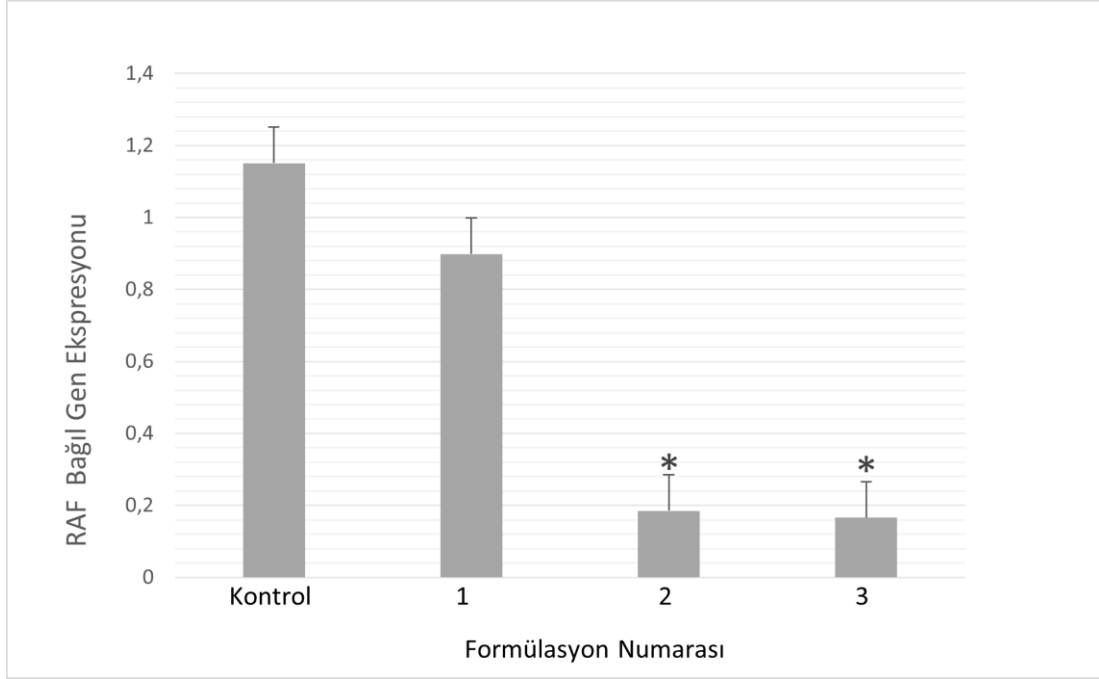
4.9. Krizotinib Yüklü Lipit-Polimer Hibrit Nanopartiküllerinin Gen ve Protein Düzeyinde İnhibitör Etkilerinin Değerlendirilmesi

4.9.1. RT-PCR Analizi

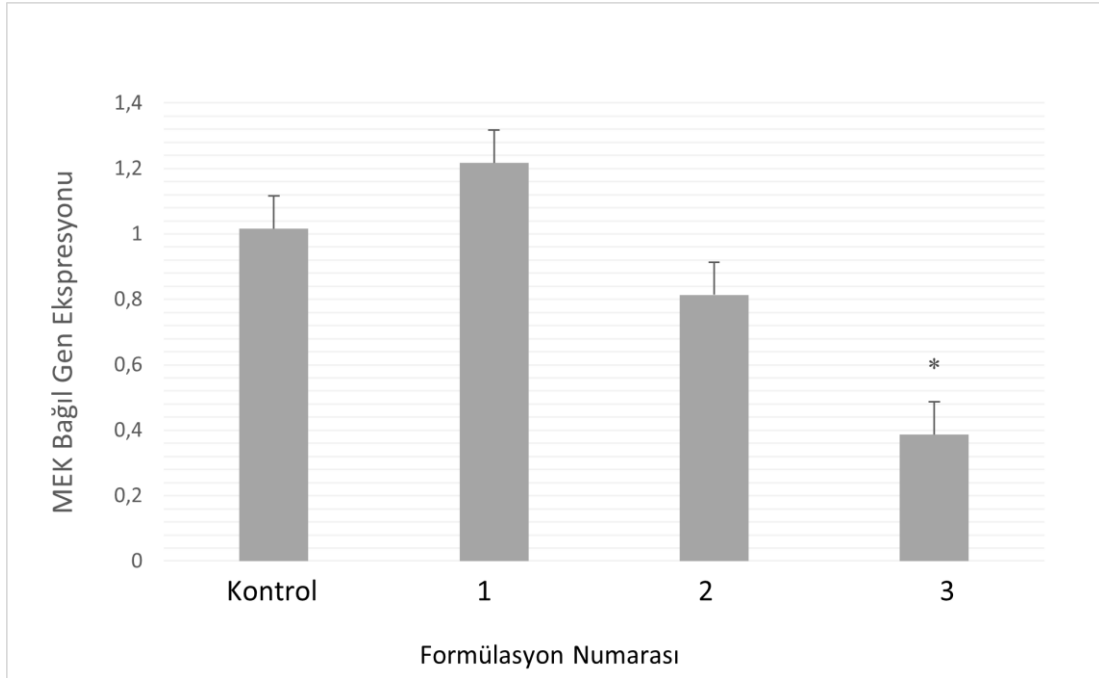
EML4-ALK geninin alt (downstream) yolağındaki K-RAS, RAF, MEK, ERK genlerinin ekspresyon düzeylerinin değerlendirilebilmesinde RT-PCR kullanılmıştır; referans gen ile (GAPDH-kontrol) normalize edilerek sonuçlar Şekil 4.18.-4.21.'de verilmiştir.



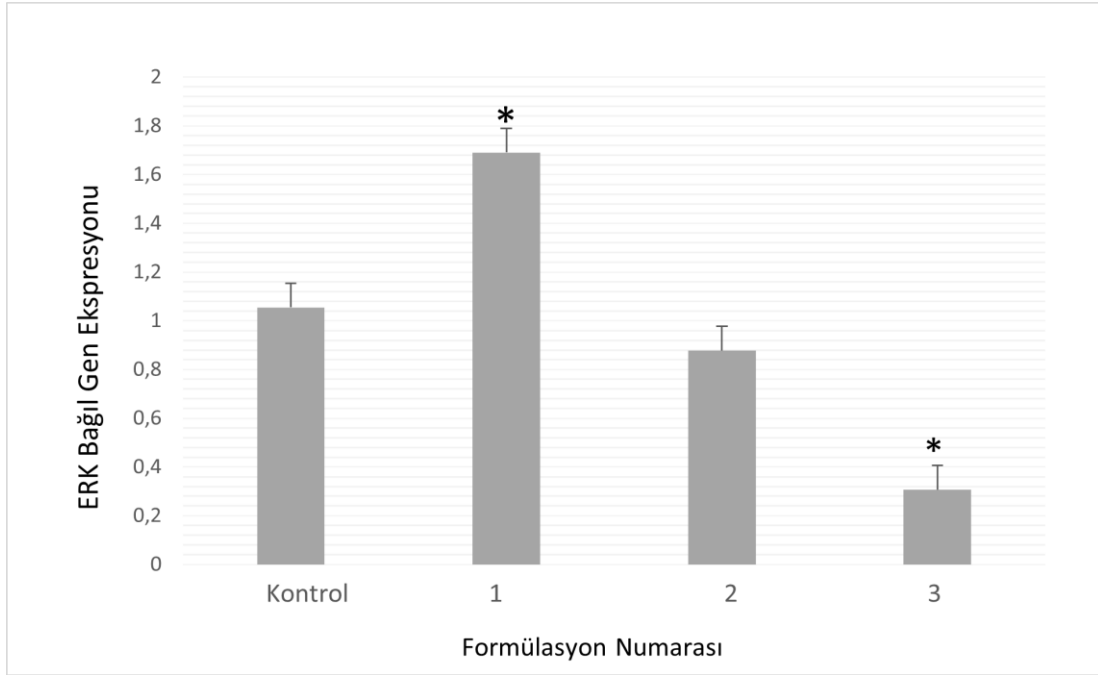
Şekil 4.18. NCI-H2228 hücrelerinin K-RAS gen ekspresyonlarındaki bağıl değişim (n=3, ortalama±SS) (1.Krizotinib, 2. KR-PLGA-LPHNP, 3. KR-PCL-LPHNP).



Şekil 4.19. NCI-H2228 hücrelerinin RAF gen ekspresyonlarındaki bağıl değişim (* $p < 0.05$ kontrole karşı) ($n=3$, ortalama \pm SS) (1.Krizotinib, 2. KR-PLGA-LPHNP, 3. KR-PCL-LPHNP).



Şekil 4.20. NCI-H2228 hücrelerinin MEK gen ekspresyonlarındaki bağıl değişim (* $p < 0.05$ kontrole karşı) ($n=3$, ortalama \pm SS) (1.Krizotinib, 2. KR-PLGA-LPHNP, 3. KR-PCL-LPHNP).

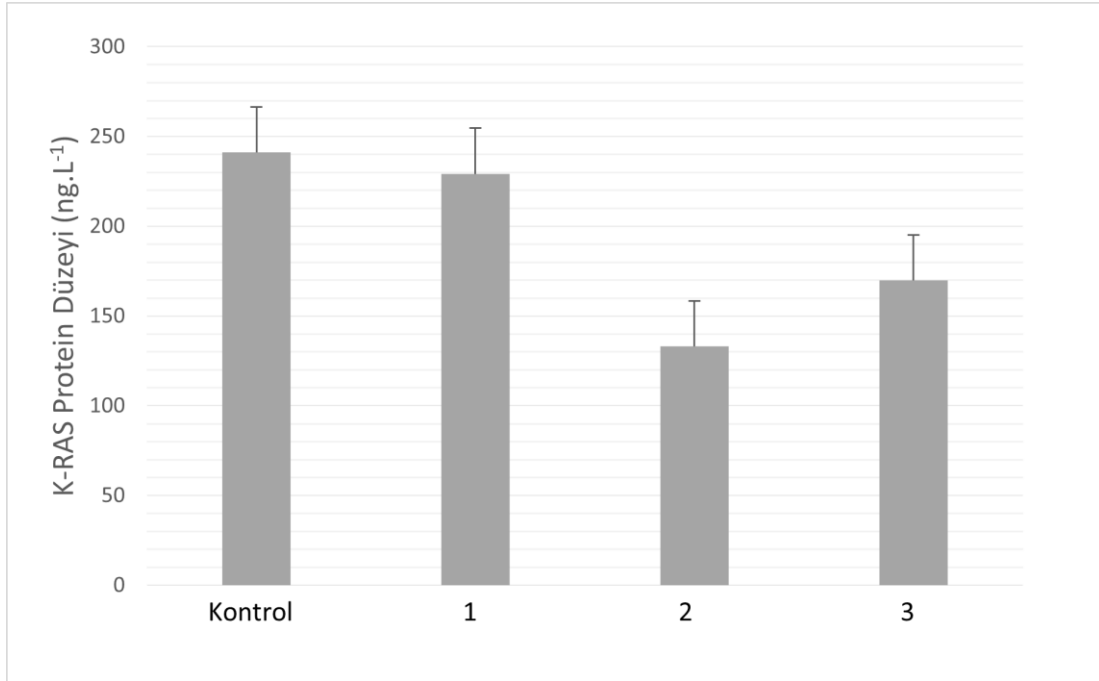


Şekil 4.21. NCI-H2228 hücrelerinin ERK gen ekspresyonlarındaki bağıl değişim (* $p < 0.05$ kontrole karşı) ($n=3$, ortalama \pm SS) (1.Krizotinib, 2. KR-PLGA-LPHNP, 3. KR-PCL-LPHNP).

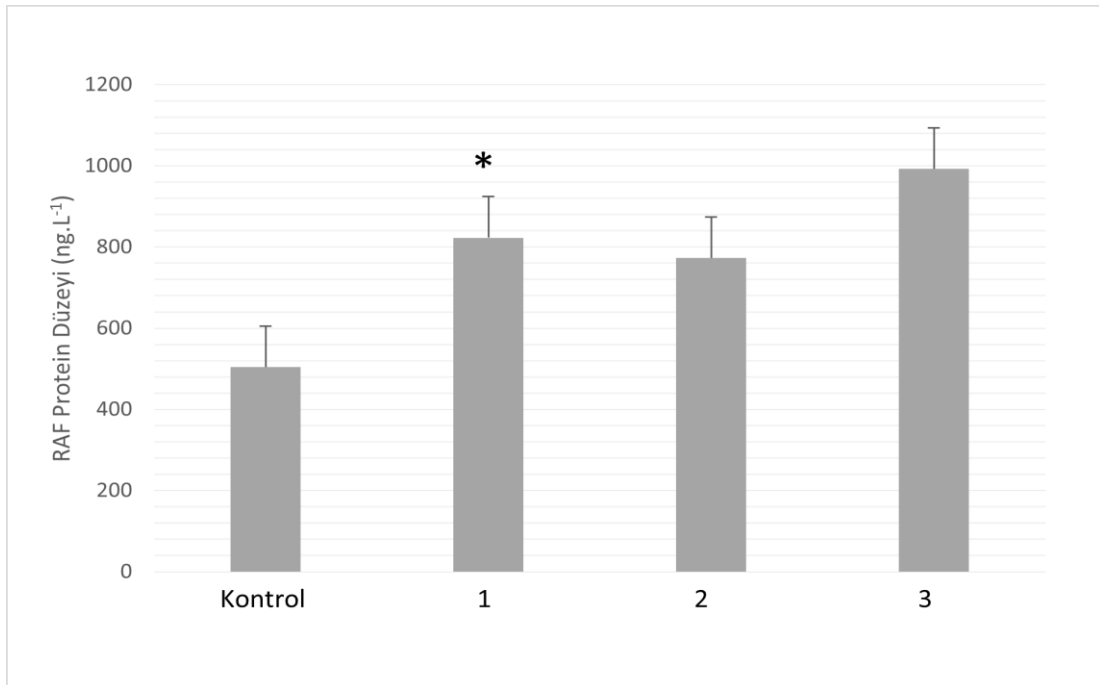
KR-PLGA-LPHNP ve KR-PCL-LPHNP formülasyonları ile hücrelerin 48 saat inkübasyonu sonunda hücrelerin K-RAS, RAF, MEK, ERK gen ekspresyon düzeyleri, referans gen ile (GAPDH) normalize edilmiş ve sonuçlar bağıl gen ekspresyonu olarak sunulmuştur. NCI-H2228 hücrelerindeki gen ekspresyon değişimleri incelendiğinde tüm genlerin ekspresyon düzeylerinde azalma eğilimi olduğu görülmüştür. RAF genindeki ekspresyon düzeyinin azalma eğiliminin KR-PLGA-LPHNP ve KR-PCL-LPHNP formülasyonları için istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) olduğu gözlemlenmiştir. MEK, ERK genlerindeki ekspresyon düzeylerindeki azalma eğilimi ise KR-PCL-LPHNPs formülasyonu için istatistiksel açıdan anlamlı ($p < 0.05$) olduğu görülmüştür.

4.9.2. ELISA Deneyi

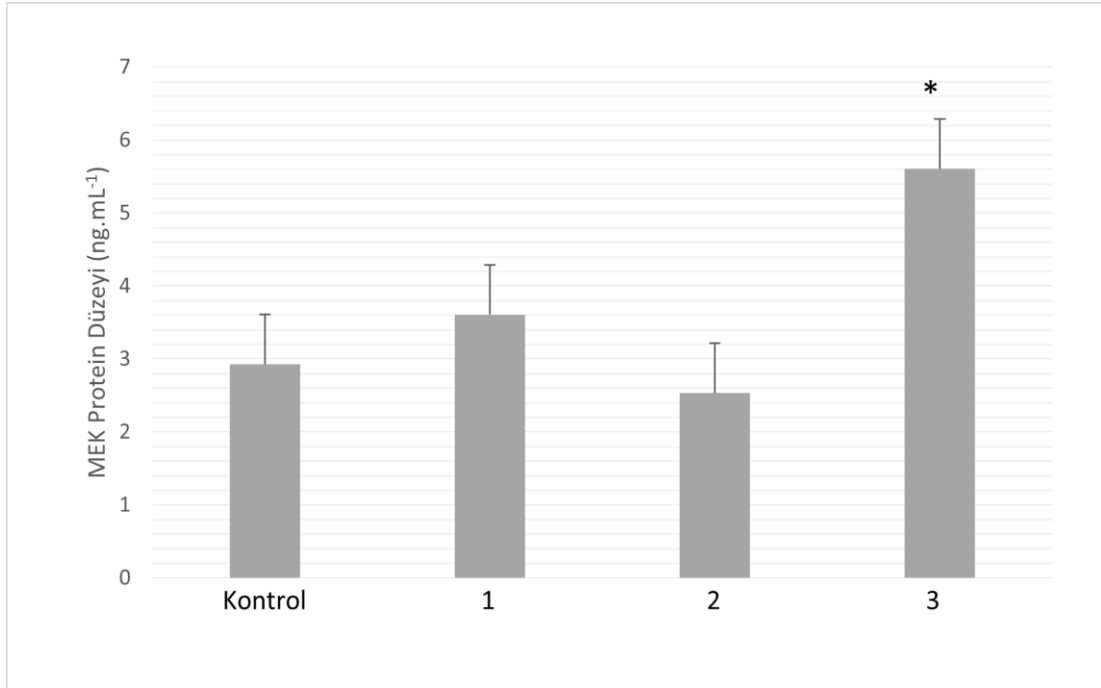
Hücrelere formülasyonların uygulanması sonrasında K-RAS, RAF, MEK, ERK proteinlerinin düzeyleri ELISA ile tayin edilmiştir ve NCI-H2228 hücrelerinde uygulama sonrası protein düzeylerine ilişkin sonuçlar Şekil 4.22.-4.25.'de verilmiştir.



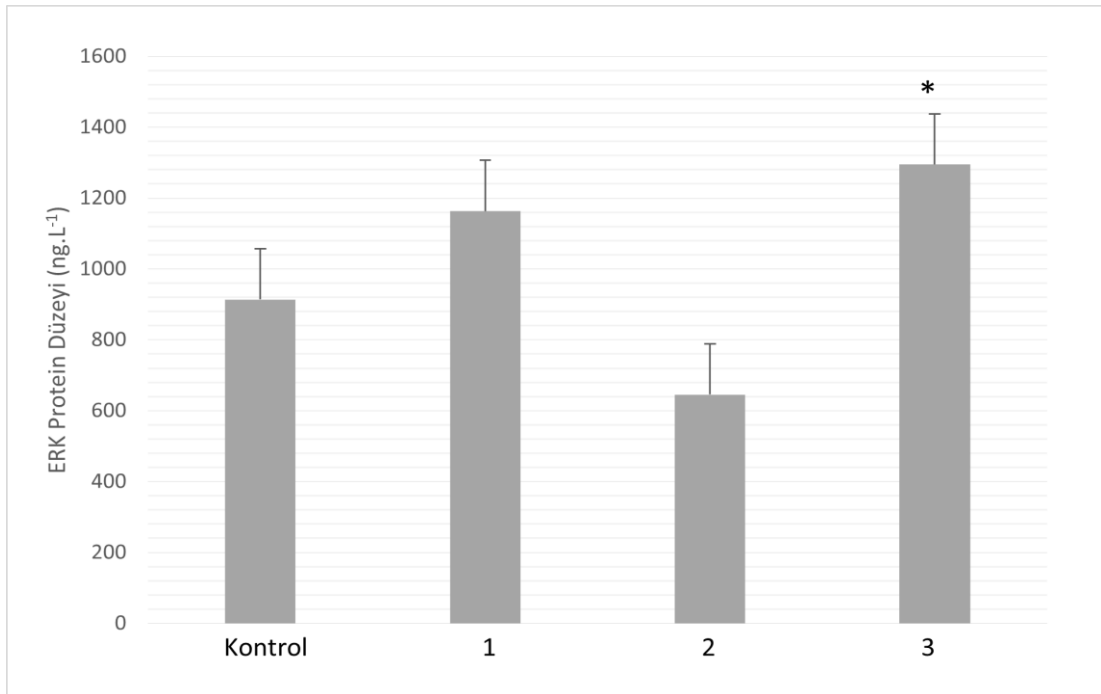
Şekil 4.22. NCI-H2228 hücrelerinde uygulama sonrası K-RAS protein düzeyleri (n=3, ortalama±SS) (1.Krizotinib, 2. KR-PLGA-LPHNP, 3. KR-PCL-LPHNP).



Şekil 4.23. NCI-H2228 hücrelerinde uygulama sonrası RAF protein düzeyleri (* p<0.05 kontrole karşı) (n=3, ortalama±SS) (1.Krizotinib, 2. KR-PLGA-LPHNP, 3. KR-PCL-LPHNP).



Şekil 4.24. NCI-H2228 hücrelerinde uygulama sonrası MEK protein düzeyleri (* $p < 0.05$ kontrole karşı) ($n=3$, ortalama \pm SS). (1.Krizotinib, 2. KR-PLGA-LPHNP, 3. KR-PCL-LPHNP).



Şekil 4.25. NCI-H2228 hücrelerinde uygulama sonrası ERK protein düzeyleri (* $p < 0.05$ kontrole karşı) ($n=3$, ortalama \pm SS) (1.Krizotinib, 2. KR-PLGA-LPHNP, 3. KR-PCL-LPHNP).

LPHNP'lerin etkinliğinin değerlendirilmesinde hedef genin alt yolağında bulunan genlerinin ekspresyon seviyelerinin yanında bu genler tarafından üretilen proteinlerin ekspresyon seviyeleri de değerlendirilmiştir. NCI-H2228 hücreleriyle 48 saatlik inkübasyon sonrasında K-RAS protein düzeyinde KR-PLGA-LPHNP ve KR-PCL-LPHNP formülasyonları ile azalma görölse de kontrol grubu ile karşılaştırıldığında protein düzeyindeki azalmanın istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı görölmüştür ($p>0.05$). RAF, MEK ve ERK protein düzeylerine bakıldığında; serbes krizotinib, KR-PLGA-LPHNP ve KR-PCL-LPHNP formülasyonları uygulanmasını takiben hücrelerde protein düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görölmemiştir ($p>0.05$).

5. TARTIŞMA

Tez çalışmalarımız kapsamında, küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin tedavisi amacıyla lipit-polimer hibrit nanopartiküller, Box-Behnken deney tasarımı kullanılarak geliştirilmiştir. Lipit-polimer hibrit nanopartiküllerin Box-Behnken deney tasarımı kullanılarak optimize edilmesinde hazırlama yönteminin ve farklı polimerlerin formülasyona etkisi değerlendirilmiştir. Geliştirilen lipit- polimer hibrit nanopartiküllerin *in vitro* karakterizasyon çalışmaları yürütülmüştür. Tez çalışmalarımız kapsamında elde ettiğimiz bulgular, tartışma bölümünde ayrıntılı şekilde literatür verileriyle karşılaştırmalı olarak incelenecektir.

5.1. Krizotinib yüklü Lipit-Polimer Hibrit Nanopartiküllerin Hazırlanması

Tez kapsamında LPHNP formülasyonlarının hazırlanmasında polimer çekirdek tabakası FDA tarafından onaylı biyouyumlu ve biyoparçalanır polimerler olan PLGA ve PCL polimerleri kullanılmıştır (180, 181). LPHNP formülasyonlarında hücreye penetrasyonu arttıran, polimer çekirdekten etken maddenin sızmasını engelleyen lipit tabaka için literatürde sıklıkla kullanılan doğal yapılı bir fosfolipid olan soya fosfatidilkolin kullanılmıştır (134, 182, 183). En dışta bulunan hidrofilik polimer katmanı için ise literatürde LPHNP formülasyonlarında en çok kullanılan lipit-PEG olan DSPE-PEG2000 kullanılmıştır (184-187).

Önformülasyon çalışmalarında LPHNP formülasyonları için farklı hazırlama yöntemleri belirlenmiştir. Tez kapsamında LPHNP formülasyonlarına farklı polimerlerin ve hazırlama yöntemlerinin etkisinin değerlendirilebilmesi için, krizotinib etken maddesinin suda çözünmemesini göz önünde bulundurarak, tek basamaklı hazırlama yöntemlerinden olan emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi ve nanoçöktürme yöntemi kullanılmıştır (133, 188, 189). Literatürde, emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yönteminde etken maddenin suda çözünürlüğüne bağlı olarak çift emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi (Y/S/Y emülsiyon tipi) veya emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi (Y/S emülsiyon tipi) kullanılmaktadır. Hidrofobik yapıya sahip krizotinib için formülasyonların hazırlanmasında emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yönteminde yararlanılmıştır. Yöntemde yağ fazı olarak diklorometan; su fazı olarak

%4 etanol-su (h/h) kullanılmıştır. Nanoçöktürme yönteminde ise krizotinibin çözüldüğü su ile karışabilir faz olarak aseton ve su fazı olarak da %4 etanol-su (h/h) kullanılmıştır. Hazırlama yöntemlerinin belirlenmesini takiben LPHNP'lerin polimer, lipit ve lipit-PEG miktarlarının belirlenmesi amacıyla çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Literatürde her iki hazırlama yönteminde kullanıldığı çalışmalarda genellikle lipit/polimer oranının %10-20 (a/a) arasında denendiği ve en ideal lipit/polimer oranının %15 (a/a) olduğu gösterilmiştir (120, 137, 190). Bu çalışmalar kapsamında, lipit/polimer oranının artmasıyla kritik misel konsantrasyonundan daha yüksek lipit konsantrasyonuna ulaşılmasıyla LPHNP oluşmasına ek olarak lipozomlarında olduğu; lipit/polimer oranının azalmasıyla da aglomerasyon gerçekleştiği gösterilmiştir (191-195). Ayrıca lipit tabakanın polimer çekirdeğin etrafını sarması nedeniyle lipit/polimer oranı formülasyonların ilaç yükleme oranını ve ilaç salım profilini etkilediği de belirlenmiştir (196, 197). En dış tabaka olan lipit-PEG tabakasının ise LPHNP formülasyonların koloidal stabilitesini sağlayan tabaka olduğu çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir (198, 199). Lipit-PEG tabakası içerecek ve içermeyecek şekilde hazırlanan LPHNP formülasyonlarında lipit-PEG yokluğunda, formülasyonun koloidal stabilitesinin sağlanmadığı ve formülasyonların agrege olduğu gösterilmiştir (132, 200). Gerçekleştirilen çalışmalar kapsamında lipit/lipit-PEG oranının %25 (a/a) olduğu formülasyonlarda pasif hedeflendirmeye uygun partikül büyüklüğünde (<400 nm), sterik stabil LPHNP formülasyonların hazırlanabildiği bildirilmiştir (136). Krizotinibin LPHNP formülasyonlarına hangi oranda eklememiz gerektiği kapsamındaki literatür tarama ve formülasyon deneme çalışmalarımız doğrultusunda da etkin madde/polimer oranı %5 (a/a) olacak şekilde formülasyon bileşen miktarları belirlenmiştir (108, 156, 201-203). Tüm bu bilgiler ve deneme çalışmaları kapsamında önformülasyon çalışmalarında LPHNP formülasyonları için polimer (10, 15, 20 mg), soya fosfatidilkolin (1.5, 2.25, 3 mg) ve DSPE-PEG200 (0.4, 0.6, 0.8 mg) miktarları belirlenmiştir.

5.2.Box-Behnken Deneysel Tasarımı İle Lipit-Polimer Hibrit

Nanopartiküllerin Ön Formülasyon Çalışmaları ve Optimizasyonu

Geleneksel ön formülasyon çalışmalarında değişkenlerin formülasyona etkisi incelenirken her bir deneyde yalnız bir değişken değiştirilip diğer değişkenler sabit

kalarak deneyler gerçekleştirilmektedir. Bu durum maliyetlidir ve değişkenler arası etkileşimlerin incelenmesine olanak sağlamamaktadır. Literatürde az sayıda deney ile çok sayıda değişkenin incelenebildiği çeşitli yöntemler bulunmaktadır (204-214). Tez kapsamında yapılan çalışmalarda öncelikle bağımsız değişkenler ve bu bağımsız değişkenlerin etkileyeceği cevap değişkenleri (bağımlı değişken) belirlenmiştir. Bağımsız değişken sayısının üç adet olması, birbirinden bağımsız formülasyonların olması ve değişkenlerin birbirleriyle olan ikinci dereceden etkileşimlerinin de incelenebilmesi amacıyla literatürde sıklıkla kullanılan, çalışma planımıza uyan ve üç veya daha fazla bağımsız değişkenin etkilerinin incelemesinde daha az deney sayısı ile hızlı sonuç alınabilen, Box-Behnken deney tasarımından yararlanılmıştır (215). Literatür taramaları ve ön çalışmalar yapılarak bağımsız değişkenlerin değerleri belirlenmiştir (124, 133). Bağımsız değişkenler ve üç farklı (düşük/orta/yüksek) düzeyi Tablo 3.1.'de verilmektedir. Formülasyonu etkileyen diğer faktörler (polimerlerin molekül ağırlığı (kDa), santrifüj hızı, santrifüj süresi, sonikasyon süresi, sonikasyon gücü) bağımlı değişkenlerin cevabını etkileyeceği için sabit tutularak formülasyonlar hazırlanmıştır. Deney tasarımının oluşturulması, deneylerin randomize edilmesi ve istatistiksel analizler için “Design Expert®13 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, ABD)” yazılımı kullanılmış, her bir hazırlama yöntemi ve polimer için olası 15 adet formülasyon oluşturulmuş, tüm formülasyonlar üç tekrarlı hazırlanmıştır. Deney tasarımı kapsamında, lipit-polimer hibrit nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan bağımsız değişkenleri ve miktarları Tablo 3.2’de gösterilmiştir. Tasarım kapsamında bağımsız değişkenlerin etkileyeceği cevap değişkenleri olarak partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değeri belirlenmiş; zeta potansiyelin -20/ -30 mV, partikül büyüklüğü ve PDI değerinin minimum değerde kalması amaçlanmıştır. Design Expert®13 yazılımı ile tasarım kapsamında değişkenler arasındaki etkileşimler incelenerek, formülasyondan elde edilen çıktılar değerlendirilmiş ve her bir cevap değişkeni için matematiksel denklem oluşturulmuştur. X_1 , X_2 ve X_3 bağımsız değişkenlerinin Y_1 , Y_2 ve Y_3 bağımlı değişkenlere uyumu (model uyumu), R^2 değerleri ile değerlendirilmiştir. Hazırlama yöntemi ve polimere göre formülasyonlar birbirinden bağımsız olarak kendi içlerinde değerlendirilmiştir. Bağımsız değişkenlerin bağımlı değişkenlere etkileri değerlendirilirken, p değerinden yararlanılmıştır.

Bağımsız değişkenlerin, bağımlı değişkenlere etkilerine ışıklı ANOVA analizleri incelendiğinde; nanoçöktürme yöntemi ve PLGA polimeri ile hazırlanan LPHNP formülasyonlarda partikül büyüklüğü üzerinde polimer miktarı, lipit miktarı, DSPE-PEG2000 miktarı ve polimer miktarı/DSPE-PEG2000 miktarı etkileşim etkisi anlamlı etki gösterirken; PDI değeri için polimer miktarı, lipit miktarı, DSPE-PEG 200 miktarı ve polimer miktarı/lipit miktarı ve polimer miktarı/DSPE-PEG200 miktarı etkileşim etkisi anlamlı etki göstermiştir ($p<0.05$). Zeta potansiyel değeri için ise lipit miktarı/DSPE-PEG200 miktarı etkileşim etkisi anlamlı etki göstermiştir ($p<0.05$). Formülasyonda ikinci dereceden etkiler anlamlı bulunmamıştır (Tablo 4.2.-4.4.).

Nanoçöktürme yöntemi ve PCL polimeri ile hazırlanan LPHNP formülasyonlarda partikül büyüklüğü üzerinde polimer miktarının ikinci dereceden etkisi dışında diğer bağımsız değişkenler ve etkileşim etkileri istatistiksel anlamlı bulunurken; PDI değeri için lipit miktarı, DSPE-PEG2000 miktarı ve polimer miktarı/DSPEPEG200 miktarı etkileşim etkisi anlamlı etki göstermiştir ($p<0.05$). Zeta potansiyel değeri için ise lipit miktarı/DSPE-PEG200 miktarı etkileşim etkisi anlamlı etki göstermiştir ($p<0.05$) (Tablo 4.6.-4.8.).

Emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi ve PLGA polimeri ile hazırlanan LPHNP formülasyonlarda partikül büyüklüğü üzerinde polimer miktarı, lipit miktarı ve polimer miktarı/DSPE-PEG2000 miktarı etkileşim etkisi anlamlı etki gösterirken PDI değeri için DSPE-PEG2000 miktarı, polimer miktarı/DSPE-PEG200 miktarı, lipit miktarı/DSPE-PEG200 miktarı etkileşim etkisi, polimer ve DSPE-PEG200 miktarının ikinci dereceden etkisi anlamlı etki göstermiştir ($p<0.05$). Zeta potansiyel değeri için ise lipit miktarı/DSPE-PEG200 miktarı etkileşim etkisi anlamlı etki göstermiştir ($p<0.05$) (Tablo 4.10.-4.12.).

Emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi ve PCL polimeri ile hazırlanan LPHNP formülasyonlarda partikül büyüklüğü için polimer miktarı ve lipit miktarı anlamlı etki gösterirken; PDI değeri için DSPE-PEG200 miktarı ve polimer miktarı/DSPE-PEG200 miktarı etkileşim etkisi anlamlı etki göstermiştir ($p<0.05$). Zeta potansiyel değeri için ise lipit miktarı/DSPE-PEG200 miktarı etkileşim etkisi anlamlı etki göstermiştir ($p<0.05$) (Tablo 4.14.-4.16.).

ANOVA analizleri sonucunda bütün formülasyonlar için polimer ve lipit miktarının partikül büyüklüğünü; DSPE-PEG 200 miktarının PDI değerini; soya fosfatidilkolin ve DSPE-PEG 200 arasındaki etkileşimin zeta potansiyel değerini istatistiksel olarak anlamlı etkilediği görülmektedir. Literatürde, Tahir ve arkadaşları tarafından, PLGA polimeri ve soya fosfatidilkolin lipidi ile Box-Behnken deney tasarımından yararlanılarak hazırlanan LPHNP formülasyonlarında da polimer ve lipit miktarının, partikül büyüklüğünü istatistiksel olarak anlamlı etkilediği; tez bulgularına benzer şekilde sabit polimer miktarında artan lipit miktarları ile partikül büyüklüğünün arttığı raporlandırılmıştır (216). Başka bir çalışma da Gajra ve arkadaşlarının Box-Behnken deney tasarımı ile hazırladığı LPHNP formülasyonlarında polimer ve lipit oranının partikül büyüklüğü üzerindeki etkisini değerlendirmiş, artan polimer ve lipit miktarları ile partiküllerin büyüklüklerinin de arttığını gözlemlemiştir (217).

DSPE-PEG 2000 miktarının PDI değişkeni üzerindeki istatistiksel anlamlı etkisi değerlendirildiğinde; DSPE-PEG 2000 bileşenin, nanopartiküllerin yüzey özelliklerini modifiye ettiği, yapısındaki PEG zincirleriyle partiküllere sterik engel oluşturarak agregasyonu engellediği ve tekdüze nanopartiküllerin oluşmasına olanak sağladığı bilinmektedir (132, 200). Literatürde Saraswat ve arkadaşlarının, dayanıklı ve tekdüze lipozomal nanopartiküller elde etmek amacıyla gerçekleştirdiği bir çalışmada, farklı molar oranlarda DSPE-PEG 2000 kullanılarak nanopartikül formülasyonları geliştirilmiş ve DSPE-PEG 2000 miktarının formülasyonun tekdüzeliğini etkilediği bildirilmiştir (218).

Lipit miktarı/DSPE-PEG200 miktarının zeta potansiyel değeri üzerindeki istatistiksel anlamlı etkisi değerlendirildiğinde ise; LPHNP formülasyonlarında kullanılan soya fosfatidilkolinin, zwitteriyon yapısında olması ve lipitin yapısındaki pozitif yüklü amonyum ve negatif yüklü fosfat grupları bulunması, soya fosfatidilkolin ile DSPE-PEG200 arasındaki etkileşimin nanopartiküllerin zeta potansiyel değerini etkilediği göstermektedir (219). Literatürde, tez çalışmalarında elde edilen sonuçlara benzer şekilde, Bhattacharya ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen Box-Behnken deney tasarımı ile LPHNP formülasyonlarının hazırladığı çalışmada; zeta potansiyel değeri üzerinde, lipit/lipit-PEG oranının istatistiksel olarak anlamlı etki gösterdiği bildirilmiştir (220).

Box-Behnken tasarımı ile bağımsız değişkenlerin cevap değişkenleri (bağımlı değişken) üzerine etkisinin matematiksel modellerle gösterilmesinin ardından hedeflenen partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değerine sahip optimum formülasyon bileşenlerinin elde edilebilmesi için hedef fonksiyonundan yararlanılmıştır (221, 222). Emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi ile PLGA polimeri ile hazırlanan LPHNP formülasyonlarda polimer miktarı, lipit miktarı ve DSPE-PEG200 miktarı sırasıyla 17 mg, 1.5 mg ve 0.6 mg iken nanoçöktürme yöntemi ile PLGA polimeri ile hazırlanan LPHNP formülasyonlarda polimer miktarı, lipit miktarı ve DSPE-PEG200 miktarı sırasıyla 12 mg, 1.5 mg ve 0.7 mg olarak belirlenmiştir. Emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi ile PCL polimeri ile hazırlanan LPHNP formülasyonlarda ise polimer miktarı, lipit miktarı ve DSPE-PEG200 miktarı sırasıyla 14 mg, 1.6 mg ve 0.8 mg iken nanoçöktürme yöntemi ile PCL polimeri ile hazırlanan LPHNP formülasyonlarda polimer miktarı, lipit miktarı ve DSPE-PEG200 miktarı sırasıyla 10 mg, 1.5 mg ve 0.6 mg olarak belirlenmiştir. Belirlenen formülasyon bileşenleri ile hazırlanan optimum formülasyonlara ait tahmin edilen ve gözlenen değerler, fark, hata yüzdesi 4.1.Lipit-Polimer Hibrit Nanopartiküllerin Optimizasyonu: Box-Behnken Deney tasarımı'nda Tablo 4.18.–4.21.'de verilmiştir.

5.3. Lipit-Polimer Hibrit Nanopartiküllerin Partikül Büyüklüğü, Partikül Büyüklük Dağılımı ve Zeta Potansiyel Değerleri

Tez çalışmaları kapsamında, ön formülasyon çalışmalarında hazırlanan ilaç yüklü olmayan LPHNP formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel sonuçları Tablo 4.1, Tablo 4.5, Tablo 4.9 ve Tablo 4.13.' de verilmektedir. PLGA ile emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan ilaç yüklü olmayan LPHNP formülasyonlarına ait ortalama ortalama partikül büyüklüğü 203-387 nm, PDI 0.1-0.4 aralığında; PCL ile emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan ilaç yüklü olmayan LPHNP formülasyonlarına ait ortalama ortalama partikül büyüklüğü 228-354 nm, PDI 0.1-0.4 aralığında; PLGA ile nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanan ilaç yüklü olmayan LPHNP formülasyonlarına ait ortalama ortalama partikül büyüklüğü 135-180 nm, PDI 0.1-0.3 aralığında; PCL ile nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanan ilaç yüklü olmayan LPHNP

formülasyonlarına ait ortalama ortalama partikül büyüklüğü 195-285 nm, PDI 0.1-0.2 aralığında bulunmuştur. Hazırlanan ilaç yüklü olmayan, dört farklı LPHNP formülasyonlarında polimer ve lipit miktarının artmasıyla partiküllerin boyutlarının arttığı, optimizasyon çalışmaları ile uyumlu şekilde, PDI ve zeta potansiyel değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmadığı ($p>0.05$) görülmüştür. Literatürde de benzer şekilde, Venugopal ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, formülasyonda polimer miktarının artmasıyla nanopartiküllerin büyüklüklerinde artış gözlenebileceği bildirilmiştir (223). Zhao ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada, benzer şekilde, polimer ve lipit miktarının artmasıyla, nanopartiküllerin partikül büyüklüklerinin arttığı raporlandırılmıştır (224).

Hazırlanan bütün formülasyonlarda zeta potansiyel değerinin DSPE-PEG2000 kaynaklı negatif değerde olduğu görülmüştür. DSPE-PEG2000 yapısındaki DSPE (1,2-distearoil-sn-glisero-3-fosfoetanolamin) anyonik yapıya sahip bir lipit; PEG 2000 zinciri ise nötral yapıya sahip bir polimerdir (225). Literatürde çeşitli çalışmalarda, LPHNP formülasyonlarında kullanılan DSPE-PEG2000 bileşeninin anyonik özellik göstermesi sonucu nanopartiküllerin zeta potansiyel değerini negatif olduğu bildirilmiştir (226-228).

Formülasyonlarda kullanılan polimer tipine bağlı olarak LPHNP'lerin partikül büyüklüğündeki değişimin (PLGA polimeri ile hazırlanan LPHNP formülasyonlarının PCL ile hazırlanan LPHNP formülasyonlarına göre ortalama partikül büyüklüğü küçüktür) istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) olduğu gözlenirken; PDI ve zeta potansiyel değerlerinde anlamlı bir değişiklik olmadığı gözlemlenmiştir ($p>0.05$). Partikül büyüklüğünü, kullanılan polimerin molekül ağırlıkları, zincir uzunlukları ve farklı yapılarının etkilediği bilinmektedir (229). Bu özelliklere ek olarak polimerlerin lipitler ile etkileşimi de partikül büyüklüğünü etkilemektedir (229). Literatürde, Raval ve arkadaşlarının PLGA ve PCL polimerleri ile ayrı olarak hazırladığı nanopartikülleri karşılaştırdığında, nanopartiküllerin partikül büyüklükleri arasında istatistiksel anlamlı fark olduğunu bildirmiştir (230).

Box-Behnken deney tasarımı ile belirlenen optimum PLGA ve PCL polimerleri ile emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemiyle hazırlanan krizotinib yüklü LPHNP formülasyonlarında faz ayrışması gözlemlenmiş; partiküller elde edilememiştir. Bu nedenle PLGA ve PCL polimerleri ile nanoçöktürme yöntemi ile

hazırlanmış krizotinib yüklü LPHNP formülasyonları ile çalışmalara devam edilmiştir. Box-Behnken deney tasarımı ile belirlenen optimum ilaç yüklü olmayan ve krizotinib yüklü LPHNP formülasyonları (Tablo 4.22.-4.23.) nanoçöktürme yöntemiyle hazırlanmış ilaç yüklü olmayan PLGA LPHNP formülasyonlarının partikül büyüklüğü ortalama 134.0 ± 4.063 nm, PDI 0.148 ± 0.012 ve zeta potansiyel değeri -22.9 ± 0.780 iken KR-PLGA-LPHNP formülasyonlarının partikül büyüklüğü ortalama 124 ± 0.9609 nm, PDI 0.225 ± 0.001 ve zeta potansiyel değeri -10.4 ± 0.327 mV olarak ölçülmüştür. Optimum ilaç yüklü olmayan nanoçöktürme yöntemiyle hazırlanmış PCL LPHNP formülasyonlarının ise partikül büyüklüğü ortalama 215.6 ± 1.588 nm, PDI 0.124 ± 0.010 ve zeta potansiyel değeri -28.6 ± 0.462 mV iken KR-PCL-LPHNP formülasyonlarının partikül büyüklüğü ortalama 211.8 ± 1.701 nm, PDI 0.123 ± 0.005 ve zeta potansiyel değeri -7.55 ± 0.445 mV olarak ölçülmüştür. Bu durumda LPHNP'lere krizotinib yüklenmesiyle partikül büyüklüğünün ve PDI değerinin istenen aralıkta kaldığı istatistiksel olarak anlamlı değişimin gözlenmediği; zeta potansiyel değerinin pozitif yönde arttığı (katyonikleştiği) görülmüştür. Zeta potansiyel değerindeki bu değişimin; krizotinibin, LPHNP bileşenleri (polimer ve lipid) ile etkileşime girerek nanopartiküllerin yüzey yükü özelliklerini değiştirmesi kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Literatürde, Zhong ve arkadaşları tarafından krizotinib ile sorafenib etken maddesinin kombine kullanıldığı nanopartikül formülasyonunda; formülasyondaki krizotinib miktarının artması ile nanopartiküllerin zeta potansiyel değerinin katyonikleştiği gösterilmiştir (202).

Literatür ile karşılaştırıldığında, tez çalışmalarında hazırlanan krizotinib yüklü LPHNP formülasyonlarının partikül büyüklüklerinin (< 400 nm) pasif hedeflendirme için uygun büyüklükte olduğu; formülasyonların tekdüze dağılım gösterdiği (PDI <0.3) görülmektedir (231-235). Nanopartiküllerin pasif hedeflenmesinde nanopartiküllerin partikül büyüklükleri yanında nanopartiküllerin yüzey yükleri ve şekillerinin önemli olduğu bilinmektedir (236). LPHNP formülasyonlarının zeta potansiyel değerleri incelendiğinde ise negatif zeta potansiyelin literatür ile uyumlu olduğu görülmektedir (175, 237-241). Zeta potansiyel, nanopartiküler sistemlerde fiziksel stabiliteyi gösteren bir değer olmasının yanı sıra nanopartiküller de kullanılan lipidlerin yapısına göre değeri negatif veya pozitif olarak değişmektedir (137, 242). Literatürde *in vivo* ortamda negatif zeta potansiyele sahip nanopartiküllerin, pozitif zeta potansiyele sahip

nanopartiküllerden daha az toksik, daha kararlı oldukları ve en dayanıklı kolloidal sistemlerin 20 ± 30 mV zeta potansiyele sahip sistemler olduğu belirtilmektedir ancak zeta potansiyel değerinin tek başına fiziksel stabilite göstergesi olmadığı da bilinmektedir (243-245). Hazırlanan krizotinib yüklü olmayan optimum LPHNP formülasyonlarının zeta potansiyel değerleri $-10/-30$ mV aralığındayken, krizotinib yüklü LPHNP formülasyonlarının zeta potansiyel değerleri yaklaşık -10 mV değerindedir.

5.4. Lipit-Polimer Hibrit Nanopartiküllerin Morfolojik Özellikleri

Tez çalışması kapsamında, LPHNP formülasyonlarının morfolojik olarak incelenmesinde TEM görüntüleme tekniği kullanılmıştır. Şekil 4.7.-4.10.'da krizotinib yüklü olmayan ve krizotinib yüklü LPHNP'lere ait TEM görüntüleri incelendiğinde LPHNP formülasyonların agregate olmadığı, düzgün yüzeyli ve küresel yapıda olduğu ve koyu renkli polimer çekirdeğini çevreleyen daha açık renkli fosfolipid tabakasına sahip olduğu görülmektedir. LPHNP formülasyonlarına ait koyu renkli polimer çekirdek ve açık renkli lipit tabakası görüntüsünün literatürdeki diğer LPHNP formülasyonlarındaki TEM görüntülerinde de benzer olduğu görülmüştür (246-250). Koyu renkli polimer çekirdek etken maddenin yüklenmesi ve nanopartiküllerden kontrollü salımın gerçekleşmesi için gerekli bir yapıyken; açık renkli lipit tabakası nanopartiküllerin dış kabuğunu ve yüzeyinin oluşturarak stabiliteyi sağlayarak agregasyonu önlemek ve hedef hücreler/dokular ile etkileşim için gerekli bir yapıdır (189). Malvern Zetasizer NanoZS ve TEM görüntüleri karşılaştırıldığında; nanopartiküllerin partikül büyüklüklerinin birbiri ile tutarlı olduğu, partiküllerin homojen olarak dağılım gösterdiği görülmektedir. TEM görüntüleri bireysel partiküllerin çapının ölçülmesine olanak sağlarken, NanoZS ile edilen görüntülerde daha geniş partikül popülasyonun ölçümü gerçekleştirilmekte ve genellikle bir dağılım profili hakkında ortalama değer elde edilmektedir (251). TEM ve NanoZS ölçümleri sonucu benzer partikül büyüklüklerinin gözlenmesi nanopartiküllerin agregate olmadığını homojen olarak dağılım gösterdiğini göstermektedir.

5.5. Krizotinibin HPLC ile Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu

Tez çalışmaları kapsamında krizotinib etkin maddesi için HPLC ile miktar tayini yöntemi literatürdeki yöntemlerin modifiye edilmesiyle geliştirilmiş ve geliştirilen yöntemin validasyonu başarıyla tamamlanmıştır. HPLC yönteminin doğrusallık çalışmaları 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 0.005, 0.001 mg.mL⁻¹ konsantrasyonlarında gerçekleştirilmiş ve çalışılan standart konsantrasyonlarına karşılık HPLC analizi ile elde edilen piklerin alanlarının doğrusal orantı da olduğu tayin edilmiştir. Analiz sonucunda kalibrasyon doğrusu için R² değeri 0.998 olarak tayin edilmiştir. Değişkenler arasındaki ilişkiyi belirten 1'e yakın olması istenen R² değeri, konsantrasyon aralığımız da yöntemin doğrusal olduğunu göstermiştir. Validasyon çalışmaları kapsamında doğruluk parametresi kalibrasyon aralığında bulunan üç konsantrasyonda (yüksek, orta ve düşük) tayin edilmiştir. % Geri kazanım değerleri % 98 ve % 100,07 aralığında bulunmuştur (Tablo 4.24.). Literatür çalışmaları ve uluslararası kılavuzlar incelendiğinde tayin edilen geri kazanım değerleri yöntemin doğruluğunu göstermiştir (252, 253). Kesinlik parametresi, doğruluk parametresi gibi üç konsantrasyonda (yüksek, orta ve düşük) tekrar edilebilirlik ve tekrarlanabilirlik olarak tayin edilmiştir. Kesinlik parametresi değerlendirilirken ölçüm sonucu % varyasyon katsayısının ≤ %2 olması istenmektedir. Çalışmalarımıza tekrar edilebilirlik ve tekrarlanabilirlik parametrelerinin % varyasyon katsayılarının %2'den küçük olması geliştirilen HPLC yönteminin tekrar edilebilir ve tekrarlanabilir olduğunu göstermiştir (Tablo 4.25.-4.26.). Seçicilik parametresi için LPHNP formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan yardımcı maddelerin pikleri ile krizotinibe ait pik karşılaştırılmış piklerin girişim yapmadığı gösterilmiştir (Şekil 4.12.). HPLC yönteminin krizotinib ve hazırlanan LPHNP formülasyonları için seçici olduğu tayin edilmiştir. Duyarlılık parametresinin incelenmesi kapsamında krizotinib için LOD 68,59 ng/mL, LOQ ise 162,40 ng/mL olarak tayin edilmiştir. HPLC yönteminin krizotinib için nanogram seviyesinde doğru ve hassas şekilde ölçüm yapılabildiği gösterilmiştir.

5.6. Krizotinib yüklü Lipit-Polimer Hibrit Nanopartiküllerin İlaç Yükleme Etkinliği ve *in vitro* Krizotinib Salım Çalışmaları

Tez kapsamında hazırlanan LPHNP formülasyonlarına yüklenen krizotinib miktarlarının belirlenebilmesi için ilaç yükleme etkinliği çalışması gerçekleştirilmiştir. Literatürde kullanılan polimerin ve lipitin cinslerinin, miktarlarının ve solvanlarda çözünürlüğünün, polimer-lipit etkileşimi, polimer-etken madde etkileşiminin ilaç yükleme etkinliğini değiştirdiği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (254). İlaç yükleme etkinliğine ait bulgulara bakıldığında KR-PLGA-LPHNP ve KR-PCL-LPHNP formülasyonları için sırasıyla %79.25±0.07 ve %70.93±1.81 olarak elde edilmiştir. Literatürde, bulgularımıza benzer şekilde, PLGA ve PCL polimerlerinin sahip oldukları benzer hidrofobik özellikleri nedeniyle, suda çözünmeyen krizotinibin, LPHNP formülasyonlarındaki hidrofobik polimer çekirdek bölgesine affinitesinin benzer olabileceği bildirilmektedir (230). Literatürde, Mota ve arkadaşları tarafından PLG ve PCL polimerleriyle hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının ilaç yükleme etkinliği karşılaştırılmış, iki polimer için ilaç yükleme etkinliklerinin benzer olduğu tespit edilmiştir (255).

Literatürde krizotinib yüklü nanopartiküller ile yapılan ilaç yükleme etkinliği çalışmaları incelendiğinde ise; Jiang ve arkadaşları tarafından hazırlanan krizotinib yüklü polilaktik-tokoferil polietilen glikol 1000 süksinat polimerik misellerin ilaç yükleme etkinliği çalışmalarının benzer şekilde indirekt yöntem ile gerçekleştirildiği ve ilaç yükleme etkinliği sonuçlarının tez çalışmalarına benzer olduğu görülmektedir (108). Diğer bir çalışma da Wang ve arkadaşları krizotinib yüklü polidopamin ile değiştirilmiş polilaktit-tokoferil polietilen glikol 1000 süksinat polimerik nanopartikül sistemlerin ilaç yükleme etkinliğinin %83.95±3.23 olduğunu raporlandırmıştır (201). Başka bir çalışmada Melo-Diogo ve arkadaşları krizotinib, palbosiklib ve sildenafil etken maddelerini kombine olarak D-a-tocopheryl polietilen glikol 1000 süksinat-polilaktik asit polimerik misellere yüklemiş ve krizotinib için enkapsülasyon etkinliğini %77±3 olarak bildirmiştir (156). Literatürde krizotinib etken maddesinin tek başına veya kombine halde yüklendiği sınırlı sayıda nanopartikül formülasyon çalışmaları ilaç yükleme etkinliği çalışmaları incelendiğinde sonuçlarının tez kapsamında yapılan çalışmaların sonuçları ile uyumlu olduğu görülmektedir.

Krizotinib yüklü LPHNP formülasyonlarının *in vitro* salım profillerinin elde edilmesi amacıyla; örneklerden farklı zaman noktalarında örnekler alınarak salım profili oluşturulmuştur (Şekil 4.13.). Zamana karşı-% kümülatif salım profili incelendiğinde KR-PLGA-LPHNP ve KR-PCL-LPHNP formülasyonların da krizotinib salım profilleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p < 0.05$). Krizotinib yüklü PCL polimeri ile hazırlanan LPHNP formülasyonlarında krizotinibin ani patlama şeklinde (burst release) salım gösterdiği ve krizotinibin yaklaşık %100'ünün 48 saat içerisinde salındığı görülmüştür. Krizotinib yüklü PLGA polimeri ile hazırlanan LPHNP formülasyonların da ise herhangi bir patlama etkisi görülmeden kademeli ve kontrollü olarak, 96 saat içerisinde krizotinibin yaklaşık %100'ünün salındığı görülmüştür. KR-PLGA-LPHNP formülasyonların da gözlenen salım profiline benzer şekilde, Jiang ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada krizotinibin PLA polimerik misellerinden salımına ait salım profili incelendiğinde iki aşamalı bir salım gerçekleştiği bildirilmiştir. İki aşamalı salımın ilk 24 saatinde daha hızlı bir salım ile ilacın yaklaşık %40'ının salındığı gözlenirken devam eden 96 saatte krizotinibin yaklaşık %100'ünün kontrollü bir salım gösterdiği rapor edilmiştir. Serbest krizotinib ve krizotinib yüklü nanopartiküllerin salım profillerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, krizotinib yüklü nanopartiküllerden salımın *in vitro* salım çalışmalar ile elde edilen salım profilleri ile benzer yavaş ve kontrollü olduğu bildirilmiştir (108). İlaç salımını, partikül büyüklüğü, zeta potansiyel değeri, ilaç yükleme etkinliği, ilacın polimer çekirdek-lipit tabaka ile etkileşimi, formülasyonda kullanılan polimerin cinsi, miktarı, hidrofobisitesi ve kimyasal yapısı gibi bir çok faktör etkilemektedir (256, 257). Bu sebeple iki farklı polimer ile hazırlanmış LPHNP formülasyonlarında salım profillerinin birbirinden farklı tayin edilmesi beklenen ve literatürde çalışmalarda karşılaşılan bir durumdur (258, 259). Elde edilen *in vitro* salım profilleri, konvansiyonel sistemlerin salım profilleri ile karşılaştırıldığında gözlenen kontrollü ve sürekli salım profilinin ilacın kan dolaşımında kalma süresinin artması ve tümöre hedeflenme açısından avantajlı olduğu bildirilmektedir (260).

5.7. Krizotinib yüklü Lipit-Polimer Hibrit Nanopartiküllerin Stabilité Çalışmaları

Krizotinib yüklü LPHNP formülasyonları sulu dispersiyon halinde -20°C , $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}/60\% \text{RH}\pm 5\% \text{RH}$, $4^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ ve $40^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}/75\% \text{RH}\pm 5\% \text{RH}$ ortamlarında 6 ay süreyle bekletilerek *in vitro* fiziksel stabilite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Farklı koşullarda saklanan LPHNP formülasyonlarının partikül büyüklüğü, PDI değeri ve zeta potansiyel değerleri ölçülmüştür. Hem PLGA hem PCL ile hazırlanan lipit-polimer hibrit nanopartikül formülasyonlarının $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}/60\% \text{RH}\pm 5\% \text{RH}$ ve $40^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}/75\% \text{RH}\pm 5\% \text{RH}$ ortamlarında stabilitesi incelendiğinde 1. ay sonunda formülasyonlarda mikrobiyolojik üreme gerçekleşmiş ve formülasyonların stabil olmadığı gözlenmiştir. PLGA ile hazırlanan Krizotinib yüklü lipit-polimer hibrit nanopartiküllerin, -20°C 'deki stabilitelere bakıldığında ilk 3 aydan sonra agregasyonun giderek arttığı buna bağlı olarak da partikül büyüklüğü ve PDI değerinin (partiküllerin homojenizitesi azaldığı) istatistiksel anlamlı olarak arttığı, zeta potansiyelinin istatistiksel anlamlı olarak katyonikleştiği ($p<0.05$) ; $4^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ ortamındaki stabilitelere bakıldığında ise -20°C 'ye göre partikül büyüklüğü ve PDI değerinin daha küçük kaldığı, zeta potansiyelinde istatistiksel anlamlı bir değişimin olmadığı gözlemlenmiştir ($p>0.05$). KR-PCL-LPHNP formülasyonlarında KR-PLGA-LPHNP formülasyonlarına benzer şekilde -20°C 'de ilk 3 aydan sonra partikül büyüklüğü ve PDI değerlerinin arttığı, zeta potansiyelinde pozitif yöne doğru azaldığı ($p<0.05$); $4^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ ortamındaki LPHNP formülasyonlarının -20°C 'deki LPHNP formülasyonlarından daha stabil kaldığı gözlemlenmiştir.

Literatürde Mandal ve arkadaşları tarafından tez çalışmamıza benzer şekilde hazırlanan LPHNP formülasyonlarının $2-8^{\circ}\text{C}$ 'de sulu dispersiyonda 30 gün süreyle ve 37°C 'de %50 FBS ortamında 24 saat süreyle stabilite çalışmaları gerçekleştirmiştir. Çalışmanın sonucunda 30 gün süreyle $2-8^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilen LPHNP formülasyonların da benzer şekilde partikül büyüklüğü ve PDI değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı değişiklik gözlenmemiştir ($p>0.05$). 24 saat süreyle 37°C 'de %50 FBS ortamında bekletilen LPHNP formülasyonlarının ise ilk 12 saatte stabil olduğu devam eden 12 saat içerisinde formülasyonların stabilitesinin azaldığı gösterilmiştir (65). Yue ve arkadaşlarının yaptığı LPHNP formülasyonlarının stabilitesini dispersiyon halinde

4°C’de 3 ay süreyle takip etmişlerdir. Stabilite çalışmaları sonucunda 3 ayın sonunda, tez kapsamında yapılan çalışmalara benzer şekilde, formülasyonların partikül büyüklüğü ve PDI değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı değişikliğin meydana gelmediğini bildirmişlerdir (261). Krizotinib yüklü LPHNP formülasyonlarının stabilite çalışmalarıyla elde edilen sonuçlar ve literatür doğrultusunda LPHNP formülasyonlarının fiziksel stabilitesini korumaları için 4°C±1°C ortamında saklanmalarının uygun olduğu görülmüştür.

5.8. Krizotinib yüklü Lipit-Polimer Hibrit Nanopartiküllerin Hücre Kültürü Çalışmaları

Serbest krizotinib, krizotinib yüklü olmayan LPHNP ve krizotinib yüklü LPHNP formülasyonlarının NCI-H2228 hücre hatlarının proliferasyonu üzerindeki etkilerinin saptanabilmesi için XTT yöntemi kullanılarak, IC₅₀ (yarı maksimum inhibisyon konsantrasyonu) değerleri hesaplanmıştır. Literatür taraması ile belirlenen konsantrasyonlara karşılık NCI-H2228 hücrelerinin canlılığına ilişkin veriler Şekil 4.15.-4.17.’de sunulmuştur. NCI-H2228 hücreleri ile farklı konsantrasyonlarda LPHNP formülasyonlarının 48 saat inkübasyonu sonucunda KR-PLGA-LPHNP formülasyonu için IC₅₀ değeri 0.366 µM; KR-PCL-LPHNP formülasyonu için IC₅₀ değeri 0.295 µM; serbest krizotinib için IC₅₀ değeri 0.710 µM olarak hesaplanmıştır. KR-PCL-LPHNP ve KR-PLGA-LPHNP formülasyonlarının IC₅₀ değerleri arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı (p>0.05); serbest krizotinib ile LPHNP formülasyonlarının IC₅₀ değerleri arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05) olduğu görülmüştür. IC₅₀ değerleri açısından literatürle uyumlu olarak, LPHNP formülasyonlarının serbest krizotinibe göre daha etkin bir sitotoksikite gösterdiği saptanmıştır (175, 262). Krizotinib yüklü olmayan LPHNP formülasyonlarının ise hücrelerle 48 saat inkübasyon sonrasında önemli bir toksik etki göstermediği gözlemlenmiştir.

Literatürdeki hücre kültürü çalışmaları incelendiğinde; Tahir ve arkadaşları tarafından, PLGA polimeri ve soya fosfatidilkolin lipidi kullanarak metotraksat yüklü LPHNP formülasyonları geliştirilmiş; ilaç yüklü ve ilaç yüklü olmayan LPHNP formülasyonlarının sitotoksik etkilerini üç farklı hücre hattında (meme, kolarektal ve prostat kanseri hücre hatları) tayin etmişlerdir (216). Çalışmanın sonucunda, tez

çalışmalarına benzer şekilde, ilaç yüklü olmayan LPHNP formülasyonlarında her üç hücre hattında da sitotoksik etki göstermezken, ilaç yüklü LPHNP formülasyonu hücre hatlarında sitotoksik etki gösterdiği görülmüştür (216). Khan ve arkadaşlarının sisplatin yüklü LPHNP formülasyonlarıyla over kanser hücrelerinde gerçekleştirdiği çalışmada, sisplatin içermeyen LPHNP formülasyonlarının hücrelere sitotoksik etki göstermezken sisplatin yüklü LPHNP formülasyonlarının ve sisplatin çözeltisinin hücrelerde zamana ve doza bağımlı olarak sitotoksik etki gösterdiğini bildirmişlerdir (263). Başka bir çalışmada, Li ve arkadaşlarının 5-fluorourasil, irinotekan, oksiplatin kombine olarak LPHNP formülasyonlarına yüklediği bir diğer çalışmada, kombine ilaç yüklü LPHNP formülasyonlarının, ilaç yüklü olmayan LPHNP formülasyonlara göre pankreas kanseri hücrelerinde sitotoksitesinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir (264). Tez çalışmalarından elde edilen sonuçlar ve literatür doğrultusunda, etken madde yüklü LPHNP formülasyonları *in vitro* hücre kültüründe hücre canlılığını azaltan etki gösterirken; etken madde yüklü olmayan LPHNP formülasyonlarının uygulama dozunda toksik etki göstermediği görülmektedir.

5.9. Krizotinib Yüklü Lipit-Polimer Hibrit Nanopartiküllerinin Gen ve Protein Düzeyinde İnhibitör Etkilerinin Değerlendirilmesi

Krizotinib içeren (0,3 μ M) KR-PLGA-LPHNP ve KR-PCL-LPHNP formülasyonları ile hücrelerin 48 saat inkübasyonu sonunda hücrelerin K-RAS, RAF, MEK, ERK gen ekspresyon düzeyleri, referans gen ile (GAPDH) normalize edilmiş ve sonuçlar bağıl gen ekspresyonu olarak Şekil 4.18.-4.21.'de sunulmuştur. NCI-H2228 hücrelerindeki gen ekspresyon seviyelerinin değişimleri incelendiğinde, LPHNP formülasyonlarının uygulanmasını takiben K-RAS gen ekspresyonunda gözlemlenen azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamasına rağmen RAF genindeki ekspresyon düzeyinin azalma eğiliminin KR-PLGA-LPHNP ve KR-PCL-LPHNP formülasyonları için istatistiksel açıdan anlamlı ($p<0.05$) olduğu gözlemlenmiştir. MEK, ERK genlerindeki ekspresyon düzeylerindeki azalma eğilimi ise KR-PCL-LPHNP formülasyonu için istatistiksel açıdan anlamlı ($p<0.05$) olduğu görülmüştür. Sadece serbest krizotinib uygulanan hücrelerdeki yüksek gen ekspresyon seviyeleri ise, krizotinibin serbest halinde uygulama konsantrasyonunun gen ekspresyonunu azaltmada yeterli olmadığını göstermiştir.

Literatürde, Gencer ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada K-RAS gen ekspresyon seviyelerindeki azalma karşılaştırılmış; gen ekspresyonlarındaki azalma en çok DOTAP ile modifiye edilmiş siRNA yüklü PLGA nanopartiküllerinde, sonrasında hyalüronik asit ile kaplanmış DOTAP ile modifiye edilmiş siRNA yüklü PLGA nanopartiküllerinde ve siRNA yüklü PLGA nanopartiküllerinde görülmüştür. Formülasyonlar arası gen ekspresyon seviyelerindeki azalma eğiliminin farklı olmasının nedeninin nanopartiküllerin partikül büyüklüklerinin ve yüzey potansiyellerinin farklı olması hücreye giriş miktarlarının değişmesi kaynaklı olabileceği bildirilmiştir. Çalışmada, siRNA yüklü PLGA nanopartiküllerinin anyonik yüzey potansiyelleri nedeniyle gen seviyesinde en az azalma gözlemlendiği, hyalüronik asit ile kaplanmış DOTAP ile modifiye edilmiş siRNA yüklü PLGA nanopartiküllerinin ise partikül büyüklüğünün artması kaynaklı hücreye girişin azalmasına neden olduğu, ve ekspresyonun daha az oranda azaldığı bildirilmiştir (265). Zhang ve arkadaşlarına ait bir diğer çalışmada ise RAF/MEK/ERK sinyal yolağında genlerin susturulması amacıyla nanopartiküler sistem ve fotodinamik tedavi kombine edilerek kullanmıştır. Çalışmada tek başına nanopartiküler sistem uygulanması ile yeterli azalma sağlanamayan RAF/MEK/ERK ekspresyon seviyelerinde kombine tedavi ile istatistiksel olarak anlamlı azalma gerçekleştirildiği gösterilmiştir (266).

Tez çalışmaları kapsamında literatür ile uyumlu olarak, KR-PLGA-LPHNP formülasyonlarında RAS, MEK, ERK genlerinin ekspresyon seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı azalmadığı; KR-PCL-LPHNP formülasyonlarında ise RAS geninin ekspresyon seviyesinin istatistiksel açıdan anlamlı azalmadığı görülmüştür ($p>0.05$). Bu durumun nedenleri olarak; nanopartiküllerin karakteristik özelliklerinin farklı olması, EML4-ALK geninin alt yolağında bulunan RAS, RAF, MEK, ERK genlerinin aynı zamanda başka genlerinde alt yolağında bulunması ve bu yolların krizotinib etken maddesi ile inhibe edilememesi olduğu yönünde değerlendirilmiştir (267-271).

LPHNP formülasyonlarının etkinliğinin değerlendirilmesinde hedef genin (ALK) downstream yolağındaki genlerin ekspresyon düzeyleri yanında bu genlerin ifade ettiği proteinlerin de ekspresyon düzeylerinin ölçülmüştür (272). Protein ekspresyon seviyelerinin ölçülmesi için literatürde yaygın kullanılan; pratik, düşük maliyetli ve hassas kantitatif analiz yapabilen ELISA yöntemi kullanılmıştır (167, 273,

274). NCI-H2228 hücrelerine formülasyonların uygulanması sonrasında K-RAS, RAF, MEK, ERK proteinlerinin düzeylerine ilişkin sonuçlar Şekil 4.22.-4.25.'de verilmiştir. Krizotinib yüklü LPHNP formülasyonlarının K-RAS protein düzeyine etkileri incelendiğinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında her iki formülasyonunda K-RAS protein düzeyinde azalma gerçekleştirdiği ancak düzeylerdeki azalmanın istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı görülmüştür ($p>0.05$) (Şekil 4.22.). RAF, MEK ve ERK protein düzeyleri incelendiğinde ise; serbest krizotinib, KR-PLGA-LPHNP ve KR-PCL-LPHNP formülasyonları uygulanmasını takiben hücrelerde protein düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmemiştir ($p>0.05$) (Şekil 4.23.-4.25.).

Literatürde, Baschnagel ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, baş-boyun kanserinde bir reseptör tirozin kinaz olan mezenkimal-epitelyal geçiş faktörünün (MET) inhibe edilmesi amacıyla krizotinib kullanılmış, krizotinib ile tedavi sonrasında MET proteininin inhibe edildiği ancak MET'in alt yolak proteinlerinin ekspresyonunu inhibe edemediği gösterilmiştir. Çalışmada bu durum değerlendirilirken alt yolakların başka reseptör kinazların da alt yolaklarında da olması ve bu reseptör kinazların genlerin/proteinlerin ekspresyon seviyelerine etki gösterebileceği bildirilmiştir. Çalışma sonucunda sadece ilk basamakta bulunan MET proteininin azalması göz önünde bulundurulduğunda, tez çalışmaları kapsamında protein düzeyinde azalmanın istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde olmamasına rağmen yalnızca K-RAS proteininde meydana gelmesinin, K-RAS'ın ALK geninin alt yolağında ilk basamakta yer almasından kaynaklı olduğu değerlendirilmiştir (275).

Tez kapsamında çalışılan ALK geninin alt yolaklarından olan K-RAS, RAF, MEK, ERK genleri hücrelerin büyüme ve farklılaşmasından sorumludur. Bu sinyal yolları ALK dışındaki başka genlerinde (EGFR, VEGFER gibi) alt yolaklarında bulunmakta ve bu genler aracılığıyla da sinyal iletiminde rol oynamaktadırlar (276-278). Ek olarak hücre içerisinde proteinlerin ekspresyon seviyelerini ve etkinliklerini düzenleyen çeşitli telafi edici mekanizmalarda bulunmaktadır (279). Bu durumlar göz önünde bulundurulduğunda; LPHNP formülasyonlarının uygulamasını takiben K-RAS, RAF, MEK, ERK proteinlerinin ekspresyon seviyelerindeki yetersiz azalmanın, literatür ile uyumlu şekilde, hazırlanan krizotinib yüklü nanopartikül formülasyonlarının ALK genini inhibe edebilmesi ancak ALK dışındaki

genleri/proteinleri inhibe edememesi kaynaklı sinyal yolağındaki iletimin devam etmesi olduğu yönünde değerlendirilmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmaları kapsamında;

- Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri tedavisinde kullanılmak üzere krizotinib yüklü LPHNP formülasyonlarının iki farklı polimerin (PLGA ve PCL) ve iki farklı hazırlama yönteminin (emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi ve nanoçöktürme yöntemi) formülasyonlara etkisi değerlendirilerek Box- Behnken deney tasarımıyla geliştirilmesi ve optimize edilmesi,
- Optimize edilen formülasyonların; ilaç yükleme etkinlikleri ve ilaç salım profilleri belirlenmesi, *in vitro* hücre kültürü ve hücre canlılık analizi çalışmaları ile formülasyonların tedavi etkinlikleri değerlendirilmesi,
- *In vitro* olarak inhibitör etkilerinin gen düzeyinde ve protein düzeyinde gösterilmesi amaçlanmış,
- Uygun partikül büyüklüğüne, tekdüze ve dar dağılım aralığına sahip, fiziksel stabiliteyi sağlayacak zeta potansiyel değerinde LPHNP formülasyonları emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi ve nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanmış,
- Krizotinib karakterizasyon çalışmaları için HPLC ile miktar tayini yöntemi geliştirilmiş ve yöntemin doğrusalılık, doğruluk, kesinlik, seçicilik duyarlılık parametreleri validasyon çalışmaları ile gösterilmiş,
- Krizotinibin, LPHNP formülasyonlarına yüklenebildiği ilaç yükleme etkinliği çalışmaları ile gösterilmiş,
- NCI-H2228 (EML4-ALK füzyon akciğer adenokarsinom) hücre hattı uygun kültür koşulları ile çoğaltılmış ve krizotinib yüklü LPHNP formülasyonlarının sitotoksiteleri *in vitro* hücre kültüründe değerlendirilmiş,
- Krizotinib yüklü LPHNP formülasyonlarının *in vitro* olarak inhibitör etkileri gen düzeyinde Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemi ve protein düzeyinde Enzime Bağlı Immünosorbent Deneyi (ELISA) yöntemi kullanılarak gösterilmiş,
- Krizotinib yüklü LPHNP formülasyonlarının $-18^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$, $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}/60\% \text{RH}\pm 5\% \text{RH}$, $4^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ ve $40^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}/75\% \text{RH}\pm 5\% \text{RH}$ ortamlarında 6 ay süreyle stabilite çalışmaları başarıyla gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmaları ile elde edilen sonuçların, küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yenilikçi bir bakış açısı sunacağı ve krizotinib etken maddesiyle gerçekleştirilmiş olan mevcut sınırlı araştırmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Tez kapsamında *in vitro* ortamda elde edilen sonuçların, *in vivo* çalışmalarla doğrulanması ve desteklenmesi gerekmektedir. *In vivo* çalışmalarda, ALK pozitifliği doğrulanmış deney hayvanlarına krizotinib yüklü LPHNP formülasyonlarının uygulanması takiben karaciğer, dalak, akciğer gibi organlarda biyodağılımın tespit edilmesi; belirli periyotlarda uygulanan tedavi sonrası deney hayvanlarında tümör boyutlarının değişiminin incelenmesi; LPHNP formülasyonlarının *in vivo* uygulama sonrasındaki etkinliklerinin ve davranışlarının değerlendirilmesi gerekmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Morgan E, Arnold M, Gini A, Lorenzoni V, Cabasag C, Laversanne M, et al. Global burden of colorectal cancer in 2020 and 2040: incidence and mortality estimates from GLOBOCAN. *Gut*. 2023;72(2):338-44.
2. Luo G, Zhang Y, Etxeberria J, Arnold M, Cai X, Hao Y, et al. Projections of lung cancer incidence by 2035 in 40 countries worldwide: population-based study. *JMIR Public Health and Surveillance*. 2023;9(1):e43651.
3. Sathishkumar K, Chaturvedi M, Das P, Stephen S, Mathur P. Cancer incidence estimates for 2022 & projection for 2025: result from National Cancer Registry Programme, India. *Indian Journal of Medical Research*. 2022;156(4&5):598-607.
4. Wang DC, Wang W, Zhu B, Wang X. Lung cancer heterogeneity and new strategies for drug therapy. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2018;58:531-46.
5. Hiddinga BI, Raskin J, Janssens A, Pauwels P, Van Meerbeeck JP. Recent developments in the treatment of small cell lung cancer. *European Respiratory Review*. 2021;30(161).
6. Mangiameli G, Cioffi U, Testori A. Lung cancer treatment: from tradition to innovation. *Frontiers in Oncology*. 2022;12:858242.
7. Imyanitov EN, Iyevleva AG, Levchenko EV. Molecular testing and targeted therapy for non-small cell lung cancer: current status and perspectives. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2021;157:103194.
8. Ruiz-Cordero R, Devine WP. Targeted therapy and checkpoint immunotherapy in lung cancer. *Surgical pathology clinics*. 2020;13(1):17-33.
9. Saraon P, Pathmanathan S, Snider J, Lyakisheva A, Wong V, Stagljar I. Receptor tyrosine kinases and cancer: oncogenic mechanisms and therapeutic approaches. *Oncogene*. 2021;40(24):4079-93.
10. Esteban-Villarrubia J, Soto-Castillo JJ, Pozas J, San Román-Gil M, Orejana-Martín I, Torres-Jiménez J, et al. Tyrosine kinase receptors in oncology. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(22):8529.
11. Pottier C, Fresnais M, Gilon M, Jérusalem G, Longuespée R, Sounni NE. Tyrosine kinase inhibitors in cancer: breakthrough and challenges of targeted therapy. *Cancers*. 2020;12(3):731.
12. Shah R, Lester JF. Tyrosine kinase inhibitors for the treatment of EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer: a clash of the generations. *Clinical lung cancer*. 2020;21(3):e216-e28.
13. Reshetnyak AV, Rossi P, Myasnikov AG, Sowaileh M, Mohanty J, Nourse A, et al. Mechanism for the activation of the anaplastic lymphoma kinase receptor. *Nature*. 2021;600(7887):153-7.
14. Lei Y, Lei Y, Shi X, Wang J. EML4-ALK fusion gene in non-small cell lung cancer. *Oncology letters*. 2022;24(2):1-6.
15. Sasaki T, Rodig SJ, Chirieac LR, Jänne PA. The biology and treatment of EML4-ALK non-small cell lung cancer. *European journal of cancer*. 2010;46(10):1773-80.
16. Gandhi L, Jänne PA. Crizotinib for ALK-rearranged non-small cell lung cancer: a new targeted therapy for a new target. *Clinical Cancer Research*. 2012;18(14):3737-42.
17. Yan HH, Jung KH, Son MK, Fang Z, Kim SJ, Ryu YL, et al. Crizotinib exhibits antitumor activity by targeting ALK signaling not c-MET in pancreatic cancer. *Oncotarget*. 2014;5(19):9150-68.
18. Camidge DR, Doebele RC. Treating ALK-positive lung cancer—early successes and future challenges. *Nature reviews Clinical oncology*. 2012;9(5):268-77.

19. Remon J, Pignataro D, Novello S, Passiglia F. Current treatment and future challenges in ROS1-and ALK-rearranged advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Treatment Reviews*. 2021;95:102178.
20. Siegel RL, Giaquinto AN, Jemal A. Cancer statistics, 2024. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2024;74(1):12-49.
21. Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA, editors. *Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship*. Mayo clinic proceedings; 2008: Elsevier.
22. Malhotra J, Malvezzi M, Negri E, La Vecchia C, Boffetta P. Risk factors for lung cancer worldwide. *Eur Respir J*. 2016;48(3):889-902.
23. Collins LG, Haines C, Perkel R, Enck RE. Lung cancer: diagnosis and management. *Am Fam Physician*. 2007;75(1):56-63.
24. Quintanal-Villalonga Á, Molina-Pinelo S. Epigenetics of lung cancer: a translational perspective. *Cell Oncol (Dordr)*. 2019;42(6):739-56.
25. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2021;71(3):209-49.
26. Ramalingam SS, Owonikoko TK, Khuri FR. Lung cancer: New biological insights and recent therapeutic advances. *CA Cancer J Clin*. 2011;61(2):91-112.
27. Rivera MP, Detterbeck F, Mehta AC. Diagnosis of lung cancer: the guidelines. *Chest*. 2003;123(1 Suppl):129s-36s.
28. Mottaghitlab F, Farokhi M, Fatahi Y, Atyabi F, Dinarvand R. New insights into designing hybrid nanoparticles for lung cancer: Diagnosis and treatment. *Journal of Controlled Release*. 2019;295:250-67.
29. Liam CK, Andarini S, Lee P, Ho JC, Chau NQ, Tscheikuna J. Lung cancer staging now and in the future. *Respirology*. 2015;20(4):526-34.
30. Cok G. TNM Staging of Lung Cancer. *Nükleer Tıp Seminerleri*. 2018;4:1-5.
31. Lemjabbar-Alaoui H, Hassan OU, Yang YW, Buchanan P. Lung cancer: Biology and treatment options. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1856(2):189-210.
32. Chu Q, Vincent M, Logan D, Mackay JA, Evans WK. Taxanes as first-line therapy for advanced non-small cell lung cancer: a systematic review and practice guideline. *Lung Cancer*. 2005;50(3):355-74.
33. Nascimento AV, Gattacceca F, Singh A, Bousbaa H, Ferreira D, Sarmiento B, et al. Biodistribution and pharmacokinetics of Mad2 siRNA-loaded EGFR-targeted chitosan nanoparticles in cisplatin sensitive and resistant lung cancer models. *Nanomedicine (Lond)*. 2016;11(7):767-81.
34. Gadgeel SM, Ramalingam SS, Kalemkerian GP. Treatment of lung cancer. *Radiol Clin North Am*. 2012;50(5):961-74.
35. Ashrafi A, Akter Z, Modareszadeh P, Modareszadeh P, Berisha E, Alemi PS, et al. Current Landscape of Therapeutic Resistance in Lung Cancer and Promising Strategies to Overcome Resistance. *Cancers (Basel)*. 2022;14(19).
36. Hung J, Hsu W, Hsieh C, Huang B, Huang M, Liu J, et al. Post-recurrence survival in completely resected stage I non-small cell lung cancer with local recurrence. *Thorax*. 2009;64(3):192.
37. Sugimura H, Nichols FC, Yang P, Allen MS, Cassivi SD, Deschamps C, et al. Survival after recurrent nonsmall-cell lung cancer after complete pulmonary resection. *The Annals of thoracic surgery*. 2007;83(2):409-18.
38. Hortobagyi GN, Stemmer SM, Burris HA, Yap YS, Sonke GS, Paluch-Shimon S, et al. Ribociclib as First-Line Therapy for HR-Positive, Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2016;375:1738.

39. Vinod SK, Hau E. Radiotherapy treatment for lung cancer: Current status and future directions. *Respirology*. 2020;25:61-71.
40. Alshammari MK, Almomen EY, Alshahrani KF, Altwalah SF, Kamal M, Al-Twallah MF, et al. Nano-Enabled Strategies for the Treatment of Lung Cancer: Potential Bottlenecks and Future Perspectives. *Biomedicines*. 2023;11(2).
41. Sundar R, Soong R, Cho BC, Brahmer JR, Soo RA. Immunotherapy in the treatment of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2014;85(2):101-9.
42. Toloza EM. Gene therapy for lung cancer. *Thorac Surg Clin*. 2006;16(4):397-419, vii.
43. Cho K, Wang X, Nie S, Chen ZG, Shin DM. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin Cancer Res*. 2008;14(5):1310-6.
44. Haley B, Frenkel E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Urol Oncol*. 2008;26(1):57-64.
45. Pal SK, Figlin RA, Reckamp K. Targeted therapies for non-small cell lung cancer: an evolving landscape. *Mol Cancer Ther*. 2010;9(7):1931-44.
46. Yang M, Li J, Gu P, Fan X. The application of nanoparticles in cancer immunotherapy: Targeting tumor microenvironment. *Bioactive materials*. 2021;6(7):1973-87.
47. Lahiri A, Maji A, Potdar PD, Singh N, Parikh P, Bisht B, et al. Lung cancer immunotherapy: progress, pitfalls, and promises. *Molecular cancer*. 2023;22(1):40.
48. Steven A, Fisher SA, Robinson BW. Immunotherapy for lung cancer. *Respirology*. 2016;21(5):821-33.
49. Zappa C, Mousa SA. Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Transl Lung Cancer Res*. 2016;5(3):288-300.
50. Derman BA, Mileham KF, Bonomi PD, Batus M, Fidler MJ. Treatment of advanced squamous cell carcinoma of the lung: a review. *Transl Lung Cancer Res*. 2015;4(5):524-32.
51. Boyero L, Sánchez-Gastaldo A, Alonso M, Noguera-Uclés JF, Molina-Pinelo S, Bernabé-Caro R. Primary and Acquired Resistance to Immunotherapy in Lung Cancer: Unveiling the Mechanisms Underlying of Immune Checkpoint Blockade Therapy. *Cancers (Basel)*. 2020;12(12).
52. Barr Kumarakulasinghe N, Zanwijk Nv, Soo RA. Molecular targeted therapy in the treatment of advanced stage non-small cell lung cancer (NSCLC). *Respirology*. 2015;20(3):370-8.
53. Cheng L, Li Y, Zhang SB, Teng XD. [Molecular pathology of lung cancer: key to personalized medicine]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*. 2012;41(10):715-20.
54. Yuan M, Huang LL, Chen JH, Wu J, Xu Q. The emerging treatment landscape of targeted therapy in non-small-cell lung cancer. *Signal Transduct Target Ther*. 2019;4:61.
55. Murugesan S, Murugesan J, Palaniappan S, Palaniappan S, Murugan T, Siddiqui SS, et al. Tyrosine Kinase Inhibitors (TKIs) in Lung Cancer Treatment: A Comprehensive Analysis. *Current Cancer Drug Targets*. 2021;21(1):55-69.
56. Ansari J, Palmer D, Rea D, Hussain S. Role of tyrosine kinase inhibitors in lung cancer. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*. 2009;9(5):569-75.
57. Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 2000;103(2):211-25.
58. Sugiyama Y, Kameshita I. Multi-PK antibodies: Powerful analytical tools to explore the protein kinase world. *Biochemistry and biophysics reports*. 2017;11:40-5.
59. Pawson T. Regulation and targets of receptor tyrosine kinases. *European journal of cancer*. 2002;38:S3-S10.
60. Gotink KJ, Verheul HM. Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: what is their mechanism of action? *Angiogenesis*. 2010;13(1):1-14.
61. Dogan L, Güç D. Sinyal İletim Mekanizmaları ve Kanser. *Hacettepe Medical Journal*. 2004;35:34-42.

62. Smidova V, Michalek P, Goliasova Z, Eckschlager T, Hodek P, Adam V, et al. Nanomedicine of tyrosine kinase inhibitors. *Theranostics*. 2021;11(4):1546.
63. Maulik G, Kijima T, Salgia R. Role of receptor tyrosine kinases in lung cancer. *Lung Cancer: Volume 1: Molecular Pathology Methods and Reviews*. 2003:113-25.
64. Paul MK, Mukhopadhyay AK. Tyrosine kinase—role and significance in cancer. *International journal of medical sciences*. 2004;1(2):101.
65. Mandal B, Mittal NK, Balabathula P, Thoma LA, Wood GC. Development and in vitro evaluation of core-shell type lipid-polymer hybrid nanoparticles for the delivery of erlotinib in non-small cell lung cancer. *Eur J Pharm Sci*. 2016;81:162-71.
66. Pang J, Xing H, Sun Y, Feng S, Wang S. Non-small cell lung cancer combination therapy: Hyaluronic acid modified, epidermal growth factor receptor targeted, pH sensitive lipid-polymer hybrid nanoparticles for the delivery of erlotinib plus bevacizumab. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2020;125:109861.
67. Wang J, Su G, Yin X, Luo J, Gu R, Wang S, et al. Non-small cell lung cancer-targeted, redox-sensitive lipid-polymer hybrid nanoparticles for the delivery of a second-generation irreversible epidermal growth factor inhibitor—Afatinib: In vitro and in vivo evaluation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019;120:109493.
68. Knighton DR, Zheng JH, Ten Eyck LF, Ashford VA, Xuong NH, Taylor SS, et al. Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science*. 1991;253(5018):407-14.
69. Ayala-Aguilera CC, Valero T, Lorente-Macías Á, Baillache DJ, Croke S, Unciti-Broceta A. Small Molecule Kinase Inhibitor Drugs (1995–2021): Medical Indication, Pharmacology, and Synthesis. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2022;65(2):1047-131.
70. Sahu A, Prabhash K, Noronha V, Joshi A, Desai S. Crizotinib: A comprehensive review. *South Asian J Cancer*. 2013;2(2):91.
71. Ou S-HI. Crizotinib: a drug that crystallizes a unique molecular subset of non-small-cell lung cancer. *Expert review of anticancer therapy*. 2012;12(2):151-62.
72. Zhao D, Chen J, Chu M, Long X, Wang J. Pharmacokinetic-based drug–drug interactions with anaplastic lymphoma kinase inhibitors: a review. *Drug Des Devel Ther*. 2020:1663-81.
73. Sun Y, Nowak KA, Zaorsky NG, Winchester C-L, Dalal K, Giacalone NJ, et al. ALK inhibitor PF02341066 (crizotinib) increases sensitivity to radiation in non–small cell lung cancer expressing EML4-ALK. *Molecular cancer therapeutics*. 2013;12(5):696-704.
74. Kwak EL, Bang Y-J, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non–small-cell lung cancer. *New England Journal of Medicine*. 2010;363(18):1693-703.
75. Sahu A, Prabhash K, Noronha V, Joshi A, Desai S. Crizotinib: A comprehensive review. *South Asian J Cancer*. 2013;2(2):91-7.
76. Bergethon K, Shaw AT, Ou S-HI, Katayama R, Lovly CM, McDonald NT, et al. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *Journal of clinical oncology*. 2012;30(8):863.
77. Johnson TR, Tan W, Goulet L, Smith EB, Yamazaki S, Walker GS, et al. Metabolism, excretion and pharmacokinetics of [14C] crizotinib following oral administration to healthy subjects. *Xenobiotica*. 2015;45(1):45-59.
78. Timm A, Kolesar JM. Crizotinib for the treatment of non-small-cell lung cancer. *American Journal of Health-System Pharmacy*. 2013;70(11):943-7.
79. Camidge DR, Bang YJ, Kwak EL, Iafrate AJ, Varella-Garcia M, Fox SB, et al. Activity and safety of crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer: updated results from a phase 1 study. *Lancet Oncol*. 2012;13(10):1011-9.

80. Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K, Seto T, Crinó L, Ahn MJ, et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med*. 2013;368(25):2385-94.
81. Zhao D, Chen J, Chu M, Long X, Wang J. Pharmacokinetic-based drug–drug interactions with anaplastic lymphoma kinase inhibitors: a review. *Drug Des Devel Ther*. 2020(14):1663-81.
82. Hamilton G, Rath B, Burghuber O. Pharmacokinetics of crizotinib in NSCLC patients. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 2015;11(5):835-42.
83. De Jong WH, Borm PJ. Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *Int J Nanomedicine*. 2008;3(2):133-49.
84. Li S, Xu S, Liang X, Xue Y, Mei J, Ma Y, et al. Nanotechnology: Breaking the Current Treatment Limits of Lung Cancer. *Adv Healthc Mater*. 2021;10(12):e2100078.
85. Ojo OA, Olayide II, Akalabu MC, Ajiboye B, Ojo A, Oyinloye B, et al. Nanoparticles and their biomedical applications. *Biointerface Res Appl Chem*. 2021;11:8431-45.
86. Anselmo AC, Mitragotri S. Nanoparticles in the clinic. *Bioengineering & translational medicine*. 2016;1(1):10-29.
87. Steichen SD, Caldorera-Moore M, Peppas NA. A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics. *European journal of pharmaceutical sciences*. 2013;48(3):416-27.
88. Mitchell MJ, Billingsley MM, Haley RM, Wechsler ME, Peppas NA, Langer R. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2021;20(2):101-24.
89. Mohanraj V, Chen Y. Nanoparticles-a review. *Tropical journal of pharmaceutical research*. 2006;5(1):561-73.
90. Elbatany RS, Parvathaneni V, Kulkarni NS, Shukla SK, Chauhan G, Kunda NK, et al. Afatinib-loaded inhalable PLGA nanoparticles for localized therapy of non-small cell lung cancer (NSCLC)—development and in-vitro efficacy. *Drug Delivery and Translational Research*. 2021;11(3):927-43.
91. Zeng F, Xu B, Zhu H, Wu S, Liao G, Xie D, et al. A cascade dual-targeted nanocarrier for enhanced alectinib delivery to ALK-positive lung cancer. *Biomaterials science*. 2020;8(22):6404-13.
92. Ahmed MM, Fatima F, Anwer MK, Aldawsari MF, Alsaidan YSM, Alfaiz SA, et al. Development and characterization of Brigatinib loaded solid lipid nanoparticles: In-vitro cytotoxicity against human carcinoma A549 lung cell lines. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2020;233:105003.
93. Zaki RM, Alfadhel MM, Alshahrani SM, Alsaqr A, Al-Kharashi LA, Anwer MK. Formulation of Chitosan-Coated Brigatinib Nanospanlastics: Optimization, Characterization, Stability Assessment and In-Vitro Cytotoxicity Activity against H-1975 Cell Lines. *Pharmaceuticals*. 2022;15(3):348.
94. Suvarsha G. Development and Optimization of Solid Lipid Nanoparticle Formulation for Enhanced Solubility of Ceritinib Using Box–Behnken Design. *Asian Journal of Pharmaceutics (AJP): Free full text articles from Asian J Pharm*. 2020;14(1).
95. Fatani WK, Aleanizy FS, Alqahtani FY, Alanazi MM, Aldossari AA, Shakeel F, et al. Erlotinib-Loaded Dendrimer Nanocomposites as a Targeted Lung Cancer Chemotherapy. *Molecules*. 2023;28(9):3974.
96. Chauhan G, Wang X, Yousry C, Gupta V. Scalable Production and In Vitro Efficacy of Inhaled Erlotinib Nanoemulsion for Enhanced Efficacy in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). *Pharmaceutics*. 2023;15(3):996.
97. Zhou X, He X, Shi K, Yuan L, Yang Y, Liu Q, et al. Injectable Thermosensitive Hydrogel Containing Erlotinib-Loaded Hollow Mesoporous Silica Nanoparticles as a Localized Drug Delivery System for NSCLC Therapy. *Advanced Science*. 2020;7(23):2001442.

98. Saravanakumar K, Sathiyaseelan A, Mariadoss AVA, Jeevithan E, Hu X, Shin S, et al. Dual stimuli-responsive release of aptamer AS1411 decorated erlotinib loaded chitosan nanoparticles for non-small-cell lung carcinoma therapy. *Carbohydrate Polymers*. 2020;245:116407.
99. Varan G, Akkın S, Demirtürk N, Benito JM, Bilensoy E. Erlotinib entrapped incholesterol-depleting cyclodextrin nanoparticles shows improved antitumoral efficacy in 3Dspheroid tumors of the lung and the liver. *Journal of drug targeting*. 2021;29(4):439-53.
100. Sherif AY, Harisa GI, Shahba AA, Alanazi FK, Qamar W. Optimization of Gefitinib-Loaded Nanostructured Lipid Carrier as a Biomedical Tool in the Treatment of Metastatic Lung Cancer. *Molecules*. 2023;28(1):448.
101. Majumder J, Minko T. Multifunctional Lipid-Based Nanoparticles for Codelivery of Anticancer Drugs and siRNA for Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer with Different Level of Resistance and EGFR Mutations. *Pharmaceutics*. 2021;13(7):1063.
102. Rohilla S, Awasthi R, Mehta M, Chellappan DK, Gupta G, Gulati M, et al. Preparation and evaluation of gefitinib containing nanoliposomal formulation for lung cancer therapy. *BioNanoScience*. 2022;12(1):241-55.
103. Hu Y, Zhang J, Hu H, Xu S, Xu L, Chen E. Gefitinib encapsulation based on nanoliposomes for enhancing the curative effect of lung cancer. *Cell Cycle*. 2020;19(24):3581-94.
104. Satari N, Taymouri S, Varshosaz J, Rostami M, Mirian M. Preparation and evaluation of inhalable dry powder containing glucosamine-conjugated gefitinib SLNs for lung cancer therapy. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2020;46(8):1265-77.
105. Alshetaili AS. Gefitinib loaded PLGA and chitosan coated PLGA nanoparticles with magnified cytotoxicity against A549 lung cancer cell lines. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2021;28(9):5065-73.
106. Hegde N, Juvale K, Prabhakar B. Formulation and optimization of gefitinib-loaded nanosuspension prepared using a newly developed dendritic lipopeptide oligomer material. *Chemical Papers*. 2021;75(5):2007-22.
107. Wang H, Wu Y, Lin X. Crizotinib loaded polydopamine-poly lactide-TPGS nanoparticles in chemotherapy for non-small cell lung cancer. *Research Square*; 2022.
108. Jiang ZM, Dai SP, Xu YQ, Li T, Xie J, Li C, et al. Crizotinib-loaded polymeric nanoparticles in lung cancer chemotherapy. *Med Oncol*. 2015;32(7):193.
109. Wilczewska AZ, Niemirowicz K, Markiewicz KH, Car H. Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacological reports*. 2012;64(5):1020-37.
110. Chan JM, Valencia PM, Zhang L, Langer R, Farokhzad OC. Polymeric nanoparticles for drug delivery. *Cancer Nanotechnology: Methods and Protocols*. 2010:163-75.
111. Masood F. Polymeric nanoparticles for targeted drug delivery system for cancer therapy. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016;60:569-78.
112. Zielińska A, Carreiró F, Oliveira AM, Neves A, Pires B, Venkatesh DN, et al. Polymeric nanoparticles: production, characterization, toxicology and ecotoxicology. *Molecules*. 2020;25(16):3731.
113. Russo E, Spallarossa A, Tasso B, Villa C, Brullo C. Nanotechnology of Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer Therapy: A Perspective. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(12):6538.
114. Taghipour-Sabzevar V, Sharifi T, Moghaddam MM. Polymeric nanoparticles as carrier for targeted and controlled delivery of anticancer agents. *Therapeutic delivery*. 2019;10(8):527-50.
115. Loo YS, Zahid NI, Madheswaran T, Mat Azmi ID. Recent advances in the development of multifunctional lipid-based nanoparticles for co-delivery, combination treatment strategies, and theranostics in breast and lung cancer. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2022;71:103300.

116. Sharma D, Ali AAE, Trivedi LR. An Updated Review on: Liposomes as drug delivery system. *PharmaTutor*. 2018;6(2):50-62.
117. Alavi M, Karimi N, Safaei M. Application of various types of liposomes in drug delivery systems. *Advanced pharmaceutical bulletin*. 2017;7(1):3.
118. Kim E-M, Jeong H-J. Liposomes: Biomedical Applications. *Chonnam medical journal*. 2021;57(1):27-35.
119. Kim J-S. Liposomal drug delivery system. *Journal of Pharmaceutical investigation*. 2016;46:387-92.
120. Zhang L, Chan JM, Gu FX, Rhee J-W, Wang AZ, Radovic-Moreno AF, et al. Self-Assembled Lipid-Polymer Hybrid Nanoparticles: A Robust Drug Delivery Platform. *ACS Nano*. 2008;2(8):1696-702.
121. Bose RJ, Ravikumar R, Karuppagounder V, Bennet D, Rangasamy S, Thandavarayan RA. Lipid-polymer hybrid nanoparticle-mediated therapeutics delivery: advances and challenges. *Drug discovery today*. 2017;22(8):1258-65.
122. Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Le Breton A, Préat V. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *J Control Release*. 2012;161(2):505-22.
123. Mandal B, Bhattacharjee H, Mittal N, Sah H, Balabathula P, Thoma LA, et al. Core-shell-type lipid-polymer hybrid nanoparticles as a drug delivery platform. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2013;9(4):474-91.
124. Zhang L, Zhang L. Lipid-polymer hybrid nanoparticles: synthesis, characterization and applications. *Nano life*. 2010;1(01n02):163-73.
125. Shawe S, Buchanan F, Harkin-Jones E, Farrar D. A study on the rate of degradation of the bioabsorbable polymer polyglycolic acid (PGA). *Journal of materials science*. 2006;41:4832-8.
126. Ebrahimi F, Ramezani Dana H. Poly lactic acid (PLA) polymers: from properties to biomedical applications. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. 2022;71(15):1117-30.
127. Kapoor DN, Bhatia A, Kaur R, Sharma R, Kaur G, Dhawan S. PLGA: a unique polymer for drug delivery. *Ther Deliv*. 2015;6(1):41-58.
128. Kumskova N, Ermolenko Y, Osipova N, Semyonkin A, Kildeeva N, Gorshkova M, et al. How subtle differences in polymer molecular weight affect doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles degradation and drug release. *J Microencapsul*. 2020;37(3):283-95.
129. Makadia HK, Siegel SJ. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers*. 2011;3(3):1377-97.
130. Stepanova M, Korzhikova-Vlakh E. Modification of Cellulose Micro- and Nanomaterials to Improve Properties of Aliphatic Polyesters/Cellulose Composites: A Review. *Polymers*. 2022;14:1477.
131. Mohammadian S, Khazaei M, Maghami P, Avan A, Rezaei M. Polycaprolactone-based Nanocarriers Containing 5-fluorouracil as a Therapeutic Guided Drug Delivery Approach for Enhancing Anticancer Activity. *Curr Cancer Drug Targets*. 2023;23(7):524-33.
132. Clawson C, Ton L, Aryal S, Fu V, Esener S, Zhang L. Synthesis and characterization of lipid-polymer hybrid nanoparticles with pH-triggered poly(ethylene glycol) shedding. *Langmuir*. 2011;27(17):10556-61.
133. Hadinoto K, Sundaresan A, Cheow WS. Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a new generation therapeutic delivery platform: a review. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*. 2013;85(3):427-43.
134. Dave V, Tak K, Sohga A, Gupta A, Sadhu V, Reddy KR. Lipid-polymer hybrid nanoparticles: Synthesis strategies and biomedical applications. *Journal of microbiological methods*. 2019;160:130-42.

135. Mukherjee A, Waters AK, Kalyan P, Achrol AS, Kesari S, Yenugonda VM. Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a next-generation drug delivery platform: state of the art, emerging technologies, and perspectives. *International Journal of Nanomedicine*. 2019;14:1937-52.
136. Shah S, Famta P, Raghuvanshi RS, Singh SB, Srivastava S. Lipid polymer hybrid nanocarriers: Insights into synthesis aspects, characterization, release mechanisms, surface functionalization and potential implications. *Colloid and Interface Science Communications*. 2022;46:100570.
137. Cheow WS, Hadinoto K. Factors affecting drug encapsulation and stability of lipid-polymer hybrid nanoparticles. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*. 2011;85(2):214-20.
138. Demir Ö, Aksu B, Ozsoy Y. İlaç Formülasyonu Geliştirilmesinde Deney Tasarımı (DoE) Seçimi ve Kullanımı / The Use and Selection of Design of Experiments (DoE) in the Development of Drug Product Formulation. *Marmara Pharmaceutical Journal*. 2016;21:211-22.
139. Box GE, Behnken DW. Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*. 1960;2(4):455-75.
140. Ferreira SL, Bruns RE, Ferreira HS, Matos GD, David JM, Brandão GC, et al. Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. *Anal Chim Acta*. 2007;597(2):179-86.
141. Śliwka L, Wiktorska K, Suchocki P, Milczarek M, Mielczarek S, Lubelska K, et al. The Comparison of MTT and CVS Assays for the Assessment of Anticancer Agent Interactions. *PLoS One*. 2016;11(5):e0155772.
142. Tominaga H, Ishiyama M, Ohseto F, Sasamoto K, Hamamoto T, Suzuki K, et al. A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. *Analytical Communications*. 1999;36(2):47-50.
143. Fleutot S. Nanoparticles toxicity and biocompatibility tests. *Nanoparticle*. 2020;2(1):1-7.
144. Teo Z, Savas P, Loi S. Gene Expression Analysis: Current Methods. 2016. p. 107-36.
145. Zhu H, Zhang H, Xu Y, Laššáková S, Korabečná M, Neužil P. PCR past, present and future. *Biotechniques*. 2020;69(4):317-25.
146. Hussain MT, Forbes N, Perrie Y. Comparative Analysis of Protein Quantification Methods for the Rapid Determination of Protein Loading in Liposomal Formulations. *Pharmaceutics*. 2019;11(1).
147. Segundo-Val IS, Sanz-Lozano CS. Introduction to the Gene Expression Analysis. *Methods Mol Biol*. 2016;1434:29-43.
148. Hosseini S, Vazquez-Villegas P, Rito-Palomares M, Martinez-Chapa S. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) From A to Z 1232018.
149. Crowther JR. The ELISA guidebook. *Methods Mol Biol*. 2000;149:lii-iv, 1-413.
150. Pasma SA, Daik R, Maskat MY, Hassan O. Application of Box-Behnken Design in Optimization of Glucose Production from Oil Palm Empty Fruit Bunch Cellulose. *International Journal of Polymer Science*. 2013;2013:104502.
151. Woitiski CB, Veiga F, Ribeiro A, Neufeld R. Design for optimization of nanoparticles integrating biomaterials for orally dosed insulin. *Eur J Pharm Biopharm*. 2009;73(1):25-33.
152. Baig MS, Ahad A, Aslam M, Imam SS, Aqil M, Ali A. Application of Box-Behnken design for preparation of levofloxacin-loaded stearic acid solid lipid nanoparticles for ocular delivery: Optimization, in vitro release, ocular tolerance, and antibacterial activity. *International journal of biological macromolecules*. 2015;85:258-70.
153. Gupta M, Marwaha RK, Dureja H. Formulation and Characterization of Gefitinib-loaded Polymeric Nanoparticles Using Box-Behnken Design. *Current Nanomedicine*. 2019;9(1):46-60.

154. Zhang L, Gu F, Chan J, Wang A, Langer R, Farokhzad O. Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. *Clinical pharmacology & therapeutics*. 2008;83(5):761-9.
155. Khalil NY, Wani TA, Darwish IA, Al-Majed A-RA. Highly sensitive hplc method with non-extractive sample preparation and fluorescence detection for determination of crizotinib in human plasma. *Lat Am J Pharm*. 2014;33(6):1019-26.
156. de Melo-Diogo D, Gaspar VM, Costa EC, Moreira AF, Oppolzer D, Gallardo E, et al. Combinatorial delivery of Crizotinib-Palbociclib-Sildenafil using TPGS-PLA micelles for improved cancer treatment. *Eur J Pharm Biopharm*. 2014;88(3):718-29.
157. Putta P. Analytical methods Development and Validation of Crizotinib by RP-HPLC Technique. *International Journal of Biochemistry and Pharmacology*. 2019;1(1):1-4.
158. Weng J, Tong HH, Chow SF. In vitro release study of the polymeric drug nanoparticles: development and validation of a novel method. *Pharmaceutics*. 2020;12(8):732.
159. D'Souza S. A review of in vitro drug release test methods for nano-sized dosage forms. *Advances in pharmaceutics*. 2014;2014:1-12.
160. Kim HR, Kim WS, Choi YJ, Choi CM, Rho Jin K, Lee JC. Epithelial-mesenchymal transition leads to crizotinib resistance in H2228 lung cancer cells with EML4-ALK translocation. *Molecular Oncology*. 2013;7(6):1093-102.
161. Lu H, Wu S, Chen H, Huang Y, Qiu G, Liu L, et al. Crizotinib induces apoptosis of lung cancer cells through JAK-STAT pathway. *Oncol Lett*. 2018;16(5):5992-6.
162. Shrestha N, Nimick M, Dass P, Rosengren RJ, Ashton JC. Mechanisms of suppression of cell growth by dual inhibition of ALK and MEK in ALK-positive non-small cell lung cancer. *Scientific Reports*. 2019;9(1):18842.
163. Roehm NW, Rodgers GH, Hatfield SM, Glasebrook AL. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *Journal of immunological methods*. 1991;142(2):257-65.
164. Okamoto W, Okamoto I, Arai T, Kuwata K, Hatashita E, Yamaguchi H, et al. Antitumor action of the MET tyrosine kinase inhibitor crizotinib (PF-02341066) in gastric cancer positive for MET amplification. *Mol Cancer Ther*. 2012;11(7):1557-64.
165. Green MR, Sambrook J. Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harb Protoc*. 2019;2019(6).
166. Teo ZL, Savas P, Loi S. Gene expression analysis: current methods. *Molecular pathology in cancer research: Springer*; 2016. p. 107-36.
167. Shah K, Maghsoudlou P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. *British journal of hospital medicine*. 2016;77(7):C98-C101.
168. Liu L, Cao Y, Chen C, Zhang X, McNabola A, Wilkie D, et al. Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer research*. 2006;66(24):11851-8.
169. Mallon R, Feldberg LR, Kim SC, Collins K, Wojciechowicz D, Hollander I, et al. An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Raf/MEK1/MAPK Signaling Cascade. *Analytical Biochemistry*. 2001;294(1):48-54.
170. Yadav P, Rastogi V, Verma A. Application of Box-Behnken design and desirability function in the development and optimization of self-nanoemulsifying drug delivery system for enhanced dissolution of ezetimibe. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020;6(1):7.
171. Candioti LV, De Zan MM, Cámara MS, Goicoechea HC. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. *Talanta*. 2014;124:123-38.
172. Derringer GC, Suich RC. Simultaneous Optimization of Several Response Variables. *Journal of Quality Technology*. 1980;12:214-9.

173. Jeong I-J, Kim K-J. Interactive desirability function approach to multi-response surface optimization. *International Journal of Reliability, Quality and Safety Engineering*. 2003;10(02):205-17.
174. Bukzem AL, Signini R, dos Santos DM, Lião LM, Ascheri DPR. Optimization of carboxymethyl chitosan synthesis using response surface methodology and desirability function. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2016;85:615-24.
175. Jadon RS, Sharma M. Docetaxel-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles for breast cancer therapeutics. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2019;51:475-84.
176. Kogita A, Togashi Y, Hayashi H, Sogabe S, Terashima M, De Velasco MA, et al. Hypoxia induces resistance to ALK inhibitors in the H3122 non-small cell lung cancer cell line with an ALK rearrangement via epithelial-mesenchymal transition. *Int J Oncol*. 2014;45(4):1430-6.
177. Katayama R, Khan TM, Benes C, Lifshits E, Ebi H, Rivera VM, et al. Therapeutic strategies to overcome crizotinib resistance in non-small cell lung cancers harboring the fusion oncogene EML4-ALK. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(18):7535-40.
178. Cuyàs E, Pérez-Sánchez A, Micol V, Menendez JA, Bosch-Barrera J. STAT3-targeted treatment with silibinin overcomes the acquired resistance to crizotinib in ALK-rearranged lung cancer. *Cell Cycle*. 2016;15(24):3413-8.
179. Ji C, Zhang L, Cheng Y, Patel R, Wu H, Zhang Y, et al. Induction of autophagy contributes to crizotinib resistance in ALK-positive lung cancer. *Cancer Biol Ther*. 2014;15(5):570-7.
180. Shi J, Xiao Z, Votruba AR, Vilos C, Farokhzad OC. Differentially charged hollow core/shell lipid-polymer-lipid hybrid nanoparticle for small interfering RNA delivery. *Angewandte Chemie (International ed in English)*. 2011;50(31):7027.
181. Wong HL, Rauth AM, Bendayan R, Manias JL, Ramaswamy M, Liu Z, et al. A new polymer-lipid hybrid nanoparticle system increases cytotoxicity of doxorubicin against multidrug-resistant human breast cancer cells. *Pharmaceutical research*. 2006;23:1574-85.
182. Chan JM, Rhee J-W, Drum CL, Bronson RT, Golomb G, Langer R, et al. In vivo prevention of arterial restenosis with paclitaxel-encapsulated targeted lipid-polymeric nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(48):19347-52.
183. Aryal S, Hu CMJ, Zhang L. Combinatorial drug conjugation enables nanoparticle dual-drug delivery. *small*. 2010;6(13):1442-8.
184. Zheng M, Yue C, Ma Y, Gong P, Zhao P, Zheng C, et al. Single-step assembly of DOX/ICG loaded lipid-polymer nanoparticles for highly effective chemo-photothermal combination therapy. *ACS Nano*. 2013;7(3):2056-67.
185. Park J, Wrzesinski SH, Stern E, Look M, Criscione J, Ragheb R, et al. Combination delivery of TGF- β inhibitor and IL-2 by nanoscale liposomal polymeric gels enhances tumour immunotherapy. *Nat Mater*. 2012;11(10):895-905.
186. Sengupta S, Eavarone D, Capila I, Zhao G, Watson N, Kiziltepe T, et al. Temporal targeting of tumour cells and neovasculature with a nanoscale delivery system. *Nature*. 2005;436(7050):568-72.
187. Dehaini D, Fang RH, Luk BT, Pang Z, Hu CM, Kroll AV, et al. Ultra-small lipid-polymer hybrid nanoparticles for tumor-penetrating drug delivery. *Nanoscale*. 2016;8(30):14411-9.
188. Bou S, Wang X, Anton N, Bouchaala R, Klymchenko AS, Collot M. Lipid-core/polymer-shell hybrid nanoparticles: synthesis and characterization by fluorescence labeling and electrophoresis. *Soft Matter*. 2020;16(17):4173-81.
189. Gajbhiye KR, Salve R, Narwade M, Sheikh A, Kesharwani P, Gajbhiye V. Lipid polymer hybrid nanoparticles: a custom-tailored next-generation approach for cancer therapeutics. *Molecular Cancer*. 2023;22(1):160.

190. Liu Y, Pan J, Feng SS. Nanoparticles of lipid monolayer shell and biodegradable polymer core for controlled release of paclitaxel: effects of surfactants on particles size, characteristics and in vitro performance. *Int J Pharm.* 2010;395(1-2):243-50.
191. Chan JM, Zhang L, Yuet KP, Liao G, Rhee JW, Langer R, et al. PLGA-lecithin-PEG core-shell nanoparticles for controlled drug delivery. *Biomaterials.* 2009;30(8):1627-34.
192. Yang XZ, Dou S, Wang YC, Long HY, Xiong MH, Mao CQ, et al. Single-step assembly of cationic lipid-polymer hybrid nanoparticles for systemic delivery of siRNA. *ACS Nano.* 2012;6(6):4955-65.
193. Zheng Y, Yu B, Weecharangsan W, Piao L, Darby M, Mao Y, et al. Transferrin-conjugated lipid-coated PLGA nanoparticles for targeted delivery of aromatase inhibitor 7alpha-APTADD to breast cancer cells. *Int J Pharm.* 2010;390(2):234-41.
194. Bershteyn A, Chaparro J, Yau R, Kim M, Reinherz E, Ferreira-Moita L, et al. Polymer-supported lipid shells, onions, and flowers. *Soft Matter.* 2008;4(9):1787-91.
195. Troutier AL, Delair T, Pichot C, Ladavière C. Physicochemical and interfacial investigation of lipid/polymer particle assemblies. *Langmuir.* 2005;21(4):1305-13.
196. Mittal G, Sahana DK, Bhardwaj V, Ravi Kumar MN. Estradiol loaded PLGA nanoparticles for oral administration: effect of polymer molecular weight and copolymer composition on release behavior in vitro and in vivo. *J Control Release.* 2007;119(1):77-85.
197. Chu CH, Wang YC, Huang HY, Wu LC, Yang CS. Ultrafine PEG-coated poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles formulated by hydrophobic surfactant-assisted one-pot synthesis for biomedical applications. *Nanotechnology.* 2011;22(18):185601.
198. Stark B, Pabst G, Prassl R. Long-term stability of sterically stabilized liposomes by freezing and freeze-drying: Effects of cryoprotectants on structure. *Eur J Pharm Sci.* 2010;41(3-4):546-55.
199. Thevenot J, Troutier AL, David L, Delair T, Ladavière C. Steric stabilization of lipid/polymer particle assemblies by poly(ethylene glycol)-lipids. *Biomacromolecules.* 2007;8(11):3651-60.
200. Kandel PK, Fernando LP, Ackroyd PC, Christensen KA. Incorporating functionalized polyethylene glycol lipids into reprecipitated conjugated polymer nanoparticles for bioconjugation and targeted labeling of cells. *Nanoscale.* 2011;3(3):1037-45.
201. Wang H, Wu Y, Lin X. Crizotinib loaded polydopamine-poly(lactide)-TPGS nanoparticles in targeted therapy for non-small cell lung cancer. *Med Oncol.* 2022;40(1):26.
202. Zhong T, Liu X, Li H, Zhang J. Co-delivery of sorafenib and crizotinib encapsulated with polymeric nanoparticles for the treatment of in vivo lung cancer animal model. *Drug Deliv.* 2021;28(1):2108-18.
203. Greish K, Jasim A, Parayath N, Abdelghany S, Alkhateeb A, Taurin S, et al. Micellar formulations of Crizotinib and Dasatinib in the management of glioblastoma multiforme. *J Drug Target.* 2018;26(8):692-708.
204. Li Y, Wu M, Zhang N, Tang C, Jiang P, Liu X, et al. Mechanisms of enhanced antiglioma efficacy of polysorbate 80-modified paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles by focused ultrasound. *Journal of Cellular and Molecular Medicine.* 2018;22(9):4171-82.
205. Bose S, Du Y, Takhistov P, Michniak-Kohn B. Formulation optimization and topical delivery of quercetin from solid lipid based nanosystems. *International Journal of Pharmaceutics.* 2013;441(1):56-66.
206. Madan JR, Khobaragade S, Dua K, Awasthi R. Formulation, optimization, and in vitro evaluation of nanostructured lipid carriers for topical delivery of Apremilast. *Dermatologic Therapy.* 2020;33(3):e13370.
207. Subramaniam B, Siddik ZH, Nagoor NH. Optimization of nanostructured lipid carriers: understanding the types, designs, and parameters in the process of formulations. *Journal of Nanoparticle Research.* 2020;22(6):141.

208. Alruwaili NK, Zafar A, Imam SS, Alharbi KS, Alotaibi NH, Alshehri S, et al. Stimulus Responsive Ocular Gentamycin-Ferrying Chitosan Nanoparticles Hydrogel: Formulation Optimization, Ocular Safety and Antibacterial Assessment. *International Journal of Nanomedicine*. 2020;15(null):4717-37.
209. Hanafy NAN, Abdelbadea RH, Abdelaziz AE, Mazyed EA. Formulation and optimization of folate-bovine serum albumin-coated ethoniosomes of pterostilbene as a targeted drug delivery system for lung cancer: In vitro and in vivo demonstrations. *Cancer Nanotechnology*. 2023;14(1):49.
210. Adnan M, Afzal O, S. A. Altamimi A, Alamri MA, Haider T, Faheem Haider M. Development and optimization of transethosomal gel of apigenin for topical delivery: In-vitro, ex-vivo and cell line assessment. *International Journal of Pharmaceutics*. 2023;631:122506.
211. Pawar S, Shende P. 22 factorial design-based biocompatible microneedle arrays containing artemether co-loaded with lumefantrine nanoparticles for transepidermal delivery. *Biomedical Microdevices*. 2020;22(1):19.
212. Imran M, Iqbal MK, Imtiyaz K, Saleem S, Mittal S, Rizvi MMA, et al. Topical nanostructured lipid carrier gel of quercetin and resveratrol: Formulation, optimization, in vitro and ex vivo study for the treatment of skin cancer. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020;587:119705.
213. Rapalli VK, Kaul V, Waghule T, Gorantla S, Sharma S, Roy A, et al. Curcumin loaded nanostructured lipid carriers for enhanced skin retained topical delivery: optimization, scale-up, in-vitro characterization and assessment of ex-vivo skin deposition. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020;152:105438.
214. Ismail TA, Shehata TM, Mohamed DI, Elsewedy HS, Soliman WE. Quality by design for development, optimization and characterization of brucine ethosomal gel for skin cancer delivery. *Molecules*. 2021;26(11):3454.
215. Beg S, Akhter S. Box–Behnken designs and their applications in pharmaceutical product development. *Design of Experiments for Pharmaceutical Product Development: Volume I: Basics and Fundamental Principles*. 2021:77-85.
216. Tahir N, Madni A, Balasubramanian V, Rehman M, Correia A, Kashif PM, et al. Development and optimization of methotrexate-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles for controlled drug delivery applications. *International Journal of Pharmaceutics*. 2017;533(1):156-68.
217. Gajra B, Dalwadi C, Patel R. Formulation and optimization of itraconazole polymeric lipid hybrid nanoparticles (Lipomer) using box behnken design. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015;23:1-15.
218. Saraswat AL, Maher TJ. Development and optimization of stealth liposomal system for enhanced in vitro cytotoxic effect of quercetin. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2020;55:101477.
219. Teng F, He M, Xu J, Chen F, Wu C, Wang Z, et al. Effect of ultrasonication on the stability and storage of a soy protein isolate-phosphatidylcholine nanoemulsions. *Scientific Reports*. 2020;10(1):14010.
220. Bhattacharya S. Methotrexate-loaded polymeric lipid hybrid nanoparticles (PLHNPs): a reliable drug delivery system for the treatment of glioblastoma. *Journal of Experimental Nanoscience*. 2021;16(1):344-67.
221. Maran JP, Manikandan S, Mekala V. Modeling and optimization of betalain extraction from *Opuntia ficus-indica* using Box–Behnken design with desirability function. *Industrial crops and products*. 2013;49:304-11.

222. Sharma A, Guarve K, Singh R. Application of Box-Behnken design and desirability function in the optimization of aceclofenac-loaded micropsonges for topical application. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2021;14(12):6295-303.
223. Venugopal V, Kumar KJ, Muralidharan S, Parasuraman S, Raj PV, Kumar KV. Optimization and in-vivo evaluation of isradipine nanoparticles using Box-Behnken design surface response methodology. *OpenNano*. 2016;1:1-15.
224. Zhao Y, Lin D, Wu F, Guo L, He G, Ouyang L, et al. Discovery and in Vivo Evaluation of Novel RGD-Modified Lipid-Polymer Hybrid Nanoparticles for Targeted Drug Delivery. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014;15(10):17565-76.
225. Takayama R, Inoue Y, Murata I, Kanamoto I. Characterization of Nanoparticles Using DSPE-PEG2000 and Soluplus. *Colloids and Interfaces*. 2020;4(3):28.
226. Kim C-E, Lim S-K, Kim J-S. In vivo antitumor effect of cromolyn in PEGylated liposomes for pancreatic cancer. *Journal of controlled release*. 2012;157(2):190-5.
227. Nakamura K, Yamashita K, Itoh Y, Yoshino K, Nozawa S, Kasukawa H. Comparative studies of polyethylene glycol-modified liposomes prepared using different PEG-modification methods. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2012;1818(11):2801-7.
228. Smith MC, Crist RM, Clogston JD, McNeil SE. Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2017;409:5779-87.
229. Dolai J, Mandal K, Jana NR. Nanoparticle size effects in biomedical applications. *ACS Applied Nano Materials*. 2021;4(7):6471-96.
230. Raval M, Patel P, Airao V, Bhatt V, Sheth N. Novel silibinin loaded chitosan-coated PLGA/PCL nanoparticles based inhalation formulations with improved cytotoxicity and bioavailability for lung cancer. *Bionanoscience*. 2021;11:67-83.
231. Wu J. The Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect: The Significance of the Concept and Methods to Enhance Its Application. *Journal of Personalized Medicine*. 2021;11(8):771.
232. Ikeda-Imafuku M, Wang LL-W, Rodrigues D, Shaha S, Zhao Z, Mitragotri S. Strategies to improve the EPR effect: A mechanistic perspective and clinical translation. *Journal of Controlled Release*. 2022;345:512-36.
233. Arias JL. Drug targeting strategies in cancer treatment: an overview. *Mini Rev Med Chem*. 2011;11(1):1-17.
234. Zi Y, Yang K, He J, Wu Z, Liu J, Zhang W. Strategies to enhance drug delivery to solid tumors by harnessing the EPR effects and alternative targeting mechanisms. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2022;188:114449.
235. Shah R, Eldridge D, Palombo E, Harding I. Optimisation and stability assessment of solid lipid nanoparticles using particle size and zeta potential. *Journal of physical science*. 2014;25(1).
236. Zein R, Sharrouf W, Selting K. Physical properties of nanoparticles that result in improved cancer targeting. *Journal of Oncology*. 2020;2020(1):5194780.
237. Gao Z-M, Wang J-M, Wu N-N, Wan Z-I, Guo J, Yang X-Q, et al. Formation of Complex Interface and Stability of Oil-in-Water (O/W) Emulsion Prepared by Soy Lipophilic Protein Nanoparticles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013;61(32):7838-47.
238. Liu Y, Hu Y, Huang L. Influence of polyethylene glycol density and surface lipid on pharmacokinetics and biodistribution of lipid-calcium-phosphate nanoparticles. *Biomaterials*. 2014;35(9):3027-34.
239. Duncanson WJ, Figa MA, Hallock K, Zalipsky S, Hamilton JA, Wong JY. Targeted binding of PLA microparticles with lipid-PEG-tethered ligands. *Biomaterials*. 2007;28(33):4991-9.

240. Massadeh S, Omer ME, Alterawi A, Ali R, Alanazi FH, Almutairi F, et al. Optimized Polyethylene Glycolylated Polymer–Lipid Hybrid Nanoparticles as a Potential Breast Cancer Treatment. *Pharmaceutics*. 2020;12(7):666.
241. Bhattacharjee S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *J Control Release*. 2016;235:337-51.
242. Morini MA, Sierra MB, Pedroni VI, Alarcon LM, Appignanesi GA, Disalvo EA. Influence of temperature, anions and size distribution on the zeta potential of DMPC, DPPC and DMPE lipid vesicles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2015;131:54-8.
243. Kedmi R, Ben-Arie N, Peer D. The systemic toxicity of positively charged lipid nanoparticles and the role of Toll-like receptor 4 in immune activation. *Biomaterials*. 2010;31(26):6867-75.
244. Cho EJ, Holback H, Liu KC, Abouelmagd SA, Park J, Yeo Y. Nanoparticle characterization: state of the art, challenges, and emerging technologies. *Mol Pharm*. 2013;10(6):2093-110.
245. Clogston JD, Patri AK. Zeta potential measurement. Characterization of nanoparticles intended for drug delivery. 2011:63-70.
246. Chan JM, Zhang L, Yuet KP, Liao G, Rhee J-W, Langer R, et al. PLGA–lecithin–PEG core–shell nanoparticles for controlled drug delivery. *Biomaterials*. 2009;30(8):1627-34.
247. Deok Kong S, Sartor M, Jack Hu C-M, Zhang W, Zhang L, Jin S. Magnetic field activated lipid–polymer hybrid nanoparticles for stimuli-responsive drug release. *Acta Biomaterialia*. 2013;9(3):5447-52.
248. Zhang L, Zhu D, Dong X, Sun H, Song C, Wang C, et al. Folate-modified lipid–polymer hybrid nanoparticles for targeted paclitaxel delivery. *International journal of nanomedicine*. 2015:2101-14.
249. Yang Q, Zhou Y, Chen J, Huang N, Wang Z, Cheng Y. Gene therapy for drug-resistant glioblastoma via lipid-polymer hybrid nanoparticles combined with focused ultrasound. *International journal of nanomedicine*. 2021:185-99.
250. Colombo S, Cun D, Remaut K, Bunker M, Zhang J, Martin-Bertelsen B, et al. Mechanistic profiling of the siRNA delivery dynamics of lipid-polymer hybrid nanoparticles. *J Control Release*. 2015;201:22-31.
251. Ito T, Sun L, Bevan MA, Crooks RM. Comparison of nanoparticle size and electrophoretic mobility measurements using a carbon-nanotube-based coulter counter, dynamic light scattering, transmission electron microscopy, and phase analysis light scattering. *Langmuir*. 2004;20(16):6940-5.
252. Shabir GA. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *J Chromatogr A*. 2003;987(1-2):57-66.
253. Guideline IHT. Validation of analytical procedures: text and methodology. Q2 (R1). 2005;1(20):05.
254. Snehathatha M, Venugopal K, Saha RN. Etoposide-loaded PLGA and PCL nanoparticles I: preparation and effect of formulation variables. *Drug Delivery*. 2008;15(5):267-75.
255. Mota AH, Duarte N, Serra AT, Ferreira A, Bronze MR, Custódio L, et al. Further Evidence of Possible Therapeutic Uses of *Sambucus nigra* L. Extracts by the Assessment of the In Vitro and In Vivo Anti-Inflammatory Properties of Its PLGA and PCL-Based Nanoformulations. *Pharmaceutics*. 2020;12(12):1181.
256. Son G-H, Lee B-J, Cho C-W. Mechanisms of drug release from advanced drug formulations such as polymeric-based drug-delivery systems and lipid nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Investigation*. 2017;47:287-96.

257. Fu Y, Kao WJ. Drug release kinetics and transport mechanisms of non-degradable and degradable polymeric delivery systems. *Expert Opin Drug Deliv.* 2010;7(4):429-44.
258. Bose S, Sarkar N, Banerjee D. Effects of PCL, PEG and PLGA polymers on curcumin release from calcium phosphate matrix for in vitro and in vivo bone regeneration. *Materials Today Chemistry.* 2018;8:110-20.
259. Mirzaeei S, Mansurian M, Asare-Addo K, Nokhodchi A. Metronidazole- and Amoxicillin-Loaded PLGA and PCL Nanofibers as Potential Drug Delivery Systems for the Treatment of Periodontitis: In Vitro and In Vivo Evaluations. *Biomedicines.* 2021;9(8).
260. Bhowmik D, Gopinath H, Kumar BP, Duraivel S, Kumar KS. Controlled release drug delivery systems. *The pharma innovation.* 2012;1(10):24-32.
261. Yue Y, Zhao D, Yin Q. Hyaluronic acid modified nanostructured lipid carriers for transdermal bupivacaine delivery: in vitro and in vivo anesthesia evaluation. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2018;98:813-20.
262. Yalcin TE, Ilbasmis-Tamer S, Takka S. Development and characterization of gemcitabine hydrochloride loaded lipid polymer hybrid nanoparticles (LPHNs) using central composite design. *Int J Pharm.* 2018;548(1):255-62.
263. Khan MM, Madni A, Torchilin V, Filipczak N, Pan J, Tahir N, et al. Lipid-chitosan hybrid nanoparticles for controlled delivery of cisplatin. *Drug Delivery.* 2019;26(1):765-72.
264. Li F, Zhao X, Wang H, Zhao R, Ji T, Ren H, et al. Multiple layer-by-layer lipid-polymer hybrid nanoparticles for improved FOLFIRINOX chemotherapy in pancreatic tumor models. *Advanced functional materials.* 2015;25(5):788-98.
265. Gencer A, Baysal I, Nemutlu E, Yabanoglu-Ciftci S, Arica B. Efficacy of siRNA-loaded nanoparticles in the treatment of K-RAS mutant lung cancer in vitro. *J Microencapsul.* 2022;39(3):261-75.
266. Zhang Y, Zhan X, Peng S, Cai Y, Zhang YS, Liu Y, et al. Targeted-gene silencing of BRAF to interrupt BRAF/MEK/ERK pathway synergized photothermal therapeutics for melanoma using a novel FA-GNR-siBRAF nanosystem. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.* 2018;14(5):1679-93.
267. Hrustanovic G, Olivas V, Pazarentzos E, Tulpule A, Asthana S, Blakely CM, et al. RAS-MAPK dependence underlies a rational polytherapy strategy in EML4-ALK-positive lung cancer. *Nature medicine.* 2015;21(9):1038-47.
268. Raimondi V, Iannozzi NT, Burroughs-Garcia J, Toscani D, Storti P, Giuliani N. A personalized molecular approach in multiple myeloma: the possible use of RAF/RAS/MEK/ERK and BCL-2 inhibitors. *Explor Target Antitumor Ther.* 2022;3(4):463-79.
269. Song Y, Bi Z, Liu Y, Qin F, Wei Y, Wei X. Targeting RAS-RAF-MEK-ERK signaling pathway in human cancer: Current status in clinical trials. *Genes Dis.* 2023;10(1):76-88.
270. Song Y, Bi Z, Liu Y, Qin F, Wei Y, Wei X. Targeting RAS-RAF-MEK-ERK signaling pathway in human cancer: current status in clinical trials. *Genes & Diseases.* 2022.
271. Gonzalez-Urias A, Zapata-Gonzalez I, Licea-Claverie A, Licea-Navarro AF, Bernaldez-Sarabia J, Cervantes-Luevano K. Cationic versus anionic core-shell nanogels for transport of cisplatin to lung cancer cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2019;182:110365.
272. Shepard AR, Jacobson N, Clark AF. Importance of quantitative PCR primer location for short interfering RNA efficacy determination. *Anal Biochem.* 2005;344(2):287-8.
273. Awad MM, Mastini C, Blasco RB, Mologni L, Voena C, Mussolin L, et al. Epitope mapping of spontaneous autoantibodies to anaplastic lymphoma kinase (ALK) in non-small cell lung cancer. *Oncotarget.* 2017;8(54):92265-74.
274. Kleczko EK, Hinz TK, Nguyen TT, Gurule NJ, Navarro A, Le AT, et al. Durable responses to alectinib in murine models of EML4-ALK lung cancer requires adaptive immunity. *npj Precision Oncology.* 2023;7(1):15.

275. Baschnagel AM, Galoforo S, Thibodeau BJ, Ahmed S, Nirmal S, Akervall J, et al. Crizotinib Fails to Enhance the Effect of Radiation in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Xenografts. *Anticancer Res.* 2015;35(11):5973-82.
276. Ullah R, Yin Q, Snell AH, Wan L. RAF-MEK-ERK pathway in cancer evolution and treatment. *Semin Cancer Biol.* 2022;85:123-54.
277. Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene.* 2007;26(22):3291-310.
278. Wu PK, Becker A, Park JI. Growth Inhibitory Signaling of the Raf/MEK/ERK Pathway. *Int J Mol Sci.* 2020;21(15):5436.
279. Montor WR, Salas AROSE, Melo FHMd. Receptor tyrosine kinases and downstream pathways as druggable targets for cancer treatment: the current arsenal of inhibitors. *Molecular Cancer.* 2018;17(1):55.

8.EKLER

EK- 1: Turnitin Dijital Makbuz



Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Pelinsu Korucu
Ödev başlığı: Pelinsu AKTAŞ TEZ
Gönderi Başlığı: Pelinsu Aktaş turnitin.docx
Dosya adı: Pelinsu_Aktaş_turnitin.docx
Dosya boyutu: 4.89M
Sayfa sayısı: 122
Kelime sayısı: 25,430
Karakter sayısı: 179,310
Gönderim Tarihi: 26-Kas-2024 08:31ÖS (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 2533051414



EK- 2: Turnitin Orjinallik Raporu

Pelinsu Aktaş turnitin.docx

ORJİNALLIK RAPORU

| | | | |
|-------------------|---------------------|------------|------------------|
| % 11 | % 9 | % 5 | % 2 |
| BENZERLİK ENDEKSİ | İNTERNET KAYNAKLARI | YAYINLAR | ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ |

BİRİNCİL KAYNAKLAR

| | | |
|----------|--|-------------|
| 1 | openaccess.hacettepe.edu.tr İnternet Kaynağı | % 3 |
| 2 | www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı | % 2 |
| 3 | dspace.gazi.edu.tr İnternet Kaynağı | % 1 |
| 4 | acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı | % 1 |
| 5 | ur.booksc.me İnternet Kaynağı | % 1 |
| 6 | www.researchgate.net İnternet Kaynağı | <% 1 |
| 7 | openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı | <% 1 |
| 8 | Submitted to Uludag University Öğrenci Ödevi | <% 1 |
| 9 | İpek Baysal, Serra Örsten. "BEAS-2B ve A549 Hücre Hatlarında Hidatik Kist Sıvısının | <% 1 |

EK- 3: Tez Kapsamında Üretilen Yayın – 1

AAPS PharmSciTech (2023) 24:178
<https://doi.org/10.1208/s12249-023-02634-4>

RESEARCH ARTICLE



Development and *In Vitro* Evaluation of Crizotinib-Loaded Lipid–Polymer Hybrid Nanoparticles Using Box–Behnken Design in Non-small Cell Lung Cancer

Pelinsu Korucu Aktas¹ · Ipek Baysal² · Samiye Yabanoglu-Ciftci³ · Betul Arica¹

Received: 26 May 2023 / Accepted: 7 August 2023
 © The Author(s), under exclusive licence to American Association of Pharmaceutical Scientists 2023

Abstract

The goal of the study was to produce, optimize, characterize, and compare crizotinib-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles (CL-LPHNPs), representing a novel contribution to the existing literature, and to determine their anticancer activity in non-small cell lung cancer cells (NSCLC). Box–Behnken design was used to investigate the effect of three independent variables: polymer amount (X_1), soy phosphatidylcholine (X_2), and DSPE-PEG (X_3), on three responses: particle size (Y_1), polydispersity index (Y_2), and zeta potential (Y_3). Different parameters were evaluated on the optimized LPHNP formulations such as encapsulation efficiency, drug release study, transmission electron microscopy (TEM) image analysis, and *in vitro* cell evaluations. The mean particle size of the optimized formulation is between 120 and 220 nm with a PDI < 0.2 and a zeta potential of –10 to –15 mV. The encapsulation efficiency values of crizotinib-loaded PLGA-LPHNPs (CL-PLGA-LPHNPs) and crizotinib-loaded PCL-LPHNPs (CL-PCL-LPHNPs) were $79.25 \pm 0.07\%$ and $70.93 \pm 1.81\%$, respectively. Drug release study of CL-PLGA-LPHNPs and CL-PCL-LPHNPs showed a controlled and sustained release pattern as a result of core–shell type. Additionally, after 48 h, CL-PLGA-LPHNPs and CL-PCL-LPHNPs significantly reduced the viability of NCI-H2228 cells compared to free crizotinib. Moreover, CL-PLGA-LPHNPs and CL-PCL-LPHNPs exhibited a significant decrease in RAS, RAF, MEK, and ERK gene/protein expression levels after 48-h incubation. In conclusion, this pioneering study introduces lipid-polymer hybrid nanoparticles containing crizotinib as a novel treatment approach, uniting the advantages of a polymeric core and a lipid shell. The successful formulation optimization using Box–Behnken design yielded nanoparticles with adjustable size, remarkable stability, high drug loading, and a customizable drug release profile. Extensive investigations of key parameters, including particle size, PDI, ZP, TEM analysis, drug release, EE%, and *in vitro* evaluations, validate the potential of these nanoparticles. Moreover, the examination of two different polymers, PLGA and PCL, highlights their distinct impacts on nanoparticle performance. This research opens up new prospects for advanced therapeutic interventions with lipid-polymer hybrid nanoparticles.

Keywords box–Behnken design · crizotinib · lipid–polymer hybrid nanoparticles · non-small cell lung cancer cells · tyrosine kinase inhibitors

Introduction

Lung cancer, which accounts for approximately 25% of all cancer-related deaths and is a primary cause of cancer-related mortality, remains the most common malignant disease affecting both men and women [1]. Lung cancer manifests in two distinct histological types, with non-small cell lung cancer (NSCLC) accounting for 80 to 95% of all cases, while the remaining portion corresponds to small cell lung cancer [2]. A significant majority of individuals diagnosed with lung cancer experience a fatal outcome within 1 year or less. Compared to various other cancers like colorectal,

✉ Betul Arica
barica@hacettepe.edu.tr

¹ Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Hacettepe University, 06100 Ankara, Turkey

² Vocational School of Health Services, Hacettepe University, Ankara, Turkey

³ Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Hacettepe University, Ankara, Turkey



Published online: 02 September 2023

Springer

breast, and prostate cancer, lung cancer exhibits a lower 5-year survival rate, indicating a less favorable prognosis [3]. Treatment for lung cancer is chosen in line with the stage and type of cancer. Conventional treatment methods used in lung cancer are surgical resection, chemotherapy, and radiotherapy [4]. Given the low survival rate associated with lung cancer, there is a pressing need for the development of innovative and targeted treatment approaches that not only improve patient life expectancy but also enhance their quality of life by minimizing adverse effects [5]. In recent years, targeted therapy has gained importance with the deficiency of conventional therapy [6]. One such target is anaplastic lymphoma kinase which is overexpressed in NSCLC [7]. When ALK fuses with EML4, it generates the EML4-anaplastic lymphoma kinase (ALK) fusion gene, which is responsible for nearly 5% of NSCLC [8, 9]. The US Food and Drug Administration (FDA) approved crizotinib, a small molecule ALK tyrosine kinase inhibitor, in 2011 for the treatment of NSCLC that has been determined to be ALK-positive [10, 11]. Crizotinib functions by blocking the activity of tyrosine kinases associated with ALK and hepatocyte growth factor receptors, while also triggering apoptosis through the activation of caspase-3 [12]. Crizotinib, marketed as Xalkori®, is available in the form of an oral film-coated tablet, offering a preferred route for systemic therapy. However, traditional oral delivery of crizotinib has been associated with challenges such as limited therapeutic efficacy, dose-dependent side effects, low or inconsistent bioavailability, drug resistance, and non-specific distribution within tissues [13, 14]. As a hydrophobic molecule with a log p value of 4.28 and low water solubility and permeability, crizotinib is categorized as class IV in the biopharmaceutical classification system [15]. Recently, to overcome these limitations, various approaches are being investigated to develop and design novel and efficient delivery systems for crizotinib. Several studies have explored the utilization of nanosized drug delivery systems for crizotinib, including polymeric micelles such as polylactide-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (PLA-TPGS) micelles, polydopamine (pD)-modified PLA-TPGS micelles, poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone) (PCL-PEG-PCL) polymeric NPs, and poly(ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol) (PEG-PCL-PEG, PECE) polymeric NPs [16–20]. However, the studies conducted are very limited, and there are no studies using lipid-polymer hybrid nanoparticles in the literature.

Polymeric nanoparticles and liposomes are two significant subclasses of nanosized drug delivery systems [21]. Liposomes are appealing delivery systems due to their versatile physicochemical and biophysical properties, which allow for easy manipulation and addressing various delivery challenges [22]. Polymeric nanoparticles can be classified

into two categories: reservoir systems, also known as nanocapsules, and matrix systems, also known as nanospheres. In nanocapsules, a drug is typically dissolved within a liquid core, which is surrounded by a polymeric membrane responsible for controlling the release of the drug. On the other hand, in nanospheres, the drug can be either encapsulated inside the polymeric network or adsorbed onto its surface, providing support and stability [23, 24]. Through surface changes, polymeric nanoparticles made from biocompatible polymers can deliver medications in a controlled and targeted manner [25, 26]. Lipid-polymer hybrid nanoparticles (LPHNs) are a unique drug delivery systems that combine the benefits of lipid nanoparticles and polymeric nanoparticles [27]. LPHNs typically consist of three functional components: (i) a hydrophobic polymeric core, (ii) a lipid layer, and (iii) a hydrophilic polymer layer. (i) Poorly water-soluble drugs can be efficiently incorporated into the hydrophobic polymeric core, enabling high drug loading capacity. (ii) The polymeric core is surrounded by a lipid layer, serving as a biocompatible shell that enhances drug retention. (iii) An outer hydrophilic polymer layer further extends the systemic circulation time and enhances the stability of the nanoparticles [28]. Between electrostatic contacts, hydrophobic interactions, or van der Waals forces lie the lipid shell and the polymeric core. Covalent bonds are often utilized to link the lipid shell to the hydrophilic polymer layer. LPHNs may provide drugs with benefits such improved anticancer efficacy, reduced systemic toxicity, physical stability and biocompatibility and controlled drug release [29, 30]. Ongoing studies are investigating the potential applications of LPNs in a range of drug delivery systems. These include cancer treatment, utilization as a vaccine adjuvant, nucleic acid transport, active targeting strategies, treatment of genetic diseases, and diagnostic imaging [31–35].

The objective of this study was to explore the potential of lipid-polymer hybrid nanoparticles (LPHNPs) by formulating crizotinib, capitalizing on the advantages of both lipid- and polymer-based nanocarriers. Our aim was to capitalize on the enhanced drug loading, improved stability, and controlled release capabilities offered by LPHNPs. By merging these two carrier systems, we aimed to explore the potential of LPHNPs as a promising approach for drug delivery with the potential to enhance therapeutic efficacy. To explore the development of effective drug delivery systems for NSCLC, two types LPHNPs were formulated: PLGA-LPHNPs and PCL-LPHNPs, both loaded with crizotinib. The study aimed to assess the impact of polymer type in LPHNPs for their potential role in NSCLC treatment.

The formulation and process variables of these LPHNPs are optimized using the Box-Behnken design. Different parameters were evaluated on the optimized LPHNP formulations such as main particle size analysis, polydispersity index (PDI), zeta potential (ZP), TEM image analysis, drug

release study, encapsulation efficiency (EE%), and *in vitro* cell evaluations. The primary objective of this study was to produce, optimize, characterize, and compare crizotinib-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticle (CL-LPHNP) formulations, with the ultimate goal of demonstrating their effectiveness in anticancer-efficacy specifically in NSCLC cells.

Materials and Methods

Materials

PLGA (Mw: 7000–17,000 Da) and CL (Mw ~14,000) were purchased from Sigma-Aldrich (Germany). Soy phosphatidylcholine and DSPE-PEG2000 were purchased from Avanti polar lipids (USA). Ethanol and acetonitrile were purchased from Sigma-Aldrich (Germany). NCI-H2228 (EML4-ALK fusion lung adenocarcinoma) cell line was purchased from ATCC®. Human K-RAS and Human MEK kinase ELISA

Kit were purchased from Fine Test (China). Human ERK Kinase and Human RAF Kinase ELISA Kit were purchased from BT-LAB (China).

Methods

Optimization of PLGA-LPHNPs and PCL-LPHNPs Using Box-Behnken Design

To investigate and optimize the primary, quadratic, and interaction effects of the formulation parameters on the efficacy of the LPHNPs, Box-Behnken design (BBD) was adopted. BBD is an autonomous quadratic design without any fractional factorial or factorial design [36]. The benefit of BBD over central composite design is that it takes fewer runs and so is more affordable. In this type of design, there is no need for many center points. Using a single central point allows all repetitions to be performed under the same parameter. The responses' results were fitted to a quadratic polynomial model explained by a non-linear Eq. 1:

$$y = \alpha_0 + \alpha_1 X_1 + \alpha_2 X_2 + \alpha_3 X_3 + \alpha_4 X_1 X_2 + \alpha_5 X_1 X_3 + \alpha_6 X_2 X_3 + \alpha_7 X_1^2 + \alpha_8 X_2^2 + \alpha_9 X_3^2 \quad (1)$$

where X_1 , X_2 , and X_3 are independent factors, y is the observed response, and α_0 to α_9 are regression coefficients [37]. Analysis of variance (ANOVA), lack of fit, and multiple correlation coefficient (R^2) tests were used to validate the models.

BBD (Design Expert® 13 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA) software) was performed to learn the effect of three critical factors amount of polymer (X_1), amount of soy phosphatidylcholine (X_2), and amount of DSPE-PEG (X_3) on the particle size (Y_1), PDI (Y_2), and ZP (Y_3) for PLGA-LPHNPs and PCL-LPHNPs. These designs are rotatable and necessitate 3 levels (-1, 0, +1) of all factors. For LPHNPs the ranges for independent variables were selected as polymer 10–20 mg, soy phosphatidylcholine 1.5–3 mg, and DSPE-PEG 0.4–0.8 mg (Table 1). The fifteen batches

of BBD, PLGA-LPHNPs (PLGA-LPHNPs-1 to PLGA-LPHNPs-15), and PCL-LPHNPs (PCL-LPHNPs-1 to PCL-LPHNPs-15) are enlisted in Tables II and III.

In the current study's formulation optimization, a desirability function that makes use of the numerical optimization approach in the Design-Expert program simultaneously optimized all three responses. Several more studies have reported on the desirability function strategy for optimizing multiple responses [38–44]. According to the desirability function technique, multicriteria responses are approached as single criterion problems while individual responses are given desirable goals [45].

Preparation of Crizotinib-Loaded PLGA-LPHNPs and Crizotinib-Loaded PCL-LPHNPs by One-Step Method

Various methods for the synthesis of LPHNPs have been established, although they can be divided into two methods: (i) two-step methods and (ii) one-step methods. One-step methods are more commonly used because they are cost-effective, scalable, and predictable, whereas two-step methods have been showed to be time-consuming and unsuitable for scale-up [29, 31, 34, 46]. Therefore, the blank, crizotinib-loaded PLGA-LPHNPs (CL-PLGA-LPHNPs) and crizotinib-loaded PCL-LPHNPs (CL-PCL-LPHNPs) were prepared in triplicate using the nanoprecipitation method [28, 29, 33]. Briefly, crizotinib (%5 (w/w) of total polymer) and polymer (PLGA/PCL) were dissolved together in a water-miscible organic solvent (acetone); the DSPE-PEG 2000 and soy phosphatidylcholine dissolved in

Table 1 Variables Used in the Box-Behnken Design

| | Levels, actual (coded) | | |
|---------------------------------|------------------------|------------|-----------|
| | Low (-1) | Medium (0) | High (+1) |
| Independent variables | | | |
| X_1 : amount of polymer (mg) | 10 | 15 | 20 |
| X_2 : amount of lipid (mg) | 1.5 | 2.25 | 3 |
| X_3 : amount of DSPE-PEG (mg) | 0.4 | 0.6 | 0.8 |
| Goals | | | |
| Dependent variables | | | |
| Y_1 : particle size (nm) | Minimize | | |
| Y_2 : polydispersity index | Minimize | | |
| Y_3 : zeta potential (mV) | -20 to -30 | | |

Table II Experimental Matrix and Observed Responses from Randomized Runs in the Box–Behnken Design for PLGA-LPHNPs (Results Denote Mean \pm SD, $n=3$)

| Run | Independent variables | | | Dependent variables | | |
|-----|-----------------------|----------------|----------------|---------------------|-------------------|---------------------|
| | X ₁ | X ₂ | X ₃ | Y ₁ (nm) | Y ₂ | Y ₃ (mV) |
| 1 | -1 | -1 | 0 | 135.6 \pm 1.054 | 0.137 \pm 0.011 | -28.7 \pm 1.650 |
| 2 | -1 | 0 | -1 | 149.9 \pm 1.845 | 0.283 \pm 0.012 | -25.7 \pm 0.150 |
| 3 | -1 | 0 | 1 | 141.6 \pm 0.404 | 0.180 \pm 0.018 | -27.5 \pm 0.640 |
| 4 | -1 | 1 | 0 | 159.4 \pm 2.424 | 0.341 \pm 0.023 | -17.5 \pm 0.200 |
| 5 | 0 | -1 | -1 | 141.6 \pm 1.209 | 0.126 \pm 0.013 | -21.9 \pm 0.510 |
| 6 | 0 | -1 | 1 | 148.1 \pm 0.984 | 0.097 \pm 0.007 | -32.0 \pm 0.950 |
| 7 | 0 | 0 | -1 | 144.5 \pm 2.157 | 0.141 \pm 0.016 | -27.1 \pm 0.510 |
| 8 | 0 | 0 | 0 | 153.5 \pm 0.585 | 0.116 \pm 0.018 | -23.4 \pm 1.010 |
| 9 | 0 | 0 | 1 | 151.5 \pm 0.650 | 0.112 \pm 0.022 | -25.8 \pm 0.379 |
| 10 | 0 | 1 | -1 | 237.1 \pm 2.015 | 0.222 \pm 0.010 | -9.35 \pm 0.482 |
| 11 | 0 | 1 | 1 | 153.1 \pm 1.039 | 0.207 \pm 0.003 | -19.1 \pm 0.781 |
| 12 | 1 | -1 | 0 | 149.2 \pm 0.964 | 0.110 \pm 0.013 | -26.8 \pm 0.350 |
| 13 | 1 | 0 | -1 | 145.3 \pm 1.079 | 0.121 \pm 0.070 | -25.5 \pm 0.700 |
| 14 | 1 | 0 | 1 | 179.5 \pm 1.626 | 0.138 \pm 0.014 | -26.0 \pm 0.265 |
| 15 | 1 | 1 | 0 | 167.9 \pm 3.134 | 0.166 \pm 0.008 | -20.6 \pm 0.850 |

4% (v/v) ethanol-water solution. The DSPE-PEG 2000 and soy phosphatidylcholine were warmed to about 50°C. The aqueous phase was then gradually and continuously stirred at 550 rpm while the organic phase was added dropwise. The organic phase was allowed to evaporate with continuous stirring for 24 h. The LPHNPs were precipitated using centrifugation at 14,000 rpm for 30 min after the organic solvent evaporated, and the supernatant was kept for drug quantification analysis. The precipitate was subsequently washed three times using distilled water (Fig. 1).

Characterization of LPHNPs

Measurement of Particle Size, Polydispersity Index, and Zeta Potential

The average particle size and PDI were determined using dynamic light scattering (DLS), and the zeta potential was assessed in an aqueous medium at room temperature using the Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK). At least three separate batches of nanoparticles were

Table III Experimental Matrix and Observed Responses from Randomized Runs in the Box–Behnken Design for PCL-LPHNPs (Results Denote Mean \pm SD, $n=3$)

| Run | Independent variables | | | Dependent variables | | |
|-----|-----------------------|----------------|----------------|---------------------|-------------------|---------------------|
| | X ₁ | X ₂ | X ₃ | Y ₁ (nm) | Y ₂ | Y ₃ (mV) |
| 1 | -1 | -1 | 0 | 212.7 \pm 1.803 | 0.120 \pm 0.033 | -36.2 \pm 0.757 |
| 2 | -1 | 0 | -1 | 250.9 \pm 3.179 | 0.220 \pm 0.004 | -27.3 \pm 0.404 |
| 3 | -1 | 0 | 1 | 195.2 \pm 0.550 | 0.117 \pm 0.022 | -41.9 \pm 0.603 |
| 4 | -1 | 1 | 0 | 230.8 \pm 2.809 | 0.164 \pm 0.027 | -31.7 \pm 0.760 |
| 5 | 0 | -1 | -1 | 274.6 \pm 2.101 | 0.131 \pm 0.021 | -31.9 \pm 0.569 |
| 6 | 0 | -1 | 1 | 242.8 \pm 1.039 | 0.121 \pm 0.032 | -46.4 \pm 1.060 |
| 7 | 0 | 0 | -1 | 244.8 \pm 0.611 | 0.162 \pm 0.010 | -36.1 \pm 0.608 |
| 8 | 0 | 0 | 0 | 220.2 \pm 0.721 | 0.160 \pm 0.016 | -43.6 \pm 1.150 |
| 9 | 0 | 0 | 1 | 257.4 \pm 1.873 | 0.157 \pm 0.017 | -37.1 \pm 0.681 |
| 10 | 0 | 1 | -1 | 284.8 \pm 1.550 | 0.191 \pm 0.033 | -40.0 \pm 0.200 |
| 11 | 0 | 1 | 1 | 262.5 \pm 0.642 | 0.170 \pm 0.019 | -44.4 \pm 0.458 |
| 12 | 1 | -1 | 0 | 260.8 \pm 2.571 | 0.169 \pm 0.014 | -46.5 \pm 1.210 |
| 13 | 1 | 0 | -1 | 267.4 \pm 2.101 | 0.184 \pm 0.008 | -41.4 \pm 2.210 |
| 14 | 1 | 0 | 1 | 273.1 \pm 2.747 | 0.185 \pm 0.012 | -30.4 \pm 4.710 |
| 15 | 1 | 1 | 0 | 268.0 \pm 1.801 | 0.180 \pm 0.020 | -33.2 \pm 1.700 |

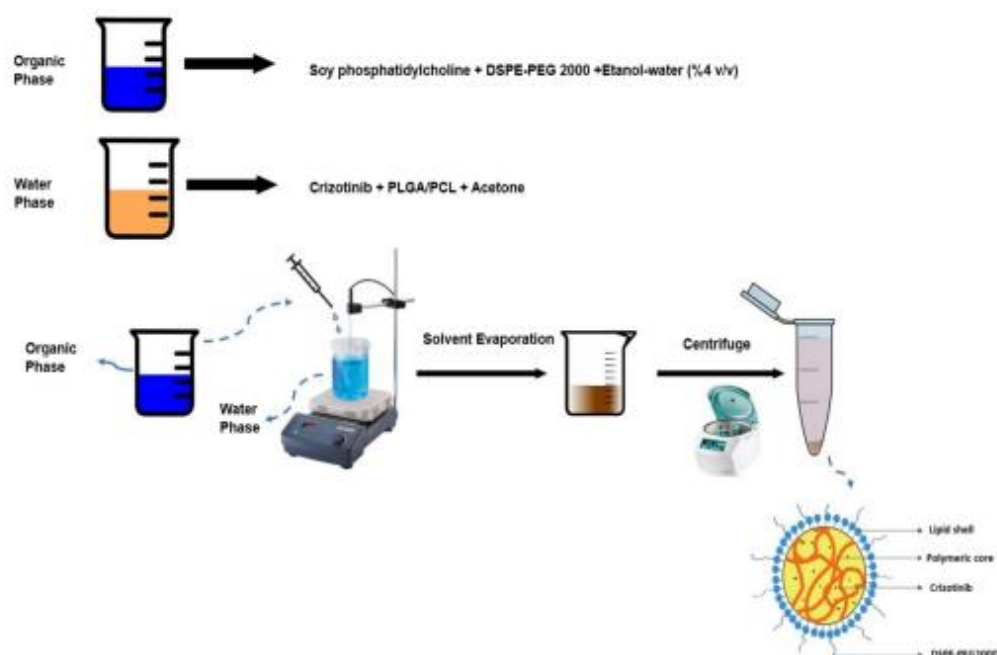


Fig. 1 The preparation of crizotinib-loaded PLGA-LPHNPs and crizotinib-loaded PCL-LPHNPs

used for the measurements, which were carried out in triplicate [47].

Morphological Evaluation

The morphological characteristics of CL-PLGA-LPHNPs and CL-PCL-LPHNPs were investigated using TEM. Following the application of a 10 mL nanoparticle dispersion in ultrapure water onto a copper grid coated with a carbon film, it was allowed to dry naturally in the atmosphere before imaging was performed using the TEM device (FEI Tecnai G2 Spirit BioTwin, USA) [47].

Crizotinib Encapsulation Efficiency

High-performance liquid chromatography (HPLC) instrument (Dionex, Germany) was utilized to quantify the amount of unbound crizotinib in the supernatant with a C18 column (250 mm×4.6 mm, 5 μm particle size). Methanol and 0.1% orthophosphoric acid (50:50 v/v) mixture was used as the mobile phase at a flow rate of 1 mL/min at 24±0.5°C. The UV detector was set at 264 nm and the injection volume was set as 20 μL. Crizotinib concentration was calculated using calibration curve consisted with seven different standards of crizotinib ($R^2 = 0.999$). All samples were measured in triplicate.

The EE was calculated using Eq. (2), which is shown below.

$$EE(\%) = \frac{\text{Amount of Crizotinib added LPHNPs (mg)} - \text{Amount of Crizotinib in supernatant (mg)}}{\text{Amount of Crizotinib added LPHNPs (mg)}} \times 100 \quad (2)$$

Drug Release Studies

The release of crizotinib from the LPHNPs was evaluated using a practical, easy, affordable sample and separate

method [47]. The LPHNPs (which contain 5% (w/w) of the polymer amount of crizotinib) were mixed in 2 mL of pH 7.4 PBS and then incubated at 37°C in a horizontal shaker water bath (Mammert, Germany). At specific intervals (0,

1, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48, and 72 h), the samples were centrifuged for 20 min at 14,000 rpm and 4°C, and the supernatant was gathered. Samples were returned to the water bath after nanoparticles were re-dispersed in 1 mL of fresh medium. HPLC was used to determine the amount of released crizotinib in the supernatant [16, 17, 19].

In Vitro Cytotoxicity Studies

The effects of LPHNPs on the cell proliferation of NCI-H2228 (EML4-ALK fusion lung cancer) cell lines were evaluated using the quantitative and colorimetric XTT method. A total of 4×10^4 – 6×10^4 cells were seeded in RPMI media supplemented with 10% (v/v) FBS in each well of 96-well plates, followed by incubation for 24 h. Nanoparticle formulations (crizotinib loaded and blank) and crizotinib as a positive control were diluted at various concentrations and applied to the cells and incubated for 48 h. After incubation, 50 μ L of XTT solution was added per well and after 4 h of incubation, the absorbance of each well was measured by microplate reader (FLUOstar® Omega (BMG LabTech, Germany)) at 450 nm wavelength. Results were standardized using control group values and presented as % viability ($n=6$).

Evaluation of In Vitro Inhibitor Activity

Real-time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

To assess the expression levels of the RAS, RAF, MEK, and ERK genes in the downstream pathway of the EML4-ALK gene in the produced formulations, RT-PCR was employed [48, 49]. In 6-well plates, NCI-H2228 (EML4-ALK fusion lung cancer) cells were plated (3×10^5 cells/well). After the cells reached full confluency, crizotinib-loaded LPHNP formulations and free crizotinib were applied and incubated for 48 h at 37°C. Total RNA was extracted from the cells after incubation utilizing an RNA extraction kit and following to the manufacturer's instructions. Following the manufacturer's instructions, SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA) was used to generate cDNA from total RNA that had been extracted. To verify the absence of contamination in the samples, negative control samples were prepared without the addition of reverse transcriptase. SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA) was used for the RT-PCR analysis in 96-well plates utilizing the Viia 7 (Applied Biosystems, USA) sequence detection system. GAPDH, a commonly used internal control housekeeping gene, was employed to normalize the expression levels of the examined genes. The following primers were generated using the Primer-BLAST tool (Table IV).

Table IV Primer Sequences to be Used in RT-PCR Experiments

| Gene | 5'→3' | Tm |
|-------|-----------------------------|-------|
| KRAS | F: AGCTGTATCGTCAAGGCACT | 59.10 |
| | R: AGGTACTGGTGGAGTATTGATAGT | 58.80 |
| RAF | F: CTCTCCTACAATAGITTCAG | 48.86 |
| | R: TTCCATTTTCGCACATTGAC | 54.30 |
| MEK | F:GGTGTTC AAGGTCTCCACAAG | 66.8 |
| | R:CCACGATGTACGGAGAGTTGCA | 69.3 |
| ERK | F: ACACCAACCTCTCGTACATCGG | 67.2 |
| | R:TGGCAGTAGGTCTGGTGCTCAA | 69.1 |
| GAPDH | F:GCATCTTCTTGTGCAGTGCC | 60.11 |
| | R:TACGGCCAATCCGTTCA | 59.96 |

F, Sequence of Forward Primer; R, Sequence of Reverse Primer

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Sandwich-ELISA was used to assess the levels of cell RAS, RAF, MEK, and ERK protein expression following 48 h of incubation with the formulations [50]. The analysis was performed using the Human B-raf ELISA kit, the Human K-RAS ELISA kit, the Human MAP4K1 ELISA kit, and the Human ERK-1 ELISA kit (Bioassay Technology, China) according to the manufacturer's instructions.

Stability Studies

In accordance with the ICH (Q1C) criteria, stability experiments were performed on the optimized nanoparticle formulation by subjecting it to storage conditions of room temperature ($25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}/60\% \text{RH} \pm 5\% \text{RH}$), freeze temperature ($4^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$), and elevated temperature ($40^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}/75\% \text{RH} \pm 5\% \text{RH}$). PDI and ZP% analyses were conducted on the optimized formulations after the first, second, third, and sixth months.

Statistical Analysis

Development of LPHNPs was done by BBD using Design-Expert® software. The results are shown as means with standard deviations (SD). Student's *t*-test and ANOVA were used to analyze statistically significant differences. Each test result was obtained from a minimum of three separate experiments. Statistical significance was considered at $p < 0.05$. The statistical calculations were performed utilizing Graph-Pad Prism ®8 software.

Results

Optimization and Characterization of LPHNPs

Fifteen experiments for each of two different polymers are performed for BBD. A series of experiments was conducted based on the various combinations of factor levels generated during the experimental runs. Table 1 shows the experimental matrix for the independent variables and observed responses from the randomized runs. The results of particle size, PDI, and ZP for all formulations (PLGA-LPHNPs-1 to PLGA-LPHNPs-15 and PCL-LPHNPs-1 to PCL-LPHNPs-15) are represented in Tables II and III. Fourteen formulations from PLGA-LPHNPs showed a particle size of < 200 nm and the rank of a particle size for all PLGA-LPHNPs was 165.6–237.1 nm. PDI was below 0.3 for all PLGA-LPHNP formulations, which clearly indicates the formation of monodispersed LPHNPs. PLGA-LPHNPs zeta potential between –10 mV and –32 mV. The ranges of particle size, PDI, and zeta-potential for PCL-LPHNPs were 195–284 nm, 0.1 to 0.2, and –27.3 to –46 mV respectively. The PDI value, an important factor of the particle size distribution and a sign that nanoparticles were produced with maximum homogeneity, is less than 0.3 for all LPHNP formulations [51, 52]. Zeta potential values for the formulations of all LPHNPs ranged from –10 to –46 mV (Tables II and III). The negative zeta potential of LPHNPs may have been mediated by the DSPE-PEG [53].

Figures 2 and 3 show surface and contour plots of the responses over the chosen factors to further explain the relation between the dependent and independent variables. These graphs are useful for identifying the interactions between two variables and for comprehending how the change in the amount of one variable would affect the effect of another. Using the desirability function, the independent variables were at the same time optimized for each responses after the effects of the dependent and independent factors on the responses were determined [37]. A multi-response using mathematical calculation is converted into a single response using a desirability function. For the optimized LPHNP formulation, a desirability function was used to achieve the desired goals. The goals were to decrease particle size and PDI, and maintain ZP of –20/–30 mV. The optimized PLGA-LPHNPs levels of X_1 , X_2 , and X_3 were 11.5 mg, 1.5 mg, and 0.7 mg, while the predicted values of Y_1 , Y_2 , and Y_3 were 137.74 nm, 0.104, and –30 mV and the optimized PCL-LPHNPs levels of X_1 , X_2 , and X_3 were 10 mg, 1.5 mg, and 0.6 mg, while the predicted values of Y_1 , Y_2 , and Y_3 were 213.99 nm, 0.121, and –33.28 mV, respectively.

In order to verify the accuracy of the determined expected responses and ideal parameters, three batches of the optimized formulations were created. For each optimized formulation, all of the responses were assessed.

Tables V and VI show comparisons between expected and experimental results. As can be observed, the experimental results were broadly in line with the expected results and demonstrated the effectiveness of BBD combined with desirability function to develop and improve the LPHNP formulations. The analysis of variance using the ANOVA test in the Box–Behnken experiment is summarized in Tables VII and VIII. At the 95% confidence level, there is a statistically significant link between the variables being investigated if the p -value in the ANOVA table is less than 0.05. In this design, the p values of X_1 , X_2 , X_3 , and X_1X_3 for particle size response; X_1 , X_3 , X_1X_2 , X_1X_3 , and X_1^2 for polydispersity index response; and X_2X_3 for zeta potential response were $p < 0.05$ for lipid-polymer hybrid nanoparticles prepared with PLGA. In lipid-polymer hybrid nanoparticles prepared with PCL, all variables except X_1^2 for particle size response; X_1 , X_2 , X_3 , and X_1X_3 variables for polydispersity index response; and X_1X_3 variable for zeta potential response were $p < 0.05$. The correlation between the observed and predicted values is better when R^2 is close to 1. In terms of particle size response, the R^2 value for both formulations was examined closer to 1.

The particle size, PDI, and ZP values of optimum CL-PLGA-LPHNPs and CL-PCL-LPHNPs are shown in Table IX. Table IX indicates the addition of crizotinib that did not produce a significant influence on PLGA-LPHNPs and PCL-LPHNPs in terms of particle size and PDI. The mean particle size of CL-PLGA-LPHNPs and CL-PCL-LPHNPs was 124 ± 0.960 and 210.8 ± 1.701 nm, respectively. The PDI of all samples was < 0.2.

Morphological Characterization of Optimized LPHNPs

Morphological characterization of optimized LPHNPs includes the size, surface, and appearance of the globule using TEM (Fig. 4). The images demonstrated that all LPHNPs exhibited a uniform, spherical shape, with a distinct dark polymeric core surrounded by a lighter phospholipid coating. The particle size results of DLS and the particle size of LPHNPs as determined by TEM showed good correlation.

Crizotinib Encapsulation Efficiency and Drug Release Studies

An indirect method was followed to measure the EE% of CL-PLGA-LPHNPs and CL-PCL-LPHNPs which were measured as $79.25 \pm 0.07\%$ and $70.93 \pm 1.81\%$, respectively. The drug release profiles of crizotinib from CL-PLGA-LPHNPs and CL-PCL-LPHNPs were studied in phosphate-buffered saline (pH 7.4) at 37°C. There was a significant difference ($p < 0.01$) observed in the rate and extent of drug

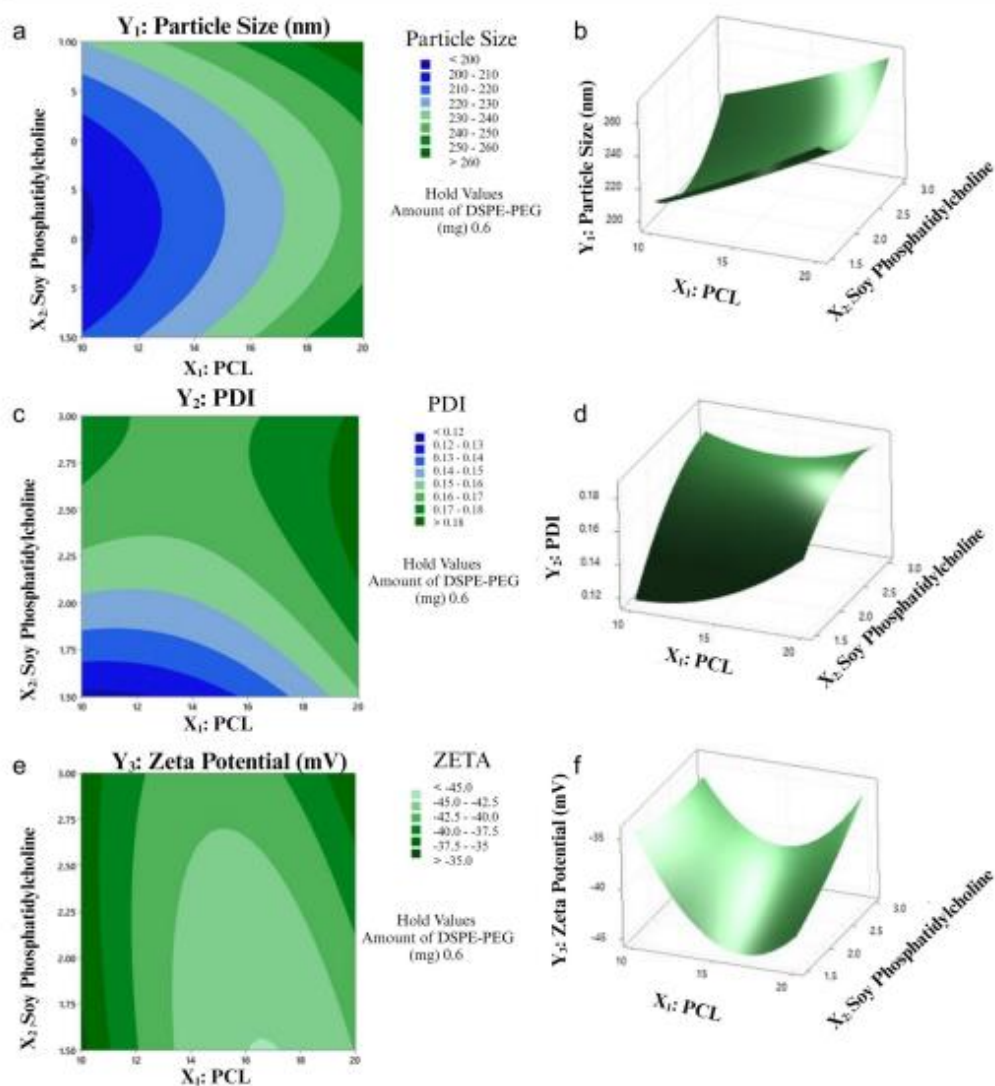


Fig. 2 Effect of PCL and soy phosphatidylcholine interaction on particle size (a), PDI (c), zeta potential (e) surface graphs and (b), (d), (f) contour graphs at the mid-level of DSPE-PEG

release between CL-PLGA-LPHNPs and CL-PCL-LPHNPs. In the initial 8 h, approximately 50% of crizotinib was released from CL-PCL-LPHNPs, whereas the release from CL-PLGA-LPHNPs occurred over a period of 24 h. Over a period of 96 h, the CL-PLGA-LPHNPs exhibited a gradual

and controlled release of the drug, with 100% of the drug being released without any observed burst effects (Fig. 5). In addition, approximately 100% crizotinib was found to be released from CL-PCL-LPHNPs in a controlled manner within 48 h.

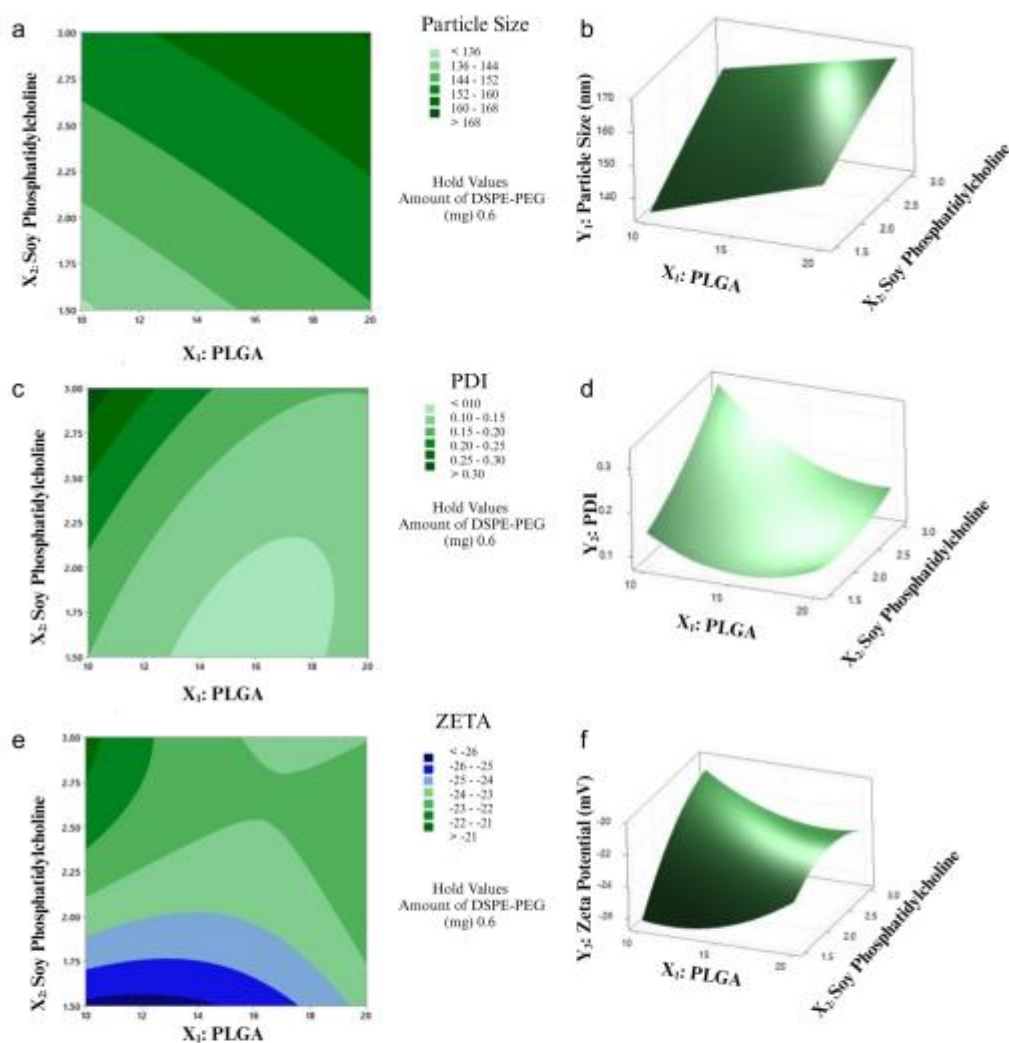


Fig. 3 Effect of PLGA and soy phosphatidylcholine interaction on particle size (a), PDI (c), zeta potential (e) surface graphs and (b), (d), (f) contour graphs at the mid-level of DSPE-PEG

In Vitro Cytotoxicity Studies

The cytotoxicity potential of free crizotinib, CL-PLGA-LPHNPs, and CL-PCL-LPHNPs were investigated on NCI-H2228 cells. Cells were incubated with series of equivalent concentrations (0.025 μM - 0.05 μM - 0.1 μM - 0.2 μM - 0.4

μM -0.8 μM and 1.6 μM) of free crizotinib, CL-PLGA-LPHNPs, or CL-PCL-LPHNPs for 48 h. XTT assay was used to measure the cells' vitality (Fig. 6). The inhibitory concentration (IC_{50}) values for free crizotinib, CL-PLGA-LPHNPs, and CL-PCL-LPHNPs were found to be 0.7 μM , 0.4 μM , and 0.3 μM respectively. The results revealed that

Table V Comparison of Predicted and Observed Experimental Values of PLGA-LPHNPs Prepared Under Optimum Conditions (Results Denote Mean \pm SD, $n = 3$)

| Response | Predicted value | Observed value | Residuals | Bias ^a (%) |
|----------|-----------------|-------------------|-----------|-----------------------|
| Y1 (nm) | 137.74 | 134.0 \pm 4.063 | -3.74 | 2.8 |
| Y2 | 0.104 | 0.148 \pm 0.012 | 0.044 | -30 |
| Y3 (mV) | -30 | -22.9 \pm 0.780 | 7.1 | 31 |

^aBias (%) = (predicted value - observed value)/observed value \times 100

CL-PLGA-LPHNPs and CL-PCL-LPHNPs were better to free crizotinib in terms of efficacy. When compared to free crizotinib, both CL-PLGA-LPHNPs and CL-PCL-LPHNPs exhibited a lower cancer cell survival rate at all dosages. Additionally, a dose-dependent cytotoxicity was observed in both nanoparticle formulations. The findings show that the loading of crizotinib in CL-PLGA-LPHNPs and CL-PCL-LPHNPs enhances the cytotoxic effect of crizotinib.

Evaluation of *In Vitro* Inhibitor Activity

RT-PCR and ELISA

Figure 7 shows the expression levels of the RAS, RAF, MEK, and ERK genes in the cells after incubation with free crizotinib, CL-PLGA-LPHNPs, and CL-PCL-LPHNPs in comparison to the reference gene (GAPDH). It was observed that RAS and RAF gene expression levels decreased similarly for CL-PLGA-LPHNPs and CL-PCL-LPHNPs but CL-PLGA-LPHNPs tended to decrease statistically significant ($p < 0.05$) and at a higher rate than CL-PCL-LPHNPs in MEK and ERK gene expressions.

The expression levels of genes in the target gene's downstream pathway (ALK), as well as the expression levels of the proteins produced by these genes, were examined in order to assess the efficacy of LPHNPs. Figure 8 shows the RAS, RAF, MEK, and ERK protein levels of the cells as evaluated by ELISA 48 h after incubation. MEK and ERK protein levels after 48 h of incubation with NCI-H2228 (EML4-ALK fusion lung cancer) cells were significantly ($p < 0.05$) different in the PLGA group compared to

Table VI Comparison of Predicted and Observed Experimental Values of PCL-LPHNPs Prepared Under Optimum Conditions (Results Denote Mean \pm SD, $n = 3$)

| Response | Predicted value | Observed value | Residuals | Bias ^a (%) |
|----------|-----------------|-------------------|-----------|-----------------------|
| Y1 (nm) | 213.99 | 215.6 \pm 1.588 | -188.39 | -0.75 |
| Y2 | 0.121 | 0.124 \pm 0.010 | 0.003 | -2.42 |
| Y3 (mV) | -33.28 | -28.6 \pm 0.462 | 4.68 | 16.4 |

^aBias (%) = (predicted value - observed value)/observed value \times 100

Table VII Analysis of Variance (ANOVA) Results for CL-PLGA-LPHNPs

| Model | Degree of freedom | Y ₁ | | | Y ₂ | | | Y ₃ | | | | | |
|-------------------------------|-------------------|-------------------------|---------|---------|-------------------------|---------|---------|-------------------------|---------|---------|-------|-------|------------------------|
| | | Adjusted sum of squares | F-value | p value | Adjusted sum of squares | F-value | p value | Adjusted sum of squares | F-value | p value | | | |
| | | Mean squares | | | Mean squares | | | Mean squares | | | | | |
| | 9 | 1798.35 | 199.816 | 4.79 | 0.050 | 0.0071 | 15.45 | 0.004 | 335.452 | 37.272 | 2.18 | 0.202 | |
| X ₁ | 1 | 383.64 | 383.645 | 9.20 | 0.029 | 0.0206 | 44.53 | 0.001 | 0.031 | 0.031 | 0.00 | 0.968 | |
| X ₂ | 1 | 766.36 | 766.361 | 18.38 | 0.008 | 0.0218 | 47.20 | 0.001 | 18.911 | 18.911 | 1.11 | 0.341 | |
| X ₃ | 1 | 21.45 | 21.451 | 0.51 | 0.050 | 0.0008 | 1.82 | 0.236 | 8.820 | 8.820 | 0.52 | 0.505 | |
| X ₁ X ₂ | 1 | 6.50 | 6.502 | 0.16 | 0.709 | 0.0054 | 11.83 | 0.018 | 6.250 | 6.250 | 0.37 | 0.572 | |
| X ₁ X ₃ | 1 | 451.56 | 451.562 | 10.83 | 0.022 | 0.0036 | 7.78 | 0.038 | 0.423 | 0.423 | 0.02 | 0.881 | |
| X ₂ X ₃ | 1 | 166.41 | 166.410 | 3.99 | 0.102 | 0.0009 | 2.08 | 0.209 | 238.702 | 238.702 | 13.97 | 0.013 | |
| X ₁ ² | 1 | 0.04 | 0.037 | 0.00 | 0.977 | 0.0096 | 20.76 | 0.006 | 3.879 | 3.879 | 0.23 | 0.654 | |
| X ₂ ² | 1 | 0.52 | 0.519 | 0.01 | 0.915 | 0.0017 | 3.69 | 0.113 | 3.879 | 3.879 | 0.23 | 0.654 | |
| X ₃ ² | 1 | 1.68 | 1.682 | 0.04 | 0.849 | 0.0006 | 1.45 | 0.282 | 53.317 | 53.317 | 3.12 | 0.138 | |
| | | | | | | | | | | | | | R ² = 0.989 |
| | | | | | | | | | | | | | R ² = 0.897 |

Table VIII Analysis of Variance (ANOVA) Results for CL-PCL-LPHNPs

| Model | Degree of freedom | Y ₁ | | | | Y ₂ | | | | Y ₃ | | | |
|-------------------------------|-------------------|-------------------------|-----------------------|---------|---------|-------------------------|-----------------------|---------|---------|-------------------------|-----------------------|---------|---------|
| | | Adjusted sum of squares | Adjusted mean squares | F-value | p value | Adjusted sum of squares | Adjusted mean squares | F-value | p value | Adjusted sum of squares | Adjusted mean squares | F-value | p value |
| Model | 9 | 10425.5 | 1158.38 | 383.63 | <0.0001 | 0.0109 | 0.0012 | 5.39 | 0.039 | 463.047 | 51.450 | 2.31 | 0.185 |
| X ₁ | 1 | 4036.5 | 4036.51 | 1336.81 | <0.0001 | 0.0011 | 0.0011 | 5.20 | 0.071 | 25.920 | 25.920 | 1.17 | 0.330 |
| X ₂ | 1 | 380.9 | 380.88 | 126.14 | <0.0001 | 0.0033 | 0.0033 | 14.87 | 0.012 | 17.111 | 17.111 | 0.77 | 0.421 |
| X ₃ | 1 | 1354.6 | 1354.60 | 448.62 | <0.0001 | 0.0022 | 0.0022 | 9.78 | 0.026 | 63.281 | 63.281 | 2.84 | 0.153 |
| X ₁ X ₂ | 1 | 29.7 | 29.70 | 9.84 | 0.026 | 0.0002 | 0.0002 | 1.20 | 0.323 | 19.360 | 19.360 | 0.87 | 0.394 |
| X ₁ X ₃ | 1 | 942.5 | 942.49 | 312.13 | 0.0001 | 0.0027 | 0.0027 | 11.96 | 0.018 | 163.840 | 163.840 | 7.36 | 0.042 |
| X ₂ X ₃ | 1 | 22.6 | 22.56 | 7.47 | 0.041 | 0.0001 | 0.0001 | 0.13 | 0.730 | 25.502 | 25.502 | 1.15 | 0.333 |
| X ₁ ² | 1 | 10.4 | 10.36 | 3.43 | 0.123 | 0.0004 | 0.0004 | 1.89 | 0.228 | 135.707 | 135.707 | 6.10 | 0.057 |
| X ₂ ² | 1 | 1659.5 | 1659.47 | 549.58 | <0.0001 | 0.0005 | 0.0005 | 2.55 | 0.171 | 1.501 | 1.501 | 0.07 | 0.805 |
| X ₃ ² | 1 | 2266.3 | 2266.34 | 750.57 | <0.0001 | 0.0001 | 0.0001 | 0.54 | 0.496 | 19.321 | 19.321 | 0.87 | 0.394 |
| R ² | 0.998 | | | | | 0.906 | | | | 0.860 | | | |

the control group, whereas RAF protein levels were significantly different for the free crizotinib group compared to the control group ($p < 0.05$).

Stability Studies

To assess the ability of CL-PLGA-LPHNPs and CL-PCL-LPHNPs to tolerate environmental changes, storage stability studies were carried out at various temperatures (4°C, 25°C, and 40°C). The mean particle size, PDI, and ZP of the CL-PLGA-LPHNPs and CL-PCL-LPHNPs were determined during the stability analysis and the findings are shown in Table X. Upon a 6-month evaluation, the formulations CL-PLGA-LPHNPs and CL-PCL-LPHNPs were deemed stable, as evidenced by the absence of significant changes in the aforementioned parameters at 4°C, as presented in Table X. It was observed that both formulations did not remain stable at the end of the first month 25°C and 40°C. When comparing the formulations stored at 25°C and 40°C for 1 month, it was observed that the increase in particle size of CL-PLGA-LPHNPs and CL-PCL-LPHNPs formulations was less pronounced when stored at 4°C. Caused by the aggregation of the particles, the size of CL-PLGA-LPHNPs and CL-PCL-LPHNPs expanded with the expansion of time intervals. Therefore, for enhanced stability, it is recommended to store the formulations at 4°C.

Discussion

The management of lung cancer poses a challenging dilemma due to the increasing rates of morbidity and mortality worldwide [54]. Lung cancer is highly heterogeneous, and each patient's evolution of the disease exhibits distinct histological and genetic characteristics. As a result, treatment outcomes and prognoses vary greatly [55, 56]. Along with breakthroughs in new molecularly targeted therapies, such as those involving crizotinib, the most significant changes are mainly related to the treatment of NSCLC.

Crizotinib, an orally administered drug approved by the FDA in 2011, is utilized in the treatment of lung cancer. Its mechanism of action involves inhibiting hepatocyte growth factor receptor tyrosine kinases as well as ALK, leading to cell death through the activation of caspase-3 [12]. Crizotinib has been recommended by the American Society of Clinical Oncology (ASCO) recommendations for the second- or third-line therapy of advanced NSCLC with ALK positive [57]. However, with the accelerating use of crizotinib in clinical practice, it has been shown to have problems such as strong hydrophobicity, poor bioavailability, poor solubility, limited circulation time, drug resistance, and extensive tissue toxicity in oral administration. In response to these problems, nanoparticle-based methods for drug

Table IX Particle Characterization and Encapsulation Efficiencies of the Developed CL-PLGA-LPHNPs and CL-PCL-LPHNPs (Results Denote Mean \pm SD, $n=3$)

| Formulate | Particle size (nm) \pm SD | PDI | ZP (mV) | %EE \pm SD |
|----------------|-----------------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| CL-PLGA LPHNPs | 124 \pm 0.9609 | 0.205 \pm 0.001 | -10.4 \pm 0.327 | 79.25 \pm 0.07 |
| CL-PCL-LPHNPs | 211.8 \pm 1.701 | 0.123 \pm 0.005 | -7.55 \pm 0.445 | 70.93 \pm 1.81 |

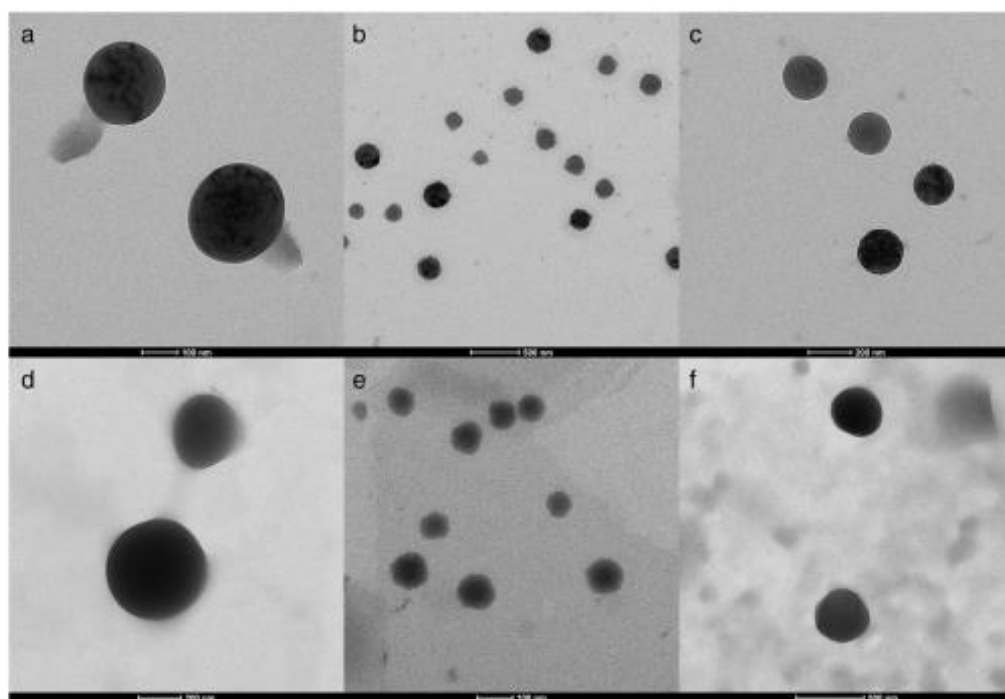
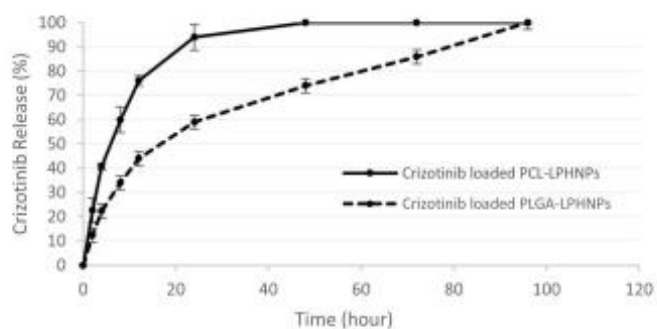
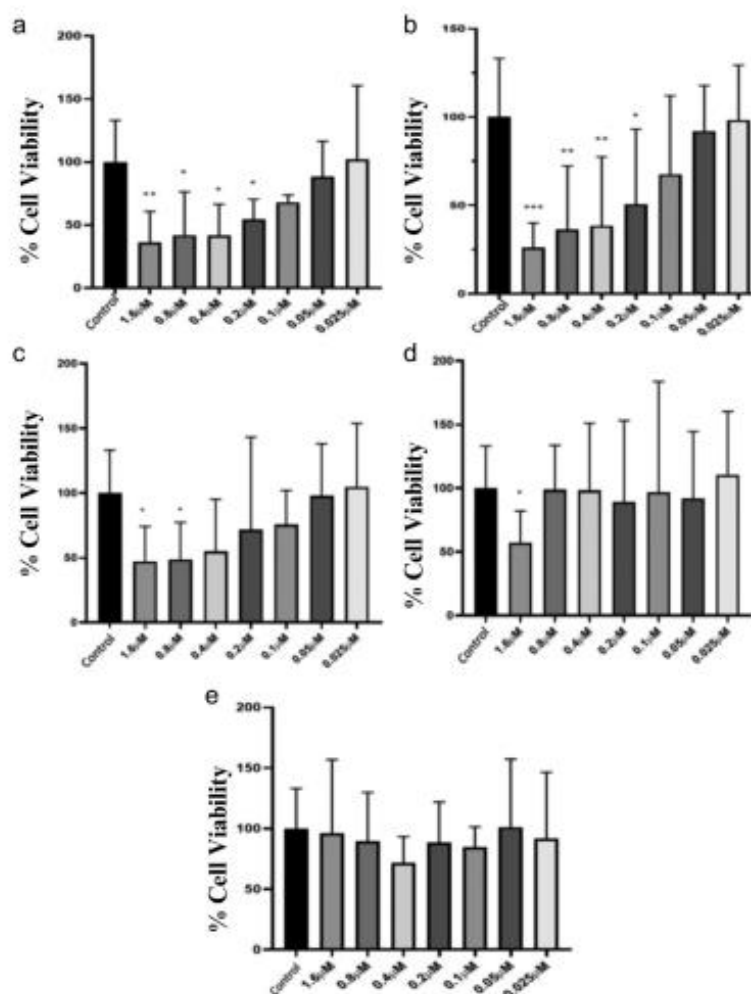
**Fig. 4** TEM image of CL-PLGA-LPHNPs and CL-PCL-LPHNPs (a: 100 nm; b: 500 nm; c: 200 nm; d: 200 nm; e: 100 nm; f: 500 nm)**Fig. 5** Release of crizotinib from the CL-PLGA-LPHNPs and CL-PCL-LPHNPs formulations for 96 h. (Results denote mean \pm SD, $n=3$)

Fig. 6 *In vitro* cellular viability results of CL-PLGA-LPHNPs (a), CL-PCL-LPHNPs (b), free crizotinib (c), PLGA-LPHNPs (d), and PCL-LPHNPs (e) in NCI-H2228 cells after 48 h (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) (results denote mean \pm SD, $n = 6$)



delivery have shown promise in enhancing the bioavailability and anticancer effectiveness of poorly water-soluble drugs.

In this study, PLGA-LPHNPs and PCL-LPHNPs were utilized as a drug delivery system for crizotinib for the first time, and prepared systems were optimized and evaluated for their anti-cancer efficacy using *in vitro* studies.

The CL-PLGA-LPHNPs and CL-PCL-LPHNPs were effectively optimized and prepared using a nanoprecipitation method. The mean particle size of the obtained CL-PLGA-LPHNPs and CL-PCL-LPHNPs ranged from 120 to 220 nm. The significance of nanoparticle sizes, which would significantly alter the fate of nanoparticles *in vivo*, has been

highlighted in recent studies: less than 200 nm was demonstrated improved uptake through the EPR effect, greater stability, lower cytotoxicity, and longer blood circulation time [58, 59]. Additionally, the formulations exhibited an ideal PDI (0.2), which indicates monodispersity. From PLGA-LPHNPs and PCL-LPHNPs, lower zeta potential values of CL-PLGA-LPHNP and CL-PCL-LPHNP formulations may probably be attributed to crizotinib. In both the stability of a colloidal system and the biological applications of nanoparticles, the zeta potential is crucial. Strong repellent interactions between particles can prevent aggregation of the formulations when there is a negative or positive high zeta potential. A zeta potential between ± 20 and 30 mV is

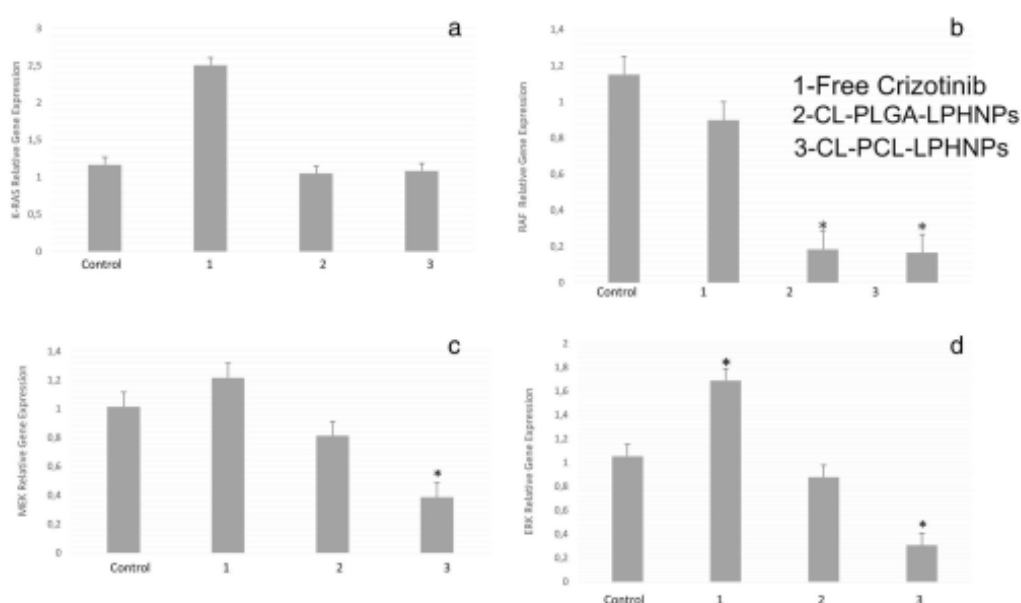


Fig. 7 Relative gene expression changes of NCI-H2228 cells were determined by RT-PCR after treatment with CL-PLGA-LPHNPs and CL-PCL-LPHNPs for 48 h. GAPDH was used as internal control-housekeeping gene. The investigated gene was normalized by propor-

tioning with GAPDH. (* $p < 0.05$) (results denote mean \pm SD, $n = 6$). K-RAS relative gene expression (a), RAF relative gene expression (b), MEK relative gene expression (c), ERK relative gene expression (d)

preferable and infers electrical stability, while a small zeta potential can lead to clustered and unstable NPs [60, 61]. According to TEM images, CL-PLGA-LPHNPs and CL-PCL-LPHNPs appeared as uniform, smooth, and spherical particles with a dark polymeric core inside and a lighter phospholipid coating surrounding it. No apparent difference in shape or size was seen between various formulations. Moreover, the encapsulation efficiency values of CL-PLGA-LPHNPs and CL-PCL-LPHNPs were $79.25 \pm 0.07\%$ and $70.93 \pm 1.81\%$, respectively. The encapsulation efficiency of nanoparticles depends on different factors like type and concentration of the polymer and lipid, the solubility of polymer and lipid in the solvent, solubility of organic solvent in water, etc. [62]. It was found that the PLGA polymer improved the LPHNPs' ability to encapsulate crizotinib.

Drug release is influenced by multiple factors such as particle size, zeta potential, encapsulation efficiency, interactions between the polymer core and the lipid shell of the drug, and features of polymers like type, amount, hydrophobicity, composition, and structure [63, 64]. The cumulative drug release results of CL-PLGA-LPHNPs and CL-PCL-LPHNPs in pH 7.4 (phosphate buffer solution) are shown in Fig. 5. After 48 h, nearly 100% of crizotinib release was observed from CL-PCL-LPHNPs. When the release profiles

were compared after 48 h, drug release from CL-PLGA-LPHNPs was 2 times slower than that of CL-PCL-LPHNPs. Zhi-Ming Jiang *et al.* reported a similar drug release profile [17]. The results showed that crizotinib was released more slowly from CL-PLGA-LPHNPs but it showed controlled and sustained manner for both formulations. A drug delivery system that can control and maintain drug release in the systemic circulation is much more useful in terms of tumor targeting than conventional drug delivery methods [63].

Cytotoxicity studies were performed with free crizotinib, CL-PLGA-LPHNPs, and CL-PCL-LPHNPs in NCI-H2228 cancer cells using the XTT assay after 48-h incubation. Various concentrations of free crizotinib, CL-PLGA-LPHNPs, and CL-PCL-LPHNPs were treated with the cells. They showed a dose-dependent cytotoxic effect in NCI-H2228 cancer cells (Fig. 6). In comparison to CL-PLGA-LPHNPs and CL-PCL-LPHNPs, free crizotinib exhibited significantly higher cell viability. In NCI-H2228 cells, the free crizotinib half maximum inhibitory concentration (IC_{50}) was approximately $0.7 \mu\text{M}$. CL-PLGA-LPHNPs and CL-PCL-LPHNPs had an IC_{50} of $0.4 \mu\text{M}$ and $0.3 \mu\text{M}$, respectively. The observed IC_{50} showed a 2-fold decrease in IC_{50} with crizotinib-loaded LPHNPs when compared to free crizotinib. This observation indicated that the CL-PLGA-LPHNPs

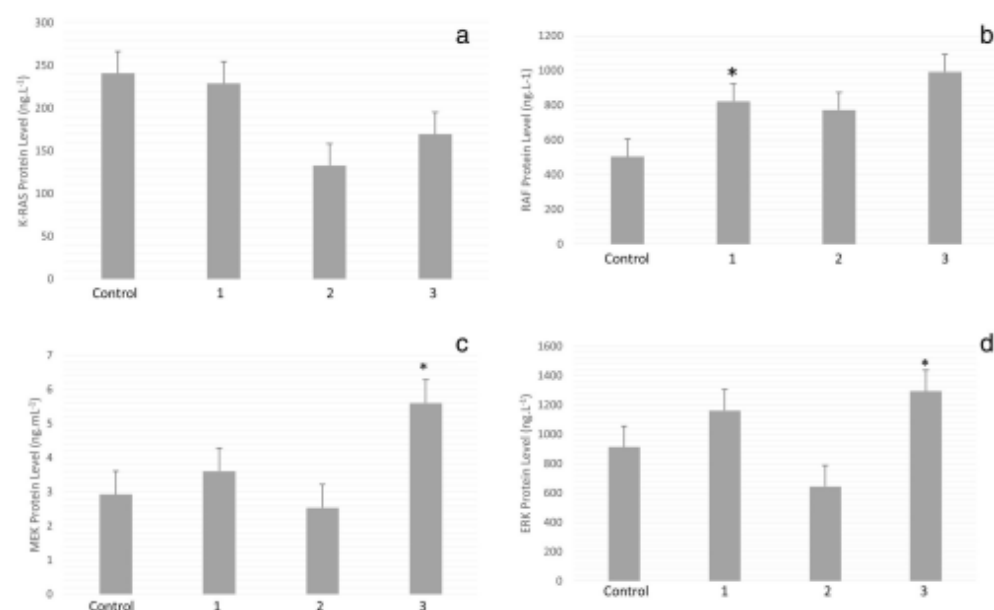


Fig. 8 K-RAS, RAF, MEK, ERK protein levels NCI-H2228 cells were determined by ELISA after 48 h of the nanoparticle administration (* $p < 0.05$) (results denote mean \pm SD, $n = 6$). K-RAS protein

level (ng/L^{-1}) (a), RAF protein level (ng/L^{-1}) (b), MEK protein level (ng/mL^{-1}) (c), ERK protein level (ng/L^{-1}) (d). 1, free crizotinib; 2, CL-PLGA-LPHNPs; 3, CL-PCL-LPHNPs

and CL-PCL-LPHNPs were more effective compared to free crizotinib in killing the NCI-H2228 cancer cells. The enhanced inhibitory effects observed with CL-PLGA-LPHNPs and CL-PCL-LPHNPs can be attributed to their sustained release profile and potentially higher cellular absorption, which are the primary contributing factors. It may be advantageous to use CL-PLGA-LPHNPs and CL-PCL-LPHNPs to enhance drug delivery to the tumor area while reducing side effects. In addition, the cell vitality of

NCI-H2228 cells was examined for the impact of PLGA, PCL, HSPC, and DSPE-PEG2000 by incubating equivalent dosages with blank LPHNPs. When exposed to a significantly higher concentration of blank LPHNPs, there was only a minimal decrease in cell viability, suggesting that LPHNPs could potentially serve as a safe drug delivery system. This study also aims to compare CL-PLGA-LPHNP and CL-PCL-LPHNP formulations. After the optimization and characterization of CL-PLGA-LPHNPs and

Table X Stability of CL-PLGA-LPHNPs and CL-PCL-LPHNPs at 4°C, 25°C \pm 2°C, and 40°C \pm 2°C (Results Denote Mean \pm SD, $n = 3$)

| Time | Conditions | Particle size (nm) | | PDI | | Zeta potential (mV) | |
|----------|----------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------|-------------------|
| | | CL-PLGA-LPHNPs | CL-PCL-LPHNPs | CL-PLGA-LPHNPs | CL-PCL-LPHNPs | CL-PLGA-LPHNPs | CL-PCL-LPHNPs |
| Initial | | 105.24 \pm 3.509 | 212.7 \pm 1.815 | 0.235 \pm 0.026 | 0.347 \pm 0.052 | -12.6 \pm 1.99 | -9.53 \pm 0.324 |
| 1 week | 4°C | 105.25 \pm 1.927 | 153.8 \pm 23.78 | 0.234 \pm 0.017 | 0.341 \pm 0.058 | -12.3 \pm 0 | -3.93 \pm 0.275 |
| | 25°C \pm 2°C | 138.4 \pm 8.618 | 212.7 \pm 1.815 | 0.584 \pm 0.069 | 0.374 \pm 0.023 | -8.88 \pm 3.42 | -2.92 \pm 0.632 |
| | 40°C \pm 2°C | 134.1 \pm 2.663 | 194.9 \pm 4.352 | 0.605 \pm 0.026 | 0.330 \pm 0.043 | -11.1 \pm 0.473 | -2.39 \pm 0.159 |
| 1 month | 4°C | 106.4 \pm 1.531 | 155.1 \pm 1.767 | 0.388 \pm 0.021 | 0.289 \pm 0.033 | -20.6 \pm 1.86 | -1.90 \pm 0.205 |
| | 25°C \pm 2°C | 266 \pm 4.110 | 190.8 \pm 1.940 | 0.430 \pm 0.041 | 0.347 \pm 0.031 | -11.4 \pm 1.01 | -7.88 \pm 0.923 |
| | 40°C \pm 2°C | 164.4 \pm 5.445 | 150.4 \pm 2.606 | 0.578 \pm 0.079 | 0.266 \pm 0.003 | -11.8 \pm 1.27 | -2.15 \pm 0.403 |
| 3 months | 4°C | 107.8 \pm 0.251 | 162.5 \pm 1.819 | 0.387 \pm 0.011 | 0.312 \pm 0.021 | -16.5 \pm 3.12 | -3.17 \pm 0.235 |
| 6 months | 4°C | 129 \pm 1.802 | 232.6 \pm 22.77 | 0.464 \pm 0.025 | 0.439 \pm 0.070 | -18.2 \pm 1.13 | -3.65 \pm 0.561 |

CL-PCL-LPHNPs, it is observed that CL-PCL-LPHNPs had larger particle sizes and were more cationic than CL-PLGA-LPHNPs. Because of the anionic nature of the cell surface allows cationic nanoparticles to enter the cell easily, while the size of the particles is known to affect the entry into the cell [64]. In addition, *in vitro* cell culture studies have observed CL-PLGA-LPHNPs and CL-PCL-LPHNPs show cytotoxicity at similar concentrations.

After 48 h of incubation with CL-PLGA-LPHNPs and CL-PCL-LPHNPs, the levels of the cells' RAS, RAF, MEK, and ERK genes were assessed using RT-PCR, and the results are presented as relative gene expression. When the NCI-H2228 cells' gene expression alterations were analyzed, it was discovered that the expression levels of the RAS and RAF genes reduced similarly for CL-PLGA-LPHNPs and CL-PCL-LPHNPs but CL-PLGA-LPHNPs tended to decrease statistically significant ($p < 0.05$) and at a higher rate than CL-PCL-LPHNPs in MEK and ERK gene expressions. Also, to evaluate the efficiency of CL-PLGA-LPHNPs and CL-PCL-LPHNPs, both the expression level of the target gene and the expression level of the protein that is produced by this gene have to be assessed. Compared to untreated control cells, RAS, RAF, MEK, and ERK protein levels in NCI-H2228 cells decreased after 48 h of treatment with CL-PLGA-LPHNPs and CL-PCL-LPHNPs. K-RAS protein levels decreased in the groups treated with free crizotinib and CL-PLGA-LPHNPs/CL-PCL-LPHNPs compared to the control group. Although the suppression of protein expression obtained with CL-PLGA-LPHNPs and CL-PCL-LPHNPs was higher than that obtained with free crizotinib, in comparison to the control group, this decline was not statistically significant ($p > 0.05$). In addition, when the RAF, MEK, and ERK protein levels are examined, there was no statistically significant decrease in protein levels in cells following the administration of free crizotinib, CL-PLGA-LPHNPs, and CL-PCL-LPHNPs. In a recent study, Baschnagel *et al.* obtained similar results in RAS, RAF, MEK, and ERK protein levels. It is concluded that the 48-h incubation period may be sufficient to reduce the expression to the gene level, but it is not sufficient for the expression at the protein level, and/or those other receptor kinases (epidermal growth factor receptor) of K-RAS, RAF, MEK, and ERK proteins are also involved in the downstream pathway and this may cause accumulation by affecting production [65–69]. Moreover, although suppression at the protein level is not statistically significant, it is considered that the occurrence of only RAS protein is due to the fact that K-RAS takes place in the first step in the downstream pathway of the ALK gene. Furthermore, when evaluating the inhibitory activity at the gene and protein levels *in vitro*, both formulations exhibited similar effects. However, CL-PLGA-LPHNPs demonstrated a slight advantage over CL-PCL-LPHNPs. This can be attributed to several factors including smaller particle sizes, higher

encapsulation efficiency, and a sustained release profile, as well as superior inhibition of gene and protein levels compared to CL-PCL-LPHNPs.

Conclusion

In this study, we successfully formulated CL-PLGA-LPHNPs and CL-PCL-LPHNPs for delivering crizotinib using a nanoprecipitation method. The formulation was optimized using a BBD experiment to achieve desired particle size, PDI, and zeta potential. The mean size of CL-PLGA-LPHNPs and CL-PCL-LPHNPs ranged from 120 to 220 nm, with PDI less than 0.3 and zeta potential between -10 and -15 mV. Encapsulation efficiency was $79.25 \pm 0.07\%$ for CL-PLGA-LPHNPs and $70.93 \pm 1.81\%$ for CL-PCL-LPHNPs. The drug release study demonstrated controlled and sustained release patterns. Storage at 4°C was found to be more suitable than 25°C and 40°C for CL-PLGA-LPHNPs and CL-PCL-LPHNPs. Both formulations showed a significant reduction in cell viability and gene/protein expression levels related to NSCLC after 48 h. These results indicate the potential of CL-PLGA-LPHNPs and CL-PCL-LPHNPs as delivery systems for NSCLC therapy. However, further *in vivo* studies are needed to validate their efficacy. Challenges such as large-scale manufacturing, storage stability, and standardized protocols for preclinical and clinical studies should be addressed to fully realize their clinical potential.

Acknowledgements The authors thank Dr. Aslıhan ARSLAN and Prof. Levent ÖNER for their support during this research.

Author Contribution P. Korucu Aktas, I. Baysal, S. Yabanoglu Ciftci, and B. Arica Yegin designed the study and performed the experiments. All Authors analyzed the data and wrote the paper with input.

Funding This work was supported by the Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) (Grant number: 1002-221S496)

Data Availability The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author.

Declarations

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

References

1. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin.* 2022;72(1):7–33. <https://doi.org/10.3322/caac.21708>.
2. Ramalingam SS, Owonikoko TK, Khuri FR. Lung cancer: new biological insights and recent therapeutic advances. *CA Cancer J Clin.* 2011;61(2):91–112. <https://doi.org/10.3322/caac.20102>.

3. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020 GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer J Clin*. 2021; 71(3):209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
4. Lemjabbar-Alaoui H, Hassan OU, Yang YW, Buchanan P. Lung cancer: biology and treatment options. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1856(2):189–210. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2015.08.002>.
5. Nascimento AV, Gattaceca F, Singh A, Bousbaa H, Ferreira D, Sarmento B, et al. Biodistribution and pharmacokinetics of Mad2 siRNA-loaded EGFR-targeted chitosan nanoparticles in cisplatin sensitive and resistant lung cancer models. *Nanomedicine (Lond)*. 2016;11(7):767–81. <https://doi.org/10.2217/nmm.16.14>.
6. Pal SK, Figlin RA, Reckamp K. Targeted therapies for non-small cell lung cancer: an evolving landscape. *Mol Cancer Ther*. 2010;9(7):1931–44. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.Mct-10-0239>.
7. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*. 2007;448(7153):561–6.
8. Kwak EL, Bang Y-J, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2010;363(18):1693–703.
9. Gridelli C, Peters S, Sgambato A, Casaluce F, Adjei AA, Ciardiello F. ALK inhibitors in the treatment of advanced NSCLC. *Cancer Treat Rev*. 2014;40(2):300–6.
10. Ou SHI. Crizotinib: a novel and first-in-class multitargeted tyrosine kinase inhibitor for the treatment of anaplastic lymphoma kinase rearranged non-small cell lung cancer and beyond. *Drug Des, Dev Ther*. 2011;5:471–85.
11. Khan M, Lin J, Liao G, Tian Y, Liang Y, Li R, et al. ALK inhibitors in the treatment of ALK positive NSCLC. *Front Oncol*. 2019;8:557.
12. Sahu A, Prabhaskar K, Noronha V, Joshi A, Desai S. Crizotinib: a comprehensive review. *South Asian J Cancer*. 2013;2(2):91–7. <https://doi.org/10.4103/2278-330X.110506>.
13. Camidge DR, Bang YJ, Kwak EL, Jafrate AJ, Varella-Garcia M, Fox SB, et al. Activity and safety of crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer: updated results from a phase I study. *Lancet Oncol*. 2012;13(10):1011–9. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(12\)70344-3](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(12)70344-3).
14. Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K, Seto T, Crinó L, Ahn MJ, et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med*. 2013;368(25):2385–94. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1214886>.
15. Zhao D, Chen J, Chu M, Long X, Wang J. Pharmacokinetic-based drug–drug interactions with anaplastic lymphoma kinase inhibitors: a review. *Drug Des Devel Ther*. 2020;14:1663–81.
16. Wang H, Wu Y, Lin X. Crizotinib loaded polydopamine-poly(lactide-TPGS) nanoparticles in targeted therapy for non-small cell lung cancer. *Med Oncol*. 2022;40(1):26. <https://doi.org/10.1007/s12032-022-01893-8>.
17. Jiang ZM, Dai SP, Xu YQ, Li T, Xie J, Li C, et al. Crizotinib-loaded polymeric nanoparticles in lung cancer chemotherapy. *Med Oncol*. 2015;32(7):193. <https://doi.org/10.1007/s12032-015-0636-5>.
18. Zhong T, Liu X, Li H, Zhang J. Co-delivery of sorafenib and crizotinib encapsulated with polymeric nanoparticles for the treatment of in vivo lung cancer animal model. *Drug Deliv*. 2021;28(1):2108–18. <https://doi.org/10.1080/10717544.2021.1979129>.
19. de Melo-Diogo D, Gaspar VM, Costa EC, Moreira AF, Oppolzer D, Gallardo E, et al. Combinatorial delivery of crizotinib-palboiciclib-sildenafil using TPGS-PLA micelles for improved cancer treatment. *Eur J Pharm Biopharm*. 2014;88(3):718–29. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.09.013>.
20. Yang J, Guo H, Lei J, Zhang S, Zhang S, Bai J, et al. Fabrication of polymer-based self-assembly nanocarriers loaded with a crizotinib and gemcitabine: potential therapeutics for the treatment of endometrial cancer. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2022;33(1):20–34. <https://doi.org/10.1080/09205063.2021.1974149>.
21. Haley B, Frenkel E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Urol Oncol*. 2008;26(1):57–64. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2007.03.015>.
22. Kim E-M, Jeong H-J. Liposomes: biomedical applications. *Chonnam Med J*. 2021;57(1):27–35.
23. Zelińska A, Carreiró F, Oliveira AM, Neves A, Pires B, Venkatesh DN, et al. Polymeric nanoparticles: production, characterization, toxicology and ecotoxicology. *Molecules*. 2020;25(16):3731.
24. Masood F. Polymeric nanoparticles for targeted drug delivery system for cancer therapy. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016;60:569–78. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.11.067>.
25. Taghipour-Sabzevar V, Shariif T, Moghaddam MM. Polymeric nanoparticles as carrier for targeted and controlled delivery of anticancer agents. *Ther Deliv*. 2019;10(8):527–50.
26. Russo E, Spallarossa A, Tasso B, Villa C, Brullo C. Nanotechnology of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy: a perspective. *Int J Mol Sci*. 2021;22(12):6538.
27. Zhang L, Chan JM, Gu FX, Rhee J-W, Wang AZ, Radovic-Moreno AF, et al. Self-assembled lipid-polymer hybrid nanoparticles: a robust drug delivery platform. *ACS Nano*. 2008;2(8):1696–702. <https://doi.org/10.1021/nr800275r>.
28. Mandal B, Bhattacharjee H, Mittal N, Sah H, Balabathula P, Thoma LA, et al. Core-shell-type lipid-polymer hybrid nanoparticles as a drug delivery platform. *Nanomed Nanotechnol Biol Med*. 2013;9(4):474–91. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2012.11.010>.
29. Zhang L, Zhang L. Lipid-polymer hybrid nanoparticles: synthesis, characterization and applications. *Nano Life*. 2010;1(01n02):163–73.
30. Mottaghitab F, Farokhi M, Fatahi Y, Atyabi F, Dinarvand R. New insights into designing hybrid nanoparticles for lung cancer: diagnosis and treatment. *J Control Release*. 2019;295:250–67.
31. Mukherjee A, Waters AK, Kalyan P, Achrol AS, Kesari S, Yenugondal VM. Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a next-generation drug delivery platform: state of the art, emerging technologies, and perspectives. *Int J Nanomed*. 2019;14:1937–52.
32. Hadinoto K, Sundaresan A, Cheow WS. Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a new generation therapeutic delivery platform: a review. *Eur J Pharm Biopharm*. 2013;85(3):427–43.
33. Dave V, Tak K, Sobgaura A, Gupta A, Sadhu V, Reddy KR. Lipid-polymer hybrid nanoparticles: synthesis strategies and biomedical applications. *J Microbiol Methods*. 2019;160:130–42.
34. Mandal B, Mittal NK, Balabathula P, Thoma LA, Wood GC. Development and in vitro evaluation of core-shell type lipid-polymer hybrid nanoparticles for the delivery of erlotinib in non-small cell lung cancer. *Eur J Pharm Sci*. 2016;81:162–71. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.10.021>.
35. Loo YS, Zahid NI, Madheswaran T, Mat Azmi ID. Recent advances in the development of multifunctional lipid-based nanoparticles for co-delivery, combination treatment strategies, and theranostics in breast and lung cancer. *J Drug Del Sci Technol*. 2022;71:103300. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103300>.
36. Box GE, Behnken DW. Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*. 1960;2(4):455–75.
37. Marasini N, Yan YD, Poudel BK, Choi HG, Yong CS, Kim JO. Development and optimization of self-nanoemulsifying drug delivery system with enhanced bioavailability by Box-Behnken design and desirability function. *J Pharm Sci*. 2012;101(12):4584–96.
38. Islam MA, Sakkas V, Albanis TA. Application of statistical design of experiment with desirability function for the removal

- of organophosphorus pesticide from aqueous solution by low-cost material. *J Hazard Mat.* 2009;170(1):230–8.
39. Liu Y, Zhang P, Feng N, Zhang X, Wu S, Zhao J. Optimization and in situ intestinal absorption of self-microemulsifying drug delivery system of oridonin. *Int J Pharm.* 2009;365(1–2):136–42.
 40. Gannu R, Palem CR, Yamsani VV, Yamsani SK, Yamsani MR. Enhanced bioavailability of lacidipine via microemulsion based transdermal gels: formulation optimization, ex vivo and in vivo characterization. *Int J Pharm.* 2010;388(1–2):231–41.
 41. Raghavendra Naveen N, Kurakula M, Gowthami B. Process optimization by response surface methodology for preparation and evaluation of methotrexate loaded chitosan nanoparticles. *Mat Today: Proc.* 2020;33:2716–24. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.01.491>.
 42. Kurakula M, Ahmed OAA, Fahmy UA, Ahmed TA. Solid lipid nanoparticles for transdermal delivery of avanafil: optimization, formulation, in-vitro and ex-vivo studies. *J Liposome Res.* 2016;26(4):288–96. <https://doi.org/10.3109/08982104.2015.1117490>.
 43. Rizg WY, Naveen NR, Kurakula M, Bukhary HA, Safhi AY, Alfayez E, et al. QbD supported optimization of the alginate-chitosan nanoparticles of simvastatin in enhancing the anti-proliferative activity against tongue carcinoma. *Gels.* 2022;8(2):103.
 44. Kurakula M, Naveen NR. In situ gel loaded with chitosan-coated simvastatin nanoparticles: promising delivery for effective anti-proliferative activity against tongue carcinoma. *Mar Drugs.* 2020;18(4):201.
 45. Derringer GC, Suich RC. Simultaneous optimization of several response variables. *J Qual Technol.* 1980;12:214–9.
 46. Persano F, Gigli G, Loporatti S. Lipid-polymer hybrid nanoparticles in cancer therapy: current overview and future directions. *Nano Express.* 2021;2(1):012006.
 47. Gencer A, Baysal I, Nemutlu E, Yabanoglu-Ciftci S, Arica B. Efficacy of siRNA-loaded nanoparticles in the treatment of K-RAS mutant lung cancer in vitro. *J Microencapsul.* 2022;39(3):261–75. <https://doi.org/10.1080/02652048.2022.2061058>.
 48. Okamoto W, Okamoto I, Arai T, Kuwata K, Hatashita E, Yamaguchi H, et al. Antitumor action of the MET tyrosine kinase inhibitor crizotinib (PF-02341066) in gastric cancer positive for MET amplification. *Mol Cancer Ther.* 2012;11(7):1557–64. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.Mct-11-0934>.
 49. Shrestha N, Nimick M, Dass P, Rosengren RJ, Ashton JC. Mechanisms of suppression of cell growth by dual inhibition of ALK and MEK in ALK-positive non-small cell lung cancer. *Sci Rep.* 2019;9(1):18842. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55376-4>.
 50. Mallon R, Feldberg LR, Kim SC, Collins K, Wojciechowicz D, Hollander I, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay for the Raf/MEK1/MAPK signaling cascade. *Anal Biochem.* 2001;294(1):48–54. <https://doi.org/10.1006/abio.2001.5151>.
 51. Dragicevic-Curic N, Scheglmann D, Albrecht V, Fahr A. Development of liposomes containing ethanol for skin delivery of temoporfin: characterization and in vitro penetration studies. *Colloids Surf B: Biointerfaces.* 2009;74(1):114–22.
 52. Vighi E, Ruozi B, Montanari M, Battini R, Leo E. pDNA condensation capacity and in vitro gene delivery properties of cationic solid lipid nanoparticles. *Int J Pharm.* 2010;389(1–2):254–61.
 53. Kim C-E, Lim S-K, Kim J-S. In vivo antitumor effect of cromolyn in PEGylated liposomes for pancreatic cancer. *J Control Release.* 2012;157(2):190–5.
 54. Herbst RS, Heymach JV, Lippman S. Molecular origins of cancer. *N Engl J Med.* 2008;359(13):1367–80.
 55. Burgess DJ. Initially complex, always heterogeneous. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(3):153.
 56. Wang DC, Wang W, Zhu B, Wang X. Lung cancer heterogeneity and new strategies for drug therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2018;58:531–46.
 57. Hanna NH, Robinson AG, Temin S Jr, SB, Brahmer JR, Ellis PM, et al. Therapy for stage IV non-small-cell lung cancer with driver alterations: ASCO and OH (CCO) Joint Guideline Update. *J Clin Oncol.* 2021;39(9):1040–91. <https://doi.org/10.1200/jco.20.03570>.
 58. Arshad A, Yang B, Bienemann AS, Barua NU, Wyatt MJ, Woolley M, et al. Convection-enhanced delivery of carboplatin PLGA nanoparticles for the treatment of glioblastoma. *PLoS One.* 2015;10(7):e0132266.
 59. Muntimadugu E, Kumar R, Saladi S, Rafeeqi TA, Khan W. CD44 targeted chemotherapy for co-eradication of breast cancer stem cells and cancer cells using polymeric nanoparticles of salinomycin and paclitaxel. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces.* 2016;143:532–46.
 60. Honary S, Zahir F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems—a review (Part 1). *Trop J Pharm Res.* 2013;12(2):255–64.
 61. Snehalatha M, Venugopal K, Saha RN. Etoposide-loaded PLGA and PCL nanoparticles I: preparation and effect of formulation variables. *Drug Del.* 2008;15(5):267–75.
 62. Cheow WS, Hadinoto K. Factors affecting drug encapsulation and stability of lipid-polymer hybrid nanoparticles. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces.* 2011;85(2):214–20.
 63. Bhowmik D, Gopinath H, Kumar BP, Duraivel S, Kumar KS. Controlled release drug delivery systems. *Pharm Innov.* 2012;1(10):24–32.
 64. Gonzalez-Urias A, Zapata-Gonzalez I, Licea-Claverie A, Licea-Navarro AF, Bernaldez-Sarabia J, Cervantes-Luevano K. Cationic versus anionic core-shell nanogels for transport of cisplatin to lung cancer cells. *Colloids Surf B: Biointerfaces.* 2019;182:110365.
 65. Baschnagel AM, Galoforo S, Thibodeau BJ, Ahmed S, Nirmal S, Akervall J, et al. Crizotinib fails to enhance the effect of radiation in head and neck squamous cell carcinoma xenografts. *Anticancer Res.* 2015;35(11):5973–82.
 66. Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene.* 2007;26(22):3291–310. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210422>.
 67. Song Y, Bi Z, Liu Y, Qin F, Wei Y, Wei X. Targeting RAS-RAF-MEK-ERK signaling pathway in human cancer: current status in clinical trials. *Genes Dis.* 2023;10(1):76–88. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2022.05.006>.
 68. Ullah R, Yin Q, Snell AH, Wan L. RAF-MEK-ERK pathway in cancer evolution and treatment. *Semin Cancer Biol.* 2022;85:123–54. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.05.010>.
 69. Wu PK, Becker A, Park JI. Growth inhibitory signaling of the Raf/MEK/ERK pathway. *Int J Mol Sci.* 2020;21(15):5436. <https://doi.org/10.3390/ijms21155436>.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

English ▾

☰ Products

Web of Science™

Search

Sign In ▾

Register

[Search](#) > [Results for Development a...](#) >

Development and In Vitro Evaluation of Crizotinib-Loaded Lipid-Polymer Hy...

[←](#) Journal information

✕

AAPS PHARMSCITECH

Publisher name: SPRINGER

Journal Impact Factor™**3.4**

2023

3.5

Five Year

| JCR Category | Category Rank | Category Quartile |
|---|---------------|-------------------|
| PHARMACOLOGY & PHARMACY <i>in SCIE edition</i> | 105/354 | Q2 |

Source: Journal Citation Reports 2023. [Learn more](#) **Journal Citation Indicator™****0.93**

2023

0.93

2022

| JCI Category | Category Rank | Category Quartile |
|--------------|---------------|-------------------|
|--------------|---------------|-------------------|

PHARMACOLOGY & PHARMACY
in SCIE edition

95/354

Q2

The Journal Citation Indicator is a measure of the average Category Normalized Citation Impact (CNCI) of citable items (articles and reviews) published by a journal over a recent three year period. It is used to help you evaluate journals based on other metrics besides the Journal Impact Factor (JIF).

[Learn more](#) 



Document Type Article

Jump to [↓ Enriched Cited References](#)

Abstract The goal of the study was to produce, optimize, characterize, and compare crizotinib-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles (CL-LPHNPs), representing a novel contribution to the existing literature, and to determine their anticancer activity in non-small cell lung cancer cells (NSCLC). Box-Behnken design was used to investigate the effect of three independent variables: polymer amount (X-1), soy phosphatidylcholine (X-2), and DSPE-PEG (X-3), on three responses: particle size (Y-1), polydispersity index (Y-2), and zeta potential (Y-3). Different parameters were evaluated on the optimized LPHNP formulations such as encapsulation efficiency, drug release study, transmission electron microscopy (TEM) image analysis, and in vitro cell evaluations. The mean particle size of the optimized formulation is between 120 and 220 nm with a PDI < 0.2 and a zeta potential of -10 to -15 mV. The encapsulation efficiency values of crizotinib-loaded PLGA-LPHNPs (CL-PLGA-LPHNPs) and crizotinib-loaded PCL-LPHNPs (CL-PCL-LPHNPs)

metrics panel

New

Data is from InCites Benchmarking & Analytics

Citing items by classification

Breakdown of how this article has been mentioned, based on available citation context data and snippets from 4 citing item(s).

EK- 4: Tez Kapsamında Üretilen Yayın – 2

International Journal of Pharmaceutics 650 (2024) 123703



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpharm

Recent progress in drug delivery systems for tyrosine kinase inhibitors in the treatment of lung cancer

Pelinsu Korucu Aktas^a, Ipek Baysal^b, Samiye Yabanoglu-Ciftci^c, Alf Lamprecht^d, Betül Arica^{a,*}^a Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Hacettepe University, Ankara, Turkey^b Vocational School of Health Services, Hacettepe University, Ankara, Turkey^c Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Hacettepe University, Ankara, Turkey^d Department of Pharmaceutics, Institute of Pharmacy, University of Bonn, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:

Lung cancer
Drug delivery
Nanoparticles
Tyrosine kinase
Tyrosine kinase inhibitors
Lipid and polymer-based nanocarriers

ABSTRACT

Lung cancer ranks as the second most commonly diagnosed cancer in both men and women worldwide. Despite the availability of diverse diagnostic and treatment strategies, it remains the leading cause of cancer-related deaths globally. The current treatment approaches for lung cancer involve the utilization of first generation (e.g., erlotinib, gefitinib) and second generation (e.g., afatinib) tyrosine kinase inhibitors (TKIs). These TKIs exert their effects by inhibiting a crucial enzyme called tyrosine kinase, which is responsible for cell survival signaling. However, their clinical effectiveness is hindered by limited solubility and oral bioavailability. Nanotechnology has emerged as a significant application in modern cancer therapy. Nanoparticle-based drug delivery systems, including lipid, polymeric, hybrid, inorganic, dendrimer, and micellar nanoparticles, have been designed to enhance the bioavailability, stability, and retention of these drugs within the targeted lung area. Furthermore, these nanoparticle-based delivery systems offer several advantages, such as increased therapeutic efficacy and reduced side effects and toxicity. This review focuses on the recent advancements in drug delivery systems for some of the most important TKIs, shedding light on their potential in improving lung cancer treatment.

1. Introduction

Lung cancer, being responsible for around 25 % of total cancer-related deaths and a leading cause of mortality associated with cancer (Sung et al., 2021). Overall, the lifetime risk of developing lung cancer is approximately 1 in 15 for men and 1 in 17 for women. It is important to note that lung cancer ranks among the leading causes of cancer-related mortality for both men and women (Siegel et al., 2022). Lung cancer manifests in two distinct histological types, with Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) accounting for 80 to 95 % of all cases, while the remaining portion corresponds to Small Cell Lung Cancer (SCLC) (Ramalingam et al., 2011). NSCLC has subgroups such as squamous cell carcinoma, adenocarcinoma and large cell carcinoma. Important risk factors for the occurrence of lung cancer include exposure to cigarette

smoke, air pollution, exhaust fumes, and some toxic metals like chromium, cadmium, and arsenic as well as a few organic compounds (Molina et al., 2008). Treatment for lung cancer is chosen in line with the type and stage of cancer. Conventional treatment methods used in lung cancer are surgical resection, chemotherapy and radiotherapy (Lemjabbar-Alaoui et al., 2015). Early-stage first-line therapy recommended for lung cancer patients includes surgical tumor resection and radiotherapy. However, because most lung cancer patients receive their diagnosis at an advanced stage, surgery is not recommended for them. Systemic chemotherapy is therefore preferred form of treatment that will extend survival and improve quality of life. When epidermal growth factor receptor (EGFR) or Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) are absent, third-generation chemotherapeutic agents (paclitaxel, docetaxel, irinotecan, topotecan, gemcitabine, doxorubicin, and vinorelbine) and

Abbreviations: NSCLC, Non-Small Cell Lung Cancer; SCLC, Small Cell Lung Cancer; EGFR, Epidermal Growth Factor Receptor; ALK, Anaplastic Lymphoma Kinase; TK, Tyrosine kinase; TKI, Tyrosine Kinase Inhibitor; TKIs, Tyrosine Kinase Inhibitors; VEGFR, Vascular Endothelial Growth Factor Receptor; FGFR, Fibroblast Growth Factor Receptor; EphA, EphB, Ephrin Receptors; ABL, Abelson Murine Leukemia; FAK, Focal Adhesion Kinase; JAK, Janus Kinases; EGFR-TKI, Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor; HSA, Human Serum Albumin; HELF, Human Embryonic Lung Fibroblast Cell Line; CD, Cyclodextrin; 5-ALA, 5-aminolevulinic acid.

* Corresponding author at: Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Hacettepe University, 06100, Ankara, TURKEY.

E-mail address: barica@hacettepe.edu.tr (B. Arica).

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.123703>

Received 16 August 2023; Received in revised form 1 December 2023; Accepted 10 December 2023

Available online 11 December 2023

0378-5173/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

platinum-derived anticancer agents (such as cisplatin, carboplatin) are typically advised and utilized in the first-line therapy of NSCLC (Chu et al., 2005). The combined agent is usually chosen according to the patient's tolerance to the drug, quality of life, cancer stage, and drug toxicity. However, because these chemotherapeutic medicines are non-selective, they cause systemic toxicity, multi-drug resistance, treatment failure, and high mortality (Nascimento et al., 2016). In addition, an investigation of the comprehensive genomic profile of lung cancers revealed that these tumors are genetically highly heterogeneous and complex (Wang et al., 2018). To effectively treat lung cancer and improve both the life expectancy and quality of life for patients, the development of new treatment strategies that are highly effective and targeted with minimal side effects is imperative. In recent years, targeted therapy has gained significant recognition, particularly with the identification of genomic mutations in tumor biology and immunology. Among the most common approaches for targeted therapy in the treatment of advanced, metastatic, or recurrent NSCLC are monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors (TKIs). Monoclonal antibodies exert their anti-tumor effects through receptor signaling, where they are linked to IgG antibodies, as well as through cell-mediated cytotoxicity and complement-dependent cytotoxic effects. On the other hand, TKIs work by inhibiting the phosphorylation of proteins catalyzed by tyrosine kinases. This interference halts the cell cycle and induces apoptosis in tumor cells. Consequently, TKIs have emerged as valuable tools in the targeted treatment of various types of cancers. The adoption of targeted therapy, whether through monoclonal antibodies or TKIs, represents a significant advancement in lung cancer treatment, offering the potential for personalized and precise interventions that can improve patient outcomes and prolong survival (Knighton et al., 1991; Mandal et al., 2016).

2. Roles of tyrosine kinase and tyrosine kinase inhibitors in cancer

Kinases are proteins that can transfer phosphate groups between molecules and activate (activation) or deactivate (inactivation) another protein/molecule. Tyrosine kinase (TK), a phosphorylated protein, is an enzyme in the protein kinase family. 518 protein kinases encoded in the human genome have been identified, 90 of which belong to the TK group (Sugiyama and Kameshita, 2017). TK's are classified as receptor protein kinases (membrane-localized protein kinases) and non-receptor protein kinases (cytoplasmic protein kinases) (Pawson, 2002). There are 58 transmembrane proteins in the receptor TK's (membrane-localized protein kinases) family such as insulin receptor, growth factors (EGFR, vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR), ALK, and fibroblast growth factor receptor (FGFR), ephrin receptors (EphA, EphB)). Non-receptor protein kinases (cytoplasmic protein kinases) include Src kinase, Abelson murine leukemia (ABL), focal adhesion kinase (FAK), and Janus kinases (JAK) proteins (Gotink and Verheul, 2010; Sugiyama and Kameshita, 2017).

Continuous activation of TK's and oncogenic signal transduction accelerates malignant phenotype-specific cellular events such as transformation, tumor growth, increased motility and invasion, and angiogenesis (Dogan and Güç, 2004; Smidova et al., 2021). Various TKI's were used to prevent the acceleration of mentioned cellular events, and it was predicted that cancer treatment could be possible by inhibiting TK activities (Fig. 1) (Mandal et al., 2016; Pang et al., 2020; Wang et al., 2019; Yugui et al., 2019).

In general, the mechanisms of action of TKI's are competitive ATP inhibition at the binding site; however, the kinase spectrum, pharmacokinetics and side effects of the targeted compounds are different from each other (Gotink and Verheul, 2010). Gefitinib, erlotinib, crizotinib, afatinib, alectinib, ceritinib, osimertinib, and brigatinib are TKI's that are approved by the US Food and Drug Administration (FDA) for use in NSCLC. TKI's are classified in Table 1.

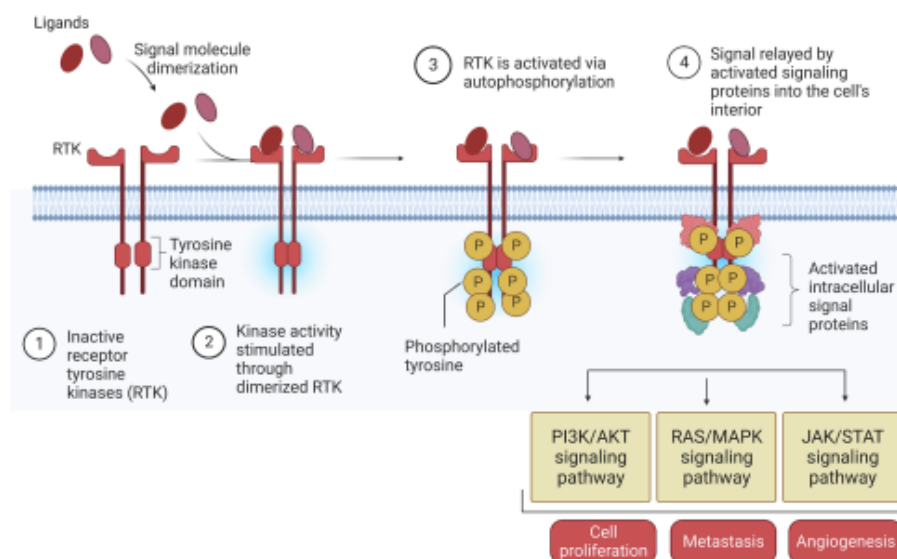


Fig. 1. Schematic presentation of mechanism of action of tyrosine kinase inhibitors, where PI3K/AKT: phosphoinositide-3-kinase/protein kinase B, RAS/MAPK: mitogen activated protein kinases and JAK/STAT: janus kinases/signal transducer and activation of transcription proteins. This figure was created using BioRender ([http ps://biorender.com/](http://ps://biorender.com/)).

Table 1
Selected TKIs, their molecular targets, FDA approval years, trade name and chemical structure (Ayala-Aguilera et al., 2022).

| Tyrosine Kinase Inhibitor | Target | FDA Approval | Trade name | LogP |
|---------------------------|---|--------------|------------|------|
| Erlotinib | EGFR | 2004 | Tarceva® | 3.1 |
| Gefitinib | EGFR | 2003 | Iressa® | 4.0 |
| Alectinib | ALK | 2016 | Alecensa® | 5.6 |
| Afatinib | EGFR, Erb family receptors (HER2 and HER4) | 2013 | Giotrif® | 3.7 |
| Ceritinib | ALK | 2014 | Zykadia® | 5.2 |
| Brigatinib | ALK, ROS1, IGF-1 receptor | 2017 | Alunbrig® | 5.1 |
| Crizotinib | ALK, mesenchymal-epithelial transition factor (MET), receptor d'orçin Nantais (RON) | 2011 | Xalkori® | 3.8 |

(i) A selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI), erlotinib (Tarceva®) is an oral medication used for inhibiting the activity of the EGFR. Erlotinib, a quinazoline derivative with the formula N-(3-ethynylphenyl)-6,7-bis(2-methoxyethoxy)-4-quinazolinamine, was approved by the FDA in 2004 for the treatment of pancreatic cancer and metastatic NSCLC. However, after oral administration of erlotinib, which is classified as class II in the biopharmaceutical classification system, low solubility and high permeability (logP 2.7), limited efficacy, drug resistance, serious and fatal side effects (cardiovascular, dermatological, gastrointestinal, hematological, hepatobiliary, infection, musculoskeletal skeletal, ophthalmic, renal, respiratory) have been reported (Pandey and Dureja, 2017). (ii) Gefitinib is the first member of the group known as TKI's. Gefitinib is available in the market for oral use under the name Iressa®. Gefitinib, has low solubility, high permeability (biopharmaceutics classification system class II), slow absorption and poor bioavailability, and has serious side effects due to its large volume of biodistribution (Dhillon, 2015). (iii) An aniline-quinazoline derivative known as afatinib is a small molecule tyrosine inhibitor that the FDA approved in 2013. It inhibits EGFR and Erb family receptors (HER2 and HER4). Afatinib (Giotrif®), which is commercially available in 3 strengths as an oral film-coated tablet, has a large volume of biodistribution and a high protein binding rate. Due to the large volume of distribution of the drug, severe side effects are seen and these effects cause discontinuation of the treatment (Hirsh, 2017). (iv) Alectinib is an orally administered second-generation TKI's targeting ALK. Alectinib tablet, Alecensa® was approved by the FDA in 2016. Although oral delivery is the preferred approach due to the drug's wide distribution, it's unable to especially target lung cancer cells (Paik and Dhillon, 2018). (v) Brigatinib (Alunbrig®) is a next-generation TKI's targeting ALK that has been approved by the FDA in 2017 and is preferred for use in crizotinib-resistant patients. The limited bioavailability and significant adverse effects associated with oral administration of brigatinib, as classified under the class I biopharmaceutical classification system, have prompted the development of drug delivery systems aimed at achieving optimal effectiveness (Huang et al., 2016; Markham, 2017). (vi) ALK and hepatocyte growth factor receptor tyrosine kinases are inhibited by the 2011 FDA-approved drug crizotinib (Xalkori®), which also activates caspase-3 to cause apoptosis. Despite its potential, crizotinib is not completely effective because patients develop resistance to it after several administrations. In addition, free crizotinib, a hydrophobic drug, is expected to have poor solubility and limited circulation time (Sahu et al., 2013). (vii) Ceritinib is a TKI used to treat ALK-positive metastatic NSCLC, such as crizotinib, alectinib and brigatinib. Ceritinib (Zykadia®) is an orally administered market preparation approved by the FDA in 2014. Ceritinib, which is chemically named 5-chloro-N4-[2-[(1-methylethyl)sulfonyl]phenyl]-N2-[5-methyl-2-(1-methylethoxy)-4-(4-piperidinyl)phenyl] 2,4-pyrimidine diamine, has low solubility and low permeability, class IV in the biopharmaceutical classification system. In addition, ceritinib, like other TKIs, has serious

side effects due to drug toxicity due to its wide distribution (Dhillon and Clark, 2014).

These novel drugs all exhibited undesirable characteristics, such as poor solubility, poor oral absorption, drug resistance, and significant side effects, which limited their use. TKI's are poorly soluble; a number of them with high permeability and others with low permeability. Thus, TKI's are characterized by a class II or IV biopharmaceutical classification system formulations of these drugs are considered challenging because of their physicochemical properties such as dissolution rate, permeability and solubility. Also, difficulties such as dose-related side effects, variable bioavailability, and non-specific tissue distribution are seen in conventional drug delivery systems. As a result, overcoming these restrictions and achieving the full therapeutic potential for lung cancer treatment is critical. To overcome these limitations, various approaches have been explored in recent years to develop and design new and efficient delivery systems for TKI's. Also, due to resistance and intolerance to TKI's, efforts to develop pharmaceutical formulations (such as TKI's in combination with different therapeutic compounds and various delivery systems) that will enhance the effectiveness of inhibitors and decrease their side effects remain important (van der Wekken et al., 2016; Westover et al., 2018). Thus, studies are carried out to develop new generation drug delivery systems (nanoparticulate systems) that can specifically target drugs and to develop more effective and selective new treatment approaches with fewer side effects. Targeted administration of TKI's via nanoparticulate systems such as organic, inorganic and hybrid nanoparticles (NPs) might reduce adverse effects while improving therapeutic efficacy and bioavailability of the drugs in the target organs. Furthermore, these drug delivery systems offer significant benefits in terms of increasing patient compliance and enhancing quality of life. Additionally, combination therapies that involve the simultaneous use of multiple therapeutic agents have shown several advantages over monotherapies in the treatment of cancer. By targeting multiple anticancer activities concurrently, combination therapies can enhance efficacy, reduce the development of tumor resistance, lower the cost and effort required for developing new therapeutic drugs, and limit side effects, among other benefits.

In this review, our objective is to provide a comprehensive summary of the novel delivery systems for TKIs as therapeutic agents, both as stand alone treatments and in combination with other therapeutic agents or various drug delivery systems, with a particular focus on nanocarriers. By exploring the potential of these delivery systems, we aim to shed light on their role in improving the effectiveness and safety of TKIs in lung cancer treatment.

3. Nanoparticle-based drugs delivery systems containing tyrosine kinase inhibitors

Currently, new generation drug delivery systems prepared with nanocarriers have replaced conventional drugs in cancer treatment. Nanoparticulate systems are solid colloidal particles with sizes ranging from 10 to 1000 nm that have been designed to release active substances in a trapped or adsorbed form in a controlled manner. By using nanoparticulate systems, promising results have been obtained in increasing the effectiveness of the active substance(s), reducing side effects/toxicity, preventing drug resistance, ensuring/increasing stability and increasing patient compliance. Compared to conventional systems nanoparticulate systems have some unique advantages (Fig. 2). (i) When utilized with suitable drug combinations in delivery systems, NPs can co-load hydrophilic and hydrophobic drugs concurrently, enhancing both the solubility and anticancer activity of hydrophobic drugs. (ii) With adjustable particle size distribution and surface modification, NPs enable passive or active tumor targeting, which results in enhanced medication deposition at the tumor location. (iii) Drug release that is controlled and sustained is made possible by the use of nanoparticles as drug carriers. Improved pharmacokinetics and reduced dose-related toxicity of drugs are achieved possible by optimized release

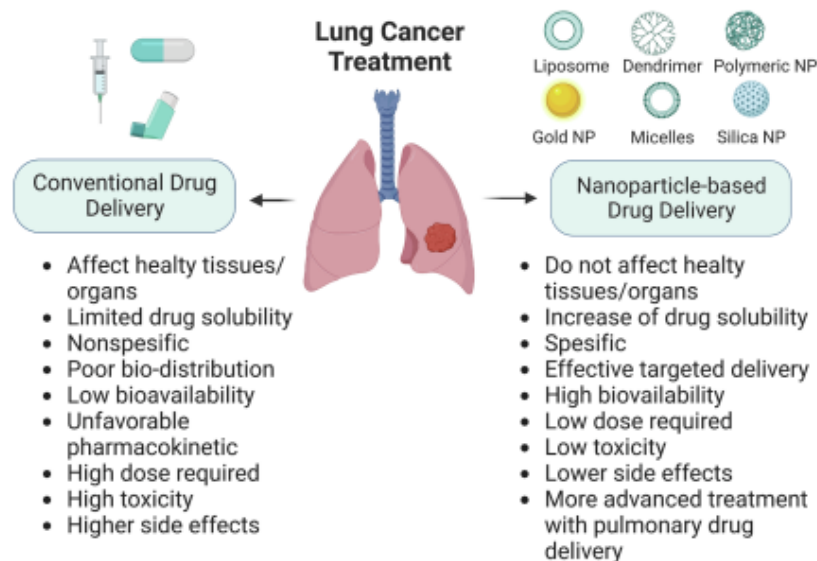


Fig. 2. Conventional and nanoparticle-based drug delivery for lung cancer treatment. This figure was created using BioRender ([http ps://biorender.com/](http://ps://biorender.com/)).

patterns with extended circulation life. (iv) It allows delivery in different ways, including oral, pulmonary, parenteral, and nasal, and allows these medications to have a more targeted therapy (Anselmo and Mitragotri, 2016; Donahue et al., 2019; Steichen et al., 2013) (Mitchell et al., 2021; Mohanraj and Chen, 2006).

Nanoparticle-based systems offer a distinct advantage over free drugs by enabling the specific delivery of chemotherapeutic agents to target tissues. These systems are designed to encapsulate or aggregate the drug around cancer cells, ensuring its safe and targeted delivery to these cells. This targeted approach enhances the bioavailability of the drug while minimizing its exposure to healthy tissues, thereby reducing potential side effects. The enhanced permeability and retention effect of nanoparticle carriers plays a crucial role in the accumulation of nanomedicines within tumors. This phenomenon enables nanoparticles to selectively accumulate in tumor tissues, maximizing drug concentration at the desired site. Furthermore, various conjugation techniques can be employed to actively target nanoparticles, further enhancing their specificity and efficacy in delivering therapeutic agents to cancer cells. By utilizing nanoparticle-based systems, the field of nanomedicine opens up possibilities for improved drug delivery, enabling precise targeting, enhanced therapeutic efficacy, and reduced off-target effects. This approach holds great promise for advancing cancer treatment and improving patient outcomes (Yadav et al., 2021; Yang et al., 2021). Utilizing NPs also provides a crucial advantage in terms of improved pharmacokinetic profiles compared to conventional drugs. Unlike conventional drugs, which often require high doses to achieve therapeutic drug concentrations at the target site, NPs offer the potential for targeted delivery with lower doses. This targeted approach minimizes the exposure of healthy tissues to high drug concentrations, reducing the occurrence of side effects associated with conventional drug administration. Therefore, NPs offer a more favorable pharmacokinetic profile, optimizing drug distribution and enhancing the therapeutic index, thereby improving the overall efficacy and safety of cancer treatment.

Exploiting the benefits of nanoparticle-based systems, targeting the delivery of TKIs to cancer cells through nanocarriers emerges as a highly effective strategy. In the forthcoming section, we present a

comprehensive review of studies focusing on nanoparticle delivery systems as promising carriers for TKIs. Table 2 provides an overview of the drug names, associated nanoparticle-based delivery systems, and their specific characteristics for TKI delivery.

NPs offer a highly effective delivery strategy, owing to their exceptional biocompatibility, biodegradability, low toxicity, and minimal immunogenicity. Currently, extensive research is being conducted on diverse nanoparticle delivery techniques with the aim of advancing drug delivery capabilities. Therapeutic NPs are primarily classified into two distinct categories: (a) organic NPs, such as polymer-based, lipid-based, albumin-based, and hybrid NPs, and (b) inorganic NPs, including silver, gold, quantum dot, and metallic NPs (Ojo et al., 2021) (Fig. 3).

3.1. Organic nanoparticles

3.1.1. Lipid-based nanoparticles (Liposomes and solid lipid nanoparticles)

Lipid-based drug delivery systems have showed significant promise in enhancing the efficacy of hydrophobic drugs. Examples of these products are AmBisome®, Neoral® and Onivyde® which have been very successful commercial products. Liposomes are bilayer, spherical vesicular structures composed of phospholipid building blocks. Due to their hydrophobic tail and hydrophilic head, they may encapsulate both hydrophilic and hydrophobic drugs and range in size from 25 nm to 2.5 μm . Liposomes can exist as a single bilayer or multiple bilayers and have benefits such minimal toxicity, higher drug loading capacity, and good biocompatibility (Loo et al., 2022). However, a major drawback of liposomes is their rapid blood elimination (Kim and Jeong, 2021). A solid lipid core and a monolayer surfactant shell constitute solid lipid NPs. Their qualities include; easy and large-scalable manufacturing techniques, low cytotoxicity, increased encapsulation capacity, and stable formulation. Furthermore, like liposomes, they are able to carry both hydrophilic and hydrophobic drugs (Geszeke-Moritz and Moritz, 2016).

Researchers developed aptamer-conjugated chitosan-anchored liposomal complexes loaded with erlotinib to overcome EGFR-TKI resistance. The goal was to create targeted drug delivery systems with prolonged circulation and low toxicity while effectively targeting cancer

Table 2
An overview of investigated delivery systems for various TKIs and their characteristics.

| Tyrosine Kinase Inhibitor | Delivery Systems | Particle Size (nm) | Encapsulation Efficiency (%w/w) | Drug Loading (% w/w) | In Vitro | Reference | |
|---|---|---|---------------------------------|----------------------|---|--------------------------------|----------------------|
| Erlotinib | Thermosensitive Hydrogel Containing Hollow Mesoporous Silica NPs | 175.17 ± 3.47 | – | 45 | A549 | (Zhou et al., 2020) | |
| | pH-Dependent Aptamer AS1411 decorated Chitosan NPs | 165 – 199 | 44–70 | 30–55 | A549 | (Saravananakumar et al., 2020) | |
| | Aptamer - Conjugated chitosan - Anchored Liposomal Complexes | 179.4 ± 1.16 | –100 | 5 | H1975 and PC-9 | (Li et al., 2017) | |
| | Nanocrystals | 232.4 ± 4.3 | 78.5–95.3 | – | A549 | (Thakkar et al., 2018) | |
| | Gellan Gum Coated Carboxymethyl Pullulan- Zinc Oxide Nanocomposites | 995.7–2972.0 | 50.49–70.43 | – | – | (Bera et al., 2020) | |
| | Cyclodextrin Modified PLGA NPs | 210 ± 8 | 21.9–61.5 | 5 | 3D Spheroid Model | (Vaidya et al., 2019) | |
| | Lipid-Polymer Hybrid NPs | 150–180 | 18–66 | 1.6–2.1 | A549 | (Mandal et al., 2016) | |
| | Liposomes | 102.4 ± 3.1 | 85.3 ± 1.8 | – | A549 | (Zhou et al., 2018) | |
| | Conventional and Galactosylated Liposomes | 103.5–121.4 | 82.3–83.4 | – | – | (Xu et al., 2018) | |
| | Chitosan NPs | 170.2 | 43 ± 0.57 | 74.45 ± 0.34 | A549 | (Pandey et al., 2019) | |
| | Polycaprolactone Nanocapsules | 171 | 99 | – | A549 | (Brunsmann et al., 2020) | |
| | Solid Lipid NPs | 82.32 ± 4.04 | 78.21 ± 1.19 | 4.17 ± 0.12 | A549 | (Bakhtyari et al., 2017) | |
| | Poly(ϵ -Caprolactone)- Poly(Ethylene Glycol)- Poly(ϵ -Caprolactone) NPs | 94–557 | 44.4–58.7 | – | A549 | (Barghi et al., 2015) | |
| | Human Serum Albumin NPs | 112.5 ± 2.8 | 81.2 | 5.6 | A549 | (Shen and Li, 2018) | |
| | Core- Shell Type Polypeptide-Based Lipid Nanocapsules | 200 | >90 | 10.5 ± 2.5 | NCI-H358 and HCC-827 | (Kim et al., 2017) | |
| | Poly(Ester-Thioether) Microspheres | 12900–13600 | – | 6.2–7.1 | A549 | (Cheng et al., 2020) | |
| | Redox-Responsive and pH-Sensitive Poly (acrylic acid) Cystamine Oleic Acid Modified Lipid NPs | 170 | 85 | 2.6 | A549, NCI-H460 and human umbilical vein endothelial cells | (Tan and Wang, 2017) | |
| | Gefitinib | PLGA NPs | 22.53 ± 26.31 | – | – | A549 | (Zhang et al., 2020) |
| | | Colloidal Gold NPs with the EGFR Antibody | – | – | – | A549, NCI-H460, and NCI-H1975 | (Lam et al., 2014) |
| L-glutamic acid-based Dendritic Lipopeptide Oligomeric Nanosuspension Nanoliposomes | | 337.1 | 60.67 | – | 3 T3, A549, SiHa and U87 | (Hegde et al., 2021) | |
| Chitosan-Coated PLGA NPs | | 189 | 60.26 | – | A549 | (Hu et al., 2020) | |
| DSPE-PEG2000 Nanomicelles with CD133 Aptamers | | 527 | 82.46 ± 5.2 | 2.34 ± 0.16 | A549 | (Abshatili, 2021) | |
| Folic Acid Modified PLA NPs | | 25.8 ± 4.4 | 85.9 ± 3.7 | 8.3 ± 5.8 | A549, A431 | (Huang et al., 2017) | |
| Human Serum Albumin NPs | | 78 | 5.1 | 5.4 | A549 | (Bian et al., 2018) | |
| Poly(ϵ -Caprolactone)- Poly(Ethylene Glycol)- Poly(ϵ -Caprolactone) NPs | | 138.6 ± 1.0 | 85.50 ± 0.58 | 6.06 ± 0.18 | NCI-H358, HELF | (Pang et al., 2019) | |
| Mannose Conjugated pH-sensitive Nanomicelles | | 24 | 9 | 92 | A549 | (Ni et al., 2017) | |
| Glucosamine-Conjugated Solid Lipid NPs | | 168 | >95 | 24.7 | A549 | (Wang et al., 2015) | |
| PLGA-PEG NPs | | 187.23 ± 14.08 | 97.31 ± 0.23 | 33.29 | A549 | (Safari et al., 2020) | |
| Polymer based NPs | | 132.5 ± 19.7 | 76.3 ± 9.5 | 7.5 ± 3.6 | A549 and A431 | (Zhang et al., 2017) | |
| Magnetic/Trans-activating Transcription Dual-Targeted Nanocarriers | | 114 | 93.02 | – | PC-9/BB4 | (Huang et al., 2022) | |
| Cationic Liposomes, pH-sensitive Liposomes and Conventional Liposomes | | 122 | 44.9 | – | H2228 | (Zeng et al., 2020) | |
| PLGA NPs | | 46 – 57 | 43.20–52.01 | – | H1975 | (Almushedl et al., 2018) | |
| Pegylated Gold NPs | | 180.2 ± 15.6 | 34.4 ± 2.3 | 0.58 ± 0.05 | H460 and A549 | (Elbatany et al., 2021) | |
| Solid Lipid NPs with Paclitaxel in PLGA Porous Microspheres | | 41 ± 3 | – | – | A549 | (Coelho et al., 2016) | |
| Solid Lipid NPs | | 358.3 ± 3.38 | 87.9 ± 1.27 | – | H1975, PC9/G | (Yang et al., 2019) | |
| Certinib | | Solid Lipid NPs | 167.9 | 90.24 | – | – | (Suvrasha, 2020) |
| | Chitosan Modified PLGA NPs | 406.3 ± 5.1 | 82.32 | 13.53 | A549 | (Mohammed et al., 2019) | |
| Crizotinib | Solid Lipid NPs | 475.6 ± 3.45 | 87.09 ± 0.68 | 7.86 ± 0.44 | A549 | (Ahmed et al., 2020) | |
| | Poly(lactide-tocopheryl Polyethylene glycol 1000 Succinate Polymeric Micelles | 162 ± 2.65 | – | – | NCI-H3122 | (Jiang et al., 2015) | |
| | Poly(dopamine (pD)-modified Poly(lactide-tocopheryl Polyethylene glycol 1000 Succinate NPs | – | 83.95 ± 3.23 | 3.24 ± 0.11 | PC-9 | (Wang et al., 2022a) | |
| | Lipid-polymer hybrid NPs | 120–220 | 70.93 ± 1.81–79.25 ± 0.07 | – | NCI-H2228 | (Korcu Aktas et al., 2023) | |

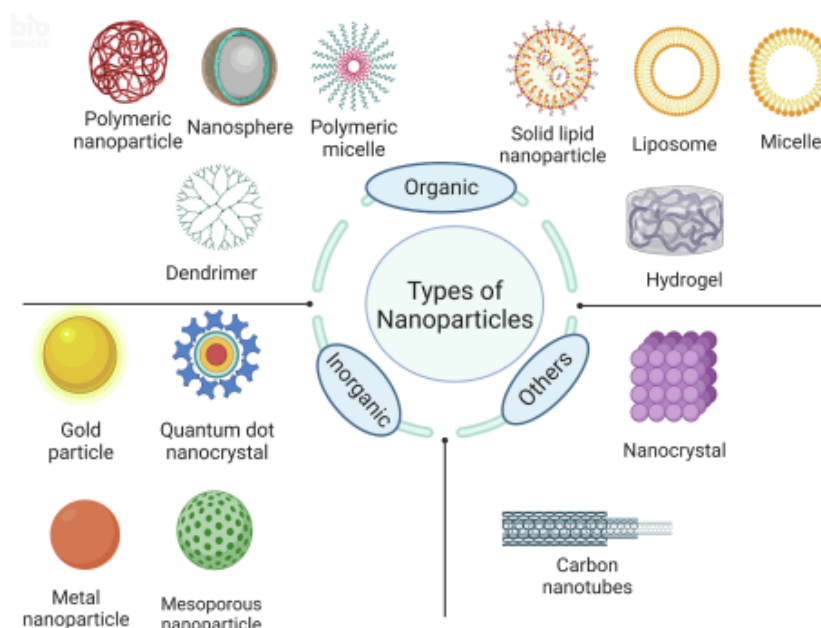


Fig. 3. Classification of nanoparticles. This figure was created using BioRender ([htt ps://bioender.com/](http://ps://bioender.com/)).

cells with EGFR mutations. The optimized nanoparticles had a particle size of 179 nm and a zeta potential of 35 mV. In vitro cell culture experiments with three different cell lines showed that these nanoparticles had a significant impact, particularly on EGFR-TKI resistant H1975 cells (Li et al., 2017).

Liposomal formulations containing DSPE-PEG were created to enhance erlotinib's pharmacokinetics and bioavailability. The study compared pegylated and non-pegylated liposomes, revealing that both were similarly cytotoxic, but pegylated liposomes exhibited twice the pharmacological effectiveness. In vitro testing was performed on the A549 cell line, while *in vivo* studies on rats demonstrated that erlotinib-loaded pegylated liposomes were more effective than their non-pegylated counterparts (Zhou et al., 2018).

In a similar study, two types of liposomes were prepared for erlotinib delivery: conventional and galactosylated liposomes. The characterization and *in vitro* drug release results showed no significant differences between the two. However, in *in vivo* studies on rats, galactosylated liposomes were found to be more effective in terms of drug targeting and bioavailability (Xu et al., 2018).

Sheng Tan et al. developed erlotinib-loaded lipid nanoparticles modified with poly(acrylic acid) cystamine oleic acid to enhance stability and anticancer effectiveness. The optimized formulation, with a size of 170 nm, demonstrated high cytotoxicity in A549, NCI-H460, and human umbilical vein endothelial cells in MTT assays. In a human lung cancer xenograft mouse model, these modified nanoparticles effectively reduced tumor growth (Tan and Wang, 2017).

A study developed erlotinib-loaded solid lipid nanoparticles (NPs) for dry powder inhalers, achieving improved drug loading (83 nm, 78 % encapsulation efficiency, and 4 % drug loading). These NPs showed enhanced antitumor effectiveness compared to free erlotinib in cytotoxicity studies. They were then converted into inhalable dry powder formulations, with mannitol, exhibiting optimal physicochemical

properties (Bakhtiary et al., 2017).

Yanjie Hu et al. prepared gefitinib-loaded nanoliposomes, with a particle size of 189 nm and 60.26 % encapsulation efficiency. In vitro, they demonstrated increased efficacy against A549 lung cancer cells (IC₅₀: 41.96 µg/mL) compared to free gefitinib (29.63 µg/mL). In vivo experiments with lung cancer models in mice showed that gefitinib-loaded nanoliposomes reduced tumor growth with low toxicity. These nanoliposomes released the drug slowly over 12 h, contributing to its prolonged action, unlike the rapid release of free gefitinib (within 2 h) (Hu et al., 2020).

This study designed glucosamine-conjugated gefitinib solid lipid nanoparticles for inhalable dry powders, aiming to reduce side effects and improve localized anticancer treatment. They optimized formulations with mannitol, achieving improved particle characteristics. Cytotoxicity studies on A549 cells showed dose-dependent changes with the glucosamine-conjugated gefitinib solid lipid nanoparticles (Safari et al., 2020).

In this study, three afatinib-loaded liposome formulations (cationic, pH-sensitive, and conventional) were developed and compared. The pH-sensitive liposomes, designed to target the tumor's acidic environment, showed the most effective inhibition of H1975 lung cancer cell proliferation, with fewer adverse effects, compared to the other two liposomes (Almurshedi et al., 2018).

To prevent the development of resistance, afatinib solid lipid NPs was combined with paclitaxel in PLGA porous microspheres for inhalational drug delivery. The objective of this work is to design for sustained release of afatinib loaded on solid lipid nanoparticles and rapid release of paclitaxel in the microsphere with Afatinib loaded solid lipid nanoparticles. Firstly, the optimum formulation of afatinib loaded lipid NPs was obtained and characterized (particle size of approximately 350 nm, PDI < 0.2). The optimum formulation of afatinib loaded solid lipid NPs with paclitaxel in PLGA porous microspheres was developed and its

anticancer activity was evaluated *in vitro* in H1975, PC9/G cells and *in vivo* in rats. As a result of the study, it was reported that afatinib-loaded solid lipid NPs were obtained by paclitaxel in PLGA porous microspheres suitable for use with inhalation providing two-stage release (Yang et al., 2019).

In one study, an optimized brigatinib-loaded solid lipid nanoparticle formulation was developed, with a particle size of 475.6 nm, high entrapment efficiency, and sustained drug release. Cytotoxicity tests on A549 cells showed that these nanoparticles had an IC50 value approximately half that of free brigatinib (Ahmed et al., 2020).

In another study, nanoparticles were created from enzyme-sensitive block polymer-dendron conjugates, incorporating a photosensitizer (Ppa) and lapatinib for enhanced antitumoral effects through a synergistic approach. Both *in vitro* and *in vivo* experiments demonstrated that these nanoparticles had a stronger antitumoral impact, achieving apoptosis induction with laser irradiation, improved tumor cell penetration with Ppa, and molecular therapy using lapatinib (Gu et al., 2023).

3.1.2. Polymer-based nanoparticles

Polymers, a wide range of materials that have various physical and chemical features, are increasingly being used in developing of nanoparticle drug delivery systems with technology advances. In particular, biodegradable polymers such as Poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and polycaprolactone (PCL) are widely used because of their safe profile and their system-controlled release capabilities. Polymeric nanoparticles can be classified into two categories: reservoir systems, also known as nanocapsules, and matrix systems, also known as nanospheres. In nanocapsules, a drug is typically dissolved within a liquid core, which is surrounded by a polymeric membrane responsible for controlling the release of the drug. On the other hand, in nanospheres, the drug can be either encapsulated inside the polymeric network or adsorbed onto its surface, providing support and stability (Zielinska et al., 2020). Through surface changes, polymeric nanoparticles made from biocompatible polymers can deliver medications in a targeted and controlled manner. Natural molecules such as protein-based (e.g., albumin, collagen and gelatin) and polysaccharide-based (e.g., chitosan, sodium alginate, hyaluronic acid) polymers can be used to synthesize polymeric NPs. Moreover, synthetic polymers including polyacrylic acid (PAA), polyethyleneimine (PEI), polyglycolic acid (PGA), polylactic acid (PLA), and dendrimers can be used for producing polymeric NPs. For the purpose to develop different types of carriers, synthetic polymers have been utilized to produce polymeric micelles, conjugates, and NPs (Cao and Bae, 2012; Taghipour-Sabzevar et al., 2019).

3.1.3. Albumin-based nanocarriers

Protein-based nanoparticle systems known albumin NPs could be utilized to deliver TKIs since these molecules are nonimmunogenic, nontoxic, and biocompatible. Additionally, albumin is a flexible drug carrier that is easily administered by injection due to its high water solubility and simple purification. Albumin has been used in medicine since 1940, and Abraxane® was given approval to treat metastatic breast cancer in 2005. The encapsulation of drugs that are lipophilic can benefit significantly from albumin nanoparticles, which are simple to manufacture.

HSA-based erlotinib-loaded NPs were modified with hyaluronic acid for targeted drug delivery to CD44 overexpressing tumor cells. These optimized NPs demonstrated superior *in vitro* antiproliferative effects and *in vivo* antitumor activity when compared to free erlotinib and unmodified erlotinib-HSA NPs (Shen and Li, 2018).

Xiaoying Pang et al. used nanoparticle albumin-bound (nab) technology to create gefitinib NPs. These NPs, loaded with gefitinib, were characterized with a size of 138.6 nm, PDI of 0.13, and zeta potential of -15.14 mV, with nearly 100 % drug release after 8 h. *In vitro* tests demonstrated a lower IC50 value (8.251 µg/mL) for NPs compared to gefitinib solution (14.290 µg/mL). Both *in vivo* and *in vitro* results indicated an enhanced antitumoral effect with gefitinib NPs compared to

free gefitinib (Pang et al., 2019).

3.1.4. Dendrimers

Dendrimers are multi-branched, three-dimensional, spherical structures formed by repeating monomers. These macromolecules consist of an inner core and branches extending from the core. It has high targeting and therapeutic efficiency because of its modifiable surface groups, sphere cavity with different bonding abilities and high loading capacity. On the other hand, variable physicochemical properties, cytotoxic properties and hemolytic properties are known as factors limiting factors for these structures (Abbasi et al., 2014).

Aptamer AS1411 was combined with erlotinib-loaded chitosan nanoparticles to create a dual stimuli-responsive drug delivery system targeting tumor areas. These nanoparticles, sized 165–199 nm with zeta potentials from 9 to -57 mV, exhibited drug loading capacities of 30–55 % and encapsulation efficiencies of 44–70 %. *In vitro* tests on A549 cells demonstrated enhanced antitumor activity without harming normal cells (Saravanakumar et al., 2020).

In this study, cyclodextrin was used to modify erlotinib-loaded PLGA nanoparticles, improving drug solubility. β -cyclodextrin sulfobutyl ether was employed to create a complex, resulting in smaller particle sizes (210 nm), higher entrapment efficiency (61.5 % vs. 21.9 %), and loading efficiency (approximately 5 %). *In vitro* tests in a 3D spheroid model demonstrated that these nanoparticles enhanced antitumoral activity by inhibiting autophagy and increasing apoptosis (Vaidya et al., 2019).

Parijat Pandey et al. developed erlotinib-loaded chitosan nanoparticles using two different methods: probe sonication and spray drying. They investigated key formulation factors and optimized both methods. In the probe sonication method, 13 formulations were created, with the best results obtained using medium chitosan concentration, high sodium tripolyphosphate concentration, and high spray dryer inlet temperature. In the spray drying method, 18 formulations were prepared, and the best results were achieved with low chitosan concentration, high sodium tripolyphosphate concentration, and a high sonication time. *In vitro* studies showed that the optimized nanoparticles had a cytotoxic effect on the A549 cell line in both methods (Pandey et al., 2019).

Erlotinib-loaded polycaprolactone nanocapsules with controlled drug release were developed. The optimized formulation had a particle size of 171 nm, encapsulation efficiency of 99 %, and significantly lower IC50 values (0.94 µm) in A549 lung cancer cells compared to free erlotinib (14.45 µm) (Bruinsmann et al., 2020).

Erlotinib-loaded poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone) (PCEC) nanoparticles were synthesized with different molar ratios, affecting particle size, encapsulation efficiency, and drug release. Decreasing the molar ratio resulted in smaller particles, lower encapsulation efficiency, and faster drug release. These NPs demonstrated significant cytotoxicity in the A549 cell line (Barghi et al., 2015).

Furong Cheng et al. created erlotinib poly(ester-thioether) microspheres with α -tocopheryl succinate, resulting in enhanced bioavailability and synergistic inhibition of A549 cells compared to free drug. The porous microspheres co-loaded with erlotinib and α -tocopheryl succinate effectively inhibited tumor growth in A549 tumor-bearing mice with minimal systemic toxicity (Cheng et al., 2020).

Junhua Li et al. developed pH-sensitive doxorubicin hydrochloride-loaded polymeric microspheres using multiblock poly(L-lactide) with pH-sensitive acetal bonds. These microspheres, with particle sizes of 2–10 µm, demonstrated effective anticancer efficacy in both 4 T1 cells *in vitro* and in tumor-bearing mice *in vivo*, resulting in substantial tumor growth inhibition and minimal organ toxicity (Li et al., 2018).

Gefitinib PLGA nanoparticles were combined with the photosensitizer 5-aminolevulinic acid (5-ALA) to enhance therapeutic efficacy with reduced side effects. Pulmonary administration with external laser light irradiation significantly suppressed A549 cell proliferation, and intratracheal administration of gefitinib PLGA nanoparticles with the photosensitizer reduced tumor growth in lung cancer rats, suggesting a

promising treatment option for lung cancer patients (Zhang et al., 2020).

To compare gefitinib-loaded PLGA nanoparticles and chitosan-coated gefitinib-loaded PLGA nanoparticles, characterization parameters and *in vitro* anticancer effects were studied. The two formulations had different particle sizes, zeta potentials, drug entrapment, and drug loading. Chitosan-coated gefitinib-loaded PLGA nanoparticles showed better drug release profiles and significantly lower cell viability (from 31 % to 0.9 %) against A549 cells compared to gefitinib-loaded PLGA nanoparticles (Alshetali, 2021).

In this study, gefitinib-loaded NPs were developed with folic acid modification for enhanced cellular uptake, and an amphiphilic dextran surface shell to prolong systemic circulation and reduce cytotoxicity. These NPs, prepared by the flash nanoprecipitation method, had a hydrodynamic size of 78 nm, encapsulation efficiency of 5.1 %, and drug loading content of 5.4 %. The study demonstrated the potential to create targeted and effective NPs with reduced side effects using folic acid and dextran copolymer at the desired particle size (Bian et al., 2018).

In a study by Xiao Ling Ni et al., gefitinib-loaded poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone) (PCEC) nanoparticles were designed using the solid dispersion method. These nanoparticles had a small particle size (24 nm), high drug loading (92 %), and effectively targeted tumor cells with low side effects. *In vitro* tests showed time and dose-dependent cytotoxicity, with the IC50 values at 24 and 48 h being 37.8 μ g/mL and 8.1 μ g/mL, respectively, compared to free gefitinib (29.03 μ g/mL and 5.6 μ g/mL) (Ni et al., 2017).

PLGA-PEG nanoparticles were designed for co-delivery of gefitinib and salinomycin, showing enhanced efficacy in targeting lung cancer cells and cancer stem cells. The nanoparticles had a size of 130–150 nm, -20 mV zeta potential, 80 % encapsulation efficiency, and 8 % drug loading. *In vivo* studies revealed co-loaded nanoparticles to be highly effective (94 %) compared to separate treatments with gefitinib (64 %) and salinomycin (44 %) (Zhang et al., 2017).

An inhalable form of afatinib for lung cancer treatment was developed using afatinib-loaded PLGA nanoparticles. These nanoparticles had a size of 180 nm, a zeta potential of -23.1 mV, and released 56.8 % of the drug in 48 h. *In vitro* tests showed significantly lower IC50 values for afatinib-loaded nanoparticles (1.8 μ m in H460 and 1.2 μ m in A549) compared to free afatinib (3.8 μ m in H460 and 2.7 μ m in A549) (Elbatany et al., 2021).

In an effort to enhance cellular uptake, chitosan modification was applied to brigatinib-loaded PLGA nanoparticles. The optimized formulation had a particle size of 406.3 nm, a PDI of 0.277, a zeta potential of 30.4 mV, 82.32 % drug entrapment efficiency, and an IC50 value of 5 μ g/mL in the A549 cell line (compared to 6.5 μ g/mL for free drug). *In vitro* drug release studies showed an initial rapid release followed by sustained release. Hemocompatibility tests demonstrated lower hemolysis with the nanoparticles (35.05 %) compared to free brigatinib (44.86 %) (Mohammed et al., 2019).

In a recent study, alectinib-loaded nanoparticles were developed with a magnetic/*trans*-activating transcription (TAT) dual-targeting system to improve drug uptake in tumor cells. These TAT-targeted nanoparticles, made with TAT-functionalized polymer, had a size of 122 nm and an encapsulation efficiency of about 44.9 %. They exhibited a release profile with alectinib release percentages of 36.0 %, 43.8 %, and 51.3 % at different pH levels. *In vitro* studies on H2228 cells showed significantly reduced cell viability with alectinib-loaded nanoparticles (46.9 %) compared to free alectinib (86.6 %). *In vivo* studies in mice with modified particles co-encapsulating hydrophobic magnetic nanoparticles demonstrated a significant reduction in tumor volume, tumor weight, and hepatotoxicity effects (Zeng et al., 2020).

In a study targeting EGFR-TKI-resistant NSCLC, Huang et al. employed a multifaceted approach. They combined Gefitinib (Gef) to block the EGFR signaling pathway, YAP-siRNA to suppress the EGFR bypass signaling pathway, and photodynamic therapy (PDT) to induce tumor cell apoptosis. *In vitro* studies on PC-9/BB4 cells showed that Gef-YAP-siRNA NPs combined with PDT had the most significant reduction

in IC50 value. *In vivo* experiments on mice with Gef-resistant tumors confirmed the effectiveness of this combination therapy in suppressing tumor growth, highlighting its potential for combating drug-resistant tumors (Fig. 4) (Huang et al., 2022).

3.1.5. Polymeric micelles

Beyond the critical micelle concentration, amphiphilic molecules form micelles, which are self-assembled structures that spontaneously emerge in an aqueous environment due to the hydrophobic effect. They are made consisting of an inner core and an outer shell, two distinct functioning components. The inner core is in control of drug loading capacity, stability, and release behavior, whereas the outer shell controls *in vivo* pharmacokinetic behavior (PK). But the most important difficulty with micelles is storage instability (Gong et al., 2012).

This study developed gefitinib-loaded DSPE-PEG2000 nanomicelles with CD133 aptamers to target lung cancer stem cells and enhance anticancer efficacy. The nanomicelles were small (20 nm), with high encapsulation efficiency (85 %) and controlled drug release (50 % in 12 h). *In vitro* and *in vivo* studies confirmed their effectiveness and potential in preventing gefitinib resistance (Huang et al., 2017).

Wang et al. developed gefitinib-loaded mannose-conjugated pH-sensitive nanomicelles with PLGA-PEG core, PEG shells, and histidine for pH sensitivity. These nanomicelles exhibited a small size (168 nm), negative charge (-18.5 mV), high drug loading (24.7 %), and excellent entrapment efficiency (95 %). *In vitro* and *in vivo* studies demonstrated superior drug release, lower IC50 values, and a 5-fold longer half-life compared to free gefitinib, emphasizing their potential for improved cancer treatment (Wang et al., 2015).

To improve crizotinib's therapeutic efficacy, researchers developed crizotinib-loaded PLA-TPGS polymeric micelles. These micelles had a small particle size (162 nm) and demonstrated a two-phase drug release profile. *In vitro* studies on NCI-H3122 lung cancer cells revealed a 40 % increase in apoptosis compared to free crizotinib, along with enhanced anticancer effects in morphological imaging and the Live/Dead assay (Jiang et al., 2015).

In an effort to enhance the anticancer efficacy of crizotinib-loaded PLA-TPGS polymeric micelles, researchers developed polydopamine (pD)-modified PLA-TPGS NPs. These NPs exhibited favorable characteristics, including size, zeta potential, encapsulation efficiency, and drug loading. *In vitro* and *in vivo* studies demonstrated that crizotinib-loaded pD-PLA-TPGS NPs improved antitumor activity by promoting sustained drug release and cellular uptake (Wang et al., 2022a).

3.1.6. Hybrid nanoparticles

In a prior study, we developed lipid-polymer hybrid nanoparticles using two distinct polymers, PLGA and PCL, along with soy phosphatidylcholine and DSPE-PEG. Our aim was to enhance the anti-tumor activity of crizotinib. We optimized two types of nanoparticles with different characteristics. These nanoparticles had average sizes of approximately 125 nm (PLGA NPs) and 212 nm (PCL NPs), with low polydispersity and specific zeta potentials. The encapsulation efficiency was around 79.25 % for PLGA NPs and 70.93 % for PCL NPs. We assessed their inhibitory effects on NCL-H2228 cells *in vitro*, both at the gene level using PCR and at the protein level using ELISA (Korucu Aktas et al., 2023).

Bivash Mandal et al. developed core-shell lipid-polymer hybrid nanoparticles for delivering erlotinib. These nanoparticles featured a soy phosphatidylcholine and DSPE-PEG monolayer shell and a poly-caprolactone core. The nanoparticles exhibited sizes ranging from 150 to 180 nm, zeta potentials between -15 and -30 mV, low polydispersity (PDI), and drug entrapment efficiency ranging from 18 % to 66 %. They demonstrated high serum and storage stability. In efficacy evaluations on A549 cells, the erlotinib-loaded core-shell lipid-polymer hybrid nanoparticles displayed significantly lower IC50 values compared to erlotinib solution (Mandal et al., 2016).

Jeonhwan Kim et al. developed core-shell polypeptide-based lipid

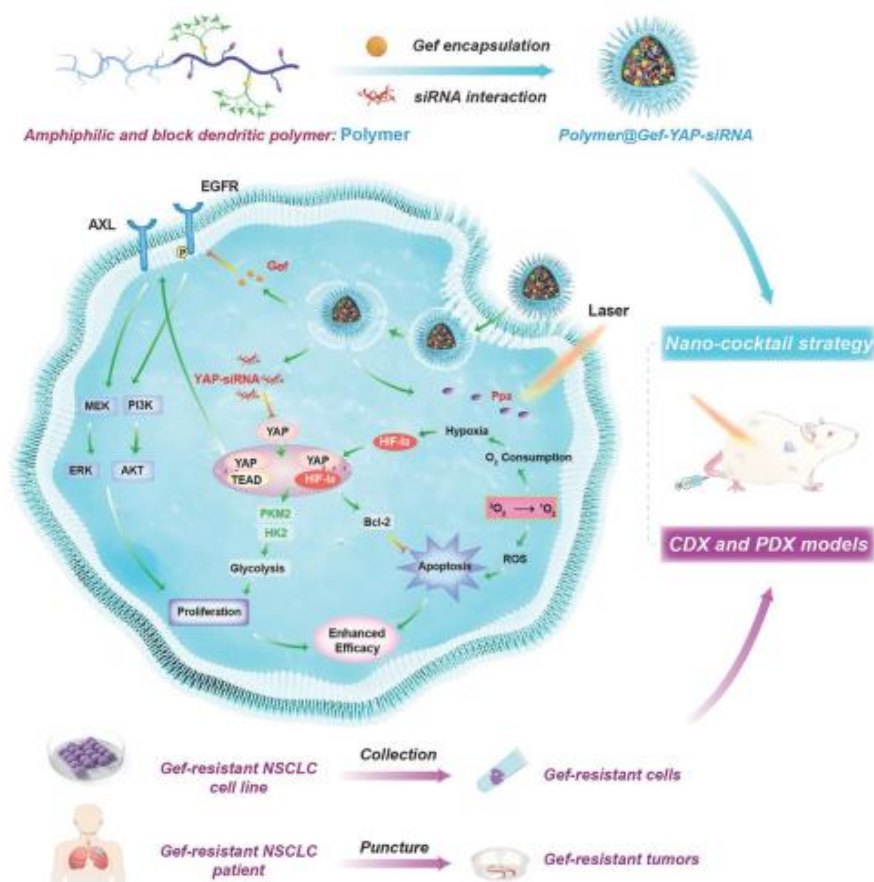


Fig. 4. Schematic illustration of the anticancer mechanisms of action of a cocktail therapy using multifunctional core-shell nanoparticles (Polymer@Gef-YAP-siRNA NPs) in both CDX and PDX models of Gef-resistant NSCLC. Reproduced with permission from Huang et al., 2022.

nanocapsules to enhance erlotinib's anticancer effectiveness. The optimized nanocapsules, featuring a size of around 200 nm and a zeta potential of -20 mV, demonstrated dose-dependent cytotoxicity in lung cancer cells (NCI-H358 and HCC-827). In a xenograft mouse model, these nanocapsules significantly reduced tumor growth, with tumor volume shrinking by 2 to 5 times compared to free erlotinib and control groups (Kim et al., 2017).

3.2. Inorganic nanoparticles

Inorganic NPs are often chosen over organic NPs because of their capacity to be modified in terms of size and shape, crystallinity, surface area, ease of functionalization, and attachment of high-density surface ligands. Metallic and non-metallic nanoparticles (NPs) are types of inorganic particles that have special optical, magnetic, catalytic, thermodynamic, and electrochemical properties, as well as extra bioactivities. The most popular delivery techniques for anticancer drugs

include gold, silver, iron oxide metallic NPs, and mesoporous silica (PSi), which are non-metallic NPs (Ojo et al., 2021; Zhou et al., 2019).

Erlotinib-loaded hollow mesoporous silica NPs was developed with injectable thermosensitive hydrogel and an amphiphilic triblock copolymer (PDLLA-PEG-PDLLA, PLEL) was used. Since erlotinib is a hydrophobic drug, drug loading capacity has been increased by encapsulating it into hollow mesoporous silica NPs and the solubility of the hydrophobic drug has been also increased because of hydrogel's hydrophilic polymer chains. The drug loading capacity of the NPs was 45 %, and their particle size was 175 nm. The *in vitro* antitumor activity of the nanoparticulate system was assessed on A549 cells and *in vivo* biodistribution and retention studies were conducted A549 xenograft models, both of which revealed that thermosensitive hydrogel containing erlotinib loaded hollow mesoporous silica NPs displayed the greatest antitumor effects (Fig. 5) (Zhou et al., 2020).

In another study, erlotinib-loaded nanocomposites was prepared with an anionic biopolymer (gellan gum) coated carboxymethyl

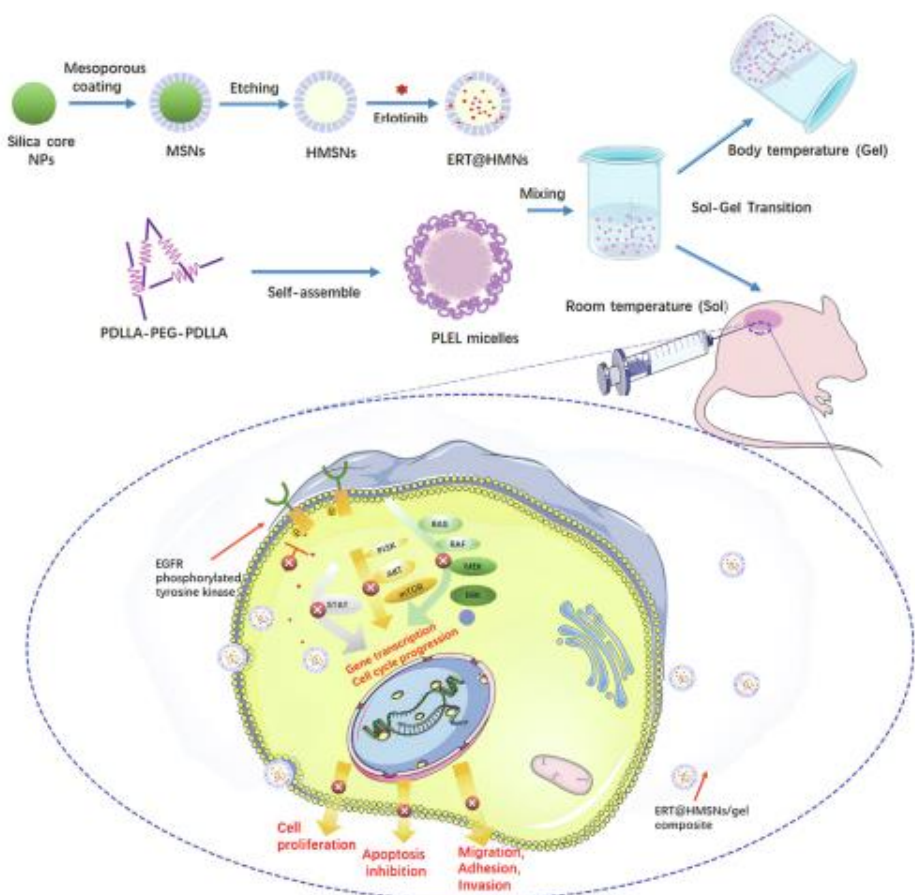


Fig. 5. Schematic representation of the ERT@HMSNs and ERT@HMSNs/gel composite. HMSNs/gel *in situ* drug delivery platform was employed for localized and sustained delivery of small molecule, erlotinib, to promote its therapeutic efficacy and ameliorate drug-related toxicity. Reproduced with permission from [Zhou et al., 2020](#)

pullulan- zinc oxide. For efficient adsorption, selective apoptosis in cancer cells improved solubility and stability, pullulan modified with carboxymethyl (CM) and zinc oxide (ZnO) were prepared. In this study, gellan gum-coated and uncoated CMP-ZnO nanocomposites were characterized and evaluated for drug release. Among a variety of formulations, gellan gum-coated CMP-ZnO nanocomposites showed a high drug loading efficiency (approximately 71 %) and improved drug release profiles when compared to free erlotinib ([Bera et al., 2020](#)).

In study, gold NPs was used delivery of afatinib. Pegylation was performed with polyethyleneglycol, a hydrophilic polymer, to improve the surface properties and stability of gold NPs. As a result of characterization studies of afatinib loaded pegylated gold NPs, particle size was 41 ± 3 nm, PDI was 0.6, and zeta potential was -35 ± 4 mV. The IC_{50} value of afatinib-loaded gold NPs was 20 times lower than free afatinib in *in vitro* studies conducted on the A549 cell line. In addition, when the release profiles were compared after 6 h, drug release from afatinib-loaded gold NPs was 4 times slower than that of free afatinib (15 % and 60 %) ([Coelho et al., 2016](#)).

In another study, gefitinib conjugated colloidal gold NPs was prepared with the EGFR antibody. Antibodies were attached in the preparation of NPs, as cell cultures A549, NCI-H460, and NCI-H1975 cells were resistant to gefitinib. According to the cell viability results, AuNPs-gefitinib-antibody were 30–80 % more effective than free gefitinib and gefitinib-AuNPs ([Lam et al., 2014](#)).

3.3. Other nanocarriers

Namita Hedge et al. synthesized L-glutamic acid-based dendritic lipopeptide oligomeric nanosuspension for delivery of gefitinib using the Box-Behnken experimental design. An optimized formulation, showing a particle size of 337.1 nm, the zeta potential of -23.8 mV, drug entrapment efficiency of 60.67 %, and drug release of more than 40 % in 3 h, has been identified. *In vitro* anticancer activity of oligomeric nanosuspension was evaluated in 3 T3 (fibroblast), SiHa (cervical carcinoma), A549 (adenocarcinoma), and U87 (glioblastoma) cell lines. Results showed oligomeric nanosuspension has cytotoxic effects on cells

(Hegde et al., 2021).

In a comparative study, erlotinib-loaded nanocrystals were prepared using electrospraying and lyophilization techniques. The final nanosuspension had a particle size of 232 nm, a polydispersity index of 0.162, and a zeta potential of -9.82 mV. *In vitro* evaluations on A549 lung cancer cells showed an IC_{50} value of 20.14 ± 0.92 for the nanosuspension, compared to 29.37 ± 3.74 for the free drug. The study demonstrated that lyophilization outperformed electrospraying in terms of particle morphology, drug loading, drug release, and other factors. Additionally, the nanocrystal formulation exhibited higher erlotinib solubility (Thakkar et al., 2018).

4. Discussion

The urgent need for transformative therapeutic strategies in the face of high mortality rates and limitations associated with conventional lung cancer treatments has spurred the demand for innovative approaches. It is anticipated that the implementation of these novel therapeutic methods will effectively address the shortcomings and challenges encountered in traditional treatment modalities. Molecular targeted therapy, immunotherapy, gene therapy, and the utilization of nanoparticle-based drug delivery systems for co-delivery of anticancer agents represent some of the highly promising and cutting-edge approaches in cancer treatment (Gencer et al., 2021). Moreover, given the substantial cost and time investments involved in developing new medicinal molecules, research efforts focusing on the development of nanotechnology-based drug delivery systems utilizing existing drugs hold significant importance.

In recent years, small molecule TKIs have made remarkable advancements in anti-cancer therapy, especially in the context of lung cancer treatment (Pan et al., 2023; Truong et al., 2020). However, it is crucial not to overlook the limitations associated with these TKIs, such as inadequate selectivity, unexpected pharmacokinetics, and bio-distribution patterns that can lead to heightened toxicity and adverse effects on healthy tissues. Notably, erlotinib, afatinib, and gefitinib, classified as class II in the biopharmaceutical classification system, have been reported to exhibit limited efficacy, drug resistance, serious side effects, slow absorption, and poor bioavailability (Dhillon, 2015; Hirsh, 2017; Pandey and Dureja, 2017). The therapeutic effectiveness of these drugs has been bolstered by the emergence of novel drug delivery systems that minimize harm to healthy cells. Furthermore, *in vitro* and *in vivo* studies have demonstrated that modifications and conjugations made to carrier systems can prevent drug resistance, enabling effective treatment with lower doses. Additionally, co-delivery nanoparticulate systems incorporating these drugs with other active substances have been developed, revealing enhanced antitumor activity compared to free drugs. Alectinib, ceritinib, brigatinib and crizotinib, which are TKI's targeting ALK, are available in market preparations that can only be administered orally. Nevertheless, the use of these drugs is limited due to their low and variable bioavailability, serious side effects and drug resistance (Huang et al., 2016; Peters et al., 2017; Sabu et al., 2013). These limitations are overcome by drug delivery systems. Also, studies have shown that the antitumor effect is increased when compared to free drugs. In addition, for targeted therapy TAT has been used to improve the antitumor effect of the alectinib by increasing the uptake of alectinib into tumor cells, and it has been shown *in vitro* and *in vivo* to increase the anticancer effect of the drug at reduced doses (Zeng et al., 2020).

This review comprehensively summarizes various approaches employed to enhance the effectiveness of TKI delivery by leveraging diverse nanoparticle-based drug delivery systems (Table 3). Erlotinib and gefitinib are the two tyrosine kinase inhibitors that have been observed to have the most studies among all tyrosine kinase inhibitors in the literature. Considering *in vivo* studies, surface modifications such as poly(acrylic acid)-cystamine-oleic acid modification, PEGylation, and galactosylation were carried out to increase the stability, bioavailability, and antitumor effect of lipid-based nanoparticle systems containing

erlotinib. Another noteworthy study, compared free gefitinib with gefitinib-loaded mannose-conjugated pH-sensitive micelles, and found that the proliferation of cancer cells was more significantly suppressed and that drug accumulation in the tumor site was 7-fold higher higher with gefitinib-loaded mannose-conjugated pH-sensitive micelles.

The findings from these studies suggest the following key insights: (i) Formulations incorporating polymer-based, lipid-based, and inorganic nanoparticles exhibit increased bioavailability, stability, and enable targeted therapy. (ii) Combining TKIs with other therapeutic agents delivered via nanoparticles helps to circumvent tumor and drug resistance development while improving the overall therapeutic effects of TKIs. The development of drug resistance in lung cancer treatment can be attributed to various factors. These factors often involve alterations in the oncogenes targeted within tumor cells and changes in other associated signaling pathways, primarily arising from the genetic heterogeneity of the tumor (Kuwano et al., 2016; Liu et al., 2020). Several approaches can be devised to prevent the emergence of resistance in lung cancer treatment: Such as identifying specific genomic changes during treatment, employing combinations of multiple drugs with molecular targets, shifting from first-generation TKIs to second and third-generation TKIs, developing nanoparticulate systems as carriers for TKIs (de Klerk et al., 2018; Kuwano et al., 2016; Murtuza et al., 2019). These approaches aim to enhance the effectiveness of treatment and mitigate the development of drug resistance in lung cancer. For the purpose that, α -tocopheryl succinate, which is a mitochondrial destabilizer, was used with erlotinib for more effective cancer treatment of EGFR-overexpressing NSCLC (Cheng et al., 2020). Another study, conducted with the specific goal of overcoming drug resistance to gefitinib, employed a combination of drug therapy, gene therapy with siRNA, and photodynamic therapy (Huang et al., 2022). In another study, compared to either salinomycin-NPs or gefitinib-NPs alone, combinations of both nanoparticles were observed to more effectively reduce tumor growth (Zhang et al., 2017). Additionally, it has been determined that photodynamic therapy increased the anticancer effects of PLGA nanoparticles containing gefitinib (Zhang et al., 2020). Moreover, the delivery of afatinib and paclitaxel showed that more effective anticancer treatment of EGFR TKIs resistant NSCLC (Yang et al., 2019). (iii) Polymer-based, lipid-based, inorganic, and hybrid systems contribute to enhancing the properties of TKIs, including water solubility, dissolution, bioavailability, and toxicity. As nanotechnology continues to advance, TKIs loaded onto nanocarriers demonstrate substantial improvements in therapeutic efficacy by enhancing solubility, prolonging systemic circulation, facilitating increased accumulation at tumor sites, and minimizing distribution in healthy tissues. Furthermore, the development of co-delivery systems enables simultaneous encapsulation of multiple anticancer drugs and precise regulation of drug release, thereby maximizing synergistic effects.

Nanotechnology enhances drug development with numerous FDA-approved nanomedicines and approximately 400 clinical studies related to nanoparticles and cancer currently ongoing or completed. Nevertheless, despite numerous preclinical *in vivo* have investigated nanoparticles carrying TKIs, clinical studies on this topic are limited to just three (Table 4). Numerous studies have progressed to the *in vivo* phase, but the transition of these nanoparticles to clinical trials remains elusive. To move from *in vivo* testing to clinical trials, a crucial milestone to accomplish is the scale-up in nanodrug manufacturing. Several challenges need to be addressed before their clinical potential can be fully realized. Manufacturing NPs on a large scale remains a significant obstacle due to factors such as high material costs, low manufacturing efficiency, and time-consuming processes. Additionally, the poor storage stability of NPs and the absence of standardized protocols for pre-clinical and clinical studies pose additional hurdles that need to be overcome. Furthermore, the clinical application of nanoparticles is restricted due to their potential interactions with numerous biological barriers within the body, which remain largely unexplored. Nevertheless, several challenges remain unaddressed in the clinical phase. NPs

Table 3
Nanoparticles for delivery of Tyrosine Kinase Inhibitors.

| Tyrosine kinase inhibitor + Other active agents/ modalities | Nanocarrier type | Experiments | Result | Ref. | |
|---|---|------------------------------------|--|--|----------------------|
| Erlotinib | Liposomal Complexes | in vitro | Decrease of proliferation of H1975 and PC-9 cells and increase of uptake and liposomal stability with anti-EGFR aptamer conjugation | (Li et al., 2017) | |
| | Liposomes | in vitro, in vivo | Increase of bioavailability nearly 2 times and cytotoxicity in A549 cells | (Zhou et al., 2018) | |
| | Liposomes | in vitro, in vivo | Improve of the drug targeting and increase of bioavailability | (Xu et al., 2018) | |
| | Poly(acrylic acid) Cystamine Oleic Acid Modified Lipid NPs | in vitro, in vivo | Increase of bioavailability and decrease of tumor inhibition rate by 2-fold | (Tan and Wang, 2017) | |
| | Solid Lipid NPs | in vitro | Induction of apoptosis and increase of cytotoxicity in A549 cells | (Bakhtiyari et al., 2017) | |
| | Albumin-bound nanoparticles | in vitro, in vivo | Decrease of proliferation of A549 NSCLC cells and inhibition of tumor growth | (Shen and Li, 2018) | |
| | Chitosan NPs | in vitro | Increase of apoptosis and cytotoxicity in A549 NSCLC cells with pH-dependent AS1411 aptamer conjugation | (Saraswathakumar et al., 2020) | |
| | Poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) NPs | in vitro | Increase of cytotoxicity, apoptosis and autophagy inhibition with cyclodextrin modification | (Vaidya et al., 2019) | |
| | Chitosan NPs | in vitro | Increase of cytotoxicity in A549 cells and sustained drug release | (Pandey et al., 2019) | |
| | Polycaprolactone Nanocapsules | in vitro | Increase of cytotoxicity in A549 cells | (Bruinsmann et al., 2020) | |
| | Poly(ϵ -Caprolactone)- Poly(Ethylene Glycol)- Poly(ϵ -Caprolactone) NPs | in vitro | Increase of cytotoxicity in A549 NSCLC cells and sustained drug release | (Barghi et al., 2015) | |
| | Polymeric polycaprolactone; Phospholipid | in vitro | Decrease of cellular viability in A549 NSCLC cells | (Mandal et al., 2016) | |
| | Core-Shell Type Polypeptide-Based Lipid Nanocapsules | in vitro, in vivo | Increase of uptake and cytotoxicity in HCC-827 and NCI-H358 lung cancer cells, and inhibition of tumor growth | (Kim et al., 2017) | |
| | Silica NPs | in vitro, in vivo | Increase of tumoral drug retention, antitumor efficacy and, reduction of tumor volume without significant body weight difference | (Zhou et al., 2020) | |
| | Nanocrystals | in vitro | Increase of dissolution and cytotoxicity in A549 NSCLC cells | (Thakkar et al., 2018) | |
| | Erlotinib + α -tocopheryl succinate | Poly(Ester-Thioether) Microspheres | in vitro, in vivo | Increase of bioavailability and decrease of tumor volume nearly 1.5-fold and 2.5 fold | (Cheng et al., 2020) |
| | | Liposomes | in vitro, in vivo | Increase of cytotoxicity in A549 and 16HBE cells, increase of antitumor efficacy and, reduction of tumor volume without significant body weight difference | (Hu et al., 2020) |
| Solid Lipid NPs | | in vitro | Increase of cytotoxicity in A549 NSCLC cells | (Sotari et al., 2020) | |
| Albumin-bound nanoparticles | | in vitro, in vivo | Increase of proliferation and apoptosis in NCI-H358 NSCLC cells, and inhibition of tumor growth | (Pang et al., 2019) | |
| PLA NPs | | in vitro | Increase of cellular uptake and cytotoxicity with folic acid | (Bian et al., 2018) | |
| Poly(ϵ -Caprolactone)- Poly(Ethylene Glycol)- Poly(ϵ -Caprolactone) NPs | | in vitro, in vivo | Increase of antitumor activity with small body weight changes and lower side effects | (Ni et al., 2017) | |
| PLGA NPs | | in vitro | Increase of cytotoxicity with chitosan coating in A549 cells | (Alshetaiti, 2021) | |
| Micelles | | in vitro | Increase of cytotoxicity with CD133 aptamers in CD133 ⁺ lung cancer stem cells with CD133 aptamer conjugation | (Huang et al., 2017) | |
| Micelles | | in vitro, in vivo | Increase of half-life of gefitinib and accumulation in tumor sites, and inhibition of cancer cell proliferation | (Wang et al., 2015) | |
| Gold Nps | | in vitro | Increase of cytotoxicity in A549, NCI-H460, and NCI-H1975 cells | (Lam et al., 2014) | |
| Gefitinib + Yes-associated protein- siRNA | Nanosuspension | in vitro | Increase of cytotoxicity in 3 T3, A549, S1Ha and U87 cells | (Hegde et al., 2021) | |
| | Polymer-based NPs | in vitro, in vivo | Increasing anticancer effect with photodynamic therapy, gene therapy and molecular targeted therapy in drug-resistant tumours | (Huang et al., 2022) | |
| Gefitinib + Photodynamic therapy (5-Aminolevulinic acid | PLGA NPs | in vitro, in vivo | Increase of anticancer effect especially under photodynamic therapy | (Zhang et al., 2020) | |
| Gefitinib + Salinomycin | PLGA-PEG NPs | in vitro, in vivo | Targeting of lung cancer cells and lung cancer stem cells, and a 94 % decrease in tumor volume with salinomycin NP combined with gefitinib NPs | (Zhang et al., 2017) | |
| Afatinib | Liposomes | in vitro | Suppression of lung cancer cell growth with pH-sensitive liposomes more effective than cationic and non-targeting liposomes. | (Almusheddi et al., 2018) | |
| | PLGA NPs | in vitro, in vivo | Improve in pharmacokinetic profile and accumulation in tumor sites, and Increase of cytotoxicity in KRAS-mutated NSCLC cells (A549, H460) | (Elbotany et al., 2021) | |
| | Gold NPs | in vitro | Increase of cytotoxicity in A549 nearly 20 times with Gold NPs | (Coelho et al., 2016) | |
| Afatinib + Paclitaxel | Solid Lipid NPs | in vitro, in vivo | Synergistic stronger tumor-killing effect in vitro and in vivo with acceptable safety | (Yang et al., 2019) | |

(continued on next page)

Table 3 (continued)

| Tyrosine kinase inhibitor + Other active agents/ modalities | Nanocarrier type | Experiments | Result | Ref. |
|---|---|----------------------------------|--|---|
| Crizotinib | Poly(lactide- <i>l</i> -tocopheryl glycol 1000 Succinate Polymeric Micelles | <i>in vitro</i> | Increase of apoptosis in A549 NSCLC cells | (Jiang et al., 2015) |
| | Polydopamine (pD)-modified Poly(lactide- <i>l</i> -tocopheryl glycol 1000 Succinate NPs | <i>in vitro</i> , <i>in vivo</i> | Increase of apoptosis and cytotoxicity in A549 NSCLC cells, and inhibition of tumor growth, and decrease of hepatocyte damage | (Wang et al., 2022b) |
| | Lipid-polymer hybrid NPs | <i>in vitro</i> | Increase of cytotoxicity in NCI-H2228 cells | (Korucu Aktas et al., 2023) |
| Alectinib | TAT-PEG-B-PHEP | <i>in vitro</i> , <i>in vivo</i> | Improve in tumor cellular uptake with a cascade dual-target nanocarrier, initiate of tumor shrinkage and decrease of hepatocyte damage | (Zeng et al., 2020) |
| Ceritinib Brigatinib | Solid Lipid NPs | <i>in vitro</i> | Increase of dissolution | (Suvarsha, 2020) |
| | Solid Lipid NPs PLGA NPs | <i>in vitro</i> | Decrease of cellular viability in A549 NSCLC cells Increase of cytotoxicity in A549 NSCLC cells | (Ahmed et al., 2020) (Mohammed et al., 2019) |

Table 4

Represents summary of recent clinical trial studies of tyrosine kinase inhibitor nanomedicines for cancer.

| Active Drug | Nanomaterial Types | Types of Cancer | Phase | Reference |
|---------------------------------------|--------------------|-------------------|-------|----------------------------|
| TUSC2, Erlotinib | Lipid-based NPs | NSCLC | I/II | (Lu et al., 2012) |
| Erlotinib, Carboplatin and Paclitaxel | Albumin NPs | NSCLC | II | (Lara et al., 2016) |
| Ceritinib | Albumin NPs | Pancreatic Cancer | I | (Pountzilias et al., 2021) |

have shown promising results by significantly enhancing the effectiveness of TKIs, improving their bioavailability, and reducing side effects, ultimately achieving more precise and targeted therapies. Consequently, NPs have opened up new avenues for the development of anti-cancer treatments that are both more potent and less invasive. This innovation has the potential to re-evaluate compounds that previously faced challenges related to drug delivery, providing a fresh perspective on anti-cancer therapies.

CRedit authorship contribution statement

Pelinsu Korucu Aktas: Investigation, Visualization, Writing – original draft. **Ipek Baysal:** Investigation, Writing – review & editing. **Samiye Yabanoglu-Giftci:** Investigation, Writing – review & editing. **Alf Lamprecht:** Writing – review & editing. **Betul Arica:** .

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

No data was used for the research described in the article.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.123703>.

References

- Abbas, E., Aval, S.F., Akbarzadeh, A., Milani, M., Nasrabadi, H.T., Joo, S.W., Hamfipour, Y., Nejadi-Koshki, K., Fushari-Adl, R., 2014. Dendrimers: synthesis, applications, and properties. *Nanoscale Res. Lett.* 9, 1–10.
- Ahmed, M.M., Fatima, F., Anwer, M.K., Aldawsari, M.F., Alsaifan, Y.S.M., Alfnir, S.A., Haque, A., Alanazi, A., Alhazzani, K., 2020. Development and characterization of Brigatinib loaded solid lipid nanoparticles: In-vitro cytotoxicity against human carcinoma A549 lung cell lines. *Chem. Phys. Lipids* 233, 105003.
- Almushedi, A.S., Radwan, M., Omar, S., Alaiya, A.A., Badran, M.M., Elmaghrabi, H., Saleem, I.Y., Hutcheon, G.A., 2018. A novel pH-sensitive liposome to trigger delivery of afatinib to cancer cells: Impact on lung cancer therapy. *J. Mol. Liq.* 259, 154–166.
- Alshetali, A.S., 2021. Gefitinib loaded PLGA and chitosan coated PLGA nanoparticles with magnified cytotoxicity against A549 lung cancer cell lines. *Saudi J. Biol. Sci.* 28, 5065–5073.
- Anselmo, A.C., Mitragotri, S., 2016. Nanoparticles in the clinic. *Bioeng. Transl. Med.* 1, 10–29.
- Ayala-Aguilera, C.C., Valero, T., Lorente-Macias, A., Bailache, D.J., Croke, S., Unciti-Broceta, A., 2022. Small molecule kinase inhibitor drugs (1995–2021): Medical indication, pharmacology, and synthesis. *J. Med. Chem.* 65, 1047–1131.
- Bakhtiyari, Z., Barar, J., Aghajani, A., Saei, A.A., Nemati, E., Ezazi Nazhad Dolatabadi, J., Omid, Y., 2017. Microparticles containing erlotinib-loaded solid lipid nanoparticles for treatment of non-small cell lung cancer. *Drug development and industrial pharmacy* 43, 1244–1253.
- Barghi, L., Azgan, D., Barar, J., Nakhilband, A., Valizadeh, H., 2015. Synthesis, characterization and *in vitro* anti-tumoral evaluation of Erlotinib-PCEC nanoparticles. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 15, 10281–10287.
- Bera, H., Ang, S.R., Chieng, S.W., Chan, C.H., Abbasi, Y.F., Law, L.P., Chatterjee, B., Venugopal, V., 2020. Core-shell structured pullulan based nanocomposites as erlotinib delivery shuttles. *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* 69, 846–859.
- Bian, W., Wang, M., Ahson, B., Lin, S., Ren, Z., Huang, J.-A., Wang, J., 2018. Gefitinib-loaded nanoparticles with folic acid-modified dextran surface prepared by flash nanoprecipitation. *Chem. Lett.* 47, 1405–1408.
- Bruinsmann, F.A., Bass, J.H., Sauto, G.D., Schultze, E., de Cristo Soares Alves, A., Seixas, F.K., Collares, T.V., Pohlmann, A.R., Gutierrez, S.S., 2020. Erlotinib-loaded poly(ϵ -caprolactone) nanocapsules improve *in vitro* cytotoxicity and anticlonogenic effects on human A549 lung cancer cells. *AAPS PharmSciTech* 21, 1–12.
- Cao, P., Bai, Y., 2012. Polymer nanoparticulate drug delivery and combination cancer therapy. *Future Oncol.* 8, 1471–1480.
- Cheng, F., Peng, X., Meng, G., Pu, Y., Luo, K., He, B., 2020. Poly (ester-thioether) microspheres co-loaded with erlotinib and α -tocopheryl succinate for combinational therapy of non-small cell lung cancer. *J. Mater. Chem. B* 8, 1728–1738.
- Chu, Q., Vincent, M., Logan, D., Mackay, J.A., Evans, W.K., 2005. Taxanes as first-line therapy for advanced non-small cell lung cancer: a systematic review and practice guideline. *Lung Cancer* 50, 355–374.
- Coelho, S.C., Almeida, G.M., Pereira, M.C., Santos-Silva, F., Coelho, M.A., 2016. Functionalized gold nanoparticles improve afatinib delivery into cancer cells. *Expert Opin. Drug Deliv.* 13, 133–141.
- de Klerk, D.J., Honeywell, R.J., Jansen, G., Peters, G.J., 2018. Transporter and Lysosomal Mediated (Multi)drug Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors and Potential Strategies to Overcome Resistance. *Cancers (Basel)* 10.
- Dhillon, S., 2015. Gefitinib: a review of its use in adults with advanced non-small cell lung cancer. *Target. Oncol.* 10, 153–170.
- Dhillon, S., Clark, M., 2014. Ceritinib: First global approval. *Drugs* 74, 1285.
- Dogan, L., Güç, D., 2004. Sinyal İletim Mekanizmaları ve Kansere. *Hacettepe Med. J.* 35, 34–42.
- Donahue, N.D., Acar, H., Wilhelm, S., 2019. Concepts of nanoparticle cellular uptake, intracellular trafficking, and kinetics in nanomedicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 143, 68–96.
- Elbatnony, R.S., Parvathaseni, V., Kulkarni, N.S., Shukla, S.K., Chauhan, G., Kunda, N.K., Gupta, V., 2021. Afatinib-loaded inhalable PLGA nanoparticles for localized

- therapy of non-small cell lung cancer (NSCLC)—development and in-vitro efficacy. *Drug Deliv. Transl. Res.* 11, 927–943.
- Fountallos, C., Adjei, A., Gyverchal, M., Evans, R., Ghaseini, M., Attwood, K., Gorman, A., Bohara, W., Govey, A., Wilton, J., Ma, W.W., Iyer, R., 2021. A phase I study of the anaplastic lymphoma kinase inhibitor ceritinib in combination with gemcitabine-based chemotherapy in patients with advanced solid tumors. *Int. J. Cancer* 149, 2063–2074.
- Gençer, A., Duruloğlu, C., Özbay, S., Çiftçi, T.T., Yahşinoğlu-Öfçeli, S., Arica, B., 2021. Recent advances in treatment of lung cancer: nanoparticle-based drug and siRNA delivery systems. *Curr. Drug Deliv.* 18, 103–120.
- Gesche-Morris, M., Morris, M., 2016. Solid lipid nanoparticles as attractive drug vehicles: Composition, properties and therapeutic strategies. *Mater. Sci. Eng. C* 68, 982–994.
- Gong, J., Chen, M., Zheng, Y., Wang, S., Wang, Y., 2012. Polymeric micelles drug delivery system in oncology. *J. Control. Release* 159, 312–323.
- Gotlib, K.J., Verheul, H.M., 2010. Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: what is their mechanism of action? *Angiogenesis* 13, 1–14.
- Gu, L., Duan, Z., Li, X., Li, X., Li, Y., Li, X., Xu, G., Gao, P., Zhang, H., Gu, Z., Chen, J., Gong, Q., Luo, R., 2023. Enzyme-triggered deep tumor penetration of a dual-drug nanomedicine enables an enhanced cancer combination therapy. *Biomater. Mater.* 26, 102–115.
- Hegde, N., Juveale, K., Prebnikar, B., 2021. Formulation and optimization of gefitinib-loaded nanosuspension prepared using a newly developed dendritic lipopeptide oligomer material. *Chem. Pap.* 75, 2007–2022.
- Hirsh, V., 2017. New developments in the treatment of advanced squamous cell lung cancer: focus on afatinib. *Oncotargets Ther.* 10, 2513.
- Hu, Y., Zhang, J., Hu, H., Xu, S., Xu, L., Chen, E., 2020. Gefitinib encapsulation based on nano-liposomes for enhancing the curative effect of lung cancer. *Cell Cycle* 19, 3581–3594.
- Huang, X., Huang, J., Leng, D., Yang, S., Yao, Q., Sun, J., Hu, J., 2017. Gefitinib-loaded BSAPE-PEG2000 nanomicelles with CD133 aptamers target lung cancer stem cells. *World J. Surg. Oncol.* 15, 1–10.
- Huang, W.S., Liu, S., Zou, D., Thomas, M., Wang, Y., Zhou, F., Romero, J., Kohlmann, A., Li, F., Qi, J., Cai, L., Dwight, T.A., Xu, Y., Xu, R., Dodd, R., Tums, A., Puffilon, L., Lu, X., Anjum, B., Zhang, S., Wang, F., Kees, J., Wardwell, S.D., Ning, Y., Xu, Q., Moran, L.E., Moheemad, Q.K., Jung, H.G., Clarkson, T., Narasimhan, N.I., Rivera, V.M., Zuo, X., Dalgarro, D., Shukresure, W.C., 2016. Discovery of brigatinib (AP26113), a phosphite oxide-containing, potent, orally active inhibitor of anaplastic lymphoma kinase. *J. Med. Chem.* 59, 4948.
- Huang, J., Zhuang, C., Chen, J., Chen, X., Li, X., Zhang, T., Wang, R., Feng, Q., Zheng, X., Gong, M., Gong, Q., Xiao, K., Luo, K., Li, W., 2022. Targeted drug/gene/photodynamic therapy via a stimuli-responsive dendritic-polymer-based nanocoil for treatment of EGFR-TKI-resistant non-small-cell lung cancer. *Adv. Mater.* 34, e2201516.
- Jiang, Z.M., Dai, S.P., Xu, Y.Q., Li, T., Xie, J., Li, C., Zhang, Z.H., 2015. Erlotinib-loaded polymeric nanoparticles in lung cancer chemotherapy. *Med. Oncol.* 32, 193.
- Kim, E.M., Jeong, H.-J., 2021. Liposomes: Biomedical applications. *Chemom Med. J.* 57, 27–35.
- Kim, J., Ramasamy, T., Choi, J.Y., Kim, S.T., Yoon, Y.S., Choi, H.-G., Yong, C.S., Kim, J.-O., 2017. PEGylated polypeptide lipid nanoparticles to enhance the anticancer efficacy of erlotinib in non-small cell lung cancer. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 150, 393–401.
- Knighson, D.R., Zheng, J.H., Tet Eyck, L.F., Ashford, V.A., Xiang, N.H., Taylor, S.S., Sawicki, J.M., 1991. Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* 255, 407–414.
- Korucu Aktes, P., Bayral, I., Yahşinoğlu-Öfçeli, S., Arica, B., 2023. Development and in vitro evaluation of erlotinib-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles using Box-Behnken design in non-small cell lung cancer. *AAPS PharmSciTech* 24, 178.
- Kuwano, M., Sonoda, K., Murakami, Y., Watan, K., Ono, M., 2016. Overcoming drug resistance to receptor tyrosine kinase inhibitors: Learning from lung cancer. *Pharmacol. Ther.* 161, 97.
- Lam, A.T.N., Yoon, J., Ganbold, E.-O., Singh, D.K., Kim, D., Cho, K.-H., Lee, S.Y., Cho, J., Lee, K., Joo, S.-W., 2014. Colloidal gold nanoparticle conjugates of gefitinib. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 123, 61–67.
- Lara Jr., P.N., Moon, J., Heckath, P.J., Redman, M.W., Williamson, S.K., Akorley Sed, W. L., Hirsch, F.R., Mack, P.C., Gandara, D.R., 2016. SWOG S0709: Randomized phase II trial of erlotinib versus erlotinib plus carboplatin/paclitaxel in patients with advanced non-small cell lung cancer and impaired performance status as selected by a serum proteomics assay. *J. Thorac. Oncol.* 11, 420–425.
- Leungbor-Arasul, H., Hassan, O.U., Yang, Y.W., Buchanan, P., 2015. Lung cancer: Biology and treatment options. *Biochim. Biophys. Acta* 1856, 189–210.
- Li, F., Mei, H., Xie, X., Zhang, H., Liu, J., Lv, T., Nie, H., Gao, Y., Jia, L., 2017. Aptamer-conjugated chitosan-anchored liposomal complexes for targeted delivery of erlotinib to EGFR-mutated lung cancer cells. *AAPS J.* 19, 814–826.
- Li, J., Zhang, X., Zhao, M., Wu, L., Luo, K., Pe, Y., He, B., 2018. Tumor-pH-sensitive PLLA-based microsphere with acid cleavable acetal bonds on the backbone for efficient localized chemotherapy. *Biomacromolecules* 19, 3140–3148.
- Liu, W.-J., Du, Y., Wen, R., Yang, M., Xu, J., 2020. Drug resistance to targeted therapeutic strategies in non-small cell lung cancer. *Pharmacol. Ther.* 206, 107438.
- Luo, Y.S., Zahid, N.I., Madhewarao, T., Mat Azzni, I.D., 2022. Recent advances in the development of multifunctional lipid-based nanoparticles for co-delivery, combination treatment strategies, and theranostics in breast and lung cancer. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 71, 103300.
- Liu, C., Stewart, D.J., Lee, J.J., Ji, L., Ramesh, B., Jayachandran, G., Nunez, M.L., Wisniew, L.I., Erasmus, J.J., Hicks, M.E., Grimm, E.A., Reuben, J.M., Balasubramanian, V., Templeton, N.S., McManis, J.D., Roth, J.A., 2012. Phase I clinical trial of systemically administered TUSC2(FUS1)-nanoparticles mediating functional gene transfer in humans. *PLoS One* 7, e34833.
- Mandal, B., Mittal, N.K., Baladandula, P., Thomas, L.A., Wood, G.C., 2016. Development and in vitro evaluation of core-shell type lipid-polymer hybrid nanoparticles for the delivery of erlotinib in non-small cell lung cancer. *Eur. J. Pharm. Sci.* 81, 162–171.
- Markham, A., 2017. Brigatinib: First global approval. *Drugs* 77, 1131.
- Mitchell, M.J., Billingsley, M.M., Haley, R.M., Wechsler, M.E., Peppas, N.A., Langer, R., 2021. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 20, 101–124.
- Mohammed, M., Alnaffah, M.S., Ameer, M.K., Fatima, F., Almutairy, B.K., Alshahrani, S. M., Alshetaiti, A.S., Alalawie, A., Fayad, M.H., Alanssi, A.Z., 2019. Chitosan surface modified PLGA nanoparticles loaded with brigatinib for the treatment of non-small cell lung cancer. *J. Polym. Eng.* 39, 909–916.
- Mohamed, V., Chen, Y., 2006. Nanoparticles—a review. *Trop. J. Pharm. Res.* 5, 561–573.
- Molina, J.R., Yang, P., Cassivi, S.D., Schild, S.E., Adjei, A.A., 2009. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin. Proc.* Elsevier 594–594.
- Murtaza, A., Ruffo, A., Shen, J.P., Foshavarizan, P., Woodward, B.D., Lopez-Diaz, F.J., Lippman, S.M., Hussain, H., 2019. Novel third-generation EGFR tyrosine kinase inhibitors and strategies to overcome therapeutic resistance in lung cancer. *Cancer Res.* 79, 689.
- Nascimento, A.V., Gattacecca, F., Singh, A., Boudina, H., Ferreira, D., Sarmento, B., Amiji, M.M., 2016. Biodistribution and pharmacokinetics of Mad2 siRNA-loaded EGFR-targeted chitosan nanoparticles in cisplatin sensitive and resistant lung cancer models. *Nanomedicine (Lond.)* 11, 767–781.
- Ni, X.L., Chen, L.X., Zhong, H., Yang, B., Xu, S., Wu, M., Liu, J., Yang, L.L., Chen, Y., Fu, S.Z., 2017. In vitro and in vivo antitumor effect of gefitinib nanoparticles on human lung cancer. *Drug Deliv.* 24, 1501–1512.
- Ojo, O.A., Olayide, I.I., Akalolu, M.C., Ajiboye, B., Ojo, A., Oyinloye, B., Ramalingam, M., 2021. Nanoparticles and their biomedical applications. *Biointerface Res. Appl. Chem.* 11, 8431–8445.
- Paik, J., Dhillon, S., 2018. Alectinib: A review in advanced, ALK-positive NSCLC. *Drugs* 78, 1247.
- Pan, Q., Li, Y., Xie, L., Wu, D., Liu, R., Gao, W., Luo, K., He, B., Pe, Y., 2023. Recent advances in boosting EGFR tyrosine kinase inhibitors-based cancer therapy. *Mod. Pharm.* 20, 829–852.
- Pandey, P., Dua, K., Dureja, H., 2019. Erlotinib loaded chitosan nanoparticles: Formulation, physicochemical characterization and cytotoxic potential. *Int. J. Biol. Macromol.* 139, 1304–1316.
- Pandey, P., Dureja, H., 2017. Erlotinib: a targeted anticancer drug. *Curr. Cancer Ther. Rev.* 13, 3–16.
- Pang, J., Xing, H., Sun, Y., Peng, S., Wang, S., 2020. Non-small cell lung cancer combination therapy: Hyaluronic acid modified, epidermal growth factor receptor targeted, pH sensitive lipid-polymer hybrid nanoparticles for the delivery of erlotinib plus bevacizumab. *Biomater. Pharmacother.* 125, 109861.
- Pang, X., Yang, P., Wang, L., Gao, J., Cheng, Y., Sheng, D., Wan, X., Guo, Q., Qian, K., Zhang, Q., 2019. Human serum albumin nanoparticle system with encapsulation of gefitinib for enhanced anti-tumor effects in non-small cell lung cancer. *J. Drug Delivery Sci. Technol.* 52, 997–1007.
- Pawson, T., 2002. Regulation and targets of receptor tyrosine kinases. *Eur. J. Cancer* 38, S3–S10.
- Peters, S., Camidge, D.R., Shaw, A.T., Gadgil, S., Ahn, J.S., Kim, D.-W., Du, S.-H.-I., Perol, M., Dziadziuszko, R., Rosell, R., 2017. Alectinib versus erlotinib in untreated ALK-positive non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 377, 829–838.
- Ramalingam, S.S., Owonikoko, T.K., Khuri, F.R., 2011. Lung cancer: New biological insights and recent therapeutic advances. *CA Cancer J. Clin.* 61, 91–112.
- Saha, A., Prabhakar, K., Neebha, V., Joshi, A., Desai, S., 2013. Crizotinib: A comprehensive review. *South Asian J. Cancer* 2, 91–97.
- Saravankumar, K., Sahyaseelan, A., Mariadas, A.V.A., Jeevitnan, E., Hu, X., Shin, S., Wang, M.-H., 2020. Dual stimuli-responsive release of aptamer AS1411 decorated erlotinib loaded chitosan nanoparticles for non-small-cell lung carcinoma therapy. *Carbohydr. Polym.* 245, 116407.
- Satari, N., Taymouri, S., Vazhosaz, J., Rostami, M., Miran, M., 2020. Preparation and evaluation of inhalable dry powder containing glucosamine-conjugated gefitinib SLNs for lung cancer therapy. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 46, 1265–1277.
- Shen, Y., Li, W., 2018. HA/HSA co-modified erlotinib-albumin nanoparticles for lung cancer treatment. *Drug Des. Devel. Ther.* 12, 2285.
- Siegel, R.L., Miller, K.D., Fuchs, H.E., Jemal, A., 2022. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J. Clin.* 72, 7–33.
- Semidova, V., Michalek, P., Gollasova, Z., Eckschlager, T., Hodek, P., Adam, V., Heger, Z., 2021. Nanomedicine of tyrosine kinase inhibitors. *Theranostics* 11, 1546.
- Steichen, S.D., Calderera-Moore, M., Peppas, N.A., 2013. A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics. *Eur. J. Pharm. Sci.* 46, 416–427.
- Sugiyama, Y., Kameshita, I., 2017. Multi-PK antibodies: Powerful analytical tools to explore the protein kinase world. *Biochem. Biophys. Rep.* 11, 40–45.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjanatantam, I., Jemal, A., Bray, F., 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* 71, 209–249.
- Suvaraha, G., 2020. Development and optimization of solid lipid nanoparticle formulation for enhanced solubility of ceritinib using Box-Behnken design. *Asian J. Pharmaceut. (AJP): Five Full Text Articles Asian J. Pharm.* 14.
- Taghipour-Sabzevar, V., Shariif, T., Moghaddam, M.S., 2019. Polymeric nanoparticles as carrier for targeted and controlled delivery of anticancer agents. *Ther. Deliv.* 10, 527–550.

- Tan, S., Wang, G., 2017. Redox-responsive and pH-sensitive nanoparticles enhanced stability and anticancer ability of erlotinib to treat lung cancer in vivo. *Drug Des. Devel. Ther.* 11, 3519.
- Thakkar, S., Sharma, D., Misra, M., 2018. Comparative evaluation of electrospraying and lyophilization techniques on solid state properties of Erlotinib nanocrystals: Assessment of In-vitro cytotoxicity. *Eur. J. Pharm. Sci.* 111, 257–269.
- Truong, D.H., Le, V.K.H., Pham, T.T., Do, A.H., Pham, T.P.D., Tran, T.H., 2020. Delivery of erlotinib for enhanced cancer treatment: An update review on particulate systems. *J. Drug Delivery Sci. Technol.* 55, 101348.
- Vaidya, B., Parvathani, V., Kulkarni, N.S., Shukla, S.K., Damon, J.K., Sarode, A., Kanabar, D., Garcia, J.V., Mitragotri, S., Muth, A., 2019. Cyclodextrin modified erlotinib loaded PLGA nanoparticles for improved therapeutic efficacy against non-small cell lung cancer. *Int. J. Biol. Macromol.* 122, 338–347.
- van der Wekken, A.J., Sabar, A., Hillermann, T.J.N., Koh, K., van den Berg, A., Groen, H.J.M., 2016. Resistance mechanisms after tyrosine kinase inhibitors afatinib and crizotinib in non-small cell lung cancer, a review of the literature. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 100, 107–116.
- Wang, S.-J., Huo, Z.-J., Liu, K., Yu, N., Ma, Y., Qin, Y.-H., Li, X.-C., Yu, J.-M., Wang, Z.-Q., 2015. Ligand-conjugated pH-sensitive polymeric micelles for the targeted delivery of gefitinib in lung cancers. *RSC Adv.* 5, 73184–73193.
- Wang, J., Su, G., Yin, X., Luo, J., Gu, R., Wang, S., Feng, J., Chen, B., 2019. Non-small cell lung cancer-targeted, redox-sensitive lipid-polymer hybrid nanoparticles for the delivery of a second-generation irreversible epidermal growth factor inhibitor—Afatinib: In vitro and in vivo evaluation. *Biomed. Pharmacother.* 120, 109493.
- Wang, D.C., Wang, W., Zhu, B., Wang, X., 2018. Lung cancer heterogeneity and new strategies for drug therapy. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 58, 531–546.
- Wang, H., Wu, Y., Lin, X., 2022a. Crizotinib loaded polydopamine-poly(lactide)-TPGS nanoparticles in chemotherapy for non-small cell lung cancer. *Res. Sq.*
- Wang, H., Wu, Y., Lin, X., 2022b. Crizotinib loaded polydopamine-poly(lactide)-TPGS nanoparticles in targeted therapy for non-small cell lung cancer. *Med. Oncol.* 40, 26.
- Westover, D., Zugazagoitia, J., Cho, B.C., Lowly, C.M., Pus-Aers, L., 2018. Mechanisms of acquired resistance to first- and second-generation EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Ann. Oncol.* 29, 110.
- Xu, H., He, C., Liu, Y., Jiang, J., Ma, T., 2018. Novel therapeutic modalities and drug delivery—erlotinib liposomes modified with galactosylated lipid: In vitro and in vivo investigations. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 46, 1902–1907.
- Yadav, P., Jain, J., Shejle, A.P., 2021. Recent advances in nanocarriers-based drug delivery for cancer therapeutics: A review. *React. Funct. Polym.* 165, 104970.
- Yang, Y., Huang, Z., Li, J., Mo, Z., Huang, Y., Ma, C., Wang, W., Pan, X., Wu, C., 2019. PLGA porous microspheres dry powders for codelivery of afatinib-loaded solid lipid nanoparticles and paclitaxel: novel therapy for EGFR tyrosine kinase inhibitors resistant nonsmall cell lung cancer. *Adv. Healthc. Mater.* 8, 1900965.
- Yang, M., Li, J., Gu, P., Fan, X., 2021. The application of nanoparticles in cancer immunotherapy: Targeting tumor microenvironment. *Bioact. Mater.* 6, 1973–1987.
- Yugui, F., Wang, H., Sun, D., Zhang, X., 2019. Nasopharyngeal cancer combination chemoradiation therapy based on folic acid modified, gefitinib and yttrium 90 co-loaded, core-shell structured lipid-polymer hybrid nanoparticles. *Biomed. Pharmacother.* 114, 108820.
- Zeng, F., Xu, B., Zhu, H., Wu, S., Liao, G., Xie, D., Huang, L., Qiao, G., Yang, X., Zhou, H., 2020. A cascade dual-targeted nanocarrier for enhanced alectinib delivery to ALK-positive lung cancer. *Biomater. Sci.* 8, 6404–6413.
- Zhang, T., Bao, J., Zhang, M., Ge, Y., Wei, J., Li, Y., Wang, W., Li, M., Jin, Y., 2020. Chemo-photodynamic therapy by pulmonary delivery of gefitinib nanoparticles and 5-aminolevulinic acid for treatment of primary lung cancer of rats. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* 31, 101807.
- Zhang, Y., Zhang, Q., Sun, J., Liu, H., Li, Q., 2017. The combination therapy of salinomycin and gefitinib using poly (D, L-lactic-co-glycolic acid)-poly (ethylene glycol) nanoparticles for targeting both lung cancer stem cells and cancer cells. *OncoTargets Ther.* 10, 5653.
- Zhou, H., Ge, J., Miao, Q., Zhu, R., Wen, L., Zeng, J., Gao, M., 2019. Biodegradable inorganic nanoparticles for cancer theranostics: insights into the degradation behavior. *Bioconjug. Chem.* 31, 315–331.
- Zhou, X., Tao, H., Shi, K.H., 2018. Development of a nanoliposomal formulation of erlotinib for lung cancer and in vitro/in vivo antitumoral evaluation. *Drug Des. Devel. Ther.* 12, 1.
- Zhou, X., He, X., Shi, K., Yuan, L., Yang, Y., Liu, Q., Ming, Y., Yi, C., Qian, Z., 2020. Injectable thermosensitive hydrogel containing erlotinib-loaded hollow mesoporous silica nanoparticles as a localized drug delivery system for NSCLC therapy. *Adv. Sci.* 7, 2001442.
- Zielińska, A., Carreiró, F., Oliveira, A.M., Neves, A., Pires, B., Venkatesh, D.N., Durazzo, A., Lucarini, M., Eder, P., Silva, A.M., 2020. Polymeric nanoparticles: production, characterization, toxicology and ecotoxicology. *Molecules* 25, 3731.

← Journal information



INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS

Publisher name: ELSEVIER

Journal Impact Factor™

5.3

2023

5.6

Five Year

| JCR Category | Category Rank | Category Quartile |
|---|---------------|-------------------|
| PHARMACOLOGY & PHARMACY <i>in SCIE edition</i> | 34/354 | Q1 |

Source: Journal Citation Reports 2023. [Learn more](#)

Journal Citation Indicator™

1.63

2023

1.65

2022

| JCI Category | Category Rank | Category Quartile |
|---|---------------|-------------------|
| PHARMACOLOGY & PHARMACY <i>in SCIE edition</i> | 23/354 | Q1 |

The Journal Citation Indicator is a measure of the average Category Normalized Citation Impact (CNCI) of citable items (articles and reviews) published by a journal over a recent three year period. It is used to help you evaluate journals based on other metrics besides the Journal Impact Factor (JIF).



9.ÖZGEÇMİŞ

