

T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEME KANSERİ TEDAVİSİNDE AKTİF HEDEFLENDİRME AMACIYLA  
KULLANILMAK ÜZERE NANO BOYUTLU İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİN  
(NANOFARMASÖTİKLER) TASARIMI, İN VİTRO / İN VİVO  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Ecz. Selin Seda TİMUR**

**Farmasötik Teknoloji Programı**

**DOKTORA TEZİ**

**ANKARA**

**2017**



T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEME KANSERİ TEDAVİSİNDE AKTİF HEDEFLENDİRME AMACIYLA  
KULLANILMAK ÜZERE NANO BOYUTLU İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİN  
(NANOFARMASÖTİKLER) TASARIMI, İN VİTRO / İN VİVO  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Ecz. Selin Seda TİMUR**

**Farmasötik Teknoloji Programı**

**DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. R. Neslihan GÜRSOY**

**ANKARA**

**2017**



**MEME KANSERİ TEDAVİSİNDE AKTİF HEDEFLENDİRME AMACIYLA KULLANILMAK  
ÜZERE NANO BOYUTLU İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİN (NANOFARMASÖTİKLER) TASARIMI,  
İN VİTRO / İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Ecz. Selin Seda Timur**

Bu çalışma 15/09/2017 tarihinde jürimiz tarafından "Farmasötik Teknoloji Programı"nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

**Jüri Başkanı:**

*Prof. Dr. İmran Vural*

*(Hacettepe Üniversitesi)*

*(imza)*

**Tez Danışmanı:**

*Prof. Dr. R. Neslihan Gürsoy*

*(Hacettepe Üniversitesi)*

*(imza)*

**Üye:**

*Prof. Dr. Yalçın Özkan*

*(Sağlık Bilimleri Üniversitesi)*

*(imza)*

**Üye:**

*Prof. Dr. İsmail Tuncer Değim*

*(Biruni Üniversitesi)*

*(imza)*

**Üye:**

*Doç. Dr. Güneş Esendağlı*

*(Hacettepe Üniversitesi)*

*(imza)*

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

Tarih

18 Eylül 2017

*(imza)*

Prof. Dr. Diclehan Orhan

Enstitü Müdürü



## 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 kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etseniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

- Tezimin/Raporumun 15/09/2022 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya tamamının fotokopisi alınabilir)

- Tezimin/Raporumun ..... tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**

- Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

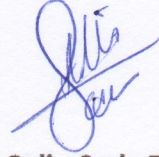
15 / 09 / 2017

*Selin Seda TIMUR*



**ETİK BEYAN SAYFASI**

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 özgün olduğunu, Prof. Dr. R. Neslihan GÜRSOY danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

**Selin Seda TİMUR**

## TEŞEKKÜR

Bilgi ve deneyimiyle her zaman yanımda olan, zor zamanlarımda beni cesaretlendiren, her türlü desteği sunan danışman hocam Sayın Prof. Dr. R. Neslihan Gürsoy'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bana laboratuvarını açarak eşsiz bir çalışma ortamı sağlayan, engin tecrübesiyle yol gösteren Sayın Prof. Dr. Ban-An Khaw'a ve bilimsel tecrübesini paylaşmaktan hiçbir zaman çekinmeyen, her zaman yanımda olarak çözümler üreten, beni grubunun bir üyesi olarak görüp rahat bir çalışma ortamı sağlayan Sayın Doç. Dr. Güneş Esendağlı'ya destekleri için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tezimin hücre kültürü ve hayvan deneyleri kısmını gerçekleştirdiğim H.Ü. Kanser Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı'ndan Uzm. Bio. Diğdem Yöyen Ermiş ve Uzm. Bio. Utku Horzum başta olmak üzere, tüm anabilim dalı çalışanlarına bilimsel destekleri, arkadaşlıkları ve güler yüzleri için teşekkürlerimi sunarım.

Anabilim dalımızda yürüttüğüm hücre kültürü çalışmalarında bilimsel yaklaşımı ve tecrübesiyle yol gösteren ve desteğini her zaman hissettiren hocam Sayın Prof. Dr. İmran Vural'a; anabilim dalında ve yurtdışında yürüttüğüm hücre kültürü çalışmalarında bilgi ve tecrübesini paylaşan Dr. Ecz. Can Sarısözen'e teşekkürlerimi sunarım.

LC-MS/MS çalışmaları sürecinde desteklerini esirgemedi yardımcıları sunan Sayın Doç. Dr. Erol Şener ve Sayın Doç. Dr. Emirhan Nemutlu'ya teşekkürlerimi sunarım.

Bilgi ve tecrübeleri ile eğitim sürecim boyunca bana destek olan ve her türlü imkanı sunan başta Prof. Dr. Betül Arıca Yegin ve Doç. Dr. Hakan Eroğlu olmak üzere Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'nın değerli hocalarına teşekkür ederim.

Doktora süreci boyunca desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen Ecz. Nihan İzat, Ecz. (B.U.) Elif Sarıgöl Çalamak, Ecz. Naile Öztürk, Dr. Ecz. Seçil Çaban, Dr. Ecz. Burçin Yavuz, Dr. Ecz. Kıvılcım Öztürk, Dr. Ecz. Yağmur Akdağ Çaylı, Dr. Ecz. Tuğba Gülsün İnal, Ecz. Zeynep Burcu Akkuş, Kim.Simge Dülger'a; Northeastern Üniversitesi'nden sevgili laboratuvar arkadaşlarım Prashant Bhattarai ve Wei Ting Chang'a bilimsel destek ve arkadaşlıkları için teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreçte sevgi ve desteklerini her zaman kalbimde hissettiğim canım annem, babam ve kardeşime sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu uzun yolda en başından beri yanımda olan, bana olan güvenini her zaman hissettiren; iyi günümde, kötü günümde benimle olan eşim Mert Timur'a sonsuz teşekkür ederim.



## ÖZET

**Timur S.S., Meme Kanseri Tedavisinde Aktif Hedeflendirme Amacıyla Kullanılmak Üzere Nano Boyutlu İlaç Taşıyıcı Sistemlerin (Nanofarmasötikler) Tasarımı, İn Vitro/İN Vivo Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Teknoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2017.** Antikanser özellikte etkin maddeler kullanılarak ulaşılması istenen ideal kanser tedavisinde, normal dokular zarar görmeden tümörlü dokunun seçici olarak tanınması amaçlanmaktadır. Kanser hücrelerinin gelişimleri sırasında uğradığı fizyolojik ve morfolojik değişimler sonucunda ortaya çıkan tümöre özgü belirleyici moleküller, bu yapılara özgü ligandlar kullanılarak tanınmaktadır. Bu yönde geliştirilen yaklaşımlardan aktif hedeflendirmede amaç, vücutta bulunan sağlıklı dokuların tedaviden etkilenmesini önlemektir. Lenfatik sistem kanser hücrelerinin metastazında kilit rol oynadığından, kanserde metastazın önlenmesi amacıyla lenfatik hedeflendirme yaklaşımı önem kazanmıştır. Siklik yapıda, 9 aminoasitten oluşan LyP-1 (CGNKRTRGC), Laakkonen ve ark. tarafından 2002 yılında faj sunum tekniğiyle tanımlanan, tümör lenf damarlarına özgü bir peptittir. Bu tez kapsamında; meme kanseri hücreleri yüzeyinde yüksek miktarda bulunan ve LyP-1'e bağlanarak hücre içerisine alınmasını sağlayan p32 reseptörüne, LyP-1 içeren yağ bazlı nanofarmasötikler (kendiliğinden emülsifiye olabilen ilaç taşıyıcı sistemler, SEDDS) ile hedeflendirme yapılmıştır. Ayrıca, peptidin doksorubisin, anti-DTPA antikoru ve floresin ile konjugatları hazırlanmıştır. Hazırlanan tüm formülasyonların karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. SEDDS formülasyonlarının (sıvı ve katı) in vitro değerlendirilmesi için Caco-2, MDA-MB-231 ve 4T1 hücre hatları kullanılmış; elde edilen sonuçlar doğrultusunda 4T1 fare meme kanseri modelinde in vivo etkililik çalışmaları yürütülmüştür. Bu tezin sonunda, peptit yapılı LyP-1'in parenteral ve oral yoldan uygulanabilecek SEDDS formülasyonları geliştirilerek, lenfatik hedeflendirme ile meme kanseri tedavisindeki potansiyeli gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Meme kanseri tedavisi, LyP-1, Lipid bazlı nanofarmasötikler, Lenfatik hedeflendirme.

Bu tez, TÜBİTAK SBAG 1002(Proje Numarası: 113S569), TÜBİTAK 2214/A, HÜBAB Hızlı Destek (Proje Numarası: THD-2017-11642) ve HÜBAB Lisansüstü Tez Desteği Projesi (Proje Numarası: TDK-2017-15964) kapsamında desteklenmiştir.

## ABSTRACT

**Timur S.S., Design and In Vitro/In Vivo Evaluation of Nanosized Drug Delivery Systems (Nanopharmaceuticals) for Active Targeting in Breast Cancer Therapy, Hacettepe University Institute of Health Sciences, Ph.D. Thesis in Pharmaceutical Technology, Ankara, 2017, Ankara.** The aim of an ideal therapy using anticancer molecules is to target tumors selectively without damaging healthy tissues. Tumor specific markers formed by the physiological and morphological changes during the growth of cancer cells are identified by the help of specific ligands. The aim of active targeting, which is developed in this direction, is to protect the normal tissues from the therapy. The lymphatic system plays a critical role in the metastasis of cancer cells, thus lymphatic targeting approach has gained importance for the prevention of cancer metastasis. Laakkonen et al. have identified a cyclic 9-amino-acid (CGNKRTRGC) peptide called LyP-1, which specifically binds to tumor lymphatic vessels using phage-displayed peptide libraries in 2002. Within the scope of this thesis, LyP-1 containing lipid-based nanopharmaceuticals (self emulsifying drug delivery systems, SEDDS) were targeted to p32, which is found in high amounts on the surface of breast cancer cells and to which LyP-1 binds and is internalized. Furthermore, the conjugates of the peptide were prepared with doxorubicin hydrochloride, anti-DTPA antibody and fluorescein. The characterization studies were carried out for all prepared formulations. Caco-2, MDA-MB-231 and 4T1 cell lines were used for in vitro evaluation of SEDDS formulations (liquid and solid), as well as in vivo efficacy studies were performed in 4T1 mouse breast cancer model in accordance with the results obtained from in vitro studies. At the end of this thesis, SEDDS formulations of LyP-1 for parenteral and oral use were developed and their potential for the treatment of breast cancer by lymphatic targeting were shown.

**Keywords:** Breast cancer therapy, Cyclic LyP-1, Lipid-based nanopharmaceuticals, Lymphatic targeting.

**İÇİNDEKİLER**

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN SAYFASI	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xiv
ŞEKİLLER	xvi
TABLolar	xxi
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>3</b>
2.1. Kanser ve Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar	3
2.2. Kanser Tedavisinde Tümöre Hedeflendirme	4
2.2.1. Tümöre Hedeflendirilmiş Peptitler	8
2.2.2. LyP-1 ve Aktif Hedeflendirme	10
2.3. Lenfatik Sistem ve Kanserdeki Rolü	17
2.3.1. Kanser Tedavisinde Lenfatik Hedeflendirme Yaklaşımları	18
2.4. Nano Boyutlu İlaç Taşıyıcı Sistemler ve Kanser Tedavisindeki Yeri	20
2.5. Peptit Konjugatları	22
2.5.1. Peptit – İlaç Konjugatları	23
2.6. Antikor Konjugatları	25
2.6.1. Bispesifik Hedeflendirme	27
2.7. Yağ Bazlı İlaç Taşıyıcı Sistemler	28
2.7.1. Kendiliğinden Emülsifiye Olabilen İlaç Taşıyıcı Sistemler (SEDDS)	31
2.7.2. SEDDS Oluşum Mekanizmaları	33
2.7.3. SEDDS Türleri	34
2.8. SEDDS Formülasyonlarının Hazırlanması ve Hazırlamada Kullanılan Yardımcı Maddeler	36



2.8.1. Yağlar	36
2.8.2. Yüzey Etkin Maddeler / Yardımcı Yüzey Etkin Maddeler	38
2.8.3. Yardımcı Çözücüler	40
2.9. SEDDS Formülasyonlarında Güncel Yaklaşımlar	41
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>47</b>
3.1. Kullanılan Kimyasal Madde, Malzeme ve Aletler	47
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler	47
3.1.2. Kullanılan Aletler	48
3.2. Önformülasyon Çalışmaları	50
3.2.1. Yardımcı Maddelerin Seçimi	50
3.2.2. Üçgen Faz Diyagramları	50
3.2.3. Sıvı Formülasyonların Hazırlanması	55
3.2.4. Katı Formülasyonların Hazırlanması	56
3.3. Formülasyon Optimizasyonu ve Karakterizasyonu	59
3.3.1. Makroskobik Özellikler	59
3.3.2. Mikroskobik Özellikler	59
3.3.3. Damlacık Büyüklüğü ve Zeta Potansiyel Tayini	59
3.3.4. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi	60
3.4. Konjugasyon Çalışmaları	60
3.4.1. Peptit – İlaç Konjugatlarının Hazırlanması	60
3.4.2. Polimer – İlaç Konjugatlarının Hazırlanması	61
3.4.3. Bispesifik Konjugatların Hazırlanması	63
3.5. Konjugatların Karakterizasyonu	66
3.5.1. D-PGA Konjugatlarının Tayini için ELISA Testi	66
3.5.2. Modifiye Edilmiş anti-DTPA'nın İmmunoreaktivite Tayini	66
3.5.3. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)	67
3.5.4. Floresan Aktive Hücre Ayırma ( <i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> , FACS) Analizi	67
3.5.5. <i>In – Cell</i> ELISA	68
3.5.6. İmmünohistokimya Çalışmaları	68
3.6. Etkin Madde Miktar Tayin Yöntemi Geliştirilmesi ve Validasyonu	69

3.6.1.	HPLC Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu	69
3.6.2.	LC-MS/MS Yönteminin Geliştirilmesi	73
3.7.	Stabilite Çalışmaları	74
3.7.1.	Etkin Maddenin Stabilitesi	74
3.7.2.	Formülasyonların Stabilitesi	77
3.8.	Dissolüsyon Çalışması	77
3.9.	Hücre Kültürü Çalışmaları	78
3.9.1.	Formülasyonlara Ait Çalışmalar	79
3.9.2.	Konjugatlara Ait Çalışmalar	83
3.9.3.	Western Blot Analizi	84
3.9.4.	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	86
3.10.	İn Vivo Etkililik Çalışmaları	89
3.10.1.	Tümör Modeline Karar Verilmesi	90
3.11.	İn Vivo Biyodağılım Çalışması	91
3.12.	Bulguların İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	92
<b>4.</b>	<b>BULGULAR</b>	<b>93</b>
4.1.	Önformülasyon Çalışmaları	93
4.1.1.	Makroskobik Özellikler	93
4.1.2.	Mikroskobik Özellikler	94
4.1.3.	Damlacık Büyüklüğü ve Zeta Potansiyel Tayini	94
4.2.	Formülasyon Çalışmaları	97
4.2.1.	Üçgen Faz Diyagramları	97
4.3.	Formülasyonların Karakterizasyonu	99
4.3.1.	Makroskobik Özellikler	99
4.3.2.	Mikroskobik Özellikler	99
4.3.3.	Damlacık Büyüklüğü ve Zeta Potansiyel Tayini	99
4.3.4.	Katı Formülasyonların Karakterizasyonu	100
4.3.5.	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi	104
4.4.	Konjugasyon Çalışmaları	105
4.4.1.	Peptit – İlaç Konjugatlarının Hazırlanması	105
4.4.2.	Polimer – İlaç Konjugatlarının Hazırlanması	106
4.5.	Konjugatların Karakterizasyonu	108

4.5.1.	D-PGA Konjugatlarının Tayini için ELISA Testi	108
4.5.2.	Modifiye Edilmiş anti-DTPA'nın İmmunoreaktivite Tayini	109
4.5.3.	Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)	110
4.5.4.	Floresan Aktive Hücre Ayırma ( <i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> , FACS) Analizi	112
4.5.5.	<i>In – Cell</i> ELISA	112
4.5.6.	İmmünohistokimya Çalışmaları	114
4.6.	Etkin Madde Miktar Tayin Yöntemi Geliştirilmesi ve Validasyonu	119
4.6.1.	HPLC Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu	119
4.6.2.	LC-MS/MS Yönteminin Geliştirilmesi	123
4.7.	Stabilite Çalışmaları	125
4.7.1.	Etkin Maddenin Stabilitesi	125
4.7.2.	Formülasyonların Stabilitesi	131
4.8.	Dissolüsyon Çalışması	132
4.9.	Hücre Kültürü Çalışmaları	134
4.9.1.	Formülasyonlara Ait Çalışmalar	134
4.9.2.	Konjugatlara Ait Çalışmalar	155
4.9.3.	Western Blot Analizi	156
4.9.4.	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	157
4.10.	İn Vivo Etkililik Çalışmaları	158
4.11.	İn Vivo Biyodağılım Çalışması	163
<b>5.</b>	<b>TARTIŞMA</b>	<b>171</b>
5.1.	Önformülasyon Çalışmaları	171
5.1.1.	Makroskobik Özellikler	171
5.1.2.	Mikroskobik Özellikler	172
5.1.3.	Damlacık Büyüklüğü ve Zeta Potansiyel Tayini	172
5.2.	Formülasyon Çalışmaları	173
5.2.1.	Üçgen Faz Diyagramları	173
5.3.	Formülasyonların Karakterizasyonu	174
5.3.1.	Katı Formülasyonların Karakterizasyonu	175
5.3.2.	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi	176



5.4. Konjugasyon Çalışmaları	177
5.4.1. Peptit – İlaç Konjugatlarının Hazırlanması	177
5.4.2. Polimer – İlaç Konjugatlarının Hazırlanması	179
5.5. Konjugatların Karakterizasyonu	180
5.5.1. D-PGA Konjugatlarının Tayini için ELISA Testi	180
5.5.2. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)	179
5.5.3. Floresan Aktive Hücre Ayırma ( <i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> , FACS)	181
5.5.4. <i>In – Cell</i> ELISA	181
5.5.5. İmmünohistokimya Çalışmaları	182
5.6. Etkin Madde Miktar Tayin Yöntemi Geliştirilmesi ve Validasyonu	184
5.6.1. HPLC Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu	184
5.6.2. LC-MS/MS Yönteminin Geliştirilmesi	185
5.7. Stabilite Çalışmaları	185
5.8. Dissolüsyon Çalışması	187
5.9. Hücre Kültürü Çalışmaları	188
5.9.1. Formülasyonlara Ait Çalışmalar	188
5.9.2. Konjugatlara Ait Çalışmalar	193
5.9.3. Western Blot Analizi	194
5.9.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	195
5.10. İn Vivo Etkinlik Çalışmaları	196
5.11. İn Vivo Biyodağılım Çalışması	198
<b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	200
<b>7. KAYNAKLAR</b>	202
<b>8. EKLER</b>	222
<b>EK-1:</b> Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni	
<b>EK-2:</b> Tez Çalışması ile İlgili Bildiriler ve Yayınlar	
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>	228

## SİMGELER VE KISALTMALAR

BCA	Bikinkoninik asit protein tayin yöntemi
bp	Baz çifti
BSA	Bovin serum albümini
CendR	C-ucu kuralı - <i>C-end rule</i>
CPP	Hürelere penetre olabilen peptitler- <i>Cell Penetrating Peptides</i>
D-PGA	DTPA-Poliglutamik asit konjugatı
D-PGA-Doks	DTPA-Poliglutamik asit-doksorubisin konjugatı
D.B.	Damlacık büyüklüğü
Da	Dalton
DEPC	Dietil pirokarbonat
DMF	Dimetil formamid
DMSO	Dimetil sülfoksit
Doks	Doksorubisin hidroklorür
DPL	DTPA-Polilizin konjugatı
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetri
DSPL-Doks	Süksinillenmiş DTPA-polilizin-doksorubisin konjugatı
DSPL-RITC	Süksinillenmiş DTPA- polilizin- RITC konjugatı
DTPA	Dietilen triamin penta asetik asit
EDC	1-etil-3-(3- dimetilaminopropil) karbodiimid
EDTA	Etilen diamino tetraasetik asit
ELISA	Enzim İlintili İmmün Test - <i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i>
EMA	Avrupa İlaç Ajansı
FACS	Floresan aktive hücre ayırma
FAM	Floresin amidit
FBS	Fetal dana serumu
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
GAM	<i>Goat anti mouse</i>

HLB	Hidrofilik – lipofilik denge
HRP	<i>Horse radish</i> peroksidaz
$k_{obs}$	Parçalanma hız sabiti
LC-MS	Sıvı kromatografisi-Kütle spektrometresi
LyP-1- bsAbC	Lyp-1 bispesifik antikor-ligand kompleksi
MTT	3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolyum bromür
NHS-Floresin	5/6 – karboksifloresin süksinimid esteri
OD	Optik yoğunluk
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PDİ	Polidispersite indeksi
PEG	Polietilen glikol
PGA	Poliglutamik asit
PL	Poli-L-lizin
PLGA	Poli (laktik-ko-glikolik asit)
PVDF	Polivinilidin florür
$R_f$	Bağlı göç
RITC	Rodamin B izotiyosiyanat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi
SEDDS	Kendiliğinden emülsifiye olabilen sistemler
SF	Serum fizyolojik
SMEDDS	Kendiliğinden mikroemülsifiye olabilen sistemler
SNEDDS	Kendiliğinden nanoemülsifiye olabilen sistemler
SS	Standart sapma
TEER	Transepitel elektrik direnci
TFA	Trifloroasetik asit
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidin
TNBS	Trinitro benzen sülfonik asit
TPGS	D – $\alpha$ – tokoferil polietilen glikol 1000 süksinat
VK	Varyasyon katsayısı



## ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
2.1.	Üçgen faz diyagramı.	33
3.1.	Sıvı formülasyonların hazırlanmasında kullanılan üçgen faz diyagramı ve formülasyon noktaları.	55
3.2.	a. D-PGA-Doks sentezinin şematik gösterimi b. Bispesifik LyP-1-anti-DTPA antikör kompleksi (LyP-1-bsAbC) sentezinin şematik gösterimi c. LyP-1-Doks sentezinin şematik gösterimi.	65
3.3.	Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan Caco-2 hücre hattı.	79
3.4.	Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan MDA-MB-231 hücre hattı.	80
4.1.	A. U8 B. U9 C. U11 D. U12 formül kodlu üçgen faz diyagramları.	98
4.2.	A. Yardımcı maddeler ve boş sıvı formülasyona ait DSC termogramı B. Püskürterek kurutma ile elde edilmiş katı formülasyonlara ait DSC termogramı C. Liyofilizasyon ile elde edilmiş katı formülasyonlara ait DSC termogramı.	104
4.3.	LyP-1-Doks'un elüsyon profili (Sephadex G10 kolon).	106
4.4.	D-PGA-Doks'un elüsyon profili (Sephadex G25 kolon).	107
4.5.	DSPL-Doks'un elüsyon profili (Sephadex G25 kolon).	107
4.6.	Doksorubisin HCl'e ait kalibrasyon doğrusu.	108
4.7.	A. D-PGA, B. D-PGA-Doks, C. DSPL-Doks'un immunoreaktivitesi.	109
4.8.	LyP-1-bsAbC sentezinde kullanılan anti-DTPA'nın immunoreaktivitesi	109
4.9.	Poliakrilamid jel görüntüsü A. Protein molekül ağırlığı standardı B. Modifiye edilmemiş antikör C. Modifiye edilmiş antikör D. LyP-1-bsAbC'e ait bant.	110
4.10.	Molekül ağırlıkları ile R <sub>f</sub> değerleri arasındaki ilişki.	111
4.11.	Farklı seri LyP-1-bsAbC'lerine ait immunoreaktivite sonuçları.	113

<b>4.12.</b>	LyP-1-bsAbC'e ait immunoreaktivite sonuçları (perm=geçirgenliği artırılmış MDA-MB-231 hücrelerinde).	114
<b>4.13.</b>	I. Tek başına floresin II. Linear LyP-1-Floresin konjugatı III. Siklik LyP-1-Floresin konjugatı uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerine ait mikroskop görüntüleri (40x) A. Işık mikroskobu, B. DAPI çekirdek boyası, C. Yeşil floresan.	115
<b>4.14.</b>	LyP-1-Floresin ve DAPI ile muamele edilmiş MDA-MB-231 hücrelerine ait birleştirilmiş floresan mikroskop görüntüleri. A. 30 dk., B. 1sa., C. 3sa., D. 6sa., E. 24 sa.	116
<b>4.15.</b>	İki basamakta uygulanan bispesifik hedeflendirmeye ait floresan mikroskop görüntüleri I. DSPL-RITC (kontrol, 1 sa.) II. LyP-1-bsAbC (30 dk.) + DSPL-RITC (1 sa.) III. LyP-1- bsAbC (3 sa.) + DSPL-RITC (1 sa.) uygulama. A. Işık mikroskobu, B. DAPI çekirdek boyası, C. Kırmızı floresan.	118
<b>4.16.</b>	İki basamaklı bispesifik kompleks uygulaması sonrası MDA-MB-231 hücrelerinde gösterilen Düzeltilmiş Total Hücre Floresanı değerleri.	119
<b>4.17.</b>	LyP-1'in gradyan elüsyon ile elde edilen HPLC kalibrasyon doğrusu (n=6).	120
<b>4.18.</b>	LyP-1'in gradyan elüsyon ile elde edilen HPLC kromatogramları (n=6).	120
<b>4.19.</b>	LyP-1, boş formülasyon ve yardımcı maddelere ait kromatogramlar; a. LyP-1 SEDDS, b. LyP-1, c. SEDDS, d. Peceol, e. Propilen glikol, f. TPGS, g. Labrasol	123
<b>4.20.</b>	LyP-1'e ait LC-MS/MS kalibrasyon doğrusu pikleri.	124
<b>4.21.</b>	LyP-1'e ait LC-MS/MS kalibrasyon doğrusu (n = 6).	124
<b>4.22.</b>	LyP-1'e ait kütle spektrumu pikleri.	125
<b>4.23.</b>	pH 1, pH 2, pH 11 ve pH 12'ye ait log % C – zaman grafikleri.	127
<b>4.24.</b>	pH 3 – 10'a ait konsantrasyon (M)– $k_{obs}$ (sa <sup>-1</sup> ) grafikleri.	128
<b>4.25.</b>	LyP-1'e ait pH-hız profili.	129
<b>4.26.</b>	pH 3, 6 ve 8 tamponları için oluşturulan Arrhenius doğruları.	130
<b>4.27.</b>	Sıvı formülasyonların Caco-2 hücre canlılığı üzerine etkileri	136

	(1:200-1:64000 dilüsyon, 24 saat) (n=4).	
<b>4.28.</b>	Katı boş formülasyonların Caco-2 hücre canlılığı üzerine etkileri (n=6).	138
<b>4.29.</b>	U9-F21 kodlu katı formülasyonların Caco-2 hücre canlılığı üzerine etkileri (n=4).	139
<b>4.30.</b>	Katı formülasyonların MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerine etkileri (n=4).	140
<b>4.31.</b>	U9-F21 kodlu katı formülasyonların MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerine etkileri (n=4).	141
<b>4.32.</b>	Meme kanseri hücre hatlarında Doks konsantrasyonu değişimlerinin % hücre canlılığına etkisi (serumsuz ortam). <b>A.</b> MDA-MB-231 <b>B.</b> 4T1 hücre hattı.	142
<b>4.33.</b>	Meme kanseri hücre hatlarında LyP-1 konsantrasyonu değişimlerinin % hücre canlılığına etkisi (serumsuz ortam). <b>A.</b> MDA-MB-231 <b>B.</b> 4T1 hücre hattı.	144
<b>4.34.</b>	Doksorubisin ve LyP-1 kombine tedavisinin meme kanseri hücre canlılıkları üzerine etkisi (serumsuz ortam). <b>A.</b> MDA-MB-231 <b>B.</b> 4T1 hücre hattı.	146
<b>4.35.</b>	Boş formülasyonların meme kanseri hücre hatları üzerine etkisi (serumsuz ortam). <b>A.</b> MDA-MB-231 <b>B.</b> 4T1 hücre hattı.	148
<b>4.36.</b>	Formülasyon içerisinde Doksorubisin ve LyP-1 kombine tedavisinin meme kanseri hücre canlılıkları üzerine etkisi (serumsuz ortam). <b>A.</b> MDA-MB-231 <b>B.</b> 4T1 hücre hattı.	150
<b>4.37.</b>	LyP-1 içeren formülasyonların Caco-2'den geçiş çalışmalarına ait grafik (n=5).	152
<b>4.38.</b>	LyP-1-FAM'ın 4T1 hücreleri tarafından alımı.	153
<b>4.39.</b>	LyP-1-FAM çözelti ve SEDDS formülasyonlarının <b>A.</b> 1. saat ve <b>B.</b> 5. saatte hücre yüzeyinde tutunan ve hücre içine giren ortalama miktarları.	154
<b>4.40.</b>	MDA-MB-231 hücre hattında Doks çözeltisi ve LyP-1-Doks konjugatı uygulaması sonrası % hücre ölümü.	156
<b>4.41.</b>	<b>A.</b> p32 proteini <b>B.</b> $\beta$ -aktin'in 4T1 ve MDA-MB-231 hücre hattı	157

- ve 4T1 tümör dokusunda ekspresyonu, 1. kuyucuk protein molekül ağırlığı standardı 2. ve 3. kuyucuk 4T1 hücre hattı, 4. ve 5. kuyucuk 4T1 tümör dokusu, 6. ve 7. kuyucuk MDA-MB-231 hücre hattı.
- 4.42.** PCR sonrası yürütülen %2'lik agaroz jelde gözlenen **A.** p32 **B.** 158  
β-aktin ürünlerine ait bantlar. **1.** DNA standardı **2.** 4T1 hücre  
**3.** 4T1 tümör **4.** negatif kontrol **5.** pozitif kontrol.
- 4.43.** Tedavi sonrası sakrifiye edilen farelerden elde edilen tümör 159  
dokuları **1.** kontrol grubu, **2.** Boş SEDDS, **3.** LyP-1 çözeltisi,  
**4.** LyP-1 SEDDS, **5.** Doks çözeltisi, **6.** Doks SEDDS, **7.** LyP-  
1+Doks kombine tedavisi, **8.** LyP-1+Doks SEDDS kombine  
tedavisi.
- 4.44.** Zamana bağlı olarak farklı tedavi gruplarında tümör 160  
çaplarında görülen % değişim.
- 4.45.** Çözelti ve formülasyon içerisinde verilen tedavilere ait tümör 161  
çaplarında görülen % değişim.
- 4.46.** **A.** Meme tümör dokusu (100 X) **B.** meme tümördokusu 162  
(400 X) **C.** kas dokusu (400 X) **D.** yağ dokusu histopatolojik  
görüntüsü (400 X).
- 4.47.** Tedavi süresince hayvan ağırlıklarında meydana gelen % 163  
değişim.
- 4.48.** Biyodağılım çalışması sonrası sakrifiye edilen hayvanlara ait 164  
dokuların UV görüntüleri. **1.** karaciğer, **2.** dalak, **3.** meme lenf  
nodu, **4.** mezenterik lenf nodu, **5.** tümör, **a.** kontrol grubu, **b.**  
sağlıklı fare, LyP-1-FAM çözeltisi uygulaması, **c.** tümörlü fare,  
LyP-1-FAM çözeltisi uygulaması, **d.** sağlıklı fare, LyP-1-FAM  
SEDDS uygulaması, **e.** tümörlü fare, LyP-1-FAM SEDDS  
uygulaması.
- 4.49.** **A.** LyP-1-FAM çözeltisi ve **B.** LyP-1-FAM SEDDS şeklinde 165  
uygulanan floresan işaretli peptidin tümörlü farede  
biyodağılımı.
- 4.50.** **A.** LyP-1-FAM çözeltisi ve **B.** LyP-1-FAM SEDDS'in organlarda 167

- dağılımı.
- 4.51.** Tümör dokusunda LyP-1-FAM çözeltisi (boş) ve LyP-1-FAM SEDDS formülasyonu(dolu) uygulaması sonucu elde edilen akış sitometrisi histogram grafiği. 169
- 4.52.** Peritoneal lavaj örneğinde LyP-1-FAM SEDDS formülasyonu uygulaması sonucu total immün hücre (boş) ve makrofajlara (dolu) girişi gösteren akış sitometrisi histogram grafiği. 169
- 4.53.** Mezenterik lenf nodunda LyP-1-FAM çözeltisi (boş) ve LyP-1-FAM SEDDS formülasyonu(dolu) uygulaması sonucu elde edilen akış sitometrisi histogram grafiği. 170
- 4.54.** Periferik kanda LyP-1-FAM çözeltisi (boş) ve LyP-1-FAM SEDDS formülasyonu (dolu) uygulaması sonucu elde edilen akış sitometrisi histogram grafiği. 170

## TABLOLAR

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa</b>
2.1. Yağ bazlı formülasyonların sınıflandırılması.	29
2.2. Yağ bazlı formülasyon bileşenleri.	30
2.3. Piyasada bulunan oral yağ bazlı kendiliğinden emülsifiye olabilen preparatlara örnekler.	42
3.1. Önformülasyon çalışmalarında kullanılan formülasyonlara ait bileşenler.	51
3.2. Önformülasyon çalışmaları kapsamında kullanılan üçgen faz diyagramlarına ait bileşenler.	54
3.3. Liyofilizasyon için kullanılan yardımcı maddeler ve kullanım oranları.	57
3.4. Püskürterek kurutma işlemine ait koşullar.	57
3.5. Tablet formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan yardımcı maddeler.	58
3.6. Etkin maddeye ait stabilite çalışmalarında kullanılan tamponlar.	75
3.7. Dissolüsyon çalışmaları kapsamında kullanılan formülasyonlar.	77
4.1. Formülasyon çalışmaları için seçilen üçgenlere ait bileşenler.	93
4.2. Stabil formülasyonlara ait damlacık büyüklüğü sonuçları.	95
4.3. Seçilen sıvı formülasyon noktalarına ait bileşenler.	97
4.4. Seçilen sıvı formülasyonlara ait damlacık büyüklüğü ve zeta potansiyel değerleri (n=3).	100
4.5. Katı formülasyonlara ait karakterizasyon çalışmaları.	101
4.6. Direkt basım tablet formülasyonu için seçilen formülasyonlara ait yardımcı maddeler ve kullanım oranları.	103
4.7. Formülasyonlara ait toz ve tablet kontrolleri değerleri.	103
4.8. Formülasyon ve yardımcı maddelere ait DSC termogramı analizi.	105
4.9. Analizi yapılan örneklerle ait $R_f$ değerleri ve molekül	111

	ağırlıkları.	
<b>4.10.</b>	LyP-1 konjugatlarına ait akış sitometrisi sonuçları (MDA-MB-231 hücre hattı).	112
<b>4.11.</b>	LyP-1-Floresin'e ait görüntüleme sitometrisi sonuçları (MDA-MB-231 hücre hattı).	117
<b>4.12.</b>	LyP-1'e ait doğruluk değerleri (n=3).	121
<b>4.13.</b>	LyP-1'e ait tekrarlanabilirlik değerleri (n=6).	121
<b>4.14.</b>	LyP-1'e ait tekrar elde edilebilirlik değerleri (n=6).	122
<b>4.15.</b>	LyP-1'e ait duyarlılık değerleri.	123
<b>4.16.</b>	Etkin maddeye ait $k_{obs}$ ve $t_{1/2}$ değerleri.	125
<b>4.17.</b>	pH 3 – 10'a ait $k_0$ ve $t_{1/2}$ değerleri	129
<b>4.18.</b>	pH 3, 6 ve 8 tamponlarında gerçekleştirilen kinetik çalışmalar sonucu elde edilen $k_0$ ve $E_a$ değerleri.	131
<b>4.19.</b>	Seçilen boş formülasyonlara ait stabilite çalışması (n=3).	132
<b>4.20.</b>	Dissolüsyon çalışmalarında kullanılan formülasyonlara ait etkin madde çözünme değerleri.	133
<b>4.21.</b>	LyP-1 içeren formülasyonlara ait Caco-2'den geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen görünür permeabilite katsayıları, $P_{app}$ (cm/s).	151



## 1. GİRİŞ

Kanser tedavisinde uygulanan cerrahi yöntemler, radyoterapi ve kemoterapi uygulamalarının ortak problemi; sunulan etkin tedavinin beraberinde sağlıklı dokularda görülen olumsuz etkilerdir. Bu sakıncaların azaltılmasına yönelik olarak yürütülen güncel çalışmaların temelini, aktif/pasif hedeflendirme ile etki yerinde seçici ve etkili tedavinin sağlanması oluşturmaktadır. Hedeflendirme yaklaşımları, kanser hücrelerinin gelişimi sırasında uğradığı fizyolojik ve morfolojik değişimler sonucunda ortaya çıkan moleküller üzerine kurulmaktadır. Tümöre özgü bu belirleyici moleküllerin, söz konusu yapılara özgü ligandlar kullanılarak tanınması; hem az miktarda etkin madde kullanılarak terapötik etkililik elde edilmesine, hem de sağlıklı dokuların tedaviden olumsuz etkilenme riskinin azaltılmasına olanak sağlamaktadır.

Lenfatik sisteme geçişin artırılması, son yıllarda suda çözünürlüğü az olan etkin maddelerin biyoyararlanımlarının iyileştirilmesi amacıyla çalışmaların yoğunlaştığı güncel bir alandır. Lipid bazlı sistemler ile lenfatik alımı artırılmış etkin maddeler, karaciğerde ilk geçiş etkisine uğramadan sistemik dolaşıma geçerek etki göstermektedirler. Lenfatik sistemin tümör gelişimi ve metastazında kilit rol oynadığının keşfedilmesiyle de, kanser tedavisinde lenfatik sistemin hedeflendirilmesi alanında yapılan çalışmalar hız kazanmıştır.

Bu tez kapsamında yürütülen çalışmalarda; etkinliği önceden kanıtlanmış, tümörlü dokuya özgü, aynı zamanda tek başına apoptozu indükleyici özelliğe sahip olan LyP-1 peptidinin lenfatik hedeflendirme özelliği temel alınmıştır. Tümör hücreleri, tümör bağıntılı makrofajlar ve tümör lenf damarları yüzeyinde fazla miktarda ifade edilen p32 reseptörüne (1) özgü bir peptit olan LyP-1, lenfatik alımı

artırılmış lipid bazlı sistemler aracılığıyla tümör dokusuna hedeflendirilmiştir. LyP-1'in özgün olarak bağlandığı reseptör olan p32'nin, normal hücrelerde mitokondride yer aldığı ve bu sebeple peptidin bağlanmasına elverişli olmadığı, ancak tümörlü hücrelerde yüksek miktarlarda üretilip tümör makrofajları ve tümör lenfatiklerinin luminal duvarlarındaki hücrelerin yüzeyinde bulunduğu bildirilmektedir (2, 3).

Reseptör – ligand etkileşimiyle seçici etki gösteren LyP-1 kullanılarak hazırlanan yağ bazlı taşıyıcı sistemlerin (kendiliğinden emülsifiye olabilen sistemler, SEDDS) lipid özellikleri sayesinde, lenfatik absorpsiyonun artırılarak kanda kalış süresinin uzatılması; böylece, peptidin tümörlü dokuya ulaşmasının kolaylaştırılarak tümör gelişiminin durdurulması amaçlanmıştır. Bu doğrultuda tasarlanan parenteral ve oral kullanıma uygun sıvı SEDDS'ler ve bunların uygun tekniklerle hazırlanan katı formları optimize edilmiştir. Ayrıca, peptidin doksorubisin, anti-DTPA antikoru ve floresin ile konjugatları hazırlanarak karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sıvı formülasyonların etkililik ve güvenlilikleri in vitro ve in vivo çalışmalarla incelenerek, LyP-1'in meme kanseri tedavisindeki potansiyeli tek başına ve antikanser etkili doksorubisin hidroklorür ile birlikte kullanılarak değerlendirilmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kanser ve Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar

Kanser temelde, hücrelerin normal olmayan bir şekilde kontrolsüz bölünmesi ve vücuda dağılması olarak tanımlanmakta olup; ülkemizde ve dünyada en yaygın ölüm nedenleri arasında kalp – damar hastalıklarından sonra ikinci sırada yer almaktadır (4, 5).

Dünya Sağlık Örgütü tarafından yapılan çalışma sonucunda elde edilen verilere göre 2012 yılı itibariyle dünya çapında 14,1 milyon yeni kanser vakası; 8,2 milyon kansere bağlı ölüm ve kanser teşhisiyle yaşayan 32,6 milyon vaka tespit edilmiştir. Kansere bağlı ölümlerin sayısı 2015 yılında ise dünya çapında 8,8 milyona yükselmiştir (6). 2014 yılı verilerine göre Türkiye’de de toplam 163 bin 417 kişiye yeni kanser teşhis konulmuştur (7).

Amerikan Kanser Derneği (*American Cancer Society*) tarafından 2017 yılı için yayımlanan istatistiklere göre, Amerika Birleşik Devletleri’nde 2017 yılı içerisinde yaklaşık 1,7 milyon yeni kanser vakasının teşhis edileceği öngörülmektedir (4). Dünya Sağlık Örgütü 2015 yılı verilerine göre ise, dünya çapında kanserin getirdiği ekonomik yük yıllık 1,16 trilyon dolar olarak belirlenmiştir. Kanser teşhis ve tedavisine ait harcamaların yıllar içerisinde hızla artması kritik tabloyu gözler önüne sermektedir (6).

En yaygın kanser türleri akciğer kanseri, kolorektal kanser, meme kanseri ve prostat kanseri olarak bildirilmektedir. Meme kanseri ise, kadınlar arasında en yaygın görülen kanser türü olarak ilk sırayı almaktadır (4, 8). 2017 yılı için Amerika Birleşik Devletleri’nde teşhis edilmesi öngörülen yeni meme kanseri vakası sayısı yaklaşık 255 bin olup, bu rakamın yaklaşık 252 bini kadınlarda görülecek olan

vakaları temsil etmektedir. Türkiye’de de kanser teşhisi konulan her 4 kadından biri meme kanserine yakalanmakta olup, yeni vaka sayısı 2014 yılı için 17 bin civarındadır (7). Söz konusu olumsuz tabloya rağmen, Amerika Birleşik Devletleri’nde, meme kanserine ait 5 yıllık sağ kalım oranlarının 1975-2012 yılları arasında % 75’ten % 91’e kadar çıkması, erken tanı ve tedavinin önemini vurgulamaktadır (4).

Geleneksel meme kanseri tedavisi, cerrahi müdahale başta olmak üzere, kemoterapi, radyoterapi ve immunoterapi seçeneklerinden oluşmaktadır (9). Meme kanseri tedavisinde kullanılan küçük yapıli antikanser moleküller antimitotikler (paklitaksel, dozetaksel, vinorelbin), siklofosamid, antimetabolitler (5-florourasil, kapesitabin, gemitabin), antrasiklinler (doksorubisin, epirubisin) ve platinyum bileşikleri (sisplatin, karboplatin) olarak sınıflandırılmaktadır (10). Söz konusu ilaç grupları tek başına tercih edilebileceği gibi tedavide genellikle kombinasyon şeklinde uygulama söz konusudur.

## **2.2. Kanser Tedavisinde Tümöre Hedeflendirme**

Kanser tedavisinde geleneksel tedavi sürecinin en önemli yan etkisi, vücutta bulunan ve doğaları gereği hızlı bölünmeye uğrayan saç folikülleri, gastrointestinal sistem hücreleri, kemik iliği hücreleri gibi normal hücreler başta olmak üzere, pek çok sağlıklı hücrenin toksik etkilere maruz kalmasıdır (11). Hedeflendirme ile yapılacak tedavinin temeli, kansere karşı sistemik tedavinin etkinliğinin artırılıp toksisitesinin azaltılarak dengenin sağlanmasıdır (12). Hedeflendirilmiş tedavi yöntemleri ile, kanser hücrelerinin daha kolay büyümesi ve yayılması için kazandığı genetik değişiklikler hedef alınmaktadır. Bu genetik adaptasyonların neden olduğu hücresel farklılıklar, hedeflendirmede kullanılan ajanların kanserli dokuda toplanmalarına olanak sağladığından, hedeflendirilmiş tedavide başarı olasılığı

yükselmektedir. Geleneksel tedavi ile hedeflendirilmiş tedavi arasındaki bir diğer fark da kullanılan moleküllerin etki mekanizmaları ile ilgilidir. Çoğu geleneksel kemoterapötik ajan, etki mekanizması tam olarak aydınlatılmadan, sadece hücre bölünmesi ile ilgili yetenekleri nedeniyle tedaviye girmişken, moleküler bazda tasarlanan ve hedeflendirilmiş tedavide kullanılan moleküller, kanserli dokuda keşfedilen hedeflere özgün olarak geliştirilmektedir (13).

Kanser, normal hücrelerin farklılaşarak yeni özellikler kazanmasıyla özetlenebilecek bir tablodur. Kanser hücrelerinin mikroçevresi, vücutta bulunan diğer hücrelerinkinden farklı olup, söz konusu hücrelerin hayatta kalabilmesi için kazanılmış birtakım özelliklerle karakterizedir. Hanahan ve Weinberg, hücre fizyolojisinde gerçekleşen bu değişiklikleri altı başlık altında özetlemiştir (14) :

- i. Hücre bölünmesini tetikleyen sinyalleri kendi başına oluşturabilme,
- ii. Büyümeyi engelleyen sinyallere cevap vermeme,
- iii. Programlanmış hücre ölümünden (apoptoz) kaçma,
- iv. Kromozomların kendini sınırsız kopyalama yeteneği,
- v. Sürekli devam eden yeni damar oluşumu (anjiyogenez)
- vi. Doku invazyonu ve metastaz.

Söz konusu özellikler insan tümör hücrelerinin hemen hepsinde ortak olarak bulunan özellikler olup, zaman içerisinde bu altı özelliğe ek olarak yeni özellikler keşfedilmiştir. Tümör hücreleri, genomlarının stabil olmaması ve buna bağlı oluşan mutasyonlar nedeniyle immün sistemden kaçabilme ve enerji metabolizmasını yeniden programlama özelliklerini de ortak olarak geliştirmektedirler (15).

Tümör hücreleri ve tümör mikroçevresini normal hücrelerden ayıran bu özelliklerin iyi anlaşılması, ilaç moleküllerinin tümör dokusuna hedeflendirilmesi için yol haritası oluşturmaktadır. Tümör hücrelerinin hedeflenmesi doğrudan tümör

hücresi üzerindeki hedeflerin seçilmesi ile gerçekleştirilebileceği gibi tümör dokusu etrafındaki kan damarları veya tümör dokusu içerisinde yer alan stroma hücrelerinin hedef olarak seçilmesiyle de sağlanabilmektedir (16).

Tümör dokusuna yönelik hedeflendirme stratejileri aktif ve pasif hedeflendirme başlıkları altında toplanmaktadır (12). Pasif hedeflendirme stratejisinde temel dayanak, tümör hücrelerinde meydana gelen adaptasyonlar sonucunda oluşan artmış geçirgenlik ve alıkonma etkisidir (*Enhanced Permeability and Retention – EPR*). Artmış geçirgenlik ve alıkoyma etkisi ilk olarak 1986 yılında Matsumura ve Mameda tarafından tanımlanmıştır (17). Tümör hücreleri, hızlı büyüme için gerekli olan besin ve oksijenin sağlanmasını, damar endotelinin geçirgenliğinin artması sayesinde gerçekleştirmektedir. Artmış geçirgenlik, damar endotelinin normal dokuda bulunan endotel yapısına göre daha geniş por açıklığına sahip olmasıdır ve buna bağlı olarak da ilaç molekülleri ve taşıyıcı sistemlerin tümör dokusuna geçişinin artması ile sonuçlanmaktadır (18, 19). Normal damarlanma gösteren dokularda sıkı kavşaklar, 2 nm'den büyük olan partiküllerin endotel hücreleri arasından geçmesine izin vermezken, bu durum tümör damarlanmasında 10 nm ile 2 µm arasında değişmektedir (20-22). Bunun yanı sıra, tümör bölgesinde lenfatik sistemin görevini düzgün şekilde yerine getirememesi ve buna bağlı olarak dokulardan drenajın azalması, pasif hedeflendirilen moleküllerin tümör dokusunda birikmesine neden olmaktadır (23, 24). Pasif hedeflendirme yaklaşımının başarısını etkileyen faktörler; tümör dokusundaki damarlanma, interstisyel sıvının bileşimi, hücrelerarası ortamın bileşimi, nekrotik bölgelerin varlığı, hedeflendirmede kullanılan taşıyıcı sistemin boyutu, şekli, yüzey özellikleri ve yükü olarak özetlenebilir (21).

Aktif hedeflendirme yaklaşımında ise, ilaç molekülleri ve ilaç taşıyıcı sistemler; antikor, antikorun aktif bölgesini içerecek şekilde hazırlanmış antikor kısımları, peptitler gibi büyük yapıli moleküller veya folik asit ve karbonhidratlar gibi küçük moleküllerle tümör hücrelerine özgün olan veya tümör hücrelerinde normal hücrelerdeki miktarlarından daha fazla ifade edilen reseptörler aracılığıyla tümör dokusuna gönderilmektedir (24-26). Bu sayede, normal dokularda gerçekleşecek olan toksik etkiler azaltılmış olup, kemoterapötik maddelerin kanserli dokuda birikerek tüm vücuda dağılmaları engellenmektedir.

Kanserde aktif hedeflendirme kapsamında üzerinde sıklıkla çalışılan reseptörlere örnek olarak transferrin, folat, glukozamin, granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) reseptörü ve vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü (VEGFR) verilebilir (12, 25, 27).

Piyasaya çıkan hedeflendirilmiş kanser tedavisine yönelik ilk ilaç, 1997 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (*Food and Drug Administration – FDA*) tarafından onaylanan monoklonal antikor Rituxan®/Mabthera®'dır. Hodgkin dışı lenfoma ve kronik lenfositik lösemi tedavisinde kullanılmak üzere piyasaya sunulmuştur. Günümüzde kanser tedavisinde klinikte kullanım için onaylı monoklonal antikor sayısı 14 olup; bunlardan sekiz tanesi solid tümör tedavisi, altısı ise hematopoetik kanserlerin tedavisinde endikedir (13).

Aktif hedeflendirme yaklaşımına benzer şekilde, meme kanserinin alt gruplara sınıflandırılmasında da kanserli dokunun sahip olduğu farklı moleküler özellikler esas alınmaktadır. Söz konusu farklılıklar; östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörünün (HER2) varlığı üzerinden değerlendirilmektedir (28). Belirlenen alt gruba göre planlanan tedavilerde, mevcut reseptöre hedeflenen ajanlar kullanılarak tedavinin



etkinliği artırılmaya çalışılmaktadır. Meme kanserinde aktif hedeflendirme için en çok tercih edilen reseptörler; ER (28), folat reseptörü (FR) ve HER2'dir (21).

Meme kanseri tedavisinde klinikte halihazırda kullanılan hedeflendirilmiş tedavi seçenekleri aşağıdaki gibidir (29) :

- HER2 pozitif meme kanseri tedavisi:
  - Trastuzumab (Herceptin®),
  - Pertuzumab (Perjeta®),
  - Ado-trastuzumab emtansin (Kadcyla™),
  - Lapatinib (Tykerb™)
- Hormon reseptör pozitif meme kanseri tedavisi (ER veya PR pozitif):
  - CDK 4/6 (sikline bağımlı kinaz 4/6) inhibitörleri: Palbosiklib (Ibrance®) ve ribosiklib (Kisqali®)
  - Everolimus (Afinitor®)

Piyasada örnekleri bulunan ve klinikte kullanımları devam eden monoklonal antikor ve antikor – ilaç konjugatlarının yanı sıra, alternatif hedeflendirme stratejileri de sıklıkla çalışmalara konu olan alanlar içerisinde yer almaktadır. Bu stratejiler arasında bakteriyofaj görüntüleme tekniklerine ait kütüphanelerin oluşturulmasını sağlayan sentetik biyoloji temelli yaklaşımlarla başlayan gelişmeler; bakteri ve maya hücreleri, antikor, cDNA , mRNA veya peptit kütüphanelerinin kullanımıyla çeşitlilik kazanmıştır (30).

### **2.2.1. Tümöre Hedeflendirilmiş Peptitler**

Peptit yapılı ilaç molekülleri, son yıllarda biyoteknoloji alanında yaşanan gelişmeler, peptit sentezi teknolojisinin ilerlemesi ve buna bağlı olarak zaman ve maliyetlerin azalması sebebiyle artan pazar payına sahiptir (31, 32).

Peptitlerin antikorlar gibi makromoleküllerle karşılaştırıldıklarında sahip oldukları küçük molekül yapıları, üretim ve formülasyon sürecinde avantaj sağlamaktadır. Peptitlere ait sentez protokollerinin zaman içinde standart hale gelmesi, metabolizmalarının önceden tahmin edilebilir olması gibi üstünlükleri piyasaya çıkma sürecinin kısılmasına olanak sağlamıştır (31). Bunun yanı sıra peptit yapılı moleküllerin yüksek seçicilikleri ve etkililikleri de tedavide tercih edilmeleri için öncelik sağlamaktadır.

Hedeflendirilmiş kanser tedavisinde en çok tercih edilen seçeneklerden olan monoklonal antikorların pek çoğu, hücrenin plazma membranından hücre içerisine penetre olamayacak kadar büyük yapıda moleküllerdir. Söz konusu monoklonal antikorlar etkilerini, hücre dışında bulunan reseptörler veya bu reseptörlere bağlanan ligandlar aracılığıyla göstermektedir. Küçük yapılı moleküller ise hücre içerisine girebildiklerinden, hücre içi hedeflere yönlendirme amacıyla da kullanılabilirler (13).

Hücrelere penetre olabilen peptitler (*Cell Penetrating Peptides-CPPs*) iki gruba ayrılmakta olup, bunlar hidrofobik ve katyonik peptitlerdir. CPP'ler arasında en yaygın olarak kullanılan hedeflendirme ajanlarından olan Tat peptidi ve penetratin, katyonik peptitler grubunda yer almaktadır (16). CPP'lerin hücre içerisine girme mekanizmaları taşıdıkları kargo moleküle göre değişiklik gösterdiğinden genel bir mekanizma üzerinde karara varılamasa da ortak olarak paylaşılan nokta, CPP'ler ile hücre membranı arasındaki ilk etkileşimin elektrostatik bir karakteri olduğudur (33).

Tümöre hedeflenen peptitler, tümör dokusunda ilaç konsantrasyonunu artırmanın yanı sıra tümör dokusunda ilaç dağılımını da değiştirdiklerinden, ilaç direnci olduğu durumlarda da alternatif bir tedavi sağlamaktadırlar. Tümör

dokusunun iç kısmında kalan ve nekrotik bir çekirdek oluşturan hücelere giden ilaç konsantrasyonunun artmasıyla, gözlenen ilaç direncinde azalma sağlanabilmektedir (34, 35).

### **2.2.2. LyP-1 ve Aktif Hedeflendirme**

LyP-1, peptidi Laakkonen ve ark. tarafından 2002 yılında ex vivo/in vivo faj sunum tekniği ile keşfedilmiş, 9 aminoasitten oluşan siklik yapıda bir peptittir (36). LyP-1, belirli tümörler ve bu tümörlerin lenf damarlarına ait endotel hücelere özgün olarak bağlanmaktadır. Floresan işaretli LyP-1 peptidinin, MDA-MB-435 meme kanseri ksenograflı farelere enjekte edildiğinde, lenfatik işaretleme molekülleri ile benzer bir dağılıma sahip olduğu ve tümör çevresindeki lenf damarlarında toplandığı gösterilmiştir. Peptidin toplandığı bölgeler aynı zamanda tümör yapısındaki hipoksik bölgelerle çakışmaktadır (36, 37). Bu durum, LyP-1'in tümör lenf damarlarına özgün olarak bağlandığını göstermekte ve hedeflendirme ajanı olarak kullanılabilir önemli bir özelliğini kanıtlamaktadır.

Hedeflendirme özelliğinin yanı sıra LyP-1, meme kanseri hücre hattında antitümör etki göstermektedir. MDA-MB-435 meme kanseri hücre hattında yapılan toksisite çalışması sonunda LyP-1'in bağlandığı ve içeri alındığı hücrelerde konsantrasyona bağlı olarak hücre ölümüne neden olduğu tespit edilmiştir. MDA-MB-435 hücre hattına ait ksenograflı farelerde LyP-1'in tekrarlanan sistemik uygulamasının tümör büyümesini ve lenfatik damarlanmayı istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı görülmüştür (37).

LyP-1 peptidinin, hücre içine girişi için kullandığı reseptör 2008 yılında Fogal ve ark. tarafından keşfedilmiştir (1). LyP-1 peptidine özgü olan p32 (p32/gC1qR/HABP) isimli reseptör, normal hücrelerin mitokondrilerinde, hücre

yüzeyinde ve hücre çekirdeğinde yer almakla birlikte tümör hücrelerinde, tümör endotel hücrelerinde ve tümör makrofajlarında hücre yüzeyinde ve artmış şekilde ifade edilmektedir (1, 16, 36).

LyP-1, C-ucu kuralı (*C-end rule*, *CendR*) adı verilen bir motifi taşıyan (R/KXXR/K) peptit grubuna aittir (38-40). Söz konusu gruba ait peptitler, tümöre penetre olabilen peptitler olarak adlandırılmakta ve hücre içine girebilmek için nörofilin (NRP) reseptörlerini (Nörofilin-1 ve Nörofilin-2) kullanmaktadır (39). Tümöre hedeflenen peptitler (*tumor penetrating peptides*, *CendR* peptitler), hücre ve dokulara penetre olabilen peptitlerin (*cell penetrating peptides – CPPs*) yeni keşfedilen bir alt sınıfı olup birbirlerinin işlevlerini tamamlayan özelliklere sahiptirler (16, 41). *CPP*'ler endozomal kaçış yönünden daha güçlü özelliklere sahipken, *CendR* peptitler hedefe özgünlük ve dokuya penetrasyon sağlamaktadır. Söz konusu hedefe özgünlük, LyP-1 gibi p32'ye bağlanan peptitler için hücre içerisinde bulunan bir organelle taşıma yapılmasına da olanak verebilmektedir (16).

LyP-1 *CendR* dizilimine sahip bir tümöre özgün *CendR* peptididir (*tumor-specific CendR peptide*) ve bu durum tümör hücreleri içine girebilme ve tümör dokularına penetre olabilme özelliğini sağlamaktadır (42). Son yıllarda aydınlatılan mekanizmaya göre LyP-1'in hücre içerisine penetre olabilmesi, üç aşamalı olarak gerçekleşmektedir. İlk aşamada LyP-1, özgün reseptörü olan p32'ye bağlanmaktadır. Sonrasında proteazlar ile parçalanma sonrası *CendR* motifi ortaya çıkmaktadır. Bunu takiben, söz konusu motif NRP-1 veya NRP-2'ye bağlanarak *CendR* yolağı olarak adlandırılan endositik transport yolağını etkinleştirmektedir (16, 43). *CendR* yolağı endositik veziküller oluşumu ile hücre içine penetrasyonu sağlamaktadır. Bu durumun klasik makropinositozdan farkı ise yolağın NRP reseptörüne bağlanma sonrası aktifleşmesidir (16, 41). Oluşan makropinositik veziküller, peptit ile

beraberinde taşımakta olduğu moleküllerin de, konjuge olsun ya da olmasın, hücre içerisine girmesine olanak sağlamaktadır (38, 40, 44, 45). Hücre içerisine girişin mekanizması henüz tüm yönleriyle aydınlatılamamıştır; ancak, CendR yolağı ile hücre içerisine alınmanın diğer tüm endositik yollardan farklı olduğu ve hücrelerin besin ihtiyacının karşılanmasında görev alan mTOR sinyal mekanizması ile bağlantılı olduğu keşfedilmiştir (41).

Keşfedilmiş olduğu 2002 yılından itibaren LyP-1 peptidi ile yapılan çalışmalar literatürde yerini almıştır. Söz konusu çalışmalar hem teşhis hem de tedavi alanında olup, LyP-1 genellikle hedeflendirme ajanı olarak tercih edilmiştir. Lipozom (46-49), dendrimer (50, 51), mikrobalon (52-54), SMEDDS (55), misel (56, 57), nanopartikül (2, 58-64) ve mezoporöz nanoküre (65) sistemleri LyP-1 ile hedeflendirmede kullanılan taşıyıcı sistemlerdir.

Keşfedilmesinin ardından 2004 yılında Laakkonen ve ark. tarafından LyP-1'in MDA-MB-435 ksenograftlı çıplak farelerde i.v. uygulama sonrası, tümör çaplarında yaklaşık %50 oranında istatistiksel açıdan anlamlı küçülme görülmüştür (37). Ayrıca LyP-1'in hipoksik bir reaktif olan EF5 ile i.v. injeksiyon sonrası aynı bölgede toplandığı gösterilmiştir. Bu durum LyP-1'in hedeflendirme özelliğine ek olarak antikanser etki gösterdiğini kanıtlamaktadır.

LyP-1'in terapötik genlerin kanser tedavisinde hedeflendirilmesi için kullanımı da mevcuttur. LyP-1 ile modifiye edilen bakuloviral vektörün, MDA-MB-435 hücre hattına gen aktarımını 7 kat artırdığı gözlenmiştir (66). LyP-1'in tümör hücresi içerisine girerek çekirdekte viral birikmeyi ve buna bağlı olarak gen aktarımını olumlu yönde etkilediği gösterilmiştir (67).

LyP-1 peptidi polietilen glikol (PEG) ile kaplanmış demir oksit nanopartiküllerine "click" kimya ile tek basamakta bağlanarak MDA-MB-435

tümörüne sahip çıplak farelerde i.v. uygulandığında, peptidin damardan ayrılarak tümör dokusuna ulaştığı ve tümör dokusunda p32 reseptörlerine hedeflendiği gösterilmiştir (64).

Abraxane®, metastatik meme kanseri tedavisinde klinik olarak kullanımı onaylanmış nanoteknoloji ürünü ilaçlardan biridir. Formülasyonunda, taksan grubu kemoterapötiklerden paklitakselin çözünürlüğü, albümin nanopartikülüne bağlanarak artırılmıştır. Floresan işaretli LyP-1 (FAM-LyP-1), Abraxane® konjugatları hazırlamada kullanılmış ve konjugatların MDA-MB-435 tümör ksenograftlı farelere uygulanması sonrası, molekülün damar dışı tümör dokusunda p32 reseptörü ile kolokalizasyon gösterdiği gözlenmiştir. Tek başına Abraxane® ile karşılaştırıldığında LyP-1- Abraxane'in tümör büyümesini belirgin şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir(63).

LyP-1'in hedeflendirme ligandı olarak kullanıldığı çalışmalar literatürde sıklıkla yer bulmaktadır. LyP-1'in, özellikle nanopartiküler sistemlerin hedeflendirilmesinde kullanımı yaygındır. PEG – PLGA nanopartiküllerine konjuge edilen LyP-1'in BxPC-3 insan pankreatik kanser hücre hattında in vitro hücresel alımı, konjuge edilmemiş nanopartiküllere göre yaklaşık dört kat, pankreatik kanser modelinde ise metastatik lenf nodlarında in vivo alımı yaklaşık sekiz kat artırdığı bildirilmiştir (62). Benzer şekilde, B16-F1 melanoma hücre hattına LyP-1 ile hedeflendirilen doksorubisin yüklü lipozomların kontrol grubu ile karşılaştırıldıklarında tümörde istatistiksel olarak anlamlı derecede birikme sağladığı gösterilmiştir (48).

LyP-1, polimerik misellerin hedeflendirilmesinde de kullanılmıştır. PEG-PCL misel yapılarına konjuge edilen LyP-1, artemisininin yüksek derecede metastatik tümör hücrelerine ve bu hücrelere ait lenf damarlarına taşınması amacıyla uygulanmıştır. Kullanılan MDA-MB-435S ve lenfatik endotelial hücrelere (LEC) özgü

hedeflendirmenin arttığı, in vitro hücre kültürü ve in vivo hayvan modelinde kanıtlanmıştır (57).

Ultrasonik moleküler görüntüleme sistemleri, girişimsel olmayan şekilde dokudaki hedef bölgede hücresel ve hücre içi görüntülemeye olanak sağlamaktadır. LyP-1, ultrasonik moleküler görüntüleme sistemlerinde kullanılmak üzere hedeflendirme ajanı olarak mikrobalonlara konjuge edilmiş ve bu sayede hastalık ortamının taklit edildiği bir mikroçevrenin görüntülenmesine olanak sağlamıştır (54). Mikrobalonlarla yapılan diğer bir çalışmada paklitaksel yüklenmiş lipid bazlı mikrobalonlar avidin – biyotin bağı yardımıyla LyP-1 ile kaplanmış ve ultrason uygulanarak MDA-MB-231 hücrelerine hedeflendirilmiştir. Çalışma sonucunda ultrason uygulama zamanına bağlı olarak in vitro hücresel alımda 3,71 ile 7,66 kat arasında değişen oranlarda artış gözlenmiştir (53). Aynı gruba ait yeni bir çalışmada fosfolipid kabuklarına LyP-1 konjuge edilmiş mikrobalonların, hücrelere hedeflenme özellikleri mikroakışkan çip teknolojisi kullanılarak değerlendirilmiştir. Dinamik adezyon çalışmalarında hücre hattı olarak MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı kullanılmıştır. LyP-1 ile hedeflendirilmiş mikrobalonların uygulanmış olduğu grup ile LyP-1 ile konjuge olmayan mikrobalonların uygulandığı grup arasında hücre yüzeyine bağlanma miktarı istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı bulunmuştur ( $p<0.01$ ). Hedeflendirme öncesi serbest LyP-1 ile bloke edildikten sonra konjuge mikrobalon uygulaması yapılan grupta hücresel bağlanmada gözlenen düşüş ( $p<0.01$ ), LyP-1'in spesifik reseptörü olan p32'ye bağlanarak işlevini yerine getirdiğini göstermektedir (52).

Tömöre bağlı lenfatik damarlanmanın (lenfanjiyogenez) görüntülenmesinde kullanılmak üzere yakın kızılötesi florofor madde (Cy5.5) ile konjuge edilmiş LyP-1; subkütan 4T1 tümör inokülasyonunu takiben 3, 7, 14 ve 21. günlerde tümörlü

farelere üst ekstremitte parmaklarından uygulandığında; tümöre bağlı lenf nodlarında floresan şiddetinin arttığı gözlenmiştir. 21. gün sonunda LyP-1 ile hedeflendirme yapılan ve tek başına florofor maddenin uygulandığı gruplar arasında gözlenen floresan şiddeti farkı, istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Böylece LyP-1'in tümöre bağlı gelişen lenfatik damarlanmanın izlenmesinde, buna bağlı olarak da tümör metastazının belirlenmesinde etkili bir hedeflendirme molekülü olduğu gösterilmiştir (68). Metastatik lenf nodlarının hedeflendirilmesi alanında yapılan bir başka çalışmada LyP-1 konjuge edilmiş PEG ile lipozomlar floresin veya doksorubisin yüklenerek hazırlanmıştır. LyP-1 ile yapılan modifikasyonun in vitro ve in vivo olarak SPC-A1 akciğer adenokarsinom hücreleri ve metastatik lenf nodlarına alımı artırdığı, farmakodinamik çalışmalarla gösterilmiştir (47). Aynı gruba ait diğer bir çalışmada, doksorubisin yüklü LyP-1 ile konjuge lipozomlar MDA-MB-435 hücre hattına hedeflendirilmiş; in vitro ve in vivo olarak metastatik lenf nodlarında artmış floresan şiddetinin yanı sıra doksorubisin yüklü lipozomlar ile lenf nodu büyümesi ve metastazında azalma gözlenmiştir(46).

LyP-1'in görüntüleme ajanı olarak kullanıldığı çalışmalara örnek olarak verilebilecek bir diğer çalışmada; Na<sup>131</sup>I işaretli LyP-1 peptidi, MDA-MB-435 ksenograftlı çıplak farelere kuyruk veninden uygulanarak 1, 3, 6 ve 24. saatlerde dokulardaki dağılımı yine Na<sup>131</sup>I işaretlenen kontrol peptidi ile karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda, peptidin enjeksiyon sonrası 24 saat boyunca stabilitesini koruduğu ve radyoaktif işaretli LyP-1 peptidinin 6. ve 24. saatlerde tümör dokusunda diğer dokulardan daha yüksek oranda bulunduğu belirlenmiştir. Bu çalışma ile LyP-1'in deneysel tümör modelinde sistemik uygulama ile in vivo tümör görüntüleme için kullanılabilir önemli bir hedeflendirme ajanı olduğu gösterilmiştir (69).



LyP-1'in kombine tedavide hedeflendirici molekül olarak kullanımına örnek olabilecek nitelikteki bir başka çalışmada, dosetaksel ve yakın kızılötesi boya (IR820) yüklenmiş miseller, LyP-1 ile konjuge edilmiştir. LyP-1 konjugasyonunun tümöre in vitro ve in vivo hedeflenmeyi artırarak tümör metastazını ve büyümesini engellediği gösterilmiştir (56).

LyP-1'in parenteral kullanımı dışında, antikanser tedavide oral kullanımına ait çalışmalar da mevcuttur. Hazırlanan doksorubisin yüklü lesitin ters miselleri kitosan nanopartiküllerin içerisine hapsedildikten sonra iki farklı peptit ile konjuge edilmiştir. Söz konusu peptitlerden RGD ile M hücrelerinde bulunan beta integrinlere hedeflendirme yapılarak permeabilitenin artırılması sağlanırken; LyP-1, MDA-MB-231 hücrelerinde fazla miktarda ifade edilen p32 reseptörüne hedeflenerek artmış antitümör etki sağlamıştır. MDA-MB-231 ksenograftlı çıplak BALB/c farelere 3-4 günde bir defa 10 mg/kg dozda doksorubisin içeren konjugatlar uygulandığında; 4 haftalık tedavi sonunda, en yüksek oranda LyP-1 (79 nmol/mg nanopartikül) ile konjuge nanopartiküllerle tedavi edilen hayvanlarda, bağlı tümör hacmi oranı ( $V/V_0$ ) 5,24 olup; tek başına doksorubisin uygulaması yapılan gruptan ( $V/V_0$  değeri 21,81) istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı bulunmuştur (70).

Son dönemde gerçekleştirilen çalışmalardan LyP-1'in teranostik kullanımına ultra küçük (3,6 nm) yarı metal bizmut nanopartiküllerin LyP-1 ile konjugasyonu örnek olarak verilebilir. 14 günlük uygulama sonunda LyP-1 ile konjuge edilmiş nanopartiküllerin lazer ve X-ışını uygulaması ile kombine kullanımını takiben bağlı tümör hacmi ( $V/V_0$ ) kontrol grubuna göre anlamlı derecede farklı bulunmuştur ( $p<0,005$ ) (58).

LyP-1'in meme kanseri tedavisi dışında gliyoma (60, 71), ateroskleroz (50, 61, 72, 73) ve pankreas kanseri (65) tedavisinde kullanımları üzerinde de çalışmalar mevcuttur.

### **2.3. Lenfatik Sistem ve Kanserdeki Rolü**

Lenfatik sistem; immün yanıtın oluşturulması, vücutta bulunan sıvıların homeostazı ve lipid absorpsiyonundaki rollerinin yanı sıra, kanserin yayılmasında kilit bir rol oynamaktadır (74).

Lenfatik sistem temelde, interstisyel sıvı ve hücreleri absorbe ederek lenf sıvısını oluşturan ve başlangıç lenf damarları olarak da tanımlanan küçük lenfatik kılcal damarlardan oluşan bir ağdır. Söz konusu lenf kılcalları; lenf sıvısını, toplayıcı lenf damarlarına ileterek lenf nodlarına kadar ulaştırmada kritik rol oynamaktadır. Vücudun çeşitli bölgelerinde yer alan lenf nodları ise lenf sıvısının son aşamada kan dolaşımına geri gönderilmesini sağlar (75-77).

Kanser tedavisinde en önemli dönüm noktalarından biri, tümörün başlangıç bölgesinden farklı dokulara metastazıdır. Tümör hücrelerinin metastatik yayılımı kan damarları vasıtasıyla (hematojen yayılım), lenfatik damarlarla (lenfojen yayılım) veya direkt olarak dokulara ve vücut boşluklarına taşınmayla gerçekleşmektedir (78). Lenfatik damarlanmanın tümör metastazı için en temel yollardan biri olduğu bilinmektedir. Bu durum özellikle bölgesel lenf nodları etrafında lokalize kanser türlerinden meme, akciğer ve gastrointestinal sistem kanserlerinin seyrinde ve buna bağlı olarak izlenecek tedavi stratejisinde oldukça önemlidir (74). Tümör hücreleri ve tümör bağımlı makrofajlar, proinflamatuvar ve lenfanjiyogenik faktörler salgılayarak tümör bölgesi ve lenf nodlarında lenfanjiyogenezi uyarırlar. Lenfanjiyogenez ile, lenf damarlarında dilatasyon ve artmış tümör içi basınca bağlı olarak tümör dokusundan

lenf nodlarına doğru akışta artış gerçekleşir. Bu durumda metastaz için gerekli koşullar sağlanmaktadır (79).

Konvansiyonel sistemik kemoterapi, dozu kısıtlayan bir toksisite durumu olmaksızın lenfatik sisteme etkin bir şekilde taşınmamaktadır (77). İstenen dozda etkin maddenin lenfatik sisteme taşınabilmesi için hedeflendirme stratejilerinden yararlanılmalıdır.

### **2.3.1. Kanser Tedavisinde Lenfatik Hedeflendirme Yaklaşımları**

Lenfatik sistem tarafından absorpsiyon, belli durumlarda gerçekleşmektedir. Lipozomlar, emülsiyonlar, polimerik partiküller gibi kolloidal sistemler, lenfatik sistem tarafından yüksek oranlarda tutulmaktadır (77).

Yağların absorpsiyonunda görev aldığı bilinen lenfatik sistem tarafından absorpsiyonun artırılabilmesi için, hedeflendirilmesi planlanan sistemlerin lipofilik özelliklerinin artırılması doğru bir yaklaşımdır (77). Oral uygulama sonrası lenf dolaşımına geçişin artırılabilmesi için moleküllerin log P değerinin 5'ten büyük olması veya trigliserid yapıda olması önem taşımaktadır. Söz konusu durumda ilaç molekülleri enterositlerden geçerek mezenterik lenf damarlarına ulaşacaklardır. İntestinal lenf nodlarına ilaç hedeflendirilmesinin en önemli üstünlüğü, absorbe olan maddelerin karaciğerde ilk geçiş etkisine maruz kalmadan direkt olarak torasik lenf damarları aracılığıyla sistemik dolaşıma geçmesidir (79).

Uygulama yolunun da lenfatik sistem tarafından absorbe edilen miktarı etkilediği gösterilmiştir. Subkütan, intramuskuler ve intraperitoneal uygulama yolları kullanılarak lenf nodları hedeflenebilmektedir (77).

Uygulanan taşıyıcı sistemlerin boyutlarının da lenfatik hedeflendirmede kritik öneme sahip olduğu bilinmektedir. Genel olarak küçük partiküllerin hücreler arası

alandan lenf damarlarına taşınması daha kolaydır (77). Parenteral yoldan interstisyel uygulanan moleküllerin lenfatik absorpsiyonları partikül boyutlarına göre değişiklik göstermektedir. Küçük ve orta büyüklükteki makromoleküller (10 nm'den küçük veya 16-20 kDa boyutunda) ve 100 nm'den büyük moleküller interstisyel alana difüzyon olanakları düşük olduğundan enjeksiyon bölgesinde bulunan kan damarları tarafından kan dolaşımına taşınmaktadır. Bu iki büyüklük aralığının dışında yer alan ve 20-30 kDa boyutundaki makromoleküller ile 10-100 nm aralığında yer alan partiküller, lenfatik damarlara ulaşmaktadır (79, 80).

Lenfatik alımın artırılması için izlenebilecek bir diğer yaklaşım ise albümin ile konjugasyondur. Albümin interstisyel alandan sistemik dolaşıma lenfatik damarlar aracılığıyla geri dönmektedir. Bu durumda albümin ile konjuge edilen moleküllerin de lenfatik dolaşıma geçişi artmaktadır (79). Söz konusu yaklaşım subkütan uygulanan aşılarda lenfatik alımını artırmak amacıyla uygulanmıştır. Antijen ya da adjuvan moleküller albümin bağlayıcı lipofilik kuyruğa, çözünürlüğü artıran polimer zincir eklenerek bağlanmış ve amfifilik yapıda moleküller elde edilmiştir. Albümin aracılığıyla lenf nodlarına taşınan ve söz konusu bölgede immün hücreler ile etkileşimleri artan moleküller, daha yüksek bir immün cevabın oluşmasına olanak sağlamıştır (81).

Lenfatik hedeflendirme alanında çalışılan reseptör aracılı hedeflendirme moleküllerine hyaluronik asit ve LyP-1 örnek olarak verilebilir (79). Lenfatik endotel hücreler üzerinde bulunan ve lenfatik damar endotel hücreler hyaluronik asit reseptörü 1 (LYVE-1) olarak adlandırılan reseptör hyaluronik asit için spesifik bir hedefken (82); LyP-1'in bağlandığı p32 reseptörü de tümör lenf damarları üzerinde yer alan bir hedefdir.

#### 2.4. Nano Boyutlu İlaç Taşıyıcı Sistemler ve Kansere Tedavisindeki Yeri

Nano boyutlu ilaç taşıyıcı sistemler kanser teşhis ve tedavisinde önemli bir rol oynamaktadır. EPR etkisinin ortaya atılması ile birlikte, tümöre hedeflendirilmiş taşıyıcı sistemlerin gelişimi hız kazanmış ve bu alanda yapılan çalışmalar kliniğe kadar taşınmıştır.

Nanoboyutlu ilaç taşıyıcı sistemlerin kanser tedavisinde getirmiş olduğu üstünlükler aşağıda sıralanmaktadır (26):

- Çözünürlük sorunu olan etkin maddelerin çözünürlüğü, uygun taşıyıcı sistem tasarımıyla artırılabilir. Buna bağlı olarak biyoyararlanımda iyileşme gerçekleşir.
- Taşıyıcı sistem içerisine hapsedilen etkin maddenin stabilitesi artırılarak vücutta kalma süresi uzatılır. Bu durumda hedef dokuda biriken madde miktarı artırılır.
- Pasif ve aktif hedeflendirme yaklaşımları ile antikanser maddelerin tümör dokusundaki konsantrasyonları artırılır.
- Antikanser maddelerin salım özellikleri değiştirilerek tümör mikroçevresinde salımın kontrol edilebileceği sistemler tasarlama olanağı mevcuttur.

Nanoteknoloji ürünü ilaçların, boyutlardaki değişikliklere bağlı olarak fizikokimyasal özellikleri de değişmekte ve buna bağlı olarak da piyasada bulunan geleneksel büyüklükte partiküllere sahip preparatlara göre fiziksel, kimyasal ve biyolojik açıdan çeşitli üstünlükler kazanmaları sağlanmaktadır (83). Diğer yandan, değişen fizikokimyasal özellikler, güvenilirlik ve etkililik ile ilgili birtakım soru işaretlerini de beraberinde getirmektedir (26, 84). FDA'nın nanoteknolojik ilaçların onaylanması aşamasında izlediği yol, ürün bazlı olarak devam etmektedir. Piyasaya

çıkarmak için onay bekleyen nanoteknoloji ürünü ilaçların takip edebileceği karakterizasyon ve kalite kontrol ile ilgili genel bir kılavuz henüz yayınlanmamıştır (26). Avrupa İlaç Ajansı (EMA) da 2006 yılında, nanoteknoloji ürünü ilaçların ruhsatlandırılması ile konuları değerlendirmek üzere otoriteler arası Nanoilaç Uzman Grubu oluşturmuştur. 2009 yılında bu grup daha da büyüyerek Avrupa, Amerika Birleşik Devletleri, Japonya ve Kanada'nın da içinde olduğu bir oluşum haline gelmiştir (85).

Ruhsatlandırma aşamasında yaşanan sıkıntıların yanı sıra nanoteknoloji ürünü preparatların üretim aşamasında karşılaşılan zorluklar da göz önünde bulundurulması gereken konulardan biridir. Söz konusu ilaçların, konvansiyonel üretim aşamasında yapılan yatırım, benzerlerine oranla oldukça yüksektir ve ölçek büyütme aşaması da geleneksel ilaçlardan oldukça farklıdır (26). Tüm bu zorluklara rağmen klinikte kullanım için onay almış ilaçların olması, ileriki yıllarda da yüksek teknoloji ürünü preparatların hastaların kullanımına sunulmasının yolunu açacaktır.

Kanser tedavisinde kullanılan nanotaşıyıcı sistemler genel olarak yağ bazlı sistemler, polimer bazlı sistemler, ilaç konjugatları, inorganik nanopartiküller ve viral nanopartiküller olarak sınıflandırılabilir (26). Söz konusu sistemler üzerinde çalışmalar yoğun bir şekilde devam ederken, piyasaya çıkarak klinik kullanıma girmiş olan lipozom (Doxil®/Caelyx®), albümin konjuge nanopartikül (Abraxane®), demir oksit nanopartikülü (NanoTherm®), polimerik misel (Genexol-PM®, Güney Kore), PEG protein konjugatı (Oncaspar®) ve polimer – protein konjugatı (Zinostatin stimalamer®, Japonya) bulunmaktadır (26). Klinik çalışmaları devam eden adaylar olmasına karşın klinikte henüz polimer – ilaç konjugatı örneği bulunmamaktadır.

PEG ile konjuge edilmiş lipozomal doksorubisin preparatı (Doxil®/Caelyx®), kanser tedavisinde klinik kullanım için FDA tarafından 1995 yılında onaylanmış ilk

nanotaşıyıcı sistem formülasyonudur (86). Doxil® dışında piyasada olan lipozomal ilaç taşıyıcı sistemler; lipozomal doksorubisin (Myocet®), lipozomal daunorubisin (DaunoXome®), lipozomal sitarabin (DepoCyt®), vinkristin sülfat lipozomları (Marqibo®) ve liposomal mifamurtid (Mepact®) (26). Bu sistemlerin hiçbiri hedeflendirici bir molekül içermemektedir. Söz konusu preparatlara ek olarak ilk jenerik lipozom preparatı olan Lipodox, FDA tarafından 2013 yılında onay almıştır (26).

EMA tarafından onaylanan ve yüksek bir market potansiyeli ile piyasaya çıkan pek çok nano boyutlu ilaç bulunmaktadır. EMA onaylı lipozom formülasyonları; lipozomal doksorubisin (Caelyx® ve Myocet®), lipozomal mifamurtid (Mepact®), lipozomal amfoterisin B (AmBisome®) ve lipozomal daunorubisindir (DaunoXome®). Lipozom formülasyonları dışında, etkin maddelerin nanoboyutlu partiküller olarak formüle edildiği EMA onaylı preparatlara örnek olarak Abraxane® (paklitaksel), Emend® (aprepitant), Rapamune® (sirolimus), Tricor®/Lipanthyl®/Lipidil® (fenofibrat) verilebilir. Bunun yanı sıra EMA onaylı protein-polimer konjugatları (Oncaspar® – mPEG asparajinaz), nanokristaller (Zypadhera® - Olanzapin), polimerik ilaç (Copaxone® - Glu, Ala, Tyr, Lys kopolimeri) ve nanokompleks preparatları da (Ferrisat® - demir III hidroksit dekstran kompleksi) bulunmaktadır (87, 88).

### **2.5. Peptit Konjugatları**

Kanser tedavisinde monoklonal antikor temelli yaklaşımlar, moleküler yapılarının çok yönlülüğü ve klinik etkililikleri sebebiyle son yıllarda hızla gelişim göstermektedir (89). Terapötik monoklonal antikorlara ek olarak antikor – ilaç konjugatları da, potent antikanser ilaçların taşınmasında konvansiyonel

kemoterapinin neden olduğu yan etkileri azaltmak amacıyla kullanılan yaklaşımlar arasında yer almaktadır. Bu alanda yapılan çalışmalar gelişme göstermeye devam ederken, monoklonal antikolar ile yapılan çalışmalara alternatif hedeflendirme yaklaşımları ortaya çıkmıştır. Peptit konjugatları da bu yaklaşımlardan biri olarak araştırmalara konu olmaktadır. Peptit yapılı moleküllere konjugasyonda kullanılan gruplara örnek olarak ilaç molekülleri, antikolar ve polimer yapılı bileşikler verilebilir.

Hedeflendirilmiş tedavi yöntemlerinden monoklonal antikolar, antikor – ilaç konjugatları ve peptit – ilaç konjugatlarından her biri tek başına üstünlük ve sakıncalara sahiptir. Ancak, bu sistemlerin bir arada kullanımları ile karşılaşılan sorunların aşılmasının mümkün olabileceği öngörülmektedir (89).

LyP-1 peptidi, yapısında bulunan amin ve tiyol grupları sayesinde “click” kimya ile konjugasyona uygun yapı göstermektedir (90).

### **2.5.1. Peptit – İlaç konjugatları**

Kimyasal açıdan farklı özellikte iki yapının kovalan bir bağ yardımıyla tek bir molekül haline getirilmesi, sinerjistik özellikler gösteren farklı moleküllerin eldesinde kullanılan kolay ve etkin bir yöntemdir (91).

Antikanser etkin maddelerin hidrofilik özellik gösteren peptitler ile konjugasyonu; ilacın çözünürlüğünü, hücresel alımını ve etkisini artırmak amacıyla tercih edilen stratejilerdendir (91). Bu yaklaşımın antikanser ilaçlar için kullanılması ile artmış penetrasyon ve seçicilik elde edilmesi, antikanser özellikteki molekülün etkisini artırmak amacıyla sıklıkla tercih edilmektedir (91).

Peptit – ilaç konjugatları, peptit yapıda bir vektör, terapötik kısım ve bunları birbirine bağlayan kovalan bir bağdan meydana gelen yapılar olup, hedeflendirmede



kullanılan peptit yapıdaki vektörler genellikle 40 aminoasitten daha kısa zincire sahip peptitlerden seçilmektedir (92).

Peptit yapıdaki terapötiklerin klinikte yerini alabilmesi için yapılan çalışmalar 1980'lerden itibaren hızla devam etmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda bugün piyasada yaklaşık 50'nin üzerinde peptit yapıda ilaç bulunmaktadır. Diğer yandan peptit-ilaç konjugatlarının kanser tedavisinde kullanımıyla ilgili araştırmalar devam etmesine rağmen henüz piyasada kanser tedavisinde onaylı peptit – ilaç konjugatı bulunmamaktadır (30). Bu eksikliğin nedenleri arasında hedeflenen reseptöre uygun ligand molekülün bulunmasının zorluğu, reseptörle ilgili hücre içine alım vb. mekanizmaların henüz açıklanamamış olması, peptit – ilaç konjugatlarının farmakokinetik ve farmakodinamik mekanizmaları ile ilgili çalışmaların yetersizliği sayılabilir (93).

Peptit – ilaç konjugatları ile hedeflendirme alanında, klinikte kullanımda olan ve etkinlikleri bilinen küçük moleüllü sitotoksik veya antineoplastik etkin maddeler substrat olarak seçilmektedir. Bu etkin maddelere örnek olarak metotreksat, 5-florourasil, doksorubisin, siklosporin ve paklitaksel verilebilir (92).

Antikor – ilaç konjugatlarında karşılaşılan problemlerden biri, büyük moleküler yapıları sebebiyle tümör içi penetrasyonun kısıtlı olmasıdır. Peptit – ilaç konjugatlarında ise, yapıların küçük olması sebebiyle dokulara penetrasyon artmaktadır. Bunun yanı sıra, bir antikor molekülü 1 ile 3 arasında ilaç molekülü ile konjuge edilebilirken, peptit – ilaç konjugatlarında ilaç yükleme kapasitesi yaklaşık olarak %20-30 arasındadır (94).

## 2.6. Antikor Konjugatları

Yüksek özgünlük ve hedef antijenlere yüksek miktarda bağlanma özellikleri sebebiyle monoklonal antikorlar uzun yıllardır temel araştırmalara konu olmaktadır (95). Antikorlar ile yürütülen çalışmalarda hedef olarak kullanılmış tümör antijenlerine örnek olarak epidermal büyüme faktörü (EGFR), vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), sitotoksik T lenfosit antijen – 4 (CTLA4), CD20, CD30 ve CD52 verilebilir (96).

Antikorlar ve antikor kısımları ile hedeflendirme, görüntüleme ajanları ve antikanser ilaçların tümör bölgesine özgün hedeflendirilmesinde en sık kullanılan moleküller arasında yer almaktadır. Antikorlar tek başına tümör antijenlerine özgün olarak bağlanarak etkin terapötik ajanlar olarak kullanılabilmelerine rağmen, bazı değişikliğe uğramamış antikorlar terapötik aktiviteden yoksun olduğundan, antikor – ilaç konjugatları olarak sitotoksik etkin maddeler ile birlikte uygulanmaları yaygın olarak tercih edilmektedir (95).

Sitotoksik ilaçların antikorlar ile konjuge edilmesi antikorların kullanılabilirliklerini artırmakta, potens ve etkililikte artış sağlamaktadır. Bu amaçla hazırlanacak konjugatların eldesinde çeşitli konjugasyon yöntemleri kullanılmaktadır. Konjugasyonun yapılması için en çok tercih edilen antikor bölgeleri, lizin ve sistein aminoasitlerinin bulunduğu bölgelerdir. Söz konusu bölgelerde yapılacak konjugasyon, stabil bağlayıcı moleküller aracılığıyla gerçekleşmektedir. Bağlayıcı moleküllerin kan dolaşımına girdikten sonra hedef bölgeye gidene kadar etkin maddeyi salmayacak kadar stabil, hücre içerisine girdikten sonra ise etkinin görülebilmesi için etkin madde salımını sağlayacak özellikte olması, beklenen ideal özelliktir (97). Bu amaçla en çok tercih edilen bağlayıcı moleküller 4-(-maleimidometil) sikloheksan karboksilik asit

N-hidroksisüksinimid esteri (SMCC), N-süksinimidil 4-(2-pridilditiyo) pentanoat (SPP) ve N- süksinimidil 3-(2- pridilditiyo) bütirat (SPDB)'tir (97).

Amerika Birleşik Devletleri (ABD) ve Avrupa Birliği'nde ado-trastuzumab emtansin (Kadcyla®) ve brentuksimab vedotin (Adcetris®) adıyla piyasada yer alan iki adet antikor – ilaç konjugatı bulunmaktadır. Bunun yanı sıra 40'a yakın antikor – ilaç konjugatı klinik çalışmalarda yer almaktadır (95). Günümüze kadar klinik kullanım için FDA tarafından onay almış 5 adet antikor – ilaç konjugatı bulunmaktadır (26, 98). Bunlardan ikisi kullanıma girdikten sonra piyasadan çekilmiştir. Kadcyla™ (ado-trastuzumab emtansin), HER2 pozitif metastatik meme kanseri tedavisinde kullanılırken; Adcetris™ (brentuksimab vedotin), Hodgkin lenfoma ve anaplastik büyük hücreli lenfoma tedavisinde endikasyon almıştır. 2000 yılında FDA'dan onay almış bir diğer antikor – ilaç konjugatı olan ve miyeloid lösemi tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilen Mylotarg™ (Gemtuzumab ozogamisin), onay sonrası çalışmaları yerine getiremediğinden 2010 yılında gönüllü olarak piyasadan çekilmiştir (98). Tedavide kullanılan konjugatların yanı sıra teşhis için geliştirilen radyonüklid işaretli iki adet konjugat daha klinik onay sahibidir. Hodgkin dışı lenfomada kullanılmak üzere FDA ve EMA tarafından onaylı bu iki preparattan Zevalin® (İbritumomab tiyuksetan) 2002 yılından beri kullanımda iken; 2003 yılında onay alan Bexxar® (Tositumomab) 2014 yılında piyasadan çekilmiştir (26).

Kliniğe çıkmayı başarmış antikor – ilaç konjugatları olmasına rağmen antikorların hedeflendirme molekülleri olarak kullanılmasında karşılaşılan iki önemli kısıtlama bulunmaktadır. Bunlar moleküler yapının büyüklüğünden kaynaklanan tümör penetrasyonunda düşüklük ve mononükleer fagositer sistem (MPS) tarafından özgün olmayan alımdır (99). Bu sebeple, antikorların alternatif moleküller ile birlikte uygulanmaları ilgi çeken konular arasında yer almaktadır. Bu

yaklaşımlardan biri de bispesifik antikolar yardımıyla ön hedeflendirme sonrası yapılan hedeflendirmedir.

### 2.6.1. Bispesifik Hedeflendirme

Tümöre spesifik toksisitenin artırılması ve tümörlü dokuya ilaç moleküllerinin hedeflendirilebilmesi amacıyla ilaç moleküllerinin polimerlere konjugasyonu, kullanılan yöntemler arasındadır. Ancak ilaç moleküllerinin tek başına polimerik yapılara konjuge edilmesi hedeflendirme sağlamadığından, terapötik etki görülebilmesi için gerekli ilaç miktarı artabilmektedir. Bunun yanı sıra, bu teknoloji büyük tümör dokularında etkili olabilmesine rağmen, metastaz yapmış küçük lezyonlarda gerekli etkiyi göstermeyebilir. Söz konusu durum, tedavide yeni alternatifler olarak antikor – ilaç konjugatlarıyla ilgili araştırmaların hız kazanmasını sağlamıştır (100).

Antikor – ilaç konjugatları, antikoların bakteriyel toksinler, peptid analogları ve sitotoksik moleküllere konjuge edilmesiyle elde edilebilmektedir. Antikoların efektör moleküllerle konjugasyonu, düşük yükleme kapasitesiyle zor bir prosedür olarak tanımlanmaktadır ve konjugasyon sonrasında biyolojik aktivitenin tamamen kaybedilmesi gibi riskler bulunmaktadır. Bu sebeple *pretargeting* – ön hedeflendirme adı verilen yeni bir yaklaşım ortaya çıkmıştır (100).

Ön hedeflendirme yaklaşımında bispesifik antikolar kullanılarak in vivo ortamda hedef olmayan dokulardan gelen spesifik olmayan aktivitenin azaltılması amaçlanmaktadır. Böylece bispesifik antikolar sayesinde hedeflenmemiş hücrelerde toksisitenin azaltılması ve moleküler anlamda tümör hedeflendirmesinin artırılması sağlanmaktadır. Bispesifik hedeflendirme teknolojisi immünolojik tanı,

toksik moleküllerin hedeflendirilmesi veya tümörlerde bulunan sitotoksik hücrelerin aktivasyonu için kullanılmaktadır (100).

Bispesifik hedeflendirmede kullanılan bispesifik antikor – ligand kompleksi, efektör moleküle bağlanan monoklonal antikorun bir reseptöre spesifik peptit veya analogu ile konjugasyonu sonucu elde edilmektedir (100). Hedeflendirmenin ilk aşamasında antikor – ligand kompleksi hedef kanser hücresine bağlanmak üzere uygulanmakta, ikinci aşamada etkin madde ile konjuge edilen ve antikorunu tanıyan kısım uygulanarak spesifik hedeflendirme sağlanmaktadır (100).

### **2.7. Yağ Bazlı İlaç Taşıyıcı Sistemler**

Oral kullanıma uygun yağ bazlı formülasyonlar Pouton tarafından beş ana gruba ayrılmıştır (101-103). Tip I, Tip II, Tip IIIA, Tip IIIB ve Tip IV olarak adlandırılan bu gruplara ait ayrıntılı bilgi Tablo 2.1’de verilmiştir. Söz konusu sınıflandırma yapılırken formülasyonda kullanılan trigliserit/karışık gliserit, yüzey etkin madde konsantrasyonu, hidrofilik yardımcı çözücü konsantrasyonu ile partikül büyüklüğü dağılımı, suyla seyreltme ve sindirilebilirliğin önemi dikkate alınmıştır(101). Tip I’den Tip IV’e doğru giderken, formülasyonların içeriğindeki hidrofilik bileşen miktarı artmaktadır(102) (Tablo 2.2). Kendiliğinden emülsifiye olabilen ilaç taşıyıcı sistemler Tip III grubunda yer almaktadır.

**Tablo. 2.1.** Yağ bazlı formülasyonların sınıflandırılması (102, 103).

<b>Formülasyon tipi</b>	<b>Maddeler</b>	<b>Özellikler</b>	<b>Faydaları</b>	<b>Sakıncaları</b>
<b>Tip I</b>	Yüzey etkin maddesiz yağlar	Dağılmazlar, yağların sindirimi gerekir	GRAS statüsünde, kapsül bileşenleri ile yüksek geçimlilik	İlaç molekülü yüksek lipofilik özellik göstermiyorsa çözücü kapasitesi düşük
<b>Tip II</b>	Yağlar ve suda çözünmeyen yüzey etkin maddeler	Suda çözünen bileşenler olmayan SEDDS/SMEDDS formülasyonları	Dispersiyon halinde çözücü kapasitesi kaybı olmaması	Bulanık yağ/su dispersiyonu (partikül boyutu 0,25-2 µm)
<b>Tip III A</b>	Yağ, yüzey etkin madde, yardımcı çözücü (suda çözünen ve çözünmeyen yardımcı maddeler)	Suda çözünen bileşenler ile oluşturulan SEDDS/SMEDDS formülasyonları	Berrak, hemen hemen berrak görünüm, yağ sindirimi olmadan absorpsiyon	Dağılma sırasında muhtemel çözücü kapasitesi azalması, zor sindirim
<b>Tip III B</b>	Yağ, yüzey etkin madde, yardımcı çözücü (suda çözünen ve çözünmeyen yardımcı maddeler)	Suda çözünen bileşenler ve düşük yağ içeriğiyle oluşturulan SMEDDS formülasyonları	Berrak görünüm, yağ sindirimi olmadan absorpsiyon	Dağılma sırasında yüksek ihtimal çözücü kapasitesi azalması
<b>Tip IV</b>	Suda çözünen yüzey etkin madde ve yardımcı çözücüler	Misel çözelti oluşturmak için disperse olurlar	Pek çok ilaç molekülü için yüksek çözücü kapasitesi	Dağılma sırasında çözücü kapasitesi azalması, sindirim mümkün olmayabilir

**Tablo 2.2.** Yağ bazlı formülasyon bileşenleri(102).

Yardımcı Maddeler	% Yardımcı Madde Miktarı				
	Tip I	Tip II	Tip III A	Tip III B	Tip IV
Yağlar:trigliserit/mono- digliserit karışımları	100	40-80	40-80	< 20	-
Suda çözünmeyen yüzey etkin maddeler (HLB<12)	-	20-60	-	-	0-20
Suda çözünen yüzey etkin maddeler (HLB>12)	-	-	20-40	20-50	30-80
Hidrofilik yardımcı çözücüler (PEG, Propilen Glikol, Transcutol vb.)	-	-	0-40	20-50	0-50

Yağ bazlı formülasyonlarda, seçilen yardımcı maddelere göre formülasyon tipi fiziksel karışımlardan, katı dispersiyonlar ve kendiliğinden mikro-/nanoemülsifiye olabilen sistemlere kadar değişiklik gösterebilmektedir (104).

Formülasyon aşamasında kullanılan yağlar, etkin maddelerin biyofarmasötik özelliklerini ve buna bağlı olarak oral biyoyararlanımlarını değiştirmektedir. Bu durum bağırsak sıvılarında çözünürlüğün artması, ilaç molekülünün kimyasal ve enzimatik parçalanmadan korunması, lipoproteinlerin oluşmasıyla birlikte lenfatik alımın artmasına bağlı olarak gerçekleşmektedir (105).

### **2.7.1. Kendiliğinden Emülsifiye Olabilen İlaç Taşıyıcı Sistemler (SEDDS)**

Kendiliğinden emülsifikasyon, yağ ve suyun hafif mekanik bir kuvvet yardımıyla emülsiyon oluşturması olarak tanımlanmaktadır (106).

Kendiliğinden emülsifiye olabilen ilaç taşıyıcı sistemler (*self emulsifying drug delivery systems*-SEDDS), yağ, yüzey etkin madde ve yardımcı yüzey etkin maddeden oluşan bir karışım olup, sulu bir faz ile bir araya geldiğinde hafif çalkalama ile termodinamik açıdan dayanıklı yağ/su tipi mikro-/nanoemülsiyonlar oluşturabilen izotropik sistemlerdir (55, 107-109). SEDDS, damlacık büyüklüğü 100-300 nm arasında olan emülsiyonlar oluştururken; kendiliğinden mikroemülsifiye olabilen sistemler (SMEDDS), 50 nm'den küçük damlacıklara sahip şeffaf görümlü mikroemülsiyonlar oluştururlar (107).

Bu aşamada, nanoemülsiyonlar ile mikroemülsiyonlar arasındaki farkı açıklama gerekliliği doğmaktadır. Nanoemülsiyonlar, birbiriyle karışmayan iki sıvının birbiri içerisinde bir dış kuvvet yoluyla dağıtıldığı heterojen dispersiyonlardır. Damlacık boyutları 20-200 nm arasında değişmektedir. Burada kullanılan

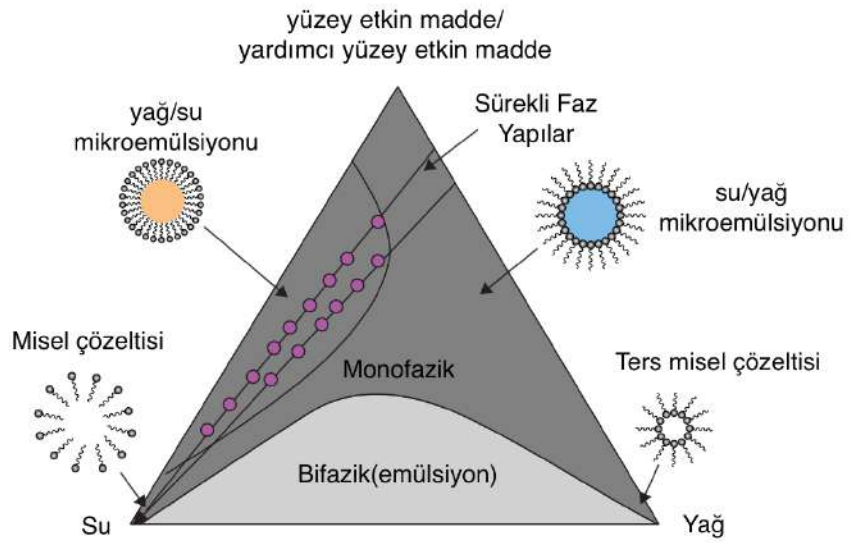


'nanoemülsiyon' ifadesi emülsiyonun damlacık boyutuna ait bir ifadedir ve 'mikroemülsiyon' ile karıştırılmamalıdır. Nanoemülsiyon yapısında bir emülsiyon her ne kadar mikroemülsiyon gibi şeffaf bir görünüme sahip olsa ve/veya uzun süreli bir stabilite davranışı gösterse de bu sistemler dengeye ulaşmış sistemler değildir ve damlacık boyutlarının nano boyuta getirilebilmesi için dışarıdan bir enerji uygulanması gerekir (110). Nanoemülsiyonlar kinetik açıdan stabil olsalar da termodinamik açıdan stabil değildir. Mikroemülsiyonlar ise termodinamik açıdan stabil formülasyonlardır ve kendiliğinden oluşurlar (111). Bu durum mikroemülsiyonların, faz ayrımı söz konusu olduğu durumdan daha düşük bir serbest enerjiye sahip olmaları, nanoemülsiyonların ise faz ayrımı olduğu durumdan daha yüksek serbest enerjiye sahip olmaları ile açıklanabilir (112). Söz konusu terminolojik karmaşa, nanoboyutlu (1-100 nm) emülsiyonların kendiliğinden oluşabilen türü olan emülsiyonlara 'mikroemülsiyon' adının verilmiş olmasından kaynaklanmaktadır. Mikroemülsiyon kavramı ilk olarak 1981 yılında ortaya çıktığında, damlacık büyüklüğü tam olarak tanımlanmamış olsa da, söz konusu mikroemülsiyonların damlacık boyutları 5-100 nm arasında değişen büyüklüğe sahiptir (109). Bu durumda, mikro boyutta damlacıklara sahip emülsiyonların da 'mikroemülsiyon' olarak adlandırılması karmaşa yaratmaktadır (110).

Emülsiyonlarda karşılaşılan terminolojik karışıklık SEDDS formülasyonlarının adlandırılması sırasında da gözlenmektedir. Temel olarak SEDDS formülasyonları SMEDDS ve SNEDDS olarak iki gruba ayrılabilir. Söz konusu ayırım yapılırken damlacık boyutunun yanı sıra, oluşan emülsiyonun termodinamik açıdan stabilitesi de önem taşımaktadır. Ancak terminolojideki karışıklık, söz konusu sistemlerin farklı araştırmacılar tarafından farklı şekillerde tanımlanmasına neden olmaktadır (113, 114).

SEDDS formülasyonlarının tasarlanmasında hareket noktası, piyasaya çıkmaya aday yeni ilaç moleküllerinin yaklaşık %60 gibi büyük bir çoğunluğunun suda çözünürlük probleminin olmasıdır (115). SEDDS formülasyonları sayesinde formüle edilen ilaç moleküllerinin çözünürlüğü artmakta ve buna bağlı olarak da oral biyoyararlanımları iyileştirilmektedir. Bunun yanı sıra, ilaç moleküllerinin enzimatik parçalanmadan korunması da söz konusu formülasyonların sağladığı faydalardandır (116).

Kendiliğinden emülsifiye olabilen ilaç taşıyıcı sistemlerin formülasyonu sırasında, bileşenlerin formülasyon parametrelerine etkilerinin değerlendirilebilmesi amacıyla üçgen faz diyagramlarından yararlanılmaktadır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Üçgen faz diyagramı (109).

### 2.7.2. SEDDS Oluşum Mekanizmaları

Kendiliğinden emülsifikasyonun gerçekleşebilmesi için yağ – su yüzeylerarası geriliminin oldukça düşük olması ve/veya yüksek yüzeylerarası bozulma oluşması gerekmektedir. Yağ – su arayüzeyinde bozulmalar, formülasyon içerisine suyun

penetre olması ya da yardımcı çözücü olarak kullanılan maddelerin formülasyondan dışarıya doğru difüzyonu ile gerçekleşmektedir (108).

Normal koşullar altında birbiriyle karışmayan iki fazdan bir emülsiyon sistemi oluşabilmesi için dışarıdan mekanik bir enerji uygulanması ya da yüzey etkin madde gibi yüzeylerarası gerilimi düşüren bir bileşenin formülasyona eklenmesi gerekmektedir (117). Söz konusu emülsiyon sistemlerinin bazılarında dağılan fazın damlacık büyüklüğü 10 nm'den küçüktür. Bu sistemler mikroemülsiyon olarak tanımlanmaktadır. Mikroemülsiyonlar; oldukça düşük yağ/su yüzeylerarası gerilimi ile karakterizedir ve bu durum oldukça geniş yüzeylerarası alanların oluşumuna olanak vermektedir. Mikroemülsiyonlardaki damlacık büyüklüğü emülsiyonlara göre oldukça küçük olduğundan, karıştırmadan gelen artmış entropi sistemin stabilizasyonunda önemli rol oynamaktadır (117, 118).

Belirli bazı koşullar altında herhangi bir müdahale olmadan da emülsifikasyon oluşması mümkündür. Bu durum difüzyon, termal dalgalanmalar ve çok düşük (bazı durumlarda negatif) yüzeylerarası gerilim gibi dinamik süreçlerde, karıştırma olmaksızın sadece fazların bir araya getirilmesiyle de emülsifikasyon oluşmasına neden olmaktadır (119).

### **2.7.3. SEDDS Türleri**

#### **Katı SEDDS**

SEDDS formülasyonları genellikle sıvı formda hazırlansa da sıvı formülasyonların getirdiği birtakım kısıtlamalar nedeniyle son yıllarda katı SEDDS formülasyonlarının geliştirilmesi konusunda önemli adımlar atılmıştır. Sıvı SEDDS formülasyonlarının özellikle stabilite, dozlama, taşıma ve saklama konularında

getirdiği problemler nedeniyle katı SEDDS formülasyonları seçenek olarak düşünülebilir.

Katı SEDDS formülasyonlarının geliştirilmesinde ilk basamak sıvı SEDDS formülasyonlarının tasarlanmasından geçmektedir. Sıvı haldeki kendiliğinden emülsifiye olabilen bileşenler katı toz veya nanopartikül formuna getirilerek çeşitli dozaj formlarının tasarlanmasında kullanılabilir (115).

Katı SEDDS formülasyonlarında kullanılan yardımcı maddeler, sıvı SEDDS formülasyonlarından farklı olmamakla beraber, kullanılacak katılaştırma tekniğine göre ek yardımcı maddelerin formülasyona girmesi gerekmektedir.

Katı SEDDS'lerin elde edilmesinde kullanılan yöntemler aşağıda sıralanmaktadır (115, 120-122):

- Sıvı/yarı katı SEDDS'lerin kapsüle doldurulması
- Püskürterek kurutma
- Dondurarak kurutma
- Katı taşıyıcılara adsorpsiyon ve katı dispersiyon
- Eritme granülasyon (*melt granulation*)
- Eritme ekstrüzyon (*melt extrusion*)
- Yaş granülasyon

SEDDS formülasyonlarının katı taşıyıcılara adsorpsiyon ve püskürterek kurutma ile katılaştırılması sırasında tercih edilen adsorban özellikli yardımcı maddelere örnek olarak laktoz (123), polioksietilen-polioksipropilen blok kopolimeri (Pluronic F-68) (124), koloidal silikon dioksit (125-128), dekstran (126), maltodekstrin (129), trehaloz (130), mannitol (131), jelatin ve krospovidon (128) verilebilir.

Katı SEDDS formülasyonları, çeşitli dozaj formları halinde tasarlanabilmektedir. Katı SEDDS'lerin kullanım alanlarına örnek olarak kuru emülsiyonlar, kendiliğinden emülsifiye olabilen kapsüller, kendiliğinden emülsifiye olabilen geciktirilmiş/kontrollü salım tabletler, kendiliğinden emülsifiye olabilen geciktirilmiş/kontrollü salım pelletler, kendiliğinden emülsifiye olabilen katı dispersiyonlar, kendiliğinden emülsifiye olabilen boncuklar, kendiliğinden emülsifiye olabilen mikroküreler, kendiliğinden emülsifiye olabilen nanopartiküller, kendiliğinden emülsifiye olabilen supozituarlar ve kendiliğinden emülsifiye olabilen implantlar verilebilir (115, 132).

## **2.8. SEDDS Formülasyonlarının Hazırlanması ve Hazırlamada Kullanılan Yardımcı Maddeler**

SEDDS formülasyonlarında kullanılacak yardımcı maddelere karar verilirken, formüle edilecek ilaç molekülünün fizikokimyasal özellikleri, tasarlanacak sistemin ilaç çözündürme kapasitesi, formülasyonun fizyolojik dayanıklılığı gibi pek çok değişken göz önünde bulundurulmalıdır (111).

Formülasyondan gelen değişkenler ilacın çözünürlüğü ve absorpsiyon yollarını etkilediğinden, seçilecek yardımcı maddeler oldukça önemlidir.

SEDDS formülasyonuna giren maddeler yağ, yüzey etkin madde/yardımcı yüzey etkin madde ve yardımcı çözücü olarak sıralanabilir.

Tez çalışması kapsamında seçilen tüm yardımcı maddeler, oral kullanıma da uygun yardımcı maddeler arasından tercih edilmiştir.

### **2.8.1. Yağlar**

Yağlar, kendiliğinden emülsifiye olabilen sistemlerin formülasyonlarında önemli bileşenlerden biri olarak görülmektedir. SEDDS formülasyonlarının

tasarımındaki genel amaç, suda çözünürlük problemi olan etkin maddelerin oral absorpsiyonlarını artırmak olduğundan, etkin maddenin çözünmesini sağlayacak yağ fazının seçimi kritik bir basamaktır. Bunun yanı sıra yağlar, kendiliğinden emülsifikasyon işlemini kolaylaştırmanın yanında, lenfatik sistem tarafından absorpsiyonun artmasını sağlamaktadır (107).

SEDDS formülasyonlarının intestinal ve lenfatik absorpsiyonu, kullanılan trigliseridlerin seçimiyle değiştirilebilmektedir. Orta zincirli gliseritler (mono-, di-, trigliserit) ile tasarlanan formülasyonlar, intestinal absorpsiyonu artırmak amacıyla tercih edilmektedirler (116).

Orta zincirli trigliseritler, uzun zincirli trigliseritlerle karşılaştırıldığında daha yüksek çözünürlük ve kendiliğinden emülsifiye olabilme özelliğine sahip olduklarından sıklıkla tercih edilmektedirler (109). Uzun zincirli trigliseridler ile orta zincirli trigliseridler arasındaki bir diğer fark da absorbe olma bölgeleridir. Uzun zincirli trigliseridler intestinal lenfatik damarlara taşınırken orta zincirli trigliseridlerin direkt olarak portal kan damarına geçtiği belirtilmektedir (109, 133).

SEDDS formülasyonlarında kullanılabilecek olan yağlar yapı olarak genellikle yağ asidi esterleri veya orta/uzun zincirli doymuş, kısmen doymuş ya da doymamış hidrokarbonlardan oluşmaktadır (115). Modifiye edilmiş/ hidrolize bitkisel yağlar da son yıllarda sıklıkla tercih edilmektedir (107). Bu yağlar oda sıcaklığında sıvı, yarı katı veya katı formlarda olabilmektedir (115). Yağ bazlı formülasyonların geliştirilmesinde kullanılan yardımcı maddeler ele alındığında, bu yardımcı maddelerin yapı bakımından birbirinden farklı özellikler taşıdığı gözlenmektedir. Kullanılabilecek yağların esterleşme derecesi birbirinden farklı olabilmekte ve buna bağlı olarak mono-, di-, trigliseridler oluşturabilmektedirler. Bunun yanında, yağ asitleri dışında propilen glikol ve polietilen glikolün esterleri de kullanılabilmektedir.

Bu tür formülasyonlarda, kullanılan “yağ” ve “yağ benzeri” yardımcı maddeler farmasötik teknolojiler arasında “yağ” olarak tanımlanmaktadır(134). Benzer şekilde, yağ bazlı sistemlerin formülasyonunda kullanılan, uzun zincirli trigliseridler, orta zincirli trigliseridler, propilen glikol esterleri, yağ asitleri, monogliseridler, digliseridler ve yağ karışımları da “yağ” kategorisine dahil edilmektedir.

Son yıllarda, uzun ve orta zincirli trigliseridlere alternatif olarak mono-, di-, trigliserid karışımlarından oluşan yağlar SEDDS formülasyon çalışmalarına konu olmaktadır. Bu gruba giren yağlar, amfifilik özelliklerinden dolayı yüksek çözünürleştirme ve kendiliğinden emülsifiye olabilme özelliklerine sahiptirler. Söz konusu gruptaki yağlara örnek olarak Imwitor® 988, Imwitor® 308, Maisine® 35-1, Peceol® Plurol Oleique® CC49, Capryol®, Myrj® verilebilir (135).

### **2.8.2. Yüzey Etkin Maddeler / Yardımcı Yüzey Etkin Maddeler**

SEDDS formülasyonlarında sıklıkla tercih edilen yüzey etkin maddeler, iyonik olmayan yüzey etkin maddeler grubuna ait olup hidrofilik – lipofilik denge (HLB) değerleri 1 ile 20 arasında değişmektedir. İyonik olmayan yüzey etkin maddelerin formülasyon aşamasında daha çok tercih edilmelerinin nedeni, diğer yüzey etkin madde grupları ile karşılaştırıldıklarında daha az toksik olarak değerlendirilmeleridir (109). İyonik olmayan yüzey etkin maddelerin getirdiği bir diğer üstünlük ise pH ve iyon gücü değişkenlerinden az etkilenmeleridir (116).

Emülsiyonların formüle edilmesinde dikkat edilmesi gereken noktalardan biri, elde edilecek mikroemülsiyonların tipinin, seçilen yüzey etkin maddelerin HLB değerlerine göre değişiklik göstermesidir. HLB değeri 3-8 arasında değişen yüzey etkin maddeler su/yağ tipi emülsiyonlar oluşturmaya yatkın olurken, yağ/su emülsiyonları elde etmek için kullanılacak yüzey etkin maddelerin HLB değeri 8-18

arasındadır. Farklı HLB değerlerine sahip yüzey etkin maddelerin doğru oranlarda karıştırılmasıyla elde edilen formülasyonlar, yardımcı yüzey etkin maddeler olmaksızın stabil mikroemülsiyonlar oluşturabilmektedir (116). SEDDS'lerin formülasyonunda kullanılan yüzey etkin maddeler genellikle yüksek HLB değerine sahip iyonik olmayan yüzey etkin maddelerdir (107, 135). Stabil bir SEDDS formülasyonu elde edebilmek için kullanılması gereken yüzey etkin madde miktarı % 30 – 60 arasında değişmektedir (107).

SEDDS formülasyonlarında tercih edilen yüzey etkin maddeler polietilen glikol ile bitkisel yağlar arasında gerçekleştirilen reaksiyonlar sonucu türetilmiş hidrofilik özellikteki yüzey etkin maddelerdir. Kullanılan yüzey etkin maddeler arasında en popüler olanları Cremophor® türevleri olarak gösterilebilir. Cremophor® türevlerinin, P-glikoprotein inhibitörü özellikleri, pek çok çalışmaya konu olmalarını sağlamıştır (109).

D –  $\alpha$  – tokoferil polietilen glikol 1000 süksinat (TPGS veya vitamin E TPGS), polietilen glikolün vitamin E ile esterleşmesi sonucu elde edilen ve iyonik olmayan yüzey etkin madde olarak son yıllarda tercih edilen yeni bir yardımcı maddedir. TPGS farmasötik alanda SMEDDS formülasyonlarının yanı sıra nanokristaller, nanosüspansiyon, katı dispersiyon, tablet, lipozom, misel, emülsifiye nanopartikül formülasyonlarında, aşılarında adjuvan olarak ve besin desteği göreviyle de kullanılmaktadır (136).

TPGS'in üstünlükleri arasında, çok düşük konsantrasyonlarda kullanıldığında bile stabil miseller oluşturabilmesi ilk sıralarda gelmektedir. Bunların yanı sıra P-glikoprotein inhibitörü olma özelliği ve çözünürlük artırıcı yapısından dolayı antikanser ilaçların oral biyoyararlanımının artırılmasına yönelik çalışmalara sıklıkla konu olmaktadır. TPGS'in FDA onaylı bir yardımcı madde olması, ilaç taşıyıcı sistem



formülasyonlarında tercih edilme sıklığını artırmaktadır (136). TPGS, bu tez kapsamında geliştirilen formülasyonların bileşiminde de mevcuttur.

Tez çalışması kapsamında tercih edilen Labrasol; Hindistan cevizi yağında bulunan orta zincir uzunluğundaki trigliseridlerin PEG 400 ile poliglikolizi sonucu elde edilen; PEG 400'e ait mono-, di-, trigliserid ve mono-, di- yağ asidi esterlerinin karışımını içeren bir yüzey etkin maddedir (137).

Önformülasyon çalışmaları kapsamında kullanılan Gelucire 44/14, hurma çekirdek yağı ve PEG 1500'ün alkoliz/esterleşme reaksiyonu sonucu elde edilen ve ana yağ asidi bileşeni laurik asit olan bir yüzey etkin maddedir. İçeriğinde PEG 1500'den gelen mono-, di-, trigliserid ve mono-, di- yağ asidi esterleri bulunmaktadır (137).

SEDDS formülasyonlarında yardımcı yüzey etkin maddelerin kullanımı zorunlu değildir ve literatürde yardımcı yüzey etkin madde kullanılmadan formüle edilen SEDDS'lere ait çalışmalar mevcuttur (116).

### **2.8.3. Yardımcı Çözücüler**

SEDDS formülasyonlarında kullanılan yardımcı çözücülere örnek olarak polietilen glikoller, propilen glikol ve etanol verilebilir. Söz konusu yardımcı çözücülerden bazıları SEDDS formülasyonlarında aynı zamanda yardımcı yüzey etkin madde olarak da görev yapabilmektedir. Yardımcı çözücüler, kullanılan etkin maddelerin çözünürlüğünü ve hidrofilik yüzey etkin maddelerin yağ fazında dağılımını artırarak formülasyona yardımcı olmaktadır (107, 135). Yardımcı çözücü seçiminde dikkat edilmesi gereken nokta, uçucu özellik taşıyan yardımcı çözücülerin kullanıldığı durumlarda, çözücü buharlaşması nedeniyle yaşanabilecek sıkıntıların göz önünde bulundurulmasıdır (107).

## 2.9. SEDDS Formülasyonlarında Güncel Yaklaşımlar

Özellikle 1980'li yıllarda Pouton ve arkadaşlarının çalışmaları ile dikkat çeken SEDDS formülasyonları, Sandimmune® ve Neoral® formülasyonlarının klinikteki başarısı ile yükselişe geçmiştir (138).

SEDDS formülasyonları, genellikle çözünürlük sorunu görülen ilaçların (BCS Sınıf II) oral biyoyaralanımının artırılması amacıyla formüle edilmektedir. Bu sebeple, literatürde söz konusu sınıfa ait ilaçların formülasyonu ile ilgili çalışmalar çoğunluktadır. Oral biyoyaralanımlarının artırılması amacıyla SEDDS formülasyonları içerisinde uygulanan etkin maddelere örnek olarak koenzim q-10, deksibuprofen, fenitoin, nitrendipin, AMG 517 (Amgen) (139), ginkgo biloba ekstresi (140) ve karvedilol (141) verilebilir (142). Bunun yanı sıra, oral yağ bazlı kendiliğinden emülsifiye olabilen sistemlerin piyasada örnekleri bulunmaktadır (Tablo 2.3).

Günümüzde SEDDS'ler ile ilgili çalışmalar, peptit/protein yapıda ilaçların oral uygulanmasında tercih edilir olmaları ile önem kazanmıştır. SEDDS'ler hidrofilik peptit/protein yapıdaki ilaçların oral uygulamasında alternatif olarak kullanılmaktadır. SEDDS'lerin permeasyon artırıcı etkileri ve lipazlara karşı dayanıklı şekilde formüle edilebilmeleri sayesinde bu konudaki çalışmalar hız kazanmaktadır (143).

**Tablo 2.3.** Piyasada bulunan oral yağ bazlı kendiliğinden emülsifiye olabilen preparatlara örnekler (144, 145)

<b>Ticari İsim</b>	<b>Firma</b>	<b>Etkin Madde</b>	<b>Piyasadaki Formülasyon</b>	<b>FDA Tarafından Onaylandığı Yıl</b>
Accutane	Roche	İzotretinoin	Yumuşak jelatin kapsül (10, 20, 40 mg)	1982
Sandimmune	Sandoz	Siklosporin	Yumuşak jelatin kapsül (25, 50, 100 mg)	1983
Solufen	Sanofi-Aventis	İbuprofen	Sert jelatin kapsül	1989
Neoral	Novartis	Siklosporin	Yumuşak jelatin kapsül ve oral çözelti (25, 50, 100 mg)	1995
Depakene	Abbott	Valproik asit	Yumuşak jelatin kapsül (250, 500 mg)	1983
Vesanoid	Roche	Tretinoin	Yumuşak jelatin kapsül (10 mg)	1995
Norvir	Abbott, Abbvie	Ritonavir	Oral çözelti (80 mg/ml)	1996
Rocaltrol	Roche	Kalsitriol	Yumuşak jelatin kapsül (0,25, 0,5 µg)	1998
Agenerase	GlaxoSmithKline	Amprenavir	Yumuşak jelatin kapsül (50 mg)	1999

**Tablo 2.3 (Devam).** Piyasada bulunan oral yağ bazlı kendiliğinden emülsifiye olabilen preparatlara örnekler

Rapamune	Wyeth	Sirolimus	Oral çözelti (0,5, 1, 2 mg)	1999
Targretin/ Bexarotene	Ligand	Beksaroten	Yumuşak jelatin kapsül (75 mg)	1999
Gengraf	Abbott	Siklosporin A	Sert jelatin kapsül (25 mg, 100 mg)	2000
Zipsor	Xanodyne Pharma	Diklofenak potasyum	Yumuşak jelatin kapsül (25 mg)	2000
Kaletra	Abbott	Lopinavir ve Ritonavir	Oral çözelti (20 mg/ml, 80 mg/ml)	2000
Fortovase, Invirase	Hoffmann- LaRoche	Sakuinavir mezilat	Yumuşak jelatin kapsül (200 mg)	2003
Aptivus	Boehringer Ingelheim	Tipranavir	Yumuşak jelatin kapsül (250 mg)	2007

SEDDS formülasyonlarının peptit/protein ilaçların oral uygulanmasında kullanımına örnek olarak insülin molekülü ile yapılan in vitro ve in vivo çalışma verilebilir. İnsülin içeren SEDDS formülasyonları ile Caco-2 hücrelerinde yapılan hücresel alım çalışmalarında, hücrelerin tek tabakalı yapılarını koruduğu ve insülinin permeabilitesinin  $0,103 \times 10^{-6}$ 'dan  $1,23 \times 10^{-6}$ 'ya yükseldiği gözlenmiştir. Yapılan in vivo çalışmada, geliştirilen oral insülin formülasyonlarının 2,5 IU/kg dozda uygulamada, subkütan insulinle karşılaştırıldığında %15,21 oral biyoyararlanım gösterdiği belirtilmiştir (146).

Peptit/protein ilaçların SEDDS formülasyonları içerisinde uygulandığı in vivo çalışmalarda insulin dışında siklosporin, laktamaz, pidotimod (147), löprolid oleat ve löprorelin asetat etkin madde olarak kullanılmıştır (143).

SEDDS formülasyonlarının büyük bir çoğunluğu oral kullanım için tasarlanıyor olsa da özellikle son 20 yıllık süreçte oral yol dışında kullanılan SEDDS formülasyonlarına ait çalışmalar da literatürde yerini almakta ve patent başvuruları dikkat çekmektedir (144). Oral biyoyararlanımın artırılmasının yanı sıra SEDDS formülasyonları; biyofarmasötik özelliklerin iyileştirilmesi, lenfatik alımın artırılarak karaciğerde ilk geçiş etkisinin ortadan kaldırılması, buna bağlı olarak da ilk geçiş etkisine uğrayan ilaçların biyoyararlanımının artırılması; bağırsak duvarında CYP-450 enzimi aracılığıyla meydana gelen metabolizmanın ortadan kaldırılması ve oral alımda gastrointestinal iritasyona neden olan ilaçların uygulanmasında da tercih edilmektedir (144, 148).

Paklitakselin intravenöz uygulaması için tasarlanan SEDDS'ler ile 70-200 nm damlacık büyüklüğü aralığında, intravenöz uygulamaya uygun formülasyonlar elde edilmiştir. Bu sayede çözünürlük sorunu olan ilaçların organik çözücüler olmaksızın parenteral uygulama için formüle edilmesi sağlanmıştır. Elde edilen stabil

formülasyonlar içerisinde paklitaksel raf ömrü sonuna kadar parçalanmaya uğramadan muhafaza edilmiştir (149). Doseetakselin formüle edildiği SEDDS formülasyonunda ise geleneksel enjeksiyonluk preparat ile karşılaştırıldığında, eğri altı kalan alanda (AUC) 1,5 kat artış gözlenmiştir (144). Düşük çözünürlüğe sahip bir bağışıklık sistemi baskılayıcı madde olan takrolimus, SEDDS içerisinde formüle edilerek, hidrojene hint yağı türevleri ile hazırlanan mevcut formülasyon ile görülen anafilaktik şok riskinin ortadan kaldırılması amaçlanmıştır. Elde edilen formülasyonun damlacık büyüklüğü 30 nm'nin altında olup intravenöz kullanım için uygun olarak, ihmal edilebilir derecede hemolize neden olduğu gösterilmiştir (150).

Oral ve parenteral kullanıma uygun şekilde formüle edilen SEDDS'ler dışında vajinal ve dermal SEDDS uygulamaları da mevcuttur. Vajinal uygulama için tasarlanan, antimikrobiyal ve antiviral etkili kurkuminin SEDDS formülasyonlarının etkin maddeyi koruyan yağlı nanodamlacıklar içerisinde mukus tabakasında dağılması amaçlanmıştır. Formülasyonlar düşük miktarda vajinal sıvı varlığında dahi etkin bir emülsifikasyon özelliği göstermiştir. Piyasada bulunan krem preparatı ile karşılaştırıldığında, SEDDS formülasyonlarının daha etkin bir biçimde dağılarak mukustan penetrasyonu artırdığı gösterilmiştir (151).

Dermal olarak uygulanmak üzere SEDDS içerisinde formüle edilen etkin maddelere örnek olarak kuersetin verilebilir. Suda ve yağda çözünürlüğü düşük bir etkin madde olan kuersetin, kendiliğinden – çifte – emülsifiye olabilen katı sistemler aracılığıyla formüle edilerek deriye uygulandığında, etanolde hazırlanmış çözeltisine oranla deride birikme ve deriden geçişin arttığı gösterilmiştir. Sulu ortam ile muamele sonrasında Y/Y/S çifte emülsiyonu oluşturan sistemlerin, katı halde iken 4 ve 25 °C'de 30 güne kadar stabil olduğu gözlenmiştir (152).

Dermal kullanım için tasarlanan bir diğer sistem ise, derinin UV ışınlarından korunması için tasarlanan, palm yağı türevleri ile formüle edilen bir nanoemülsiyon formülasyonudur. Söz konusu formülasyon ile, antifotokarsinojenik bir molekül olan soya izoflavonu genisteinin biyouyumlu bir sistem içerisinde dermal uygulaması sağlanmış ve kültür ortamında subkütan L929 hücrelerinde UVB koruma özelliği in vitro deri reaktivite testi ile gösterilmiştir (153).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan Kimyasal Madde, Malzeme ve Aletler

##### 3.1.1. Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler

Asetik Asit (%100)	Merck, Almanya
Caco-2 hücre hattı	ANAÜ Farmakoloji ABD
Cremophor EL	Sigma, Almanya
Deoksikolik asit sodyum tuzu	Fluka, Almanya
DMEM	Hyclone, ABD
DMSO	Sigma, Almanya
Fetal Dana Serumu (FBS)	Hyclone, ABD
Formik Asit (%98)	Fluka, Almanya
Fosforik Asit	Emboy, Türkiye
Gelucire 44/14	Gattefossé, Fransa
Gliserol	Sigma, Almanya
Hidroklorik Asit	Riedel-de Haën, Almanya
Labrasol	Gattefossé, Fransa
LyP-1 Peptit	Innovagen, İsveç
LyP-1-FAM Peptit	Innovagen, İsveç
Maisine	Gattefossé, Fransa
MDA-MB 231 hücre hattı	HÜ Tıp Fak. Temel Onkoloji ABD
MTT	Sigma, Almanya
Peceol	Gattefossé, Fransa
Pen-Strep (10000 U/10000 µg/ml)	Hyclone, ABD



Poli Etilen Glikol 3000	Fluka, Almanya
Potasyum Dihidrojen Fosfat	Riedel-de Haën, Almanya
Propilen Glikol	Fluka, Almanya
Sıvı Parafin	Birpa, Türkiye
Sodyum Asetat Trihidrat	PRS-Panreac, İspanya
Sodyum Dihidrojen Fosfat	Riedel-de Haën, Almanya
Sodyum Klorür	Riedel-de Haën, Almanya
Soya Yağı	Sigma, Almanya
Tripsin EDTA	Hyclone, ABD
Triton X-100	Sigma Aldrich, Almanya
Tyloxapol	Sigma Ultra, Almanya
4T1 Hücre hattı	HÜ Tıp Fak. Temel Onkoloji ABD

### 3.1.2. Kullanılan Aletler

Akış Sitometresi	BD FACSAria II, ABD
Çok Noktalı Karıştırıcı	Variomag, ABD
Deiyonize Su Cihazı	Millipore milli Di, ABD
Floresan Mikroskop	Leica, Almanya
HPLC	Agilent 1200 Series, ABD
HPLC Degazer	Agilent G1322A, ABD
HPLC Otosampler	Agilent G1329A, ABD
HPLC Pompa	Agilent G1311A, ABD
HPLC Termostatlı Kolon Bölmesi	Agilent G1316A, ABD
HPLC UV Dedektör	Agilent G1314B, ABD

Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı	Falc F60, İtalya
İnkübatör	Sanyo, Japonya
Jel Görüntüleme Sistemi	Kodak Gel Logic 1500, ABD
Laminar Kabin	BHG 2000 S/D Faster, İtalya
Liyofilizatör	Heto PowerDry PL 3000, Danimarka
Nanosizer ZS 2000	Malvern, İngiltere
pH Metre	Sartorius PP – 20, Almanya
Synergi™ Kolon 4 µm Hydro-RP 80 Å, LC Column 250 x 4.60 mm	Phenomenex, ABD
Polarize Işık Mikroskobu	Leica DM EP, Almanya
Isıl Döngüleyici (Polimeraz Zincir Reaksiyonu Cihazı)	Thermo Scientific, Almanya
Su Banyosu	Memmert, Almanya
Terazi	Shimadzu AX 200, Japonya
Triple Quad LC/MS	Agilent Technologies, 6460, ABD
Versamax Mikroplaka Okuyucu	Molecular Devices, ABD
Vorteks	FinePCR 4S, G. Kore
XTerra Kolon, 4.6x250 mm, RP18, 5µm	Waters, ABD
Western Blot Yarı Kuru Transfer Cihazı,	Pierce, Thermo Scientific, Almanya

### **3.2. Önformülasyon Çalışmaları**

#### **3.2.1. Yardımcı Maddelerin Seçimi**

Yardımcı maddeler seçilirken literatürde yer alan SEDDS formülasyonları incelenerek kullanılabilir yardımcı maddeler ile ilgili bilgiler toplanmıştır. Elde edilmesi planlanan SMEDDS formülasyonlarının damlacık büyüklüğü değerleri göz önüne alınarak yapılan taramada ön formülasyon çalışmalarında kullanılabilir yardımcı maddeler belirlenmiştir.

Yardımcı maddelerin seçimi sırasında, formülasyonun sahip olması istenen lenfatik hedeflendirme özelliğinin sağlanması amacıyla, lenfatik absorpsiyonu artırabilecek özellikteki yağlar tercih edilmiştir.

Formülasyon çalışmalarına devam etmek üzere seçilen tüm yardımcı maddelerin oral ve parenteral kullanıma uygun özellikte olmasına dikkat edilmiştir.

#### **3.2.2. Üçgen Faz Diyagramları**

Kendiliğinden emülsifiye olabilen ilaç taşıyıcı sistemlerin elde edilebilmesi için üçgen faz diyagramlarından yararlanılmıştır. Üçgen faz diyagramları ile yürütülecek çalışmalar öncesinde, çalışılacak üçgen bileşenlerine karar verilmesi amacıyla literatürde yer alan yardımcı madde oranlarından hareketle (yüzey etkin madde %60, yağ %5, yardımcı çözücü %35) çalışılan formülasyonlar Tablo 3.1'de verilmiştir.

**Tablo 3.1.** Önformülasyon çalışmalarında kullanılan formülasyonlara ait bileşenler.

<b>Formülasyon Kodu</b>	<b>Yüzey Etkin Madde</b>	<b>Yağ</b>	<b>Yardımcı Çözücü</b>
<b>F1</b>	Labrasol:Gelucire 44/14 (1:2)	Peceol	PEG 300
<b>F2</b>	Labrasol:Gelucire 44/14 (1:2)	Maisine	PEG 300
<b>F3</b>	TPGS	Peceol	PEG 300
<b>F4</b>	TPGS	Maisine	PEG 300
<b>F5</b>	TPGS:Triton X-100 (1:1)	Peceol	PEG 300
<b>F6</b>	TPGS:Triton X-100 (1:1)	Maisine	PEG 300
<b>F7</b>	TPGS	Peceol	Propilen Glikol
<b>F8</b>	TPGS	Maisine	Propilen Glikol
<b>F9</b>	TPGS:Span 80 (1:1)	Peceol	PEG 300
<b>F10</b>	TPGS:Span 80 (1:1)	Maisine	PEG 300
<b>F11</b>	TPGS:Gelucire 44/14 (1:2)	Peceol	PEG 300
<b>F12</b>	TPGS:Gelucire 44/14 (1:2)	Maisine	PEG 300
<b>F13</b>	TPGS:Labrasol (1:2)	Peceol	PEG 300
<b>F14</b>	TPGS:Labrasol (1:2)	Maisine	PEG 300
<b>F15</b>	TPGS: Tween 80 (1:2)	Peceol	PEG 300
<b>F16</b>	TPGS: Tween 80 (1:2)	Maisine	PEG 300
<b>F17</b>	TPGS:Tyloxapol (1:2)	Peceol	PEG 300
<b>F18</b>	TPGS:Tyloxapol (1:2)	Maisine	PEG 300
<b>F19</b>	Tween 80:Na-DOC (2:1)	Peceol	PEG 300

**Tablo 3.1 (Devam).** Önformülasyon çalışmalarında kullanılan formülasyonlara ait bileşenler.

<b>F20</b>	Tween 80:Na-DOC (2:1)	Maisine	PEG 300
<b>F21</b>	Labrasol:Gelucire 44/14 (1:2)	Susam Yağı	PEG 300
<b>F22</b>	Labrasol:Gelucire 44/14 (1:2)	Soya Yağı	PEG 300
<b>F23</b>	Labrasol:Gelucire 44/14 (1:2)	Ayçiçek Yağı	PEG 300
<b>F24</b>	Labrasol:Gelucire 44/14 (1:2)	Alfa Tokoferol	PEG 300
<b>F25</b>	Labrasol:Gelucire 44/14 (1:2)	Labrafac	PEG 300
<b>F26</b>	Labrasol:Gelucire (1:2)	Labrafac	Transcutol HP
<b>F27</b>	Plurol Oleique : Labrafil M1944 (1:2)	Peceol	PEG 300
<b>F28</b>	Plurol Oleique : Labrafil M1944 (1:2)	Maisine	PEG 300
<b>F29</b>	Labrafil M1944: Gelucire 44/14 (1:2)	Peceol	PEG 300
<b>F30</b>	Labrafil M1944: Labrasol (1:2)	Peceol	PEG 300
<b>F31</b>	Labrasol:Gelucire 44/14 (1:2)	Peceol	Transcutol HP
<b>F32</b>	Labrasol:Gelucire 44/14 (1:2)	Maisine	Transcutol HP
<b>F33</b>	TPGS:Labrasol (1:5)	Peceol	PEG 300
<b>F34</b>	TPGS:Labrasol (1:5)	Maisine	PEG 300
<b>F35</b>	Labrasol:Gelucire 44/14 (1:2)	Alfa tokoferol	Transcutol HP
<b>F36</b>	Labrafil M1944: Gelucire 44/14 (1:2)	Labrafac	PEG 300
<b>F37</b>	Labrafil M1944: Labrasol (1:2)	Labrafac	PEG 300

**Tablo 3.1 (Devam).** Önformülasyon çalışmalarında kullanılan formülasyonlara ait bileşenler.

<b>F38</b>	Labrafil M1944: Gelucire 44/14 (1:2)	Alfa tokoferol	Propilen Glikol
<b>F39</b>	Labrafil M1944: Labrasol (1:2)	Alfa tokoferol	Propilen Glikol
<b>F40</b>	Labrasol : Tween 80 (1:2)	Peceol	Propilen Glikol
<b>F41</b>	Labrasol : Tween 80 (1:2)	Maisine	Propilen Glikol
<b>F42</b>	Plurol oleique:Labrafil M1944 (1:2)	Labrafac	Transcutol HP
<b>F43</b>	Plurol oleique:Labrafil M1944 (2:1)	Labrafac	Propilen Glikol
<b>F44</b>	Labrasol : Tween 80 (1:1)	Peceol	PEG 300
<b>F45</b>	Labrasol : Tween 80 (1:1)	Maisine	PEG 300
<b>F46</b>	TPGS: Labrasol (1:5)	Peceol	Propilen Glikol
<b>F47</b>	TPGS: Labrasol (1:5)	Maisine	Propilen Glikol
<b>F48</b>	Gelucire: Tween 80 (1:2)	Peceol	Propilen Glikol
<b>F49</b>	Gelucire: Tween 80 (1:2)	Maisine	Propilen Glikol
<b>F50</b>	TPGS: Tween 80 (1:5)	Peceol	PEG 300
<b>F51</b>	TPGS: Gelucire 44/14 (1:5)	Maisine	PEG 300
<b>F52</b>	Labrafil M1944: Gelucire 44/14 (2:1)	Peceol	PEG 300
<b>F53</b>	Labrafil M1944: Gelucire 44/14 (2:1)	Maisine	PEG 300

Önformülasyon çalışmalarına ait üçgen faz diyagramlarının oluşturulması amacıyla yapılan çalışmalar sonrasında fiziksel stabilite değerlendirmesi ve

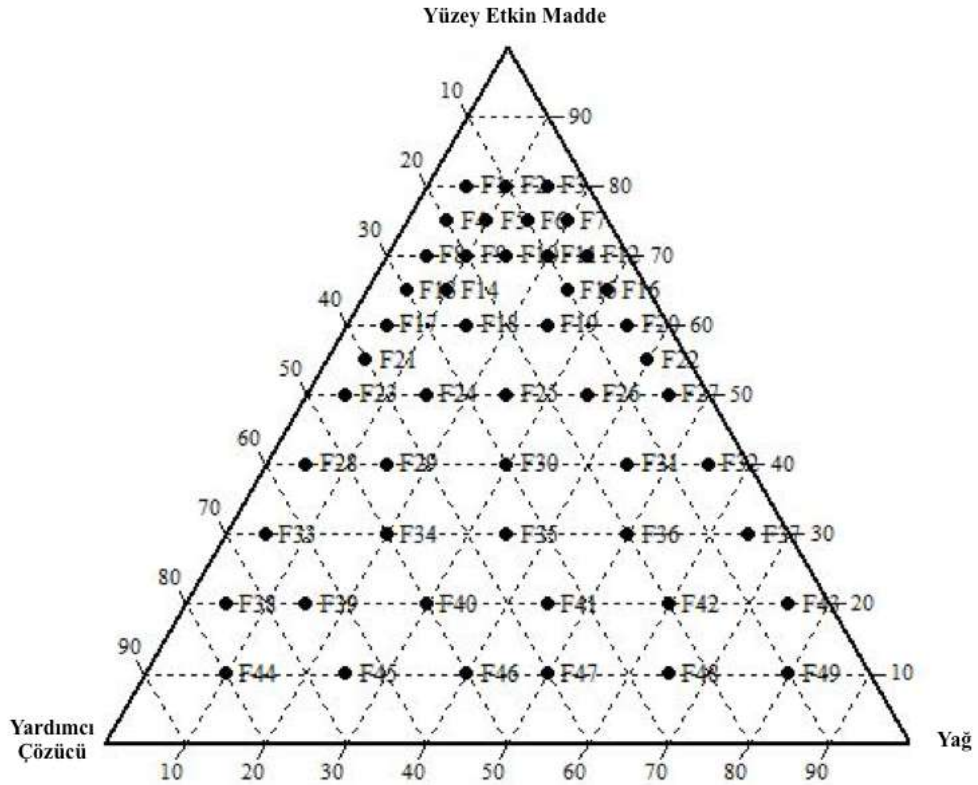
damlacık büyüklüğü ölçümleri gerçekleştirilerek takip eden çalışmalar için uygun formülasyonlar belirlenmiştir.

Sıvı formülasyonların hazırlanmasında kullanılan karışımlara ait yardımcı maddeler Tablo 3.2' de verilmiştir. Önformülasyon çalışmaları kapsamında 12 adet üçgen faz diyagramı içerisinde belirlenen 11'er adet formülasyon noktası morfolojik özellikler, sıvı kristal oluşumu ve damlacık büyüklüğü açısından değerlendirilmiştir. Değerlendirmeler sonucu, çalışılan üçgenler içerisinde 4 tanesi formülasyon çalışmaları için seçilmiştir.

**Tablo 3.2.** Önformülasyon çalışmaları kapsamında kullanılan üçgen faz diyagramlarına ait bileşenler.

Formülasyon Kodu	Yüzey Etkin Madde	Yağ	Kosolvan
U1	TPGS:Labrasol (1:5)	Peceol	PEG 300
U2	TPGS:Labrasol (1:5)	Maisine	PEG 300
U3	Labrasol : Tween 80 (1:2)	Maisine	Propilen glikol
U4	Labrasol : Tween 80 (1 :1)	Peceol	PEG 300
U5	Labrasol:Gelucire 44/14 (1:2)	Maisine	Transcutol HP
U6	Labrasol:Gelucire 44/14 (1:2)	Soya yağı	PEG 300
U7	Labrasol:Gelucire 44/14 (1:2)	Alfa tokoferol	PEG 300
U8	TPGS: Gelucire 44/14 (1:5)	Maisine	PEG 300
U9	TPGS: Labrasol (1:5)	Peceol	Propilen glikol
U10	Labrasol:Gelucire 44/14 (1:2)	Ayçiçeği Yağı	PEG 300
U11	Labrafil M1944: Gelucire 44/14 (1:2)	Peceol	PEG 300
U12	Labrasol : Tween 80 (1:2)	Peceol	PEG 300

Formülasyon çalışmaları için seçilen 4 adet üçgen faz diyagramının içerisinde belirlenen 49 adet formülasyon noktasında yapılan değerlendirmeler sonucunda SMEDDS, SNEDDS, mikronaltı emülsiyon ve faz ayrımı bölgeleri belirlenmiştir. Üçgenler üzerinde çalışılan noktalar Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



**Şekil 3.1.** Sıvı formülasyonların hazırlanmasında kullanılan üçgen faz diyagramı ve formülasyon noktaları.

### 3.2.3. Sıvı Formülasyonların Hazırlanması

#### Boş Formülasyonların Hazırlanması

Sıvı SMEDDS formülasyonlarının hazırlanması sırasında üçgen faz diyagramlarından yararlanılmıştır. Üçgen faz diyagramı üzerinden belirlenen noktalara karşılık gelen konsantrasyonlarda yağ, yüzey etkin madde ve yardımcı



çözücü, şilifli cam kaplara tartılarak yardımcı maddelerin erime sıcaklıklarının yaklaşık 5 °C üstü olan, sıcaklığı 55 °C'ye ayarlanmış su banyosunda 15 dk. boyunca erimeye bırakılmışlardır. Eriyen formülasyon karışımları, homojenliğin sağlanması amacıyla 15 dk. süreyle 700 rpm'de oda sıcaklığında karıştırılarak soğutulmuştur. Hazırlanan formülasyonlar, karakterizasyon öncesi dengeye ulaşmaları için 24 saat süreyle oda sıcaklığında bekletilmiştir.

### **Peptit İçeren Formülasyonların Hazırlanması**

Peptit içeren formülasyonlar, dengeye gelen formülasyonlara peptidin basit karıştırma yöntemi ile eklenmesi sonrasında formülasyonların seyreltilmeleriyle elde edilmişlerdir. Katı formülasyonlar ise seçilen yöntemlerle katı hale getirilmiştir.

### **Doksorubisin Hidroklorür İçeren Formülasyonların Hazırlanması**

Doksorubisin hidroklorür içeren formülasyonlar, dengeye gelen formülasyonlara etkin maddenin basit karıştırma yöntemi ile eklenmesi sonrasında formülasyonların seyreltilmeleriyle elde edilmişlerdir.

### **3.2.4. Katı Formülasyonların Hazırlanması**

Katı formülasyonların eldesinde liyofilizasyon ve püskürterek kurutma yöntemleri kullanılmıştır.

Liyofilizasyon için kullanılan yardımcı maddeler ve kullanım oranları Tablo 3.3'te gösterilmiştir. 48 saat süreyle liyofilize edilen katı toz haldeki formülasyonlarda seyreltme sonrası morfolojik inceleme, sıvı kristal oluşumu ve damlacık büyüklüğü değerlendirmesi yapılmıştır.

**Tablo 3.3 .** Liyofilizasyon için kullanılan yardımcı maddeler ve kullanım oranları.

ADSORBAN	KULLANIM ORANI (%)	
	Liyofilizasyon	Püskürterek Kurutma
Mannitol	20	-
Laktoz	10	-
Aerosil®	5	0,5
Neusilin U2®	5	0,5

Püskürterek kurutma yöntemi için kullanılan adsorbanlar ve kullanım oranları Tablo 3.3'te gösterilmiştir. Püskürterek kurutma işlemi için, adsorbanlar etanol içerisinde %0,5 oranında dağıtılarak manyetik karıştırıcı üzerinde 15 dk. süreyle 700 rpm hızla karıştırılmıştır. 15 dk. sonunda, seçilen sıvı formülasyonlar (1 ml) adsorban karışımına eklenmiş ve 15 dk. ek karıştırma sonrası Tablo 3.4'te verilen koşullarda püskürterek kurutma sağlanmıştır.

**Tablo 3.4.** Püskürterek kurutma işlemine ait koşullar.

<b>Giriş sıcaklığı</b>	60 °C
<b>Çıkış sıcaklığı</b>	44 °C
<b>Besleme</b>	%5
<b>Aspirasyon</b>	%85

Püskürterek kurutma sonrası elde edilen katı toz haldeki formülasyonlarda; sıvı formülasyonlarda olduğu gibi morfolojik inceleme, sıvı kristal oluşumu ve damlacık büyüklüğü değerlendirmesi yapılmıştır.

Liyofilizasyon ve püskürterek kurutma yöntemleri ile elde edilen formülasyonlar ayrıca tablet formunda veya kapsül içerisine doldurularak formüle edilmişlerdir. Katı formülasyonların eldesinde, sıvı formülasyonlara ait çalışmalar sonucunda uygun stabilite özellikleri gösteren ve istenen damlacık boyutlarına sahip formülasyon noktaları kullanılmıştır.

### Tablet Formülasyonları

Tablet formülasyonlarının geliştirilmesinde direkt basım ajanı olarak kullanılan yardımcı maddeler arasından seçilen bileşenler kullanılmıştır. Kullanılan yardımcı maddeler ve kullanım oranları Tablo 3.5'te verilmiştir.

Seyreltici doldurucu miktarları 200 mg'lık tablet formülasyonu için gereken madde miktarına göre belirlenmiştir. Her bir dozaj formu 0,1 mg dozda etkin madde içerecek şekilde tasarlanmıştır.

Tablet formülasyonları direkt basım sonrası %5 (a/h)'lik Eudragit S100 çözeltisi ile kaplanarak asit ortama dayanıklı hale getirilmiştir.

**Tablo 3.5.** Tablet formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan yardımcı maddeler.

Madde Fonksiyonu	Ticari İsmi	Kullanım Oranı
Seyreltici – doldurucu	Avicel® PH 102	k.m.
	Avicel® PH 200	k.m.
Dağıtıcı	Prejelatinize Mısır Nişastası (Starch 1500®)	%8
	Kroskarmelloz sodyum (Ac-Di-Sol®)	%1-3
	Mısır nişastası	%5
Kaydırıcı	Talk	%1
	Magnezyum stearat	%1

### Kapsül Formülasyonları

Kapsül formülasyonlarının hazırlanması için seyreltici – doldurucu olarak mısır nişastası kullanılmıştır.

Kapsüller her bir dozaj formu içerisinde 0,1 mg etkin madde olacak şekilde 200 mg mısır nişastası ile hazırlanmıştır. Kapsül malzemesi olarak

modifiye HPMC yapısında, Capsugel firmasına ait, asit ortama dayanıklı DRcaps™ kapsüller (size 0) kullanılmıştır.

### **3.3. Formülasyon Optimizasyonu ve Karakterizasyonu**

#### **3.3.1. Makroskopik Özellikler**

Formülasyonlar hazırlandıktan sonra, zamana karşı fiziksel stabilitelerini incelemek için berraklık, kremalaşma, faz ayrımı, renk değişimi açısından organoleptik olarak incelenmiştir.

#### **3.3.2. Mikroskopik Özellikler**

Formülasyonlar polarize ışık mikroskobu (Leica DM EP, Almanya) kullanılarak morfolojik açıdan incelenmiş ve olası sıvı kristal varlığı açısından değerlendirilmiştir. Örnekler, bir damla formülasyonun lam üzerine damlatılması ve lamel ile kapatılması ile hazırlanmıştır. İnceleme 4x, 10x ve 40x'lik büyütme altında gerçekleştirilmiştir.

#### **3.3.3. Damlacık Büyüklüğü ve Zeta Potansiyel Tayini**

Fiziksel olarak uygun bulunan formülasyonların damlacık büyüklükleri ve zeta potansiyelleri Malvern Nanosizer ZS 2000 (İngiltere) kullanılarak tayin edilmiştir. Ölçüm için formülasyon bileşenlerinin kırılma indisi ve dış faz viskoziteleri esas alınarak Standart Çalışma Prosedürü (SÇP) oluşturulmuştur. Damlacık büyüklüğü ve zeta potansiyel tayini için kapiller hücreler kullanılmıştır. Her ölçüm 3 kez tekrarlanmıştır.

### 3.3.4. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi

Formülasyon bileşenlerinin ve formülasyonların DSC analizleri DSC Q 100 (TA Instruments, ABD) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Sıvı örnekler için hermetik alüminyum örnek panı, katı örnekler için standart alüminyum örnek panı kullanılmıştır. Örnekler 5-10 mg aralığında tartılmış ve panlar sıkıca kapatılmıştır. Referans olarak örnek için tercih edilen panın boş hali kullanılmıştır. Analiz süresince örnekler azot atmosferi altında (50 ml/dk.) -25 °C'den 75 °C veya 200 °C sıcaklığa 10 °C/dk. hızla ısıtılmış ve DSC termogramları alınmıştır. Cihazın kalibrasyonu indiyum standart ile gerçekleştirilmiştir.

### 3.4. Konjugasyon Çalışmaları

#### 3.4.1. Peptit – İlaç Konjugatlarının Hazırlanması

##### LyP-1 ile NHS-Floresin Konjugatlarının Hazırlanması

Lineer veya siklik yapıdaki LyP-1 peptidi (1 mg/ml), 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> (pH 8) tamponu içerisinde çözülmüştür. 15 molar fazlalıkta 5/6 – karboksifloresin süksinimid esteri (6,8 mg) (NHS – Floresin) minimum miktarda dimetilformamit (DMF, 100 µl) içerisinde çözülmüş ve peptit çözeltisine damlatılarak eklenmiştir. Ekleme sırasında vorteks yardımıyla sürekli karıştırma uygulanmıştır. Reaksiyon karışımı buz banyosunda 2 saat süreyle inkübe edilmiş ve reaksiyona girmeyen NHS – Floresin, Sephadex G10 kolon santrifüjü yardımıyla uzaklaştırılmıştır.

##### LyP-1 ile Doksorubisinin Konjugatlarının Hazırlanması

Lineer LyP-1 peptidi (1 mg/ml), 50 mM NaCl/ 5 mM EDTA (pH 8) çözeltisi içerisinde çözülmüştür. 1,2 mg sülfö-NHS (10 mg/ml, DMSO içerisinde) ve

1,8 mg 1-etil-3-(3- dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC) (10 mg/ml, DMSO içerisinde) porsiyonlar halinde peptit çözeltisine eklenmiştir. Oda sıcaklığında 1 saatlik inkübasyon ardından 1,6 mg doksorubisin hidroklorür (2,8 mg/ml, DMF içerisinde), vorteks yardımıyla şiddetli karıştırılarak reaksiyon ortamına eklenmiştir (Şekil 3.2.c) Reaksiyon karışımı gece boyunca 4 °C'de inkübe edilmiş, ardından 50 mM NaCl/ 5 mM EDTA (pH 8) çözeltisi varlığında Sephadex G10 santrifüjü ile saflaştırılmıştır. Elde edilen konjugat Sephadex G10 kolon kromatografisi ile ikinci basamak saflaştırmaya tabi tutulmuştur.

### **3.4.2. Polimer – İlaç Konjugatlarının Hazırlanması**

#### **Doksorubisin Hidroklorürün DTPA-Polilizin ile Konjugasyonu**

2 mg sülfö-NHS ve 3 mg EDC, 0,1 M (*phosphate buffered saline – PBS*, pH 7,4) çözeltisi içerisindeki 1 ml hacimde DTPA – PL'e (1,66 mg/ml) direkt olarak eklenmiştir (154). Oda sıcaklığında gerçekleştirilen 1 saatlik inkübasyonun ardından 1,2 mg doksorubisin hidroklorür (Doks) (400 µl, DMF içerisinde), şiddetli karıştırma devam ederken reaksiyon ortamına eklenmiştir. Elde edilen örnekler Sephadex G25 kolon kromatografisi yardımıyla saflaştırılmıştır. Saflaştırılan fraksiyonlar toplanarak (1 ml), 490 nm dalga boyunda absorban ölçümü gerçekleştirilmiş ve optik yoğunluk (OD) değerlerine göre elüsyon profili oluşturulmuştur.

#### **RITC ile Poli-L-Lizin Konjugasyonu**

Poli-L-Lizin (PL, MA: 13.000 Da); 0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 8,7) içerisinde çözülmüştür. DTPA anhidritin 20 molar fazlası ile Rodamin B izotiyosiyanatın

(RITC) 20 molar fazlası 0,1 ml dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde şiddetli karıştırma altında PL çözeltisine damlatarak eklenmiştir. Karışım oda sıcaklığında 2 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası RITC ile konjuge olan DTPA-PL (DPL) karışımı Sephadex G25 kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Bu sayede DPL-RITC; serbest RITC ve DTPA'den ayrılmıştır. Saflaştırılan DPL-RITC, 100 molar fazla süksinik anhidrit (Sigma, Almanya) ile 2 saat boyunca oda sıcaklığında muamele edilmiştir. Süksinillenmiş DPL-RITC (DSPL-RITC); 0,1 M PBS (pH 7,4) varlığında diyaliz membran yardımıyla 4 °C'de gece boyu saflaştırılmıştır.

#### **Doks-DSPL-LyP-1 Konjugatlarının Hazırlanması**

PL molekülünün toplam mol sayısına oranla, her bir mol PL için 10 molar DTPA anhidrit, minimum miktarda DMSO içerisinde çözülerek PL çözeltisi içerisinde eklenmiştir. Reaksiyon karışımı 5 dk. boyunca vorteksle şiddetle karıştırıldıktan sonra 2 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 2 L 0,1 M PBS (pH 7,4) içerisinde 4 °C'de diyaliz sonrası, lizin molekülü üzerinde gerçekleşen toplam modifikasyon derecesinin tayin edilebilmesi amacıyla trinitro benzen sülfonik asit (TNBS) testi gerçekleştirilmiştir. Modifikasyon işlemi %50 derecesine gelene kadar işlem tekrarlanmıştır. İstenen dereceye ulaşıldığında 24 mol fazla miktarda bromo asetik asit N-hidroksi süksinimid esteri eklenmiştir. 4 °C'de 4 saatlik inkübasyonun ardından konjugat, Sephadex G25 kolon santrifüjü ile saflaştırılmıştır. TNBS testi tekrarlanarak D-PL konjugatlarının ε-amino gruplarında gerçekleşen ek modifikasyon derecesi belirlenmiştir.

Lineer peptit son konsantrasyonu 2,5 mg/ml olacak şekilde 5 mM EDTA içeren 0,1 M PBS içeren tampon içerisinde çözülmüş ve bromoasetillenmiş D-PL

konjugatlarına eklenmiştir. Reaksiyon karışımı 4 °C'de gece boyunca inkübe edilmiş, ardından 4 °C'de 0,1 M PBS (pH 7,4) varlığında 24 saat boyunca diyaliz edilmiştir.

Son olarak doksorubisin hidroklorür, DMSO içerisinde çözülerek (10 mg/ml, 400 µl) D-PL-LyP-1 konjugatına eklenmiştir. Reaksiyon karışımı oda sıcaklığında gece boyunca inkübasyona bırakılmış ve elde edilen D-PL-LyP-1-Doks konjugatları Sephadex G25 kolon santrifüjü ile saflaştırılmıştır. D-PL-LyP-1-Doks konjugatları son basamak olarak süksinillenerek Doks-DSPL-LyP-1 elde edilmiştir.

### **3.4.3. Bispesifik Konjugatların Hazırlanması**

#### **N-Ucu DTPA İle Modifiye Edilmiş Poliglutamik Asit Polimerinin (D-PGA-Doks) Hazırlanması**

0,1 M NaHCO<sub>3</sub> içerisinde 25 mg/ml konsantrasyonda hazırlanan Poliglutamik asit (PGA) (PLE100 poli-D-glutamik asit sodyum tuzu, MA: 15.000 Da) çözeltisi (pH 8, 500 µl), DTPA anhidratın 300 µl içerisinde çözülen yaklaşık 20 molar fazlasıyla muamele edilmiştir. Ekleme sırasında vorteks yardımıyla 5 dk. sürekli karıştırma uygulanmıştır (155, 156). Reaksiyon karışımı oda sıcaklığında 2 saat bekletildikten sonra 0,1 M (2 L) PBS (pH 7,4) ile 4 °C'de bir gece boyunca diyaliz edilerek fazla DTPA uzaklaştırılmıştır. PGA'da oluşan modifikasyon derecesi diyaliz sonrası yapılan TNBS testi ile belirlenmiştir.

PGA'ya ait karboksilik asit gruplarının aktivasyonu için 7,7 mg 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC) ve 4,6 mg sülfon-NHS direkt olarak D-PGA çözeltisi içerisine eklenmiştir. Oda sıcaklığında 1 saat inkübasyonun ardından 20 molar fazlalık Doks reaksiyon karışımına damlatılarak eklenmiştir. Ekleme



sirasında vorteks yardımıyla sürekli karıştırma uygulanmıştır. Elde edilen çözelti oda sıcaklığında ışıktan korunarak gece boyunca sürekli karıştırma altında inkübe edilmiştir.

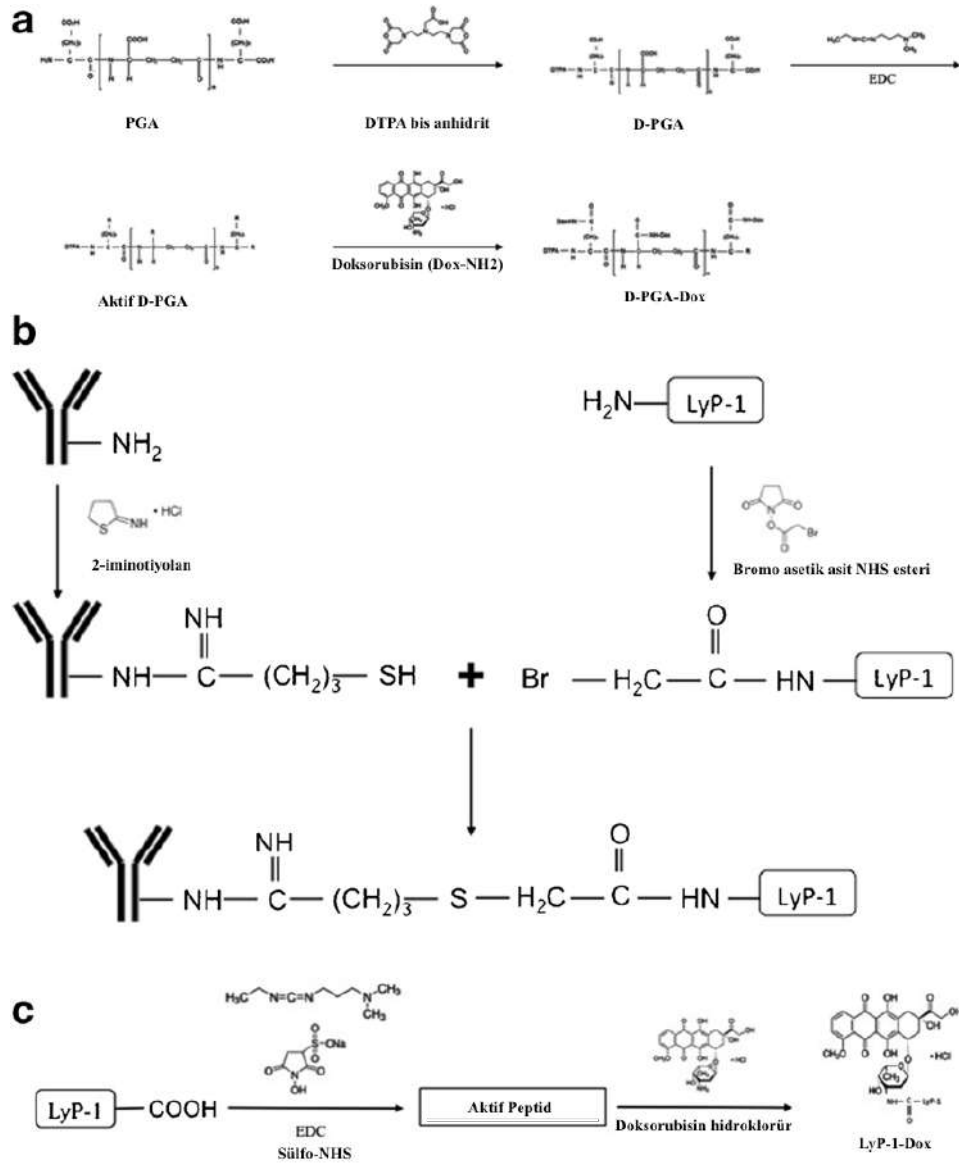
Reaksiyona girmeyen Doks'un, D-PGA-Doks konjugatından ayrılabilmesi için Sephadex G25 kolon ile saflaştırma yapılmıştır. Saflaştırılan fraksiyonlar toplanıp (1 ml), 490 nm dalga boyunda absorbans ölçümü gerçekleştirilerek optik yoğunluk (OD) değerlerine göre elüsyon profili oluşturulmuştur. D-PGA-Doks fraksiyonları toplanarak 0,1 M (2 L) PBS (pH 7,4) içerisinde 4 °C'de gece boyunca diyaliz edilerek saflaştırılmıştır.

#### **LyP-1 Bispesifik Komplekslerinin Hazırlanması**

Bütün haldeki 2C31E11 (anti-DTPA) antikoru (1 mg/ml), 50 mM NaCl/ 5 mM EDTA çözeltisi (pH 8, 2L) içerisinde 4 °C'de gece boyunca diyaliz edilerek saflaştırılmıştır. Diyaliz sonrasında anti-DTPA modifikasyonu için 50 mM NaCl/ 5 mM EDTA tamponu içerisinde çözülmüş 20 molar fazlası 2-iminotiyolan (2 mg/ml) ile 1 saat 4 °C'de muamele edilmiştir. 0,1 M PBS (pH 7,4) içerisinde çözülen LyP-1 (1 mg/ml) 24 molar fazla bromo asetik asidin N-hidroksi-süksinimid esteri (10 mg/ml, DMSO) ile 4 °C'de 7 saat muamele edilmiştir.

Modifiye edilen antikor ve LyP-1, reaksiyona girmeyen reaktiflerden, sırasıyla moleküllerin boyutuna göre seçilen Sephadex G25 ve Sephadex G10 kolonları ile santrifüj protokolü kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırma sonrası peptit ve anti-DTPA antikorunda bulunan serbest amino gruplarında gerçekleşen modifikasyon derecesinin tayin edilmesi amacıyla TNBS testi yürütülmüştür. Tiyoeter bağı yardımıyla bispesifik antikor komplekslerinin elde edilmesi amacıyla bromoasetillenmiş peptit ve tiyollenmiş antikor 4 °C'de gece boyunca

inkübe edilmiştir (Şekil 3.2.b). Konjuge edilen LyP-1-bsAbC reaksiyona girmeyen peptitlerden diyaliz membran yardımıyla ayrılmıştır (3,5 KDa molekül ağırlığı ayırma sınırı, Spectrum Labs, ABD). LyP-1–bsAbC son konsantrasyonu 280 nm dalga boyunda yapılan OD ölçümü ile belirlenmiştir.



**Şekil 3.2. a.** D-PGA-Doks sentezinin şematik gösterimi **b.** Bispesifik LyP-1-anti-DTPA antikor kompleksi (LyP-1-bsAbC) sentezinin şematik gösterimi **c.** LyP-1-Doks sentezinin şematik gösterimi.

### 3.5. Konjugatların Karakterizasyonu

Elde edilen konjugatların karakterizasyonu için ELISA testi, SDS-PAGE, FACS, *In-cell* ELISA, sitotoksisite testi ve immünohistokimya yöntemleri kullanılmıştır. Yapılan her modifikasyon sonrasında, türevlendirmelerin gerçekleştiğinin doğrulanması için TNBS testi yürütülmüştür.

#### 3.5.1. D-PGA Konjugatlarının Tayini için ELISA testi

96 kuyucuklu plaklar (yüksek bağlanma kapasiteli ELISA plakları) 1 mg/ml konsantrasyonda bovin serum albümini (BSA) ile modifiye edilmiş DTPA'nın (BSA-DTPA) 100 µl'lik porsiyonları ile kaplanmıştır. Antijenler 37 °C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Primer antikorun (2C31E11 monoklonal anti-DTPA antikor) seri dilüsyonları 0,01 to 10 µg/ml aralığında olacak şekilde plaklara eklenmiştir (n=4) ve 1 saat boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir. PGA üzerinde bulunan DTPA'nın anti-DTPA antikoruna bağlanması, kullanılan HRP (Horse Radish Peroxidase) konjuge *goat anti-mouse* IgG (GAM – HRP) sekonder antikor ile tayin edilmiştir. Sekonder antikor inkübasyonu sonrasında TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin, Enhanced K-Blue® Substrate, Neogen, ABD) ile renklendirme sağlanmış ve absorbans değerleri 630 nm dalga boyunda ELISA plak okuyucu (BioTek, ABD, Model: EL 800) ile belirlenmiştir. Ortalama ve standart hata değerleri BioTek Gen5 (BioTek, ABD) yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır.

#### 3.5.2. Modifiye Edilmiş anti-DTPA'nın İmmunoreaktivite Tayini

96 kuyucuklu plaklar (yüksek bağlanma kapasiteli ELISA plakları) 100 µl DTPA-BSA (5 µg/ml) ile kaplanmıştır. Modifiye edilmemiş (kontrol) ve tiyollenmiş

antikorlar 0,01 – 10 µg/ml konsantrasyon aralığında seri dilüsyonlar halinde kuyucuklara eklenmiştir. ELISA testi, bölüm 3.5.1.'de anlatıldığı şekliyle gerçekleştirilmiştir (n=4).

### **3.5.3. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)**

Tiyollenmiş antikorlar, indirgen olmayan SDS-PAGE yardımıyla karakterize edilmiştir. Analiz sırasında %7,5 ayrıştırıcı jel ve %4 toplayıcı jel hazırlanmıştır. Örneklerin molekül ağırlıkları, 10 – 165 kDa aralığında molekül ağırlığı standardı ile tayin edilmiştir (Sigma, Almanya). Molekül ağırlığı standardına ait jeldeki bağıl göç ( $R_f$ ) değerleri, standart eğri oluşturulmasında kullanılmış ve elde edilen bispesifik komplekslerin (LyP-1-bsAbC) molekül ağırlıkları tayin edilmiştir.

### **3.5.4. Floresan Aktive Hücre Ayırma (*Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS*) Analizi**

MDA-MB-231 hücreleri, petri kaplarına  $1 \times 10^6$  hücre yoğunluğunda ekilmiştir. %90 hücre doluluk oranına ulaşıldığında hücreler tripsinizasyon veya kazıma yolu ile toplanmıştır. Hücre pelletleri  $1 \times 10^6$  hücre/ml konsantrasyonda olacak şekilde 0,1 M PBS içerisinde tekrar süspande edilmiştir. Hedeflendirme çalışması için 100 µl porsiyonlar halinde ayrılan hücre süspansiyonları LyP-1-Doks, D-PL-LyP-1-Doks konjugatları veya tek başına Doksorubisin ile 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Tüm örneklerde son doksorubisin konsantrasyonu 5 µg/mL olacak şekilde ayarlanmıştır. İnkübasyonun ardından hücreler soğuk 0,1 M PBS ile 1000xg' de üç defa yıkanmıştır. Yıkama ve tekrar süspande etme

sonrasında işaretleme yapılan hücreler akış sitometresi (Calibur Instrument, BD Biosciences, ABD) kullanılarak belirlenmiştir (kaynak enerji: 15 mW; tayin zamanı: 500 sayım/dk.). Veriler analiz başına 10.000 hücre olacak şekilde “*Forward Light Scatter (FSC)*” and “*Side Light Scatter (SSC)*” olarak görüntenmiştir. Veriler BD CellQuest Pro Analiz Programı (BD Biosciences, ABD) kullanılarak değerlendirilmiştir.

### **3.5.5. *In-Cell* ELISA**

MDA-MB-231 hücreleri ( $2 \times 10^4$  hücre/kuyucuk) 96 kuyucuklu plaklara ekilmiştir. Analiz öncesi hücreler 37 °C’de inkübe edilerek plakalara yapışmaları sağlanmıştır. Hücreler üzerinde bulunan ortam uzaklaştırılmış ve PBS ile yıkama sonrası %4 paraformaldehit varlığında sabitlenmiştir. Hücrelerin permeabilize edilmesi için PBS içerisinde hazırlanan %0,1 Triton X kullanılmıştır. Bloklama için %3’lük BSA çözeltilisi kullanılmıştır. Hücreler LyP-1-bsAbC (5 µg/ml) veya anti-DTPA (5 µg/ml) ile 4 °C’de gece boyunca inkübe edilmiştir. Sekonder antikor olarak 1:1000 dilüsyonda GAM-HRP kullanılmıştır. Sekonder antikor inkübasyonu sonrasında TMB (Enhanced K-Blue® Substrate, Neogen, ABD) ile renklendirme sağlanmış ve absorbans değerleri 630 nm dalga boyunda ELISA plak okuyucu (BioTek, ABD, Model: EL 800) ile belirlenmiştir. Ortalama ve standart hata değerleri BioTek Gen5 (BioTek, ABD) yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır.

### **3.5.6. İmmünoSitokimya Çalışmaları**

MDA-MB-231 hücreleri  $4 \times 10^4$  /kuyucuk konsantrasyonda 24 kuyucuklu plaklara ekilmiştir. Kültür ortamı uzaklaştırdıktan sonra 400 µl porsiyonlar

halinde lineer LyP-1-Floresin, siklik LyP-1-Floresin veya tek başına floresin grupları 37 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında hücreler asetonla (4 °C) sabitlenip permeabilize edilmiştir. Sabitlenen hücrelerin çekirdekleri DAPI (2-(4-amidinofenil)-1H-indol-6-karboksamidin) ile (1 µg/ml) inkübe edilerek boyanmıştır.

Ön hedeflendirme için hücreler LyP-1-bsAbC (20 µg/ml) ile 30 dk. – 3 sa. aralığında değişen süreler boyunca inkübe edilmiştir. Belirlenen zaman noktaları sonunda ortam ile yıkanan hücreler 20x DSPL-RITC (1:50 dilüsyon) ile 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında hücreler asetonla (4 °C) sabitlenip permeabilize edilmiştir. Sabitlenen hücrelerin çekirdekleri DAPI (2-(4-amidinofenil)-1H-indol-6-karboksamidin) ile (1 µg/ml) inkübe edilerek boyanmıştır. Floresan şiddet ölçümü değerleri ImageJ Programı, NIH, ABD kullanılarak analiz edilmiştir.

### **3.6. Etkin Madde Miktar Tayin Yöntemi Geliştirilmesi ve Validasyonu**

#### **3.6.1. HPLC Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu**

Siklik LyP-1'e ait miktar tayini HPLC cihazı ve sisteme entegre bir UV dedektör kullanılarak yapılmıştır. Tayin için C18 ters faz kolon (4,6 x 250 mm, 5µm) kullanılmıştır. Biyoaktif bir peptit olan etkin maddenin miktar tayini için, peptit ve proteinlerin miktar tayininde tercih edilen gradyan elüsyon yöntemi kullanılmıştır (157-160). Analiz süresi 15 dk., analiz sonrasında bekleme süresi 2 dk. olarak belirlenmiştir.

Gradyan yöntemde hareketli faz olarak su (%0,1 TFA): asetonitril (%0,1 TFA) (h/h) kullanılmıştır. Analiz süresince hareketli faz bileşimi zamana bağlı

olarak değiştirilerek sistem uygunluk parametrelerini karşılayan piklerin elde edilmesi sağlanmıştır. Bu amaçla analize %100 su (%0,1 TFA) ile başlanmış olup, 2 dk. sonunda %2 asetonitril (%0,1 TFA) / dk. olacak şekilde 10 dk. boyunca akış sağlanmıştır. Analizin 12. dakikasında başlangıç konsantrasyonlarına dönülerek 3 dakika boyunca %100 su (%0,1 TFA) hareketli fazı ile analiz sonlandırılmıştır. Toplam analiz süresi her bir örnek için 15 dk., akış hızı 1 ml/dk. ve enjeksiyon hacmi 35 µL olarak belirlenmiştir. Analiz için 215 nm dalga boyunda UV dedektör kullanılarak sinyal alınması sağlanmıştır.

HPLC yönteminin validasyonu "*ICH Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)*" stabilite kılavuzu esas alınarak gerçekleştirilmiştir (160).

### **Doğrusallık**

Bir analitik yöntemin doğrusallığı; deney bulgularının örnek içindeki madde konsantrasyonu ile orantılı bir şekilde belirli bir aralıkta bulunması olarak tanımlanmaktadır. Doğrusallık analizi yapılacak olan etkin maddeye ait cevap pik alanı, etkin maddenin kullanılan konsantrasyonları ile doğrudan orantılı olmalıdır.

Doğrusallık için LyP-1 peptidinin saf suda çözülmesi ile hazırlanan standart numuneler kullanılarak altı noktalı kalibrasyon doğrusu oluşturulmuştur. 200 µg/ml konsantrasyondan yola çıkılarak seri dilüsyonlar ile elde edilen 150, 100, 75, 50 ve 25 µg/ml derişimlerdeki örneklerin analizi HPLC ile yapılmış ve pik alanları elde edilmiştir. Doğrusallık sonucunda maddenin konsantrasyonu ile değişen pik alanı arasındaki ilişkinin doğrusal olduğu aralık belirlenmiştir.

### **Doğruluk**

Bir analitik yöntemin doğruluğu; o yöntem kullanılarak elde edilen sonuçların gerçek değere yakınlıkları olarak tanımlanabilir. Doğruluğun gösterilmesi amacıyla düşük, orta ve yüksek derişimde üç konsantrasyonda seçilen örnekler analiz edilerek (n=3) % geri kazanımları ve % Bias değerleri hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Geri Kazanım} = (\text{Tayin Edilen Derişim} / \text{Eklenen Derişim}) \times 100$$

$$\% \text{ Bias} = (\text{Eklenen Derişim} - \text{Tayin Edilen Derişim}) / \text{Eklenen Derişim} \times 100$$

### **Kesinlik**

Kesinlik; bir yöntemin birbirini takip eden ölçümleri arasındaki yakınlığın derecesini ifade etmektedir. Yöntemin kesinliği, herhangi bir değer tekrarlanabilme kabiliyeti veya bireysel test sonuçlarının birbirine yakınlığının bir derecesidir. Standart sapma (SS) ve varyasyon katsayısı (% VK) ile ifade edilir.

### ***Tekrarlanabilirlik***

Tekrarlanabilirlik; aynı deney koşullarında kısa bir zaman aralığı içerisinde yapılan ölçümler arasındaki kesinliği belirtir. Tek derişimdeki aynı peptid çözeltilisinden art arda 6 ölçüm yapılması ile bu ölçümlerde bulunan pik alanlarından elde edilen derişim değerlerinin birbiri ile yakınlığı  $X_{ort}$ , SS ve VK hesaplanarak bulunmuştur. Tekrarlanabilirlik için ölçümler arası varyasyon katsayısının %2'den küçük olması gerekmektedir. Tekrarlanabilirlik için 200 µg/ml konsantrasyonda örneğin art arda yapılan 6 enjeksiyonu sonucu pik



alanlarına karşılık gelen derişimler bulunmuş, ortalama ( $X_{ort}$ ), standart sapma (SS) ve varyasyon katsayıları (% VK) hesaplanmıştır.

### ***Tekrar elde edilebilirlik***

Tekrar elde edilebilirlik; aynı yöntemin farklı deney zamanlarında uygulanması ile elde edilen değerlerin kesinliğini gösterir. Tek derişimdeki 6 farklı peptit çözeltilisinden yapılan ölçümler sonucu bulunan pik alanlarından elde edilen derişim değerlerinin birbiri ile yakınlığı  $X_{ort}$ , SS ve %VK hesaplanarak bulunmuştur. Tekrar elde edilebilirlik için ölçümler arası varyasyon katsayısının %2' den küçük olması gerekmektedir. Tekrar elde edilebilirlik için 200 µg/ml konsantrasyonda örneğin iki gün art arda yapılan 6 enjeksiyonu sonucu pik alanlarına karşılık gelen konsantrasyonlar bulunmuş, ortalama ( $X_{ort}$ ), standart sapma (SS) ve varyasyon katsayıları (% VK) hesaplanmıştır.

### **Duyarlılık**

Duyarlılık kapsamında; geliştirilen yöntem ile en fazla ne kadar madde saptanabileceği ve miktar tayini yapılabileceği belirlenmiştir. Genel olarak, saptama sınırı (LOD) sinyal:gürültü oranınının 3:1, tayin edilebilirlik sınırı (LOQ) ise sinyal:gürültü oranınının 10:1 olduğu konsantrasyon olarak tanımlanmaktadır. Saptama sınırı ve tayin edilebilirlik sınırını elde etmek için çeşitli yöntemler bulunmasına rağmen, bu çalışmada kalibrasyon doğrusunun eğimi ve y-kesişim değerlerine ait standart sapma değeri ( $\sigma$ ) kullanılarak aşağıda verilen denklemlerden faydalanılmıştır.

$$\text{LOD} = 3,3 (\sigma/\text{Eğim})$$

$$\text{LOQ} = 10 (\sigma/\text{Eğim})$$

### **Özgünlük**

Kullanılan analitik yöntem ile tayin edilecek maddeye ait pikin analiz edilecek örnek içerisinde başka bileşenlerin varlığında (yardımcı maddeler, safsızlık, parçalanma ürünleri vb.) dahi girişim olmadan saptanabilmesidir. Bu kapsamda boş formülasyon ve formülasyona ait bileşenler tek başına analiz edilerek, etkin maddeye ait pikin herhangi başka bir maddeye ait pik ile girişim yapmadığı gösterilmiştir.

### **3.6.2. LC-MS/MS Yönteminin Geliştirmesi**

Hücre kültürü ve dissolüsyon çalışmaları kapsamında yürütülen deneyler sırasında kullanılan LyP-1 peptit miktarlarının, geliştirilen HPLC yöntemi ile tayin edilebilen aralık dışında kalması sebebiyle, söz konusu çalışmalar için LC-MS/MS yöntemi geliştirilmiştir.

LyP-1'e ait miktar tayini LC/MS cihazı ve sisteme entegre Triple Quad dedektör kullanılarak yapılmıştır. Tayin için hidro C18 ters faz LC-MS kolonu (250 x 4,60 mm, 4 µm, 80 Å) kullanılmıştır. Etkin maddenin miktar tayini için, peptit ve proteinlerin miktar tayininde sıklıkla tercih edilen gradyan elüsyon yöntemi kullanılmıştır.

Gradyan yöntemde hareketli faz olarak su (%0,1 Formik asit):asetonitril (%0,1 Formik asit) (h/h) kullanılmıştır. Analiz süresince hareketli faz bileşimi zamana bağlı olarak değiştirilerek sistem uygunluk parametrelerini karşılayan

piklerin elde edilmesi sağlanmıştır. Yöntemde akış hızı 0,5 ml/dk., enjeksiyon hacmi 1 µL olarak belirlenmiştir. Analiz süresi 16 dk., analiz sonrası süre 9 dk. olarak optimize edilmiştir.

### 3.7. Stabilite Çalışmaları

#### 3.7.1. Etkin Maddenin Stabilitesi

Siklik yapıdaki LyP-1 peptidinin parçalanma kinetiğinin ve pH–hız profilinin belirlenmesi amacıyla 12 farklı pH'daki stabilitesi incelenmiştir. pH 3 – pH 10 aralığında yer alan tamponlar için üç farklı molar konsantrasyonda çözelti hazırlanarak konsantrasyonun peptidin stabilitesine olan etkisi incelenmiştir. pH 1 için 0,1 M ve pH 2 için 0,01 M HCl çözeltileri, pH 11 için 0,025 M fosfat tamponu ve pH 12 için 0,01 M NaOH çözeltisi kullanılmıştır. Tampon çözeltilerin hazırlanmasında USP 29 – NF 24'te yer alan standart tampon çözeltilerinin hazırlanmasında kullanılan miktarlar üzerinden tartımlar gerçekleştirilmiştir.

Tamponlar için gerekli miktarda tampon tuzu tartılmış ve suda çözülmüştür. Uygun asit veya bazlarla pH ayarlanmasını takiben belirlenen hacme su ile tamamlama yapılmıştır. Çeşitli konsantrasyonlardaki tampon çözeltileri, stok tampon çözeltisinden hareketle hazırlanan seyreltmeler ile elde edilmiştir. İyon şiddetinin 0,15'e ayarlanması için gereken NaCl miktarları aşağıda verilen formül ile hesaplanmıştır.

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n C_i Z_i^2 \quad (C_i: \text{molar konsantrasyon, } z_i: \text{iyon yükü})$$

Kullanılan tampon türleri ve derişimleri Tablo 3.6'da verilmiştir. Suda 200 µg/ml konsantrasyonda hazırlanan LyP-1 peptidine ait stok çözeltisi, hesaplanan konsantrasyonun iki katı konsantrasyonda hazırlanan tampon çözeltileri ile 1:1 oranında seyreltilerek tabloda verilen konsantrasyonlarda 100 µg/ml peptit içeren tampon çözeltileri elde edilmiştir. Hazırlanan çözeltiler 37 °C sıcaklıkta bekletilmiş ve belirlenen zaman noktalarında alınan örnekler -20 °C' de saklanmıştır.

**Tablo 3.6.** Etkin maddeye ait stabilite çalışmalarında kullanılan tamponlar.

pH	Tampon Türü	Konsantrasyon (M)
1	HCl	0,1
2	HCl	0,01
3	Fosfat	0,1
		0,05
		0,025
4	Asetat	0,2
		0,1
		0,05
5	Asetat	0,2
		0,1
		0,05
6	Fosfat	0,05
		0,025
		0,0125
7	Fosfat	0,05
		0,025
		0,0125
8	Tris	0,05
		0,025
		0,0125
9	Tris	0,05
		0,025

		0,0125
<b>10</b>	Karbonat	0,025
		0,0125
		0,00625
<b>11</b>	Fosfat	0,025
<b>12</b>	NaOH	0,01

Farklı pH'larda yürütülen stabilite çalışmalarında zamana bağlı olarak değişen peptit konsantrasyonları aşağıda verilen denklemlerde yerine konularak parçalanma hız sabitleri ( $k_{obs}$ ) ve yarılanma ömürleri ( $t_{1/2}$ ) hesaplanmıştır.

$$\log \% C = \log \% C_0 - (k_{obs}/2,303)t$$

$$t_{1/2} = 0,693/k_{obs}$$

Sıcaklığın reaksiyon hızı üzerindeki etkisinin incelenmesi amacıyla Arrhenius denkleminde yararlanılmıştır.

$$\ln k = \ln A - (E_a/R) \times (1/T)$$

Söz konusu eşitlikte "k" reaksiyon hız sabitini, "A" moleküllerin birbirine çarpma hızını, "E<sub>a</sub>" aktivasyon enerjisini (kal/mol), "R" gaz sabitini (1,987 kal/°C/mol) ve "T" mutlak sıcaklığı (°K) temsil etmektedir(161). Arrhenius eğrilerinin oluşturulması amacıyla üç farklı pH için farklı sıcaklıklardaki parçalanma hız sabitleri mutlak sıcaklığa karşı grafiğe geçirilerek aktivasyon enerjileri hesaplanmıştır.

### 3.7.2. Formülasyonların Stabilitesi

Formülasyonların stabilitesinin değerlendirilebilmesi için önformülasyon çalışmaları sonucunda hazırlanan ve uygun fiziksel özellikler gösteren formülasyonlar 14 gün süresince makroskobik ve mikroskobik özellikler ile damlacık büyüklüğü ve zeta potansiyel değerleri açısından değerlendirilmiştir.

### 3.8. Dissolüsyon Çalışması

Dissolüsyon çalışması kapsamında, elde edilen katı formülasyonların tablet haline getirilerek metakrilat türevleri ile kaplanmış dozaj formları ve kapsül içerisine doldurularak elde edilen dozaj formları kullanılmıştır.

Her bir katı dozaj formu, içerisinde 0,1 mg peptit içerecek şekilde formüle edilmiştir. Tablet ve kapsüllerin hazırlanmasında kullanılan ve sıvı formülasyonlardan hareketle elde edilen katı SEDDS formülasyonları Tablo 3.7'de verilmiştir.

**Tablo 3.7.** Dissolüsyon çalışmaları kapsamında kullanılan formülasyonlar

Formülasyon Kodu	Kullanılan Sıvı Formülasyon	Kullanılan Yöntem	Kullanılan Adsorban	Katı Dozaj Formu
TSD –U9F21	U9 – F21	Püskürterek Kurutma	Aerosil	Tablet
KSD –U9F21	U9 – F21	Püskürterek Kurutma	Aerosil	Kapsül
TLYO – U9F21	U9 – F21	Liyofilizasyon	Mannitol	Tablet
KLYO – U9F21	U9 – F21	Liyofilizasyon	Mannitol	Kapsül

Çalışmalar kapsamında USP 29 – NF 24'te yer alan “geciktirilmiş salım sağlayan dozaj formları”na ait monografda yer alan dissolüsyon ortamları kullanılmıştır. Bu amaçla asit ortamı olarak USP 29 – NF 24' te yer alan monografa uygun olarak hazırlanan 0,1 N HCl, tampon ortamı olarak 0,1 N HCl ve 0,2 M tribazik sodyum fosfat (3:1) karışımı kullanılmıştır (pH 6,8). Dozaj formları asit ortamda 2 saat süreyle 100 rpm hızda karıştırıldıktan sonra tampon ortamına alınarak tamamen dağılana kadar 100 rpm hızda karıştırma sağlanmıştır. Deneyler 60 ml asit ortamı ve 80 ml tampon (0,1 N HCl ve 0,2 M tribazik sodyum fosfat – 3:1) ortamında gerçekleştirilmiştir. Belirtilen dozaj formlarının her biri 0,1 mg peptit içerek şekilde hazırlanmıştır. Belirlenen süreler sonunda alınan örnekler analiz öncesi -20 °C'de saklanmıştır.

Söz konusu dozaj formlarının içerdiği peptit miktarlarının HPLC yöntemi ile tayininin mümkün olmaması sebebiyle analizler geliştirilen LC-MS/MS yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

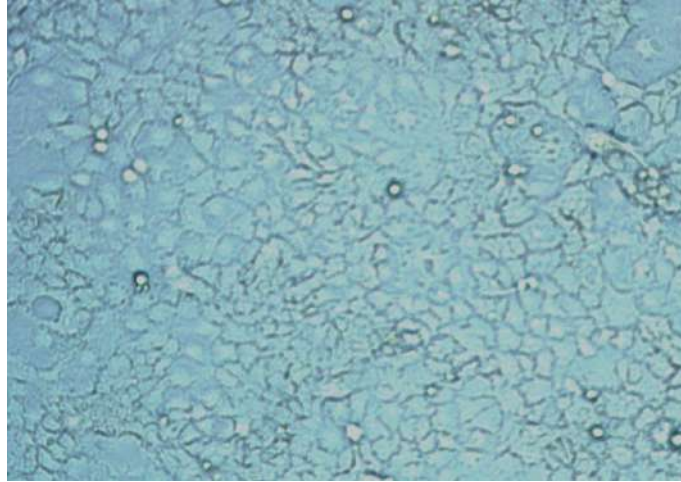
### **3.9. Hücre Kültürü Çalışmaları**

Hücre kültürü çalışmaları kapsamında sitotoksite deneylerinde Caco-2 (insan kolorektal kanser) hücre hattı, biyoaktivite ve hücresel alım çalışmalarında ise MDA-MB-231 (insan meme kanseri) ve 4T1 (fare meme kanseri) hücre hattı kullanılmıştır.

### 3.9.1. Formülasyonlara Ait Çalışmalar

#### Sitotoksisite Çalışmaları

Sitotoksisite çalışmaları, bağırsak hücrelerini taklit etmesi sebebiyle tercih edilen Caco-2 hücre hattı (pasaj 5-13) ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3).



**Şekil 3.3.** Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan Caco-2 hücre hattı.

Hücreler DMEM besiyeri kullanılarak 25 cm<sup>2</sup>'lik flasklara ekilmiştir. DMEM besiyeri 4mM L-Glutamin ve Sodyum Pirüvat, %10 FBS, %0,5 Penisilin (10.000 ünite) ve streptomisin sülfat (10.000 µg/ml) içerecek şekilde hazırlanmıştır. Hücreler 37 °C'de, %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübasyona bırakılmıştır. %80 doluluğa erişen flasklarda yer alan hücreler %0,025 konsantrasyonda tripsin – EDTA çözeltisi ile kaldırılıp yeniden süspande edildikten sonra tripan mavisi ile boyanarak hemositometre yardımıyla hücre konsantrasyonları saptanmıştır.

Sitotoksisite testi için 5x10<sup>3</sup> hücre/kuyucuk olacak şekilde 96'lık plaklara ekim yapılmıştır. Ekilen hücreler, hücre büyütmede kullanılan koşullar altında 24 saat bekletilmiştir. 24 saatin ardından boşaltılan kuyucuklara; boş/peptit içeren

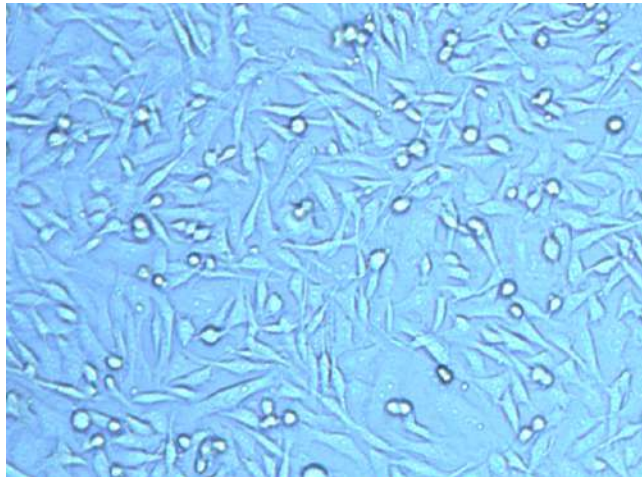


formülasyonlar, besiyeri içerisinde 100 µl hacimde çeşitli dilüsyonlarla uygulanmış; 24 ve 48 saatlik sürelerin sonunda hücre canlılıkları değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak besiyeri kullanılmıştır.

Hücre canlılığının tespit edilebilmesi amacıyla MTT yöntemi (3-[4,5-dimetil tiyazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolyum bromür) kullanılmıştır. Formülasyon uygulanan plaklara belirlenen sürelerin sonunda 25 µl %0,5'lik MTT çözeltisi eklenmiş ve 4 saat beklenmiştir. 4 saat sonunda oluşan mor renkli formazan kristallerini çözmek için her bir kuyucuğa 80 µl %23'lük SDS çözeltisi ilave edilmiştir. Gece boyunca bekletilen plaklarda oluşan mor rengin absorbansı 570 nm'de ELISA plak okuyucu ile ölçülmüştür.

### **Biyoaktivite Çalışmaları**

Biyoaktivite çalışmaları, MDA-MB-231 insan meme kanseri ve 4T1 fare meme kanseri hücre hattı ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.4).



**Şekil 3.4.** Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan MDA-MB-231 hücre hattı.

Hücreler, MDA-MB-231 için DMEM besiyeri ve 4T1 hücre hattı için RPMI 1640 besiyeri kullanılarak 75 cm<sup>2</sup>'lik flaklara ekilmiştir. DMEM besiyeri 4,5 g/L Glukoz, 4mM L-Glutamin ve Sodyum Pirüvat, %10 FBS, %0,5 Penisilin (10.000 ünite)

ve Streptomisin Sülfat (10.000 µg/ml) içerecek şekilde ayarlanmıştır. Hücreler 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübasyona bırakılmıştır. %80 doluluğa erişen flasklarda yer alan hücreler %0,25 konsantrasyonda tripsin – EDTA çözeltisi ile kaldırılıp yeniden süspande edildikten sonra tripan mavisini ile boyanarak hemositometre yardımıyla hücre konsantrasyonları saptanmıştır.

Biyoaktivite testi için  $2 \times 10^4$  hücre/kuyucuk olacak şekilde 96'lık plaklara  $4 \times 10^5$  hücre/ml konsantrasyonda ekim yapılmıştır. Ekilen hücreler, hücre büyütmede kullanılan koşullar altında 24 saat bekletilmiştir (Bkz. Bölüm 3.9.1). 24 saatin ardından besiyeri ile seyreltilen boş ve etkin madde içeren formülasyonlar kuyucuklara toplam hacim 100 µl olacak şekilde 2 katı konsantrasyonda uygulanmış, 24 ve 48 saatlik sürelerin sonunda hücre canlılıkları değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak besiyeri kullanılmıştır.

Hücre canlılığının tespit edilebilmesi amacıyla MTT yöntemi (3-[4,5-dimetilltiyazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolyum bromür) kullanılmıştır. 24. ve 48. saat sonunda kuyucuklara 25 µl %0,5'lik MTT çözeltisi eklenmiş ve 4 saat beklenmiştir. 4 saat sonunda oluşan mor renkli formazan kristallerini çözmek için her bir kuyucuğa 80 µl %23'lük SDS çözeltisi ilave edilmiştir. Oluşan mor rengin absorbansı 570 nm'de ELISA plak okuyucu ile ölçülmüştür.

### **Transport Çalışmaları**

Transport çalışmaları, bağırsak hücrelerinin tek tabakalı yapısını taklit etmesi sebebiyle tercih edilen Caco-2 hücre hattı (pasaj 5-13) ile gerçekleştirilmiştir.

Hücreler RPMI-1640 besiyeri kullanılarak 75 cm<sup>2</sup>'lik flasklara ekilmiştir. RPMI-1640 besiyeri 4mM L-Glutamin ve Sodyum Pirüvat, %10 FBS, %0,5 Penisilin (10.000 ünite) ve streptomisin sülfat (10.000 µg/ml) içerecek şekilde hazırlanmıştır. Hücreler

37 °C'de, %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübasyona bırakılmıştır. %80 doluluğa erişen flasklarda yer alan hücreler %0,025 konsantrasyonda tripsin – EDTA çözeltisi ile kaldırılıp yeniden süspande edildikten sonra tripan mavisini ile boyanarak hemositometre yardımıyla hücre konsantrasyonları saptanmıştır.

Transport çalışması için tripan mavisini ile sayım yapıldıktan sonra  $12 \times 10^4$  hücre/ml olacak şekilde insertlere (ThinCerts, 12 kuyucuk, 1 µM por çapı, transparan) ekim yapılmıştır. Apikal bölüme 0,5 ml ve bazolateral bölüme 1 ml ortam eklenmiştir. Plaklar 37 °C'de, %5 CO<sub>2</sub> içeren nemli havada inkübe edilmiştir. Kültür ortamı gün aşırı değiştirilmiş, transport çalışmaları 21 gün sonra hücre tek tabakası doluluğa ulaşıncaya gerçekleştirilmiştir.

21 gün sonunda apikal ve bazolateral bölümlerde bulunan besiyeri boşaltılarak apikal yüze 0,5 ml, bazolateral yüze 1 ml 10 mM HEPES içeren HBSS (fenol kırmızısı içermeyen) uygulanarak hücreler yıkanmıştır. Yıkama işlemi sonrası apikal bölüme transport ortamı içerisinde 0,1 mg/ml konsantrasyonda peptid içeren formülasyonlar uygulanarak 60 rpm hızda çalkama ile 37 °C'lik su banyosunda 2 saat süreyle bekletilmiştir. 2 saatin sonunda bazolateral bölümde yer alan ortam toplanarak analiz için -20 °C'de saklanmıştır. Örneklerin analizi, geliştirilen LC-MS/MS yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

### **Caco-2 Tek Tabaka Hücre Bütünlüğünün Değerlendirilmesi**

Hücre tek tabakasının bütünlüğü transepitel elektrik direnci (TEER) ölçümü yapılarak değerlendirilmiştir. Caco-2 hücre tek tabakalarının TEER değerleri, Millicell–ERS epitel voltmetre ile ölçülmüştür. Kültürdeki membran potansiyelini ve epitel hücrelerin rezistansını güvenilir bir biçimde ölçen Millicell – ERS (elektrik rezistans sistemi), kalitatif olarak hücre tek tabaka bütünlüğünü ve kantitatif olarak

hücre doluluğunu göstermektedir. Deneyler sırasında, elektrik rezistansı  $300 \Omega \cdot \text{cm}^2$  ve üzeri değerde olan hücre tabakaları kullanılmıştır.

### **Hücre İçine Alım Çalışmaları**

Hücre içi alım çalışmaları peptidin p32 ifade eden 4T1 hücrelerine giriş mekanizmalarının araştırılması amacıyla gerçekleştirilmiştir. Hücreler 6 kuyucuklu plaklara  $2 \times 10^5$  hücre/ml konsantrasyonda ekilerek gece boyunca besiyeri varlığında büyümeye bırakılmıştır. Kültür ortamı toplanan hücrelere serumsuz besiyeri içerisinde LyP-1-FAM, formülasyon içerisinde LyP-1-FAM ve kontrol olarak tek başına FAM; artan konsantrasyonlarda (1,3,9 ve 27  $\mu\text{M}$ ) uygulanmıştır. 4 °C ve 37 °C'de 1 ve 5 saatlik inkübasyon sonrası PBS ile yıkanan hücreler tripsin-EDTA çözeltisi ile kaldırılıp yeniden süspande edilmiş, akış sitometresi ile floresan şiddeti ölçülmüştür.

### **3.9.2. Konjugatlara Ait Çalışmalar**

#### **Biyoaktivite Çalışmaları**

Konjugatlara ait biyoaktivite ve immünositokimya çalışmaları kapsamında MDA-MB-231 hücre hattı kullanılmıştır. Hücreler DMEM (4,5 g/L, 4 mM L-Glutamin, sodyum piruvat, %10 FBS, %0,5 Penisilin, 10.000 ünite ve streptomisin sülfat, 10.000  $\mu\text{g/ml}$ ) besiyeri kullanılarak 25  $\text{cm}^2$ 'lik flaslara ekilmiştir ve 37 °C'de, %5  $\text{CO}_2$  içeren ortamda inkübasyona bırakılmıştır. %80 doluluğa erişen flaslarda yer alan hücreler %0,025 konsantrasyonda tripsin – EDTA çözeltisi ile kaldırılıp yeniden süspande edildikten sonra tripan mavisi ile boyanarak hemositometre yardımıyla hücre konsantrasyonları saptanmıştır.

MDA-MB-231 hücreleri  $1 \times 10^4$  hücre/kuyucuk olacak şekilde 96'lık plaklara ekim yapılmıştır. Ekilen hücreler, hücre büyütmede kullanılan koşullar altında 24 saat bekletilmiştir. 24 saatin ardından 0,3125, 0,625, 1,25, 2.5, 5, 10 ve 20  $\mu\text{M}$  doksorubisin veya aynı miktarda doksorubisine eşdeğer LyP-1-Doks konjugatı ile 24 saat muamele edilmiştir. İki basamaklı ön hedeflendirmenin değerlendirilmesi amacıyla hücreler, 100  $\mu\text{l}$  LyP-1-bsAbC (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) ile 1 saat süresince muamele edildikten sonra yıkanmış ve D-PGA-Doks örnekleri uygulanarak 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Konjugatların içerdiği doksorubisin miktarı 1,95–250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aralığında hazırlanan doksorubisin kalibrasyon eğrisi kullanılarak belirlenmiştir. İnkübasyon sonrasında ortam uzaklaştırılmış ve hücreler yıkanmıştır. Hücre canlılığının değerlendirilmesi için 1:5 oranında kültür ortamı ile seyreltilmiş CellTiter- Blue<sup>®</sup> (Promega, ABD) reaktifi kullanılmıştır. Her bir kuyucuğa 100  $\mu\text{l}$  reaktif eklenerek 2 saat inkübasyona bırakılmış ve floresan şiddeti ELISA plak okuyucu ile ölçülmüştür (BioTek, VT, ABD, Model: Synergy HT).

### 3.9.3. Western Blot Analizi

İn vitro ve in vivo çalışmalarda kullanılan hücre hatlarında LyP-1 peptidine özgü p32 reseptörünün varlığının doğrulanması amacıyla MDA-MB-231, 4T1 hücre hatlarından ve 4T1 meme kanseri fare modelinden elde edilen doku örneklerinden lizatlar hazırlanarak söz konusu proteinin ifade edilme dereceleri değerlendirilmiştir.

#### Hücre Lizatlarının Hazırlanması

Hücrelerden hazırlanacak lizatlar için her bir hücre hattı 25  $\text{cm}^2$ lik flasklara,  $2 \times 10^5$  hücre/flask konsantrasyonda ekilmiş ve gece boyunca besiyeri varlığında büyümeye bırakılmıştır. Lizatların hazırlanması sırasında flasklar 5 dakika buz

üzerinde tutulduktan sonra, besiyeri uzaklaştırılmış ve PBS aracılığıyla 2 kez yıkama yapılmıştır. Yıkama sonrasında her bir flaska 400 µl lizis tamponu eklenmiş ve 150 rpm hızda 15 dk. buz üzerinde çalkalanma yapılmıştır. Kazıyıcı yardımıyla hücreler kaldırıldıktan sonra 15 dk. buz üzerinde ek çalkalanma yapılmıştır. Örnekler önceden soğutulmuş tüplere toplanarak 4 °C'de 12.500 rpm'de 15 dk. boyunca santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası üst faz toplanarak ileri analizler için -80 °C'de saklanmıştır. Elde edilen lizatlardaki protein miktarı jellere yükleme öncesinde Bikinkoninik Asit Protein Tayin Yöntemi (BCA) ile belirlenmiştir.

### **Doku Lizatlarının Hazırlanması**

Doku lizatlarının hazırlanması amacıyla 1 mm boyutunda zirkon boncuklar kullanılmıştır. 2 ml hacimde viyallere, üçte iki hacimde boncuk konularak soğutulmuş 500 µl lizis tamponu eklenmiştir. 30-40 mg doku parçası tartılarak vialle eklenmiş ve her 5 mg doku için 200 µl lizis tamponu ilavesi yapılmıştır.

Doku homojenizatörüne (BeadBeater, Biospec, ABD) yerleştirilen vialler 15 sn'lik periyodlarla 5 döngüde homojenize edilmiştir. Her döngü arasında örnekler 1 dk. boyunca buza gömülerek sıcaklığın kontrol altında tutulması sağlanmıştır. Homojenizasyon sonrası örnekler 4 °C'de 12.500 rpm'de 15 dk. santrifüj edilerek üst faz toplanmıştır. Toplanan örnekler ileri analizler için -80 °C'de saklanmıştır. Elde edilen lizatlardaki protein miktarı jellere yükleme öncesinde Bikinkoninik Asit Protein Tayin Yöntemi (BCA) ile belirlenmiştir.

### **SDS-PAGE**

Elde edilen hücre ve doku lizatları poliakrilamid jelde yürütülerek ayırım sağlanmıştır. Bu amaçla toplayıcı ve ayrıştırıcı jeller hazırlanarak elektroforez camları

arasına dökülmüştür. Örnekler, yüklemmeden önce 2X konsantrasyonda Laemmli örnek tamponu ile 1:1 oranında karıştırılarak, 95 °C'de 5 dk. inkübasyon sonrası denatürasyon sağlanmıştır. Örneklerin içerdikleri toplam protein miktarına göre yüklenecek örnek hacimleri hesaplanmıştır. Protein miktarları aynı ve örnek miktarı en fazla 35 µl olacak şekilde jele yükleme yapılmıştır. Örnekler elektroforez tankında yürütme tamponu varlığında 90 V sabit akım ile 180 dk. boyunca yürütülmüştür. Yürütme sonrası jel distile su ile yıkandıktan sonra transfer tamponu içerisinde 10 dk. süreyle yatay çalkalayıcı üzerinde bekletilmiştir. Transfer için kullanılacak olan polivinilidin florür (PVDF, 0,45 µm por açıklığı) membran ve filtre kağıtları transfer tamponu içerisinde şartlandıktan sonra yarı kuru transfer cihazı ile (Pierce Fast Semi-Dry Blotter, Thermo Scientific, Almanya) bantlar membrana transfer edilmiştir. Transfer işlemi 25 V akım altında 30 dk. süreyle gerçekleştirildikten sonra membran, %5'lik yağsız süt tozu ile 1 saat süreyle bloke edilmiştir. Bloklama sonrası PBST (%0,1 Tween 20 içeren PBS) ile yıkanan membran, anti-GC1q R (anti-p32) primer antikorun (Abcam 60.11) PBST içerisinde 1:1000 oranında hazırlanan dilüsyonu ile 16 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası PBST ile yıkanan membran, HRP konjuge *goat anti-mouse* IgG (GAM – HRP) sekonder antikorunu ile 1 saat inkübe edilmiştir. Yüksek hassasiyette artırılmış kimyasal parlaklık sağlayan *SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate* (Thermo Scientific, Almanya) ile muamele edilen membranın görüntülemesi Kodak Gel Logic 1500 görüntüleme sistemi ile yapılmıştır.

#### **3.9.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)**

İn vivo çalışmalarda kullanılan 4T1 hücre hattının ve 4T1 tümör dokusunun p32 ekspresyonu polimeraz zincir reaksiyonu kullanılarak tayin edilmiştir. Reaksiyon

öncesi uygun çalışma koşullarının tespit edilmesi amacıyla optimizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, fare komplementer DNA (cDNA)'sından ilgili bölgeyi çoğaltmak üzere tasarlanan primerlerin uygun çalışma sıcaklığının belirlenebilmesi için gradyan yöntem kullanılmıştır. 57 – 62 °C aralığında 6 farklı sıcaklıkta yürütülen reaksiyonlar sonrası elde edilen ürünler %2 (a/h) agaroz jelde 0,5 µg/ml etidyum bromür varlığında yürütülmüştür. Örneklerin kuyucuklara yüklenmesi amacıyla 5X konsantrasyonda yükleme boyası ile dilüsyon sağlanmıştır. Analiz süresince 120 V sabit akım kullanılmıştır. Jelde oluşan bantların görüntülenmesi amacıyla Kodak Gel Logic 1500 görüntüleme sistemi kullanılmıştır.

Hücre ve dokulardan elde edilen RNA örnekleri cDNA'ya çevirilerek polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile miktar tayini gerçekleştirilmiştir.

### **Hücreden RNA İzolasyonu**

Hücrelerden yapılacak RNA izolasyonu için her bir hücre hattı 25 cm<sup>2</sup>'lik flasklara, 2x10<sup>5</sup> hücre/flask konsantrasyonda ekilmiş ve gece boyunca besiyeri varlığında büyümeye bırakılmıştır. Flasklardaki besiyeri uzaklaştırılarak PBS ile yıkama yapılmış ve her bir flaska 400 µl RLT tamponu eklenerek hücreler kazıyıcı yardımıyla kaldırılmıştır. Elde edilen karışım DEPC'li tüplere aktararak 14.000 rpm'de 5 dk. boyunca santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası üst faz toplanarak DEPC'li tüpe aktarılmış ve üzerine 500 µl %70'lik etanol eklenerek pipetleme yapılmıştır. Elde edilen lizat, RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Almanya) içerisinde yer alan RNeasy silika membranlara yüklenmiştir (RNeasy Spin Column, QIAGEN, Almanya). RNA örneğinin tutunduğu kolon talimatlara göre yıkanmıştır. Yıkama sonrasında kolona 30 µl RNaz içermeyen su eklenerek 14.000 rpm'de gerçekleştirilen 1 dk. santrifüj ile RNA kolondan elüe edilmiştir. Elde edilen RNA örneklerinin konsantrasyonu



spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir (Nanodrop, Thermo Scientific, ABD). Örnekler ileriki analizler için -80 °C'de saklanmıştır.

### **Dokudan RNA İzolasyonu**

DEPC'li 2 ml'lik vialler içine hacmin üçte ikisini dolduracak şekilde 1 mm büyüklüğünde zirkon boncuk koyulmuş ve RLT çözeltisi eklenerek boncukların çözelti ile şartlanması sağlanmıştır. RNA stabilizasyon çözeltisi (*RNA/later*) içerisinde muhafaza edilen 30 mg doku örneği boncukların üzerine eklenmiş ve doku homojenizatörüne (BeadBeater, Biospec, ABD) yerleştirilen vialler 15 sn'lik periyodlarla 5 döngüde homojenize edilmiştir. Her döngü arasında örnekler 1 dk. boyunca buza gömülerek sıcaklığın kontrol altında tutulması sağlanmıştır. Homojenizasyon sonrası örnekler 4 °C'de 14.000 rpm'de 5 dk. santrifüjlenerek elde edilen üst faz DEPC'li tüplere aktarılmıştır. Üzerine 500 µl %70'lik etanol eklenen örnekler pipetaj uygulanmış ve lizat RNeasy silika membranlara yüklenmiştir (RNeasy Spin Column, QIAGEN, Almanya). RNA örneğinin tutunduğu kolon talimatlara göre yıkanmıştır. Yıkama sonrasında kolona 30 µl RNaz içermeyen su eklenerek 14.000 rpm'de gerçekleştirilen 1 dk.'lık santrifüj ile RNA kolondan elüe edilmiştir. Elde edilen RNA örneklerinin konsantrasyonu spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir (Nanodrop, Thermo Scientific, ABD). Örnekler ileriki analizler için -80 °C'de saklanmıştır.

### **RNA Örneklerinden cDNA Eldesi**

RNA örneklerinden, ters transkripsiyon (reverse transcription) ile cDNA örnekleri elde edilmiştir (QuantiTect Reverse Transcription Kit, QIAGEN, Almanya). Reaksiyonun ilk basamağında genomik DNA'ya ait bileşenlerin uzaklaştırılması

sağlanmıştır. Genomik DNA uzaklaştırılması için eklenen tampon sonrasında 42 °C'de 2 dk. boyunca reaksiyon yürütülmüştür. İkinci basamakta ters transkripsiyon işlemi için reaksiyon karışımı oluşturulmuş ve genomik DNA'dan temizlenen örnek 42 °C'de 15 dk. reaksiyona sokulmuştur. Reaksiyon sonrası ters transkriptaz enziminin etkisizleştirilmesi amacıyla örnekler 95 °C'de 3 dk. inkübe edilmiştir. Elde edilen örnekler ileriki analizler için -80 °C'de saklanmıştır.

### **3.10. İn Vivo Etkililik Çalışmaları**

4T1 meme kanseri hücreleri ( $2,5 \times 10^4$ ), 6 – 8 haftalık dişi BALB/c farelerin meme dokusuna subkütan yoldan inoküle edilmiştir. Tümör kitlelerinin en büyük çapının 0,3-0,4 cm boyuta ulaşması sonrasında (14 gün sonunda) kontrol grubuna, SF içerisinde LyP-1 peptit veya formülasyon içerisinde LyP-1 peptit enjeksiyonu yapılmıştır. Ayrıca LyP-1'in, etkin bir kemoterapötik olan doksorubisin hidroklorür birlikteliğinde hazırlanacak formülasyonu için ise, tümör geliştirilen gruplara SF içerisinde doksorubisin hidroklorür, formülasyon içerisinde doksorubisin hidroklorür, SF içerisinde doksorubisin hidroklorür ve LyP-1 veya formülasyon içerisinde doksorubisin hidroklorür ve LyP-1 uygulanmıştır. İlaç uygulamaları haftada 2 kez intraperitoneal enjeksiyonla (10ml/kg)(162) gerçekleştirilmiştir. LyP-1 dozu 3 mg/kg (163) ve doksorubisin hidroklorür dozu 5 mg/kg (164, 165) olarak belirlenmiştir. Tedavi süresi 14 gün olarak planlanmıştır.

Deney süresince haftada 2 kez tümör inokülasyon bölgesi palpe edilerek tümör gelişimi izlenmiş, tümör çapları ve vücut ağırlıkları kaydedilmiştir. 4 haftanın sonunda, deneylerin sonlandırılmasıyla denekler diseksiyonu takiben patolojik inceleme için formol içerisine alınmıştır. Deneyler süresince 3R ilkesi gözetilmiştir.

Sakrifiye edilen hayvanlardan alınan doku örnekleri histopatolojik inceleme için %10 formaldehit çözeltisi içerisinde fikse edilmiştir. Fikse edilen örneklerden makroskopik olarak doku örnekleri kesilmiş ve parafin içerisinde gömülmüştür. Parafin içerisindeki örnekler; 0,4 µm kesitler alınarak standart hematoksilin ve eozin (H&E) boyama ardından ışık mikroskobu altında değerlendirilmiştir.

### **3.10.1. Tümör Modeline Karar Verilmesi**

Hayvanda geliştirilecek tümör modeline karar verilirken literatürde yer alan meme kanseri modelleri değerlendirilmiş ve meme kanseri modeli oluşturmada sıklıkla kullanılan 4T1 hücre hattı seçilmiştir. Farelerde meme kanseri modeli oluşturmada kullanılan farklı yöntemler mevcuttur. Tümör modelleri allograft veya ksenograft şeklinde oluşturulabilmektedir. Allograft nakil modellerinde, tümör hücreleri ile konak canlı aynı genetik özellikleri taşımaktadır. Başka bir deyişle fare tümör hücrelerinin fareye inoküle edilmesiyle elde edilen modellerdir. Ksenograft modellerinde ise insan kanser hücreleri atimik çıplak fare gibi bağışıklık yetersizliği olan canlıya inoküle edilmektedir (166). Tez kapsamında allograft modeli kullanılarak 4T1 fare meme kanseri hücreleri fare meme dokusuna inoküle edilmiştir.

Tümör modeline karar verilirken göz önünde bulundurulacak bir diğer nokta ise, kullanılan etkin maddeye özgü reseptörün (p32) ekspresyonudur. İn vitro ve in vivo biyoaktivite çalışmalarında p32 ekspresyonu yüksek olduğu gösterilen hücre hatları arasında yer alan 4T1 fare meme kanseri ve MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hatları kullanılmıştır (167).

Tez kapsamında, hedeflenen lenfatik sisteme girişin artırılması amacıyla formülasyonlar intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Subkütan, intradermal ve

intraperitoneal uygulamanın lenf nodlarında tutulumu artırdığı bilinmektedir. İntraperitoneal uygulama yolunun özellikle lipozomlar gibi lipid yapıdaki formülasyonların tümör tutulumunu artırdığı ve düşük plazma konsantrasyonuna bağlı olarak yan etkilerde azalma sağladığı gösterilmiştir(168).

İntraperitoneal uygulama sırasında enjekte edilebilen hacmin intravenöz uygulamaya göre daha fazla olması ve uygulama kolaylığı da tercih aşamasında göz önünde bulundurulmuş noktalardandır (162) .

### **3.11. İn Vivo Biyodağılım Çalışması**

4T1 meme kanseri hücreleri ( $2,5 \times 10^4$ ), 6 – 8 haftalık dişi BALB/c farelerin meme dokusuna subkütan yoldan inoküle edilmiştir. Tümör kitlelerinin çapı 0,5 cm boyuta ulaşması sonrasında (14 gün sonunda) floresan işaretli peptit (LyP-1-FAM) çözeltisi ve floresan işaretli peptidin SEDDS formülasyonu intraperitoneal yoldan 3mM konsantrasyonda enjekte edilmiştir. Aynı uygulama sağlıklı hayvanlarda da gerçekleştirilerek, peptidin tümörlü ve sağlıklı hayvanlarda biyodağılımı değerlendirilmiştir. Uygulamadan 16 saat sonra hayvanlar sakrifiye edilerek kan, peritoneal sıvı, dalak, karaciğer, meme lenf nodları, mezenkimal lenf nodları ve tümör dokusu toplanıp Kodak Gel Logic 1500 görüntüleme sistemi ile UV filtre varlığında görüntüleme yapılmıştır. Sonrasında dokular homojenize edilerek 0,4  $\mu$ M por açıklığına sahip filtreden süzölmüştür. Elde edilen homojenizatların eritrositlerinden ayrılması amacıyla Histopaque®1119 eklenerek 25 dk. süreyle 1500 rpm’de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası beyaz kan hücreleri toplanarak akış sitometresi ile analiz gerçekleştirilmiştir. Ek olarak karaciğer, dalak, periferik kan ve tümörden elde edilen beyaz kan hücrelerine, makrofaj yüzeyine özgü antikor

(CD206) işaretlemesi yapılarak makrofaj hücrelerine giren floresan madde miktarı değerlendirilmiştir.

### **3.12. Bulguların İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi**

Elde edilen sonuçların istatistiksel olarak değerlendirilmesi sırasında; parametrik olmayan sonuçların değerlendirilmesi amacıyla ikiden fazla grubun olduğu durumlarda gruplar arası farkın değerlendirilmesi Kruskal-Wallis testi ile, iki grup arasındaki farkın değerlendirilmesi ise Mann-Whitney U testi ile gerçekleştirilmiştir. Fark görülen gruplar için bir sonraki aşamada çoklu karşılaştırma testleri uygulanmıştır. Tekrarlayan ölçümlerin gerçekleştirilmiş olduğu in vivo çalışmalarda gruplar arası farkların belirlenebilmesi amacıyla Genelleştirilmiş Tahmin Denklemi (*Generalized Estimating Equations, GEE*) kullanılmıştır.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Önformülasyon Çalışmaları

Önformülasyon çalışmaları kapsamında hazırlanan 12 üçgen üzerinde belirlenen formülasyon noktalarından hareketle, formülasyon çalışmalarında kullanılmak üzere 4 adet üçgen seçilmiştir. Seçilen üçgenlere ait bileşenler Tablo 4.1'de yer almaktadır.

**Tablo 4.1.** Formülasyon çalışmaları için seçilen üçgenlere ait bileşenler.

Formülasyon Kodu	Formülasyon Bileşimi		
	Yüzey Etkin Madde	Yağ	Yardımcı Çözücü
U8	TPGS: Gelucire 44/14 (1:5)	Maisine	PEG 300
U9	TPGS: Labrasol (1:5)	Peceol	Propilen glikol
U11	Labrafil M1944: Gelucire 44/14 (1:2)	Peceol	PEG 300
U12	Labrasol: Tween 80 (1:2)	Peceol	PEG 300

#### 4.1.1. Makroskobik Özellikler

Üçgen faz diyagramları kullanılarak hazırlanan formülasyonlara ait fiziksel inceleme sonuçlarında, formülasyonlarda faz ayrımı, kremalaşma, yüzeyde yağ damlacıkları, bulanıklaşma ve parçacık oluşumu, dipte çökelti oluşumu gibi fiziksel stabilite sorunları gözlenen formülasyonlar bir sonraki basamakta kullanılmamıştır. Söz konusu 4 adet üçgen faz diyagramı içerisinde stabil olan formülasyon noktalarında mikroskobik incelemeler, damlacık büyüklüğü tayini ve zeta potansiyel tayini gerçekleştirilmiştir.

#### **4.1.2. Mikroskopik Özellikler**

Fiziksel stabilitesi uygun olan formülasyonlardan alınan örnekler, polarize ışık mikroskobu altında incelenerek yüksek miktarlarda yüzey etkin madde kullanımından kaynaklanabilecek sıvı kristal yapı oluşumu değerlendirilmiştir. Seçilen formülasyonlarda sıvı kristal oluşumuna rastlanmamıştır.

#### **4.1.3. Damlacık Büyüklüğü ve Zeta Potansiyel Tayini**

Fiziksel açıdan stabil formülasyonlarda yapılan damlacık büyüklüğü ölçümlerine ait sonuçlar Tablo 4.2'de verilmiştir. Yapılan değerlendirmeler sonucunda formülasyon çalışmaları için 5 adet formülasyon seçilmiştir (Tablo 4.3).

**Tablo 4.2.** Stabil formülasyonlara ait damlacık büyüklüğü sonuçları.

Formülasyon Kodu		0. gün		3. gün		7. gün		14. gün	
		D.B. (d.nm)	PDİ	D.B. (d.nm)	PDİ	D.B. (d.nm)	PDİ	D.B. (d.nm)	PDİ
<b>U8</b>	F1	14,84±0,20	0,29±0,02	16,02±0,92	0,33±0,02	20,45±1,41	0,30±0,03	16,38 ± 1,08	0,34±0,00
	F4	13,75±0,25	0,20±0,01	13,77±0,41	0,20±0,03	15,09±0,7	0,27±0,02	13,56±0,24	0,22±0,01
	F8	13,89±0,05	0,15±0,00	14,30±0,23	0,17±0,02	15,27±0,35	0,24±0,02	14,66±0,29	0,2±0,03
	F13	188,4±96,77	0,29±0,05	39,97±3,88	0,29±0,04	33,62±5,21	0,35±0,01	23,46±1,08	0,28±0,02
	F17	16,00±0,22	0,23±0,01	18,73±1,20	0,30±0,03	18,80±1,27	0,32±0,01	19,19±2,16	0,29±0,03
	F21	19,6±1,06	0,37±0,01	15,88±0,29	0,19±0,01	16,59±0,26	0,22±0,01	26,92±0,33	0,47±0,01
<b>U9</b>	F1	12,92±0,07	0,12±0,01	12,98±0,01	0,12±0,01	14,98±0,76	0,23±0,01	15,06±0,66	0,23±0,01
	F2	15,79±0,17	0,19±0,01	15,29±0,11	0,17±0,01	16,23±0,34	0,23±0,01	16,46±0,06	0,24±0,01
	F4	13,25±0,02	0,11±0,01	13,26±0,14	0,12±0,01	14,20±0,04	0,19±0,02	13,26±0,06	0,12±0,01
	F5	17,17±0,09	0,22±0,01	17,01±0,12	0,21±0,01	19,43±0,59	0,29±0,04	17,35±0,21	0,23±0,01
	F8	13,44±0,08	0,11±0,01	13,45±0,07	0,12±0,01	14,31±0,08	0,17±0,01	16,99±0,47	0,24±0,01
	F13	16,16±1,16	0,22±0,03	14,78±0,09	0,18±0,01	15,12±0,34	0,20±0,01	16,68±1,00	0,24±0,02
	F17	17,15±0,12	0,17±0,01	16,97±0,06	0,17±0,01	17,98±0,06	0,22±0,01	19,11±0,57	0,24±0,01
	F21	15,36±0,08	0,11±0,01	15,15±0,04	0,12±0,01	17,18±0,02	0,22±0,01	15,64±0,27	0,14±0,03
F23	16,01±0,12	0,13±0,01	15,98±0,02	0,12±0,01	18,22±1,14	0,23±0,03	16,66±0,18	0,18±0,02	



<b>U11</b>	F1	266,77±2,74	0,30±0,02	264,93±2,55	0,26±0,01	282,17±4,75	0,27±0,01	*	*
	F4	227,53±3,37	0,29±0,01	222,20±1,42	0,29±0,01	213,7±2,9	0,29±0,01	*	*
	F8	169,37±1,27	0,29±0,01	166,10±1,32	0,29±0,01	159,27±1,07	0,32±0,02	*	*
	F13	207,9±1,47	0,24±0,01	209,23±1,39	0,25±0,01	200,97±1,44	0,24±0,01	*	*
	F17	244,73±3,4	0,23±0,01	254,70±3,76	0,23±0,01	253,03±6,11	0,24±0,01	*	*
	F21	283,73±3,62	0,25±0,01	283,43±2,83	0,25±0,01	274,57±1,42	0,24±0,01	*	*
	F23	275,87±3,21	0,23±0,01	276,77±2,97	0,23±0,01	273,7±3,53	0,23±0,02	*	*
<b>U12</b>	F1	17,00±0,40	0,35±0,01	14,49±0,09	0,20±0,01	15,04±0,44	0,23±0,01	19,58±0,58	0,35±0,01
	F4	14,43±0,16	0,20±0,01	20,67±2,74	0,34±0,02	15,13±0,21	0,22±0,01	15,05±0,53	0,22±0,03
	F8	16,12±0,32	0,25±0,01	16,33±0,27	0,25±0,02	17,12±0,48	0,27±0,02	18,3±0,2	0,28±0,02
	F13	25,21±0,25	0,44±0,01	29,34±0,54	0,68±0,02	*	*	*	*
	F14	294,07±1,77	0,41±0,02	297,6±5,94	0,37±0,04	301,6±4,52	0,39±0,02	311,8±6,76	0,38±0,01
	F17	17,94±0,3	0,27±0,02	27,57±0,15	0,30±0,01	19,2±0,43	0,31±0,01	21,15±2,63	0,27±0,08
	F21	68,71±0,33	0,27±0,01	128,37±0,81	0,21±0,01	172,9±2,81	0,22±0,01	205,03±3,72	0,26±0,01
	F23	56,74±0,59	0,39±0,01	117,10±1,65	0,27±0,01	157,2±1,91	0,27±0,01	190,43±3,18	0,31±0,01

\*Fiziksel stabilite sorunları nedeniyle ölçüm yapılmamıştır.

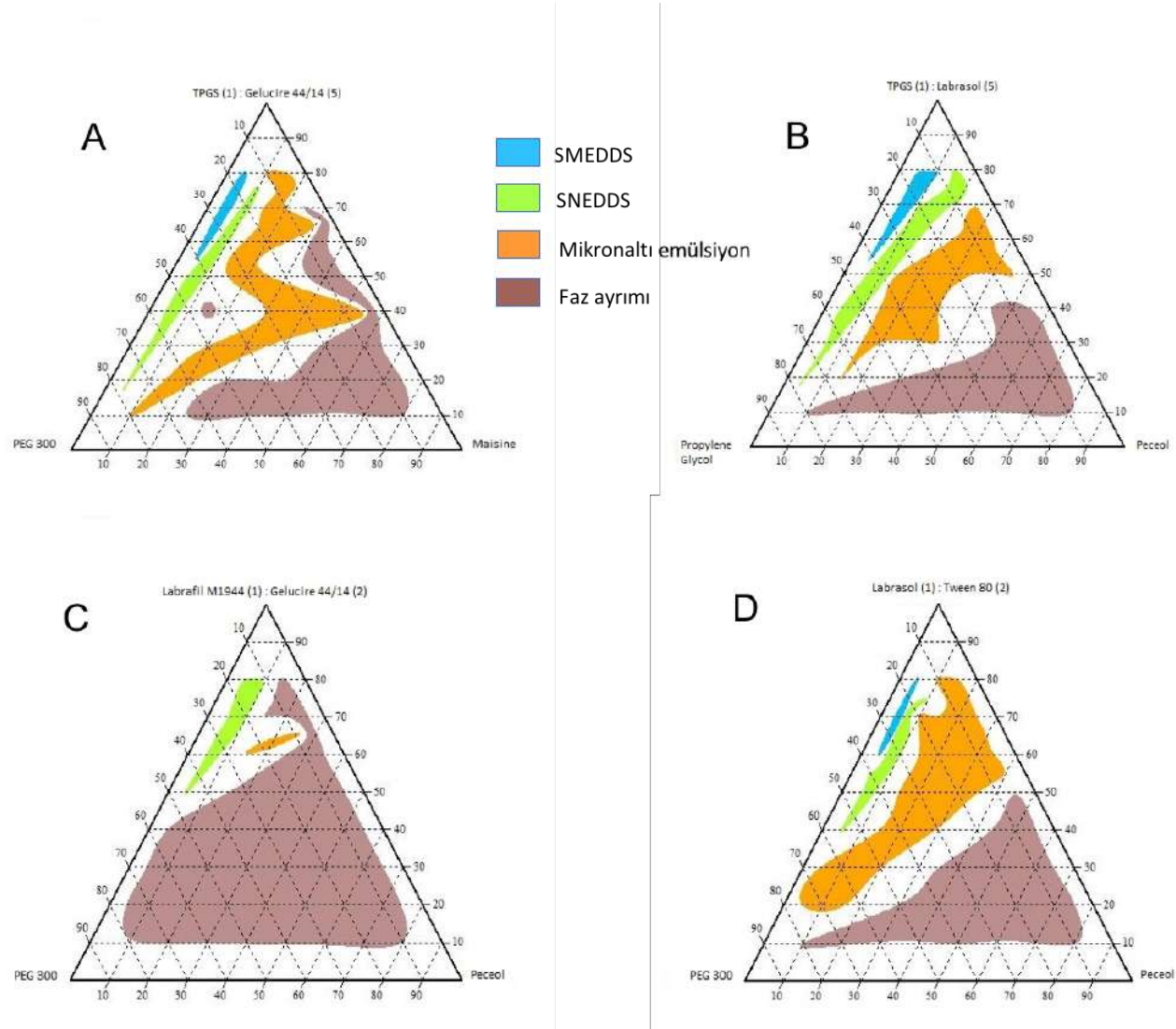
## 4.2. Formülasyon Çalışmaları

### 4.2.1. Üçgen Faz Diyagramları

Formülasyon çalışmaları kapsamında yürütülen karakterizasyon çalışmaları sonrasında, istenilen damlacık boyutlarına sahip stabil formülasyonlara ait bileşenlerin kullanım oranları Tablo 4.3'te gösterilmiştir. Çalışılan üçgen faz diyagramları üzerinde belirlenen formülasyon noktaları ve damlacık büyüklüğü dağılımları Şekil 4.1'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.3.** Seçilen sıvı formülasyon noktalarına ait bileşenler.

Formülasyon Kodu	Yüzey Etkin Madde	%	Yağ	%	Yardımcı Çözücü	%
U8-F21	TPGS: Gelucire 44/14(1:5)	55	Maisine	5	PEG 300	40
U9-F17	TPGS: Labrasol (1:5)	60	Peceol	5	Propilen Glikol	35
U9-F21	TPGS: Labrasol (1:5)	55	Peceol	5	Propilen Glikol	40
U9-F23	TPGS: Labrasol (1:5)	50	Peceol	5	Propilen Glikol	45
U12-F17	Labrasol: Tween 80 (1:2)	60	Peceol	5	PEG 300	35



Şekil. 4.1. A. U8 B. U9 C. U11 D. U12 formül kodlu üçgen faz diyagramları.

### **4.3. Formülasyonların Karakterizasyonu**

#### **4.3.1. Makroskobik Özellikler**

Seçilen formülasyonlara ait fiziksel inceleme sonunda, formülasyonlarda faz ayrımı, kremalaşma, yüzeyde yağ damlacıkları, bulanıklaşma ve parçacık oluşumu, dipte çökelti oluşumu gibi herhangi bir fiziksel stabilite sorunu gözlenmemiştir.

#### **4.3.2. Mikroskobik Özellikler**

Formülasyon çalışmaları için seçilen örnekler, polarize ışık mikroskobu altında incelenerek yüksek miktarlarda yüzey etkin madde kullanımından kaynaklanabilecek sıvı kristal yapı oluşumu değerlendirilmiştir. Seçilen formülasyonlarda sıvı kristal oluşumuna rastlanmamıştır.

#### **4.3.3. Damlacık Büyüklüğü ve Zeta Potansiyel Tayini**

Formülasyon çalışmaları kapsamında 4 farklı üçgen faz diyagramı üzerinden belirlenen 5 farklı formülasyon noktası için damlacık büyüklüğü ve zeta potansiyel ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen değerler Tablo 4.4'te verilmektedir.

LyP-1 peptidinin sıvı formülasyonlara eklenmesi sonrasında da damlacık büyüklüğü ve zeta potansiyel ölçümleri gerçekleştirilmiştir. 250 µg/mL konsantrasyonda eklenen peptidin; U8-F21, U9-F21 ve U12-F17 formülasyonları dışında, formülasyonların damlacık boyutlarında değişikliğe neden olmadığı gözlenmiştir ( $p>0,05$ ) (Tablo 4.4). Damlacık büyüklüğünde fark gözlenen U8-F21, U9-F21 ve U12-F17 formülasyonlarında değerler 100 nm'nin altındadır.

**Tablo 4.4.** Seçilen sıvı formülasyonlara ait damlacık büyüklüğü ve zeta potansiyel değerleri (n=3).

Formülasyon Kodu	D.B. (d.nm)	PDİ	Zeta Potansiyel (mV)
U8-F21 (boş)	19,6±1,06	0,37±0,01	-0,051±0,03
U8-F21	26,24±0,29*	0,57±0,01	-0,67±0,39
U9-F17(boş)	17,15±0,12	0,17±0,01	0,13±1,03
U9-F17	14,95±0,03	0,12±0,01	-1,02±0,36
U9-F21(boş)	15,36±0,08	0,11±0,01	0,78±2,5
U9-F21	25,01±1,93*	0,27±0,05	0,90±1,97
U9-F23(boş)	16,01±0,12	0,13±0,01	0,63±1,11
U9-F23	16,46±0,3	0,15±0,03	-0,75±0,44
U12-F17(boş)	17,94±0,3	0,27±0,02	-0,98±0,12
U12-F17	76,43±0,64*	0,42±0,01	-1,34±0,14

\*p<0,05.

#### 4.3.4. Katı Formülasyonların Karakterizasyonu

Fiziksel açıdan stabil ve istenilen damlacık boyutları ile polidispersite indeksine sahip sıvı formülasyonlardan hareketle katı formülasyonlar elde edilmiştir. Etkin madde içeren formülasyonlarda peptit konsantrasyonu 250 µg/mL olarak belirlenmiştir. Elde edilen boş ve peptit içeren formülasyonlara ait damlacık büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel değerleri Tablo 4.5'te verilmiştir.

**Tablo 4.5.** Katı formülasyonlara ait karakterizasyon çalışmaları.

Formülasyon Kodu	Metod	Adsorban	D.B. (d.nm)	PDI	Zeta Potansiyel (mV)
<b>U8-F21(Boş)</b>	Liyofilizasyon	Aerosil 200	110,48±48,10	0,68±0,13	-17,47±0,38
		Laktoz	145,4±3,82	0,87±0,02	-13,27±0,59
		Mannitol	291,47±28,48	0,76±0,11	-18,83±0,49
		Neusilin U2	98,84±8,99	0,75±0,02	-13,37±0,35
	Püskürterek kurutma	Aerosil 200	97,35±13,65	0,40±0,08	-19,16±2,13
Neusilin U2		34,14±0,27	0,8±0,01	-5,01±0,79	
<b>U8-F21</b>	Liyofilizasyon	Mannitol	257,2±45,72	0,43±0,01	-12,26±0,06
	Püskürterek kurutma	Aerosil 200	36,89±2,75	0,69±0,14	-8,71±0,74
<b>U9-F17 (Boş)</b>	Liyofilizasyon	Aerosil 200	32,77±0,27	0,44±0,01	-4,55 ±0,42
		Laktoz	26,07±0,33	0,27±0,03	-0,32±0,47
		Mannitol	37,02±0,35	0,25±0,01	-0,53±0,43
		Neusilin U2	38,69±0,32	0,37±0,03	-9,56±0,35
	Püskürterek kurutma	Aerosil200	18,22±0,95	0,45±0,03	-2,45±1,46
Neusilin U2		78,86±2,36	0,49±0,01	-9,85±0,52	
<b>U9-F17</b>	Liyofilizasyon	Mannitol	30,74±0,31	0,21±0,01	-4,24± 2,09
	Püskürterek kurutma	Aerosil 200	187,1±7,46	0,24±0,06	-3,11±0,78
<b>U9-F21(Boş)</b>	Liyofilizasyon	Aerosil 200	122,1±12,61	0,68±0,17	-12,87±2,01
		Laktoz	129,3±7,14	0,59±0,01	-0,37±0,15
		Mannitol	47,65±8,89	0,32±0,05	0,04±0,56
		Neusilin U2	40,85±0,69	0,40±0,03	-9,17±0,15
	Püskürterek kurutma	Aerosil 200	231,17±57,30	0,42±0,07	-7,22±0,1
Neusilin U2		123,63±3,69	0,51±0,03	-10,42±4,82	
<b>U9-F21</b>	Liyofilizasyon	Mannitol	34,66±0,54	0,28±0,02	-3,22±0,61
	Püskürterek kurutma	Aerosil 200	193,3±6,75	0,26±0,01	-5,18±0,15

**Tablo 4.5 (Devam).** Katı formülasyonlara ait karakterizasyon çalışmaları.

<b>U9-F23 (Boş)</b>	Liyofilizasyon	Aerosil 200	123,67±2,22	0,71±0,02	14,27±1,89
		Laktoz	163,67±4,72	0,43±0,09	1,91±3,56
		Mannitol	92,02±1,85	0,93±0,02	-2,91±0,69
		Neusilin U2	58,74±3,29	0,44±0,03	-11,47±0,15
	Püskürterek kurutma	Aerosil 200	248,43±19,34	0,47±0,14	-0,75±0,44
		Neusilin U2	56,27±0,28	0,68±0,01	-5,65±0,76
<b>U9-F23</b>	Liyofilizasyon	Mannitol	41,33±0,95	0,38±0,01	-5,11±0,06
	Püskürterek kurutma	Aerosil 200	163,67±6,43	0,3±0,06	-4,98±3,43
<b>U12-F17 (Boş)</b>	Liyofilizasyon	Aerosil 200	29,59±5,73	0,51±0,16	-8,88±3,38
		Laktoz	25,01±0,21	0,46±0,05	-11,79±8,14
		Mannitol	82,77±4,33	0,42±0,01	-1,74±0,45
		Neusilin U2	53,74±21,09	0,46±0,11	-11,01±1,46
	Püskürterek kurutma	Aerosil 200	20,95±1,32	0,52±0,02	-0,89±1,07
		Neusilin U2	408,3±207,75	0,51±0,26	-16,97±0,85
<b>U12-F17</b>	Liyofilizasyon	Mannitol	101,74±2,6	0,46±0,01	-15,13±1,5
	Püskürterek kurutma	Aerosil 200	27,02±0,54	0,79±0,01	-17,23±0,42

Damlacık büyüklüğü sonuçlarına göre; U9-F21 kodlu sıvı formülasyondan hareketle elde edilen katı toz formülasyonlar, tablet ve kapsül formlarına geçişte örnek olarak seçilmiştir.

Tablet formülasyonlarında kullanılan yardımcı maddeler (Tablo 4.6) arasından direkt basım için en uygun toz akış özelliklerine sahip formülasyon bileşenleri seçilmiştir.

**Tablo 4.6.** Direkt basım tablet formülasyonu için seçilen formülasyonlara ait yardımcı maddeler ve kullanım oranları.

Formülasyon Kodu	Yardımcı Madde	Madde Fonksiyonu	Kullanım Oranı
T1	Avicel® PH 102	Seyreltici – doldurucu	k.m.
	Mısır nişastası	Dağıtıcı	%5
	Magnezyum stearat	Kaydırıcı	%1
T2	Avicel® PH 102	Seyreltici – doldurucu	k.m.
	Ac-Di-Sol®	Dağıtıcı	%3
	Magnezyum stearat	Kaydırıcı	%1
T3	Avicel® PH 102	Seyreltici – doldurucu	k.m.
	Starch 1500	Dağıtıcı	%8
	Magnezyum stearat	Kaydırıcı	%1

Direkt basım için seçilen formülasyonlar ile gerçekleştirilen toz ve tablet kontrollerine ait değerler Tablo 4.7’de gösterilmektedir. Söz konusu formülasyonlar arasından uygun akış özellikleri sebebiyle T1 kodlu formülasyon, dissolüsyon çalışması için tercih edilmiştir.

**Tablo 4.7.** Formülasyonlara ait toz ve tablet kontrolleri değerleri.

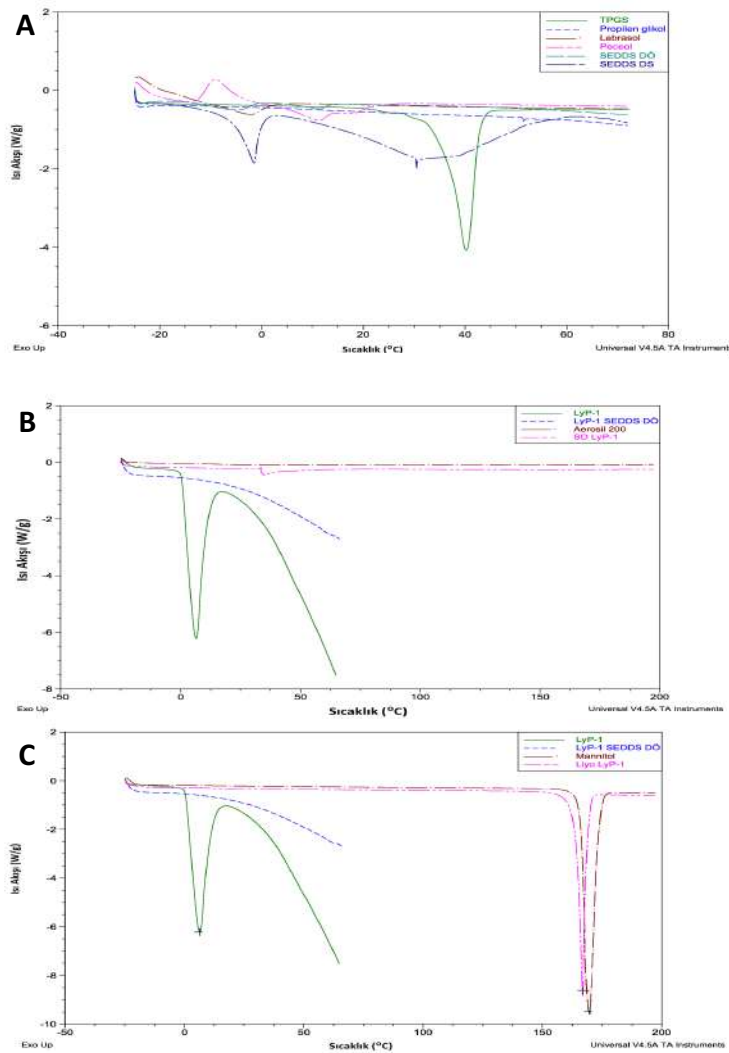
Form. Kodu	Akış Süresi (sn)	$\alpha^*$ (n=3)	Ağırlık Değişkenliği (mg) (n=20)	Çap (n=5) (cm)	Kalınlık (n=5) (cm)	Sertlik (n=5) (N)
T1	4,6	19,02±1,86°	200,38±3,43	7,67±0,01	3,618±0,02	89,3±5,63
T2	14,08	22,25±2,55°	198,64±2,32	7,68±0,01	3,618±0,02	98,2±4,66
T3	9,38	19,06±2,25°	199,54±3,05	7,68±0,01	4,44±0,08	24,12±4,44

\*  $\alpha$ =yığın açısı



#### 4.3.5. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi

Diferansiyel Taramalı Kalorimetre, biyomoleküller ve nano-boyutlu materyallerin termodinamik özelliklerini değerlendirmek amacıyla sıklıkla kullanılan bir yöntem olup, tez çalışması kapsamında hazırlanan formülasyonların karakterizasyonu amacıyla kullanılmıştır (Şekil 4.2).



**Şekil 4.2.** A. Yardımcı maddeler ve boş sıvı formülasyona ait DSC termogramı B. Püskürterek kurutma ile elde edilmiş katı formülasyonlara ait DSC termogramı C. Liyofilizasyon ile elde edilmiş katı formülasyonlara ait DSC termogramı.

DSC termogramlarında tespit edilen piklere ait bilgiler Tablo 4.8'de verilmiştir.

**Tablo 4.8.** Formülasyon ve yardımcı maddelere ait DSC termogramı analizi.

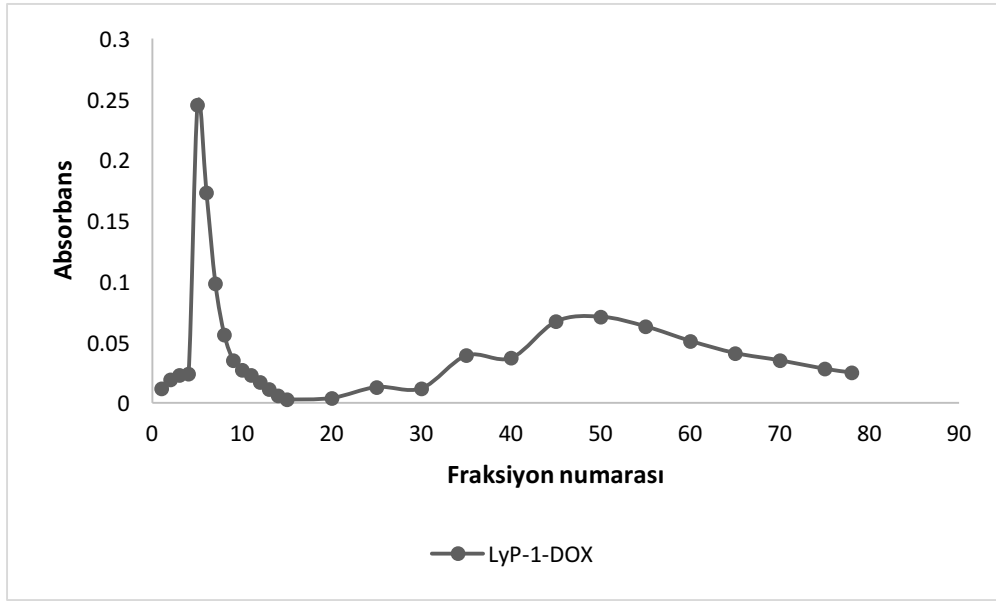
Örnek	Endoterm Pik (°C)	Ekzoterm Pik (°C)
TPGS	40,11	
Propilen Glikol	-	-23,84
Labrasol	-2,21	
Peceol	11,13	-9,15
LyP-1	6,50	
SEDSS LyP-1 DÖ <sup>1</sup>	-	-
SEDSS DÖ	-23,84    -4,66    10,99	
SEDSS DS <sup>2</sup>	-23,71    -1.53	
Mannitol	169,62	
Aerosil 200	-	-
SD LyP-1 <sup>3</sup>	34,91	
Lyo LyP-1 <sup>4</sup>	167,06	

<sup>1</sup> DÖ: dilüsyon öncesi, <sup>2</sup>DS: dilüsyon sonrası, <sup>3</sup>SD: püskürterek kurutulmuş; <sup>4</sup> Lyo: liyofilize edilmiş formülasyonlar

#### 4.4. Konjugasyon Çalışmaları

##### 4.4.1. Peptit – İlaç Konjugatlarının Hazırlanması

Peptidin Doks ile hazırlanan konjugatlarının saflaştırılması Sephadex G10 kolon santrifüjü sonrası Sephadex G10 kolon filtrasyonu ile gerçekleştirilerek Şekil 4.3'te gösterilen elüsyon profili elde edilmiştir. Peptit-Doks konjugatı, ilk fraksiyonlara karşılık gelen boş hacimde kolonu terk etmiştir. Konjuge olmamış Doks molekülleri kolonu 50. fraksiyon itibarıyla terk etmeye başlamıştır.

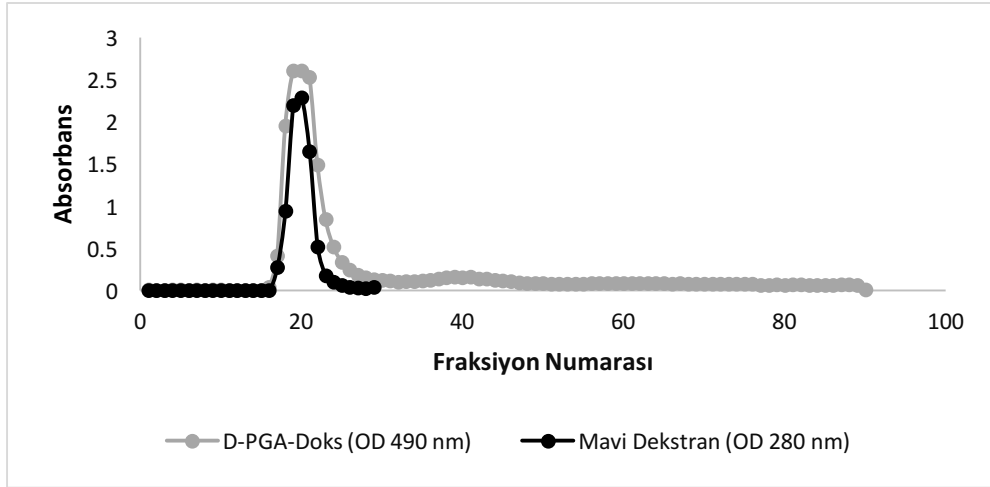


Şekil 4.3. LyP-1-Doks'un elüsyon profili (Sephadex G10 kolon).

#### 4.4.2. Polimer – İlaç Konjugatlarının Hazırlanması

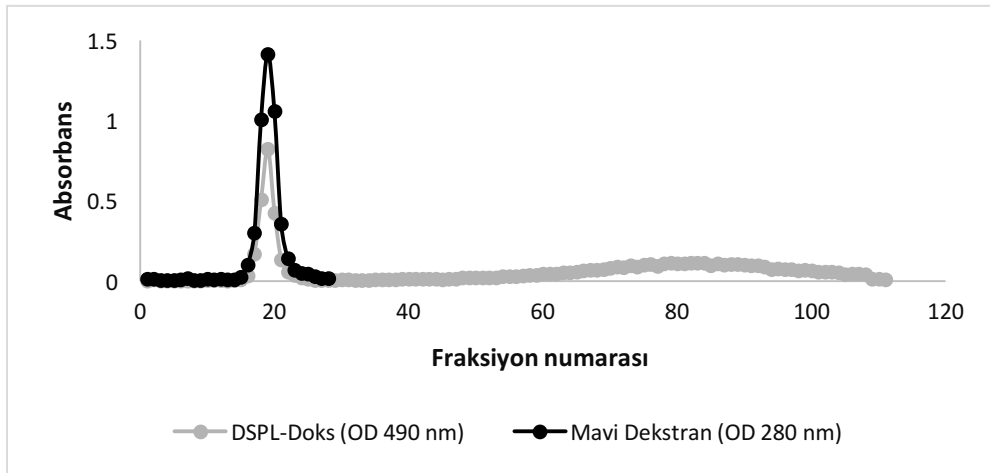
D-PGA-Doks konjugatlarının saflaştırılması sırasında Sephadex G25 kolon filtrasyonu gerçekleştirilmiş ve konjugatı içeren fraksiyonlar (17-21) toplanarak gece boyunca 0,1 M PBS varlığında (pH 7,4) diyaliz edilmiştir.

490 nm dalga boyunda yapılan ölçümler sonucunda elde edilen elüsyon profili, serbest Doks'un D-PGA-Doks kolonu terk ettikten sonra kolondan elüe olduğunu göstermektedir (Şekil 4.4). D-PGA-Doks molekülleri, yüksek molekül ağırlıklarına bağlı olarak kolonu boş hacimle birlikte terk ederken, serbest Doks molekülleri düşük molekül ağırlıkları sebebiyle elüsyon profilinde kuyruklanma olarak gözlenmektedir. Konjugatların elüsyon profili, kolonun uygun şekilde paklendiğini göstermek üzere kontrol olarak kullanılan mavi dekstran ile benzerlik göstermektedir.



**Şekil 4.4.** D-PGA-Doks'un elüsyon profili (Sephadex G25 kolon).

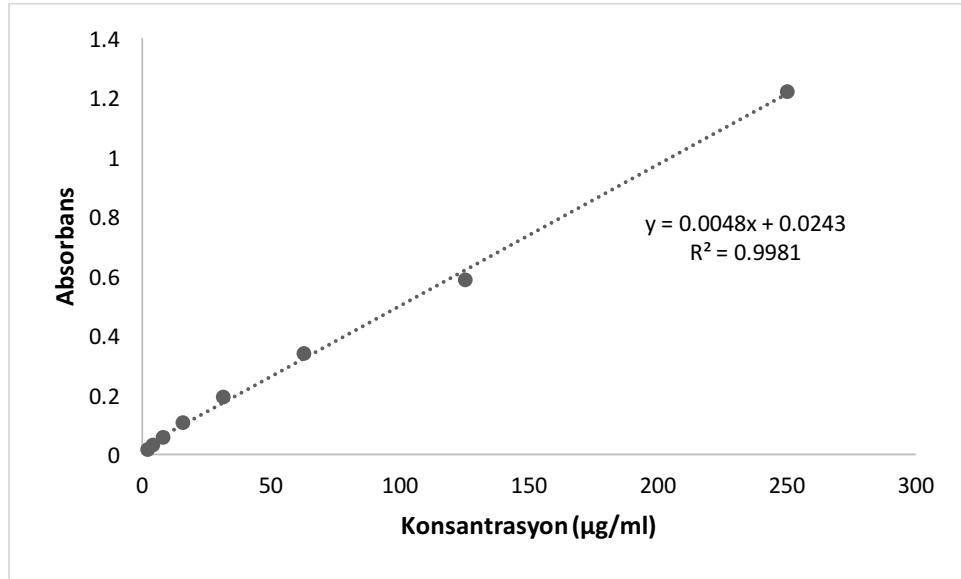
DSPL-Doks konjugatlarının Sephadex G25 kolon saflaştırmasını takiben elde edilen elüsyon profilleri Şekil 4.5'te gösterilmektedir. Konjugatlar büyük molekül ağırlıklarına bağlı olarak kolonu boş hacim içerisinde terk etmiştir. Serbest Doks molekülleri ise profilede kuyruklanma olarak gözlenmiştir.



**Şekil 4.5.** DSPL-Doks'un elüsyon profili (Sephadex G25 kolon).

#### 4.5. Konjugatların Karakterizasyonu

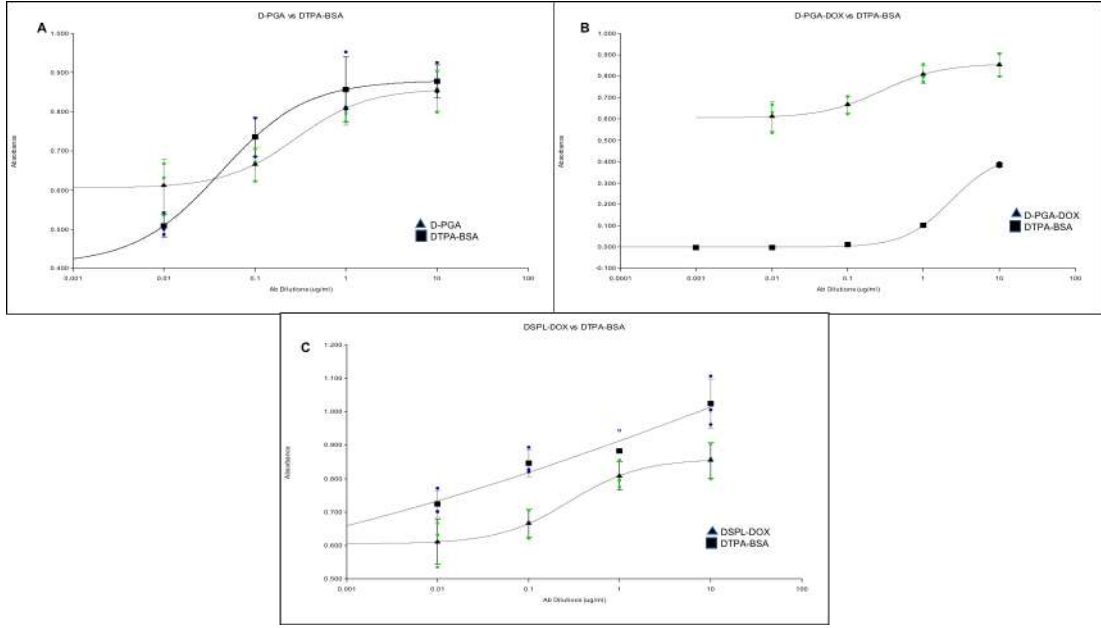
Hazırlanan konjugatlardaki Doks derişiminin tayin edilmesi amacıyla 1,95-250 µg/ml konsantrasyon aralığında sekiz noktali bir standart doğru oluşturulmuştur (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Doksorubisin HCl'e ait kalibrasyon doğrusu.

##### 4.5.1. D-PGA Konjugatlarının Tayini için ELISA testi

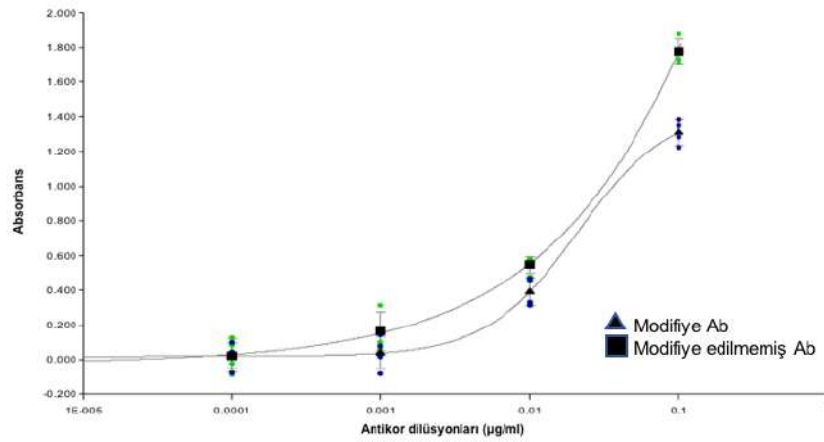
D-PGA örneği Doks ile konjuge edilmeden önce immunoreaktivitesi değerlendirilmiştir. Elde edilen tüm konjugatlarda (D-PGA, D-PGA-Doks ve DSPL-Doks) DTPA antijeninin varlığı ELISA testi ile gösterilmiştir (Şekil 4.7). Kontrol olarak kullanılan BSA-DTPA ile gözlenen immünoreaktivite farkı BSA molekülü üzerinde konjuge çok sayıda DTPA molekülü olmasından kaynaklanmaktadır.



Şekil 4.7. A. D-PGA, B. D-PGA-Doks, C. DSPL- Doks'un immunoreaktivitesi.

#### 4.5.2. Modifiye Edilmiş anti-DTPA'nın İmmunoreaktivite Tayini

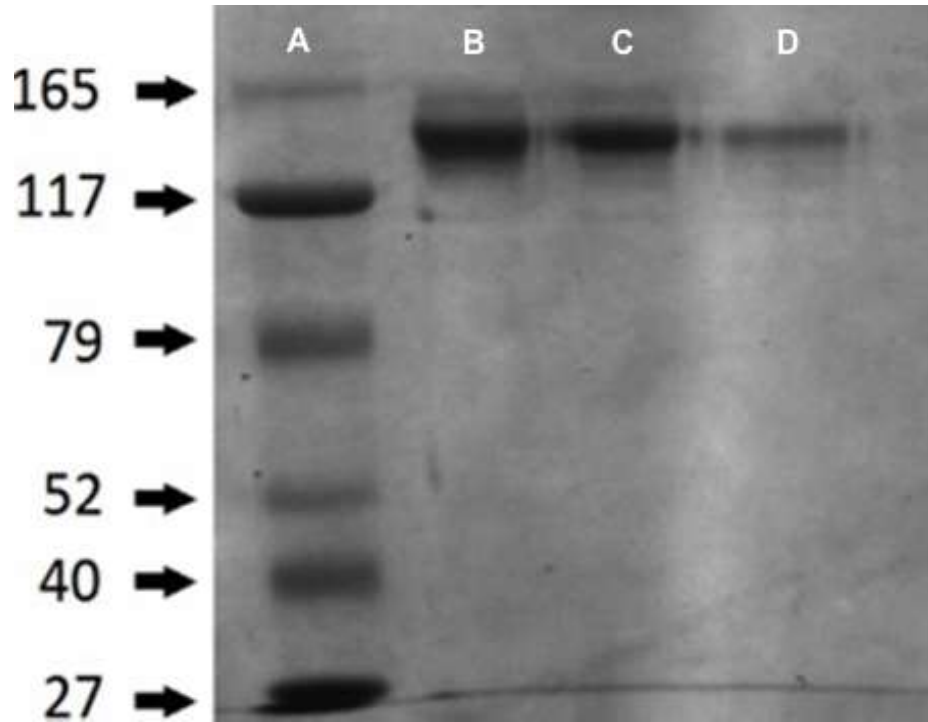
Bispesifik antikor kompleksleri elde edilmeden önce modifiye edilen tüm antikorların immunoreaktivitesi LyP-1 konjugasyonu öncesi ELISA testi ile kontrol edilmiştir. Modifikasyon öncesi ve sonrasında antikorun DTPA-BSA'ya (5 µg/ml) bağlanma özelliğinde değişikliğe rastlanmamıştır (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. LyP-1-bsAbC sentezinde kullanılan anti-DTPA'nın immunoreaktivitesi.

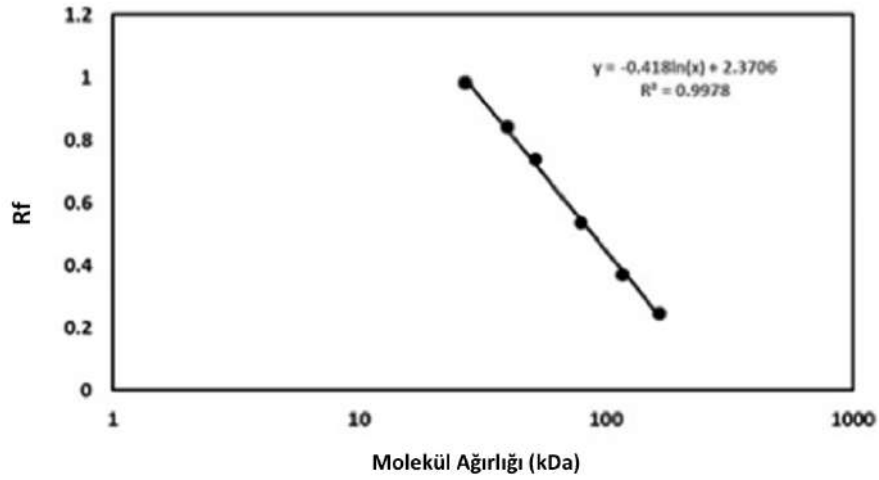
#### 4.5.3. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi SDS-PAGE

SDS – PAGE ile yapılan analiz sonrasında doğal (4,93 cm) ve modifiye edilmiş (4,84 cm) antikora ait monomerik bantların benzer olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.9). Peptit konjugasyonu ile elde edilen LyP-1-bsAbC'e ait bandın konjuge olmayan antikolar ile karşılaştırıldığında daha az ilerlediği görülmüştür (4,77 cm).



**Şekil 4.9.** Poliakrilamid jel görüntüsü **A.** Protein molekül ağırlığı standardı **B.** Modifiye edilmemiş antikor **C.** Modifiye edilmiş antikor **D.** LyP-1-bsAbC'e ait bant.

Moleküler ağırlıklara ait referans bantlarının  $R_f$  değerleri ile bu bantlara karşılık gelen molekül ağırlıkları grafiğe geçirilerek, örneklere ait ağırlıklar hesaplanmıştır (Şekil 4.10, Tablo 4.9). Molekül ağırlıklarına ait analizler Image Analysis Programı (Bio-rad, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



**Şekil 4.10.** Molekül ağırlıkları ile R<sub>f</sub> değerleri arasındaki doğrusal ilişki.

Hesaplanan molekül ağırlıklarına ait veriler Tablo 4.9'da verilmektedir. Antikorlara ait bantlar 142,878 kDa ve 143,498 kDa olarak bulunmuştur. LyP-1 bispesifik kompleksine ait bandın hesaplanan 145,006 kDa'lık değeri, antikorun molü başına 2 mol peptit konjuge edilmiş kompleksin teorik ağırlığı ile uyumludur (teorik molekül ağırlığı=145,486 kDa).

**Tablo 4.9.** Analizi yapılan örneklere ait R<sub>f</sub> değerleri ve molekül ağırlıkları.

Örnek	Başlangıç noktasından uzaklık (cm)	R <sub>f</sub>	Hesaplanan molekül ağırlığı (kDa)
Örnek A (Doğal antikor)	4,92	0,297	142,818
Örnek B (Bromoasetillenmiş antikor)	4,84	0,296	143,489
Örnek C (LyP-1-bsAbC)	4,77	0,290	145,006



#### 4.5.4. Floresan Aktive Hücre Ayırma (*Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS*) Analizi

Hazırlanan konjugatlar üzerinde akış sitometresi ile yürütülen analizler, tek başına Doks çözeltisi ile muamele edilen hücrelerin floresan şiddeti ile LyP-1'e ait ilaç konjugatları uygulanan hücreler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermiştir. LyP-1-Doks konjugatı ve Doks-DSPL-LyP-1 konjugatı ( $p < 0,0001$ ) uygulamasının Doks'a bağlı oluşan floresan şiddetini tek başına Doks çözeltisi uygulanan hücrelere oranla artırdığı gözlenmektedir (Tablo 4.10).

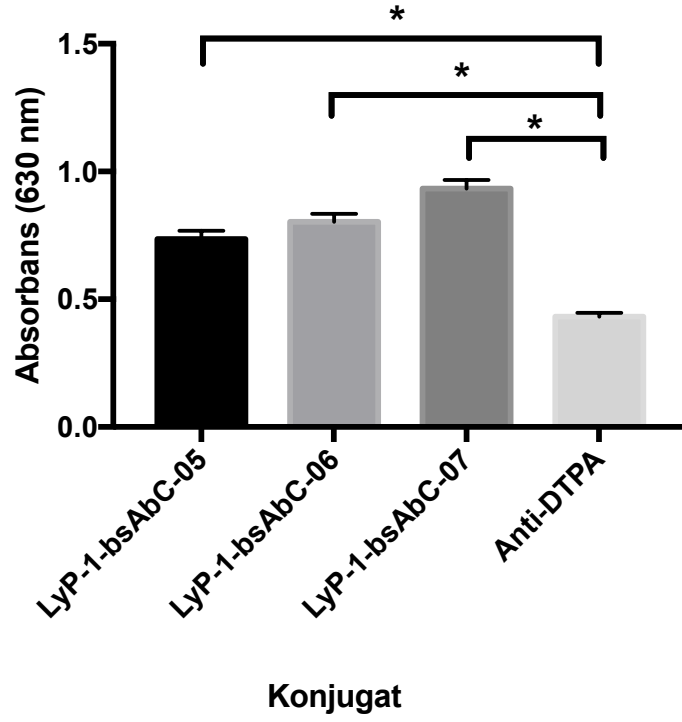
**Tablo 4.10.** LyP-1 konjugatlarına ait akış sitometresi sonuçları (MDA-MB-231 hücre hattı).

Örnekler	Kazıma		Tripsin Uygulaması	
	Ortalama	SS	Ortalama	SS
Otofloresan	4,06	0,12	4,31	0,10
Doks çözeltisi (5 µg/ml)	7,16	1,05	6,20	0,18
LyP-1-Doks (5 µg/ml)	22,88*	1,14	14,10*	0,49
Doks-DSPL-LyP-1 (5 µg/ml)	24,19*	0,13	-	-

\* $p < 0,0001$

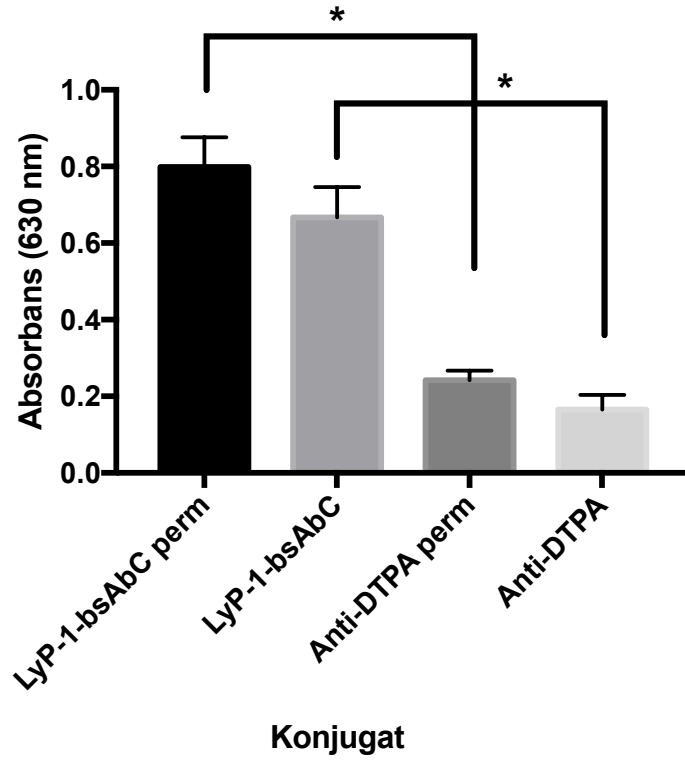
#### 4.5.5. *In-Cell* ELISA

Farklı zamanlarda seriler halinde hazırlanan bispesifik konjugatların (LyP-1-bsAbC-05, LyP-1-bsAbC-06, LyP-1-bsAbC-07) immünoaktivitelerini değerlendirmek üzere gerçekleştirilen *In-Cell* ELISA sonucunda seriler ve kontrol olarak kullanılan anti-DTPA grubu arasında farklılıklar olduğu gözlenmiştir ( $p < 0,01$ ) (Şekil 4.11).



**Şekil 4.11.** Farklı LyP-1-bsAbC serilerine ait immunoreaktivite sonuçları (\* $p < 0,0001$ ).

MDA-MB-231 hücrelerinin membran geçirgenliğinin sağlanmasının geçirgenliği artırılmamış hücrelerle karşılaştırıldığında bağlanmayı hafif bir şekilde artırdığı gösterilmiştir (Şekil 4.12). Geçirgenliği artırılmış ve artırılmamış hücre gruplarından her ikisinde de, kontrol olarak kullanılan ve spesifik olmayan bağlanmanın göstergesi olan anti-DTPA ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artmış bağlanma gösterilmiştir ( $p < 0,0001$ ).

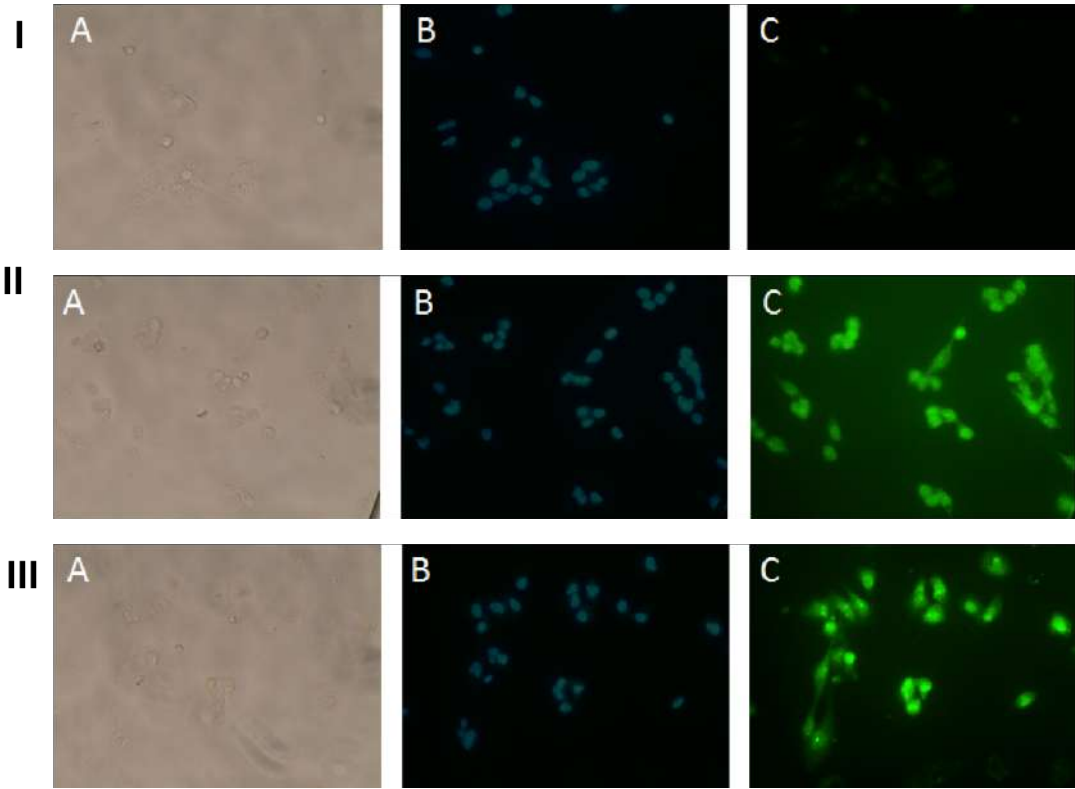


**Şekil 4.12.** LyP-1-bsAbC'e ait immunoreaktivite sonuçları (perm=geçirgenliği artırılmış MDA-MB-231 hücrelerinde, \* $p < 0,0001$ ).

Hücre membranının geçirgenliğinin artırılması, LyP-1-bsAbC konjugatlarının bağlanmasını önemli ölçüde etkilememiştir ( $p=0,0562$ ). Alınan sinyal şiddeti, geçirgenliği artırılmış hücreler için  $0,7985 \pm 0,0781$  olarak saptanırken geçirgenliği artırılmamış hücreler için bu değer  $0,6668 \pm 0,0797$  olarak okunmaktadır.

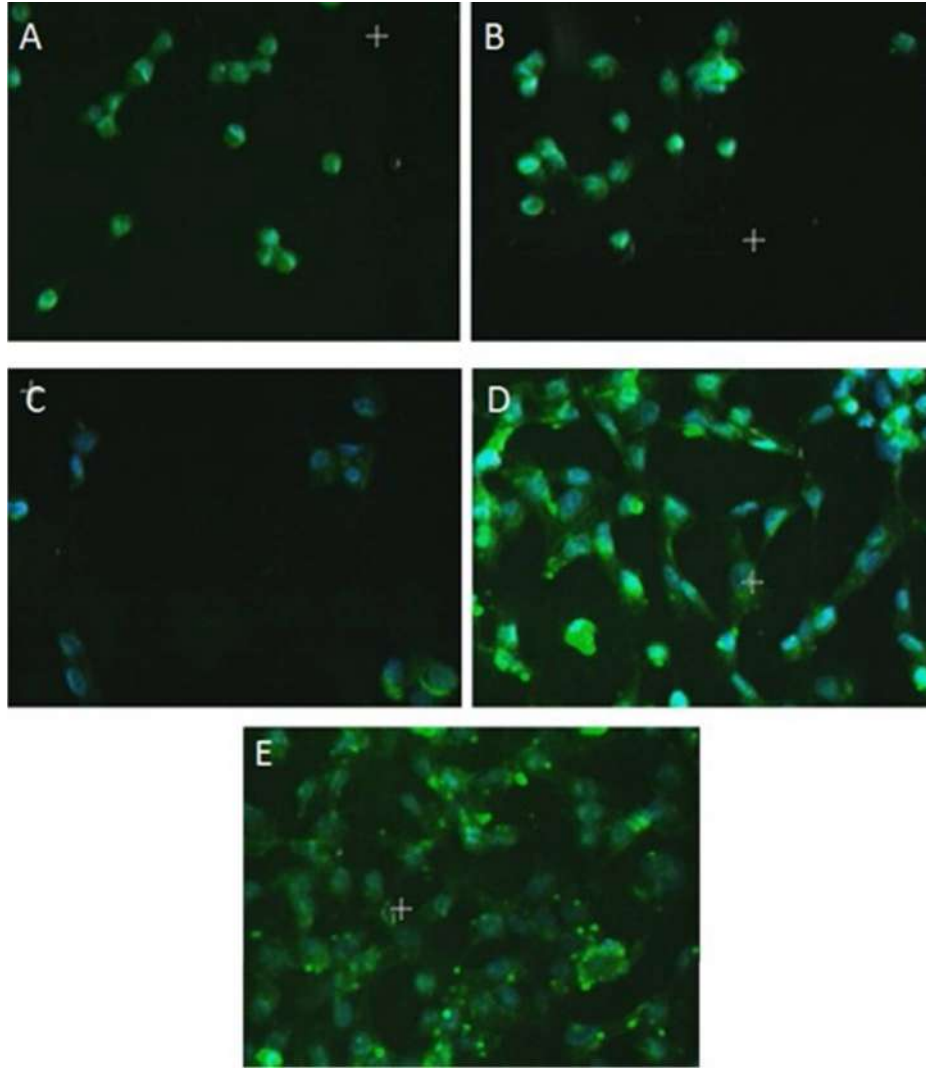
#### 4.5.6. İmmünohistokimya Çalışmaları

Floresin ile konjuge edilen lineer ve siklik peptitler MDA-MB-231 hücreleri ile  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 1 saat inkübasyon sonrası hücrelere bağlanma göstermiştir. Hücrelere ait ışık mikroskobu ve DAPI ile çekirdek boyamasına ait floresan mikroskop görüntüleri Şekil 4.13'te verilmiştir.



**Şekil 4. 13.** I. Tek başına floresin II. Lineer LyP-1-Floresin konjugatı III. Siklik LyP-1-Floresin konjugatı uygulanmış MDA-MB-231 hücrelerine ait mikroskop görüntüleri (40x) **A.** Işık mikroskobu, **B.** DAPI çekirdek boyası, **C.** Yeşil floresan.

LyP-1-Floresin konjugatlarının MDA-MB-231 hücrelerine bağlanmasının gösterilmesi ardından hücresel alım çalışmaları iCyte® Otomatikleştirilmiş Görüntüleme Sitometresi (Thorlabs Inc., NJ, USA) ile gerçekleştirilmiştir. Hücreler siklik LyP-1-Floresin konjugatı ile 30 dk., 1 sa., 3 sa., 6 sa.ve 24 sa. boyunca inkübe edildikten sonra konjugatların hücrelere girişi ve konumlanmasının değerlendirilmesi amacıyla floresan görüntüleme yapılmıştır (Şekil 4.14). Elde edilen görüntüler iCyte® ile analiz edilerek yeşil floresan integral değerleri (çekirdekte gözlenen yeşil floresan) ve yeşil periferik floresan integral değerleri (sitoplazmada gözlenen yeşil floresan) hesaplanmıştır (Tablo 4.11).



**Şekil 4.14.** LyP-1-Floresin ve DAPI ile muamele edilmiş MDA-MB-231 hücrelerine ait birleştirilmiş floresan mikroskop görüntüleri. **A.** 30 dk., **B.** 1 sa., **C.** 3 sa., **D.** 6 sa., **E.** 24 sa.

Floresan işaretli LyP-1 peptidinin hücrelere girişi 30. dk.'dan itibaren gözlenmeye başlamış olup 3 saat inkübasyon sonrası hazırlanan örnekte, sitoplazmadaki floresan işaretli peptit miktarında artma gözlenmiştir. 6. sa. ve 24. sa. örnekleri incelendiğinde floresan işaretli peptidin yoğunlaşmış noktalar halinde sitoplazmada görülmesine ek olarak, çekirdek içerisinde ve çevresinde de floresan şiddeti artmıştır.

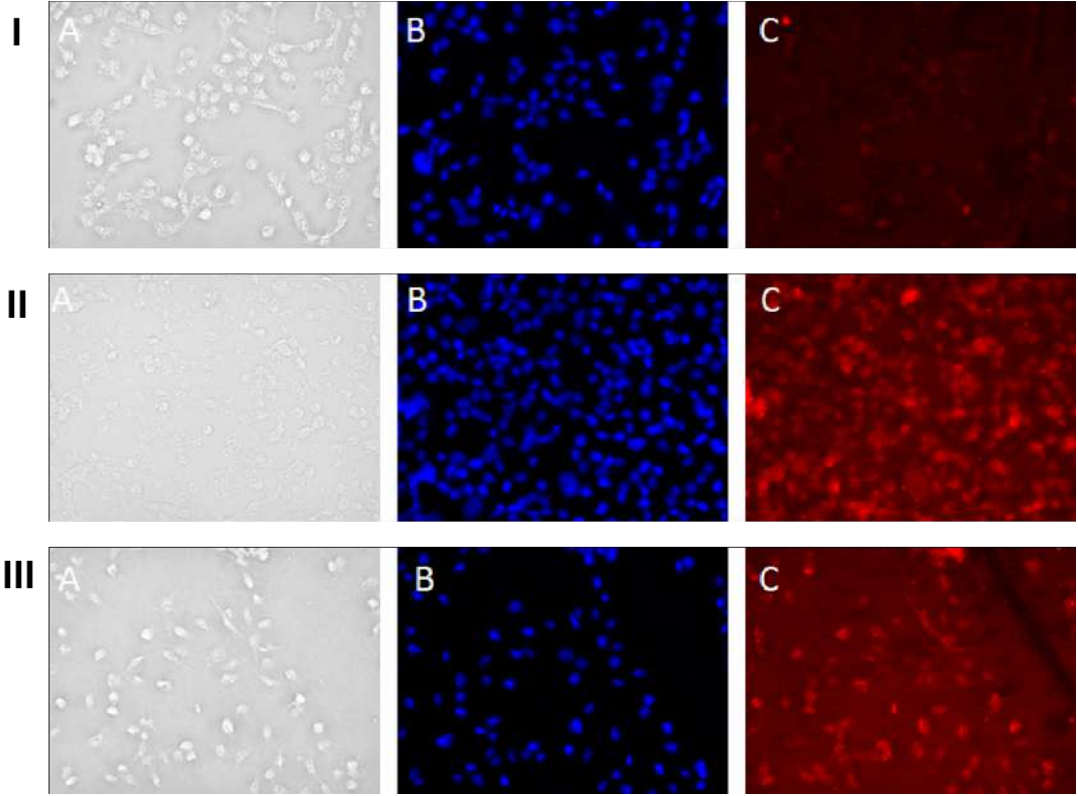
**Tablo 4.11.** LyP-1-Floresin'e ait görüntüleme sitometrisi sonuçları (MDA-MB-231 hücre hattı).

Zaman	Yeşil İntegral (Y.İ.)	SS	Yeşil Periferal İntegral(Y.P.İ.)	SS	Y.P.İ./Y.İ.	Y.İ./Y.P.İ.
<b>30 dk.</b>	10970675,21	6075795,98	13625155,61	4382238,42	1,41	0,8
<b>1 sa.</b>	11526177,38	6475958,14	9777425,38	4751356,46	0,9	1,3
<b>3 sa.</b>	15414251,25	8014136,53	12801439,89	5374872,08	0,84	1,35
<b>6 sa.</b>	14161084,49	6791697,65	14592808,06	5635334,11	1,07	1,02
<b>24 sa.</b>	11413131,43	6530919,66	16666825,71	5906966,88	1,63	0,69

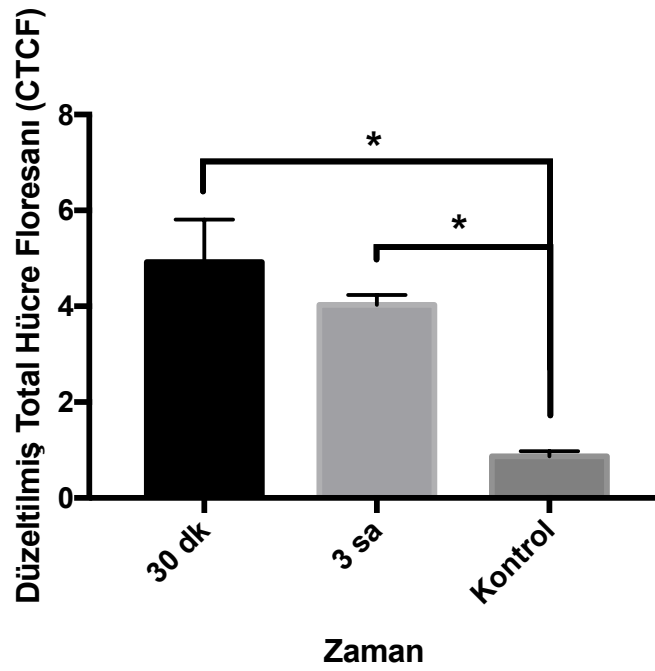
Ön hedeflendirme amacıyla LyP-1-bsAbC ile 30 dk. ve 3 sa. muamele sonrası 1 sa. süresince DSPL-RITC uygulanan MDA-MB-231 hücrelerine ait floresan mikroskop görüntüleri Şekil 4.15'te sunulmaktadır. LyP-1-bsAbC ile ön hedeflendirme yapılmadan DSPL-RITC uygulanan hücrelerde bağlanma görülmemiştir (Şekil 4.15.A). Maksimum hücre sel bağlanma 30 dk. ön hedeflendirme sonrasında 1 sa. süreyle DSPL-RITC uygulanan hücrelerde gösterilirken, 3 sa. ön hedeflendirme sonrası elde edilen sonuçlar, çekirdekte birikimin gözlendiği sonuçlar ile paralel bulunmuştur.

Ön hedeflendirme ile elde edilen floresan mikroskop görüntülerinin Image J Programı kullanılarak analiz edilmesiyle hesaplanan floresan şiddet değerleri Şekil 4.16'da verilmektedir. Düzeltilmiş total hücre floresanı (*Corrected total cell fluorescence-CTCF*) değerleri; LyP-1-bsAbC ile 30. dk. ve 3. saat inkübasyon ardından 1 sa. DSPL-RITC uygulanan hücreler için, tek başına DSPL-RITC (1 sa.) uygulanan kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı bulunmuştur ( $p=0,000442$  ve  $0,00001$ ,

sırasıyla). Bu durumda, hücrelerin yüzeyinde ifade edilen p32 reseptörünün liganda özgü olduğu söylenebilir.



**Şekil. 4.15.** İki basamakta uygulanan bispesifik hedeflendirmeye ait floresan mikroskop görüntüleri **I.** DSPL-RITC (kontrol, 1 sa.) **II.** LyP-1-bsAbC (30 dk.) + DSPL-RITC (1 sa.) **III.** LyP-1- bsAbC (3 sa.) + DSPL-RITC (1 sa.) uygulama. **A.** Işık mikroskobu, **B.** DAPI çekirdek boyası, **C.** Kırmızı floresan.



**Şekil 4.16.** İki basamaklı bispesifik kompleks uygulaması sonrası MDA-MB-231 hücrelerinde gösterilen Düzeltilmiş Total Hücre Floresanı değerleri (\* $p < 0,001$ ).

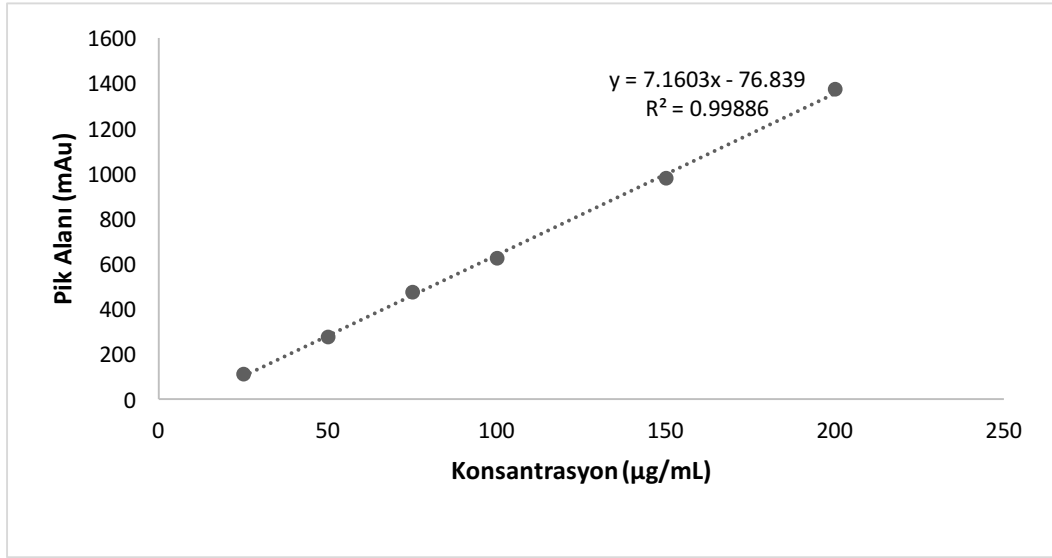
#### 4.6. Etkin Madde Miktar Tayin Yöntemi Geliştirilmesi ve Validasyonu

##### 4.6.1. HPLC Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu

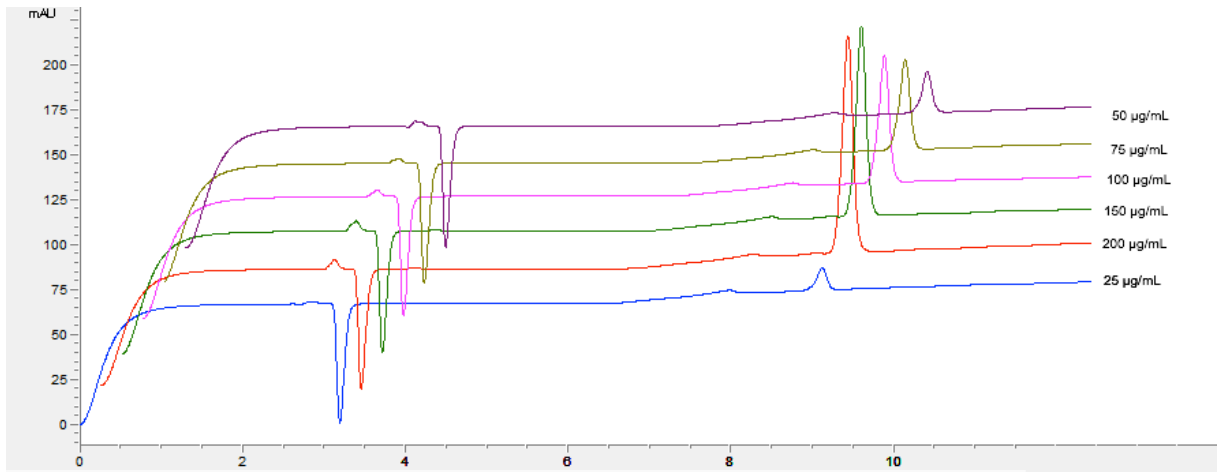
###### Doğrusallık

LyP-1'in saf su ile hazırlanan 6 farklı konsantrasyondaki çözeltisi kullanılarak kalibrasyon doğrusu çizilmiş ve regresyon analizi yapılarak doğru denklemleri elde edilmiştir. 6 seride yapılan ölçüm sonucu, hesaplanan kalibrasyon doğrusu denkleminin doğrusallığının kontrol edilmesi için "r" (regresyon katsayısı) değeri hesaplanmıştır. Şekil 4.17'de LyP-1'e ait kalibrasyon doğrusu ve Şekil 4.18'de kromatogramlar görülmektedir.





**Şekil 4.17.** LyP-1'in gradyan elüsyon ile elde edilen HPLC kalibrasyon doğrusu (n=6).



**Şekil 4.18.** LyP-1'in gradyan elüsyon ile elde edilen HPLC kromatogramları (n=6).

### Doğruluk

Yöntem doğruluğunun saptanabilmesi için düşük, orta ve yüksek konsantrasyonda (25, 100, 200 µl) 3 örneğin ardarda yapılan 3 enjeksiyonu sonrası % geri kazanımları ve % Bias değerleri hesaplanarak Tablo 4.12'de verilmiştir.

**Tablo 4.12.** LyP-1'e ait doğruluk değerleri (n=3).

<b>Eklene Derişim (µg/mL)</b>	<b>Hesaplanan Derişim (µg/mL)</b>	<b>%Geri Kazanım</b>	<b>Ortalama</b>	<b>SS</b>	<b>%Bias</b>
200	197,90	98,95	197,59	0,29	1,05
200	197,54	98,77			1,23
200	197,33	98,67			1,33
100	103,26	103,26	103,09	0,15	3,26
100	102,96	102,96			2,96
100	103,06	103,06			3,06
25	25,98	103,93	26,03	0,10	3,93
25	25,97	103,87			3,87
25	26,15	104,60			4,60

**Kesinlik****Tekrarlanabilirlik**

Ölçümler arasındaki kesinliği belirlemek için 200 µg/mL derişimdeki peptit çözeltilisinden 6 kez enjeksiyon yapılmış ve pik alanlarına karşılık gelen derişimler için ortalama, SS ve VK değerleri hesaplanarak yöntemin tekrarlanabilir olduğu Tablo 4.13'teki verilerle gösterilmiştir (VK<%2) (n=6).

**Tablo 4.13.** LyP-1'e ait tekrarlanabilirlik değerleri (n=6).

<b>Enjeksiyon Tekrarlanabilirliği</b>		<b>Yöntem Tekrarlanabilirliği</b>	
<b>Eklene Derişim (µg/mL)</b>	<b>Hesaplanan Derişim (µg/mL)</b>	<b>Eklene Derişim (µg/mL)</b>	<b>Hesaplanan Derişim (µg/mL)</b>
200	200,43	200	194,33
	205,53		194,03
	204,51		197,64
	200,46		197,99
	196,52		198,85

	199,31		197,37
<b>X<sub>ort</sub></b>	201,13	<b>X<sub>ort</sub></b>	196,70
<b>SS</b>	3,35	<b>SS</b>	2,02
<b>VK (%)</b>	1,67	<b>VK (%)</b>	1,03

### **Tekrar Elde Edilebilirlik**

Farklı deney zamanlarında yapılan enjeksiyonlar arasında fark olmadığını belirlenmesi için 6 farklı peptit çözeltisinden yapılan enjeksiyonlar sonucu bulunan pik alanlarına karşılık gelen derişimlerin ortalama, SS ve VK değerleri hesaplanarak yöntemin tekrarlanabilir olduğu Tablo 4.14'teki verilerle gösterilmiştir (VK<%2) (n=6).

**Tablo 4.14.** LyP-1'e ait tekrar elde edilebilirlik değerleri (n=6).

<b>1. gün</b>		<b>2. gün</b>	
<b>Eklene Derişim (µg/mL)</b>	<b>Hesaplanan Derişim (µg/mL)</b>	<b>Eklene Derişim (µg/mL)</b>	<b>Hesaplanan Derişim (µg/mL)</b>
200	202,23	200	199,89
	205,08		194,09
	200,95		205,58
	196,55		205,43
	198,13		198,52
	195,99		201,24
<b>X<sub>ort</sub></b>	199,82	<b>X<sub>ort</sub></b>	200,79
<b>SS</b>	3,55	<b>SS</b>	4,37
<b>VK (%)</b>	1,78	<b>VK (%)</b>	2,18
<b>X<sub>ort</sub></b>		200,31	
<b>SS</b>		3,83	
<b>VK (%)</b>		1,91	

## Duyarlılık

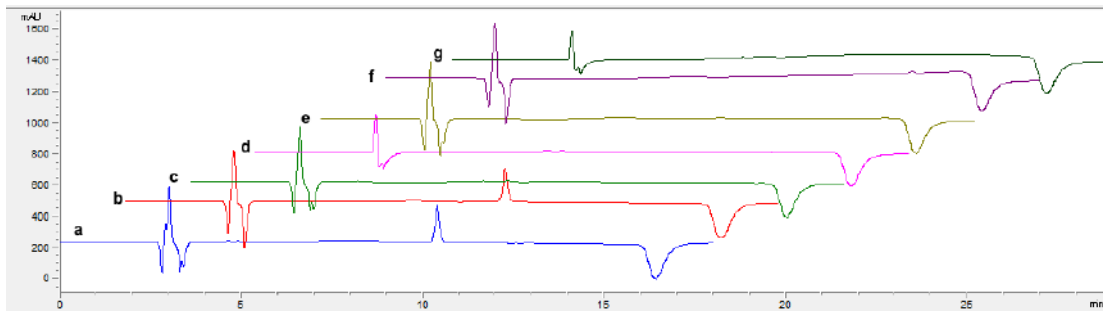
Kalibrasyon doğrusunun eğimi ve y-kesişim değerlerine ait standart sapma değeri ( $\sigma$ ) kullanılarak hesaplanan duyarlılık parametreleri Tablo 4.15'te verilmiştir.

**Tablo 4.15.** LyP-1'e ait duyarlılık değerleri.

Parametre	( $\mu\text{g/mL}$ )
LOD (Teşhis sınırı)	8,15
LOQ (Tayin sınırı)	24,70

## Özgünlük

Etkin madde, boş formülasyon ve formülasyon bileşenlerine ait kromatogram Şekil 4.19'da verilmiştir.

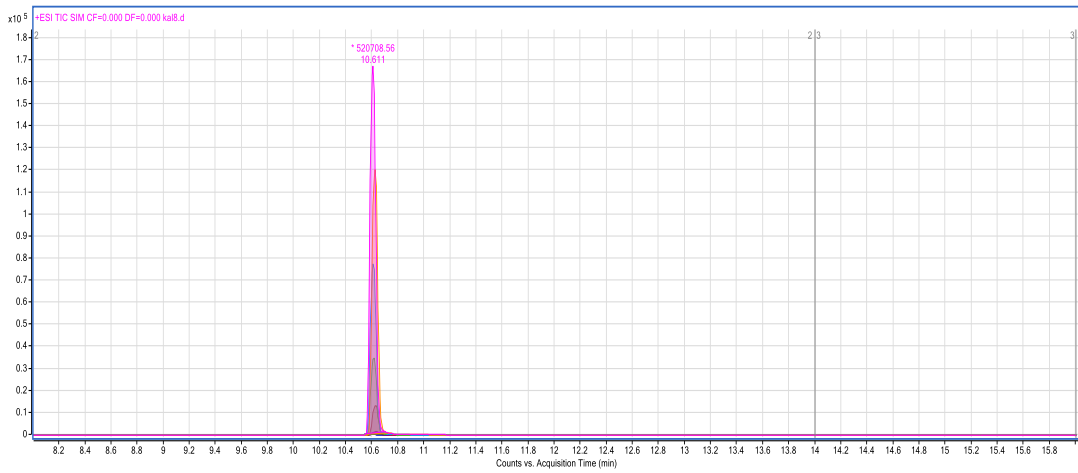


**Şekil 4.19.** LyP-1, boş formülasyon ve yardımcı maddelere ait kromatogramlar; **a.**LyP-1 SEDDS, **b.**LyP-1, **c.**SEDDS, **d.**Peceol, **e.**Propilen glikol, **f.**TPGS, **g.**Labrasol

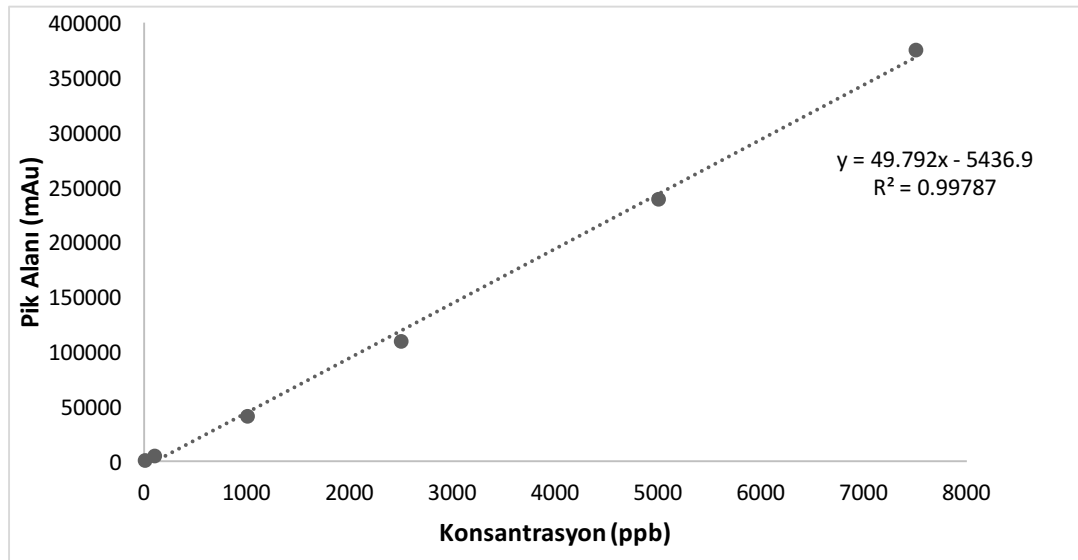
### 4.6.2. LC-MS/MS Yönteminin Geliştirilmesi

Geliştirilen LC-MS/MS yöntemine ait kalibrasyon doğrusu 10-7500 ng/mL (ppb) konsantrasyon aralığında belirlenen 6 adet konsantrasyonda enjeksiyonların yapılması ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.20). Elde edilen kalibrasyon doğrusuna ait grafik Şekil 4.21'de verilmiştir.

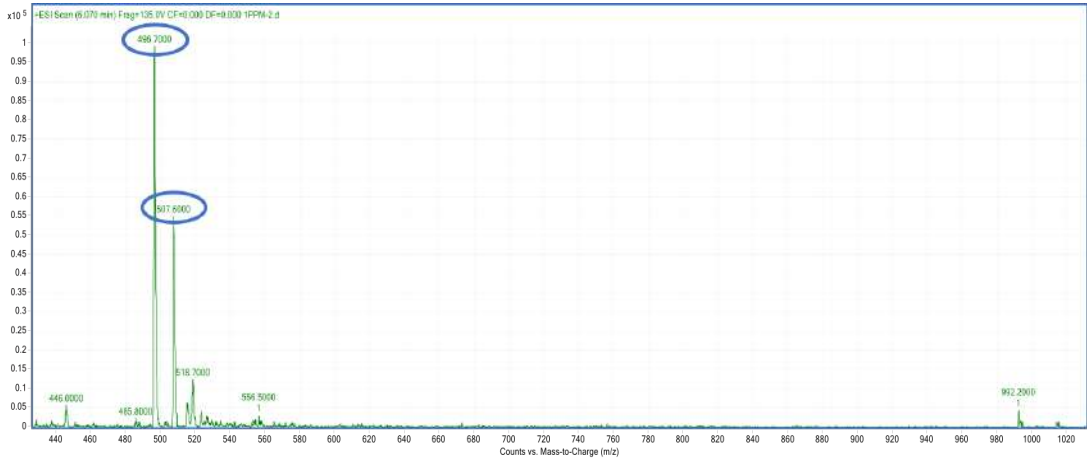
Yöntemde LyP-1'in miktar tayininin gerçekleştirilebilmesi amacıyla peptidin pozitif parçalanma pikleri içerisinde, peptide ait firma spesifikasyonlarında da yer alan 496,7 ve 507,6 parçalanma piklerinden 496,7 piki üzerinden saflaştırma yapılarak miktar tayininde kullanılacak morfolojide pikler elde edilmiştir. Peptide ait parçalanma piklerinin yer aldığı kromatogram Şekil 4.22'de gösterilmiştir.



Şekil 4.20. LyP-1'e ait LC-MS/MS kalibrasyon doğrusu pikleri.



Şekil 4.21. LyP-1'e ait LC-MS/MS kalibrasyon doğrusu (n = 6).



Şekil 4.22. LyP-1'e ait kütle spektrumu pikleri.

#### 4.7. Stabilite Çalışmaları

##### 4.7.1. Etkin Maddenin Stabilitesi

LyP-1'in farklı pH'lardaki  $k_{obs}$  ve  $t_{1/2}$  değerleri Tablo 4.16'da gösterilmiştir. Üç farklı tampon konsantrasyonunda çalışılan pH 3 – 10 aralığında, tampon konsantrasyonu arttıkça tampon katalizi nedeni ile parçalanma hızı da artmaktadır (Tablo 4.16).

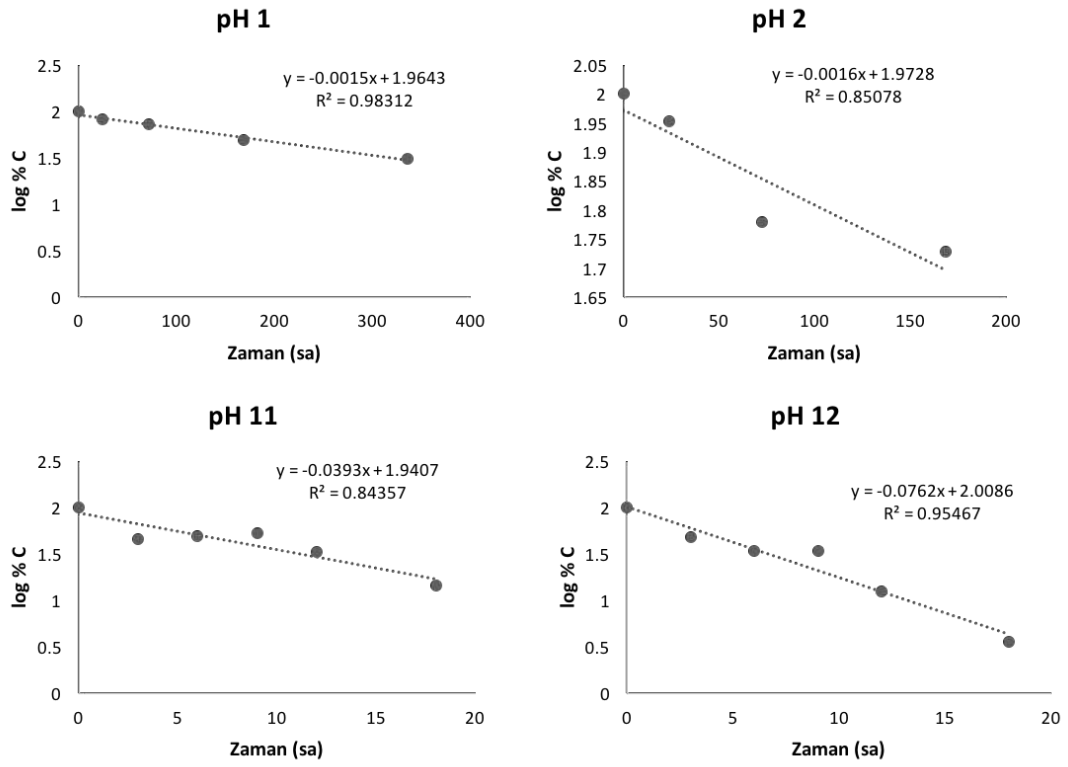
Tablo 4.16. Etkin maddeye ait  $k_{obs}$  ve  $t_{1/2}$  değerleri.

pH	Tampon Türü	Konsantrasyon (M)	$k_{obs}$ (saat <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (saat)
1	HCl	0,1	$3,37 \times 10^{-3}$	205,70
2	HCl	0,01	$3,77 \times 10^{-3}$	183,66
3	Fosfat	0,1	$3,6 \times 10^{-3}$	192,52
		0,05	$2,58 \times 10^{-3}$	268,26
		0,025	$1,32 \times 10^{-3}$	526,82
4	Asetat	0,2	$3,01 \times 10^{-1}$	2,29
		0,1	$1,07 \times 10^{-1}$	6,43
		0,05	$0,54 \times 10^{-1}$	12,68

**Tablo 4.16 (Devam).** Etkin maddeye ait  $k_{obs}$  ve  $t_{1/2}$  değerleri.

<b>5</b>	Asetat	0,2	$1,32 \times 10^{-1}$	5,26
		0,1	$0,38 \times 10^{-1}$	17,80
		0,05	$0,31 \times 10^{-1}$	22,23
<b>6</b>	Fosfat	0,05	$1,09 \times 10^{-2}$	63,58
		0,025	$2,86 \times 10^{-3}$	242,68
		0,0125	$0,53 \times 10^{-3}$	1299,31
<b>7</b>	Fosfat	0,05	$6,89 \times 10^{-3}$	100,53
		0,025	$2,50 \times 10^{-3}$	276,68
		0,0125	$2,16 \times 10^{-3}$	321,04
<b>8</b>	Tris	0,05	$1,36 \times 10^{-3}$	508,6
		0,025	$1,28 \times 10^{-3}$	540,16
		0,0125	$0,59 \times 10^{-3}$	1168,56
<b>9</b>	Tris	0,05	$2,07 \times 10^{-3}$	334,69
		0,025	$1,8 \times 10^{-3}$	385,27
		0,0125	$1,29 \times 10^{-3}$	539,25
<b>10</b>	Karbonat	0,025	$2,41 \times 10^{-2}$	28,80
		0,0125	$1,72 \times 10^{-2}$	40,38
		0,00625	$1,02 \times 10^{-2}$	67,76
<b>11</b>	Fosfat	0,025	$9,05 \times 10^{-2}$	7,66
<b>12</b>	NaOH	0,01	$1,75 \times 10^{-1}$	3,95

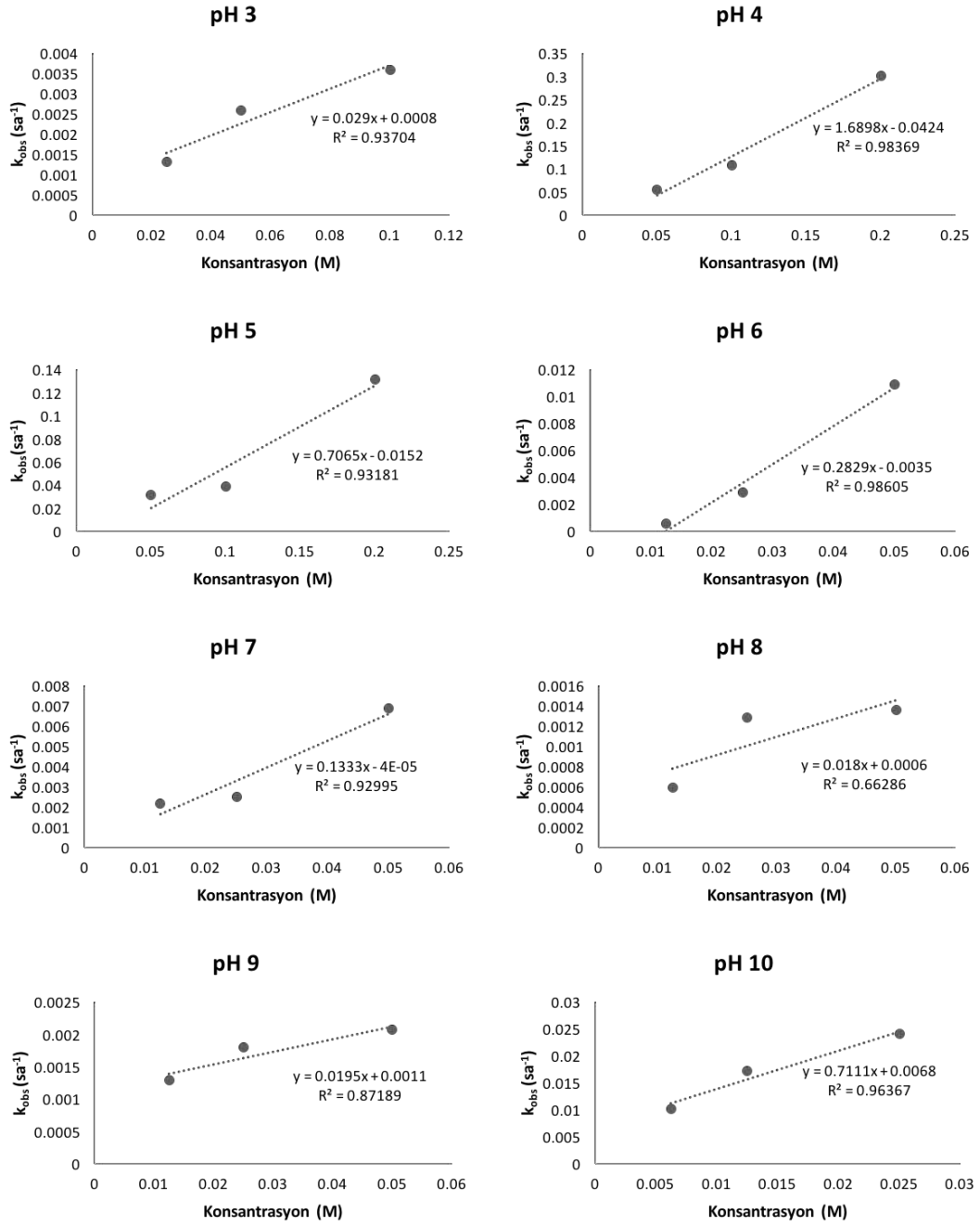
LyP-1'in tek bir tampon konsantrasyonunda stabilitesinin incelendiği pH 1, pH 2, pH 11 ve pH 12 için zamana karşı değişen madde miktarları Şekil 4.23'te gösterilmiştir.



**Şekil 4.23.** pH 1, pH 2, pH 11 ve pH 12'ye ait log % C – zaman grafikleri.

LyP-1'in üç farklı tampon konsantrasyonunda stabilitesinin incelendiği pH 3 – pH 10 aralığı için tampon konsantrasyonuna karşı değişen  $k_{obs}$  değerlerine ait grafikler Şekil 4.24'te gösterilmiştir.





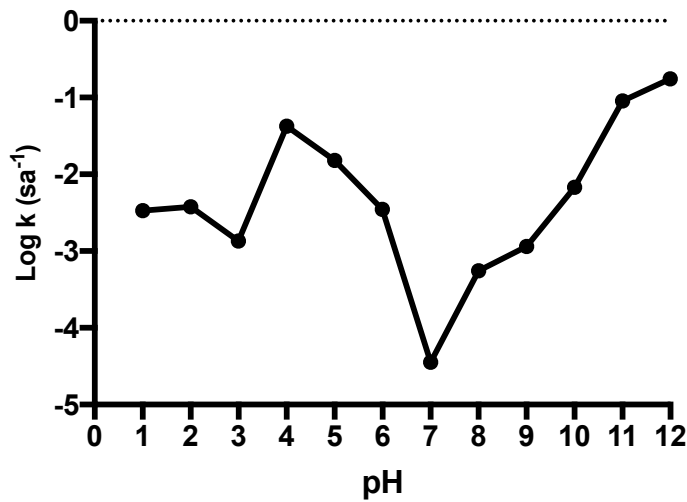
Şekil 4.24. pH 3 – 10'a ait konsantrasyon (M)– $k_{obs}$  ( $sa^{-1}$ ) grafikleri.

Şekil 4.24'te yer alan konsantrasyon (M)– $k_{obs}$  ( $sa^{-1}$ ) grafiklerinden hareketle hesaplanan  $k_0$  değerleri ve yarılanma ömürleri ( $t_{1/2}$ ) Tablo 4.17'de verilmiştir.

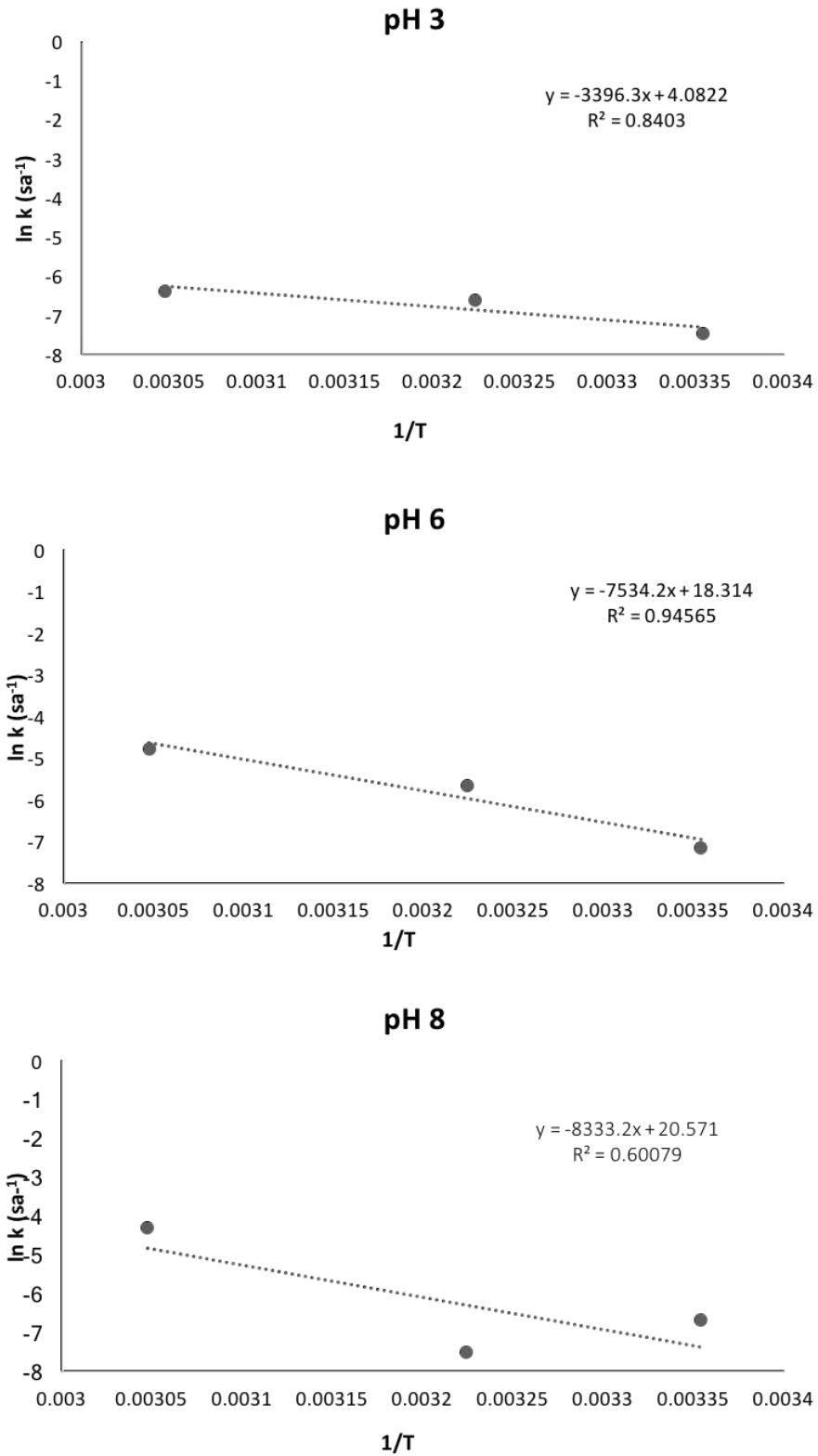
**Tablo 4.17.** pH 3 – 10'a ait  $k_0$  ve  $t_{1/2}$  değerleri

pH	$k_0$ (saat <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (saat)
3	$1,35 \times 10^{-3}$	512,5
4	$4,24 \times 10^{-2}$	16,3
5	$1,52 \times 10^{-2}$	45,6
6	$3,49 \times 10^{-3}$	198,6
7	$3,56 \times 10^{-5}$	19417,7
8	$5,53 \times 10^{-4}$	1252,6
9	$1,15 \times 10^{-3}$	603,1
10	$6,78 \times 10^{-3}$	102,2

Farklı pH değerlerindeki tampon çözeltilerden elde edilen  $k_0$  değerlerinin logaritması pH değerlerine karşı grafiklenerek peptide ait pH – hız profili elde edilmiştir (Şekil 4.25). Çalışılan pH aralığında peptidin stabilitesinin pH 7'de en yüksek değere ulaştığı görülmektedir.

**Şekil 4.25.** LyP-1'e ait pH – hız profili.

Sıcaklığın peptidin parçalanma reaksiyonu hızı üzerine etkisinin incelendiği Arrhenius doğruları pH 3, pH 6 ve pH 8 için Şekil 4.26'da verilmiştir.



Şekil 4.26. pH 3, 6 ve 8 tamponları için oluşturulan Arrhenius doğruları.

Çalışılan üç farklı pH ve sıcaklıkta hesaplanan  $k_0$  değerleri ve söz konusu pH'larda gerçekleşen parçalanma reaksiyonlarına ait aktivasyon enerjileri Tablo 4.18'de verilmiştir.

**Tablo 4.18.** pH 3, 6 ve 8 tamponlarında gerçekleştirilen kinetik çalışmalar sonucu elde edilen  $k_0$  ve  $E_a$  değerleri.

		Sıcaklık			$E_a$ (kcal/mol)
		25 °C	37 °C	55 °C	
$k_0$ (sa <sup>-1</sup> )	pH 3	0,58 x 10 <sup>-3</sup>	1,35 x 10 <sup>-3</sup>	1,69	6,75
	pH 6	0,79 x 10 <sup>-3</sup>	3,49 x 10 <sup>-3</sup>	8,39	14,97
	pH 8	1,25 x 10 <sup>-3</sup>	0,55 x 10 <sup>-3</sup>	13,37	16,56

Çalışılan üç farklı pH değerinde de artan sıcaklık ile reaksiyon hız sabitinin arttığı gözlenmektedir. 37 °C sıcaklıkta elde edilen  $k_0$  değerleri pH – hız-profilinde elde edilen sonuçlarla benzer eğilim göstermektedir.

#### 4.7.2. Formülasyonların Stabilitesi

Sıvı formülasyonlardan seçilen 5 adet formülasyona ait 14 günlük stabilite çalışması sonrasında elde edilen damlacık büyüklüğü ve zeta potansiyel değerleri Tablo 4.19'da görülmektedir. 14 gün sonunda seçilen formülasyonlarda damlacık boyutlarında meydana gelen değişim istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

**Tablo 4.19.** Seçilen boş formülasyonlara ait stabilite çalışması (n=3).

Formülasyon	Zaman (gün)	D.B. (d.nm)	PDi	Zeta Potansiyel (mV)
<b>U8-F21</b>	0	19,6±1,06	0,37±0,01	-0,051±0,03
	3	15,88±0,29	0,19±0,01	-0,81±0,74
	7	16,59±0,26	0,22±0,01	0,06±0,65
	14	26,92±0,33	0,47±0,01	0,1±0,84
<b>U9-F17</b>	0	17,15±0,12	0,17±0,01	0,13±1,03
	3	16,97±0,06	0,17±0,01	0,76±0,45
	7	17,98±0,06	0,22±0,01	-0,33±0,85
	14	19,11±0,57	0,24±0,01	0,41±0,68
<b>U9-F21</b>	0	15,36±0,08	0,11±0,01	0,78±2,5
	3	15,15±0,04	0,12±0,01	-0,22±0,28
	7	17,18±0,02	0,22±0,01	-1,01±0,7
	14	15,64±0,27	0,14±0,03	-0,91±1,13
<b>U9-F23</b>	0	16,01±0,12	0,13±0,01	0,63±1,11
	3	15,98±0,02	0,12±0,01	0,27±0,49
	7	18,22±1,14	0,23±0,03	-1,21±0,79
	14	16,66±0,18	0,18±0,02	-0,54±0,91
<b>U12-F17</b>	0	17,94±0,3	0,27±0,02	-0,98±0,12
	3	27,57±0,15	0,30±0,01	-0,74± 1,53
	7	19,2±0,43	0,31±0,01	-0,98±0,62
	14	21,15±2,63	0,27±0,08	-0,87±0,13

#### 4.8. Dissolüsyon Çalışması

Geliştirilen katı SEDDS formülasyonlarına ait dissolüsyon çalışmaları sonunda alınan örneklerin LC-MS/MS yöntemi ile analiz edilmesi ile elde edilen madde miktarları Tablo 4.20’de verilmiştir.

**Tablo 4.20.** Dissolüsyon çalışmalarında kullanılan formülasyonlara ait etkin madde çözünme değerleri.

Formülasyon Kodu	Ortam	Madde Miktarı (ppm)	% çözünen madde miktarı
TSD <sup>1</sup> –U9F21	0,1 N HCl	0,117	7,07
	Tampon (pH 6,8)	1,048	83,81
KSD <sup>2</sup> –U9F21	0,1 N HCl	0,122	7,38
	Tampon (pH 6,8)	1,176	94,08
TLYO <sup>3</sup> – U9F21	0,1 N HCl	0,118	7,12
	Tampon (pH 6,8)	0,765	61,22
KLYO <sup>4</sup> – U9F21	0,1 N HCl	0,214	12,87
	Tampon (pH 6,8)	0,599	47,96

<sup>1</sup>TSD: Püskürterek kurutma ile elde edilen tablet formülasyonu, <sup>2</sup>KSD: Püskürterek kurutma ile elde edilen kapsül formülasyonu, <sup>3</sup>TLYO: Liyofilizasyon ile elde edilen tablet formülasyonu, <sup>4</sup>KLYO: Liyofilizasyon ile elde edilen kapsül formülasyonu.

Tablet ve kapsül formlarında hazırlanan formülasyonların, asit ve tampon ortamda etkin madde çözünme oranlarında; katılaştırmada kullanılan yöntemin etkisinin olduğu gözlenmiştir. Püskürterek kurutma yöntemi ile elde edilen formülasyonlardan etkin maddenin çözünme oranı daha yüksek bulunurken, liyofilize edilerek hazırlanan katı formülasyonlardan etkin maddenin daha az çözündüğü belirlenmiştir. Asit ortamda yürütülen çalışmalarda, tüm formülasyonlarda peptidin %7,07 ile %12,87 aralığında çözündüğü saptanmıştır. Bu durumda, peptidin hazırlanan katı formülasyonlarıyla, stabilitesinin daha az olduğu

asit ortamdan korunarak bağırsak ortamını taklit eden tampon ortamında daha fazla çözüneceği görülmektedir.

#### **4.9. Hücre Kültürü Çalışmaları**

##### **4.9.1. Formülasyonlara Ait Çalışmalar**

###### **Sitotoksosite Çalışmaları**

Sitotoksosite çalışmaları kapsamında, önformülasyon çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre seçilerek Caco-2 hücrelerine uygulanan formülasyonlara ait hücre canlılığı sonuçları Şekil 4.27’de görülmektedir. Sıvı formülasyonlar için yapılan seyreltmeler pH 7,4 fosfat tamponu ile gerçekleştirilmiştir. Pozitif kontrol grubundaki hücrelere hücre kültürü ortamı ve pH 7,4 fosfat tamponu karışımı uygulanmıştır. 24 saat sonunda hücrelerin canlılıkları MTT testi kullanılarak değerlendirilmiştir.

Farklı oranlarda seyreltmeler halinde uygulanan sıvı formülasyonların hücreler üzerinde gösterdikleri etkilerde 1:200 ve 1:400 seyreltme oranlarında sadece U9-F21 formülasyonu ile kontrol grubu arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmamıştır ( $p=0,9996$ ,  $p=0,9802$ , sırasıyla). 1:1600 seyreltme oranında kontrol grubu ile fark bulunmayan formülasyon grupları U9-F21 ve U9-F23 iken, 1:3200 seyreltmede sadece U9-F13 ( $p<0,001$ ) ve U8-F21 ( $p<0,0001$ ) formülasyonları kontrol grubundan istatistiksel açıdan farklı bulunmuştur. Hücre canlılığı üzerinde formülasyon etkilerinin daha ayrıntılı olarak incelenebilmesi için 1:8000-1:64000 aralığında yapılan dilüsyonlar ile formülasyonlar karşılaştırılmıştır.

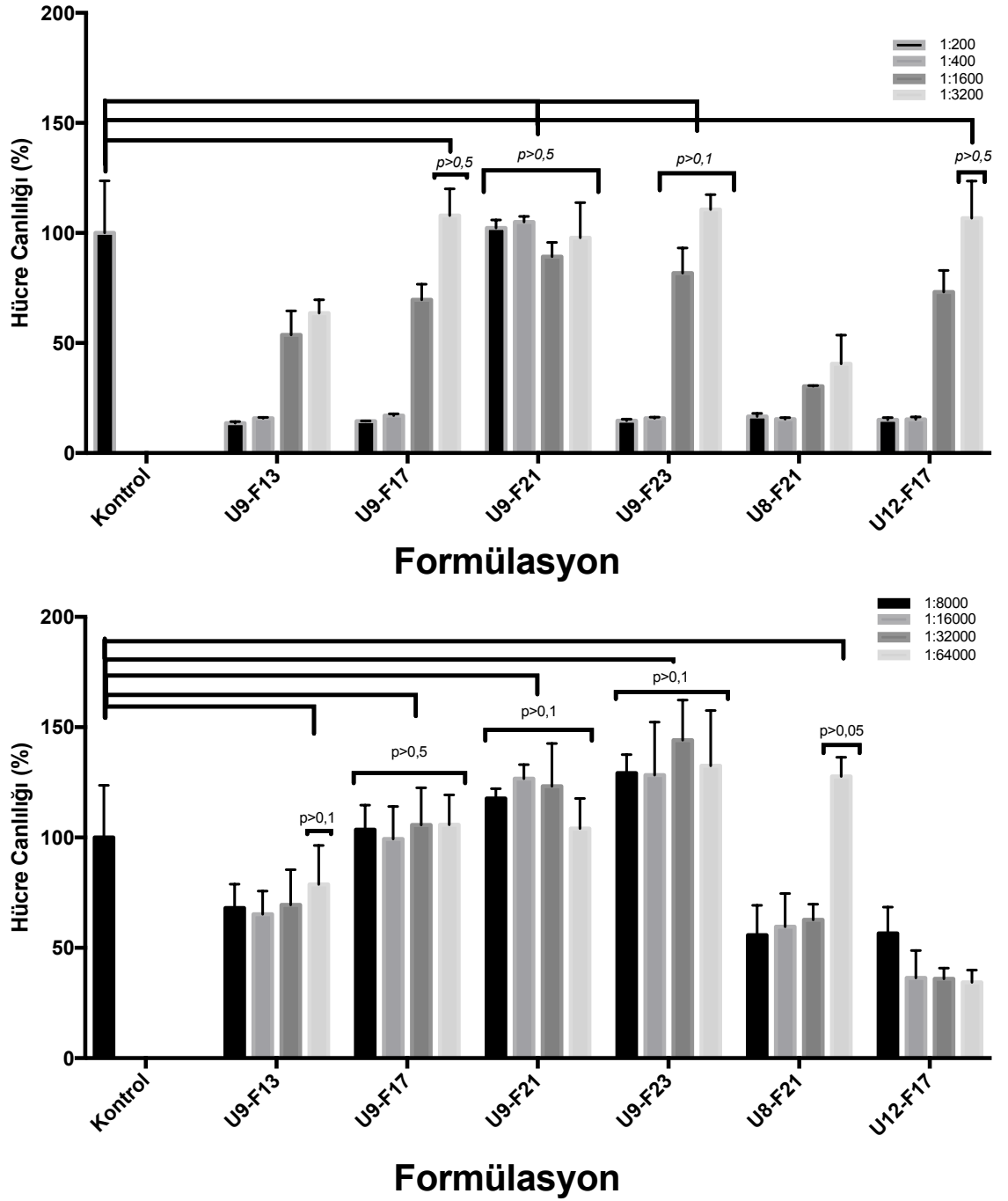
24 saatin sonunda U9-F21 formülasyonuna ait dilüsyonlar arasında (1:200-1:64000) en düşük dilüsyon da dahil olmak üzere istatistiksel açıdan anlamlı

fark bulunmamakla birlikte, hücre canlılığının en düşük ortalama değeri %89 olarak gözlenmiştir ( $p>0,05$ ).

Sıvı formülasyonların 1:8000 – 1:32000 seyreltme ile uygulandığı aralık için U9-F17, U9-F21 ve U9-F23 formülasyonları ile kontrol grubu arasında fark gözlenmezken; 1:32000 seyreltme oranında, söz konusu gruba U9-F13 formülasyonu da eklenmiştir. 1:8000 – 1:64000 seyreltme aralığında U12-F17 formülasyonu, uygulanan diğer formülasyonlardan farklı bulunmuştur. Bu formülasyonlar dışında kalan gruplarda 1:1600-1:64000 aralığı için hücre canlılığı en düşük %69 olarak gözlenmiştir.

En yüksek seyreltme oranı olan 1:64000 seyreltmede, U12-F17 formülasyonu dışındaki formülasyonlarda hücre canlılığı değerleri ile kontrol grubu arasında istatistiksel açıdan fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

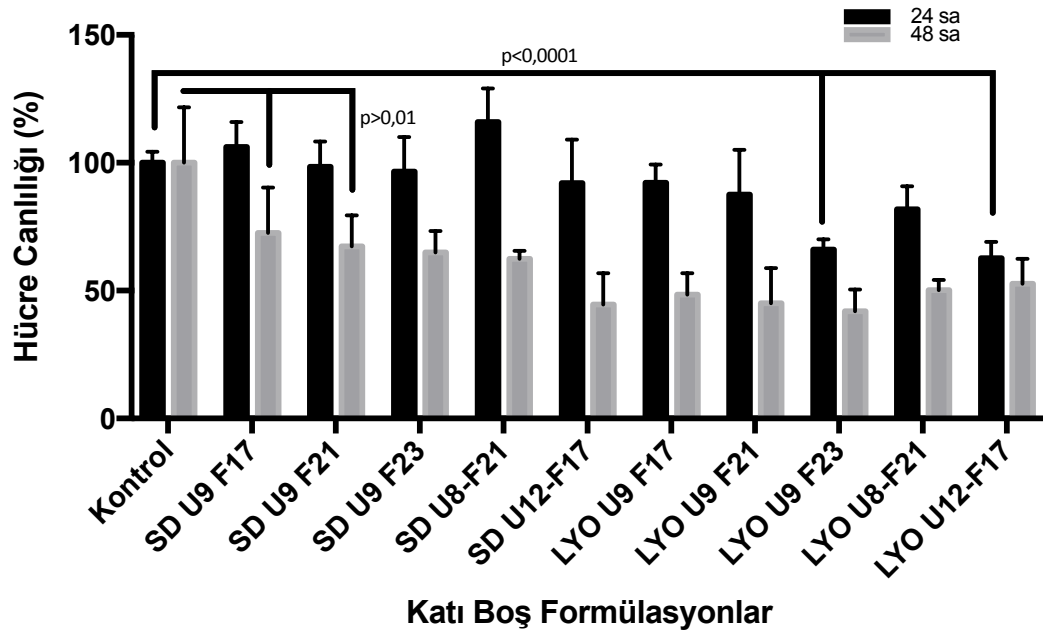




**Şekil 4.27.** Sıvı formülasyonların Caco-2 hücre canlılığı üzerine etkileri (1:200-1:64000 dilüsyon, 24 saat) (n=4).

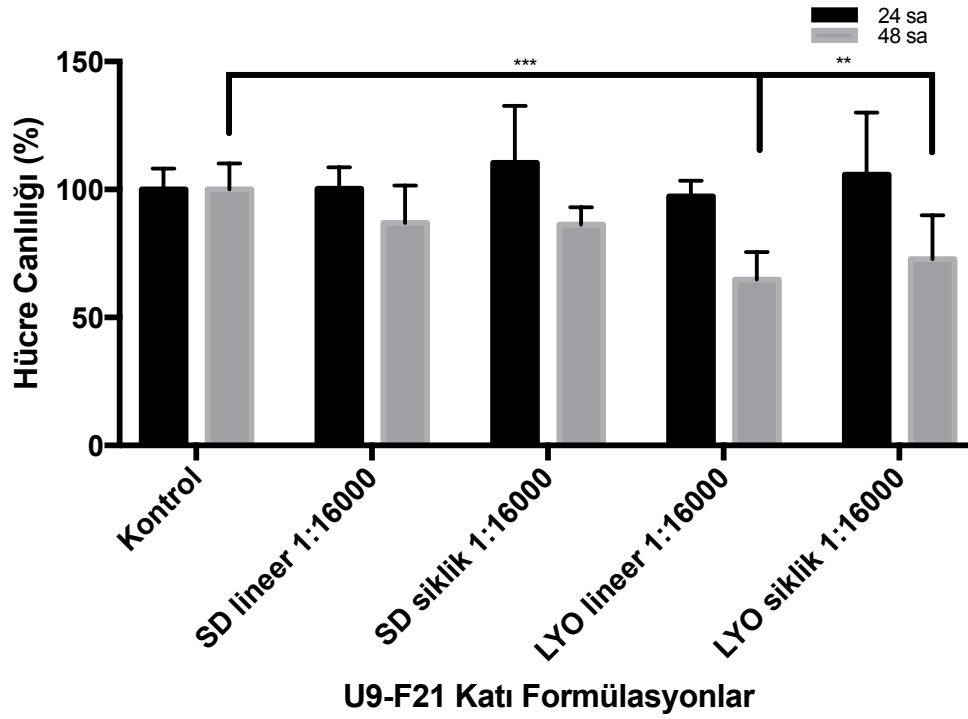
Formülasyon çalışmaları sonunda seçilen 5 adet formülasyondan hareketle katılaştırma sonucu elde edilen formülasyonların; 1:10000 seyreltme ile Caco-2 hücre hatlarına uygulanması sonucu (Şekil 4.28) 24 saat sonunda liyofilizasyon ( $p>0,01$ ) ve püskürterek kurutma ( $p>0,05$ ) ile elde edilen formülasyon gruplarında, grup içi fark gözlenmemiştir. 24 saatin sonunda liyofilizasyon ile elde edilen U9-F23 ve liyofilizasyon ile elde edilen U12-F17 formülasyonları dışında kalan formülasyonlar ile pozitif kontrol grubu arasında fark bulunmamaktadır ( $p>0,05$ ).

Liyofilizasyon ile elde edilen formülasyonlar arasında 48 saat sonunda da istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Püskürterek kurutma ile elde edilen formülasyonlar için ise, U12-F17 formülasyonu ile U9-F17 ( $p<0,01$ ) ve U9-F21 ( $p<0,05$ ) formülasyonları arasında fark gözlenmiştir. 48 saatin sonunda püskürterek kurutma ile elde edilen U9-F17 ve U9-F21 formülasyonları ile pozitif kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ( $p>0,01$ ). Formülasyonların gastrointestinal kanalda sonsuz seyrelmeye uğrayacağı düşünüldüğünde, bağırsak hücreleri üzerinde toksik etki göstermeyecekleri öngörülmektedir.



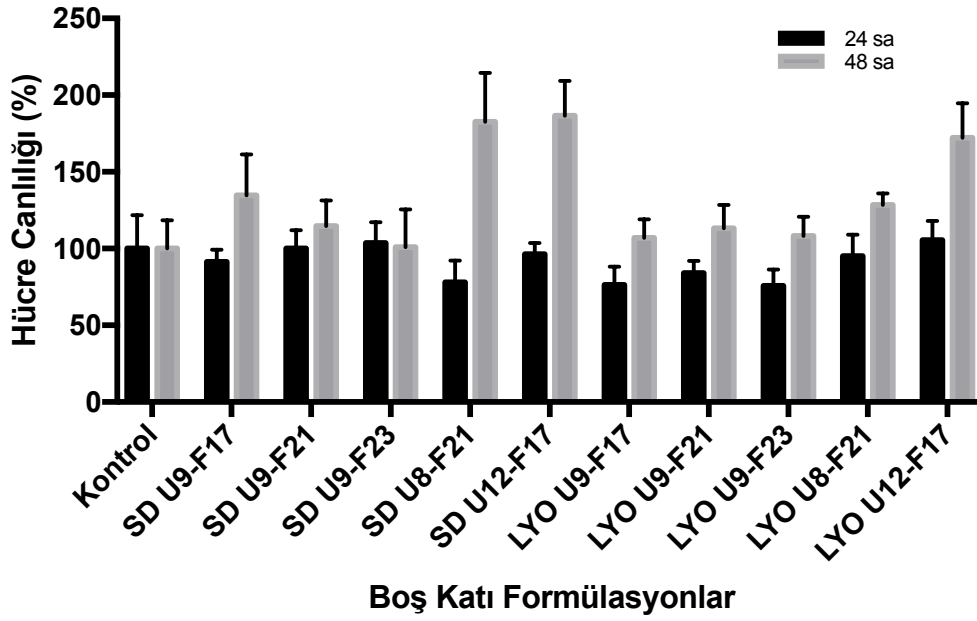
**Şekil 4.28.** Katı boş formülasyonların Caco-2 hücre canlılığı üzerine etkileri (n=6).

U9-F21 kodlu formülasyon içerisinde peptidin lineer ve siklik formu Caco-2 hücrelerine uygulandığında 24 saat sonunda 1:16000 seyreltmede formülasyonlar ile pozitif kontrol arasında fark gözlenmemiş olup (Şekil 4.29), ortalama hücre canlılığı %97-110 arasında değişmektedir ( $p > 0,05$ ). 48 saat sonunda ise 1:16000 seyreltme oranında hücre canlılığının %64-94 aralığında olduğu gösterilmiştir. Bu durumda, bağırsak ortamında sonsuz seyrelmeye uğrayacak olan formülasyonların bağırsak hücreleri üzerinde toksik etki göstermeden absorbe olması beklenmektedir.



**Şekil 4.29.** U9-F21 kodlu katı formülasyonların Caco-2 hücre canlılığı üzerine etkileri (n=4) (\*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001).

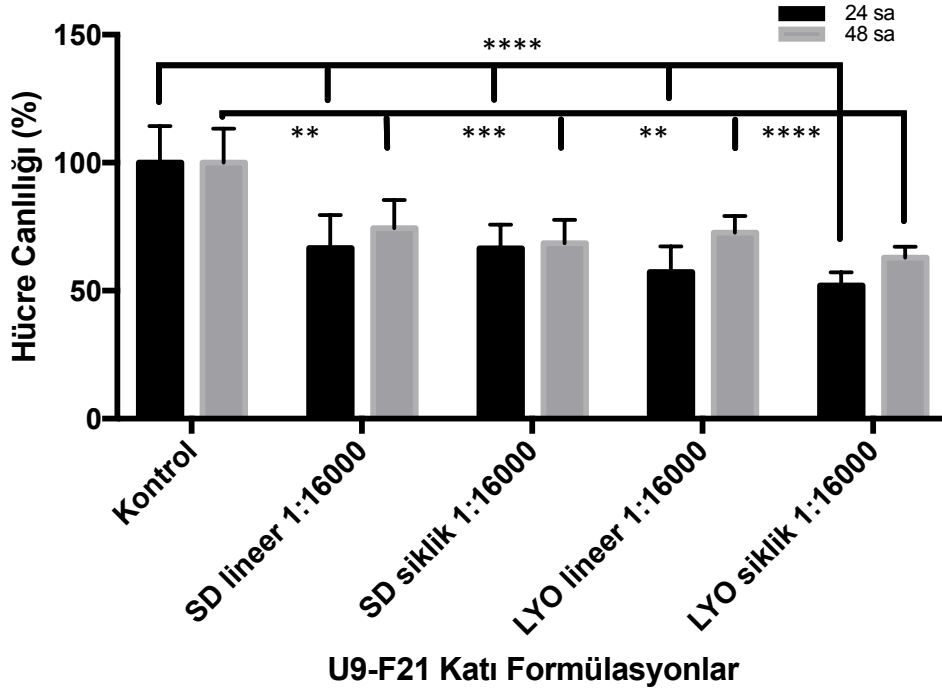
Katı formülasyonların peptidin sitotoksik etkisinden bağımsız olarak tek başına MDA-MB-231 hücreleri üzerinde yaptığı etkilerin incelenmesi için 24 saatlik ve 48 saatlik periyotlarda hücre canlılıkları incelenmiştir (Şekil 4.30). 48 saat sonunda hiçbir formülasyonda toksik etki gözlenmemesinin yanı sıra formülasyon içerisinde yer alan yağ bazlı yardımcı maddelerin varlığı sebebiyle tüm formülasyonlarda hücre canlılıklarında artma gözlenmiştir.



Şekil 4.30. Katı formülasyonların MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerine etkileri (n=4).

#### Biyoaktivite Çalışmaları

MDA-MB-231 hücre hattı ile gerçekleştirilen biyoaktivite çalışmaları sonucunda 24 ve 48 saatlik süre için 1:16000 seyreltme oranında tüm formülasyonlarda gözlenen hücre canlılıkları istatistiksel açıdan pozitif kontrol grubundan farklı bulunmuştur ( $p < 0,01$ ) (Şekil 4.31). Liyofilizasyon ile elde edilen formülasyon grubunda 24 saatin sonunda biyoaktivite, lineer ve siklik peptit kullanılan formülasyonlarda sırasıyla artmaktadır. Püskürterek kurutma ile elde edilen formülasyonlar için ise lineer ve siklik peptidi içeren formülasyonların biyoaktivitesi kullanılan formülasyona türüne göre istatistiksel açıdan farklılık göstermemiştir. 48 saat sonunda hücre canlılıklarında meydana gelen artışın formülasyonlarda yer alan yağ bazlı yardımcı maddelerin varlığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

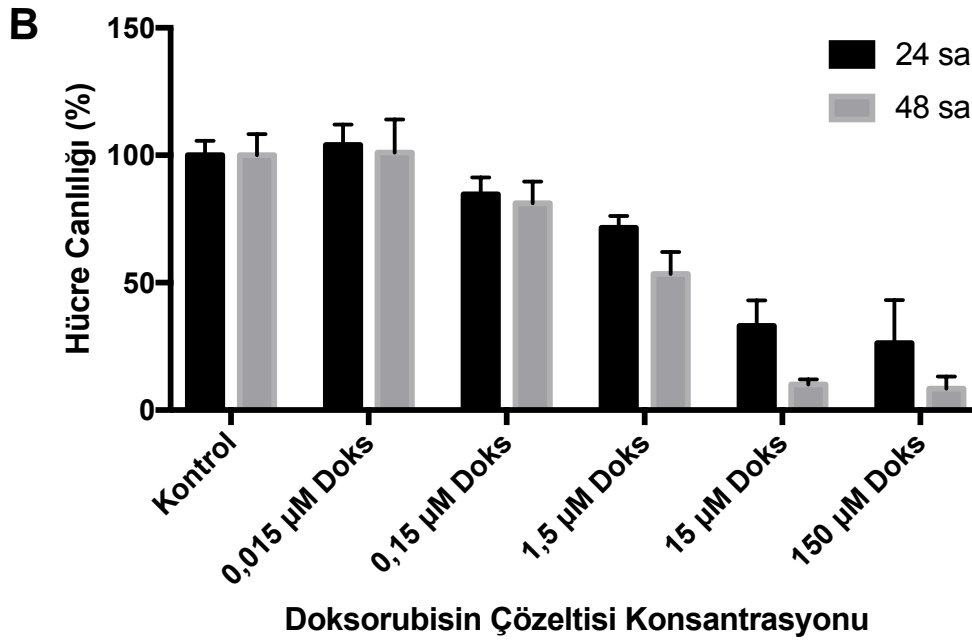
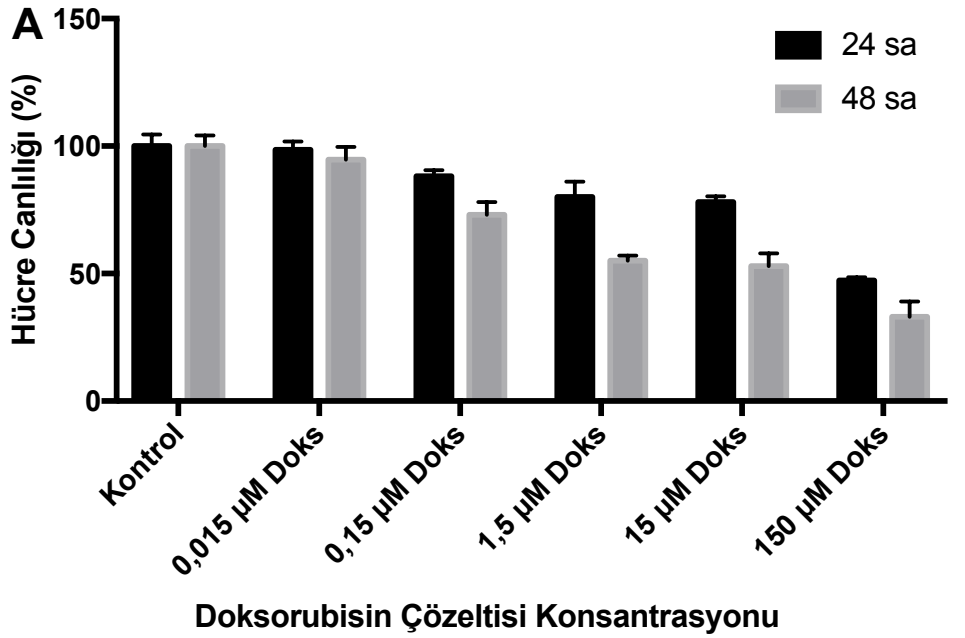


**Şekil 4.31.** U9-F21 kodlu katı formülasyonların MDA-MB-231 hücre canlılığı üzerine etkileri (n=4) (\*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; \*\*\*\* p<0,0001).

Doksorubisin konsantrasyonunun hücre canlılığı üzerine etkisi incelendiğinde; MDA-MB-231 hücre hattında 24. saatin sonunda sadece kontrol grubu ile en düşük konsantrasyondaki doksorubisin grubu arasında anlamlı fark gözlenmezken, diğer tüm gruplarda hücre canlılığı anlamlı derecede düşmüştür (Şekil 4.32.A). 1,5 µM konsantrasyonda uygulanan doksorubisin ile 10 kat düşük ve yüksek konsantrasyonları (0,15 ve 15 µM) arasında fark gözlenmezken; geriye kalan tüm konsantrasyon grupları kendi içerisinde birbirinden farklı bulunarak doz bağımlı eğilim doğrulanmıştır. 48 saat sonunda da benzer şekilde en düşük konsantrasyondaki doksorubisin grubu ile kontrol grubu arasında fark bulunmamış olup diğer tüm gruplar istatistiksel açıdan farklı hücre canlılık değerlerine sahiptir.

4T1 hücre hattı incelendiğinde de; 24. ve 48. saatlerde benzer şekilde sadece en düşük konsantrasyonda etki gözlenmezken, çoklu grup karşılaştırmalarında,

15 ve 150  $\mu\text{M}$  grupları dışındaki konsantrasyonlarda hücreler üzerinde gruplar arası fark görülmüştür (Şekil 4.32.B).

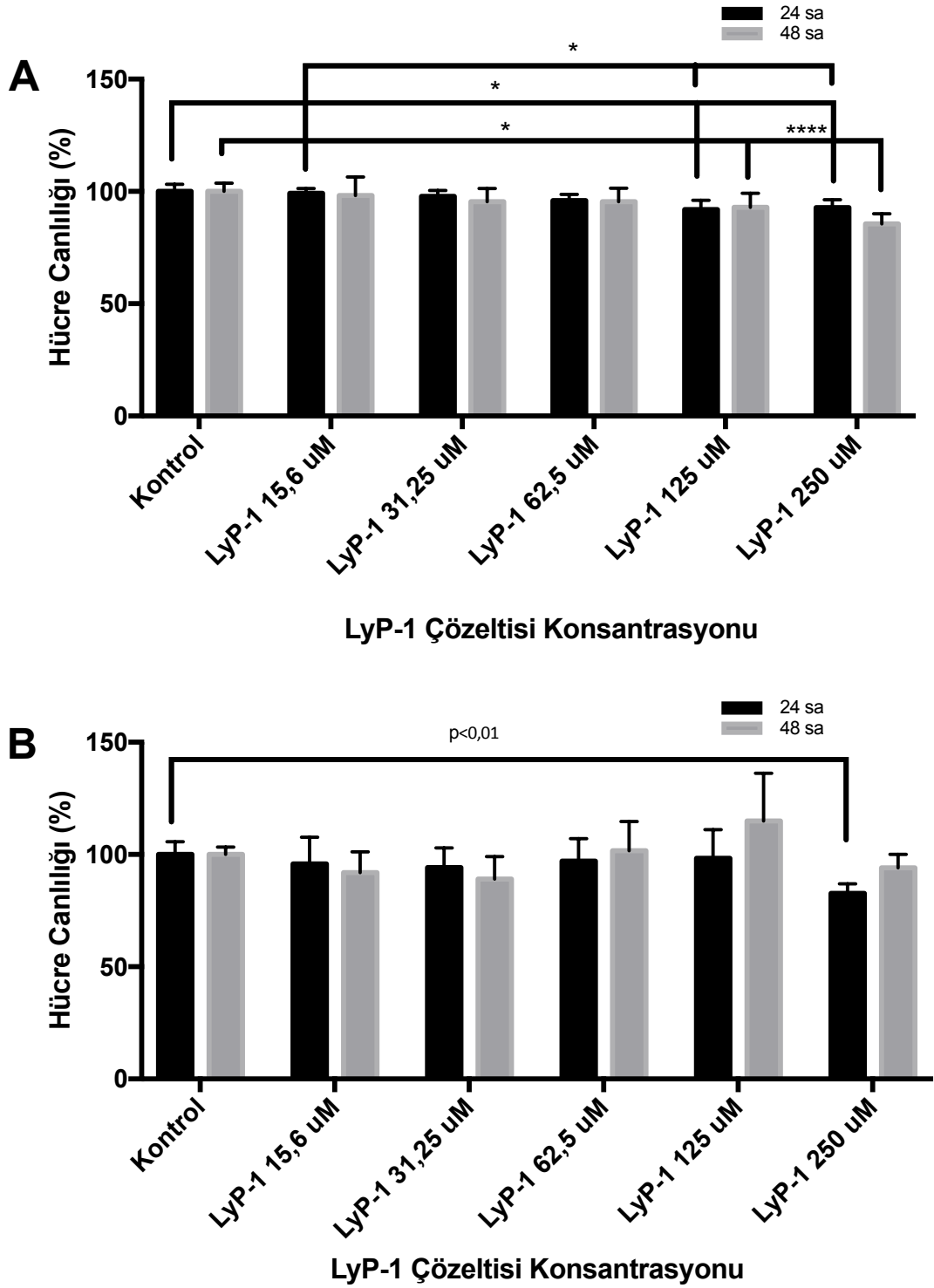


**Şekil 4.32.** Meme kanseri hücre hatlarında Doks konsantrasyonu değişimlerinin % hücre canlılığına etkisi (serumsuz ortam). **A.** MDA-MB-231 **B.**4T1 hücre hattı.

MDA-MB-231 hücre hattında 24 ve 48 saat süreyle LyP-1'in farklı konsantrasyonları uygulandığında (Şekil 4.33); 24 saatin sonunda 125 ve 250 µM konsantrasyonda kontrol grubu ile anlamlı fark gözlenmiştir (\*p<0,1) (Şekil 4.33.A). Konsantrasyon farkının hücre canlılığına etkisi değerlendirildiğinde ise 15,6 µM konsantrasyonda uygulama ile 125 ve 250 µM konsantrasyonda uygulamalar arasında, konsantrasyona bağlı bir fark olduğu görülmektedir (\*p<0,1). 48. saate gelindiğinde, kontrol grubu ile 125 ve 250 µM konsantrasyonlarda görülen fark devam etmekte olup; 250 µM konsantrasyonda uygulanan peptidin hücrelere diğer tüm gruplardan daha toksik bir şekilde etki gösterdiği gözlenmiştir (\*\*\*\*p<0,0001).

4T1 hücre hattında elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde; MDA-MB-231 hücre hattında görülen konsantrasyona bağlı eğilim değişmekte; 24. saatin sonunda sadece kontrol grubu ile 250 µM konsantrasyonda uygulanan peptit grubu arasında fark gözlenmektedir (Şekil 4.33.B).

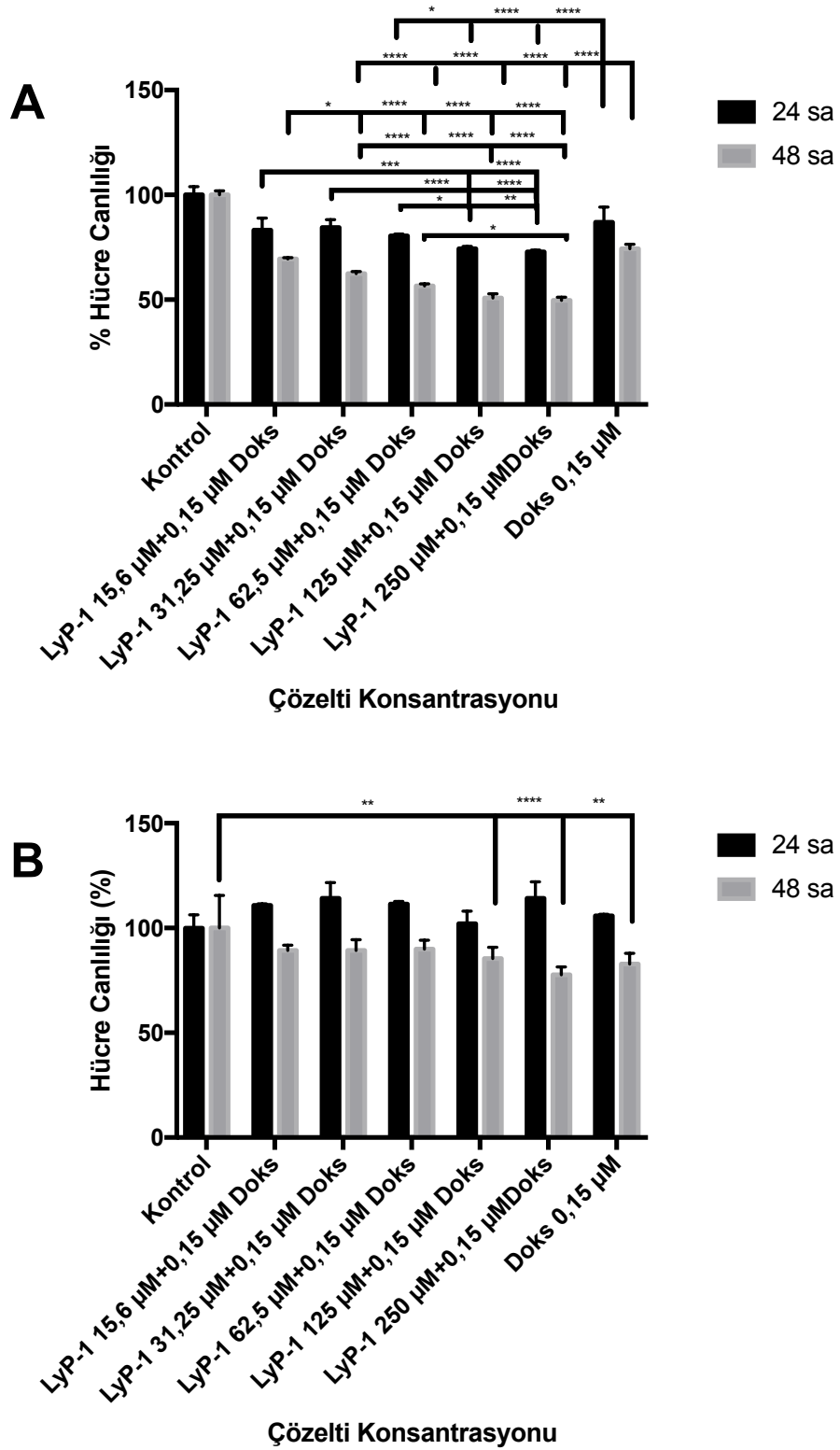




**Şekil 4.33.** Meme kanseri hücre hatlarında LyP-1 konsantrasyonu değişimlerinin % hücre canlılığına etkisi (serumsuz ortam). **A.** MDA-MB-231 **B.**4T1 hücre hattı. (\* $p < 0,1$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

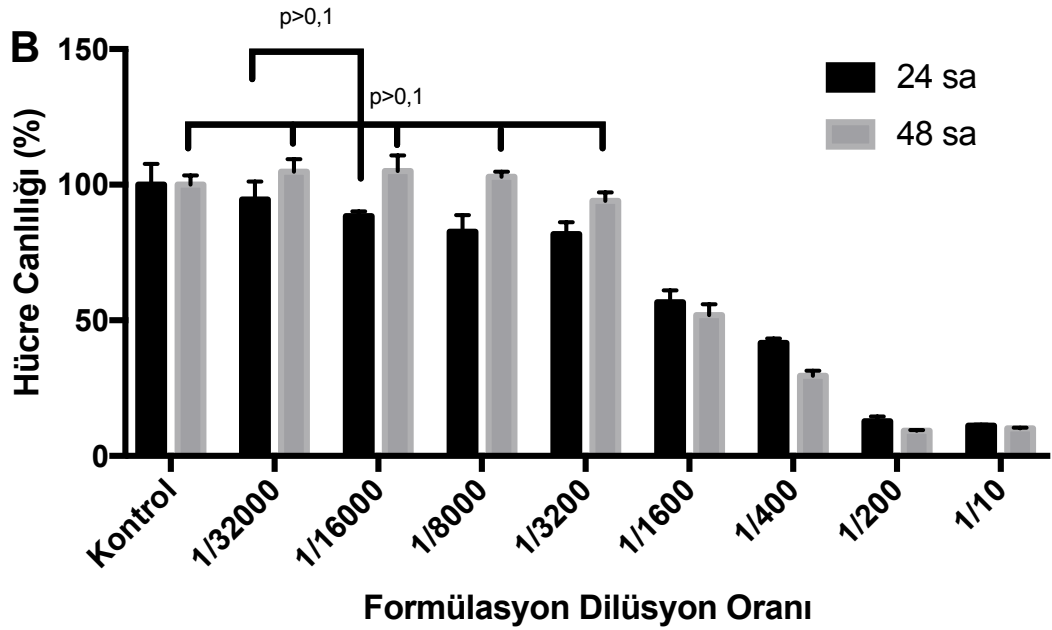
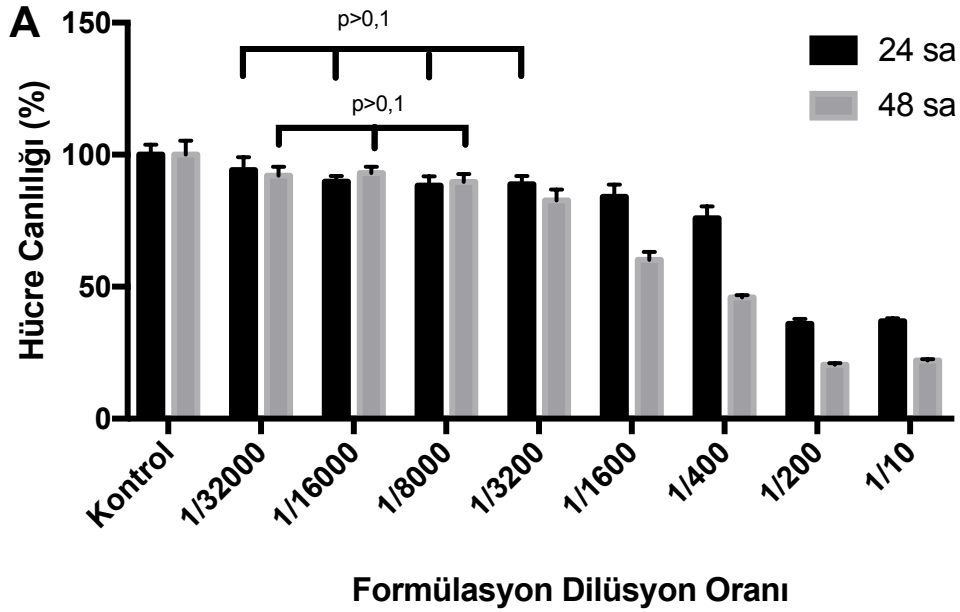
Hücreler üzerinde doksorubisin ve LyP-1'in sinerjik etkisinin incelenmesi amacıyla 24 ve 48 saat süreyle kombine tedavi uygulanan inkübasyonun ardından MDA-MB-231 hücre hatlarının % canlılık değerleri incelendiğinde; kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kullanılan tüm tedavi grupları arasında fark olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.34.A) ( $p < 0,0001$ ). Tedavi grupları arasındaki ilişkiler değerlendirildiğinde; tek başına doksorubisin çözeltisi uygulanan grupta 24 saat sonunda gözlenen % canlılık değeri ve aynı konsantrasyonda doksorubisin ile 62,5; 125 ve 250  $\mu\text{M}$  LyP-1 kombine edilmiş gruplar arasında anlamlı fark olduğu görülmektedir. Bu durumda, LyP-1 ile doksorubisin kombinasyonunun gösterdiği antikanser etkinin, doksorubisin tek başına gösterdiği antikanser etkiden daha yüksek olduğu söylenebilir. 48. saatte ise LyP-1'in sinerjik etkisi 31,25  $\mu\text{M}$  konsantrasyondan itibaren gözlenmektedir. Tedavi gruplarının kendi içerisinde gösterdikleri farklılıklar Şekil 4.34'te verilmektedir. Artan LyP-1 konsantrasyonuna karşılık hücre canlılıklarında orantılı şekilde düşüş görülmektedir.

4T1 hücre hattında 48 saat sonunda tek başına doksorubisin çözeltisi ve doksorubisin 125 ve 250  $\mu\text{M}$  konsantrasyonda LyP-1 ile kombine edildiği gruplar ve kontrol grubu arasında anlamlı fark gözlenmiştir ( $p < 0,01$ ) (Şekil 4.34.B).



**Şekil 4.34.** Doksorubisin ve LyP-1 kombine tedavisinin meme kanseri hücre canlılıkları üzerine etkisi (serumsuz ortam). **A.** MDA-MB-231 **B.** 4T1 hücre hattı. (\* $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).

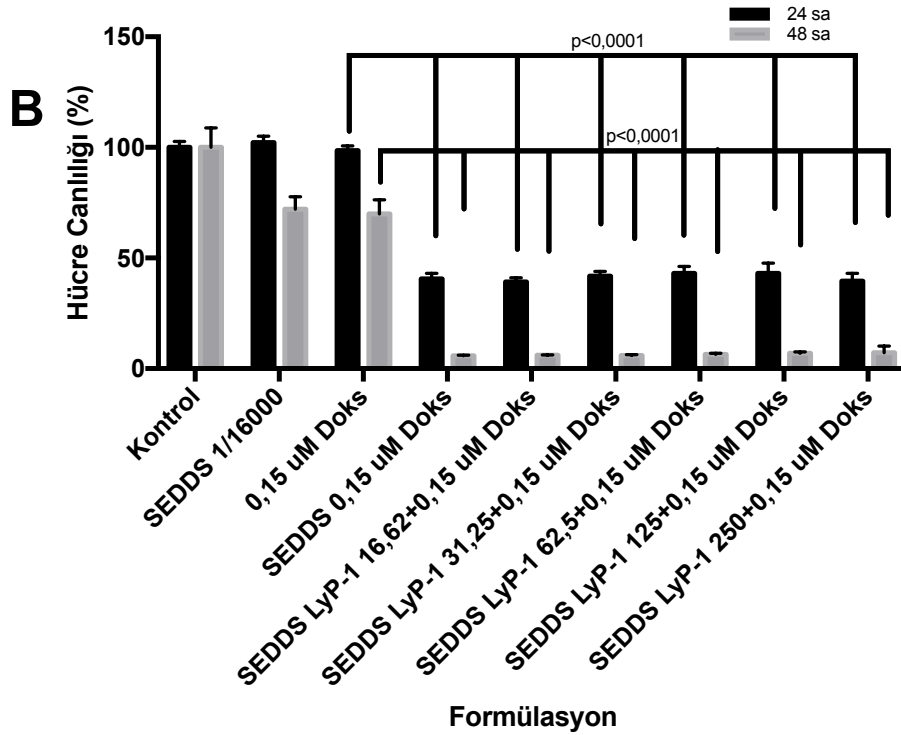
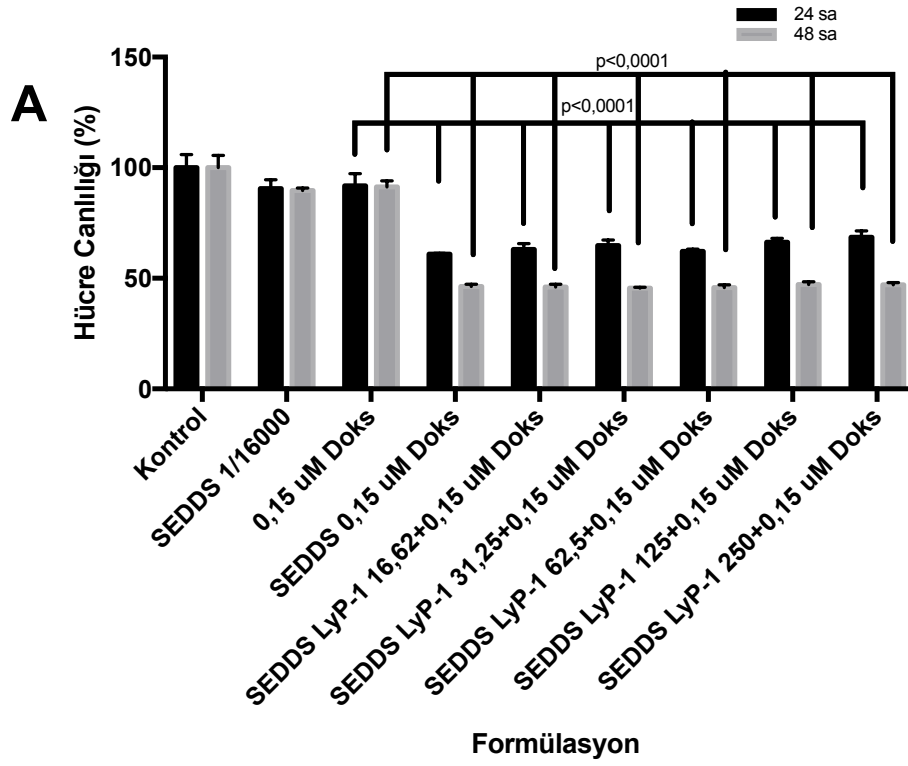
İn vivo çalışmalar için seçilen formülasyon olan U9-F21 formülasyonunun MDA-MB-231 ve 4T1 hücre hatlarında yapılan titrasyonu sonucunda 24 saatin sonunda 4T1 hücre hattında 1:32000 ile 1:16000 dilüsyon arasında fark bulunmazken, MDA-MB-231 hücre hattında 1:32000 ile 1:3200 aralığındaki dilüsyonlar arasında fark gözlenmemiştir (Şekil 4.35). 48. saat için 4T1 hücre hattında kontrol grubu ile 1:32000 ile 1:3200 dilüsyon aralığındaki formülasyonlar farklılık göstermezken ( $p>0,1$ ), MDA-MB-231 hücre hattında 1:32000 ile 1:8000 aralığındaki formülasyon dilüsyonları birbiri ile benzer bulunmuştur. Dilüsyonlar değerlendirildiğinde 24. ve 48. saatlerde her iki hücre hattında da güvenli şekilde kullanılabilir olan 1:16000 dilüsyonu tercih edilmiştir.



**Şekil 4.35.** Boş formülasyonların meme kanseri hücre hatları üzerine etkisi (serumsuz ortam). **A.** MDA-MB-231 **B.**4T1 hücre hattı.

MDA-MB-231 hücre hattında doksorubisin 0,15  $\mu$ M konsantrasyonda çözelti halinde uygulandığında hücre canlılığı 24 saat sonunda  $91,7 \pm 5,58$  değerinde iken aynı konsantrasyon formülasyon içerisinde uygulandığında bu değer  $60,93 \pm 0,35$ 'e

düşmektedir ( $p < 0,0001$ ) (Şekil 4.36.A). LyP-1 ve doksorubisinin kombine olarak formüle edildiği gruplarda MTT testi uygulandığında 24. ve 48. saatlerde LyP-1'in titre edildiği gruplar arasında fark bulunmamaktadır. 4T1 hücre hattında 24 saat sonunda kontrol grubu ile boş SEDDS ve 0,15  $\mu\text{M}$  konsantrasyonda doksorubisin uygulanan gruplar arasında fark gözlenmemiş olup ( $p > 0,5$ ), MDA-MB-231 hücre hattı ile benzer olarak 24. ve 48. saatlerde doksorubisinin 0,15  $\mu\text{M}$  konsantrasyonda çözelti halinde uygulandığı gruplar ile formülasyon içerisinde LyP-1 ile kombine edildiği tüm gruplar arasında anlamlı fark gösterilmiştir ( $p < 0,0001$ ).



**Şekil 4.36.** Formülasyon içerisinde Doksorubisin ve LyP-1 kombine tedavisinin meme kanseri hücre canlılıkları üzerine etkisi (serumsuz ortam). **A.** MDA-MB-231 **B.**4T1 hücre hattı.

### Transport Çalışmaları

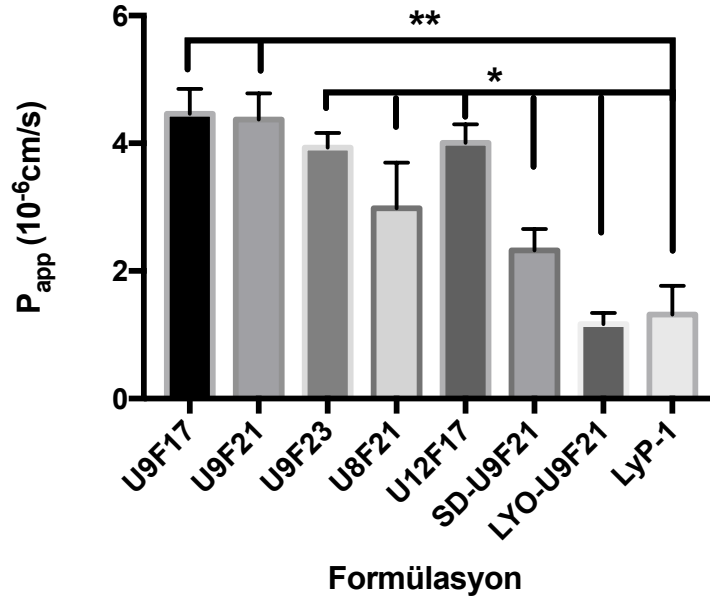
Transport çalışmaları sonunda Caco-2 hücre hattında bazolateralden 2. saatin sonunda toplanan örnekler, geliştirilen LC-MS/MS yöntemi ile analiz edilmiştir. Hesaplanan permeabilite katsayıları Tablo 4.21’de verilmiştir.

**Tablo 4.21.** LyP-1 içeren formülasyonlara ait Caco-2’den geçiş çalışmaları sonucunda elde edilen görünür permeabilite katsayıları,  $P_{app}$  (cm/s).

Formülasyon	$P_{app}$ ( $10^{-6}$ cm/s)
SD-U9F21	2,321
LYO-U9F21	1,168
U9-F17	4,463
U9-F21	4,373
U9-F23	3,931
U8-F21	2,984
U12-F17	4,006
LyP-1 çözeltisi	1,311

Caco-2 ile yapılan permeabilite çalışmalarında LYO-U9F21 formülasyonu dışında, geliştirilen tüm formülasyonların permeabilite katsayıları tek başına uygulanan peptit çözeltisinden yüksek bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). U9-F21 ( $p = 0,00005$ ) ve U9-F23 ( $p = 0,00115$ ) için bulunan fark istatistiksel olarak anlamlıdır (Şekil 4.37).

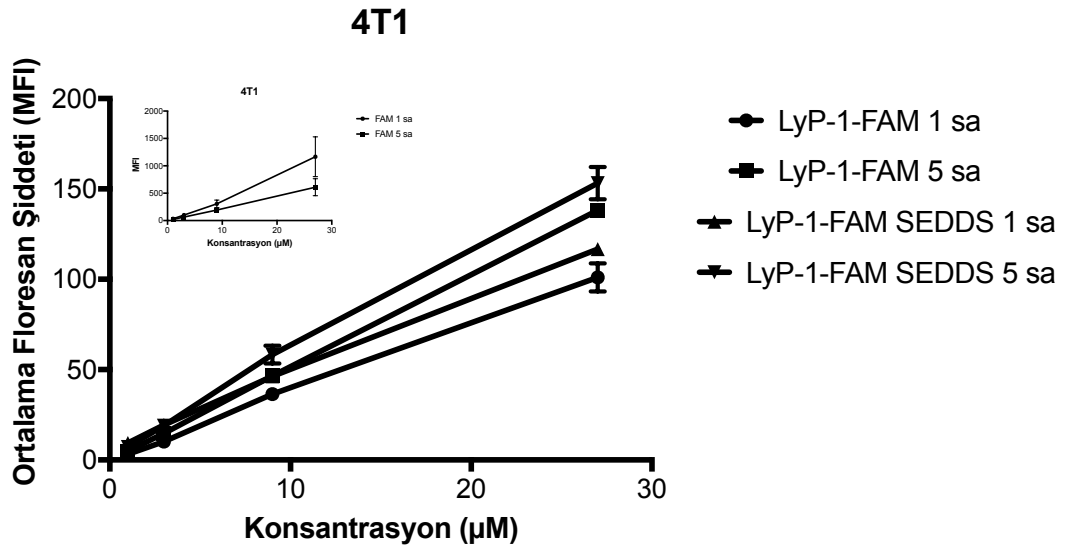




**Şekil 4.37.** LyP-1 içeren formülasyonların Caco-2'den geçiş çalışmalarına ait grafik (n=5) (\* p<0,05; \*\*p<0,01).

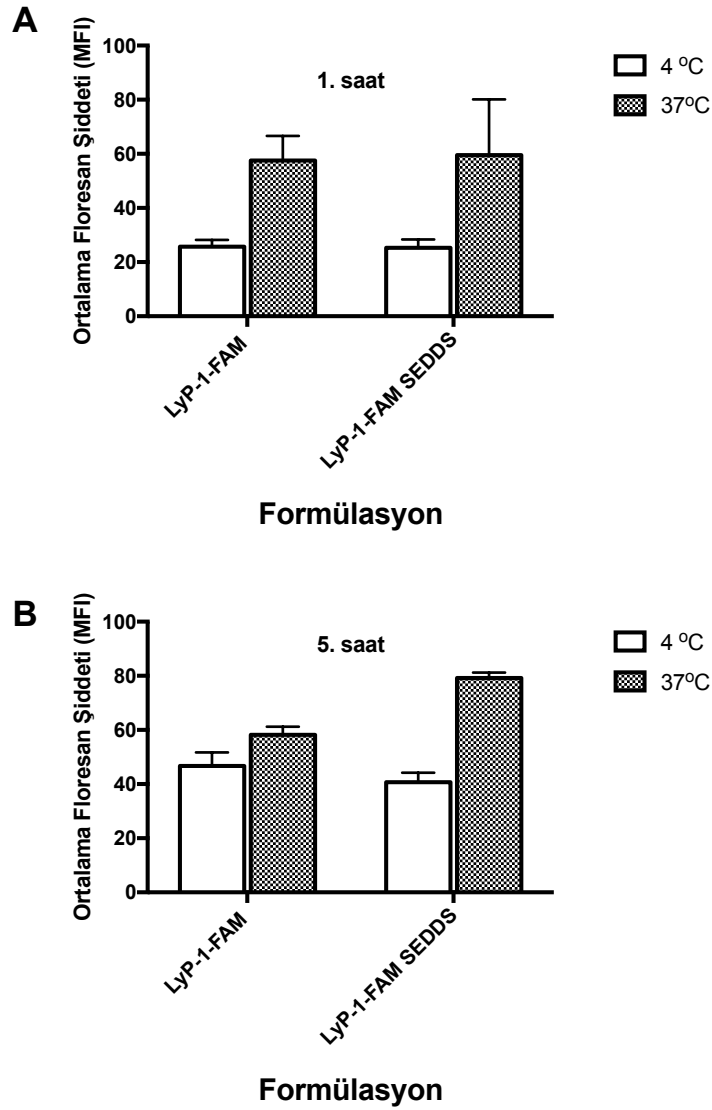
#### Hücre İçine Alım Çalışmaları

FAM ile işaretli LyP-1 peptidinin hücre kültür ortamındaki çözeltisi ve SEDDS formülasyonları ile 37 °C'de yapılan hücre içine alım çalışmaları sonucunda, peptidin konsantrasyonuna bağlı olarak hücre içerisine girişin arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.38). 1. saat sonunda 27 µM konsantrasyonda uygulanan LyP-1-FAM çözeltisi ile elde edilen ortalama floresan şiddeti 101±7,7 iken, 5. saatin sonunda bu değer 138,12±3,28 olarak ölçülmüştür (p<0,01). Bu değerler, peptidin formülasyon içerisinde uygulanması ile artmış olup, 1. saatte 116,75±0,75 ve 5. saatte 153,25±9,01 olarak tespit edilmiştir.



**Şekil 4.38.** LyP-1-FAM'ın 4T1 hücreleri tarafından alımı.

İşaretili peptidin hücrelere giriş özelliklerinin değerlendirilmesi sırasında hücreler ayrıca 4 °C'de ve 37 °C'de peptit çözeltisi ve formülasyonu ile muamele edilerek sadece yüzeye bağlanan LyP-1 ile (4 °C) yüzeye bağlanan ve hücre içerisine giren (37 °C) LyP-1 miktarı tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.39'da verilmektedir.



**Şekil 4.39.** LyP-1-FAM çözelti ve SEDDS formülasyonlarının **A.** 1. saat ve **B.** 5. saatte hücre yüzeyinde tutunan ve hücre içine giren ortalama miktarları (n=3).

4 °C'de, hücrelerin enerji gerektiren fonksiyonlarını en aza indirdikleri bilinmektedir (169). Bu sebeple tespit edilen floresan madde miktarı değerlendirilirken 4 °C'de görülen ışımaya hücre yüzeyine bağlanan peptitten kaynaklandığı, 37 °C'de ise ışımaya hem hücre yüzeyinde tutunan hem de hücre içerisine girmiş olan peptidin sebep olduğu düşünülmektedir.

LyP-1-FAM çözeltisinin 1. saat sonunda 4 °C'de  $25,6 \pm 2,5$  olan floresan şiddeti; 37 °C'de  $57,5 \pm 9,1$ 'e yükselmiş olup değişim %124,6'dır. Aynı koşullar

formülasyon içerisinde verilen peptit için değerlendirildiğinde, floresan şiddeti  $25,3 \pm 3,1$ 'den  $59,5 \pm 20,6$ 'ya çıkarak %135,17 artış göstermiştir. 5. saatin sonunda her iki formülasyon grubunda çalışılan iki sıcaklık değerinde de zamana bağlı olarak artış gözlenmiş olup, çözelti halindeki örneğin hücrelere giriş miktarı sıcaklığa bağlı olarak %24 artarken; formülasyon içerisinde uygulanan grupta %95,1'lik artış gözlenmiştir. Bu durumda, SEDDS formülasyonlarının 5. saatin sonunda hücreye giren floresan madde miktarını artırdığı söylenebilir.

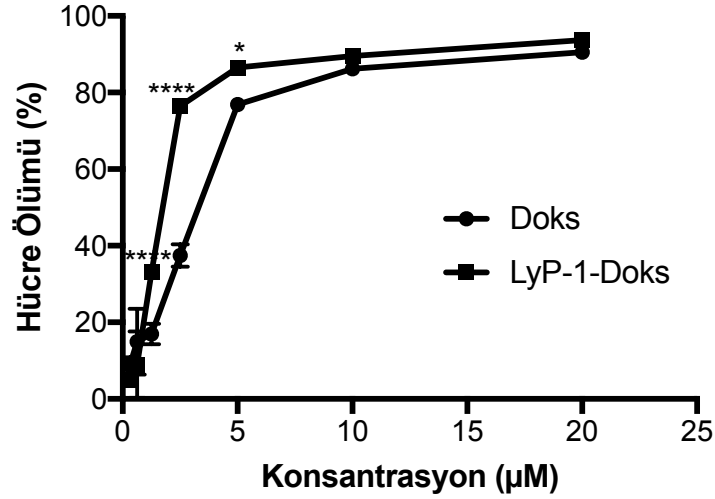
4 °C'de elde edilen floresan şiddeti değerleri 37 °C'de elde edilen değerlerden çıkarıldığında oluşan farkın, LyP-1'e özgü p32 reseptörü aracılığıyla hücreye giren peptidin miktarına bağlı olarak değiştiği düşünüldüğünden, 1. saatte LyP-1 çözeltisi için hesaplanan 42,52 ve 5. saatte 11,6 değerinde floresan şiddeti, hücre içerisine spesifik olarak giren peptit miktarını temsil etmektedir. Bu durumda, SEDDS formülasyonlarında görülen floresan şiddeti 1. saatte 34,2 iken 5. saatte 38,6'ya çıkmaktadır. Bu sonuç, peptidin SEDDS içinde uygulandığında zamana bağlı olarak hücre içerisine daha fazla miktarda alınabileceğini göstermektedir.

#### **4.9.2. Konjugatlara Ait Çalışmalar**

##### **Biyoaktivite Çalışmaları**

MDA-MB-231 hücre hattı ile yürütülen biyoaktivite çalışmaları sonucunda Doks çözeltisi uygulanan hücrelerin % hücre ölümü değerleri ile LyP-1 konjuge Doks uygulanan hücrelerin değerleri arasında anlamlı fark olduğu gösterilmiştir. Söz konusu istatistiksel fark 1,25 ile 5 µM konsantrasyon değerleri arasında güçlü derecede bulunmuştur. Hesaplanan IC<sub>50</sub> değerlerinin Doks çözeltisi için 3,087 µM ve LyP-1-Doks için 1,548 µM (GraphPad Prism 7, ABD) bulunması; peptitle konjuge

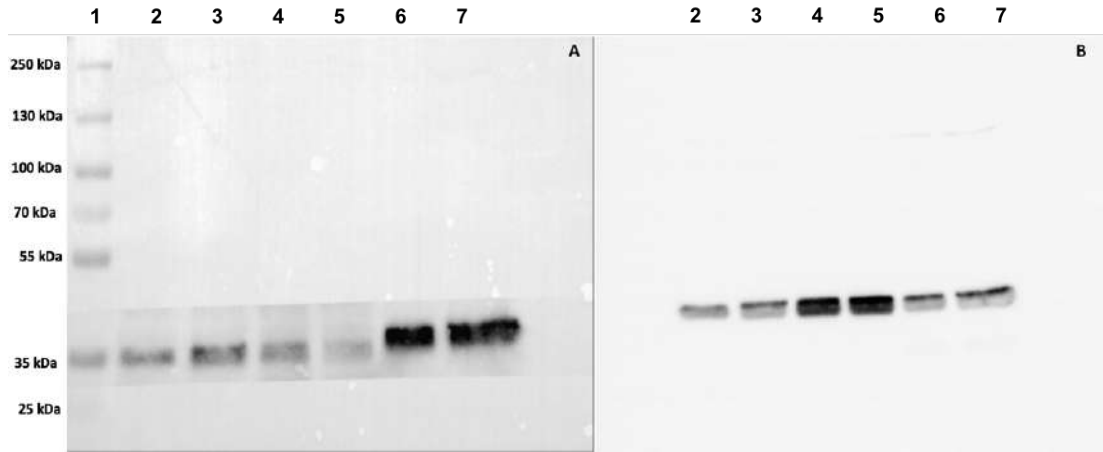
Doks'un MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki biyoaktivitesinin daha yüksek olduğunu göstermektedir (Şekil 4.40).



**Şekil 4.40.**MDA-MB-231 hücre hattında Doks çözeltisi ve LyP-1-Doks konjugatı uygulaması sonrası % hücre ölümü değerleri (\*p<0,05; \*\*\*\* p<0,0001) (n=6).

#### 4.9.3. Western Blot Analizi

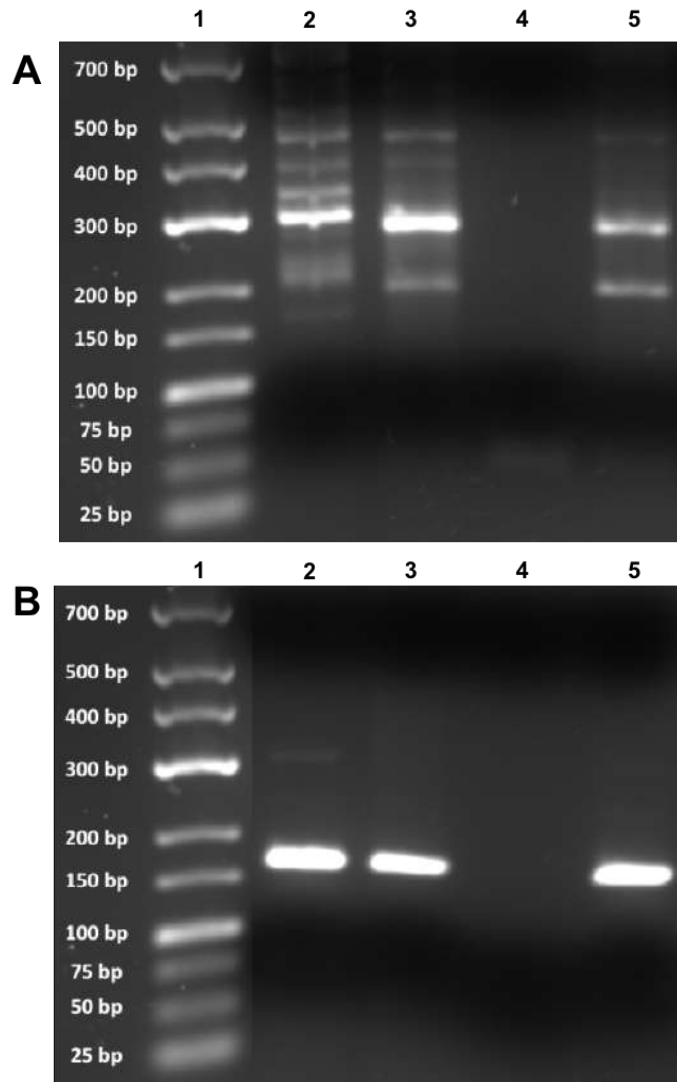
İn vitro ve in vivo çalışmalarda kullanılan hücre hatlarında LyP-1'e özgü p32 reseptörünün varlığının gösterilmesi amacıyla yapılan Western Blot analizi sonrası p32'ye ve  $\beta$ -aktin'e bağlı oluşan bantlar, sırasıyla Şekil 4.41.A ve Şekil 4.41.B'de görülmektedir.



**Şekil 4.41.** A. p32 proteini B.  $\beta$ -aktin'in 4T1 ve MDA-MB-231 hücre hattı ve 4T1 tümör dokusunda ekspresyonu, 1. kuyucuk protein molekül ağırlığı standardı 2. ve 3. kuyucuk 4T1 hücre hattı, 4. ve 5. kuyucuk 4T1 tümör dokusu, 6. ve 7. kuyucuk MDA-MB-231 hücre hattı.

#### 4.9.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

İn vivo çalışmalar kapsamında, farelerde meme kanseri tümör modeli oluşturmak üzere kullanılan 4T1 hücre hattı ve 4T1 tümör dokusundan elde edilen örneklerde, LyP-1'e özgü reseptörün ifadesinin doğrulanması amacıyla polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonun doğrulanması amacıyla pozitif kontrol olarak fare 4T1 tümör dokusu, tümörlü fareye ait dalak ve arka bacak örneği içeren cDNA karışımı şablon olarak kullanılmıştır. İç kontrol olarak  $\beta$ -aktin geni çoğaltılmıştır. Reaksiyon sonrası %2'lik agaroz jelde yürütülen örnekler ait jel görüntüleri Şekil 4.42'de verilmektedir.



**Şekil.4.42.** PCR sonrası yürütülen %2'lik agaroz jelde gözlenen **A.** p32 **B.**  $\beta$ -aktin gen ürünlerine ait bantlar. **1.** DNA standardı **2.** 4T1 hücre **3.** 4T1 tümör **4.** negatif kontrol **5.** pozitif kontrol (bp: baz çifti).

#### 4.10. İn Vivo Etkililik Çalışmaları

İn vivo etkililiğın değerlendirilmesi amacıyla 6-8 haftalık dişi BALB/c farelerde yürütülen çalışmalar kapsamında, farelere uygulanan 4 doz tedavi sonrası sakrifiye edilen hayvanlardan alınan tümör dokusuna ait görüntüler Şekil 4.43'te gösterilmektedir.

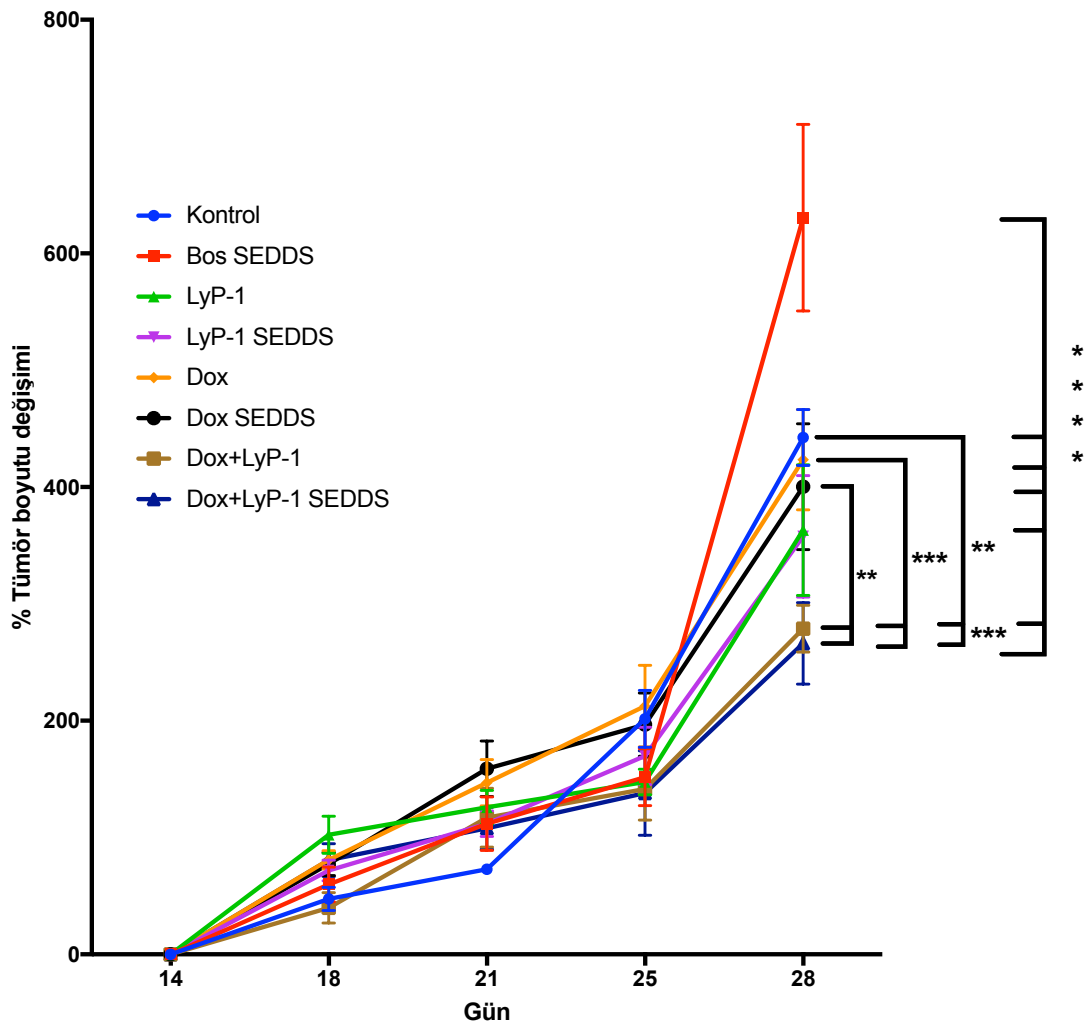


**Şekil 4.43.** Tedavi sonrası sakrifiye edilen farelerden elde edilen tümör dokuları **1.** kontrol grubu, **2.** Boş SEDDS, **3.** LyP-1 çözeltisi, **4.** LyP-1 SEDDS, **5.** Doks çözeltisi, **6.** Doks SEDDS, **7.** LyP-1+Doks kombine tedavisi, **8.** LyP-1+Doks SEDDS kombine tedavisi.

Tümör boyutlarının istenen değere ulaşması sonrasında; 14. günde başlanan tedavi süresince hayvanlarda yapılan tümör çapı ölçümleri, %tümör boyutu değişimi cinsinden hesaplanarak zamana karşı grafiklenmiştir (Şekil 4.44). Tümör çaplarında meydana gelen % değişim incelendiğinde; Doks ve LyP-1'in kombine olarak kullanıldığı tedavi grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 28. günde fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Tedavi grupları kendi aralarında



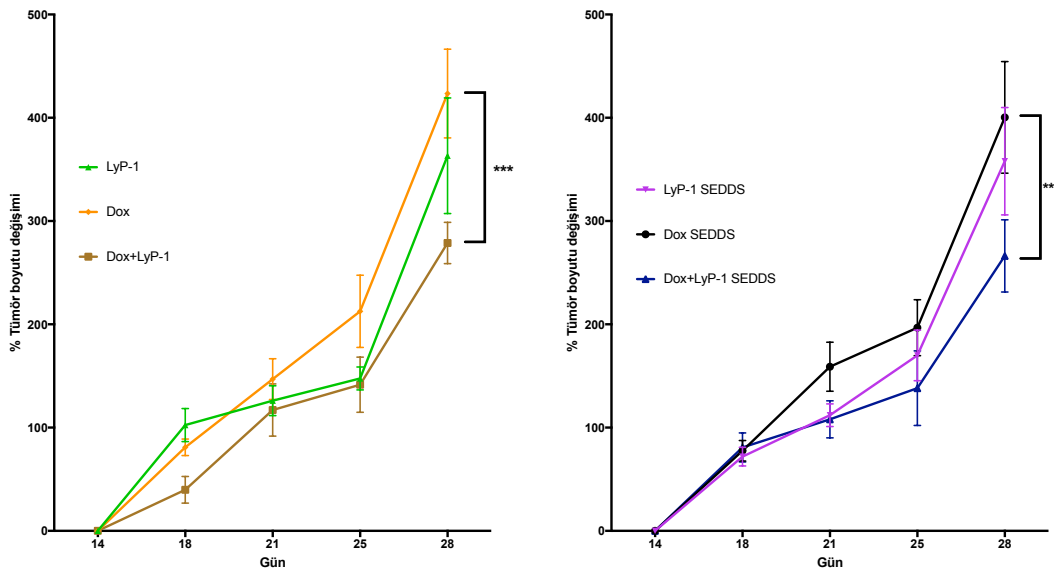
karşılaştırıldığında; Doks çözeltisi uygulanan grupta gözlenen değişim ile Doks+LyP-1 ve Doks+LyP-1 SEDDS grubunda görülen değişim arasındaki farklar istatistiksel açıdan anlamlıdır (\*\* $p < 0,001$ ). Bu durumda, Doks tedavisine LyP-1 eklenen gruplarda tümörün daha yavaş ilerlediği gösterilmiştir. Aynı şekilde, Doks SEDDS formülasyonu ile Doks+LyP-1 çözeltisi ve Doks+LyP-1 SEDDS alan hayvanlarda tümör büyümesi yavaşlamıştır (\*\* $p < 0,01$ ).



**Şekil 4.44.** Zamana bağlı olarak farklı tedavi gruplarında tümör çaplarında görülen % değişim (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).

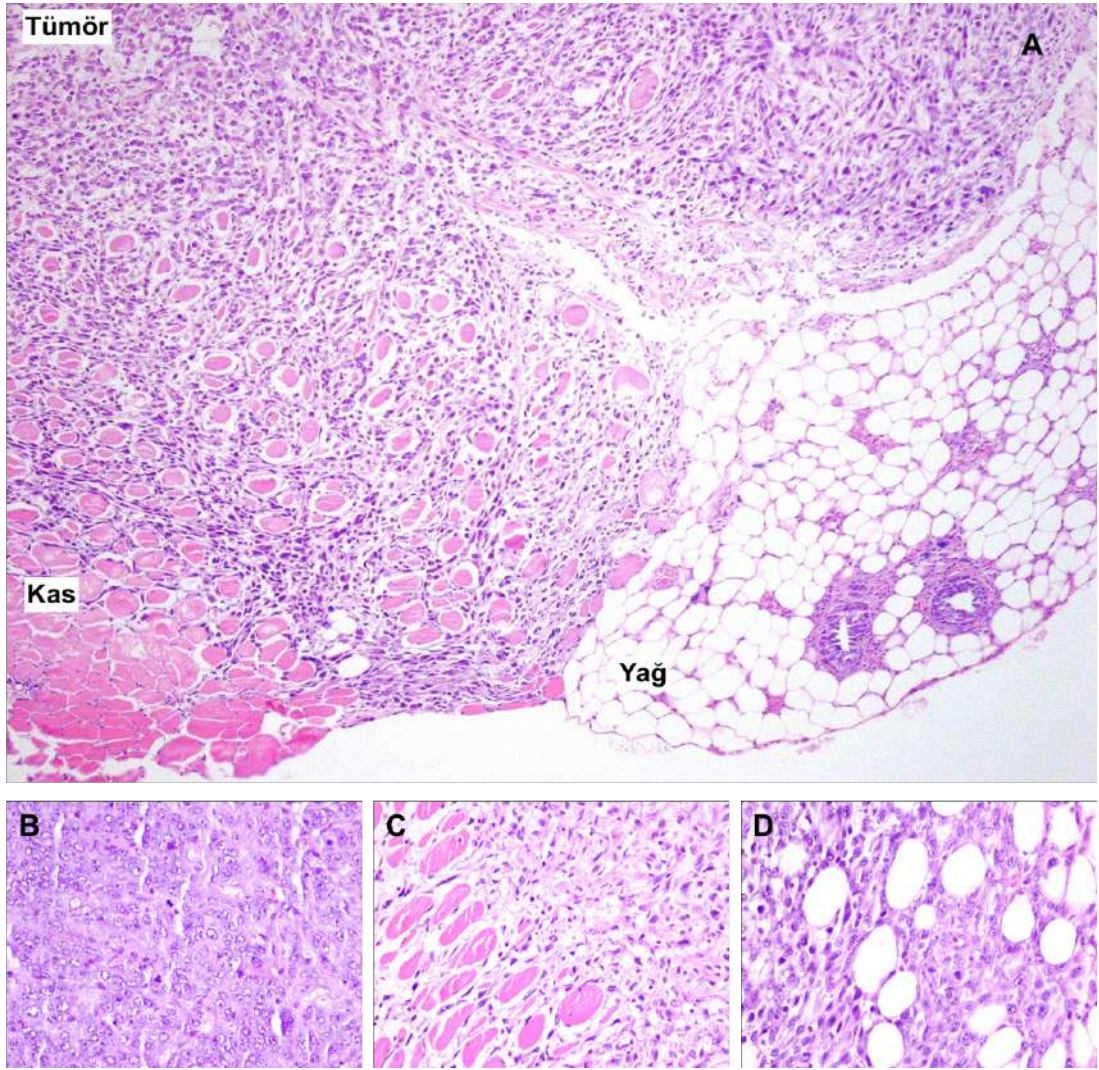
Tedavi grupları; çözelti ve formülasyon içerisinde etkin maddelerin uygulaması olarak gruplanarak değerlendirildiğinde, hayvanlarda gözlenen tümör

boyutu değişimleri Şekil 4.45'te gösterilmiştir. Çözelti grubunda uygulanan tedavi seçenekleri değerlendirildiğinde; Doks uygulamasına eklenen antikanser etkili ve lenfatik hedeflendirmeyi artıran LyP-1 peptidinin tümör büyümesini yavaşlattığı görülmektedir (\*\*p<0,001). Aynı doğrultuda, formülasyon içerisine LyP-1'in eklenmesiyle, tümör büyümesinin yavaşlaması sağlanmıştır (\*\*p<0,01).



**Şekil 4. 45.** Çözelti ve formülasyon içerisinde verilen tedavilere ait tümör çaplarında görülen % değişim (\*\*p<0,01; \*\*\* p<0,001).

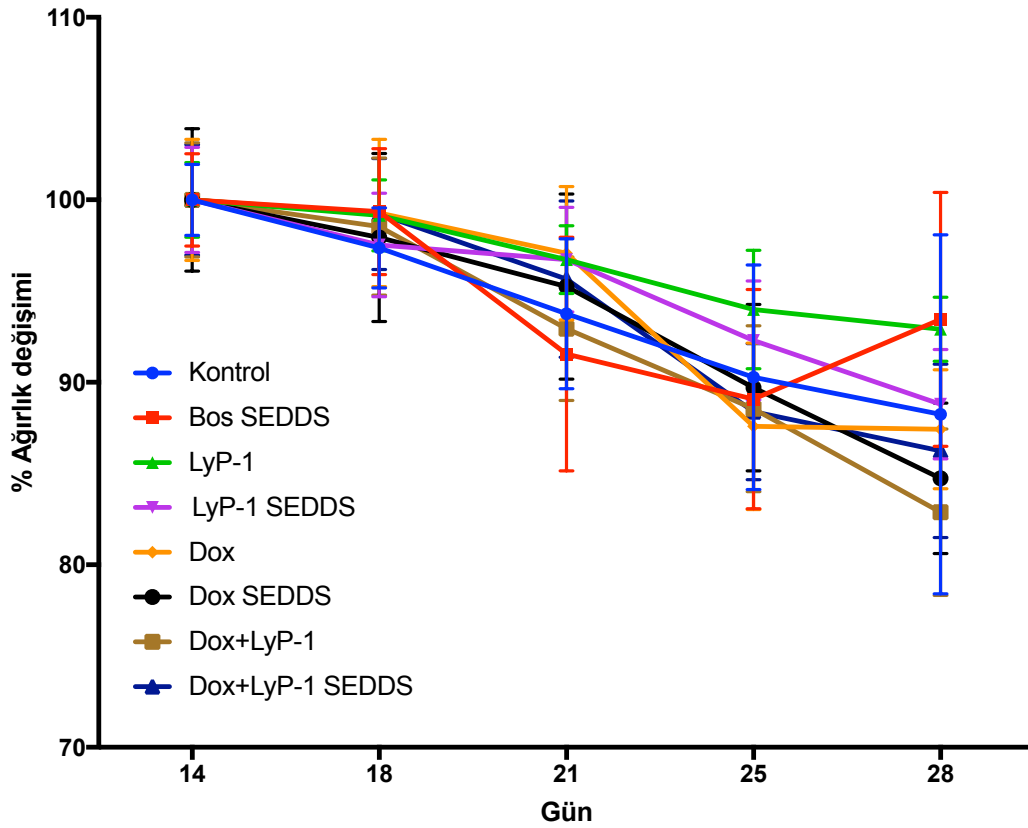
Sakrifiye edilen hayvanlardan alınan tümör dokusu örnekleri üzerinde yapılan histopatolojik inceleme sonucunda tümör oluşumu doğrulanmış olup, tümör dokusunda yer alan tümör hücrelerine ait görüntü Şekil 4.46.B'de verilmektedir. Şekil 4.46.A' da verilen meme tümör dokusu görüntülerinde kas (4.46.C) ve yağ dokusuna (Şekil 4.46.D) invaze olan tümör hücreleri görülmektedir.



**Şekil 4.46. A.** Meme tümör dokusu (100 X) **B.** meme tümör dokusu (400 X) **C.** kas dokusu (400 X) **D.** yağ dokusu histopatolojik görüntüsü (400 X).

Hayvanların tümör enjeksiyonu sonrası sağ kalım verileri değerlendirildiğinde; doksorubisin tedavisi alan gruplarda deney sonlandırılana kadar sağ kalım değerleri %100 olarak devam etmiş olup, 28. günde SF uygulaması yapılan kontrol grubunda değer %66'ya inmiştir. Tek başına boş formülasyonun uygulandığı grup %57,14 ile en düşük değere sahipken, LyP-1'in çözelti halinde uygulandığı grup %85,7; SEDDS içerisinde uygulandığı grup %87,5 sağ kalım göstermiştir. Geriye kalan gruplarda tedavi sonlandırılana kadar kayıp yaşanmamıştır.

Tedavi süresince hayvanların ağırlıklarının takip edilmesi sonucu elde edilen grafik Şekil 4.47'de sunulmaktadır. Hayvan ağırlıklarındaki değişim değerlendirildiğinde, elde edilen değerler arasında anlamlı fark bulunmamış olup, ağırlık değişimleri %87,5 ile %93,9 aralığındadır.

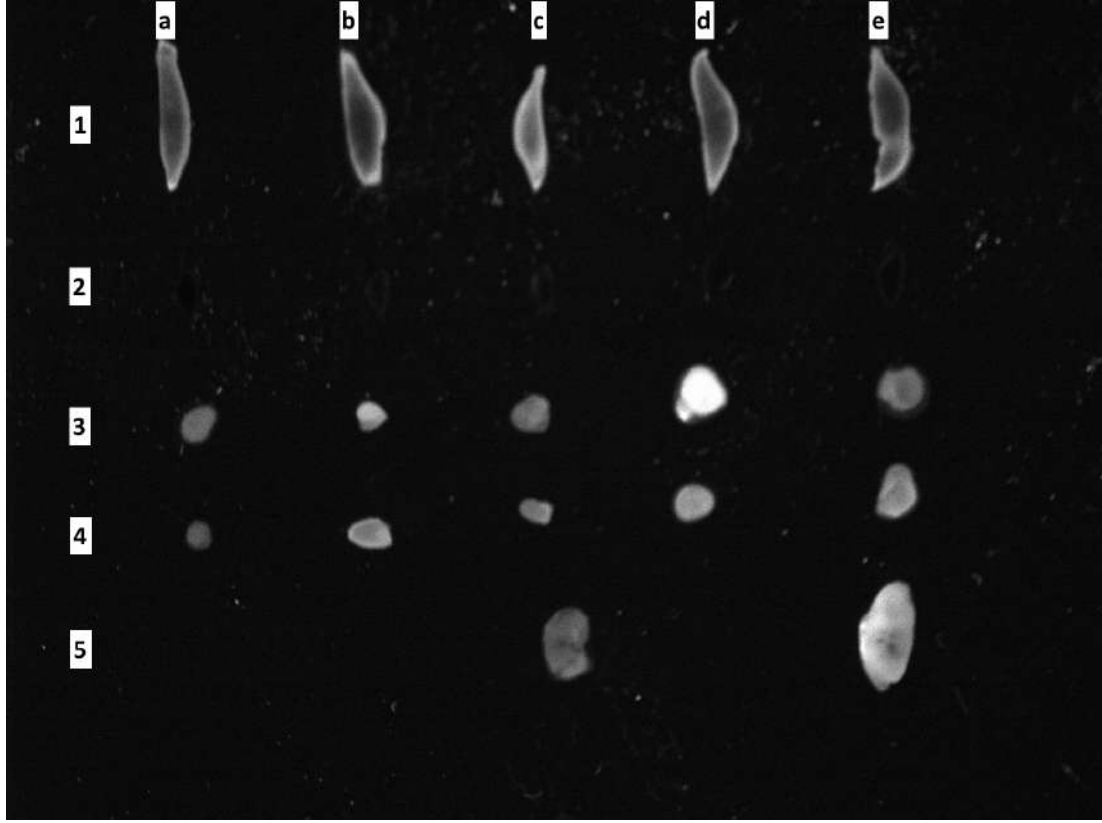


Şekil 4.47. Tedavi süresince hayvan ağırlıklarında meydana gelen % değişim.

#### 4.11. İn Vivo Biyodağılım Çalışması

Biyodağılım çalışması kapsamında; sakrifiye edilen hayvanlardan alınan doku örnekleri UV görüntüleme cihazı kullanılarak incelenmiştir (Şekil 4.48). Karaciğer, dalak, meme lenf nodu, mezenterik lenf nodu ve tümör dokularının incelenmesi sonucunda dalakta floresan şiddeti gözlenmezken, sağlıklı hayvanlara uygulanan LyP-1-FAM çözeltisi ve LyP-1-FAM SEDDS formülasyonunun, söz konusu dokularda

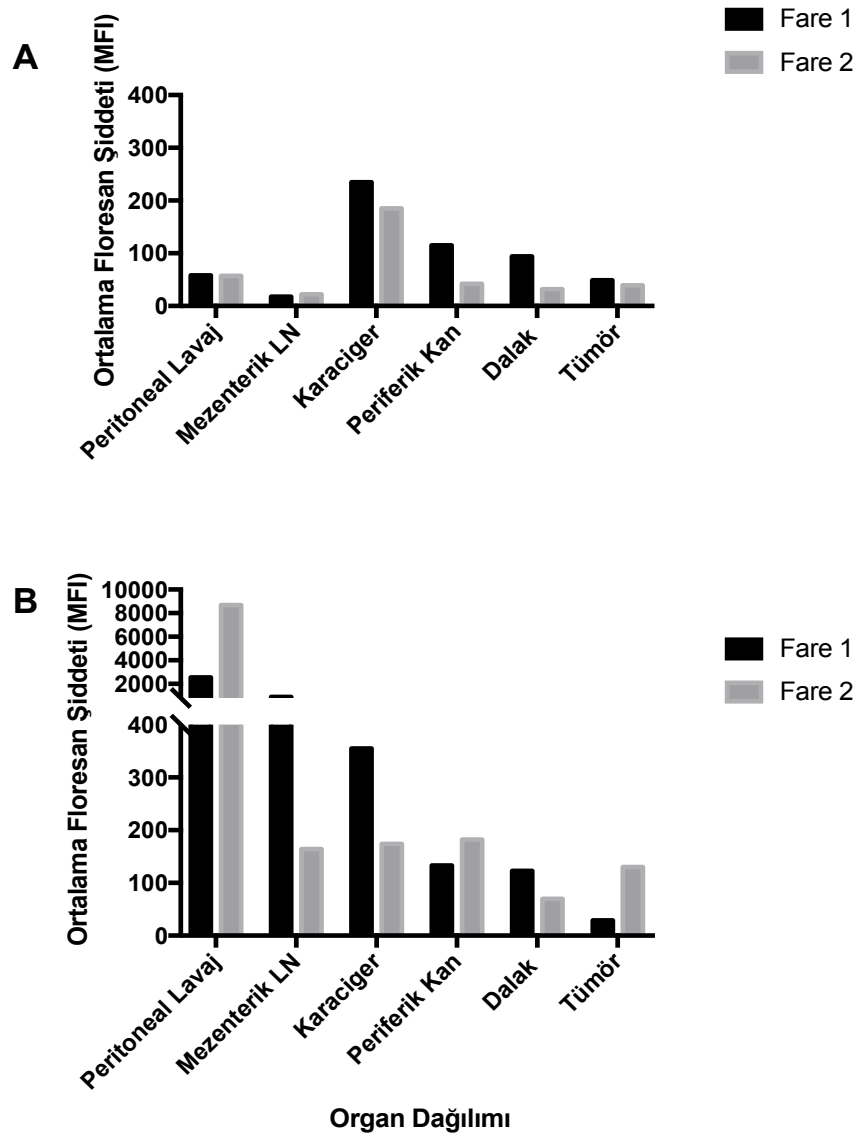
birikimi artırdığı görülmektedir. Tümör dokuları incelendiğinde, LyP-1'in SEDDS içerisinde uygulandığı durumda tümörde birikimin arttığı gösterilmiştir.



**Şekil 4.48.** Biyodağılım çalışması sonrası sakrifiye edilen hayvanlara ait dokuların UV görüntüleri. **1.** karaciğer, **2.** dalak, **3.** meme lenf nodu, **4.** mezenterik lenf nodu, **5.** tümör, **a.** kontrol grubu, **b.** sağlıklı fare, LyP-1-FAM çözeltisi uygulaması, **c.** tümörlü fare, LyP-1-FAM çözeltisi uygulaması, **d.** sağlıklı fare, LyP-1-FAM SEDDS uygulaması, **e.** tümörlü fare, LyP-1-FAM SEDDS uygulaması.

Çözelti halinde uygulanan LyP-1'in genel dağılımı incelendiğinde; peptidin sırasıyla en çok karaciğerde, periferik kanda, dalakta, periton sıvısında, tümör ve mezenterik lenf nodunda toplandığı görülmektedir. Tümör dokusunda tespit edilen floresan şiddeti 1. ve 2. hayvanda sırasıyla 39 ve 49'dur. Peptidin SEDDS içerisinde uygulandığı grupta ise en yüksek peptit miktarı periton sıvısında olup sırasıyla

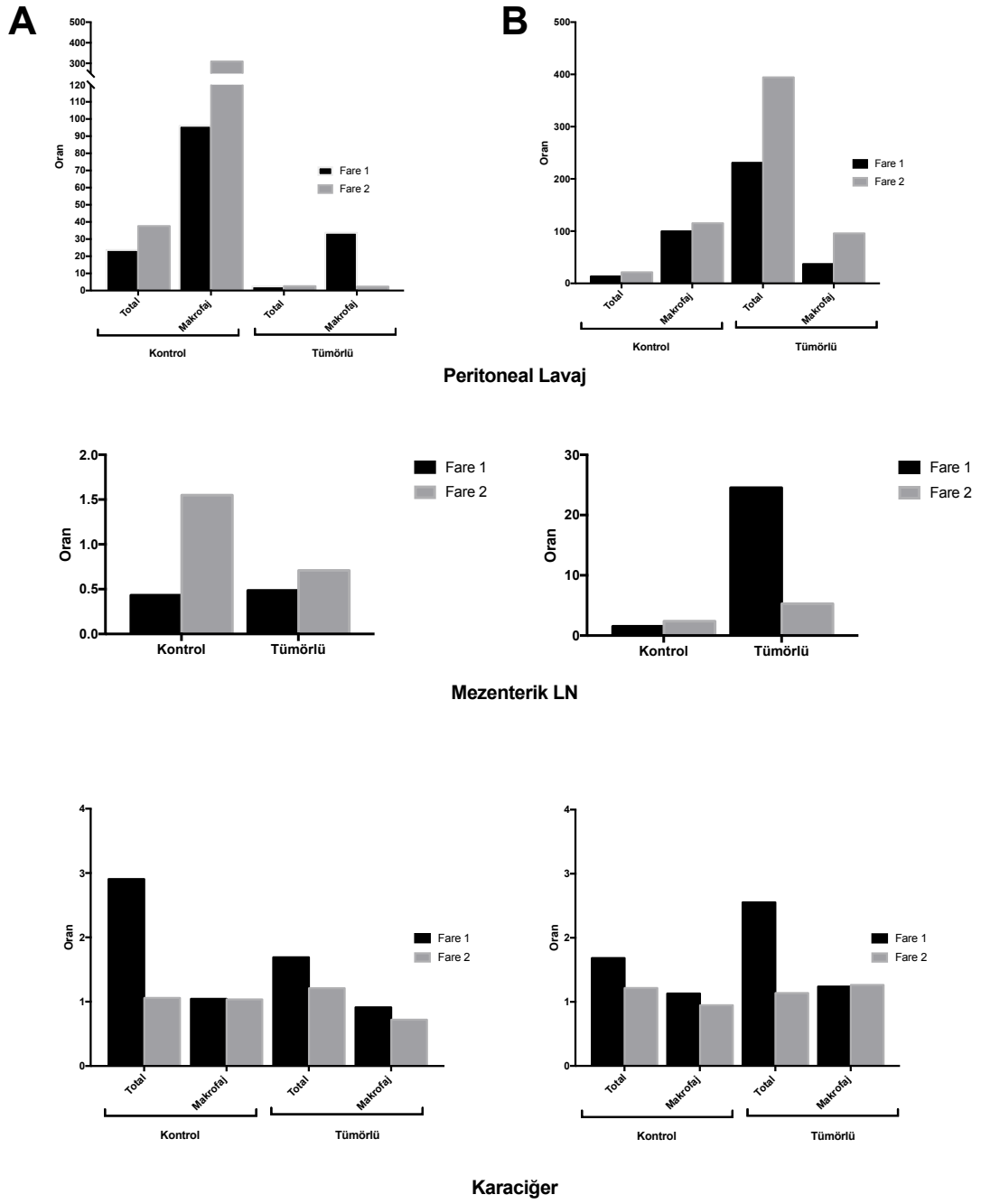
mezenterik lenf nodu, karaciğer, periferik kan, dalak ve tümörde dağılmıştır. Tümör dokusunda dağılan peptide ait ortalama floresan şiddeti değerleri 1. ve 2. hayvanda sırasıyla 29 ve 130 olup SEDDS formülasyonları ile uygulamada çözelti halinde uygulanan peptide göre daha yüksektir (Şekil 4. 49 ve Şekil 4.51).



**Şekil 4.49.** A. LyP-1-FAM çözeltisi ve B. LyP-1-FAM SEDDS şeklinde uygulanan floresan işaretli peptidin tümürlü farede biyodağılımı.

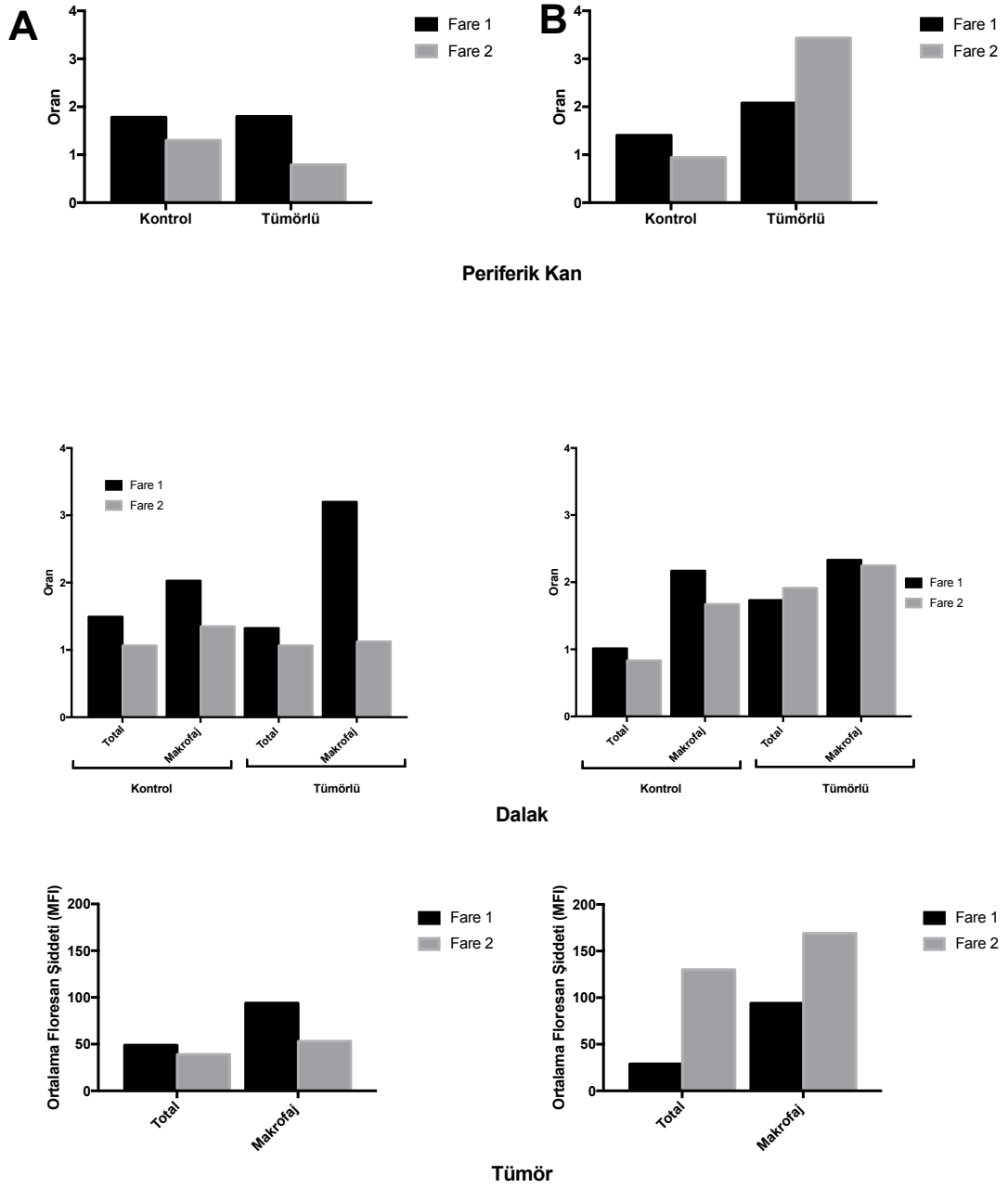
Doku homojenizatlarından elde edilen total immün hücre ve makrofajların dokulara göre dağılımı, uygulama yapılan iki fare grubu için (örnek/kontrol floresan şiddeti) incelenerek Şekil 4.50'de sunulmuştur.

Dokularda görülen dağılımda; periton bölgesinden toplanan hücre örneklerindeki CD206 pozitif hücre grubu incelendiğinde, peptidin çözelti halinde uygulandığı grupta makrofajlarda tutulum daha fazla iken, SEDDS formülasyonları periton sıvısında yer alan hücrelere yüksek miktarda dağılmış olup, makrofaj hücrelerine düşük miktarda girmiştir (Şekil 4.52). Mezenterik lenf nodlarına bakıldığında; tutulumun en yüksek olduğu grup, tümörlü farelerde SEDDS ile uygulama yapılan gruptur (Şekil 4.53). Karaciğerde tutulum hücre bazında değerlendirildiğinde; tüm gruplarda peptidin total hücre popülasyonunda makrofajlardan daha yüksek miktarda bulunduğu görülmektedir. Periferik kan örnekleri değerlendirildiğinde; dolaşımdaki hücrelerde bulunan en yüksek floresan şiddeti, tümörlü farelere uygulanan SEDDS formülasyonu sonrasında elde edilmiştir (Şekil 4.54). Dalakta yapılan değerlendirme sonucunda; total immün hücre ve makrofajlar arasındaki dağılım yakın olmakla beraber, makrofajlardan kaçış potansiyeli, tümörlü fareye yapılan SEDDS uygulaması sonucu gözlenmiştir.

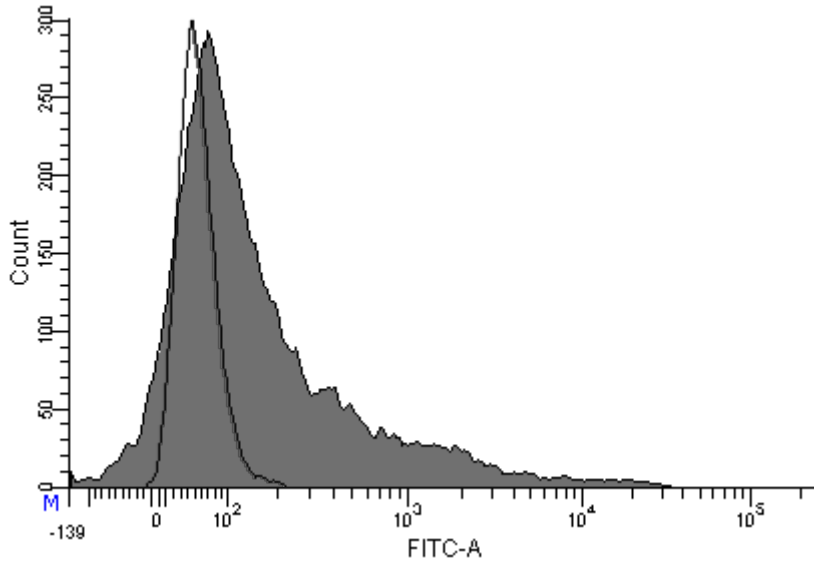


**Şekil 4.50. A.** LyP-1-FAM çözeltisi ve **B.** LyP-1-FAM SEDDS'in organlarda dağılımı.

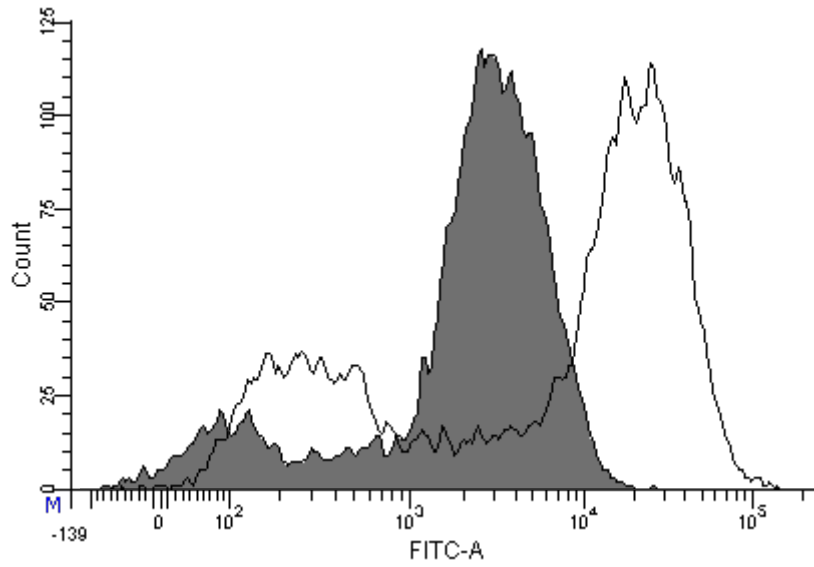




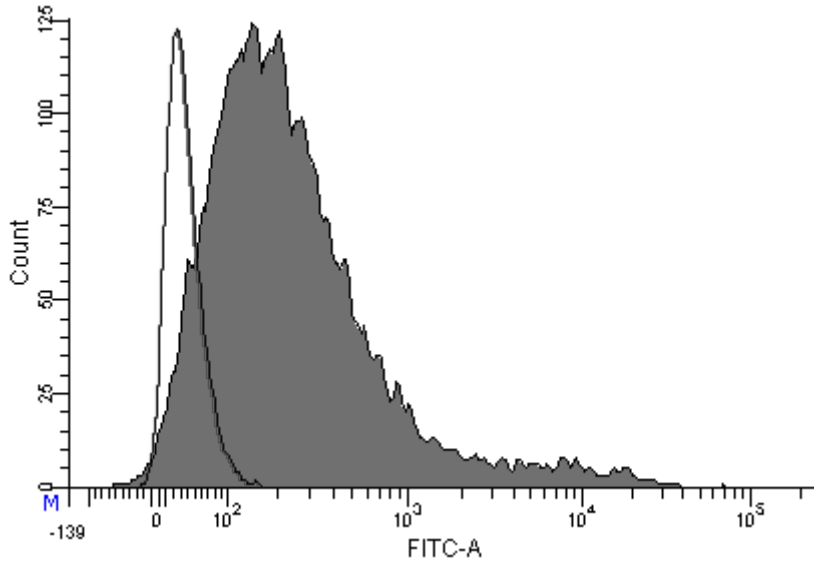
**Şekil 4.50 (devam).** A. LyP-1-FAM çözeltisi ve B. LyP-1-FAM SEDDS'in organlarda dağılımı.



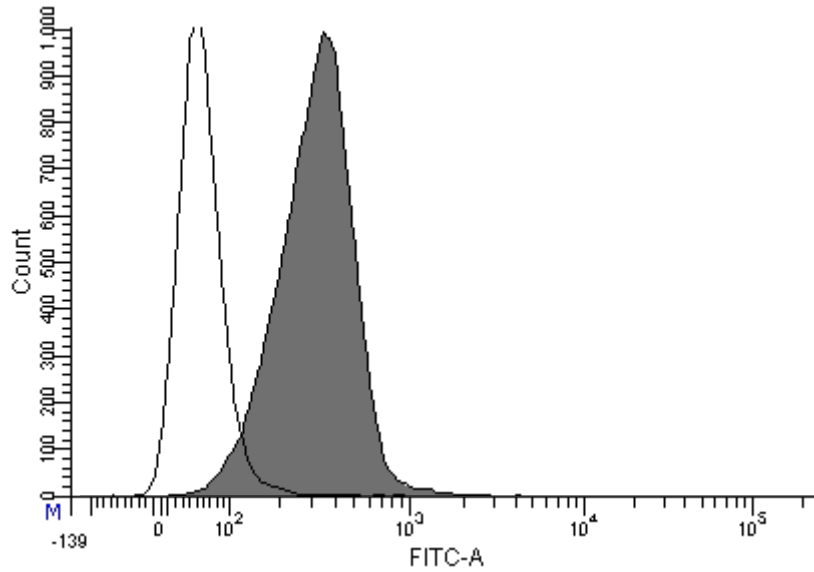
**Şekil 4.51.** Tümör dokusunda LyP-1-FAM çözeltisi (boş) ve LyP-1-FAM SEDDS formülasyonu(dolu) uygulaması sonucu elde edilen akış sitometrisi histogram grafiği.



**Şekil 4.52.** Peritoneal lavaj örneğinde LyP-1-FAM SEDDS formülasyonu uygulaması sonucu total immün hücre (boş) ve makrofajlara (dolu) girişi gösteren akış sitometrisi histogram grafiği.



**Şekil 4.53.** Mezenterik lenf nodunda LyP-1-FAM çözeltisi (boş) ve LyP-1-FAM SEDDS formülasyonu (dolu) uygulaması sonucu elde edilen akış sitometrisi histogram grafiği.



**Şekil 4.54.** Periferik kanda LyP-1-FAM çözeltisi (boş) ve LyP-1-FAM SEDDS formülasyonu (dolu) uygulaması sonucu elde edilen akış sitometrisi histogram grafiği.

## 5. TARTIŞMA

### 5.1. Önformülasyon Çalışmaları

Önformülasyon çalışmaları, tez çalışması kapsamında geliştirilen kendiliğinden emülsifiye olabilen sistemlerin elde edilmesi amacıyla ilk basamak olarak gerçekleştirilmiştir. Kendiliğinden emülsifiye olabilen sistemlerin geliştirilmesi aşamasında en kritik basamaklardan biri yardımcı maddelerin seçilmesidir. Yüzey etkin madde, yağ ve yardımcı çözücü kombinasyonlarının etkili şekilde kendiliğinden emülsifikasyon gösterebilmesi için, kullanılan yardımcı maddelerin bu amaç için özel olarak seçilmesi ve uygun bileşimde bir araya getirilebilmesi gerekmektedir. Seçilen yardımcı maddeler kendiliğinden emülsifikasyon için uygun özellikte olsalar dahi doğru oranda formüle edilmediklerinde damlacık oluşumu gözlenmeyebilir. Kendiliğinden emülsifikasyon; seçilen yağ/yüzey etkin madde çiftinin özelliğine, yüzey etkin madde konsantrasyonuna, yağ/yüzey etkin madde oranına bağlı olarak gerçekleşmektedir (107).

Tez çalışması kapsamında kullanılmak üzere seçilen tüm yardımcı maddeler, parenteral ve oral kullanım için uygun gruplar içerisinde seçilmiştir. Yardımcı maddelere karar verilirken kullanım yolunun yanı sıra lenfatik alımı artıracak özellikte olan mono-, di-, trigliserid karışımı yağlar (Peceol, Maisine) ve küçük damlacık boyutlarının eldesine imkan sağlayan yardımcı maddelere öncelik verilmiştir.

#### 5.1.1. Makroskobik Özellikler

Farmasötik açıdan uygun SEDDS formülasyonlarının değerlendirilmesi için ilk inceleme makroskobik olarak gerçekleştirilerek ön eleme yapılmıştır. Çalışılan

53 adet formülasyon içerisinde fiziksel stabilite şartını sağlayan 12 adet kombinasyon ileriki çalışmalar için seçilmiş, seçilen formülasyonlar arasından umut vadeden 4 kombinasyon, formülasyon çalışmalarına aktarılmıştır.

### **5.1.2. Mikroskopik Özellikler**

Yüzey etkin madde oranları yüksek olan formülasyonlar, sıvı kristal oluşumuna yatkınlık göstermektedir. Makroskopik inceleme sonucu uygun bulunan formülasyonlar, ikinci aşamada sıvı kristal oluşumu açısından değerlendirilmiş ve seçilen formülasyonlarda söz konusu yapıların olmadığı doğrulanmıştır.

### **5.1.3. Damlacık Büyüklüğü ve Zeta Potansiyel Tayini**

12 farklı formülasyon kombinasyonunu temsil eden üçgen faz diyagramları, söz konusu yardımcı maddelerin SEDDS oluşturması için seçilmesi gereken en uygun % oranlarını belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Ön formülasyon çalışmaları kapsamında yürütülen damlacık büyüklüğü ve zeta potansiyel ölçümleri; en düşük miktarda yüzey etkin maddeyi içeren, fiziksel açıdan stabil emülsiyonlar elde edilmesine olanak sağlayan karışımların seçilmesi amacıyla yürütülmüştür. Bölüm 4.1.3'te verilen tabloda görüldüğü gibi, elde edilen damlacıkların boyutları  $12,92 \pm 0,07$  ile  $294,07 \pm 1,77$  nm aralığında değişmektedir. Beklenildiği gibi, artan yüzey etkin madde miktarları, damlacık boyutlarında düşüşe neden olmaktadır. SEDDS formülasyonlarının bileşiminde yer alan iyonik olmayan yüzey etkin maddeler sebebiyle nötre yakın zeta potansiyel değerleri göstermiştir.

## 5.2. Formülasyon Çalışmaları

Önformülasyon çalışmaları kapsamında seçilen 12 farklı kombinasyon ile yapılan makroskobik ve mikroskobik incelemeler ile damlacık büyüklüğü ve zeta potansiyel ölçümleri sonucunda, 4 kombinasyonun üçgen faz diyagramlarının daha ayrıntılı şekilde çalışılmasına karar verilmiştir. En fazla stabil SEDDS formülasyonun eldesine olanak sağlayan 4 kombinasyona ait faz diyagramlarındaki formülasyon noktaları incelendiğinde; Bölüm 4.1.3'te verilen tabloda, damlacık büyüklüğü değerlerini 12,92±0,07 ile 294,07±1,77 nm aralığında değiştiği görülmektedir. Literatürle uyumlu olarak, artan yüzey etkin madde miktarları, damlacık boyutlarında düşüğe neden olmaktadır. 14 gün boyunca yapılan değerlendirmede; damlacık büyüklüğü ve zeta potansiyel değerleri değişmeyen formülasyonlar arasından; en düşük yüzey etkin madde miktarı ile düşük damlacık büyüklüğü değerlerini sağlayan örnekler, katı SEDDS hazırlanması ve hücre kültürü çalışmaları için seçilmiştir. Model olarak seçilen formülasyonun damlacık büyüklüğü boş halde 15,36±0,08 nm olup, peptidin eklenmesiyle 25,01±1,93 nm boyutuna ulaşmaktadır. Söz konusu damlacık büyüklüğü, lenfatik alım için uygun olan 10 – 100 nm aralığındadır(170-172).

### 5.2.1. Üçgen Faz Diyagramları

Üçgen faz diyagramları, farklı formülasyon bileşenlerinin kullanım oranlarının optimize edilmesi amacıyla; kendinden emülsifiye olabilme özelliğine sahip, optik açıdan izotropik ve termodinamik açıdan stabil formülasyonların elde edilebilmesi için kullanılan bir yöntemdir. Tez çalışması kapsamında seçilen kombinasyonların üçgen faz diyagramları oluşturulduğunda; SMEDDS formülasyonu veren noktaların

benzer bölgelere denk gelmesi, kendiliğinden emülsifiye olabilen sistemlerde damlacık boyutunun yüzey etkin madde oranı ile doğrudan bağlantılı olduğunu göstermektedir (173). Stabil SMEDDS formülasyonlarının elde edildiği noktalar %55 yüzey etkin madde miktarından başlayarak %80 oranlarına kadar çıkmaktadır. En geniş SMEDDS formülasyon bölgesi 9 numaralı faz diyagramı ile elde edilmiş olduğundan çalışmalar söz konusu faz diyagramı üzerinde yoğunlaşmıştır.

### 5.3. Formülasyonların Karakterizasyonu

Formülasyon çalışmaları kapsamında, SMEDDS formülasyonu oluşturmayan 11 numaralı faz diyagramı hariç, her faz diyagramını temsil edecek şekilde noktalar seçilerek, hücre kültüründe yapılacak olan sitoksisite çalışmaları için alternatif formülasyon sayısının artırılması amaçlanmıştır. Seçilen formülasyon noktalarının damlacık boyutları  $14,95 \pm 0,03$  ile  $26,24 \pm 0,29$  nm arasında değişmektedir. Bu damlacık boyutları ile lenfatik alımın artırılmasını sağlamak için ön koşul ( $DB < 100$  nm) yerine getirilmektedir. Formülasyonların zeta potansiyelleri incelendiğinde; zeta potansiyel değerinin boş formülasyonlar için  $-0,98 \pm 0,12$  ile  $0,78 \pm 2,5$  mV; peptit içeren formülasyonlar için  $-1,34 \pm 0,14$  ile  $0,90 \pm 1,97$  mV aralığında değiştiği görülmektedir. SEDDS formülasyonlarının bileşiminde yer alan yüzey etkin maddeler, iyonik olmayan yüzey etkin maddeler grubundan seçildiğinden ve formülasyonun büyük bir kısmını oluşturduğundan, nötre yakın zeta potansiyel değerleri beklenen bir sonuçtur. LyP-1 peptidi 9 aminoasitten oluşan bir peptit olup, yapısındaki amino asitlerden (CGNKRTRGC) sadece lizin ve arjininin pozitif yüklü olması nedeniyle net yükünün nötre yakın pozitif olacağı öngörülmektedir. Bu durumda, formülasyonlara peptit eklenmesinin zeta potansiyel değeri üzerinde anlamlı bir etkisi olmamıştır.

### 5.3.1. Katı Formülasyonların Karakterizasyonu

Katı dozaj formları, hastalar tarafından en çok tercih edilen dozaj şekli olup, hasta uyuncunun artırılması başta olmak üzere, azalan su içeriğine bağlı olarak stabilitenin artması, üretim, taşıma ve dozlama kolaylığı olarak özetlenebilecek üstünlüklere sahiptir. Tez çalışması kapsamında, sıvı formülasyonlar optimize edilerek katı SEDDS formülasyonlarına geçiş için prototip hazırlanmıştır.

Katı formülasyon denemeleri için ilk basamak olarak seçilen sıvı formülasyonlar; püskürterek kurutma ve liyofilizasyon olmak üzere iki farklı yöntem ve mannitol, Aerosil 200, Neusilin U2 ve laktoz olmak üzere dört farklı adsorban aracılığıyla formüle edilmiştir. Laktoz ve mannitol liyofilizasyonda sıklıkla tercih edilen yardımcı maddelerdir. Bu yardımcı maddelere ek olarak, Aerosil ve Neusilin U2 liyofilizasyonda da kullanılarak, püskürterek kurutma tekniği ile karşılaştırma sağlanmıştır.

İki farklı katılaştırma tekniği için model formülasyonlar seçilirken; damlacık büyüklüğü ve PDİ değerleri incelenmiş olup, püskürterek kurutma grubunda  $34,14 \pm 0,27$  ile  $408,3 \pm 207,75$  nm aralığında geniş bir damlacık büyüklüğü dağılımı gösteren Neusilin U2 yerine, küçük partikül boyutlarına sahip bir adsorban olan ve daha dar bir damlacık büyüklüğü aralığında katı SEDDS formülasyonları elde edilmesine olanak sağlayan Aerosil 200 seçilmiştir. Neusilin U2, Aerosil 200 ile karşılaştırıldığında büyük partikül boyutlu ve yüksek poroziteye sahip inorganik partiküller içeren bir adsorbandır (121).

Aerosil 200 ile elde edilen formülasyonlar;  $18,22 \pm 0,95$  –  $248,43 \pm 19,34$  nm aralığında,  $0,40 \pm 0,08$  –  $0,52 \pm 0,02$  PDİ değerlerinde damlacıkları ile lenfatik hedeflendirme için uygun özellikler sunmaktadır. Liyofilizasyon için seçilen model



formülasyon belirlenirken; Neusilin U2 ve Aerosil 200 için elde edilen yüksek PDI değerleri, tekrarlanabilir formülasyonların eldesinde engel teşkil edeceğinden, söz konusu adsorbanlar ileriki çalışmalara taşınmamıştır. Özellikle, en çok SMEDDS formülasyonu veren U9 faz diyagramına ait formülasyon grupları içerisinde, yüksek tekrarlanabilirlik potansiyeli ile düşük damlacık boyutları veren ve suda çözünürlük özellikleri laktoz ile karşılaştırıldığında üstün olan mannitol, liyofilizasyon için model adsorban olarak seçilmiştir.

Hücre kültürü (Bkz. Bölüm 4.9.1. Formülasyonlara Ait Çalışmalar, Şekil 4.36) çalışmaları da göz önüne alınarak en yüksek biyoyumluluk gösteren formülasyon olan U9-F21 formülasyonu, tablet basımı için seçilmiştir. Söz konusu formülasyonun farklı yardımcı maddelerle hazırlanan alternatifleri arasından seçilen T1 tablet formülasyonu; 5 sn'nin altında kalan toz akış süresi,  $19,02 \pm 1,86^\circ$ lik  $\alpha$  açısı ve uygun sertlik değeri ile, çalışılan formülasyonlar arasında en uygun özelliklere sahiptir. Elde edilen  $19,02 \pm 1,86^\circ$ lik  $\alpha$  açısı değeri USP 29, Genel Bölüm 1177/Toz Akışı kısmında göre değerlendirildiğinde; toz akışı "mükemmel" sınıflamasında yer almaktadır. Söz konusu formülasyon dissolüsyon çalışmalarında da kullanılarak değerlendirilmiştir.

### 5.3.2. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi

Yapılan DSC analizleri ile sıvı ve katı formülasyonlarda kullanılan yardımcı maddeler tek başına ve formülasyon içerisinde değerlendirilerek yardımcı maddelerin saflıkları, formülasyon içerisindeki diğer bileşenlerle etkileşimleri ve fiziksel durumları incelenmiş ve elde edilen termogramlar Bölüm 4.3.4'te verilmiştir.

Sıvı formda hazırlanan SEDDS formülasyonlarına ait bileşenlerin termogramları incelendiğinde formülasyon bileşiminde yer alan tek katı yardımcı madde olan TPGS'e ait  $40,11^\circ\text{C}$ 'de görülen endoterm piki, literatürde yer alan ve

37 – 41 °C aralığında olduğu bildirilen erime noktası verileriyle uyumludur(174). Formülasyonların seyreltme öncesi çekilen termogramları incelendiğinde; yardımcı maddelere ait piklerin ortadan kalktığı ve formülasyon bileşenlerinin etkileşim içerisinde oldukları görülmektedir. Bu durum, seyreltme sonrasında elde edilen termogramda da değişmemiş olup, -1,53 °C'de çözeltiden gelen suya ait erime piki de gözlenmektedir. LyP-1 içeren formülasyonlar incelendiğinde; LyP-1'in SEDDS formülasyonlarına eklenmesiyle 6,5 °C'de görülen LyP-1'e özgü keskin endoterm pikinin ortadan kalktığı ve LyP-1'in formülasyon bileşenleriyle etkileşim içerisinde olduğu gösterilmiştir. Katı formülasyonlara gelindiğinde; liyofilize edilen örneklerde 169,62 °C'de görülen mannitole ait erime piki literatür ile uyumlu olup liyofilize edilen formülasyonlarda da görülmektedir. Püskürterek kurutmada kullanılan katı adsorban olan Aerosil 200'e ait termogram literatürle uyumlu olup herhangi bir pik gözlenmemiştir (175). Hazırlanan tüm formülasyonlar değerlendirildiğinde; herhangi bir ekzoterm pikine rastlanmaması, maddelerin amorf formda olduğu ve bozunma olmadığını göstermektedir. Püskürterek kurutma ve liyofilizasyon ile elde edilen LyP-1 formülasyonlarında, LyP-1'e ait endotermik veya ekzotermik pike rastlanmaması da, formülasyonların uygun bir şekilde hazırlandığını göstermektedir.

#### **5.4. Konjugasyon Çalışmaları**

##### **5.4.1. Peptit – İlaç Konjugatlarının Hazırlanması**

LyP-1-Doks konjugatı eldesi sırasında, peptide ait karboksil grupları ile doksorubisine ait amin grupları arasında gerçekleşen reaksiyondan yararlanılmıştır. Söz konusu reaksiyonun gerçekleşebilmesi amacıyla suda çözünebilen bir karbodiimid bileşiği olan EDC varlığında gerçekleştirilen

reaksiyon, işaretleme ve çapraz bağlama gibi reaksiyonlarda en çok tercih edilen reaktiflerden biridir. N-hidroksi süksinimidin suda çözünebilir türevi olan sülfonhidroksit ise, EDC ile aktive edilen karboksilik asit grubuna bağlanarak NHS esteri oluşturmaktadır. Söz konusu ester, tek başına EDC'nin verdiği reaksiyon ile oluşan ara üründen daha stabil olup, primer aminlerle etkili bir konjugasyona olanak sağlar. EDC ve sülfonhidroksit varlığında aktive edilen peptit ile doksozobisin çözeltisi karıştırılarak, doksozobisine ait primer amin grupları ile peptidde ait karboksil grupları arasında etkili bir reaksiyonun gerçekleşmesi sağlanmıştır (176). Örneklerin saflaştırılması sırasında kullanılan Sephadex kolonlar, yatağın por büyüklüğüne bağlı olarak, belirli büyüklükteki molekülleri reaksiyon sonrası serbest halde kalan işaretleme moleküllerinden, tuz moleküllerinden ve benzer safsızlıklardan ayıran ve farklı por büyüklüklerine sahip kolonlar arasından seçim olanağı sağlayan sistemlerdir. Tez çalışması kapsamında kullanılan G10 kolon, molekül büyüklüğü 700 ve üzeri olan molekülleri ayırabilen bir yapıya sahiptir. Yatağın por açıklığından büyük olan moleküller kolonda tutulmadan boş hacim ile kolonu ilk sırada terk etmektedir. Tez çalışması kapsamında elde edilen konjugatlar da, reaksiyona girmemiş safsızlıklardan bu yöntem ile uzaklaştırılmıştır. "Bölüm 4.4. Konjugasyon Çalışmaları" başlığı altında görülen Şekil 4.6'da, elde edilen LyP-1-Doks konjugatının, G10 kolon materyali ile etkin şekilde saflaştırıldığı gösterilmiştir. Reaksiyona girmeyen 579,98 g/mol ağırlıktaki doksozobisin molekülleri kolonda tutularak ileriki fraksiyonlar içerisinde kolondan uzaklaşmıştır.

#### 5.4.2. Polimer – İlaç Konjugatlarının Hazırlanması

Polimer ilaç konjugatları hazırlanırken, peptit – ilaç konjugatlarında olduğu gibi EDC ve sülfo-NHS ile karboksilik asit gruplarının aktifleştirilmesinden yararlanılmıştır. D-PGA-Doks konjugatı eldesi için ilk basamakta PGA molekülünde bulunan primer amin grubu ile DTPA molekülünde bulunan karboksilik asit grupları arasında gerçekleşen reaksiyondan yararlanılarak DTPA-PGA (D-PGA) konjugatları elde edilmiş olup, konjugatta glutamik asitten gelen çok sayıdaki karboksilik asit grubu EDC ve sülfo-NHS ile aktive edilerek doksorubisinin primer amin grubu ile reaksiyon oluşması sağlanmıştır. Benzer şekilde; DSPL-Doks eldesinde de PL molekülü üzerinde lizin kaynaklı primer amin grupları ile DTPA molekülünde bulunan karboksilik asit grupları reaksiyona sokularak, PL-DTPA elde edilmiş ve aktive edilen karboksilik asit grupları ile doksorubisinin primer amin grubu reaksiyon oluşturmuştur.

Elde edilen konjugatlar molekül ağırlıklarına bağlı olarak seçilen ve moleküler ayırım limiti 5000 olan Sephadex G25 kolon ile saflaştırılmıştır. “Bölüm 4.4. Konjugasyon Çalışmaları” başlığı altında görülen Şekil 4.7 ve 4.8’de, konjugatların yüksek molekül ağırlıkları sebebiyle kolonda tutunmadığı ve ilk fraksiyonlarda etkin şekilde ayrıldığı görülmektedir. Mavi dekstran, 2.000 kDa ağırlığa sahip bir protein olup, paketlenen kolonların etkin bir şekilde çalıştığına gösterilmesi amacıyla kullanılan bir boş hacim işaretidir (177). Elde edilen konjugatın mavi dekstran ile aynı fraksiyonlarda kolonu terk etmesi, ayırımın etkinliğinin göstergesidir.

## 5.5. Konjugatların Karakterizasyonu

### 5.5.1. D-PGA Konjugatlarının Tayini için ELISA testi

Konjugatların reaksiyon sonrasında üzerlerinde DTPA molekülü taşıdıklarının doğrulanması amacıyla farklı anti-DTPA konsantrasyonlarına karşı ölçülen absorbans değerleri kontrol ile karşılaştırıldığında gözlenen fark beklenen bir durum olup; kontrol olarak kullanılan BSA-DTPA molekülünün D-PGA konjugatlarının aksine, PGA'ya bağlı tek mol DTPA yerine birden çok DTPA molekülü ile konjuge olmasına bağlıdır.

### 5.5.2. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE)

Bispesifik antikor komplekslerinin hazırlanması sırasında kullanılan yöntemler arasında yer alan SDS-PAGE ile, antikorun bir sonraki basamakta yer alan konjugasyona hazırlık olarak tiyollenmesi sonrasında ve elde edilen kompleks örneklerinde uygulanarak konjugasyonun gerçekleştirildiği doğrulanmıştır. SDS-PAGE sırasında örneklerin hazırlanmasında herhangi bir indirgeyici madde (beta merkaptto etanol, ditiyotretol vb.) kullanılmadığından protein yapısındaki disülfür bağı gibi kovalan etkileşimler korunmuş olup, kovalan olmayan etkileşimler ortadan kaldırılmıştır. Bu durumda, jel görüntüsünde yer alan bantlar söz konusu proteinlerin net yükü ve konformasyonlarından bağımsızdır ve örneklere ait molekül ağırlıklarını yansıtmakta olup, jelde monomer bantlarına bulunmamaktadır (178). Elde edilen komplekslerin hesaplanan molekül ağırlığı, antikor başına iki mol peptit konjugasyonu gerçekleştiğini göstermektedir. Tiyollenmiş halde 143,498 kDa ağırlıktaki modifiye antikora 2 mol peptit eklenmesi 1,98 kDa'luk bir değişikliğe neden olmaktadır.

### 5.5.3. Floresan Aktive Hücre Ayırma (*Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS*) Analizi

Hazırlanan peptit-ilaç konjugatlarının hücrelere girişinin değerlendirilmesi amacıyla yürütülen akış sitometrisi sonuçlarına göre; doksorubisinin LyP-1 ile hazırlanan konjugatları etkin maddelerin hücrelere girişini çözelti şeklinde uygulanan formuna göre 3,19 ile 3,37 kat artırmaktadır. Bu durumda, LyP-1 konjugasyonunun doksorubisinin hücre içine taşınmasını kolaylaştırdığı görülmektedir. Kazıma ve tripsin işlemi ile gerçekleştirilen iki farklı uygulama ile elde edilen floresan şiddeti değerleri incelendiğinde; doksorubisin çözeltisi uygulanan gruplar arasında fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmazken ( $p>0,1$ ), LyP-1 ile konjuge gruplarda kazıma işlemi ile elde edilen hücrelere konjugat girişinin arttığı görülmektedir ( $p<0,0001$ ). Bu durum, tripsinin proteolitik aktivitesi sonucu zarar gören yüzey reseptörleri sebebiyle, LyP-1 konjugatlarının hücre içine girişinin azalmasıyla açıklanabilir (179).

### 5.5.4. *In-Cell* ELISA

Tasarlanan bispesifik antikor komplekslerinin immünoaktivite değerlendirmeleri, geliştirilen *In-cell* ELISA yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Analiz verileri ışığında, seriler halinde hazırlanmış olan komplekslerden immünoaktivitesi en yüksek olan serinin immünohistokimya çalışmalarında kullanılması amaçlanmıştır. Elde edilen verilere göre; anti-DTPA antikor hücrelere özgün olmayan şekilde bağlanma göstermesine rağmen, konjugatlar ile elde edilen bağlanma, anti-DTPA grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı şekilde artmaktadır ( $p<0,0001$ ). Geçirgenliği artmış hücrelerde kompleksin hücre içerisine girişinin artması, hücre içerisinde

bulunan reseptörlere bağlanmayı da sağlayacağından, elde edilen absorban değerlerinde artma beklenmektedir (180). Geçirgenliği artırılmış hücrelerde görülen bağlanma artışının düşük olması, söz konusu hücrelerde bulunan p32 reseptörlerinin çoğunlukla hücre yüzeyinde konumlandığını düşündürmektedir.

### 5.5.5. İmmünohistokimya Çalışmaları

Konjugatlara ait immünohistokimya çalışmaları ile lineer ve siklik peptit kullanılarak hazırlanan konjugatların MDA-MB-231 hücrelerine bağlanma özellikleri değerlendirilmiştir. Ön deneme olarak yapılan LyP-1-Floresin konjugat inkübasyonu sonrası, tek başına floresin uygulanan hücrelerdeki özgün olmayan bağlanmaya göre lineer ve siklik peptit ile hazırlanan konjugatlarda yüksek floresan şiddeti görülmektedir. Lineer ve siklik peptit karşılaştırıldığında; siklik peptidin arka plan floresan ışımalarının daha az olduğu ve buna bağlı olarak da hücrelere spesifik olmayan bağlanmanın daha az gözlemlendiği söylenebilir.

Görüntüleme sitometresi ile 24 saat süresince yapılan inceleme sonucunda floresin işaretli peptidin hücrelere giriş ve hücre içerisinde birikimleri hakkında önemli bilgiler elde edilmiştir. Hücre membranı ve çekirdek membranı işaretlenerek okunan floresan şiddeti değerleri, peptidin zamana bağlı olarak hücrenin içerisinde konumlanma bölgelerini göstermektedir. Yeşil integral değeri; hücre çekirdeği sınırları içerisinde görülen floresan madde miktarını bildirmekte olup, yeşil periferik integral değeri; çekirdek membranı ile hücre membranı arasında kalan bölgede biriken floresan maddeye bağlı ışımaya olarak tanımlanmaktadır.

Çekilen floresan mikroskop görüntüleri değerlendirildiğinde; işaretli peptit 30. dk.'dan itibaren sitoplazmada gözlenmeye başlamıştır. 24. saatin sonuna kadar

sitoplazmadaki miktarı artmaya devam eden peptidin çekirdekte toplanması 3. saate kadar artmış olup 6. ve 24. saatte düşüşe geçmiştir.

p32 reseptörünün mitokondri, çekirdek ve hücre yüzeyinde ifade edildiği ve kanser hücreleri yüzeyinde miktarının arttığı Fogal ve ark. tarafından 2008 yılında bildirilmiştir (1). Bu bilgi ışığında; peptide özgü reseptör olan p32'nin, çekirdek yüzeyinde de ifade edilmesine bağlı olarak peptidin çekirdeğe girişini artırdığı düşünülmektedir.

Sitoplazmada 6. saat itibariyle görülmeye başlanan ve 24. saatin sonunda belirginleşen yoğun yeşil noktaların oluşumu, LyP-1'in mitokondride birikmiş olabileceğini düşündürmektedir. Söz konusu noktalar lizozomlarda biriken peptide de işaret edebileceğinden; mitokondriyal ve lizozomal işaretler ile görüntüleme çalışmaları yapılmasıyla daha doğru bir yargıya varılabilir.

Konjugasyon çalışmaları ile elde edilen bispesifik antikor komplekslerine ait iki basamaklı ön hedeflendirme çalışması kapsamında, 30 dk. ve 3 saat boyunca bispesifik kompleksler ile muamele edilmiş hücrelere 1 saat süreyle DSPL-RITC konjugatları uygulanarak komplekslerin aktif hedeflendirme kapasiteleri değerlendirilmiştir. Yapılan floresan şiddeti analizi sonrası 3. saatle karşılaştırıldığında, 30.dk.'da hücrelerde daha fazla floresan işaretli konjugat birikimi gözlenmiştir. Sonuçlar, görüntüleme sitometrisinde alınan sonuçlar ile beraber değerlendirildiğinde; 30. dk. itibariyle hücre içerisine girmeye başlayan peptit konjugatlarının 3. saate kadar hücre içerisine artan miktarlarda gireceği öngörülmektedir. Bu durumda; hücre yüzeyinde, 2. basamakta hedeflendirilen DSPL-RITC konjugatlarının bağlanmasına olanak sağlayacak bispesifik konjugat miktarı azalacaktır ve tek başına hücre içerisine giremeyen DSPL-RITC konjugatları, gözlenen floresan şiddetinde düşüşe neden olacaktır.



## 5.6. Etkin Madde Miktar Tayin Yöntemi Geliştirilmesi ve Validasyonu

### 5.6.1. HPLC Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu

Tez çalışması kapsamında, etkin maddeye ait stabilite çalışmalarında kullanılmak üzere HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Analiz için tercih edilen UV dedektör, peptit/protein yapıda moleküllerin analizinde tercih edilmektedir. Kullanılacak dalga boyu belirlenirken peptit/protein yapıdaki örneklerde sıklıkla kullanılan UV dalga boyları değerlendirilmiştir. Diziliminde triptofan ve tirozin bulunan örnekler için 280 nm dalga boyu sıklıkla tercih edilirken, tez çalışması kapsamında kullanılan peptidin diziliminde aromatik yapıda aminoasit olmaması, bu seçeneği ortadan kaldırmıştır. Peptit bağlarının 190 nm'den başlayarak düşük dalga boylarında en yüksek absorbans değerlerine ulaştığı bilinmektedir. Ancak düşük dalga boylarında analiz yapılırken yaşanan teknik sıkıntılar, analizlerde alternatif olarak 205-215 nm dalga boyu aralığının kullanılmasına olanak sağlamaktadır (181). Tez çalışması kapsamında kullanılan peptidin analizi 205 nm dalga boyunda gerçekleştirildiğinde; düşük dalga boylarında gürültü oranının artmasına bağlı olarak kromatogramda uygun referans hattı elde edilemediğinden, analizler 215 nm'de valide edilmiştir.

Analizler sırasında ters faz HPLC yöntemi kullanılmış olup hareketli faz olarak su (%0,1 TFA): asetonitril (%0,1 TFA) (h/h) sistemi tercih edilmiştir. Trifloroasetik asit (TFA), peptitlerin HPLC analizlerinde sıklıkla kullanılan bir madde olup keskin pikler elde edilmesine olanak sağlamaktadır (182, 183). Kullanılan gradyan yöntem, uygun morfolojide piklerin elde edilmesi amacıyla tercih edilmiştir. Yöntemin validasyonu "*ICH Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)*" kılavuzu esas alınarak gerçekleştirilmiştir.

Validasyon çalışmaları kapsamında doğrusallık, doğruluk, kesinlik (tekrarlanabilirlik ve tekrar edilebilirlik), duyarlılık ve özgünlük parametreleri değerlendirilmiştir. Bu kapsamda 0,99886 determinasyon katsayısı ile 25-200 µg/ml aralığında doğrusal bir kalibrasyon doğrusu oluşturulmuştur. Yöntem ile elde edilen kesinlik değerlerine ait varyasyon katsayıları %2'nin altında olup, yöntemin tekrarlanabilirliğini doğrulamaktadır. LyP-1'e ait teşhis sınırı 8,15 ve tayin sınırı 24,70 µg/ml olarak belirlenmiştir. Formülasyon bileşenlerinin enjeksiyonu sonrası elde edilen kromatogramlar ile LyP-1'e ait pikin herhangi bir girişim yapmadığı gösterilerek yöntemin peptide özgün olduğu kanıtlanmıştır.

#### **5.6.2. LC-MS/MS Yönteminin Geliştirilmesi**

Hücre kültürü ve dissolüsyon çalışmalarından elde edilen örneklerde mevcut madde miktarlarının, geliştirilip valide edilen HPLC yönteminin tayin sınırlarının dışında kalması sebebiyle, 10-7500 ng/ml aralığında doğrusal olan ( $R^2=0,99787$ ) bir LC-MS/MS yöntemi geliştirilmiştir.

Söz konusu yöntem, geliştirilen HPLC yönteminden türevlendirilmiş olup hareketli faz bileşimi benzerdir. LC-MS analizlerinde; TFA'nın sinyal baskılaması yapması nedeniyle, geliştirilen yöntemde TFA yerine formik asit tercih edilmiştir (184).

#### **5.7. Stabilite Çalışmaları**

Tez çalışması kapsamında; kullanılan peptidin farklı pH ve tampon konsantrasyonu değerlerinde stabilitesi incelenerek pH-hız profili çıkarılmış olup, peptidin dayanıklı olduğu pH'lar değerlendirilmiştir.

Siklik peptitlerin, yapılarında bulunan disülfür bağlarının peptit omurgasını güçlendirmesi sayesinde stabil yapılar oluşturduğu bilinmektedir(185, 186). Tez çalışması kapsamında kullanılan LyP-1'in siklik formu da, lineer formu ile karşılaştırıldığında (187), lineer peptidin en yüksek stabilite gösterdiği pH 1'de yarılanma ömrü 304,72 saat iken; siklik peptidin en stabil olduğu aralık pH 6-8 bölgesi olup, yarılanma ömrü 1299,31 saate kadar çıkmaktadır. Söz konusu aralık fizyolojik pH aralığı olup, peptidin siklik formunun parenteral ve oral kullanımı için üstünlük sağlamaktadır.

Peptit yapıda moleküllerde görülen stabilite problemlerinin başında hidroliz, oksidasyon ve deamidasyon gelmektedir. Amino asit diziliminde sistein bulunan peptitler oksidasyona yatkınlık gösterirken; glisin, glutamin, asparajin ve aspartik asit, deamidasyon ile siklik imid yapıda ara ürüne dönüşerek rasemizasyona uğramaktadır (188). Bu sebeple, LyP-1'e ait pH-hız profilinin belirlenmesi, literatürde benzer bir çalışma bulunmadığından önem taşımaktadır. LyP-1'in yapısında bulunan disülfür bağları yapıya konformasyonel sağlamlık kazandırdığından, peptidin stabilitesini artırmaktadır. Bazik pH değerlerinde peptit stabilitesinin azalmasının, peptit diziliminde yer alan glisin ve asparajinin deamidasyonun bazik pH'larda artmasına bağlı olduğu öngörülmektedir. Ayrıca yapısında disilfür bağı içeren peptitlerde nötral ve bazik pH'larda disülfür bağı parçalanmasına bağlı olarak stabilitede azalma görüldüğü bildirilmiştir (186).

Stabilite çalışmaları kapsamında yürütülen diğer bir çalışma, sıcaklığın reaksiyon hızı üzerine etkisinin incelendiği Arrhenius doğrularının oluşturulmasıdır. Arrhenius denklemi kullanılarak 3 farklı sıcaklık ve 3 farklı pH değerinde reaksiyon hız sabitleri hesaplanarak, literatürle uyumlu olarak artan sıcaklıklarda reaksiyon hız sabitinin arttığı gösterilmiştir. Diğer bir deyişle; sıcaklık arttıkça, peptidin stabilitesi

azalmaktadır. Üç sıcaklık üzerinden hesaplanan aktivasyon enerjileri incelendiğinde; değerin pH 8 için, pH 3 ve pH 6'dan yüksek olduğu görülmektedir. Bu sonuç, peptidin pH 8 ortamında reaksiyona girebilmesi için dışarıdan daha fazla enerji uygulanması gerektiğini, dolayısıyla peptidin söz konusu pH'da daha stabil olduğunu göstermektedir.

Formülasyonların stabilitesi incelendiğinde; 1:10 oranında seyreltilmiş formülasyonların damlacık boyutlarında 14 gün sonunda herhangi bir değişim olmaması, termodinamik açıdan stabil, kendiliğinden emülsifiye olabilen sistemler elde edildiğinin göstergesidir. Formülasyonların kullanım öncesi seyreltilerek uygulanacağı düşünüldüğünde, seyreltme sonrasında dahi stabilitesini uzun süre koruyacağı gösterilmiştir.

### **5.8. Dissolüsyon Çalışması**

Dissolüsyon çalışmaları kapsamında katılaştırılan SEDDS formülasyonları kapsül ve tablet şeklinde formüle edilerek, katı dozaj formu için öngörülen oral kullanıma uygunluk değerlendirilmiştir. Çalışmalar kapsamında USP 29 – NF 24'de tarif edilen şekilde asit ve tampon ortamı olarak hazırlanan iki farklı ortamda gerçekleştirilen çalışmada, geciktirilmiş salım sağlamak üzere polimer çözeltisi ile kaplanmış tablet ve asit ortama dayanıklı olarak üretilen HPMC yapıda DRcaps™ kapsüllerden ortama geçen LyP-1 miktarı tayin edilmiştir.

Tabletlerin kaplanması amacıyla kullanılan ve polimetakrilat türevi bir polimer olan Eudragit S100; firma tarafından verilen teknik özelliklere uygun olarak pH 7'nin üzerinde çözünmektedir. Seçilen Eudragit türevi, lenfatik absorpsiyonun fazla olduğu Peyer plaklarının bulunduğu ince bağırsak bölgesine hedeflendirme yapmak amacıyla seçilmiştir. Söz konusu bölgede pH değeri 6 ile 7,4 aralığında

değişmektedir (189). Böylece kullanılan kaplama sayesinde mide asit ortamından korunarak bağırsak bölgesine kadar gelen etkin maddenin ince bağırsakta çözünerek absorbe olması beklenmektedir. Yürütülen çalışma ile elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde; geliştirilen formülasyonların, peptidi asit ortamda %7,07 ile %12,87 aralığında saldığı, salımın geri kalan büyük kısmının pH 6,8 tamponunda gerçekleştiği görülmektedir. Püskürterek kurutma ile elde edilen örneklerde, tampon ortamında daha yüksek çözünme oranlarına rastlanmaktadır. Bu veriler ışığında, etkin maddeyi mide asidinden koruyan ve bağırsak ortamını taklit eden tampon ortamında çözünmesine olanak veren formülasyonun, püskürterek kurutma ile elde edilen kapsül formülasyonu olarak öne çıktığı söylenebilir.

## **5.9. Hücre Kültürü Çalışmaları**

### **5.9.1. Formülasyonlara Ait Çalışmalar**

Geliştirilen formülasyonlar, sağlıklı hücrelerde görülecek etkilerin en aza indirilmesi amacıyla ilk olarak Caco-2 hücre hatlarında denenmiş olup, uygun formülasyonlar ve söz konusu formülasyonlara ait seyreltmeler, biyoaktivite çalışmalarında kullanılacak seyreltme oranlarının belirlenmesinde yol gösterici olmuştur. İlk işlem olarak, farklı seyreltme oranlarında uygulanan sıvı SEDDS'ler arasından, biyoyumluluğu en yüksek örnek olan U9-F21 model formülasyon olarak seçilmiştir.

SEDDS formülasyonlarında bulunan yüzey etkin maddeler, belirli seyreltme oranları üzerinde kullanıldıklarında sağlıklı hücreler için tehdit oluşturmamaktadır. Yüzey etkin maddelerin seyreltilmesi sonucu tüm gruplar için hücre canlılıklarının arttığı görülmektedir. Sonuçlar incelendiğinde; U9-F21 formülasyonun 1:200

seyreltmeden itibaren kontrol grubu ile benzer hücre canlılığını devam ettirdiği görülmektedir. Seyreltme oranları arttıkça yüzey etkin madde miktarındaki azalma sebebiyle formülasyonlar arasındaki farklar ortadan kalkmaktadır.

Katı boş formülasyonlarda gözlenen hücre canlılıkları incelendiğinde; katılaştırma yönteminin, Caco-2 hücre canlılık değerleri üzerinde fark yarattığı görülmektedir. Liyofilizasyon ile elde edilen U9-F23 ve U12-F17 formülasyonları, püskürterek kurutma ile elde edildiğinde, uygulamadan 24 saat sonra yüksek biyoyumluluk gösterirken; liyofilizasyon örnekleri kontrol grubu ile farklılık göstererek hücre canlılığında düşüşe neden olmuştur. Bu durumun, liyofilizasyon basamağında adsorban olarak kullanılan ve donma etkisinden koruma özelliği de olan mannitolden kaynaklandığı düşünülmektedir. Mannitol geçirgenliğinin değerlendirilmesi, Caco-2 hücrelerinde tek tabaka oluşturulan deney koşullarında, tek tabakanın bütünlüğünü doğrulamak amacıyla TEER ölçümüne alternatif olarak kullanılabilen bir yöntemdir (190). Normal koşullar altında Caco-2 hücrelerine giriş yapmayan mannitolün, formülasyonlar içerisinde mevcut olan yüzey etkin maddelerin membran geçirgenliğini artırıcı özellikleri sebebiyle hücreye yüksek miktarda girerek etki gösterdiği düşünülmektedir.

Sıvı (1:8000) ve katı (1:10000) boş formülasyonların Caco-2 hücre canlılık değerleri karşılaştırıldığında, U8-F21 ve U12-F17 formülasyonları dışında, tüm gruplarda sıvı formülasyonların biyoyumluluğu katı formülasyonlardan daha yüksek bulunmuştur.

LyP-1'in U9-F21 sıvı SEDDS formülasyonu kullanılarak hazırlanan katı formülasyonlarının biyoyumluluğunun gösterilmesi amacıyla peptidin lineer ve siklik formu Caco-2 hücrelerine uygulanmıştır. 24 saat sonunda kontrol grubu ile formülasyon grupları arasında fark gözlenmezken, formülasyonların 48 saat

boyunca bekletildiği durumda katılaştırmanın liyofilizasyon ile gerçekleştirildiği gruplarda, mannitolün hücre içerisine girişinin artması sebebiyle, hücre canlılığı değeri %64-72 aralığında gözlenmiştir. Geliştirilen formülasyonların in vivo uygulaması sırasında parenteral veya oral yol tercih edileceğinden, formülasyonların kanda veya gastrointestinal sıvıda sonsuz seyreltmeye uğrayarak emülsiyon damlacıkları oluşturacakları ve sağlıklı hücreler üzerinde herhangi bir sitotoksik etki göstermeyecekleri öngörülmektedir.

MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde görülen sitotoksik etkinin boş formülasyonlardan kaynaklanmadığının doğrulanması ve formülasyonların biyoyumluluğunun gösterilmesi amacıyla hazırlanan tüm katı formülasyonlar, 24 ve 48 saat boyunca değerlendirilmiş olup, hücre canlılık değerleri kontrol grubundan farklı bulunmamıştır. Bu sonuca göre; MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında, LyP-1 içeren formülasyonlar ile görülecek hücre canlılığı değerlerinin peptidin antikanser etkisinden kaynaklandığı söylenebilir. U9-F21 formülasyonu ile hazırlanan LyP-1'e ait katı formülasyon grubunda hücre canlılığının %52,05 ile 66,64 aralığında değiştiği görülmektedir. Elde edilen bu sonuç, LyP-1'in katı SEDDS formülasyonlarının MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde antikanser etkisini doğrulamaktadır.

Geliştirilen formülasyonların in vivo çalışmalarda kullanılan 4T1 hücre hattı üzerinde etkilerinin incelenmesi, ek olarak LyP-1 ve doksorubisinin tek başına ve kombinasyon halinde etkililiklerinin değerlendirilmesi amacıyla çalışmalarda kullanılacak sıvı formülasyonlar MDA-MB-231 ve 4T1 hücre hatlarında değerlendirilmiştir. Doksorubisinin etkisine bakıldığında 24. ve 48. saate ait sonuçlar, doza bağlı etkiyi işaret etmektedir. Kontrol grubu ile anlamlı farka sahip en

düşük dozun (0,15  $\mu$ M) kombinasyon tedavisi için seçilmesi, LyP-1 ile yapılan kombinasyonun etkisinin anlamlandırılabilmesi açısından önemlidir.

LyP-1'in 15,6 – 250  $\mu$ M konsantrasyon aralığında doz titrasyonu yapıldığında, özellikle MDA-MB-231 hücre hattında doza bağlı bir eğilim gözlenmektedir. Bu sonuç, Western Blot analizlerinde söz konusu hücre hattında LyP-1'e özgü reseptörün daha yüksek miktarda ifade edilmesi ile uyumludur. Literatürde sıklık LyP-1'in tek başına uygulamada antikanser etkisinin gösterildiği tek bir çalışma mevcut olup kullanılan hücre hattı MDA-MB-435 meme kanseri hücre hattıdır (163). Peptidin antikanser etkisi ağırlıklı olarak in vivo çalışmalarla gösterilmiş olup, bu tez çalışması kapsamında da peptidin antikanser etkinlik in vivo deneyler ile somut şekilde desteklenmiştir.

LyP-1 ile kombine halde kullanılan doksorubisinin etkinliği değerlendirildiğinde; MDA-MB- 231 hücre hattında 48 saatin sonunda tek başına %74,3 oranında canlılık değerlerine sahip doksorubisin çözeltisi, 250  $\mu$ M LyP-1 ile kombine edildiğinde hücre canlılığı %49,6'ya kadar düşmüştür. Kombinasyona katılan LyP-1 miktarı arttıkça hücre canlılıklarında gözlenen düşüş, LyP-1'in doza bağlı etkisini doğrulamaktadır.

Kombine tedavide formülasyonun etkisini incelemek üzere ilk olarak boş sıvı formülasyonların meme kanseri hücre hatlarında kullanılacak seyreltme oranları belirlenirken, iki hücre hattında da 24 ve 48 saat sonunda kontrol grubu ile fark gözlenmeyen 1:32000-1:8000 aralığından, peptit ile hazırlama sırasında uygulanabilecek en yüksek seyreltme oranı olan 1:16000 seçilmiştir. Sonraki aşamada, formülasyonun etkisinin incelenmesi amacıyla doksorubisin ve LyP-1 SEDDS formülasyonları içerisinde verilmiştir. LyP-1 ve doksorubisinin kombine olarak formüle edildiği gruplarda MTT testi uygulandığında 24 ve 48. saatlerde LyP-



1'in titre edildiği gruplar arasında formülasyonun etkisi sebebiyle fark gölgelenmiştir. Doksorubisinin tek başına gösterdiği etki ise MDA-MB-231 hücre hattında 24. ve 48. saatte sırasıyla %91,7 ve 89,7 hücresel canlılığa neden olurken, bu değer SEDDS içerisinde uygulamada %60,9 ve 46,37'ye kadar gerilemiştir. Diğer bir deyişle; doksorubisinin etkisinin, SEDDS formülasyonları içerisinde uygulama ile arttığı gösterilmiştir.

### **Transport Çalışmaları**

Geliştirilen formülasyonların oral uygulamada gösterecekleri davranışın değerlendirilebilmesi amacıyla yürütülen transport çalışmalarında; peptidin SEDDS formülasyonları içerisinde uygulanmasının, bağırsak hücrelerini taklit eden Caco-2 hücre hattından geçişini U9-F21 sıvı SEDDS ile 3,3 kat artırdığı gösterilmiştir. Aynı formülasyonun püskürterek kurutma ile elde edilen örneğinde de geçişin 1,7 kat arttığı tespit edilmiştir. Lipid yapıdaki formülasyonların, hücre membranında yer alan fosfolipidler ile etkileşime geçerek hücresel girişi kolaylaştırdığı bilinmektedir. U9 faz diyagramına ait formülasyonlar arasından U9-F17 formülasyonunun en yüksek permeabilite değerine sahip olması, bu formülasyon bileşiminde sürfaktan yüzdesinin en fazla olmasından kaynaklanmaktadır (121). Bunun yanı sıra, TPGS'in Caco-2 hücreleri üzerinde absorpsiyon artırıcı etkisi (191) gösterilmiş olup U9 ve U8 faz diyagramlarında söz konusu yardımcı maddenin kullanılmış olması, lenfatik absorpsiyonun artırılması yönünden de üstünlük getirmektedir. Katı SEDDS formülasyonlarına model olarak seçilen U9-F21 formülasyonunda bulunan yardımcı maddelerden Peceol'ün de Caco-2 hücre hattında bulunan P-gp'nin ifade seviyeleri üzerinde etkisinin olduğu gösterilmiştir (192).

### 5.9.2. Konjugatlara Ait Çalışmalar

Konjugasyon çalışmaları kapsamında hazırlanan LyP-1 ilaç konjugatlarından LyP-1-Doks konjugatı, in vitro çalışmalar kapsamında model olarak seçilerek doksorubisin çözeltisi ile karşılaştırılmak üzere MDA-MB-231 hücrelerine uygulanmıştır. 0,3125 – 20  $\mu$ M konsantrasyon aralığında doksorubisin üzerinden standardize edilerek uygulanan dozların hücre canlılıkları üzerine etkisi incelendiğinde; yüksek konsantrasyonlarda gruplar arasında fark gözlenmezken, 1,25  $\mu$ M ile 5  $\mu$ M konsantrasyon değerleri arasında LyP-1-Doks konjugatının antikanser etkisinin daha yüksek olduğu ve  $IC_{50}$  değerini doksorubisinle karşılaştırıldığında %50,1 oranında düşürdüğü gösterilmiştir. Doksorubisinin literatürde bildirilen  $IC_{50}$  değeri 0,5 – 10  $\mu$ M aralığında olup, hesaplanan inhibitör konsantrasyon değerleri ile uyumludur (193).

#### Hücre İçine Alım Çalışmaları

Hücre içine alım çalışmaları kapsamında planlanan deneyler ile, FAM işaretli LyP-1'in in vivo deneylerde kullanılan 4T1 hücrelerine alım kinetikleri değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler ışığında; transport deneyleri ile paralel olarak, SEDDS formülasyonları içerisinde uygulanan işaretli peptidin, çözelti formu ile karşılaştırıldığında hücrelere daha yüksek miktarlarda girdiğinin gösterilmesi, SEDDS formülasyonlarının membran geçirgenliğini artırıcı özelliklerinin, hücrelere girişi kolaylaştırması ile açıklanabilir. 1. ve 5. saatte elde edilen floresan şiddeti değerleri karşılaştırıldığında; 5. saatte hücreler içerisinde biriken madde miktarı artmıştır. Çalışılan 1 – 27  $\mu$ M konsantrasyon aralığında, artan LyP-1-FAM miktarına bağlı olarak hücrelerde gözlenen floresan madde miktarlarında da artış gözlenmiştir.

Enerji bağımlı yolların peptidin hücre içerisine girişine etkisini değerlendirmek için sıklıkla kullanılan yöntemlerden biri, peptitlerin hücrelerle 4 °C'de muamele edilmesiyle enerji bağımlı yolları inhibe etmektir (169). Böylece, 4 ve 37 °C sıcaklıklar arasında görülen floresan şiddeti farkı, hücreye enerji bağımlı yollarla giren peptit miktarını göstermektedir. Peptidin SEDDS içerisinde uygulanması hem membran geçirgenliğini artırarak girişi kolaylaştırmakta, hem de formülasyon içerisinde stabil şekilde ara yüzeyde konumlanan peptidin reseptör aracılığıyla hücre içine alınmasına olanak sağlamaktadır.

### 5.9.3. Western Blot Analizi

İn vivo çalışmalarda kullanılan 4T1 ve MDA-MB-231 hücre hattı ile 4T1 hücre hattının farelere enjekte edilmesi sonrası elde edilen tümör dokularına ait lizatlar, p32 reseptörü varlığının doğrulanması amacıyla anti-p32 antikoru varlığında analiz edilmiştir. p32 proteininin 4T1, MDA-MB-231 , MCF-7 ve MDA-MB-435 hücrelerinde ifade edildiği literatürde yer almaktadır (1). Ancak, hücreler tarafından ifade edilen proteinlerin pasaj sayısı ve kültür koşullarına bağlı olarak değişiklik gösterdiği durumlar mevcuttur (194, 195). p32 proteinine ait bu doğrultuda bir bilgi olmamakla birlikte, kanser hücrelerinde artmış ifadeleri söz konusudur. p32'nin ifade derecelerinin yanı sıra, peptidin reseptöre bağlanabilmesi için reseptör konformasyonunun uygunluğu da önem taşımaktadır (196). Tez çalışması kapsamında çalışılan hücre hattında proteinin varlığının doğrulanması, in vitro ve vivo çalışmalar için temel oluşturmuştur.

Elde edilen membran görüntülerinde yer alan bantlar incelendiğinde, p32'ye özgü bantların MDA-MB-231 hücre hattında daha belirgin olduğu, buna bağlı olarak da daha yüksek oranlarda ifade edildiği öngörülmektedir. Hücre canlılık çalışmaları

kapsamında MDA-MB-231 hücrelerine LyP-1 uygulaması sonrası konsantrasyona bağlı olarak gözlenen eğilimin MDA-MB-231 hücrelerinde belirgin olmasının, proteinin miktarı ile ilişkili olduğu düşünülebilir. Yüklenen örnek miktarlarının karşılaştırılabilmesine de olanak sağlayan ve pozitif kontrol olarak kullanılan  $\beta$ -aktine ait bantlar değerlendirilerek örnek yükleme miktarları karşılaştırıldığında; 4T1 tümör grubunda daha yüksek miktarda  $\beta$ -aktin gözlenmesine rağmen p32 miktarı düşük bulunmuştur.

#### 5.9.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

İn vivo çalışmalarda kullanılacak hücre hattında p32 varlığının doğrulanması için kullanılan bir diğer yöntem olan polimeraz zincir reaksiyonu ile, örneklerde bulunan ve ilgili geni kodlayan bölgenin çoğaltılması sağlanmıştır. Çalışma için primerler tasarlanırken, NCBI/Primer-BLAST veri tabanı kullanılmıştır. 4T1 hücre hattında yapılacak analizler için fare (*Mus musculus*) mRNA'sında p32'yi kodlayan özgün bölgeleri tanıyacak primerler seçilmiştir. Primerlerin farklı bölgelerde bulunan aynı kodu taşıyan bölgeye spesifik olmayan şekilde bağlanmasını önlemek için araya intronların girmesine izin vermeyecek şekilde ekzon-ekzon bağlanma tercih edilmiştir. Primerler yaklaşık 20 baz çifti uzunlukta seçilerek spesifik olmayan bölgelere bağlanmanın en aza indirilmesi amaçlanmıştır. Önerilen primerler arasından seçim yapılırken, primerin kendi üzerine katlanması veya diğer primerlerle etkileşmesini önlemek amacıyla katlanma değerleri en düşük olan seçenekler arasından tercih yapılmıştır. Uygun bulunan primerlerin, genomik DNA'da benzer bir bölgeye bağlanma riskini ortadan kaldırmak amacıyla, seçilen primer çifti, aynı türe ait genomik DNA için de sistemde test edilerek eşleşen bölge olmadığı doğrulanmıştır. Seçilen primerlerin oluşturduğu p32 ürünü teorik olarak

278 baz çifti uzunluğunda olup genomik DNA işaretlerinden 300 baz çiftine karşılık gelen seviyede gözlenmiştir. “4.9.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu” bölümünde verilen şekilde görüldüğü gibi, 4T1 hücre hattı ve 4T1 tümör dokusu örneklerinde p32 gen ifadesi mevcuttur. 175 baz çifti seviyesinde görülen  $\beta$ -aktin gen ürünleri reaksiyonun pozitif kontrolüdür.

### 5.10. İn Vivo Etkililik Çalışmaları

Geliştirilen formülasyonların canlı sistemlerde davranışlarının gözlenmesi ve tedavi etkinliğinin değerlendirilebilmesi amacıyla yürütülen in vivo çalışmalar kapsamında, dişi BALB/c fareler üzerinde uygulamalar gerçekleştirilmiştir. Kullanılan tümör modeli, meme kanseri modelleri arasında sıklıkla tercih edilen bir model olup tümörün hızla oluşması ve metastaz özelliği, üstünlükleri arasındadır.

PR, ER ve HER2 reseptörlerini ifade etmeyen ve bu sebeple tümöre özgü tedavilerin kullanımının olmadığı üçlü negatif meme kanseri, görülen meme kanseri vakalarının %15’ini oluşturmaktadır. 4T1 ile oluşturulan tümör modeli de, PR, ER ve HER2 reseptörlerini ifade etmeyen üçlü negatif tümör modeli olup, agresif seyreden bir tablo sergilemektedir (197). Metastaz yapma potansiyeli oldukça yüksek olan bu model, BALB/c farelerde meme dokusuna enjekte edildiğinde kısa sürede karaciğer, akciğer, lenf nodu gibi pek çok farklı dokuya metastaz yapabilmektedir (198).

Tez çalışması kapsamında kullanılan modelde, hayvan başına % tümör değişimi değerleri incelendiğinde; tümör boyutlarının hızlı artışı, literatürle uyumlu şekilde dikkat çekmektedir. Tedavinin başlangıcı da dahil olmak üzere, elde edilen grup içi heterojen tümör boyutları, yüksek standart hata değerleri elde edilmesine neden olmuştur. Tedavinin 28. gününde, hastalığın ilerleyişi sebebiyle yüksek tümör boyutlu farelerin kaybedilmesi, gruplar arasında görülen farkların yakınlaşmasına

neden olmasına rağmen, kombinasyon tedavinin uygulandığı gruplar ile kontrol olarak kullanılan SF ve boş formülasyon grubu arasında % tümör boyutu değişimi açısından anlamlı fark görülmektedir. Çözelti olarak doksorubisin uygulanan grup ile doksorubisine ilave olarak LyP-1'in tedaviye eklendiği grup arasında gözlenen fark, LyP-1'in doksorubisinin etkisini artırdığını göstermektedir. Aynı şekilde, SEDDS formülasyonu içerisinde uygulanan doksorubisin ile doksorubisinin LyP-1 ile kombine halde SEDDS formülasyonları içerisinde uygulandığı grup arasında gözlenen fark, LyP-1'in etkisini ortaya koymaktadır. Söz konusu durum, LyP-1'in antikanser etkisine ek olarak, "bystander effect" ile açıklanabilir. LyP-1 ve RGD peptitlerinin, aralarında herhangi bir kovalan bağ olmadan da beraber uygulandıkları maddelerin etkilerini artırdıkları gösterilmiş olup; aynı etki, tez çalışması kapsamında da doksorubisinin antikanser etkisinde görülen artışı destekler niteliktedir (199).

Histopatolojik inceleme sonucu elde edilen ışık mikroskobu görüntülerinde (Şekil 4.46) yer alan meme tümör dokusunda, hem kas demetleri içerisinde hem de yağ dokusunda tümör hücrelerinin infiltrasyonu görülmektedir. Tümör dokusunda yer alan hücreler incelendiğinde (Şekil 4.46.B), mitotik hücrelerin varlığı dikkat çekmektedir. Söz konusu değerlendirme ile, 4T1 hücre hattı aracılığıyla oluşturulan tümör modelinin varlığı doğrulanmış olup, agresif karakteri gösterilmiştir.

Hayvan ağırlıkları incelendiğinde; gruplar arası fark gözlenmemiş olup, hiçbir tedavi grubunda %15'ten fazla kilo kaybı gerçekleşmemiştir. 28. günde boş SEDDS uygulaması yapılan grupta görülen ağırlık sapması, 3 hayvanın aynı gün kaybedilmesi ile ilişkilidir.

### 5.11. İn Vivo Biyodağılım Çalışması

İn vivo biyodağılım çalışması, yürütülen hayvan deneylerinin bir parçası olarak gerçekleştirilmiştir. İntraperitoneal uygulama, küçük laboratuvar hayvanlarında i.v. uygulamaya alternatif olarak kullanılmakla birlikte, farmakokinetik yönden değerlendirildiğinde, oral uygulamaya yakınlık göstermektedir. İntraperitoneal uygulanan etkin maddelerin absorpsiyonu i.v. uygulamaya göre daha yavaş olup, mezenterik damarlar tarafından absorbe edilen maddeler portal ven aracılığıyla karaciğere gitmektedir (200). “Bölüm 4.11. İn Vivo Biyodağılım Çalışması”nda yer alan Şekil 4.49’da formülasyon değişkenine göre incelenen biyodağılım sonuçları, söz konusu absorpsiyon yolağı göz önüne alınarak düzenlenmiştir. Tümörlü farelere uygulanan SEDDS formülasyonları, söz konusu yolağı izleyen bir dağılım eğilimi göstermiştir. Peptidin mezenterik lenf nodlarında yüksek miktarda toplanması, LyP-1’in literatürde bildirilen lenfatik hedeflendirme özelliğini destekler niteliktedir. Peptidin her iki uygulama türünde karaciğerdeki birikim oranları da, absorpsiyon yolağına bağlı olarak beklenen bir sonuçtur.

Doku homojenizatlarına yapılan CD206 antikor boyaması ile pozitif hücreler ayrılarak makrofaj içerisine giren floresan madde miktarı takip edilmiştir. Tümörlü hayvanlara uygulanan SEDDS formülasyonları sonrası periton boşluğu, karaciğer ve dalaktan elde edilen total immünhücrelerin floresan miktarı ile makrofajlara giren peptit miktarı karşılaştırıldığında, peptidin makrofaj hücrelerinde daha az tutulduğu görülmektedir. Bu sonuca göre; özellikle immün hücrelerin yüksek miktarda bulunduğu bölgelerde SEDDS formülasyonunun peptidin makrofajlardan kaçmasına olanak sağlayacağı söylenebilir.

Uygulanan formülasyonlar karşılaştırıldığında; uygulama yerinden kan dolaşımına en yüksek miktarda geçen grup SEDDS içerisinde formüle edilen ve tümörlü farelere uygulanan peptid grubudur. Tümör dokularında görülen birikme de peptidin SEDDS içerisinde uygulandığı grupta artmaktadır. Tümör dokusunda görülen yüksek makrofaj girişi, LyP-1'e özgü p32 reseptörünün tümör makrofajlarında da ifade edilmesi ve bunun sonucu olarak LyP-1'in, i.v. enjeksiyonu sonrası tümör makrofajları, tümör lenfatikleri ve tümör hücrelerinde toplanması ile açıklanabilir (36, 37, 201). "Bölüm 4.11. İn Vivo Biyodağılım Çalışması" başlığı altında verilen Şekil 4.48'de yer alan UV kamera görüntüleri de tümörlü hayvana uygulanan SEDDS formülasyonunun mezenkimal lenf nodu ve tümörde birikimini doğrulamaktadır.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Lenf damarlarına özgü, antikanser etkili LyP-1 peptidi, lenfatik absorpsiyona uygun damlacık boyutlarına sahip, stabil sıvı SEDDS formülasyonları içerisinde formüle edilmiştir.
- Sıvı SEDDS formülasyonları, oral uygulamaya uygun hale getirilmek üzere katılaştırılmıştır. Elde edilen katı SEDDS formülasyonları, midenin asit ortamına dayanıklı şekilde tasarlanmıştır.
- Hazırlanan SEDDS formülasyonlarının karakterizasyonları yapılmış, işlevsellikleri in vitro ve in vivo olarak gösterilmiştir.
- Lenfatik hedeflendirmeye olanak sağlayan ve kendisi de antikanser özellik gösteren LyP-1 peptidi, meme kanserinin rutin tedavisinde kullanılan doksorubisin ile konjuge edilerek; MDA-MB-231 hücre hattında doksorubisinin etkisini artırmıştır.
- Peptit ve antikor varlığında, bispesifik kompleks yapılar hazırlanmış ve seçici bağlanmayı artıran iki basamaklı ön hedeflendirme yöntemi ile başarılı bir şekilde görüntüleme sağlanmıştır.
- PGA ve PL iskelet yapısına LyP-1 ve doksorubisinin konjugasyonu sağlanarak birden fazla molekülü konjuge etme kapasitesine sahip polimer – peptit ve polimer – ilaç konjugatları elde edilmiştir.
- Siklik yapıdaki LyP-1 peptidine ait HPLC ve LC-MS/MS miktar tayini yöntemleri geliştirilmiştir.
- Siklik yapıdaki LyP-1 peptidine ait stabilite profili oluşturulmuştur.
- Geliştirilen sıvı ve katı SEDDS formülasyonları ile peptidin Caco-2 hücrelerinden geçişi artırılmıştır.

- Doksorubisin ve LyP-1'in kombinasyonu ile hazırlanan SEDDS formülasyonlarının 4T1 tümörlü BALB/c farelerde tümör büyümesini yavaşlattığı gösterilmiştir.

- LyP-1'in doksorubisin tedavisine eklenmesiyle, doksorubisinin antikanser etkinliğinde in vitro ve in vivo artış sağlanmıştır.

- İn vivo çalışmalarla peptidin formülasyon içerisinde uygulandığında mezenterik lenf nodu ve tümör dokularında daha yüksek oranda dağıldığı gösterilmiştir.

Bu tez çalışmasının sonunda; kendiliğinden emülsifiye olabilen sistemler içerisinde tümör dokusuna lenfatik yoldan hedeflendirilen LyP-1 peptidinin meme kanseri tedavisindeki potansiyeli gösterilmiştir. Söz konusu sistemler, kullanılan LyP-1 ve doksorubisin hidroklorür gibi etkin maddeler dışında, suda çözünürlük problemi olan etkin maddelerin taşınmasında da uygulanabilecek sistemler olup, kanser tedavisinde parenteral ve oral uygulama için alternatif formülasyon yaklaşımları olarak değerlendirilebilir.

İleriye yönelik çalışmalarda, tez kapsamında kullanılan LyP-1 peptidinin moleküler modelleme çalışmaları ile p32 reseptörüne etkin bir şekilde bağlanan analogları tasarlanarak antikanser etkisi güçlendirilmiş türevleri ile çalışmaların yürütülebilir. Ayrıca hazırlanan LyP-1 konjugatlarının in vivo davranışlarının değerlendirilmesi amacıyla meme kanseri tümör modelleri üzerinde çalışmalar gerçekleştirilebilir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Fogal V, Zhang L, Krajewski S, Ruoslahti E. Mitochondrial/cell-surface protein p32/gC1qR as a molecular target in tumor cells and tumor stroma. *Cancer research*. 2008;68(17):7210-8.
2. Hamzah J, Kotamraju VR, Seo JW, Agemy L, Fogal V, Mahakian LM, et al. Specific penetration and accumulation of a homing peptide within atherosclerotic plaques of apolipoprotein E-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(17):7154-9.
3. Ruoslahti E. Peptides as Targeting Elements and Tissue Penetration Devices for Nanoparticles. *Advanced Materials*. 2012;24(28):3747-56.
4. American Cancer Society: *Cancer Facts and Figures 2017*. Atlanta, Ga: American Cancer Society; 2017.
5. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2016;66(1):7-30.
6. World Health Organization, *Cancer Fact Sheet*. Updated February 2017.
7. T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Türkiye Kanser İstatistikleri. 2017.
8. Lukong KE. Understanding breast cancer - The long and winding road. *BBA clinical*. 2017;7:64-77.
9. Schaefer L, Reinhardt DP. Special issue: Extracellular matrix: Therapeutic tools and targets in cancer treatment. *Advanced drug delivery reviews*. 2016;97:1-3.
10. Marsh S, Liu G. Pharmacokinetics and pharmacogenomics in breast cancer chemotherapy. *Advanced drug delivery reviews*. 2009;61(5):381-7.
11. Perez-Herrero E, Fernandez-Medarde A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV*. 2015;93:52-79.

12. Lammers T, Kiessling F, Hennink WE, Storm G. Drug targeting to tumors: principles, pitfalls and (pre-) clinical progress. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2012;161(2):175-87.
13. Rosland GV, Engelsen AS. Novel points of attack for targeted cancer therapy. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*. 2015;116(1):9-18.
14. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
15. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
16. Ruoslahti E. Tumor penetrating peptides for improved drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*. 2016.
17. Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer research*. 1986;46(12 Pt 1):6387-92.
18. Torchilin VP. Drug targeting. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2000;11 Suppl 2:S81-91.
19. Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *Journal of Controlled Release*. 2000;65(1-2):271-84.
20. Xu X, Ho W, Zhang X, Bertrand N, Farokhzad O. Cancer nanomedicine: from targeted delivery to combination therapy. *Trends in molecular medicine*. 2015;21(4):223-32.
21. Bertrand N, Wu J, Xu X, Kamaly N, Farokhzad OC. Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Advanced drug delivery reviews*. 2014;66:2-25.
22. Byrne JD, Betancourt T, Brannon-Peppas L. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Advanced drug delivery reviews*. 2008;60(15):1615-26.
23. Torchilin VP, Lukyanov AN. Peptide and protein drug delivery to and into tumors: challenges and solutions. *Drug discovery today*. 2003;8(6):259-66.

24. Lammers T, Hennink WE, Storm G. Tumour-targeted nanomedicines: principles and practice. *British journal of cancer*. 2008;99(3):392-7.
25. Allen TM. Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nature Reviews Cancer*. 2002;2(10):750-63.
26. Wicki A, Witzigmann D, Balasubramanian V, Huwyler J. Nanomedicine in cancer therapy: challenges, opportunities, and clinical applications. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2015;200:138-57.
27. Sitohy B, Nagy JA, Dvorak HF. Anti-VEGF/VEGFR therapy for cancer: reassessing the target. *Cancer research*. 2012;72(8):1909-14.
28. Dalm SU, Sieuwerts AM, Look MP, Melis M, van Deurzen CH, Foekens JA, et al. Clinical Relevance of Targeting the Gastrin-Releasing Peptide Receptor, Somatostatin Receptor 2, or Chemokine C-X-C Motif Receptor 4 in Breast Cancer for Imaging and Therapy. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 2015;56(10):1487-93.
29. American Cancer Society, Targeted Therapy for Breast Cancer [Available from: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment/targeted-therapy-for-breast-cancer.html>].
30. Firer MA, Gellerman G. Targeted drug delivery for cancer therapy: the other side of antibodies. *J Hematol Oncol*. 2012;5:70.
31. Fosgerau K, Hoffmann T. Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug discovery today*. 2015;20(1):122-8.
32. Thundimadathil J. Cancer treatment using peptides: current therapies and future prospects. *J Amino Acids*. 2012;2012:967347.
33. Heitz F, Morris MC, Divita G. Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *British journal of pharmacology*. 2009;157(2):195-206.
34. Bolhassani A, Jafarzade BS, Mardani G. In vitro and in vivo delivery of therapeutic proteins using cell penetrating peptides. *Peptides*. 2017;87:50-63.

35. Farkhani SM, Valizadeh A, Karami H, Mohammadi S, Sohrabi N, Badrzadeh F. Cell penetrating peptides: Efficient vectors for delivery of nanoparticles, nanocarriers, therapeutic and diagnostic molecules. *Peptides*. 2014;57:78-94.
36. Laakkonen P, Porkka K, Hoffman JA, Ruoslahti E. A tumor-homing peptide with a targeting specificity related to lymphatic vessels. *Nature medicine*. 2002;8(7):751-5.
37. Laakkonen P, Akerman ME, Biliran H, Yang M, Ferrer F, Karpanen T, et al. Antitumor activity of a homing peptide that targets tumor lymphatics and tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(25):9381-6.
38. Sugahara KN, Teesalu T, Karmali PP, Kotamraju VR, Agemy L, Greenwald DR, et al. Coadministration of a tumor-penetrating peptide enhances the efficacy of cancer drugs. *Science*. 2010;328(5981):1031-5.
39. Sugahara KN, Teesalu T, Karmali PP, Kotamraju VR, Agemy L, Girard OM, et al. Tissue-Penetrating Delivery of Compounds and Nanoparticles into Tumors. *Cancer Cell*. 2009;16(6):510-20.
40. Teesalu T, Sugahara KN, Kotamraju VR, Ruoslahti E. C-end rule peptides mediate neuropilin-1-dependent cell, vascular, and tissue penetration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(38):16157-62.
41. Pang HB, Braun GB, Friman T, Aza-Blanc P, Ruidiaz ME, Sugahara KN, et al. An endocytosis pathway initiated through neuropilin-1 and regulated by nutrient availability. *Nature communications*. 2014;5.
42. Roth L, Agemy L, Kotamraju VR, Braun G, Teesalu T, Sugahara KN, et al. Transtumoral targeting enabled by a novel neuropilin-binding peptide. *Oncogene*. 2012;31(33):3754-63.
43. Roth L, Agemy L, Kotamraju VR, Braun G, Teesalu T, Sugahara KN, et al. Transtumoral targeting enabled by a novel neuropilin-binding peptide. *Oncogene*. 2012;31(33):3754-63.
44. Teesalu T, Sugahara KN, Ruoslahti E. Tumor-penetrating peptides. *Frontiers in oncology*. 2013;3:216.

45. Alberici L, Roth L, Sugahara KN, Agemy L, Kotamraju VR, Teesalu T, et al. De novo design of a tumor-penetrating peptide. *Cancer research*. 2013;73(2):804-12.
46. Yan Z, Zhan C, Wen Z, Feng L, Wang F, Liu Y, et al. LyP-1-conjugated doxorubicin-loaded liposomes suppress lymphatic metastasis by inhibiting lymph node metastases and destroying tumor lymphatics. *Nanotechnology*. 2011;22(41):415103.
47. Yan Z, Wang F, Wen Z, Zhan C, Feng L, Liu Y, et al. LyP-1-conjugated PEGylated liposomes: a carrier system for targeted therapy of lymphatic metastatic tumor. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2012;157(1):118-25.
48. Herringson TP, Altin JG. Effective tumor targeting and enhanced anti-tumor effect of liposomes engrafted with peptides specific for tumor lymphatics and vasculature. *International journal of pharmaceutics*. 2011;411(1-2):206-14.
49. Park JH, von Maltzahn G, Xu MJ, Fogal V, Kotamraju VR, Ruoslahti E, et al. Cooperative nanomaterial system to sensitize, target, and treat tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(3):981-6.
50. Seo JW, Baek H, Mahakian LM, Kusunose J, Hamzah J, Ruoslahti E, et al. (64)Cu-labeled LyP-1-dendrimer for PET-CT imaging of atherosclerotic plaque. *Bioconjugate chemistry*. 2014;25(2):231-9.
51. Lempens EH, Merckx M, Tirrell M, Meijer EW. Dendrimer display of tumor-homing peptides. *Bioconjugate chemistry*. 2011;22(3):397-405.
52. Yan F, Li X, Jiang C, Jin Q, Zhang Z, Shandas R, et al. A novel microfluidic chip for assessing dynamic adhesion behavior of cell-targeting microbubbles. *Ultrasound in medicine & biology*. 2014;40(1):148-57.
53. Yan F, Li X, Jin Q, Jiang C, Zhang Z, Ling T, et al. Therapeutic ultrasonic microbubbles carrying paclitaxel and LyP-1 peptide: preparation, characterization and application to ultrasound-assisted chemotherapy in breast cancer cells. *Ultrasound in medicine & biology*. 2011;37(5):768-79.
54. Li X, Jin Q, Chen T, Zhang B, Zheng R, Wang Z, et al. LyP-1 ultrasonic microbubbles targeting to cancer cell as tumor bio-acoustics markers or drug

carriers: targeting efficiency evaluation in, microfluidic channels. Conference proceedings : Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society IEEE Engineering in Medicine and Biology Society Annual Conference. 2009;2009:463-6.

55. Gursoy RN, Cevik O. Design, characterization and in vitro evaluation of SMEDDS containing an anticancer peptide, linear LyP-1. *Pharmaceutical development and technology*. 2014;19(4):486-90.

56. Li W, Peng J, Tan L, Wu J, Shi K, Qu Y, et al. Mild photothermal therapy/photodynamic therapy/chemotherapy of breast cancer by Lyp-1 modified Docetaxel/IR820 Co-loaded micelles. *Biomaterials*. 2016;106:119-33.

57. Wang Z, Yu Y, Ma J, Zhang H, Zhang H, Wang X, et al. LyP-1 modification to enhance delivery of artemisinin or fluorescent probe loaded polymeric micelles to highly metastatic tumor and its lymphatics. *Molecular pharmaceutics*. 2012;9(9):2646-57.

58. Yu X, Li A, Zhao C, Yang K, Chen X, Li W. Ultrasmall Semimetal Nanoparticles of Bismuth for Dual-Modal Computed Tomography/Photoacoustic Imaging and Synergistic Thermoradiotherapy. *ACS nano*. 2017;11(4):3990-4001.

59. Su CW, Yen CS, Chiang CS, Hsu CH, Chen SY. Multistage Continuous Targeting with Quantitatively Controlled Peptides on Chitosan-Lipid Nanoparticles with Multicore-Shell Nanoarchitecture for Enhanced Orally Administrated Anticancer In Vitro and In Vivo. *Macromol Biosci*. 2016.

60. Miao D, Jiang M, Liu Z, Gu G, Hu Q, Kang T, et al. Co-administration of dual-targeting nanoparticles with penetration enhancement peptide for antiglioblastoma therapy. *Molecular pharmaceutics*. 2014;11(1):90-101.

61. Uchida M, Kosuge H, Terashima M, Willits DA, Liepold LO, Young MJ, et al. Protein cage nanoparticles bearing the LyP-1 peptide for enhanced imaging of macrophage-rich vascular lesions. *ACS nano*. 2011;5(4):2493-502.

62. Luo G, Yu X, Jin C, Yang F, Fu D, Long J, et al. LyP-1-conjugated nanoparticles for targeting drug delivery to lymphatic metastatic tumors. *International journal of pharmaceutics*. 2010;385(1-2):150-6.



63. Karmali PP, Kotamraju VR, Kastantin M, Black M, Missirlis D, Tirrell M, et al. Targeting of albumin-embedded paclitaxel nanoparticles to tumors. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*. 2009;5(1):73-82.
64. von Maltzahn G, Ren Y, Park JH, Min DH, Kotamraju VR, Jayakumar J, et al. In vivo tumor cell targeting with "click" nanoparticles. *Bioconjugate chemistry*. 2008;19(8):1570-8.
65. Jiang YJ, Liu SJ, Zhang Y, Li HC, He H, Dai JT, et al. Magnetic mesoporous nanospheres anchored with LyP-1 as an efficient pancreatic cancer probe. *Biomaterials*. 2017;115:9-18.
66. Makela AR, Matilainen H, White DJ, Ruoslahti E, Oker-Blom C. Enhanced baculovirus-mediated transduction of human cancer cells by tumor-homing peptides. *Journal of virology*. 2006;80(13):6603-11.
67. Makela AR, Enback J, Laakkonen JP, Vihinen-Ranta M, Laakkonen P, Oker-Blom C. Tumor targeting of baculovirus displaying a lymphatic homing peptide. *J Gene Med*. 2008;10(9):1019-31.
68. Zhang F, Niu G, Lin X, Jacobson O, Ma Y, Eden HS, et al. Imaging tumor-induced sentinel lymph node lymphangiogenesis with LyP-1 peptide. *Amino acids*. 2012;42(6):2343-51.
69. Yu MM, Wang RF, Chen YH, Zhou HZ, Deng XH. Radiolabeling LyP-1 peptide and preliminary biodistribution evaluation in mice bearing MDA-MB-435 xenografts. *Chinese medical journal*. 2013;126(3):471-5.
70. Su CW, Yen CS, Chiang CS, Hsu CH, Chen SY. Multistage Continuous Targeting with Quantitatively Controlled Peptides on Chitosan-Lipid Nanoparticles with Multicore-Shell Nanoarchitecture for Enhanced Orally Administrated Anticancer In Vitro and In Vivo. *Macromol Biosci*. 2017;17(2).
71. Hu Q, Gu G, Liu Z, Jiang M, Kang T, Miao D, et al. F3 peptide-functionalized PEG-PLA nanoparticles co-administrated with tLyp-1 peptide for anti-glioma drug delivery. *Biomaterials*. 2013;34(4):1135-45.
72. Hamzah J, Kotamraju VR, Seo JW, Agemy L, Fogal V, Mahakian LM, et al. Specific penetration and accumulation of a homing peptide within atherosclerotic

plaques of apolipoprotein E-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(17):7154-9.

73. She ZG, Hamzah J, Kotamraju VR, Pang HB, Jansen S, Ruoslahti E. Plaque-penetrating peptide inhibits development of hypoxic atherosclerotic plaque. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2016;238:212-20.

74. Saharinen P, Tammela T, Karkkainen MJ, Alitalo K. Lymphatic vasculature: development, molecular regulation and role in tumor metastasis and inflammation. *Trends Immunol*. 2004;25(7):387-95.

75. Schmid-Schonbein GW. Microlymphatics and lymph flow. *Physiol Rev*. 1990;70(4):987-1028.

76. Munn LL, Padera TP. Imaging the lymphatic system. *Microvasc Res*. 2014;96:55-63.

77. McAllaster JD, Cohen MS. Role of the lymphatics in cancer metastasis and chemotherapy applications. *Advanced drug delivery reviews*. 2011;63(10-11):867-75.

78. Stacker SA, Achen MG, Jussila L, Baldwin ME, Alitalo K. Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nature reviews Cancer*. 2002;2(8):573-83.

79. Trevisan NL, Kaminski LM, Porter CJ. From sewer to saviour - targeting the lymphatic system to promote drug exposure and activity. *Nature reviews Drug discovery*. 2015;14(11):781-803.

80. Thomas SN, Schudel A. Overcoming transport barriers for interstitial-, lymphatic-, and lymph node-targeted drug delivery. *Curr Opin Chem Eng*. 2015;7:65-74.

81. Liu H, Moynihan KD, Zheng Y, Szeto GL, Li AV, Huang B, et al. Structure-based programming of lymph-node targeting in molecular vaccines. *Nature*. 2014;507(7493):519-22.

82. Guo Q, Liu Y, Xu K, Ren K, Sun W. Mouse lymphatic endothelial cell targeted probes: anti-LYVE-1 antibody-based magnetic nanoparticles. *International journal of nanomedicine*. 2013;8:2273-84.

83. Food and Drug Administration, Nanotechnology Fact Sheet, . 2015.
84. Hamburg MA. FDA's Approach to Regulation of Products of Nanotechnology. *Science*. 2012;336(6079):299-300.
85. Ehmann F, Sakai-Kato K, Duncan R, Hernan Perez de la Ossa D, Pita R, Vidal JM, et al. Next-generation nanomedicines and nanosimilars: EU regulators' initiatives relating to the development and evaluation of nanomedicines. *Nanomedicine (Lond)*. 2013;8(5):849-56.
86. Gray BP, McGuire MJ, Brown KC. A liposomal drug platform overrides peptide ligand targeting to a cancer biomarker, irrespective of ligand affinity or density. *PloS one*. 2013;8(8):e72938.
87. Hafner A, Lovric J, Lakos GP, Pepic I. Nanotherapeutics in the EU: an overview on current state and future directions. *International journal of nanomedicine*. 2014;9:1005-23.
88. European Medicines Agency, Medicines and Emerging Science, Nanotechnology, [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/special\\_topics/general/general\\_content\\_000345.jsp&mid=WC0b01ac05800baed9](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/special_topics/general/general_content_000345.jsp&mid=WC0b01ac05800baed9) [
89. Firer MA, Gellerman G. Targeted drug delivery for cancer therapy: the other side of antibodies. *Journal of hematology & oncology*. 2012;5:70.
90. Raha S, Paunesku T, Woloschak G. Peptide-mediated cancer targeting of nanoconjugates. *Wiley interdisciplinary reviews Nanomedicine and nanobiotechnology*. 2011;3(3):269-81.
91. Zhang P, Cheetham AG, Lock LL, Cui H. Cellular uptake and cytotoxicity of drug-peptide conjugates regulated by conjugation site. *Bioconjugate chemistry*. 2013;24(4):604-13.
92. Bob Forner JG. Peptide-drug conjugates:Types, utility & manufacturing. *Speciality Chemicals Magazine*. 2012:46-7.
93. Majumdar S, Siahaan TJ. Peptide-mediated targeted drug delivery. *Medicinal research reviews*. 2012;32(3):637-58.

94. Tai W, Shukla RS, Qin B, Li B, Cheng K. Development of a peptide-drug conjugate for prostate cancer therapy. *Molecular pharmaceutics*. 2011;8(3):901-12.
95. Panowski S, Bhakta S, Raab H, Polakis P, Junutula JR. Site-specific antibody drug conjugates for cancer therapy. *mAbs*. 2014;6(1):34-45.
96. Scott AM, Wolchok JD, Old LJ. Antibody therapy of cancer. *Nature reviews Cancer*. 2012;12(4):278-87.
97. Feng Y, Zhu Z, Chen W, Prabakaran P, Lin K, Dimitrov DS. Conjugates of Small Molecule Drugs with Antibodies and Other Proteins. *Biomedicines*. 2014;2(1):1-13.
98. Drake PM, Rabuka D. An emerging playbook for antibody-drug conjugates: lessons from the laboratory and clinic suggest a strategy for improving efficacy and safety. *Current opinion in chemical biology*. 2015;28:174-80.
99. Li ZJ, Cho CH. Peptides as targeting probes against tumor vasculature for diagnosis and drug delivery. *J Transl Med*. 2012;10.
100. Patil V, Gada K, Panwar R, Majewski S, Tekabe Y, Varvarigou A, et al. In vitro demonstration of enhanced prostate cancer toxicity: pretargeting with Bombesin bispecific complexes and targeting with polymer-drug-conjugates. *Journal of drug targeting*. 2013;21(10):1012-21.
101. Pouton CW. Lipid formulations for oral administration of drugs: non-emulsifying, self-emulsifying and 'self-microemulsifying' drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2000;11:S93-S8.
102. Pouton CW. Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: Physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2006;29(3-4):278-87.
103. Pouton CW, Porter CJ. Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: materials, methods and strategies. *Advanced drug delivery reviews*. 2008;60(6):625-37.
104. Jannin V, Musakhanian J, Marchaud D. Approaches for the development of solid and semi-solid lipid-based formulations. *Advanced drug delivery reviews*. 2008;60(6):734-46.

105. Rahman MA, Hussain A, Hussain MS, Mirza MA, Iqbal Z. Role of excipients in successful development of self-emulsifying/microemulsifying drug delivery system (SEDDS/SMEDDS). *Drug development and industrial pharmacy*. 2013;39(1):1-19.
106. Wakerly MG, Pouton CW, Meakin BJ, Morton FS. Self-Emulsification of Vegetable Oil-Nonionic Surfactant Mixtures - a Proposed Mechanism of Action. *ACS Sym Ser*. 1986;311:242-55.
107. Gursoy RN, Benita S. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2004;58(3):173-82.
108. Pouton CW. Formulation of self-emulsifying drug delivery systems. *Advanced drug delivery reviews*. 1997;25(1):47-58.
109. Gibaud S, Attivi D. Microemulsions for oral administration and their therapeutic applications. *Expert opinion on drug delivery*. 2012;9(8):937-51.
110. Mason TG, Wilking JN, Meleson K, Chang CB, Graves SM. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. *J Phys-Condens Mat*. 2006;18(41):R635-R66.
111. Date AA, Desai N, Dixit R, Nagarsenker M. Self-nanoemulsifying drug delivery systems: formulation insights, applications and advances. *Nanomedicine (Lond)*. 2010;5(10):1595-616.
112. McClements DJ. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter*. 2012;8(6):1719-29.
113. Chatterjee B, Hamed Almurisi S, Ahmed Mahdi Dukhan A, Mandal UK, Sengupta P. Controversies with self-emulsifying drug delivery system from pharmacokinetic point of view. *Drug Deliv*. 2016;23(9):3639-52.
114. Cerpnjak K, Zvonar A, Gasperlin M, Vrecer F. Lipid-based systems as a promising approach for enhancing the bioavailability of poorly water-soluble drugs. *Acta pharmaceutica*. 2013;63(4):427-45.
115. Tang B, Cheng G, Gu JC, Xu CH. Development of solid self-emulsifying drug delivery systems: preparation techniques and dosage forms. *Drug discovery today*. 2008;13(13-14):606-12.

116. Constantinides PP. Lipid microemulsions for improving drug dissolution and oral absorption: physical and biopharmaceutical aspects. *Pharmaceutical research*. 1995;12(11):1561-72.
117. Lopez-Montilla JC, Herrera-Morales PE, Pandey S, Shah DO. Spontaneous emulsification: Mechanisms, physicochemical aspects, modeling, and applications. *J Disper Sci Technol*. 2002;23(1-3):219-68.
118. Shahidzadeh N, Bonn D, Aguerre-Chariol O, Meunier J. Spontaneous emulsification: relation to microemulsion phase behaviour. *Colloid Surface A*. 1999;147(3):375-80.
119. Miller CA. Spontaneous Emulsification Produced by Diffusion - A Review. *Colloids and Surfaces*. 1988;29:89-102.
120. Camilla Sander PH. Porous Magnesium Aluminometasilicate Tablets as Carrier of a Cyclosporine Self-Emulsifying Formulation. *AAPS PharmSciTech*. 2009;10(4):1388-95.
121. Tan A, Rao S, Prestidge CA. Transforming lipid-based oral drug delivery systems into solid dosage forms: an overview of solid carriers, physicochemical properties, and biopharmaceutical performance. *Pharmaceutical research*. 2013;30(12):2993-3017.
122. Mandic J, Zvonar Pobirk A, Vrecer F, Gasperlin M. Overview of solidification techniques for self-emulsifying drug delivery systems from industrial perspective. *International journal of pharmaceutics*. 2017.
123. Chen Y, Chen C, Zheng J, Chen Z, Shi Q, Liu H. Development of a solid supersaturatable self-emulsifying drug delivery system of docetaxel with improved dissolution and bioavailability. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2011;34(2):278-86.
124. Chen Y, Zhang GG, Neilly J, Marsh K, Mawhinney D, Sanzgiri YD. Enhancing the bioavailability of ABT-963 using solid dispersion containing Pluronic F-68. *International journal of pharmaceutics*. 2004;286(1-2):69-80.
125. Yan YD, Kim JA, Kwak MK, Yoo BK, Yong CS, Choi HG. Enhanced oral bioavailability of curcumin via a solid lipid-based self-emulsifying drug delivery

system using a spray-drying technique. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2011;34(8):1179-86.

126. Oh DH, Kang JH, Kim DW, Lee BJ, Kim JO, Yong CS, et al. Comparison of solid self-microemulsifying drug delivery system (solid SMEDDS) prepared with hydrophilic and hydrophobic solid carrier. *International journal of pharmaceutics*. 2011;420(2):412-8.

127. Balakrishnan P, Lee BJ, Oh DH, Kim JO, Hong MJ, Jee JP, et al. Enhanced oral bioavailability of dexibuprofen by a novel solid self-emulsifying drug delivery system (SEDDS). *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV*. 2009;72(3):539-45.

128. Wang Z, Sun J, Wang Y, Liu X, Liu Y, Fu Q, et al. Solid self-emulsifying nitrendipine pellets: preparation and in vitro/in vivo evaluation. *International journal of pharmaceutics*. 2010;383(1-2):1-6.

129. Dollo G, Le Corre P, Guerin A, Chevanne F, Burgot JL, Leverge R. Spray-dried redispersible oil-in-water emulsion to improve oral bioavailability of poorly soluble drugs. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2003;19(4):273-80.

130. Hansen T, Holm P, Schultz K. Process characteristics and compaction of spray-dried emulsions containing a drug dissolved in lipid. *International journal of pharmaceutics*. 2004;287(1-2):55-66.

131. Cho W, Kim MS, Kim JS, Park J, Park HJ, Cha KH, et al. Optimized formulation of solid self-microemulsifying sirolimus delivery systems. *International journal of nanomedicine*. 2013;8:1673-82.

132. Gupta S, Kesarla R, Omri A. Formulation strategies to improve the bioavailability of poorly absorbed drugs with special emphasis on self-emulsifying systems. *ISRN Pharm*. 2013;2013:848043.

133. Porter CJH, Charman WN. Uptake of drugs into the intestinal lymphatics after oral administration. *Advanced drug delivery reviews*. 1997;25(1):71-89.

134. Prajapati HN, Dalrymple DM, Serajuddin AT. A comparative evaluation of mono-, di- and triglyceride of medium chain fatty acids by lipid/surfactant/water

phase diagram, solubility determination and dispersion testing for application in pharmaceutical dosage form development. *Pharmaceutical research*. 2012;29(1):285-305.

135. Cerpnjak K, Zvonar A, Gasperlin M, Vrecer F. Lipid-based systems as a promising approach for enhancing the bioavailability of poorly water-soluble drugs. *Acta pharmaceutica*. 2013;63(4):427-45.

136. Guo Y, Luo J, Tan S, Otieno BO, Zhang Z. The applications of Vitamin E TPGS in drug delivery. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2013;49(2):175-86.

137. Strickley RG. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. *Pharmaceutical research*. 2004;21(2):201-30.

138. Feeney OM, Crum MF, McEvoy CL, Trevaskis NL, Williams HD, Pouton CW, et al. 50 years of oral lipid-based formulations: Provenance, progress and future perspectives. *Advanced drug delivery reviews*. 2016;101:167-94.

139. Gao P, Akrami A, Alvarez F, Hu J, Li L, Ma C, et al. Characterization and optimization of AMG 517 supersaturatable self-emulsifying drug delivery system (S-SEDDS) for improved oral absorption. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2009;98(2):516-28.

140. Tang J, Sun J, Cui F, Zhang T, Liu X, He Z. Self-emulsifying drug delivery systems for improving oral absorption of ginkgo biloba extracts. *Drug Deliv*. 2008;15(8):477-84.

141. Wei L, Sun P, Nie S, Pan W. Preparation and evaluation of SEDDS and SMEDDS containing carvedilol. *Drug development and industrial pharmacy*. 2005;31(8):785-94.

142. Singh A, Worku ZA, Van den Mooter G. Oral formulation strategies to improve solubility of poorly water-soluble drugs. *Expert opinion on drug delivery*. 2011;8(10):1361-78.

143. Leonaviciute G, Bernkop-Schnurch A. Self-emulsifying drug delivery systems in oral (poly)peptide drug delivery. *Expert opinion on drug delivery*. 2015;12(11):1703-16.



144. Singh B, Beg S, Khurana RK, Sandhu PS, Kaur R, Katare OP. Recent advances in self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS). *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 2014;31(2):121-85.
145. Tan A, Rao S, Prestidge CA. Transforming Lipid-Based Oral Drug Delivery Systems into Solid Dosage Forms: An Overview of Solid Carriers, Physicochemical Properties, and Biopharmaceutical Performance. *Pharmaceutical research*. 2013;30(12):2993-3017.
146. Ma EL, Ma H, Liu Z, Zheng GX, Duan MX. In vitro and in vivo evaluation of a novel oral insulin formulation. *Acta pharmacologica Sinica*. 2006;27(10):1382-8.
147. Qi X, Wang L, Zhu J, Hu Z, Zhang J. Self-double-emulsifying drug delivery system (SDEDDS): a new way for oral delivery of drugs with high solubility and low permeability. *International journal of pharmaceutics*. 2011;409(1-2):245-51.
148. Cherniakov I, Domb AJ, Hoffman A. Self-nano-emulsifying drug delivery systems: an update of the biopharmaceutical aspects. *Expert opinion on drug delivery*. 2015;12(7):1121-33.
149. Lo JT, Chen BH, Lee TM, Han J, Li JL. Self-emulsifying O/W formulations of paclitaxel prepared from mixed nonionic surfactants. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2010;99(5):2320-32.
150. Borhade VB, Nair HA, Hegde DD. Development and characterization of self-microemulsifying drug delivery system of tacrolimus for intravenous administration. *Drug development and industrial pharmacy*. 2009;35(5):619-30.
151. Kollner S, Nardin I, Markt R, Griesser J, Prufert F, Bernkop-Schnurch A. Self-emulsifying drug delivery systems: Design of a novel vaginal delivery system for curcumin. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV*. 2017;115:268-75.
152. Wang Q, Hu C, Zhang H, Zhang Y, Liu T, Qian A, et al. Evaluation of a new solid non-aqueous self-double-emulsifying drug-delivery system for topical application of quercetin. *J Microencapsul*. 2016;33(8):785-94.
153. Brownlow B, Nagaraj VJ, Nayel A, Joshi M, Elbayoumi T. Development and In Vitro Evaluation of Vitamin E-Enriched Nanoemulsion Vehicles Loaded with

Genistein for Chemoprevention Against UVB-Induced Skin Damage. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2015;104(10):3510-23.

154. Cao J, Cui S, Li S, Du C, Tian J, Wan S, et al. Targeted cancer therapy with a 2-deoxyglucose-based adriamycin complex. *Cancer research*. 2013;73(4):1362-73.

155. Li X, Huang Q, Xiao J, Liu G, Dou S, Rusckowski M, et al. Novel DNA Polymer for Amplification Pretargeting. *ACS medicinal chemistry letters*. 2015;6(9):972-6.

156. Sharkey RM, Chang CH, Rossi EA, McBride WJ, Goldenberg DM. Pretargeting: taking an alternate route for localizing radionuclides. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2012;33(3):591-600.

157. Egusquiaguirre SP, Manguan-Garcia C, Perona R, Pedraz JL, Hernandez RM, Igartua M. Development and validation of a rapid HPLC method for the quantification of GSE4 peptide in biodegradable PEI-PLGA nanoparticles. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2014;972:95-101.

158. Technologies A. Logical Method Development for Peptides and Proteins Using RP-HPLC and SEC.

159. Aguilar MI. HPLC of peptides and proteins: basic theory and methodology. *Methods in molecular biology*. 2004;251:3-8.

160. Harmonisation TICo. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). 1996.

161. Acartürk F. Reaksiyon Kinetiği ve Stabilite. In: Füsün Acartürk İA, Nevin Çelebi, Tuncer Değim, Zelihagül Değim, Tanver Doğanay, Sevgi Takka, Figen Tırnaksız, editor. *Modern Farmasötik Teknoloji*. 2 ed2009.

162. Workman P, Aboagye EO, Balkwill F, Balmain A, Bruder G, Chaplin DJ, et al. Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *British journal of cancer*. 2010;102(11):1555-77.

163. Laakkonen P, Akerman ME, Biliran H, Yang M, Ferrer F, Karpanen T. Antitumor activity of a homing peptide that targets tumor lymphatics and tumor cells. *Proceedings of National Academy of Sciences*. 2004;101 (25),(25):9381-6.

164. Tarasenko N, Cutts SM, Phillips DR, Inbal A, Nudelman A, Kessler-Icekson G, et al. Disparate impact of butyroyloxymethyl diethylphosphate (AN-7), a histone deacetylase inhibitor, and doxorubicin in mice bearing a mammary tumor. *PloS one*. 2012;7(2):e31393.
165. Bao L, Haque A, Jackson K, Hazari S, Moroz K, Jetly R, et al. Increased expression of P-glycoprotein is associated with doxorubicin chemoresistance in the metastatic 4T1 breast cancer model. *Am J Pathol*. 2011;178(2):838-52.
166. Amrita Datta DM. Development of Mouse Models for Cancer Research. In: Ashish Verma AS, editor. *Animal Biotechnology:Models in Discovery and Translation*: Elsevier; 2014.
167. Fogal V, Zhang L, Krajewski S, Ruoslahti E. Mitochondrial/cell-surface protein p32/gC1qR as a molecular target in tumor cells and tumor stroma. *Cancer research*. 2008;68(17):7210-8.
168. Gad SC. *Pharmaceutical manufacturing handbook : production and processes*. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience; 2008. xiii, 1370 p. p.
169. Madani F, Lindberg S, Langel U, Futaki S, Graslund A. Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. *Journal of biophysics*. 2011;2011:414729.
170. Zhang XY, Lu WY. Recent advances in lymphatic targeted drug delivery system for tumor metastasis. *Cancer Biol Med*. 2014;11(4):247-54.
171. Ali Khan A, Mudassir J, Mohtar N, Darwis Y. Advanced drug delivery to the lymphatic system: lipid-based nanoformulations. *International journal of nanomedicine*. 2013;8:2733-44.
172. Xie Y, Bagby TR, Cohen MS, Forrest ML. Drug delivery to the lymphatic system: importance in future cancer diagnosis and therapies. *Expert opinion on drug delivery*. 2009;6(8):785-92.
173. Chanana GD, Sheth BB. Particle size reduction of emulsions by formulation design-II: effect of oil and surfactant concentration. *PDA J Pharm Sci Technol*. 1995;49(2):71-6.
174. Lamm MS, DiNunzio J, Khawaja NN, Crocker LS, Pecora A. Assessing Mixing Quality of a Copovidone-TPGS Hot Melt Extrusion Process with Atomic Force

Microscopy and Differential Scanning Calorimetry. *AAPS PharmSciTech*. 2016;17(1):89-98.

175. Hassan M. A. E-SHM. Enhancement of dissolution and the anti-inflammatory effect of nimesulide, using liquisolid compact for oral application. *Bulletin of Pharmaceutical Sciences*. 2011;34(1):1-8.

176. Grabarek Z, Gergely J. Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters. *Analytical biochemistry*. 1990;185(1):131-5.

177. AB PFC. A gel filtration experiment. *Biochemical Education*. 1974;2(4):65-7.

178. Vikas K. Sharma DSK. Experimental Detection and Characterization of Protein Aggregates. In: Wei Wang CJR, editor. *Aggregation of Therapeutic Proteins* 2010.

179. Huang HL, Hsing HW, Lai TC, Chen YW, Lee TR, Chan HT, et al. Trypsin-induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells. *J Biomed Sci*. 2010;17:36.

180. Carrods NL, Teng KS, Munro KM, Kennedy MJ, Gunnensen JM. Differential labeling of cell-surface and internalized proteins after antibody feeding of live cultured neurons. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2014(84):e51139.

181. Anthis NJ, Clore GM. Sequence-specific determination of protein and peptide concentrations by absorbance at 205 nm. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 2013;22(6):851-8.

182. Johnson D, Boyes B, Orlando R. The use of ammonium formate as a mobile-phase modifier for LC-MS/MS analysis of tryptic digests. *J Biomol Tech*. 2013;24(4):187-97.

183. Chen Y, Mehok AR, Mant CT, Hodges RS. Optimum concentration of trifluoroacetic acid for reversed-phase liquid chromatography of peptides revisited. *Journal of chromatography A*. 2004;1043(1):9-18.

184. You J, Wang L, Saji M, Olesik SV, Ringel MD, Lucas DM, et al. High-sensitivity TFA-free LC-MS for profiling histones. *Proteomics*. 2011;11(16):3326-34.

185. Bogdanowich-Knipp SJ, Chakrabarti S, Williams TD, Dillman RK, Siahaan TJ. Solution stability of linear vs. cyclic RGD peptides. *J Pept Res*. 1999;53(5):530-41.

186. He HT, Gursoy RN, Kupczyk-Subotkowska L, Tian J, Williams T, Siahaan TJ. Synthesis and chemical stability of a disulfide bond in a model cyclic pentapeptide: cyclo(1,4)-Cys-Gly-Phe-Cys-Gly-OH. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2006;95(10):2222-34.
187. Çevik Ö. Kanser Tedavisinde Solid Tümörlere Lenfatik Hedeflendirme Amacıyla LyP-1 Peptidini İçeren İlaç Taşıyıcı Nanosistemlerin Tasarımı ve İn vitro Değerlendirilmesi. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2012.
188. Zupancic O, Griessinger JA, Lam HT, Bernkop-Schnurch A. Storage Stability of Bivalirudin: Hydrophilic Versus Lipophilic Solutions. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2017;106(5):1322-30.
189. Fallingborg J. Intraluminal pH of the human gastrointestinal tract. *Dan Med Bull*. 1999;46(3):183-96.
190. Hubatsch I, Ragnarsson EG, Artursson P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nature protocols*. 2007;2(9):2111-9.
191. Collnot EM, Baldes C, Wempe MF, Hyatt J, Navarro L, Edgar KJ, et al. Influence of vitamin E TPGS poly(ethylene glycol) chain length on apical efflux transporters in Caco-2 cell monolayers. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2006;111(1-2):35-40.
192. Sachs-Barrable K, Thamboo A, Lee SD, Wasan KM. Lipid Excipients Peceol and Gelucire 44/14 decrease P-glycoprotein mediated efflux of Rhodamine 123 partially due to modifying P-glycoprotein protein expression within Caco-2 Cells. *J Pharm Pharm Sci*. 2007;10(3):319-31.
193. Taherian A, Mazoochi T. Different Expression of Extracellular Signal-Regulated Kinases (ERK) 1/2 and Phospho-Erk Proteins in MBA-MB-231 and MCF-7 Cells after Chemotherapy with Doxorubicin or Docetaxel. *Iran J Basic Med Sci*. 2012;15(1):669-77.
194. Neumann E, Riepl B, Knedla A, Lefevre S, Tarner IH, Grifka J, et al. Cell culture and passaging alters gene expression pattern and proliferation rate in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(3):R83.
195. ATCC. Passage Number Effects in Cell Lines. 2010.

196. Timur SS, Yalcin G, Cevik O, Andac C, Gursoy RN. Molecular dynamics, thermodynamic, and mutational binding studies for tumor-specific LyP-1 in complex with p32. *Journal of biomolecular structure & dynamics*. 2017;1-11.
197. Kau P, Nagaraja GM, Zheng HY, Gizachew D, Galukande M, Krishnan S, et al. A mouse model for triple-negative breast cancer tumor-initiating cells (TNBC-TICs) exhibits similar aggressive phenotype to the human disease. *BMC cancer*. 2012;12.
198. Tao K, Fang M, Alroy J, Sahagian GG. Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. *BMC cancer*. 2008;8.
199. Alberici L, Roth L, Sugahara KN, Agemy L, Kotamraju VR, Teesalu T, et al. De Novo Design of a Tumor-Penetrating Peptide. *Cancer research*. 2013;73(2):804-12.
200. Turner PV, Pekow C, Vasbinder MA, Brabb T. Administration of substances to laboratory animals: equipment considerations, vehicle selection, and solute preparation. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2011;50(5):614-27.
201. Agemy L, Kotamraju VR, Friedmann-Morvinski D, Sharma S, Sugahara KN, Ruoslahti E. Proapoptotic peptide-mediated cancer therapy targeted to cell surface p32. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2013;21(12):2195-204.

## 8. EKLER

## EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni



**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU**

06100 Sıhhiye-Ankara  
Telefon: 0 (312) 305 1090-1082 • Faks: 0 (312) 310 0580  
www.etikkurul.hacettepe.edu.tr/index\_hdk.php

Sayı: B.30.2.HAC.0.05.06.00/03

24 Şubat 2012

## HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 20.02.2012 (PAZARTESİ)
TOPLANTI SAYISI	: 2012/02
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 2012/14
KARAR NUMARASI	: 2012/14-11
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Doç. Dr. R. Neslihan Gürsoy
HAYVAN DENEYLERİNDEN	
SORUMLU ARAŞTIRMACI	: Doç. Dr. Güneş Esendağlı
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	: Selin Seda Doğan
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	: 56 Adet Balb/c Fare

Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. R. Neslihan Gürsoy'un hayvan deneylerinden sorumlu araştırmacısı olduğu 2012/14 dosya numaralı ve "*Meme Kanseri Tedavisinde Aktif Hedeflendirme Amacıyla Kullanılmak Üzere Nano Boyutlu Sistemlerin (Nanofarmasötikler) Tasarımı, In Vitro ve In Vivo Değerlendirilmesi*" isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir.

Sorumlu araştırmacı deneylere başlangıç tarihini Etik Kurula bildirmekle yükümlüdür

Prof. Dr. Ömer Uğur  
Etik Kurul Başkanı

## EK-2: Tez Çalışması ile İlgili Bildiriler ve Yayınlar

Pharm Res  
DOI 10.1007/s11095-016-2066-2



RESEARCH PAPER

## Design and *In Vitro* Evaluation of Bispecific Complexes and Drug Conjugates of Anticancer Peptide, LyP-1 in Human Breast Cancer

Selin Seda Timur<sup>1</sup> • Prashant Bhattarai<sup>2</sup> • Reyhan Neslihan Gürsoy<sup>1</sup> • İmran Vural<sup>1</sup> • Ban-An Khaw<sup>2</sup>

Received: 20 July 2016 / Accepted: 8 November 2016  
© Springer Science+Business Media New York 2016

### ABSTRACT

**Purpose** LyP-1, a nine-amino-acid tumor homing peptide, selectively binds to its cognate receptor, p32. Overexpression of p32 in certain tumors should allow use of LyP-1 as a targeting agent for the delivery of therapeutic or diagnostic agents. Peptide conjugates are developed for enhanced pre-targeting of MDA-MB-231 breast cancer cells with peptide-antibody bispecific complexes and targeting with multiple-drug/-fluorophore-conjugated nano-polymers.

**Methods** LyP-1-anti-DTPA bispecific antibody complexes (LyP-1-bsAbCx) were generated by conjugation of anti-DTPA antibody and LyP-1. LyP-1-doxorubicin (Dox), Dox-DTPA-succinyl-polylysine (Dox-DSPL), Dox-DSPL-LyP-1, DTPA-Dox-poly glutamic acid (D-Dox-PGA) or DTPA-rhodamine conjugated polylysine (DSPL-RITC) were prepared. *In vitro* therapeutic efficacy and targeting by immunofluorescence in MDA-MB-231 breast cancer cells were assessed with Dox-LyP-1. Immunofluorescence visualization of cancer cells was evaluated after pre-targeting with LyP-1-bsAbCx and targeting with DSPL-RITC.

**Results** Cytotoxicity of Dox-LyP-1 conjugates was significantly greater than free doxorubicin ( $p < 0.0001$ ). For fluorescently labeled LyP-1, internalization occurred in 30 min in tumor cells. Fluorescence intensity of two-step targeted cells showed that pre-targeting with LyP-1-bsAbCx, followed by targeting with DSPL-RITC was greater than non-pre-targeted DSPL-RITC ( $p < 0.05$ ).

**Conclusions** Peptide-conjugates are effective targeting agents for MDA-MB-231 breast cancer cells in culture. LyP-1-bsAbCx and Dox-LyP-1 conjugates may allow development of novel targeted cancer therapy and diagnosis.

**KEY WORDS** peptide-antibody bispecific complexes · polymer pro-drug conjugates · pre-targeted drug targeting

### ABBREVIATIONS

ADC	Antibody-drug-conjugates
D-Dox-PGA	Doxorubicin conjugated N-terminal DTPA conjugated PGA
DMF	Dimethylformamide
Dox	Doxorubicin hydrochloride
Dox-DSPL	Dox-DTPA-succinyl-polylysine
Dox-DSPL-LyP-1	LyP-1 conjugated to Dox-DSPL
Dox-LyP-1	LyP-1 conjugated with doxorubicin hydrochloride
D-PGA	N-terminal DTPA conjugated PGA
DPL	DTPA-poly-L-lysine
D-PL-LyP-1-Dox	DTPA conjugated poly-L-lysine conjugated with LyP-1 and Dox
DPL-RITC	RITC conjugated DPL
DSPL-LyP-1	LyP-1 conjugated to DSPL
DSPL-RITC	DTPA-succinyl rhodamine conjugated poly-L-lysine
DTPA	Diethylenetriaminepentaacetic acid
DTPA-BSA	DTPA conjugated bovine serum albumin
GAM-HRP	Goat anti-mouse IgG antibody conjugated with HRP
LyP-1	9 amino acid peptide ligand specific for mitochondrial membrane receptor p32.

✉ Ban-An Khaw  
b.khaw@neu.edu

<sup>1</sup> Pharmaceutical Technology Department, Faculty of Pharmacy, Hacettepe University, Ankara, Turkey

<sup>2</sup> Department of Pharmaceutical Sciences, School of Pharmacy, Bouve College of Health Sciences, Northeastern University, 360 Huntington Ave, Boston, Massachusetts, USA



M1138



## Design and Optimization of Solid SMEDDS for a Lymphatic Targeting Peptide, LyP-1

Selin Seda Doğan, R. Neslihan Gürsoy

Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, Ankara-TURKEY  
E-mail: selins.dogan@gmail.com, ngursoy@hacettepe.edu.tr



### ABSTRACT

**Purpose**  
The purpose of the present work was to design liquid and solid SMEDDS (Self-Microemulsifying Drug Delivery System) formulations for the lymphatic delivery of LyP-1.

**Methods**  
Preformulation studies were carried out with Labrasol®, Gelucire® 44/14, Labrafili®, D- $\alpha$ -tocopheryl polyethylene glycol succinate (TPGS) and Tween 80 as surfactants; Pecosol™, Malsine™, soybean oil, sunflower oil and alpha tocopherol as oil phase and polyethylene glycol 300, propylene glycol and Transcutol® as cosolvent to determine the optimum formulation components for the SMEDDS. Ternary phase diagrams were constructed to determine the suitable areas for nano/microemulsion formation. Suitable formulations were characterized for droplet size and zeta potential using Dynamic Light Scattering (DLS) method (Malvern Zetasizer Nanoseries, UK). Selected formulations were solidified using spray drying method (Büchi Mini Spray Dryer, Switzerland).

**Results**  
Optimum SMEDDS formulations were obtained using Pecosol as the oil phase, TPGS: Labrasol (1:5) mixture as the surfactant, and propylene glycol as the cosolvent. For the evaluation of excipient ratios, the oil phase (5-80%), surfactant (10- 80%) and cosolvent (5-80%) were mixed homogeneously on a 55 °C water bath leading to clear mixture and left at room temperature for 24 h before dilution with deionized water (1:10). Stable formulations were selected for further studies. Zeta potential values were found close to zero due to the nonionic surfactants. After two week of stability evaluation, the formulations containing Pecosol (N3) as the oil phase, TPGS: Labrasol (1:5) (N50-45) mixture as the surfactant, and propylene glycol (N30-45) as the cosolvent had 17.84±2.24 nm droplet size with 0.21±0.05 PDI. Solid formulations were obtained by spray drying using 0.5 % Aerosil in ethanol as adsorbent. Resulting solid formulations had droplet size of 15.12±3.03 nm after dilution.

**Conclusion**  
Suitable SMEDDS formulations were designed and optimized for further solid SEDDS formulations of the anti-cancer peptide, LyP-1.

**Acknowledgment:** This project is supported by TUBITAK (The Scientific and Technological Research Council of Turkey), grant number: SBAG 1002-1135569.

### PURPOSE

The purpose of the present work was to design liquid and solid SMEDDS (Self-Microemulsifying Drug Delivery System) formulations for the lymphatic delivery of LyP-1.

### METHODS



Table 1. Formulation components of pre-formulation studies

Formulation	Surfactant	Oil	Cosurfactant
T1	TPGS: Labrasol (1:5)	Pecosol	PEG 300
T2	TPGS: Labrasol (1:5)	Malsine	PEG 300
T3	Labrasol: Tween 80 (1:1)	Malsine	Propylene glycol
T4	Labrasol: Tween 80 (1:1)	Pecosol	PEG 300
T5	Labrasol: Gelucire (1:2)	Malsine	Transcutol®P
T6	Labrasol: Gelucire (1:2)	Soybean oil	PEG 300
T7	Labrasol: Gelucire (1:2)	Alpha tocopherol	PEG 300
T8	TPGS: Gelucire (1:5)	Malsine	PEG 300
T9	TPGS: Labrasol (1:5)	Pecosol	Propylene glycol
T10	Labrasol: Tween 80 (1:1)	Sunflower oil	PEG 300
T11	Labrafili M1944: Gelucire (1:5)	Pecosol	PEG 300
T12	Labrafili: Tween 80 (1:1)	Pecosol	PEG 300

Figure 1. Preparation of liquid SMEDDS formulations

### Preparation of Liquid Formulations

Preformulation studies were carried out with Labrasol®, Gelucire® 44/14, Labrafili® M1944, D- $\alpha$ -tocopheryl polyethylene glycol succinate (TPGS) and Tween 80 as surfactant; Pecosol™, Malsine™, soybean oil, sunflower oil and alpha tocopherol as oil phase and polyethylene glycol 300, propylene glycol and Transcutol® as cosolvent to determine the optimum formulation components for the SMEDDS. The suitable excipients were determined according to the droplet size and zeta potential of the formulations which had constant components for oil, cosolvent and surfactant as N5, N35 and N60 respectively. 10 formulation points for each 12 mixtures were studied for the construction of further ternary phase diagrams. The suitable formulation mixtures were selected after evaluation of four suitable ternary phase diagrams with 49 formulation points for each diagram.

### Preparation of Solid Formulations

The stable liquid formulations, which were selected after the determination of the droplet size and zeta potential for two weeks, were solidified with spray drying or lyophilization methods. For the lyophilization, mannitol (N20), lactose (N10), Aerosil®(N3) and Neusilin U2®(N3) were used as adsorbent. The selected formulations were spray-dried with % 0.5 of Aerosil® and Neusilin U2® in ethanol or lyophilized with mannitol (N20), lactose (N10), Aerosil®(N3) and Neusilin U2®(N3).

### Characterization of Formulations

**Physical Stability**  
The physical stability of formulations was investigated in terms of physical appearance, color, phase separation and turbidity during two weeks.

**Droplet Size and Zeta Potential Analysis**  
Physically stable blank formulations were analyzed in terms of droplet size and zeta potential utilizing a Malvern Zetasizer Nanoseries Nano ZS (UK) for two weeks (n=3).

**Morphological analysis**  
The formulations were evaluated using polarized light microscopy (Leica DM EP, Germany) for the possibility of liquid crystal structures that give specific anisotropic images under polarized light.

## RESULTS

### Characterization – Liquid SMEDDS

Table 2. Droplet size, PDI and zeta potential values of stable liquid SMEDDS formulations. The data are given as "Mean±S.D" (n=3)

Formulation	Time (day)	Droplet size (d.nm)	PDI	Zeta Potential (mV)
T8-F21	0	14.66±0.06	0.16±0.02	-0.09±0.03
	1	15.81±0.29	0.18±0.01	-0.81±0.74
	7	16.59±0.26	0.22±0.01	0.66±0.65
	14	25.92±0.19	0.47±0.01	0.18±0.84
	1p-1	26.24±0.29	0.57±0.01	-0.67±0.39
T9-F17	0	17.23±0.12	0.17±0.01	0.18±0.03
	1	16.97±0.06	0.17±0.01	0.76±0.65
	7	17.98±0.06	0.22±0.01	-0.19±0.85
	14	18.11±0.17	0.26±0.01	0.61±0.68
	1p-1	14.95±0.09	0.12±0.01	-1.02±0.36
T10-F21	0	15.38±0.08	0.11±0.01	0.78±2.5
	1	15.15±0.04	0.12±0.01	-0.22±0.38
	7	17.18±0.02	0.22±0.01	-1.02±0.7
	14	15.64±0.27	0.16±0.03	-0.91±1.13
	1p-1	25.01±1.53	0.27±0.05	0.90±1.97
T10-F23	0	16.01±0.12	0.13±0.01	0.83±1.11
	1	15.98±0.02	0.12±0.01	0.71±0.69
	7	18.22±1.14	0.23±0.03	-1.21±0.79
	14	16.66±0.18	0.18±0.02	-0.54±0.91
	1p-1	16.46±0.3	0.15±0.01	-0.75±0.44
T12-F17	0	17.94±0.3	0.27±0.02	-0.98±0.12
	1	17.97±0.15	0.30±0.01	-0.74±1.53
	7	19.24±0.43	0.31±0.01	-0.98±0.62
	14	21.15±2.63	0.27±0.08	-0.74±0.13
	1p-1	78.43±0.64	0.43±0.01	-1.30±0.14

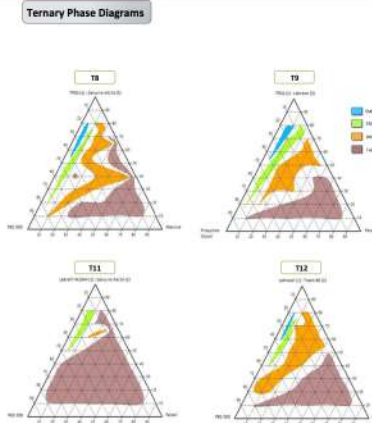


Figure 2. Ternary phase diagrams used in the preparation of SMEDDS formulations. Pecosol or Malsine or oil phase, PEG 300 or Propylene Glycol: cosolvent, TPGS/ Gelucire 44/14, TPGS/Labrasol, Labrasol/Tween 80, Labrafili M1944/Gelucire 44/14: surfactant mixture

### Characterization – Solid SMEDDS

Table 3. Droplet size, PDI and zeta potential values of solid SMEDDS formulations. The data are given as "Mean±S.D" (n=3)

Formulation	Method	Adsorbent	Droplet size (d.nm)	PDI	Zeta Potential
T8-F21(Blank)	Lyophilization	Aerosil	110.49±48.10	0.68±0.13	-17.47±0.38
		Neusilin U2	145.4±3.82	0.87±0.02	-13.27±0.33
	Spray drying	Aerosil	251.475±26.48	0.78±0.11	-18.85±0.49
		Neusilin U2	98.8±8.89	0.75±0.02	-13.37±0.35
T9-F17	Lyophilization	Aerosil	97.35±1.82	0.48±0.08	-19.16±2.13
		Neusilin U2	84.8±6.27	0.61±0.01	-20.10±0.79
	Spray drying	Aerosil	257.24±5.72	0.43±0.03	-12.28±0.08
		Neusilin U2	26.89±2.75	0.88±0.14	-8.74±0.74
T10-F21(Blank)	Lyophilization	Aerosil	32.77±0.27	0.48±0.01	-5.53±0.61
		Lactose	26.07±0.13	0.27±0.03	-0.32±0.47
	Spray drying	Aerosil	37.02±0.33	0.26±0.01	-6.53±0.83
		Neusilin U2	28.99±0.32	0.47±0.01	-5.96±0.15
T10-F17	Lyophilization	Aerosil	18.2±0.55	0.45±0.03	-2.65±1.46
		Neusilin U2	70.86±2.38	0.48±0.01	-9.85±0.52
	Spray drying	Aerosil	20.74±0.31	0.24±0.01	-4.44±2.09
		Neusilin U2	187.1±7.86	0.28±0.06	-2.13±0.78
T10-F23(Blank)	Lyophilization	Aerosil	122.1±12.61	0.68±0.17	-12.87±2.01
		Lactose	129.3±7.14	0.38±0.01	-0.73±0.15
	Spray drying	Aerosil	47.65±8.89	0.32±0.01	0.04±0.56
		Neusilin U2	40.89±0.88	0.40±0.01	0.17±0.55
T10-F21	Lyophilization	Aerosil	231.17±57.30	0.42±0.07	-7.22±0.1
		Neusilin U2	123.6±18.69	0.31±0.03	-10.42±4.82
	Spray drying	Aerosil	34.94±0.51	0.28±0.02	-2.22±0.81
		Neusilin U2	133.24±7.71	0.26±0.01	-5.16±0.15
T10-F23	Lyophilization	Aerosil	123.87±2.22	0.73±0.02	14.27±3.89
		Lactose	143.87±9.77	0.43±0.08	1.91±1.98
	Spray drying	Aerosil	92.02±1.81	0.33±0.02	-2.93±0.88
		Neusilin U2	38.78±2.29	0.44±0.03	-11.47±0.15
T12-F17(Blank)	Lyophilization	Aerosil	248.45±39.34	0.47±0.14	-0.75±0.44
		Neusilin U2	26.27±0.28	0.68±0.01	5.65±0.76
	Spray drying	Aerosil	159.87±8.49	0.31±0.06	-4.98±3.49
		Neusilin U2	25.59±0.79	0.51±0.16	-8.84±1.88
T12-F17	Lyophilization	Aerosil	25.01±0.21	0.48±0.01	-11.79±1.14
		Lactose	82.77±4.33	0.42±0.01	-1.74±0.45
	Spray drying	Aerosil	51.74±21.09	0.46±0.11	-11.01±1.49
		Neusilin U2	33.39±1.82	0.53±0.02	-0.89±1.07
T12-F17	Lyophilization	Aerosil	408.3±207.75	0.53±0.26	-18.97±0.85
	Spray drying	Aerosil	101.78±2.6	0.48±0.01	-15.18±1.5
		Aerosil	27.01±0.54	0.78±0.01	-17.28±0.42

### CONCLUSIONS

- Suitable liquid SMEDDS formulations were designed and optimized for further solid SEDDS formulations of the anti-cancer peptide, LyP-1, with ternary phase diagrams.
- Solid SMEDDS formulations were obtained with lyophilization and spray-drying methods with different adsorbents.
- The effects of methods and adsorbents were evaluated by means of droplet size and zeta potential values.

### ACKNOWLEDGEMENT

This project is supported by TUBITAK (The Scientific and Technological Research Council of Turkey), grant number: SBAG 1002-1135569.

The authors are grateful to Kura Chemical Products Trade Inc. Co. (Istanbul, Turkey), which kindly provided the excipients of Gattefosse (Lyon, France) and Fuji Chemical Industry, Co. Ltd. (Toyama, Japan), which kindly provided Neusilin sample.

### REFERENCES

1. Selen Seda Doğan, Neslihan Gürsoy, Characterization and optimization of SMEDDS formulations of the anti-cancer peptide LyP-1. *Journal of Pharmaceutical Innovation and New Drugs*, 2014, 3(2): 10-18.
2. Selen Seda Doğan, Neslihan Gürsoy, Optimization of SMEDDS formulations of the anti-cancer peptide LyP-1. *Journal of Pharmaceutical Innovation and New Drugs*, 2014, 3(2): 10-18.
3. Balakrishnan K, Lee S-J, Oh J-S, Kim J-S, Hong M-J, Lee J-P, Kim S-H, Kim S-H, Park S-C, Cho S-C. *Journal of Pharmaceutical Innovation and New Drugs*, 2014, 3(2): 10-18.
4. <http://www.fujichemical.com>

T2113



**In vitro Evaluation and Permeability Assessment of Liquid and Solid SMEDDS for the Lymphatic Targeting of the Cyclic LyP-1 Peptide**

Selin Seda Doğan<sup>1</sup>, Naile Öztürk<sup>1</sup>, Erol Şener<sup>2</sup>, R. Neslihan Gürsoy<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, Ankara, TURKEY  
<sup>2</sup> Anadolu University, Faculty of Pharmacy, Department of Analytical Chemistry, Eskişehir, TURKEY



**ABSTRACT**

**Purpose:** The purpose of the present work was to evaluate the cytotoxicity and bioactivity of designed liquid and solid SMEDDS formulations of the anticancer peptide cyclic LyP-1 and compare the transport of the formulations across the Caco-2 cell monolayer.  
**Methods:** Optimized formulations which were formulated with Labrazeal<sup>®</sup>, Gelucio<sup>®</sup> 44/24, Labrazeal<sup>®</sup>, D-α-tocopherol polyethylene glycol succinate (TPGS) and Tween 80 as surfactants, Precirol<sup>®</sup> and Miglyol<sup>®</sup> as oil of phase and polyethylene glycol 200 and propylene glycol as cosolvents were collected by lyophilization or spray-drying after characterization. The cytotoxicity and bioactivity of the formulations were evaluated by the MTT assay in Caco-2 human colorectal cancer cell line and MDA-MB-231 breast cancer cell line. Permeability studies were carried out with Caco-2 cell monolayer as a model of intestinal barrier and the samples collected from the basolateral compartment were analyzed with a novel LC-MS/MS method which was developed for the cyclic LyP-1 peptide (Triple Quad LC7MS, Agilent Technologies, USA).  
**Results:** Optimum liquid SMEDDS formulations, which were selected after stability assessment for two weeks, were formulated with minimal (0.5%) or zero (0%) oil. Cell viability after the application of optimized liquid formulations which were diluted in the 1:2000-1:60000 range was found to be 89% in the lowest range after 24 hours. No statistical difference was found between the dilutions of US-F23 liquid formulation (1:2000-5:60000) after 24 hours ( $p > 0.05$ ). Low cell viability was found as 86% for the optimized solid formulations in the different compositions were found to be statistically the same with the positive control group (p < 0.05) except lyophilized LUP-F23 and US-F17 formulations after 24 hours. There was no significant difference between the lyophilized formulations and positive control group after 48 hours (p < 0.05), which shows the safety of the formulations in the gastrointestinal tract. No statistically significant difference was found between the cell viability of the positive control group and the solid LUP-F23 formulations, which contained the linear and cyclic peptide (p < 0.05) in MDA-MB-231 cell line after 24 hours. The bioactivity of LUP-F23 formulation, which was applied as 1:10 and 1:10000 dilutions in solid SMEDDS were found to be significantly different from the positive control group after 24 and 48 hours (p < 0.05) in MDA-MB-231 cell line showing that the bioactivity was the result of the solid formulations containing the peptide. The apparent permeability coefficients (P<sub>app</sub>) of the peptide in different liquid and solid formulations were found to be higher than the peptide alone, especially for the US-F23 ( $p < 0.0005$ ) and US-F20 ( $p < 0.0013$ ) formulations.  
**Conclusion:** Optimized liquid and solid SMEDDS formulations were evaluated utilizing the Caco-2 and MDA-MB-231 cell lines for cytotoxicity and bioactivity, respectively. The transport of the anticancer peptide, cyclic LyP-1, across the Caco-2 cell monolayer in liquid and solid formulations was compared for further studies.  
**Acknowledgment:** This project was supported by TÜBİTAK (The Scientific and Technological Research Council of Turkey), grant number: 18AD 11818503.

**PURPOSE**

The purpose of the present work was to evaluate the cytotoxicity and bioactivity of designed liquid and solid SMEDDS formulations of the anticancer peptide, cyclic LyP-1, and compare the transport of the formulations across the Caco-2 cell monolayer.

**METHODS**

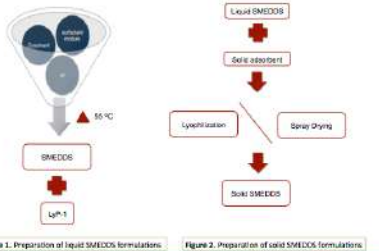


Figure 1. Preparation of liquid SMEDDS formulations. Figure 2. Preparation of solid SMEDDS formulations.

**Preparation of Formulations**

**Liquid Formulations**

Ternary phase diagrams were constructed for formulation studies of SMEDDS. The formulations were prepared according to oil, surfactant and cosolvent amounts from selected points. The formulation mixtures were subjected to melting in water bath at 55 °C for 15 minutes. The formulations were cooled down to room temperature under constant stirring and stored for 24 hours before characterization studies. LyP-1 peptide was added to formulations with simple mixing after reaching equilibration.

**Solid Formulations**

Solid formulations were prepared from liquid formulations after dilution. Lyophilization and spray drying methods were used after the addition of suitable adsorbents to diluted samples. The solid SMEDDS were formulated as tablets and capsules after solidification step.

**Tablet Formulations**

Tablet formulations were prepared with direct compression excipients. Tablets were formulated as 200 mg, each containing 0.1 mg of LyP-1 and coated with 5% Eudragit S100 after direct compression in order to increase stability in gastric fluid.

**Capsule Formulations**

Capsules were formulated with corn starch as diluent in modified HPMC structured Orlon<sup>®</sup> (size 0) containing 0.1 mg of LyP-1.

**Cell Culture Studies**

Cytotoxicity studies were carried out with Caco-2 cell line in order to evaluate the safety of prepared formulations in gastrointestinal tract. Formulations were diluted with pH 7.4 phosphate buffered saline (PBS) before administration.

**Bioactivity Studies**

Bioactivity studies were carried out with MDA-MB-231 cell line in order to evaluate the anticancer activity of prepared formulations. Formulations were diluted with pH 7.4 phosphate buffered saline (PBS) before administration.

**Transport Studies**

The transport of the anticancer peptide, LyP-1, across the Caco-2 cell monolayer in liquid and solid formulations was compared. Samples were collected from basolateral after 2 hours and analyzed with LC-MS/MS method which was developed for LyP-1.

**RESULTS**

**Cytotoxicity Studies**

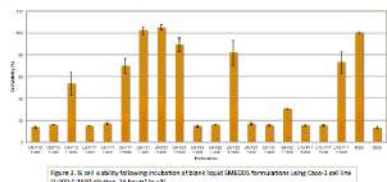


Figure 3. Cell viability following incubation of various liquid SMEDDS formulations using Caco-2 cell line (1:2000-5:60000 dilution, 24 hours) (n=3). (\* p < 0.05 vs control).

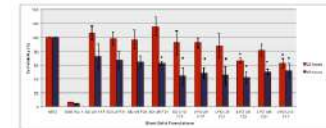


Figure 5. Cell viability following incubation of various solid SMEDDS formulations using Caco-2 cell line (n=3). (\* p < 0.05 vs control).

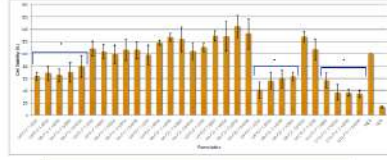


Figure 4. Cell viability following incubation of various liquid SMEDDS formulations using Caco-2 cell line (1:2000-5:60000 dilution, 48 hours) (n=3). (\* p < 0.05 vs control).

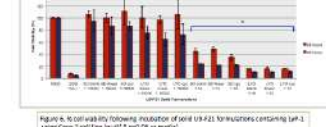


Figure 6. Cell viability following incubation of various solid SMEDDS formulations using Caco-2 cell line (n=3). (\* p < 0.05 vs control).

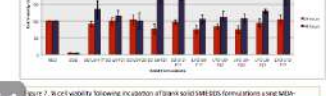


Figure 7. Cell viability following incubation of various liquid SMEDDS formulations using MDA-MB-231 cell line (n=3). (\* p < 0.05 vs control).

**Bioactivity Studies**

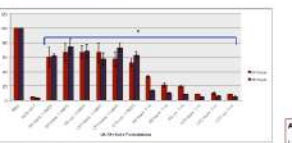


Figure 8. Cell viability following incubation of various liquid SMEDDS formulations using MDA-MB-231 cell line (n=3). (\* p < 0.05 vs control).

**Transport Studies**

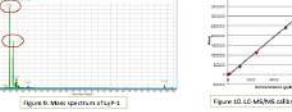


Table 1. Permeability coefficients of LyP-1 formulations from Caco-2 cell line (P<sub>app</sub>) (n=3)

Formulation	P <sub>app</sub> (cm <sup>2</sup> /h)
US-F01	1.51E-06
US-F02	1.57E-06
US-F03	1.44E-06
US-F04	4.77E-06
US-F05	1.81E-06
US-F06	2.85E-06
US-F07	4.00E-06
US-F08	1.03E-06

**CONCLUSIONS**

Optimized liquid and solid SMEDDS formulations were evaluated utilizing the Caco-2 and MDA-MB-231 cell lines for cytotoxicity and bioactivity, respectively. Solid SMEDDS (lyophilized and spray-dried) were found to be safe in the gastrointestinal tract after 24 hours (p < 0.05), except lyophilized US-F23 and US-F24 formulations. US-F23 solid formulations (lyophilized and spray-dried) were found to be bioactive after 24 and 48 hours (p < 0.05) in MDA-MB-231 cell line in both dilutions (1:10 and 1:10000). The apparent permeability coefficients (P<sub>app</sub>) of the peptide in formulations, except LUP-F23, were found to be higher than the peptide solution alone, which show the permeability enhancement of SMEDDS formulations.

**ACKNOWLEDGEMENT**

This project was supported by TÜBİTAK (The Scientific and Technological Research Council of Turkey), grant number: 18AD 11818503. The authors are grateful to Kara Chemicals (Kara Chemicals Inc., Co. (Istanbul), Turkey), which kindly provided the excipients of Gattefosse (Ison, France). Fuji Chemicals, an affiliate of Sumitomo Chemicals, kindly provided the excipients of Gattefosse (Ison, France). Fuji Chemicals, an affiliate of Sumitomo Chemicals, kindly provided the excipients of Gattefosse (Ison, France). Fuji Chemicals, an affiliate of Sumitomo Chemicals, kindly provided the excipients of Gattefosse (Ison, France). Fuji Chemicals, an affiliate of Sumitomo Chemicals, kindly provided the excipients of Gattefosse (Ison, France).

**REFERENCES**

1. Özgenç S, Akkaya S, Akkaya S, Akkaya S, Akkaya S, Akkaya S. The effect of SMEDDS on the oral bioavailability of LyP-1 peptide. J Pharm Sci. 2018;107:1234-1240.  
2. Şener E, Öztürk N, Doğan SS, Gürsoy RN, Şener E, Öztürk N, Doğan SS, Gürsoy RN. Development and optimization of a SMEDDS for the oral delivery of LyP-1 peptide. J Pharm Sci. 2018;107:1241-1248.  
3. Şener E, Öztürk N, Doğan SS, Gürsoy RN, Şener E, Öztürk N, Doğan SS, Gürsoy RN. Development and optimization of a SMEDDS for the oral delivery of LyP-1 peptide. J Pharm Sci. 2018;107:1249-1256.  
4. Şener E, Öztürk N, Doğan SS, Gürsoy RN, Şener E, Öztürk N, Doğan SS, Gürsoy RN. Development and optimization of a SMEDDS for the oral delivery of LyP-1 peptide. J Pharm Sci. 2018;107:1257-1264.





# Potential of Peptide-Drug Conjugates for Targeted Breast Cancer Therapy

Selin Seda Doğan<sup>1</sup>, Prashant Bhattarai<sup>2</sup>, R. Neslihan Gürsoy, İmran Vural<sup>1</sup>, Ban-An Khaw<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, Ankara, TURKEY  
<sup>2</sup>Northeastern University, School of Pharmacy, Bouve College of Health Sciences, Boston, USA

E-mail: selins.dogan@hacettepe.edu.tr, lbhattarai.p@husky.neu.edu, ngursoy@hacettepe.edu.tr, imran@hacettepe.edu.tr, b.khaw@neu.edu



T2009

## ABSTRACT

**Purpose:** The aim of this study was to design novel peptide-drug conjugates with the tumor homing peptide, Lyp-1, for the targeted treatment of breast cancer. The targeting properties of the tumor homing peptide were combined with the conventional anticancer agent, doxorubicin hydrochloride (Dox-HCl), in order to target and enhance the cell killing properties of the resultant conjugates.

**Methods:** Lyp-1-Doxorubicin conjugates (Lyp-1-Dox) were prepared by modification of the linear Lyp-1 peptide with sulfo-NHS and 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC). Then, Dox-HCl in dimethylformamide was added. After incubation, the conjugates were purified by the Sephadex G-10 column centrifugation protocol with 50 mM NaCl/ 5mM EDTA (pH 8) buffer. DTPA-Dox-PL-1 drug-conjugates were prepared by conjugation of polylysine (PL) with anhydride of DTPA. DTPA-PL was then bromoacetylated and purified prior to conjugation of Lyp-1 for coupling. EDC activated Dox-HCl as described above was then added dropwise to the reaction mixture and the unbound Dox was separated from DTPA-Dox-PL-Lyp-1 conjugates as described above. Cytotoxicity studies with these reagents were determined in MDA-MB-231 breast cancer cells in culture. For comparison of binding, Lyp-1 was coupled with fluorescein isothiocyanate and binding of Lyp-1-FITC compared to binding of various drug conjugates in MDA-MB-231 cells in culture. Immunocytochemistry, flow cytometry and activity assessment of the conjugates were performed. Internalization studies were carried out with CytoFluor Automated Imaging Cytometer (Thornlabs Inc., NJ, USA). MDA-MB-231 cells were incubated with Lyp-1-FITC for predetermined time intervals for internalization studies.

**Results:** Cytotoxicity of Lyp-1-Dox conjugates was found to be significantly higher than Dox-HCl alone (p<0.0001) in MDA-MB-231 cell line. The fluorescently-labeled Lyp-1 was shown to be internalized by the tumor cells after 30 minutes of incubation. Flow cytometric analyses illustrated statistical difference between the fluorescence intensity of cells treated with doxorubicin hydrochloride alone and peptide-drug conjugates. Lyp-1-Dox (p<0.002) and DTPA-Dox-PL-Lyp-1 (p< 0.001) conjugates showed greater drug uptake than free Dox-HCl in MDA-MB-231 breast cancer cells.

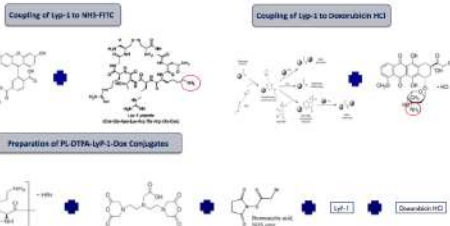
**Conclusion:** Novel peptide-drug conjugates that possess the tumor-homing properties of Lyp-1 and the anticancer activity of Dox-HCl were demonstrated in breast cancer cells. Binding and internalization of Lyp-1 drug-conjugates in the breast cancer cells were greater than that of free Dox-HCl, indicating enhanced targeted delivery of a conventional chemotherapeutic agent in the forms of peptide-polymer-drug conjugates or peptide-drug-conjugates.

**Acknowledgment:** This project was supported by TÜBİTAK (The Scientific and Technological Research Council of Turkey) 2214/A International Doctoral Research Fellowship Program.

## PURPOSE

The aim of this study was to design novel peptide-drug conjugates with the tumor homing peptide, Lyp-1, for the targeted treatment of breast cancer. The targeting properties of the tumor homing peptide were combined with the conventional anticancer agent, doxorubicin hydrochloride (Dox-HCl), in order to target and enhance the cell killing properties of the resultant conjugates.

## METHODS



**Preparation of Peptide Conjugates:** Lyp-1-Doxorubicin conjugates (Lyp-1-Dox) were prepared by modification of the linear Lyp-1 peptide with sulfo-NHS and 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC). Then, Dox-HCl in dimethylformamide was added. After incubation, the conjugates were purified by the Sephadex G-10 column centrifugation protocol with 50 mM NaCl/ 5mM EDTA (pH 8) buffer (Figure 1). DTPA-Dox-PL-Lyp-1 drug-conjugates were prepared by conjugation of polylysine (PL) with anhydride of DTPA. DTPA-PL was then bromoacetylated and purified prior to conjugation of Lyp-1 for coupling. EDC activated Dox-HCl as described above was then added dropwise to the reaction mixture and the unbound Dox was separated from DTPA-Dox-PL-Lyp-1 conjugates as described above.

**Cell Culture Studies:** MDA-MB-231 breast cancer cell line was cultured in DMEM (High Glucose, 4mM L-glutamine and sodium pyruvate) with 10% fetal bovine serum and 0.5% Penicillin-Streptomycin (10 000 U/10 000 mg/mL). For the cell viability studies MDA-MB-231 cells were seeded in 96 well plates with the concentration of 1 x 10<sup>4</sup> cell/well and cultured overnight in media. To determine the cell viability after the treatment with prepared conjugates, cells were incubated with either Dox-HCl or Lyp-1-Dox for 24 hours (Figure 2). Cell viability was determined with CellTiter-Blue cell viability assay. The media was removed after incubation and cells were washed with media. 200 µl of CellTiter-Blue reagent was added to the cells with the dilution of 1:5 in cell culture media and fluorescence intensity was measured with microplate reader (BioTek, VT, USA, Model: Synergy HT) after 2 hours of incubation.

**Immunocytochemistry Studies:** Aliquots of MDA-MB-231 cells (60 000 cells/well) were cultured overnight. The media were removed and cells were incubated with linear Lyp-1-FITC, cyclic Lyp-1-FITC or FITC alone for 1 hour at 400 µl aliquots (Figure 3). After incubation, cells were fixed and permeabilized with ice-cold acetone. The nuclei of fixed cells were stained with DAPI before epifluorescence microscopic observation (Nikon, Eclipse E400). After initial demonstration of binding of peptide-FITC conjugates to MDA-MB-231 cells, internalization studies were performed using CytoFluor Automated Imaging Cytometer (Thornlabs Inc., NJ, USA). The cells were incubated with linear Lyp-1-FITC samples for 30 minutes, 1, 3, 6 and 24 h to assess localization and internalization of peptide conjugates in MDA-MB-231 cells (Figure 4). Green fluorescence integral values were calculated to determine the localization of the conjugates (Table 2).

**Fluorescence Activated Cell Analyses:** MDA-MB-231 cells were seeded in petri dishes with 1 x 10<sup>4</sup> cell population. After 80-90 % confluency, cells were harvested by trypsinization or scraping. Cell pellets were resuspended to obtain 1 x 10<sup>6</sup> cells/ml cell concentration in ice cold 0.1 M PBS. Cell suspensions were treated with samples for determined incubation times. After washing and resuspending, the number and the staining of cells in each sample were assessed by flow cytometry (Calibur instrument, BD Biosciences, San Jose, CA) equipped with an argon laser and an optional second red diode laser (source energy, 15 mW; detection time, 200 counts per second). Data were line gated for 10 000 cells each by Forward Light Scatter (FSC) and Side Light Scatter (SSC). Cell Quest pro software was used for data acquisition and analyses (BD Biosciences, San Jose, CA) (Table 1).

**Data Analysis:** A confidence level of 95% was chosen, and p<0.05 indicated that the difference among the groups was statistically significant. All experiments were expressed as mean ± SD. All data analyses were performed using StatPlus 5.8.2.0.

## RESULTS



Figure 1. Sephadex G-10 column chromatography elution profile of Lyp-1-Dox. Lyp-1-Dox eluted in the void volume.

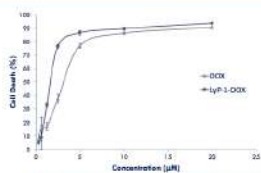


Figure 2. % cell death of MDA-MB-231 cells after 24 h treatment with drug conjugates.

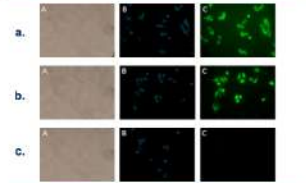


Figure 3. a. MDA-MB-231 cell line treated with linear Lyp-1-FITC (FITC) (40x). b. MDA-MB-231 cell line treated with cells Lyp-1-FITC (FITC) (40x). c. MDA-MB-231 cell line treated with fluorescently-labeled Lyp-1-FITC alone (20x).

Table 3. FACS results of MDA-MB-231 cell line (except epifluorescence cells).

Sample	Intact Cells		Internalized Cells	
	FL1-H (log)	FL2-H (log)	FL1-H (log)	FL2-H (log)
MDA-MB-231 cell line Control	4.23	4.08	4.32	4.33
Dox alone (µg/ml)	4.24	4.15	4.33	4.33
Lyp-1-Dox (µg/ml)	4.24	4.28	4.41	4.47
PL-DTPA-Lyp-1-Dox (µg/ml)	4.24	4.17	4.41	4.47

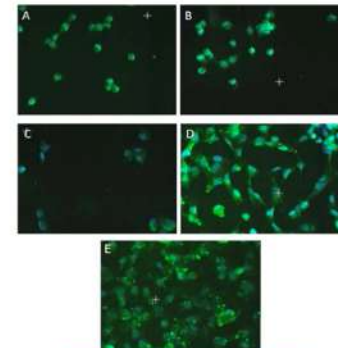


Figure 4. Confocal fluorescence images of MDA-MB-231 cells treated with Lyp-1-FITC conjugates for (A) 15 min, (B) 30, (C) 60, (D) 120 min, (E) 240 min.

Table 2. Imaging cytometry results for MDA-MB-231 cell line for Lyp-1-FITC conjugates.

Time Points	Green Integral (A.U.)	FFI	Green Peripheral (A.U.)	FFI	FL1/FL2	FL2/FL1
15 min	187876.21	4070796.08	1343343.44	4088308.02	1.41	0.8
30	1513177.38	6470308.14	3772421.38	471136.46	0.9	1.3
60	1514212.23	804136.54	2291058.89	5174772.38	0.96	1.35
120	1510060.48	878987.68	1464008.38	604844.11	1.07	1.39
240	1514111.41	513913.58	1664813.11	100646.88	1.03	0.98

## CONCLUSION

Novel peptide-drug conjugates that possess the tumor-homing properties of Lyp-1 and the anticancer activity of Dox-HCl were demonstrated in breast cancer cells. Binding and internalization of Lyp-1 drug-conjugates in the breast cancer cells were greater than that of free Dox-HCl, indicating enhanced targeted delivery of a conventional chemotherapeutic agent in the forms of peptide-polymer-drug conjugates or peptide-drug-conjugates.

## ACKNOWLEDGMENT

This project was supported by TÜBİTAK (The Scientific and Technological Research Council of Turkey) 2214/A International Doctoral Research Fellowship Program.

## REFERENCES

- 1. Seda Doğan, S., Bhattarai, P., Gürsoy, N., Vural, İ., Khaw, B.-A. (2015) Targeted Delivery of Doxorubicin to Breast Cancer Cells Using Lyp-1 Peptide. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 104(10), 3200-3208.
- 2. Prashant Bhattarai, R. Neslihan Gürsoy, İmran Vural, Ban-An Khaw, Selin Seda Doğan. (2015) Targeted Delivery of Doxorubicin to Breast Cancer Cells Using Lyp-1 Peptide. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 104(10), 3200-3208.
- 3. Doğan, S., Bhattarai, P., Gürsoy, N., Vural, İ., Khaw, B.-A. (2015) Targeted Delivery of Doxorubicin to Breast Cancer Cells Using Lyp-1 Peptide. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 104(10), 3200-3208.

**Poster Number**  
15R0800

## Stability Assessment of Lymphatic Targeting Peptide, Cyclic LyP-1

Selin S. Doğan, R. Neslihan Gürsoy  
Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology

**2016 AAPS**  
ANNUAL MEETING AND EXPOSITION  
NOVEMBER 13-17, 2016  
COLORADO CONVENTION CENTER, DENVER

### PURPOSE

The purpose of the present work was to evaluate the chemical stability of cyclic LyP-1 peptide at different pH values in order to design possible formulation strategies for administration.

### METHOD

Degradation kinetics and pH-rate profiles were evaluated with buffer solutions in 12 different pH values at 37 °C. The buffer solutions ranging from pH 3 to pH 10 were prepared as 3 different concentrations in order to evaluate the effect of ion concentration on peptide stability. All buffer solutions were prepared according to USP 29 – NF 24. Ionic strength was adjusted to 0.15 with the addition of NaCl. 200 µg/mL of cyclic LyP-1 stock solution was mixed with two times the concentration of the calculated buffer solutions to give 100 µg/mL final peptide solution. The prepared solutions were kept at 37 °C and samples were removed at predetermined time intervals. Collected samples were kept -20 °C until analytical quantitation. Degradation rate constant (k<sub>obs</sub>) and half life (t<sub>1/2</sub>) were calculated with the following equation (assuming first order degradation kinetics):

**log % C = log % C<sub>0</sub> - (k<sub>obs</sub>/2.303)t**

**t<sub>1/2</sub> = 0.693/k<sub>obs</sub>**

Between the pH ranges of 3 to 10, it was observed that the concentration of the buffer solution affected the degradation rate of the cyclic peptide. The degradation was increased and resulted in shorter half lives with increasing ionic concentration due to buffer catalysis. At pH 4 and pH 5, degradation rate constant (k<sub>obs</sub>) and half-life (t<sub>1/2</sub>) could not be calculated due to extensive degradation. The half-life of cyclic LyP-1 was found to be 1299.31 hours in pH 6 phosphate buffer (0.0125 M), which was determined as the most stable state in buffer solution.

Cyclic peptide was found to be more stable than the linear form when compared to our previous study, in which the linear form was stable at pH 1 with 304.721 hours of half-life (O. Cevik, N. Gürsoy, *Stability Assessment of the Tumor Specific LyP-1 Peptide at Different pH and in the Newly-Developed Self-Microemulsifying Drug Delivery Systems (SMEDDS), AAPS Annual Meeting and Exposition 2011 Washington, DC, USA*).

### RESULTS

pH 3

pH 6

pH 10

### CONCLUSION

- Cyclic LyP-1 peptide was found to be more stable between pH 1 – 3 and pH 6 – 9.
- The stability of peptide between pH 1-3 and pH 6 – 9 is an opportunity for further formulation studies concerning administration of the peptide by the oral route.
- Cyclic form of the peptide was found to be more stable than the linear form one due to the presence of the disulfide bond between Cys1–Cys9, dominating the stability profile of the peptide by providing a rigid structural backbone.

### RESULTS

pH 7

pH 8

pH 9

### ACKNOWLEDGMENT

This project was supported by TUBITAK (The Scientific and Technological Research Council of Turkey), grant number: SBAG 1002-113S569.

### RESULTS

pH 1

pH 2

pH 11

pH 12

### REFERENCES

O. Cevik, N. Gürsoy, *Stability Assessment of the Tumor Specific LyP-1 Peptide at Different pH and in the Newly-Developed Self-Microemulsifying Drug Delivery Systems (SMEDDS), AAPS Annual Meeting and Exposition 2011 Washington, DC, USA*

Patel K, Borchardt R.T, *Pharm. Res.*, Vol 7, No 7, 1990, 703 – 711

Patel K, Borchardt R.T, *Pharm. Res.*, Vol 7, No 8, 1990, 787 – 793

He NF, Gürsoy RN, Kuczyńska-Substokowska I, Tian J, Williams T, Sliawan TJ. *J Pharm Sci.* 2006;95(10): 2222-34.

### RESULTS

Figure 1. Concentration (M)-k<sub>obs</sub> (h<sup>-1</sup>) graphics of the different pH values studied with three different buffer concentration

### RESULTS

Figure 2. Log pH-rate profile for LyP-1 peptide at 37 °C

### RESULTS

Table 1. k<sub>obs</sub> and t<sub>1/2</sub> values of cyclic LyP-1

pH	Buffer Type	Concentration (M)	k <sub>obs</sub>	t <sub>1/2</sub> (hour)
1	HCl	0.01	3.37 × 10 <sup>-3</sup>	205.70
		0.01	3.77 × 10 <sup>-3</sup>	183.60
3	Phosphate	0.1	3.6 × 10 <sup>-3</sup>	192.52
		0.05	2.58 × 10 <sup>-3</sup>	268.26
		0.025	1.32 × 10 <sup>-3</sup>	526.82
4	Acetate	0.2	-	-
		0.1	-	-
		0.05	-	-
5	Acetate	0.2	-	-
		0.1	-	-
		0.05	-	-
6	Phosphate	0.05	1.09 × 10 <sup>-3</sup>	63.58
		0.025	2.86 × 10 <sup>-3</sup>	242.68
		0.0125	0.53 × 10 <sup>-3</sup>	1299.31
7	Phosphate	0.05	6.89 × 10 <sup>-3</sup>	100.53
		0.025	2.50 × 10 <sup>-3</sup>	276.68
		0.0125	2.16 × 10 <sup>-3</sup>	321.04
8	Tris	0.05	1.36 × 10 <sup>-3</sup>	508.6
		0.025	1.28 × 10 <sup>-3</sup>	540.16
		0.0125	0.59 × 10 <sup>-3</sup>	1168.56
9	Tris	0.05	2.07 × 10 <sup>-3</sup>	334.09
		0.025	1.8 × 10 <sup>-3</sup>	385.27
		0.0125	1.29 × 10 <sup>-3</sup>	539.25
10	Carbonate	0.025	2.41 × 10 <sup>-3</sup>	28.80
		0.0125	1.72 × 10 <sup>-3</sup>	40.38
		0.00625	1.02 × 10 <sup>-3</sup>	67.76
11	Phosphate	0.025	9.05 × 10 <sup>-3</sup>	7.66
		0.01	1.75 × 10 <sup>-3</sup>	3.95

\*k<sub>obs</sub> and t<sub>1/2</sub> values could not be calculated because of fast degradation of the peptide at pH 4 and 5.

### CONCLUSION

Figure 3. all log % C – time graphics of pH 1, pH 2, pH 11 and pH 12

2016 AAPS Annual Meeting and Exposition, November 13-17, 2016, Colorado Convention Center, Denver, USA

2016 AAPS Annual Meeting and Exposition, November 13-17, 2016, Colorado Convention Center, Denver, USA

2016 AAPS Annual Meeting and Exposition, November 13-17, 2016, Colorado Convention Center, Denver, USA

## 9. ÖZGEÇMİŞ



**Adı Soyadı:** Selin Seda TİMUR

**Doğum Tarihi:** 02 Temmuz 1988

**Adres:** Hacettepe Üniversitesi,  
Eczacılık Fakültesi,  
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı  
06100 Sıhhiye/ANKARA-TÜRKİYE

**Telefon** : 0 312 305 12 41

**Faks** : 0 312 310 09 06

**e-posta** : [selins.dogan@gmail.com](mailto:selins.dogan@gmail.com)  
[selins.dogan@hacettepe.edu.tr](mailto:selins.dogan@hacettepe.edu.tr)

### EĞİTİM

**2011-2017 Doktora**

Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji  
Anabilim Dalı, Ankara

**2006-2011 Lisans**

Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Ankara

**MESLEKİ DENEYİM****2012- Araştırma Görevlisi**

Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji  
Anabilim Dalı, Ankara

**02.2015- Misafir Araştırmacı**

**08.2015** Northeastern University, School of Pharmacy, Department of  
Pharmaceutical Sciences

**YAYINLAR**

- Timur, SS, Şahin A, AYTEKİN E, ÖZTÜRK N, POLAT HK, TEZEL N, GURSOY RN, ÇALIŞ S, Design and In vitro Evaluation of Tenofovir – Loaded Vaginal Gels for the Prevention of HIV Infections, Pharmaceutical Development and Technology, May 29:1-10, 2017.
- Timur S.S., Yalcın G., Cevik O., Andac C., GURSOY R.N. Molecular Dynamics, Thermodynamic and Mutational Binding Studies for umor Specific LyP-1 in Complex with p32. Journal of Biomolecular Structure & Dynamics, April, 1-11, 2017.
- Timur S.S, Bhattarai P., GURSOY R.N., VURAL I., KHAW B.A. Design and In Vitro Evaluation of Bispecific Complexes and Drug Conjugates of Anticancer Peptide, LyP-1. Pharmaceutical Research, 34 (2), 352-364, 2017
- Nur Syazwani binti Azeran, Nur Diyana binti Zazali, Selin Seda Timur, Ayben Işılray Özdoğan, Melike Ekizoğlu, Ravi Sheshala, Kamal Dua, Priyadarshi Soumyaranjan Sahu, Sevda Şenel, Moxifloxacin Loaded Chitosan Gel Formulations for the Treatment of Periodontal Diseases.



Journal of Polymer Materials 34(1):157-170, 2017.

•Doğan S.S., Çaban S., Çapan Y., Beyine İlaç Taşınması: Truva Atı Teknolojisi, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, 2013, 34 (1), 1-16.

•Doğan S.S., Çaban S., Çapan Y., Beyine İlaç Hedeflendirme Stratejileri, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, 2013, 33 (2), 231-250.

## **POSTERLER**

•Dogan S.S., Gursoy R.N. Stability Assessment of Lymphatic Targeting Peptide, Cyclic LyP-1, 2016 AAPS Annual Meeting and Exposition.

•Dogan S.S, Bhattarai P., Gursoy R.N., Vural I., Khaw B.A. Potential of Peptide–Drug Conjugates for Targeted Breast Cancer Therapy, 2016 AAPS National Biotechnology Conference

•Dogan S.S., Ozturk N., Senol E., Gursoy R.N. In vitro Evaluation and Permeability Assessment of Liquid and Solid SMEDDS for the Lymphatic Targeting of the Cyclic LyP-1 Peptide, 2015 AAPS Annual Meeting and Exposition.

•Development of Mucoadhesive Gels Containing Moxifloxacin for the Treatment of Periodontal Diseases, Nur Diyana binti Zazali, Nur Syazwani binti Azeran, Selin Seda Dogan, Ravi Sheshala, Kamal Dua, Ayben Işıllyay Özdoğan, Sevda Şenel, 2015 CRS, Annual Meeting and Exposition.

•Dogan S.S., Gursoy R.N. Design and Optimization of Solid SMEDDS for a Lymphatic Targeting Peptide, LyP-1, 2014 AAPS Annual Meeting and Exposition.

•Dogan S.S., Cevik O., Andac C., Gursoy R.N. Molecular Dynamics and Thermodynamic Studies of Tumor Specific Lyp -1 Peptide and Its Receptor p32, 2014 AAPS Annual Meeting and Exposition.

## PROJELER

- Meme Kanseri Tedavisinde Aktif Hedeflendirme Amacıyla Kullanılmak Üzere Nano Boyutlu İlaç Taşıyıcı Sistemlerin (Nanofarmasötikler) Tasarımı ve İn Vitro Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi, Lisansüstü Tez Desteği Projesi, Proje Numarası:15964, 2017-Devam ediyor
- Meme Kanseri Tedavisinde Aktif Hedeflendirme Amacıyla Kullanılmak Üzere Nano Boyutlu İlaç Taşıyıcı Sistemlerin (Nanofarmasötikler) Tasarımı ve İn Vitro Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi, Hızlı Destek Projesi, Proje Numarası: THD-2017-11642. 2016-Devam ediyor.
- Meme Kanseri Tedavisinde Kullanılmak Üzere Peptid Konjugatlarının Hazırlanması, TÜBİTAK 2214 A Yurt Dışı Araştırma Burs Programı, 01.03.2015-31.08.2015.
- Gliseril Trinitrat İçeren Yarı-Katı Dozaj Formlarının Geliştirilmesi, SAN-TEZ, Proje Numarası: 2014-2016.
- Meme Kanseri Tedavisinde Aktif Hedeflendirme Amacıyla Kullanılmak Üzere Nano Boyutlu İlaç Taşıyıcı Sistemlerin (Nanofarmasötikler) Tasarımı ve İn Vitro Değerlendirilmesi, TÜBİTAK 1002, Hızlı Destek Projesi No:113S569, 2014- 2015.
- Farklı Kolloidal Sistemlerin Üretim ve Kalite Kontrol Parametrelerinin Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi, Altyapı Projesi, Projesi No: 6242, 2013-2015.

## ÖDÜLLER

Novartis International Biocamp 2014, Winning Team Member