

T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI ŞEKİLLİ NANOPARTİKÜLLERİN  
GELİŞTİRİLMESİ, İMMÜNOTERAPÖTİK VE  
KEMOTERAPÖTİK MADDE YÜKLÜ OPTİMUM  
ŞEKİLLİ NANOPARTİKÜLLERİN KÜÇÜK HÜCRELİ  
DIŞI AKCİĞER KANSERİ ÜZERİNE ANTİKANSER  
ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Ecz. Meryem KAPLAN

Farmasötik Teknoloji Programı  
DOKTORA TEZİ

ANKARA

2024



T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARKLI ŞEKİLLİ NANOPARTİKÜLLERİN GELİŞTİRİLMESİ,  
İMMÜNÖTERAPÖTİK VE KEMOTERAPÖTİK MADDE  
YÜKLÜ OPTİMUM ŞEKİLLİ NANOPARTİKÜLLERİN KÜÇÜK  
HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERİ ÜZERİNE ANTİKANSER  
ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Ecz. Meryem KAPLAN**

**Farmasötik Teknoloji Programı**

**DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**

**Prof. Dr. Sema ÇALIŞ**

**ANKARA**

**2024**

**FARKLI ŞEKİLLİ NANOPARTİKÜLLERİN GELİŞTİRİLMESİ,  
İMMÜNÖTERAPÖTİK VE KEMOTERAPÖTİK MADDE YÜKLÜ  
OPTİMUM ŞEKİLLİ NANOPARTİKÜLLERİN KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI  
AKCİĞER KANSERİ ÜZERİNE ANTİKANSER ETKİNLİĞİNİN  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Ecz. Meryem KAPLAN**

**Danışman: Prof. Dr. Sema ÇALIŞ**

Bu tez çalışması 18.01.2024 tarihinde jürimiz tarafından “Farmasötik Teknoloji Doktora Programı” nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

<b>Jüri Başkanı:</b>	Prof. Dr. Erem BİLENSOY (Hacettepe Üniversitesi)
<b>Üye:</b>	Prof. Dr. Sevgi TAKKA (Gazi Üniversitesi)
<b>Üye:</b>	Prof. Dr. Yalçın ÖZKAN (Sağlık Bilimleri Üniversitesi)
<b>Üye:</b>	Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI (Hacettepe Üniversitesi)
<b>Üye:</b>	Doç. Dr. Kıvılcım SEYHUN (Hacettepe Üniversitesi)

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

05 Şubat 2024

*Prof. Dr. Müge YEMİŞCİ ÖZKAN*  
**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 kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

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

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

07/02/2024

Meryem KAPLAN

i

<sup>1</sup>“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

(1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internette paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir \*. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir. Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

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

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

## ETİK BEYAN

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

Ecz. Meryem KAPLAN

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, karşılaştığımız sorunlar karşısında her zaman yol gösteren, bu süreçte desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, bilimsel çalışmalarımı gerçekleştirebilmem için her türlü olanağı sağlayan, değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Sema ÇALIŞ'a,

Her konuda bana mentörlük eden, bilgi ve deneyimlerini içtenlikle paylaşan proje yürütücüm, sevgili hocam Doç. Dr. Kıvılcım SEYHUN'a, hücre kültürü ve *in vivo* deneylerin yürütülebilmesi için her türlü olanağı sağlayan Sayın Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI'ya, hem bir arkadaş hem bir yol gösterici olarak doktora sürecimin başından sonuna kadar yanımda olan, her türlü sorunu birlikte aştığımız değerli dostum Dr. Ec. Fatma Betül ÇAM'a,

Tez çalışmalarım sırasında her türlü laboratuvar ve altyapı imkânlarını sağlayan başta Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Erem BİLENSOY ve önceki Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Levent ÖNER'e, tüm değerli öğretim üyesi/elemanı hocalarıma, doktora ve yüksek lisans öğrencilerine, idari personelimize, teknisyenlerimize,

Doktora tezim kapsamında hayvan deneylerindeki destekleri ve arkadaşlığı için Öğr. Gör. Dr. Süleyman Can ÖZTÜRK'e, hücre kültürü deneylerindeki yardımları için başta Dr. Ece TAVUKÇUOĞLU DEMİR olmak üzere H.Ü. Kanser Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı araştırmacılarına değerli katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Her zorluğu kolaylıkla aşmamı sağlayan, hayatıma anlam katan, beni akademiye yönlendiren canım ablam Nesrin KAPLAN'a; dualarını ve desteklerini hep arkamda hissettiğim, beni ben yapan değerli annem ve babama,

Tez çalışmalarım boyunca hoşgörülü ve destekleyici davranışları için Süleyman Demirel Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanı Sayın Prof. Dr. Mustafa YILDIZ'a, dekan yardımcılarımıza, Bölüm Başkanımız Doç. Dr. Tunahan DEMİRCİ'ye, Anabilim Dalı Başkanımız Dr. Öğr. Üyesi Sıla GÜLBAĞ PINAR'a çok teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımında maddi destek sağlayan (1001 Proje Numarası: 119R055) ve 2211-A doktora bursiyeri olarak destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na, YÖK 100-2000 doktora bursu desteğinden dolayı Yüksek Öğretim Kurulu'na teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

**Kaplan, M., Farklı Şekilli Nanopartiküllerin Geliştirilmesi, İmmünoterapötik ve Kemoterapötik Madde Yüklü Optimum Şekilli Nanopartiküllerin Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Üzerine Antikanser Etkinliğinin Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Teknoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2024.** Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK), tüm akciğer kanserlerinin % 85'sini oluşturmaktadır. Kanser immünoterapisi ölümcül akciğer kanserinin tedavisi için yeni fırsatlar sunmakla birlikte, KHDAK'nin tedavisinde kullanılan immün kontrol noktası inhibitörleri ile hastaların % 15-25'inde olumlu yanıt sağlanmıştır. İmmünoterapötiklerin KHDAK tedavisindeki etkinliğinin artırılması amacıyla tez kapsamında, FDA ve EMA onaylı PLGA'nın çeşitli türevlerinden oluşan nanopartiküller sisteme, TGF- $\beta$  inhibitörü galunisertib ve immün kontrol noktası inhibitörü nivolumab kombine halde yüklenmiş ve tümöre hedeflendirme amacıyla nanopartiküller anti-EGFR ile konjuge edilmiştir. Tez kapsamında küresel nanopartiküllere ek olarak, modifiye edilen film germe yöntemi ile çubuk ve eliptik disk şeklinde nanopartiküller üretilmiş ve şeklin çeşitli parametreler üzerine etkisi incelenmiştir. Nanopartiküllerin *in vitro* ve *in vivo* karakterizasyon çalışmalarından sonra optimum özelliklere sahip nanopartikül şekli belirlenmiştir. Hedeflendirilmiş küresel nanopartiküllerin (optimum şekilli) sağlıklı ve tümör hücreleri üzerindeki toksisiteyi, T hücre immün yanıtları gibi *in vitro* karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş ardından tümör geliştirilmiş farelerde *in vivo* değerlendirme yapılmıştır. Biyodağılım çalışması ile antikor konjuge nanopartiküllerin tümör çevresindeki birikimi, kontrol grubuna kıyasla daha yüksek bulunmuştur ( $p>0,05$ ). *In vivo* deneyler sonucunda, tümöre hedeflendirilen kombine etkin madde yüklü nanopartiküllerin tümörün küçültülmesinde, hedeflendirilmemiş nanopartiküllere göre daha etkili olduğu, etkin madde çözeltisi ile benzer etki gösterdiği belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Akciğer kanseri, nivolumab, galunisertib, nanopartikül, aktif hedeflendirme.

*Söz konusu tez TÜBİTAK tarafından 119R055 numaralı 1001 projesi ve 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı ile desteklenmiştir. Doktora öğrencisi YÖK 100- 2000 Burs Programı kapsamında da desteklenmiştir.*

## ABSTRACT

**Kaplan, M., Development of Different Shaped Nanoparticles, Evaluation of Anticancer Activity of Optimum Shaped Nanoparticles Loaded with Immunotherapeutic and Chemotherapeutic Agents on Non-Small Cell Lung Cancer, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Pharmaceutical Technology Program Doctor of Philosophy Thesis, Ankara, 2024.** Non-small cell lung cancer (NSCLC) accounts for 85% of all lung cancers. Cancer immunotherapy, offers new opportunities for the treatment of lethal lung cancer, immune checkpoint inhibitors used in the treatment of NSCLC have achieved a favorable response in only 15-25% of patients. TGF- $\beta$  inhibitor galunisertib and the immune checkpoint inhibitor nivolumab were co-loaded into the nanosystem consisting of derivatives of FDA and EMA approved PLGA and the nanosystem was conjugated with anti-EGFR in the scope of Ph.D. thesis to improve efficiency of immunotherapy in treatment of NSCLC. In this study, in addition to spherical nanoparticles, rod and elliptical disk shaped nanoparticles were prepared by a modified film stretching method and the effects of shape on various parameters were investigated. Following *in vitro* and *in vivo* characterization of the nanoparticles, optimum particle shape was determined. *In vitro* characterization studies of the targeted spherical nanoparticles (optimum shape) were examined including their toxicity on healthy and tumor cells, T cell immune responses. Finally *in vivo* evaluation on tumor bearing mice were performed. Biodistribution studies have shown that the accumulation of antibody conjugated nanoparticles around the tumor was higher compared to the control group ( $p>0,05$ ). As a result of *in vivo* experiments, it was determined that the co-loaded antibody conjugated nanoparticles are more effective in tumor shrinkage than non-targeted nanoparticles and they showed similar effects with the combined solution.

**Keywords:** Lung cancer, nivolumab, galunisertib, nanoparticle, active targeting.

*This thesis was supported by TUBITAK 1001 project numbered 119R055 and 2211-A General Domestic Doctoral Fellowship Program. The PhD student was also supported by YÖK 100-2000 Scholarship Program.*

## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiv
ŞEKİLLER	xviii
TABLolar	xxiii
<b>1. GİRİŞ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	5
2.1. Akciğer Kanseri	5
2.1.1. Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri (KHDAK)	7
2.2. Kanser Tedavisinde Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler	11
2.2.1. Polimerik Nanopartiküller	16
2.2.2. Nanosistemlerde Partikül Şeklinin Önemi	18
2.3. Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Kanserli Dokuya Hedeflendirilmesi	20
2.3.1. Kanserde Pasif Hedeflendirme	21
2.3.2. Kanserde Aktif Hedeflendirme	22
2.3.3. Kanserde Uyarana Duyarlı Hedefleme	25
2.4. Kanser İmmünoterapisi	25
2.5. Nivolumab	29
2.5.1. Fragmente Antikor	32
2.6. Galunisertib (TGF- $\beta$ İnhibitörü)	33
2.7. Hedeflendirme Ligandı Olarak Anti-EGFR Antikoru	36
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	38
3.1. Araç ve Gereçler	38
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	38
3.1.2. Biyolojik Maddeler	39

3.1.3. Kullanılan Cihazlar	40
3.2. Yöntem	42
3.2.1. Galunisertib için <i>İn Vitro</i> Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu	42
3.2.2. Nivolumab Antikorumunun Fragmantasyonu	46
3.2.3. Nivolumab için <i>İn Vitro</i> Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu	48
3.2.4. Farklı Geometrik Şekillerde PLGA Nanopartiküllerinin Hazırlanması	51
3.2.5. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	54
3.2.6. Farklı Geometrik Şekillerdeki Nanopartiküllerin Sağlıklı Hücreler Üzerindeki Toksisitesinin Değerlendirilmesi	58
3.2.7. Farklı Şekillerdeki Nanopartiküllerin <i>İn Vitro</i> Hücre İçine Alım Deneyi	60
3.2.8. Farklı Geometrik Şekillerdeki Nanopartiküllerin Biyodağılım Çalışması	61
3.2.9. Optimum Özelliklere Sahip Nanopartikül Şeklinin Belirlenmesi	67
3.2.10. A549 Hücrelerinde Epidermal Büyüme Faktörü Reseptör (EGFR) Ekspresyonunun Gösterilmesi	67
3.2.11. Anti-EGFR Antikoru ile Konjugasyonun Gerçekleştirilmesi, Doğrulanması ve Konjuge Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	68
3.2.12. <i>İn Vitro</i> Sitotoksosite Çalışmaları	71
3.2.13. PD-1 ve TGF- $\beta$ İnhibisyonunun T Hücre İmmün Yanıtlarına Olan Etkisinin Değerlendirilmesi	72
3.2.14. Tümör Modelinin Geliştirilmesi ve Tümörün Değerlendirilmesi	80
3.2.15. İmmün Yanıtın <i>İn Vivo</i> Olarak Değerlendirilmesi	83
3.2.16. Biyodağılım Çalışmaları	84
3.2.17. İstatistiksel Değerlendirme	85
3.2.18. Tez Çalışmaları Kapsamında Kullanılan Nanopartiküllere İlişkin Formülasyon Kodları	85
<b>4. BULGULAR</b>	87
4.1. Galunisertib için <i>İn Vitro</i> Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu	87
4.2. Nivolumab Antikorumunun Fragmantasyonu ve Fragmantasyonun Doğrulanması	92

4.3. Nivolumab için <i>İn Vitro</i> Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu	94
4.3.1. Fragmante Nivolumab için Miktar Tayini Geliştirilmesi	94
4.3.2. Nivolumab için Miktar Tayini Geliştirilmesi	97
4.4. Küresel ve Farklı Şekli PLGA Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu	98
4.4.1. Partikül Boyutu, Polidispersite İndeksi, Zeta Potansiyelin Değerlendirilmesi	98
4.4.2. Enkapsülasyon Etkinliği ve Yükleme Kapasitesinin Değerlendirilmesi	102
4.4.3. Farklı Geometrik Şekillerdeki Nanopartiküllerin Morfolojik Özelliklerinin Değerlendirilmesi	103
4.4.4. Termal Özelliklerin Değerlendirilmesi	105
4.4.5. Farklı Şekildeki Nanopartiküllerden Etkin Madde Salımının Değerlendirilmesi	106
4.5. Farklı Şekillerdeki Nanopartiküllerin <i>İn Vitro</i> Toksisitesinin Değerlendirilmesi	109
4.6. Farklı Şekillerdeki Nanopartiküllerin Hücre İçine Alımının Değerlendirilmesi	110
4.7. Farklı Geometrik Şekillerdeki Nanopartiküllerin Biyodağılımlarının Değerlendirilmesi	111
4.8. Optimum Özelliklere Sahip Nanopartikül Şeklinin Belirlenmesi	114
4.9. A549 Hücrelerinde Epidermal Büyüme Faktörü Reseptör (EGFR) Ekspresyonunun Gösterilmesi	117
4.10. Ligand Konjugasyonunun Değerlendirilmesi ve Konjuge Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	118
4.10.1. Ligand Konjugasyonunun Doğrulanması	118
4.10.2. Ligand Konjuge Edilmiş Nanopartiküllerin <i>İn Vitro</i> Karakterizasyon Çalışmaları	119
4.11. <i>İn Vitro</i> Sitotoksite Çalışmaları	126
4.12. PD-1 ve TGF- $\beta$ İnhibisyonunun T Hücre İmmün Yanıtlarına Olan Etkisinin Değerlendirilmesi	128
4.13. Tümör Modelinin Geliştirilmesi, Nanopartiküllerin Uygulanması ve Tümörün Değerlendirilmesi	137
4.14. Biyodağılım Çalışmaları	140

<b>5. TARTIŞMA</b>	142
5.1. Galunisertibin Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu	142
5.2. Nivolumabın Fragmantasyonu ve Miktar Tayini Yöntemi Geliştirilmesi	144
5.3. Polimerik Nanopartiküllerin Üretimi ve Karakterizasyonu	145
5.3.1. Partikül Boyutu, Polidispersite İndeksi ve Zeta Potansiyelin Değerlendirilmesi	145
5.3.2. Enkapsülasyon Etkinliği ve Yükleme Kapasitesinin Değerlendirilmesi	149
5.3.3. Morfolojik Analiz	151
5.3.4. DSC Analizi	152
5.3.5. <i>İn Vitro</i> Salım Çalışmaları	152
5.4. Farklı Şekillerdeki Nanopartiküllerin <i>İn Vitro</i> Sitotoksosite Çalışmaları	154
5.5. Farklı Şekillerdeki Nanopartiküllerin Hücre İçine Alımının Değerlendirilmesi	155
5.6. Biyodağılım Çalışmaları	158
5.7. Optimum Şeklin Belirlenmesi	159
5.8. A549 Hücrelerinde EGFR Ekspresyonunun Gösterilmesi	162
5.9. Antikor Konjugasyon Çalışmaları	163
5.10. <i>İn Vitro</i> Sitotoksosite Çalışmaları	168
5.11. PD-1 ve TGF- $\beta$ İnhibisyonunun T Hücre İmmün Yanıtlarına Olan Etkisinin Değerlendirilmesi	168
5.11.1. PD-1 Bloklama Deneyleri	171
5.11.2. PKMH Canlılık Deneyi ( <i>İn Vivo</i> Deney Gruplarına İlişkin)	172
5.11.3. T Hücre Proliferasyon Deneyi ( <i>İn Vivo</i> Deney Gruplarına İlişkin)	173
5.11.4. CD8/NK Boncuk Temelli Çoklu Analiz Kiti ile Yapılan <i>İn Vitro</i> Sitokin Analizi	174
5.11.5. CD8/NK Boncuk Temelli Çoklu Analiz Kiti ile Yapılan <i>İn Vivo</i> Sitokin Analizi	179
5.11.6. <i>İn Vivo</i> Tümör Numunelerindeki Yüzey Farklılaşma Antijenlerinin Akım Sitometri ile Analizi	182
5.12. <i>İn Vivo</i> Çalışmalar Sonrası Tümörün Değerlendirmesi	185
5.13. Biyodağılımın Değerlendirilmesi	188
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	190
<b>7. KAYNAKLAR</b>	192

<b>8. EKLER</b>	225
<b>EK-1:</b> Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri	
<b>EK-2:</b> Dijital Makbuz ve Orijinallik Raporu	
<b>EK-3:</b> Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası	
<b>EK-4:</b> Tez Kapsamında Üretilen Yayın	
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>	236

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>°C</b>	Santigrat Derece
<b>µg</b>	Mikrogram
<b>µL</b>	Mikrolitre
<b>µm</b>	Mikrometre
<b>µM</b>	Mikromolar
<b>cm</b>	Santimetre
<b>Da</b>	Dalton
<b>dk</b>	Dakika
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>kg</b>	Kilogram
<b>MA</b>	Molekül Ağırlığı
<b>mg</b>	Miligram
<b>mL</b>	Mililitre
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mV</b>	Milivolt
<b>n</b>	Örneklem Sayısı
<b>ng</b>	Nanogram
<b>nm</b>	Nanometre
<b>pg</b>	Pikogram
<b>r<sup>2</sup></b>	Korelasyon Katsayısı
<b>rpm</b>	Dakikadaki Devir Sayısı
<b>sn</b>	Saniye
<b>SS</b>	Standart Sapma
<b>ABD</b>	Amerika Birleşik Devletleri
<b>AR</b>	En-Boy Oranı
<b>BCA</b>	Bikinkoninik Asit
<b>BSA</b>	Sığır Serum Albumini
<b>CD</b>	Yüzey farklılaşma antijenleri
<b>CD4+ T</b>	Yardımcı T Hücreci

<b>CD8+ T</b>	Sitotoksik T Hücresi
<b>CFSE</b>	Karboksifloresein Süksinimidil Ester
<b>CO<sub>2</sub></b>	Karbondioksit
<b>CTLA-4</b>	Sitotoksik T-Lenfosit İlişkili Antijen 4
<b>ÇNP</b>	Çubuk Şeklindeki Nanopartikül
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>DLS</b>	Dinamik Işık Saçılımı
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modifiye Eagle's Besiyeri
<b>DMF</b>	Dimetilformamid
<b>DMSO</b>	Dimetil Sülfoksit
<b>DSC</b>	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
<b>DSÖ</b>	Dünya Sağlık Örgütü
<b>EDNP</b>	Eliptik Disk Şeklindeki Nanopartikül
<b>EDTA</b>	Etilendiamin Tetraasetik Asit
<b>EE</b>	Enkapsülasyon Etkinliği
<b>EGF</b>	Epidermal Büyüme Faktörü
<b>EGFR</b>	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
<b>ELISA</b>	Enzim Bağlı İmmunosorbent Analizi
<b>EMA</b>	Avrupa İlaç Ajansı
<b>EMT</b>	Epitelyal Mezenkimal Geçiş
<b>EPR</b>	Artmış Geçirgenlik ve Tutulma
<b>FBS</b>	Fetal Sığır Serumumu
<b>FDA</b>	Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi
<b>FITC</b>	Florosein İzosiyanat
<b>His</b>	Histidin
<b>HPLC</b>	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
<b>HRP</b>	Yabanturbu Peroksidazı
<b>ICH</b>	Uluslararası Harmonizasyon Konseyi
<b>IdeS</b>	<i>Streptococcus pyogenes</i> 'ten üretilen immünoglobulin parçalayıcı enzim
<b>IFN</b>	İnterferon Gama
<b>IgG</b>	İmmünoglobulin G Antikoru

<b>IL</b>	İnterlökin
<b>IVIS</b>	<i>In vivo</i> Görüntüleme Sistemi
<b>i.v.</b>	İntravenöz
<b>İKNI</b>	İmmün Kontrol Noktası İnhibitörü
<b>KHDAK</b>	Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
<b>KNP</b>	Küresel Nanopartikül
<b>LOD</b>	Saptama Sınırı
<b>LOQ</b>	Tayin Sınırı
<b>mAb</b>	Monoklonal Antikor
<b>Mal</b>	Maleimit
<b>MFI</b>	Ortalama Floresan Yoğunluk
<b>MHC</b>	Majör Histokompabilite Kompleksi
<b>MTT</b>	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromür
<b>NCI</b>	Ulusal Kanser Enstitüsü
<b>NH<sub>2</sub></b>	Amin
<b>NK</b>	Doğal Öldürücü Hücre
<b>NP</b>	Nanopartikül
<b>OD</b>	Optik yoğunluk
<b>PBS</b>	Fosfat Tamponu Çözeltilisi
<b>PD-1</b>	Programlanmış Hücre Ölüm Proteini-1
<b>PDI</b>	Polidispersite İndeksi
<b>PD-L1</b>	Programlanmış Hücre Ölüm Ligandı-1
<b>PE</b>	Fikoeritrin
<b>PEG</b>	Polietilen Glikol
<b>PGA</b>	Poliglikolik Asit
<b>PI</b>	Propidyum İyodür
<b>PKMH</b>	Periferik Kan Mononükleer Hücreleri
<b>PLA</b>	Polilaktik Asit
<b>PLGA</b>	Poli (laktik-ko-glikolik asit)
<b>PMA</b>	Forbol 12-miristat 13-asetat
<b>PVA</b>	Polivinil alkol
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute

<b>SDS</b>	Sodyum Dodesil Sülfat
<b>SDS-PAGE</b>	Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamit Jel Elektroforezi
<b>SEM</b>	Taramalı Elektron Mikroskobu
<b>TCR</b>	T Hücre Reseptörleri
<b>TEM</b>	Transmisyon/Geçirimli Elektron Mikroskobu
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Dönüştürücü Büyüme Faktörü- $\beta$
<b>TNF</b>	Tümör Nekroz Faktör
<b>Treg</b>	Düzenleyici T Hücresi
<b>UV</b>	Ultaviyole
<b>VEGF</b>	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
<b>VK</b>	Varyasyon Katsayısı
<b>YK</b>	Yükleme Kapasitesi

## ŞEKİLLER

<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
2.1. 2020 yılı kanser tiplerine göre insidans grafiği.	5
2.2. Görülme sıklığına göre akciğer kanseri tipleri.	6
2.3. Kanser tedavisinde kullanılmak üzere araştırılan nano boyutlu ilaç taşıyıcı sistemlere örnekler.	12
2.4. İlaç taşıyıcı nanosistemlerin sınıflandırılması.	15
2.5. Farklı şekillerde nanopartiküllerin üretimi amacıyla yaygın kullanılan yöntemler.	19
2.6. Kanser hücrelerine ilaç taşıyıcı sistemlerin hedeflendirme mekanizmaları.	20
2.7. Tümör dokusunda EPR etkisi ile nanopartiküllerin birikimi.	21
2.8. KHDAK tedavisinin zaman içindeki gelişimi.	26
2.9. Kanser immünite döngüsünün şematik gösterimi.	27
2.10. T hücre ve antijen sunucu hücreler arasındaki reseptör ligand etkileşimleri	30
2.11. Anti-PD-1 antikoru etki mekanizması.	31
2.12. Antikor fragman çeşitleri.	32
2.13. TGF- $\beta$ sinyali ve kanserdeki rolü.	33
2.14. Galunisertib etki mekanizmasının şematik gösterimi.	34
2.15. Galunisertibin kimyasal şekli.	35
3.1. Antikorların IdeS ile fragmantasyonu.	46
3.2. Fragmantasyonun doğrulanması amacıyla yapılan SDS-PAGE analizi. A: numunelerin tatbiki; B: Elektrik akımı uygulaması.	48
3.3. BCA protein analizi için BCA-bakır kompleksinin oluşumu.	49
3.4. Sandviç ELISA ile nivolumabın miktar tayininin şematik gösterimi.	50
3.5. ELISA analizinin son basamağında pH'ya bağlı gözlenen renk değişimi.	51
3.6. Çift emülsifikasyon/çözücü buharlaştırma yöntemi ile nanopartikül üretiminin şematik gösterimi.	53
3.7. Çubuk ve eliptik disk şeklindeki nanopartiküllerin üretiminde kullanılmak üzere hazırlanan küresel nanopartikül yüklü PVA film.	54
3.8. Lusiferin ile biyoluminesans ışımaya reaksiyonu oluşum mekanizması.	62
3.9. A549-Luc2 hücre enjeksiyonunu takiben onuncu günde tümör oluşumu takibi: A. Subkütan hücre hattı enjeksiyonu yapılan farede	63

	oluşan tümörün görüntüsü; B. Subkütan hücre hattı enjeksiyonu yapılan farede IVIS ile tümör oluşumu takibi; C. İntravenöz hücre hattı enjeksiyonu yapılan farede IVIS ile tümör oluşumu takibi.	
3.10.	Tümör oluşturulması amacıyla farelere A549-Luc2 hücrelerinin subkütan enjeksiyonu.	64
3.11.	Heterotopik KHDAK tümör modeli geliştirilen farelerin IVIS ile görüntülenmesi.	65
3.12.	CD-1 nude farenin sırtında oluşturulan tümör.	66
3.13.	PLGA-PEG-Maleimit kopolimer yapısı.	68
3.14.	Antikor üzerindeki primer amin grubunun tiyol grubuna dönüştürülmesi.	68
3.15.	Nanopartiküllere tiyole antikor konjugasyonunun şematik gösterimi.	69
3.16.	Kan numunesinden PKMH izolasyonunun şematik gösterimi.	73
3.17.	T hücre proliferasyonu ölçüm prensibinin şematik gösterimi.	76
3.18.	CD8/NK boncuk temelli ELISA kit prosedürü şematik gösterimi.	79
3.19.	Nude farelerde PKMH ile humanizasyon işleminin şematik gösterimi.	81
3.20.	İnsan KHDAK hücre hattının (A549-Luc2) optik mikroskoptaki görüntüsü.	81
3.21.	T175 flaskta bulunan hücrelerin kaldırılması ve tek bir falkon tüpte toplanmasına ilişkin görsel.	82
3.22.	CD-1 nude farelere subkütan olarak A549-Luc2 hücrelerinin uygulanması.	82
4.1.	Galunisertibin 1:9 (h/h) oranında DMSO:su içerisindeki UV spektrumunun üç boyutlu görüntüsü.	87
4.2.	Galunisertibe ilişkin (100 µg/mL) HPLC kromatogramı.	88
4.3.	Galunisertibe ilişkin kalibrasyon doğrusu ve denklemi.	88
4.4.	Galunisertib için geliştirilen HPLC yönteminin özgünlüğüne ilişkin kromatogram.	91
4.5.	Bütün ve fragmente edilmiş nivolumaba ilişkin SDS-PAGE bantları: 1. PageRuler™ protein merdiveni (10-180 kDa aralığında bantlara sahip); 2. Bütün nivolumab antikor; 3. IdeS enzimi ile 1 saat inkübasyon sonrası elde edilen F(ab') <sub>2</sub> ve Fc fragmanları karışımı.	93
4.6.	Antikor fragmanlarına uygulanan ultrafiltrasyon işlemi sonrası elde edilen SDS-PAGE bantları: A1 ve B1. PageRuler™ protein merdiveni; A2. 50 kDa ultra filtreden süzülen F(ab') <sub>2</sub> ve Fc antikor fragmanı karışımı; B2. 100 kDa filtreden süzülen F(ab') <sub>2</sub> ve Fc antikor fragmanı karışımı.	94

4.7.	BSA ve fragmanite nivolumabın farklı konsantrasyonlardaki standart/numunelerine ilişkin BCA analizi plaka görüntüsü.	95
4.8.	BSA standartları için BCA tayini sonucu elde edilen kalibrasyon doğrusu.	96
4.9.	Fragmanite nivolumab standartları için BCA tayini sonucu elde edilen kalibrasyon doğrusu.	96
4.10.	ELISA analizine ilişkin kalibrasyon eğrisi.	97
4.11.	PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG KNP'ye ilişkin partikül boyutu ve polidispersite indeksi.	99
4.12.	PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG KNP'ye ilişkin zeta potansiyel dağılımı.	99
4.13.	PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG ÇNP'ye ilişkin partikül boyutu ve polidispersite indeksi.	100
4.14.	PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG ÇNP'ye ilişkin zeta potansiyel dağılımı.	100
4.15.	PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG EDNP'ye ilişkin partikül boyutu ve polidispersite indeksi.	101
4.16.	PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG EDNP'ye ilişkin zeta potansiyel dağılımı.	101
4.17.	PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG KNP'ye ilişkin TEM analiz görüntüsü.	103
4.18.	PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG ÇNP'ye ilişkin TEM analiz görüntüsü.	104
4.19.	PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG EDNP'ye ilişkin TEM analiz görüntüsü.	104
4.20.	Etkin maddelerin fiziksel karışımı, etkin maddeler ve boş nanopartiküllerin fiziksel karışımı ve kombine etkin madde yüklü PLGA nanopartiküllerine ilişkin DSC termogramları.	105
4.21.	Farklı şekillerdeki PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-G-NF(ab') <sub>2</sub> nanopartiküllerinden galunisertibin <i>in vitro</i> salım profili.	107
4.22.	Farklı şekillerdeki PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-G-NF(ab') <sub>2</sub> nanopartiküllerinden nivolumabın <i>in vitro</i> salım profili.	108
4.23.	Farklı şekillerdeki nanopartiküllerle gerçekleştirilen MTT testine ilişkin % canlılık sonuçları.	109
4.24.	A549-Luc2 hücre içine alım deneyi akım sitometri analiz sonuçları.	110
4.25.	A549-Luc2 hücre içine alım deneyi floresan mikroskop sonuçları.	111
4.26.	IVIS cihazı ile görüntüleme için CD-1 nude farelerden sakrifiye işlemi sonrası elde edilen doku ve organlar: A. Beyin ve kemik iliği çıkarılan ilk grup fareler için temsili görüntü; B. Beyin ve kemik iliği çıkarılmayan ikinci grup fareler için temsili görüntü.	112

4.27.	Sıra ile akciğer, kalp, karaciğer, dalak, böbrekler ve tümör dokusu çıkarılan farelerin IVIS görüntüsü.	112
4.28.	Polimer çözeltisi ve nanopartiküllerin organlardaki biyodağılımı.	113
4.29.	A549-Luc2 hücrelerinde EGFR ekspresyon düzeyini gösteren akım sitometri görüntüsü.	117
4.30.	BCA testi ile protein miktar tayinininde kullanılan kalibrasyon doğrusu ve denklemi.	118
4.31.	PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG KNP'nin partikül boyutu ve polidispersite indeksi.	120
4.32.	PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG KNP'nin zeta potansiyel dağılımı.	121
4.33.	PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR KNP'nin partikül boyutu ve dağılımı.	121
4.34.	PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR KNP'nin zeta potansiyel dağılımı.	122
4.35.	PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR-G-N KNP'nin partikül boyutu ve polidispersite indeksi.	122
4.36.	PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR-G-N KNP'nin zeta potansiyel dağılımı.	123
4.37.	PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR KNP'ye ilişkin SEM analiz görüntüsü.	123
4.38.	pH 6,8 ve 7,4 koşullarında PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-G-NF(ab') <sub>2</sub> KNP ve PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR-G-NF(ab') <sub>2</sub> KNP'den galunisertib (A) ve fragmante nivolumaba (B) ilişkin salım profilleri.	125
4.39.	pH 5,5 ve 7,4 koşullarında PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR-G-N KNP'den galunisertib ve nivolumaba ilişkin salım profilleri.	126
4.40.	Konjugasyonun sitotoksisite üzerine etkisi.	127
4.41.	Galunisertibin farklı konsantrasyonları için PKMH üzerindeki canlılığın değerlendirilmesi.	129
4.42.	PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR KNP ve PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR-N KNP'nin PKMH canlılığı üzerine etkisi.	129
4.43.	PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR KNP ve PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR-N KNP'nin T hücre proliferasyonu üzerine etkisi.	130
4.44.	Bütün ve fragmante nivolumabın T hücreleri yüzeyinde bulunan PD-1 reseptör blokajına etkileri.	130
4.45.	Nivolumabın çözelti ve nanopartiküle yüklü halde PD-1 bloklama üzerine etkisinin değerlendirilmesi.	131

4.46.	Nivolumabın çözelti ve nanopartiküle yüklü halde T hücre proliferasyonu üzerine etkisinin değerlendirilmesi.	132
4.47.	<i>İn vivo</i> deneyde kullanılacak nanopartikül ve çözelti gruplarına ilişkin PKMH canlılık yüzdeleri.	132
4.48.	<i>İn vivo</i> deneyde kullanılacak nanopartikül ve çözelti gruplarına ilişkin T hücre proliferasyon yüzdeleri.	133
4.49.	<i>İn vitro</i> numuneler için CD8/NK boncuk temelli çoklu analiz kiti ile yapılan sitokin analizi sonuçları.	134
4.50.	<i>İn vivo</i> tümör numuneleri için CD8/NK boncuk temelli çoklu analiz kiti ile yapılan sitokin analizi.	135
4.51.	<i>İn vivo</i> tümör numuneleri için CD biyobelirteçlerinin akım sitometri ile analizi.	136
4.52.	Farelerde heterotopik tümör gelişiminin IVIS ile takibi.	137
4.53.	Sakrifiye edilen farelerden elde edilen tümör dokularına ilişkin temsili görüntüler.	138
4.54.	Tedavi süresince farelerin ağırlıklarındaki değişim.	139
4.55.	Tedavi sürecince farelerdeki tümör dokusunun boyutlarında değişim.	139
4.56.	Tümör modeli geliştirilen humanize nude farelerin IVIS ile biyoluminesans görüntülemesi: A. PLGA-FPI749/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR KNP uygulanan grup; B. PLGA-FPI749/PLGA-His/PLGA-PEG-İzo KNP uygulanan grup.	140
4.57.	Tümör modeli geliştirilen humanize nude farelerde nanopartiküllerin organlardaki birikiminin IVIS ile görüntülenmesi: A. PLGA-FPI749/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR KNP uygulanan grup; B. PLGA-FPI749/PLGA-His/PLGA-PEG-İzo KNP uygulanan grup.	141
4.58.	Antikor konjuge floresan özellikli nanopartiküllerin biyodağılımı.	141

## TABLOLAR

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa</b>
2.1. KHDAK tedavisinde kullanılan FDA onaylı kemoterapötikler.	8
2.2. KHDAK tedavisinde son gelişmelere örnekler.	9
2.3. FDA ve EMA onaylı nanosistem örnekleri.	13
2.4. KHDAK tedavisi amacıyla araştırılan nanofarmasötiklere örnekler.	15
2.5. Tez kapsamında kullanılan polimerler.	18
2.6. İlaç taşıyıcı sistemlerde aktif hedefleme amacıyla kullanılan hedefleme ligandları.	24
2.7. KHDAK evre III/IV popülasyonu tedavisinde kullanılan FDA onaylı immün kontrol noktası inhibitörlerine örnekler.	28
3.1. Galunisertibin HPLC ile miktar tayininde kullanılan analiz koşulları.	42
3.2. Çift emülsifikasyon/çözücü buharlaştırma yöntemi ile boş veya kombine etkin madde yüklü nanopartikül üretimi için gerekli faz bileşimi ve miktarları.	52
3.3. Partikül büyüklüğü analizine ilişkin çalışma koşulları.	55
3.4. DSC analiz koşulları.	57
3.5. DSC analizi amacıyla hazırlanan numunelerin bileşimi.	57
3.6. Salım deneylerine ilişkin bilgiler.	58
3.7. <i>In vivo</i> biyodağılım deney grupları.	66
3.8. Polimerik nanopartiküllere ilişkin formülasyon kodları.	85
4.1. Galunisertib için deney içi ve deneyler arası % geri kazanım değerleri.	89
4.2. Galunisertib için HPLC ile tekrarlanabilirliğin değerlendirilmesi.	90
4.3. Galunisertib için HPLC ile tekrar elde edilebilirliğin değerlendirilmesi	90
4.4. Galunisertibe ilişkin stabilite analiz sonuçları.	92
4.5. Nivolumab 4PL kalibrasyon eğrisine ilişkin değerler.	97
4.6. Farklı geometrik şekillerdeki boş ve etkin madde yüklü nanopartiküllere ilişkin partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri.	98
4.7. Farklı geometrik şekillerdeki nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinlikleri ve yükleme kapasitelerinin değerlendirilmesi.	102
4.8. Farklı şekillerdeki nanopartikül formülasyonlarına ilişkin <i>in vitro</i>	114

ve *in vivo* karakterizasyon sonuçları.

- |              |   |     |
|--------------|---|-----|
| <b>4.9.</b>  | Konjugasyonun doğrulanması amacıyla yapılan BCA analizine ilişkin veriler.              | 119 |
| <b>4.10.</b> | Nanopartiküllerin partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel değerleri. | 120 |
| <b>4.11.</b> | Konjugasyonun enkapsülasyon etkinliği ve yükleme kapasitesine olan etkisi.              | 124 |

## 1. GİRİŞ

Kanser, son yıllarda yeni terapötiklerin geliştirilmesindeki ilerlemelere rağmen, artan prevalans, morbidite ve mortalite nedeniyle, dünya genelinde hala en yaygın ölüm nedenleri arasında yer almaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre akciğer kanseri en sık teşhis edilen ikinci ve ölüm oranı en yüksek kanser tipidir. Temel olarak, küçük hücreli (% 15) ve küçük hücreli dışı (% 85) olarak ikiye ayrılan akciğer kanserinin tedavi yaklaşımları, bu tiplerin özelliklerine göre belirlenmektedir.

Küçük hücreli dışı akciğer kanseri'nin (KHDAK) tedavisi, kanserin evrelerine göre farklılık göstermektedir. Erken evrelerde cerrahi ile tedavi sağlanabilirken, III. ve IV. evrelerde cerrahi, kemoterapi, radyoterapi ve immünoterapi yaklaşımları birlikte uygulanabilmektedir. Bu tedavi yöntemlerinin, zayıf terapötik etkinlik, spesifik olmayan etkileşimler ve sağlıklı dokularda toksik yan etkiler gibi sakıncaları mevcuttur. Erken evrelerde tümörün cerrahi olarak çıkarılması günümüzde genellikle başarılı bir seçenek olarak uygulanırken, ilk kez teşhis edilen hastaların % 70'inin, lokal ileri evre ya da metastatik akciğer kanseri olduğu gözlenmektedir. Bu durum cerrahi seçeneğini ortadan kaldırmaktadır.

Son yıllarda tanı ve tedavideki gelişmelere rağmen, hastalığın geç teşhis edilmesi, metastaza eğilim, sınırlı cerrahi seçeneği, tümör heterojenliği, tedaviye direnç gösterilmesi, hastaların yaşam kalitesini yüksek düzeyde etkileyen yan etkiler ve yüksek mortalite riski nedenleriyle bu alandaki yeni ilaç ve tedavi araştırmaları yoğun bir şekilde devam etmektedir. Yeni bir tedavi yaklaşımı olarak yakın zamanda tedavide yer almaya başlayan immünoterapi, bazı KHDAK hastalarında umut verici sonuçlar göstermiş olsa da her hasta tedaviye aynı derecede olumlu yanıt vermemektedir. Tez kapsamında bilinen sakıncalara çözüm önerisi sunabilecek özellikte bir ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmesi amaçlanmıştır.

TGF- $\beta$ , hücre büyümesi, doku onarımı ve bağışıklık sistemi düzenlemesi gibi çeşitli biyolojik süreçleri kontrol eden bir sinyal yolağında rol almaktadır. Başlangıçta, tümör baskılayıcı olarak işlev gören bu sitokin (TGF- $\beta$ ), daha sonra inflamasyon, anjiyogenez, bağışıklıktan kaçış ve kötü huylu hücrelerin invazyon ve metastaz potansiyellerini artırarak kanserin tüm vücuda yayılmasına yol açabilmektedir. Bu nedenle, TGF- $\beta$  inhibisyonu, güncel bir antikanser tedavi yaklaşımı olarak

araştırılmaktadır.

Bağışıklık hücreleri üzerinde bulunan immün kontrol noktası reseptörleri (PD-1, CTLA-4) sağlıklı hücreleri bağışıklık sisteminin aşırı tepki ve otoreaktif saldırılarından korurken, kanser hücreleri üzerindeki ligandlar bu mekanizmayı kullanarak bağışık yanıtı kaçabilmektedir. İmmün yanıtı yeniden aktive etmek için kullanılan immün kontrol noktası inhibitörleri (İKNİ), diğer bağışıklık hücrelerinin yanı sıra T hücrelerini hedef alarak kanser hücrelerine karşı immün yanıtı artırmayı amaçlamaktadır. Yüksek üretim maliyetleri sebebiyle İKNİ, sadece gelişmiş ülkelerde bir tedavi seçeneği olarak sunulmaktadır. Nivolumab (Opdivo®), Programlanmış Hücre Ölüm Proteini-1 (PD-1) reseptörünü bloke eden, Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (FDA) onaylı, immün kontrol noktası inhibitörlerinden biridir. İKNİ ile tedavide başlangıçta yanıt alınabilirken ileri dönemlerde tedaviye direnç gelişebilmesi nedeniyle, bu duruma çözüm olabilecek immünoterapötik ve/veya kemoterapötiklerle kombine tedavi seçeneği klinik araştırmalarla test edilme aşamasındadır. Bu proje ve tez kapsamında, galunisertib ve nivolumab, ilk kez kombine halde ilaç taşıyıcı sisteme enkapsüle edilerek KHDAK'ye hedeflendirilmeye çalışılmıştır.

Tezin amacı doğrultusunda, immünoterapötiklerin KHDAK tedavisindeki etkinliğinin artırılması planlanmış, FDA ve Avrupa İlaç Kurumu (EMA) onaylı bir polimer olan poli (laktik-ko- glikolik asit) (PLGA)'nın, poli (etilen glikol) (PEG), maleimit (Mal) ve histidin (His) ile modifiye edilmiş formları kullanılarak, galunisertib ve immün kontrol noktası inhibitörü nivolumabın kombine halde yüklendiği nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanmış ve tümöre hedeflendirme amacıyla nanopartiküller anti-EGFR ile konjuge edilmiştir. Tez kapsamında küresel nanopartiküllere ek olarak, modifiye edilen film germe yöntemi ile çubuk ve eliptik disk şeklinde nanopartiküller üretilmiş ve şeklin çeşitli parametreler üzerine etkisi incelenmiştir. Epidermal büyüme faktörü reseptörü (*Epidermal Growth Factor Receptor*, EGFR), KHDAK hücrelerinin yüzeyinde yüksek düzeyde bulunan bir membran reseptörüdür. Günümüzde, EGFR antagonistleri özellikle EGFR mutasyonu olan metastatik KHDAK'nin tedavisinde kullanılmaktadır. İnhibitörlerin EGFR'ye bağlanması, tümör hücrelerinin büyümesini yavaşlatmakta ya da durdurmaktadır. EGFR sinyal yolağı, insan epitelyal kanserlerinde tanımlanan ilk onkojenik etmendir. Tüm bu nedenlerden dolayı, hedeflendirme ligandı olarak

kullanılacak olan anti-EGFR antikorunun, bu fonksiyonuna ek olarak antikanser etkisinin de olabileceği öngörülmektedir.

Farklı şekilli nanopartiküllere ilişkin bilimsel araştırmaların başlama ve literatüre dahil olma süreci incelendiğinde, canlı organizmaların *in vivo* ortamdaki davranışlarının, araştırmacılara ilham kaynağı olduğu görülmektedir. Çok farklı şekillere sahip patojenlerin fagositik hücrelerden kaçışı, uzun süre kan dolaşımında kalışı ve yüksek miktarda hücre içine alım gibi özelliklerinden yola çıkılarak, farklı şekillerdeki nanopartiküllerin küresel nanopartiküllere kıyasla üstün özelliklere sahip olabileceği fikri oluşmuştur. Bu düşüncelerden yola çıkılarak küresel partiküllerin yanında çubuk ve eliptik disk şeklinde nanopartiküller de hazırlanarak *in vitro* ve *in vivo* parametreler üzerine etkileri incelenmiş ve tedavi için optimum şekle karar verilmiştir.

İki aşamalı olan bu tez çalışmasında araştırma hipotezimiz; küçük hücreli dışı akciğer kanseri tedavisinde kemoterapötik küçük molekül ile immünoterapötik makromolekülü kombine olarak içeren, EGFR reseptörü hedefli polimerik nanopartiküllerin immün yanıt etkinliğini *in vitro* ve *in vivo* koşullarda artırılabilenidir.

Hipotez doğrultusunda tezin amaçları sıralanırsa:

- Nanopartiküllerin şeklinin *in vitro* ve *in vivo* parametreler üzerine etkinliğinin değerlendirilmesi,
- Hazırlanan nanopartiküllerin, partikül boyutu, şekli ve pasif hedeflendirme stratejisi ile tümör bölgesine ulaşabilecek kadar uzun süre kan dolaşımında kalması,
- Nivolumabın  $F(ab')_2$  fragmanı elde edilerek nanopartiküllere enkapsülasyonunun artırılması,
- Yüzeyinde taşıdığı hedeflendirme ligandı sayesinde tümör hücrelerinin yüzeyinde lokalize olması,
- Polimerin yapısındaki aside duyarlı modifikasyon sayesinde asidik tümör mikroçevresinde artan, pH'ya bağlı kontrollü etkin madde salımı,
- İlaç taşıyıcı sisteme, galunisertib ve PD-1 reseptör blokörü olan nivolumabın kombine halde enkapsülasyonu ile, mevcut tedavide kullanılan ve hastalardaki başarı oranı % 25 olan nivolumabın etkinliğinin galunisertib ile artırılması

amaçlanmıştır.

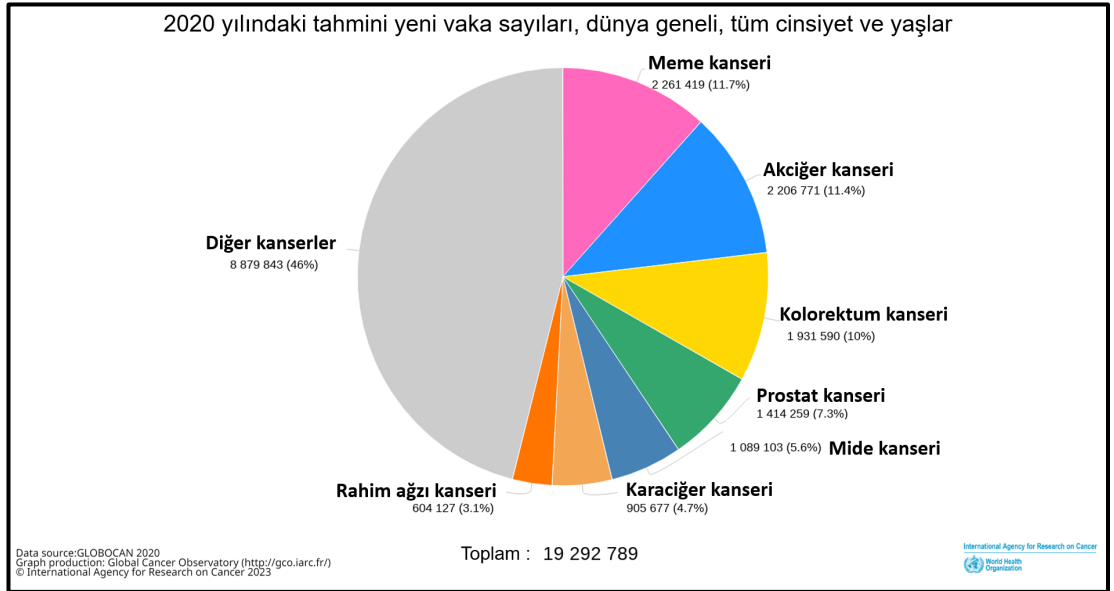
Çift emülsifikasyon/çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak hazırlanan nanopartiküller ile tek bir sistem içerisine iki farklı çözünürlük profiline sahip maddenin (galunisertib ve nivolumab) enkapsülasyonu sağlanmıştır. İlerleyen aşamalarda, optimize edilen ilaç taşıyıcı sisteme anti-EGFR antikorunun konjugasyonu gerçekleştirilerek, kombine etkin madde yüklü nanopartiküllerin tedavideki etkinliği, konjugasyon yapılmayan grupla *in vivo* ortamda kıyaslanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Akciğer Kanseri

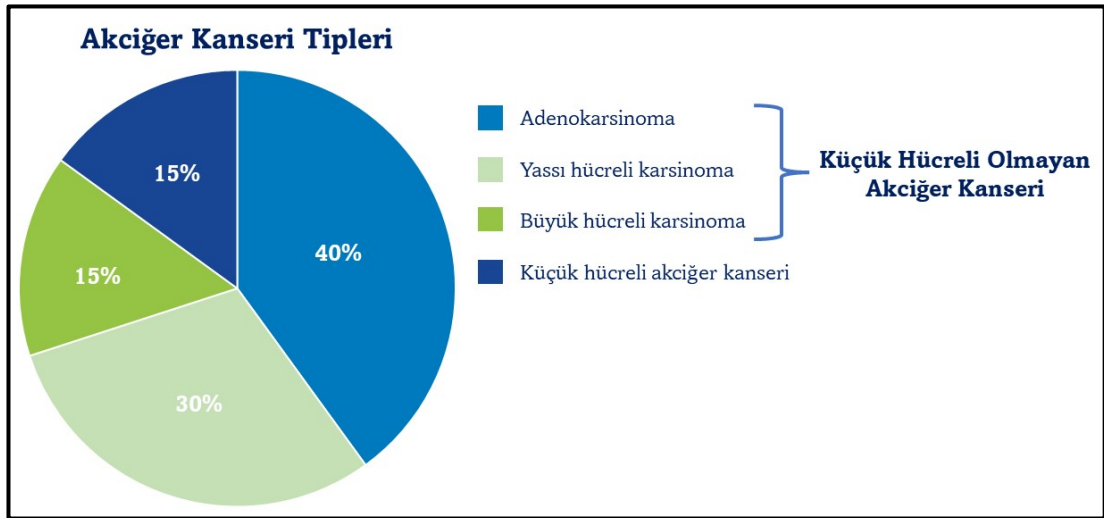
Ulusal Kanser Enstitüsü'nün tanımına göre kanser, vücuttaki bazı hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyüdüğü ve vücudun diğer bölgelerine yayıldığı bir hastalıktır. Hücre bölünmesinin doğal sürecinde meydana gelen patofizyolojik değişiklikler, kanserli hücre oluşumunu tetiklemektedir (1). Zaman içinde bu hücreler kan ve lenf sistemi yoluyla vücudun diğer bölgelerine yayılarak veya metastaz yaparak hastalığa karşı tedavi seçeneklerini daha da zorlaştırarak sınırlamaktadır (2, 3). Dünya çapında önemli bir halk sağlığı problemi olan kanserin kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci en yaygın ölüm nedeni olduğu bilinmektedir. Özellikle, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde kanser teşhisi konulan hasta sayısında önemli bir artış gözlenmektedir (3, 4), nüfusun yaşlanması ve büyümesi gibi demografik değişikliklerin güçlü etkisi nedenleriyle de önümüzdeki yıllarda kanser insidansının daha da artacağı ve 2025 yılına kadar yılda 20 milyondan fazla yeni kanser vakasının oluşacağı öngörülmektedir (5, 6).

DSÖ 2020 verilerine göre, yılda 2,2 milyondan fazla vaka sayısı ile akciğer kanseri, dünya genelinde ikinci en sık görülen ve en yüksek ölüm oranına sahip kanser tipidir (Şekil 2.1.) (7, 8).



Şekil 2.1. 2020 yılı kanser tiplerine göre insidans grafiği (9).

Sigara ve tütün ürünlerinin kullanımı, akciğer kanseri vakalarının yaklaşık % 90'ında gözlenen ortak risk faktörleridir. Diğer risk etmenleri arasında; radon gazı, asbest, hava kirliliği, iş yerlerinde kullanılan kimyasal maddelere maruziyet, genetik faktörler ve kronik enfeksiyonlar gibi diğer faktörler sayılmaktadır (10). Özellikle gelişmiş ülkeler, bu bilgiler doğrultusunda hava kirliliği ve tütün kullanımı ile ilgili yoğun bir mücadele içindedir. Akciğer kanseri, bronşların birçok farklı bölgesinde ortaya çıkabilen heterojenitesi yüksek bir kanser tipidir, bu nedenle anatomik konumuna bağlı olarak oldukça değişken semptom ve bulgular gösterebilmektedir. En yaygın semptomlar; öksürük, dispne (nefes darlığı), hemoptizi (kanlı öksürük), kilo kaybı ve anoreksi (iştahsızlık) şeklinde sıralanabilmektedir (11). Akciğer kanseri, farklı şekilde büyüyen ve yayılan hücrelerin histolojik görünümüne göre iki temel alt sınıfa ayrılmaktadır: küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) (Şekil 2.2.) (10-12).



**Şekil 2.2.** Görülme sıklığına göre akciğer kanseri tipleri (13).

Akciğer kanserinde klinik sonuçlar, teşhis anındaki kanser evresiyle doğrudan ilişkilidir. Örneğin, evre I akciğer kanseri ile başvuran hastaların beş yıllık sağkalım oranı % 68,4 iken, evre IV akciğer kanseri ile başvuran hastaların beş yıllık sağkalım oranı % 5,8'dir. Çoğunlukla hastaların ilk teşhisi, daha düşük bir sağkalım ve artan semptom yükü ile ilişkili olan evre IV olmaktadır. Dolayısıyla agresif ve hızlı seyirli olan akciğer kanserine yönelik taramaların yapılması ve erken teşhisi, mortalite riskini önemli ölçüde azaltacaktır (14, 15). Akciğer kanseri için tedavi seçenekleri arasında cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, immünoterapi ve hedefe yönelik tedaviler yer

almaktadır (8, 10). Akciğer kanserinin bütün evrelerinde sistemik kemoterapinin sağkalım üzerindeki etkisi sınırlı olup, metastaz durumunda palyatif etkisi bulunmaktadır (16). Hastalık çoğunlukla geç teşhis edildiği için, tek bir farmakolojik ilaç grubu ile tedavi edilememekte ve tedavi için genellikle kompleks, kombinasyon terapiler uygulanmaktadır. Özetle hastalığın tedavisindeki ilerlemelere rağmen uzun süreli sağkalım oranları oldukça düşüktür (17).

### 2.1.1. Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri (KHDAK)

KHDAK, tüm akciğer kanseri vakalarının yaklaşık olarak % 85'ini oluşturmaktadır (12). Ulusal Kanser Enstitüsü (*National Cancer Institute*, NCI) verilerine göre sigara içmek, küçük hücreli dışı akciğer kanseri için en önemli risk faktörüdür. KHDAK'nin en önemli belirtileri arasında geçmeyen öksürük ve nefes darlığı bulunmaktadır. Hastalığın teşhisine yönelik çeşitli tanı testleri (göğüs röntgeni, bilgisayarlı tomografi taraması ve/veya PET-CT taraması (18)) yapılmakta ve testlerin sonuçları ve biyopsi ile kesin tanı konulmaktadır (19). Ek olarak EGFR, KRAS, ALK gibi tümör belirteçleri, akciğer kanserinin erken teşhisini ve kanserin spesifik alt tiplerini tespit etmek amacıyla kullanılabilir. Bu belirteçler aynı zamanda bireyselleştirilmiş tedavi ve prognoz tahmininde önemli bir öngörü sağlamaktadır (14). KHDAK, hücrelerin mikroskop altındaki histolojik görünüşüne göre üç gruba ayrılmaktadır: adenokarsinoma, yassı hücreli karsinoma, ve büyük hücreli karsinoma (20, 21). Evrelere göre inceleme yapıldığında, KHDAK, erken (evre I ve II) ve ileri/metastatik evre (evre III ve IV) olarak iki ana grup ile toplamda dört alt gruba ayrılmaktadır (14). Alt gruplar NCI tarafından IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB, IIIC, IVA ve IVB olarak kanserin ilerleme derecesine göre detaylandırılmıştır. Çoğu kanser tipi solid tümör yapısındadır. KHDAK, solid tümörlerin en agresif formlarından birini oluşturmaktadır (17) ve solid forma dönüşüm, dezmoplastik reaksiyon sonucu fibröz oluşumuna dayanmaktadır. Dezmoplazi, hücre dışı matriks proteinlerinin üretiminde (kolajen tip I, III ve IV; fibronektin; laminin; hiyalüronik asit vb.) önemli bir artış ve sonuçta yoğun bir fibröz bağ dokusunun oluşumu ile karakterizedir. Hücreler arasındaki artan yoğun basınç sebebiyle antikanser moleküllerin tümör hücrelerine ulaşımı engellenmektedir (22), bu durum da KHDAK'nin ilaçla tedavisinde zorluk oluşturmaktadır.

NCI'ya göre, KHDAK'de güncel tedavi seçenekleri; ameliyat, radyoterapi, kemoterapi, immünoterapi, lazer tedavisi, fotodinamik terapi, kriyocerrahi (çeşitli kimyasal maddelerin uygulanması ile tümörün lokal olarak soğutulması), elektrokoter (dokuyu yakarak kesme işlemi) ve hedefe yönelik tedavidir.

KHDAK tedavisinde FDA onaylı pek çok kemoterapötik (Tablo 2.1.), cerrahi veya radyoterapi sonrası tek başına veya diğer ilaçlarla kombine halde kullanılmaya devam edilmektedir (23). 2000'li yılların başından itibaren, platin temelli kombinasyon kemoterapiler, hedefe yönelik tedaviye duyarlı, mutasyon gözlenmeyen ileri evre KHDAK hastaları için ilk basamak tedavi olmuştur (24). Örneğin sisplatinin paklitaksel, gemsitabin, dosetaksel veya vinorelbin gibi diğer kemoterapötik ilaçlarla kombinasyonu, KHDAK'nin başlangıç tedavisi için kullanılmaktadır (25).

**Tablo 2.1.** KHDAK tedavisinde kullanılan FDA onaylı kemoterapötikler (23, 26).

İlaç (Ticari ürün)	Etki mekanizması
Sisplatin (Cisplatin®)	Alkilleyici madde
Karboplatin (Paraplatin®)	Alkilleyici madde
Mekloreタミン Hidroklorür (Mustargen®)	Alkilleyici madde
Doksorubisin Hidroklorür (Adryamycin®, Rubex®)	Topoizomeras inhibitörü
Gemsitabin Hidroklorür (Gemzar®)	Antimetabolit
Metotreksat (Trexall™, Rheumatrex®)	Antimetabolit
Pemetrekset Disodyum (Alimta®)	Antimetabolit
Dosetaksel (Taxotere®)	Mitotik inhibitör
Paklitaksel (Taxol®)	Mitotik inhibitör
Vinorelbin Tartrat (Navelbine®)	Tübülün bağlayıcı

Kemoterapötikler uzun yıllardır kullanılmasına rağmen dar bir terapötik indekse sahip olması, uzun süreli kullanımda istenmeyen yan etkilere ve ilaç direncine yol açması ve düşük tedavi etkinliği sebebiyle hedefe yönelik yeni tedavi seçenekleri araştırılmaya başlanmıştır (24, 25). Hedefe yönelik tedavi seçenekleri arasında; monoklonal antikorlar, tirozin kinaz inhibitörleri (TKİ), rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi (mTOR) inhibitörleri (örneğin; everolimus) ve KRAS G12C inhibitörleri (örneğin; sotorasib, adagrasib) olmak üzere 4 ana grup bulunmaktadır (19).

Günümüzde, hedefe yönelik ilaçlar çoğunlukla kemoterapi ile birlikte veya tek başına, ilerlemiş akciğer kanseri tedavisinde kullanılmaktadır (Tablo 2.2.) (27). Örneğin, nesitumumab, gemsitabin ve sisplatin ile kombine halde metastatik yassı hücreli KHDAK'nin birinci basamak tedavisinde kullanılmaktadır (28).

**Tablo 2.2.** KHDAK tedavisinde son gelişmelere örnekler (29).

<b>İlaç (Ticari ürün)</b>	<b>Grubu</b>	<b>Endikasyon</b>	<b>FDA onay tarihi</b>
<b>Pemetrekset</b> ( <i>Pemfexy</i> ®)	Kemoterapötik (folat antagonisti) (30)	Yassı hücreli olmayan ileri evre KHDAK	Şubat 2020
<b>Osimertinib</b> ( <i>Tagrisso</i> ®)	Kemoterapötik (EGFR tirozin kinaz inhibitörü) (31)	Cerrahi operasyon geçirmiş, EGFR ekzon 19 veya ekzon 21 L858R pozitif KHDAK	Aralık 2020
<b>Pralsetinib</b> ( <i>Gavreto</i> ®)	Kemoterapötik (kinaz inhibitörü)	MET* ekzon 14 mutasyonuna sahip metastatik KHDAK	Ekim 2020
<b>Nivolumab</b> ( <i>Opdivo</i> ®)	Anti-PD-1 antikoru	Neoadjuvan tedavi ile rezeke edilebilir KHDAK için platin çifti kemoterapisi ile kombine	Mart 2022
<b>Selpercatinib</b> ( <i>Retevmo</i> ®)	Kemoterapötik (kinaz inhibitörü)	FDA, RET* füzyonu pozitif lokal ileri veya metastatik KHDAK	Eylül 2022
<b>Durvalumab</b> ( <i>Imfinzi</i> ®) + <b>Tremelimumab</b> ( <i>Imjudo</i> ®) + <b>Kemoterapik madde kombinasyonu</b>	Anti-PD-L1 antikoru  Anti-CTLA-4 antikoru	Metastatik KHDAK	Kasım 2022
<b>Adagrasib</b> ( <i>Krazati</i> ®)	Kemoterapötik (RAS GTPaz ailesi inhibitörü)	KRAS G12C mutasyonlu lokal ileri veya metastatik KHDAK olan ve daha önce en az bir sistemik tedavi almış hastalar	Aralık 2022
<b>Pembrolizumab</b> ( <i>Keytruda</i> ®)	Anti-PD-1 antikoru	Evre IB, II veya IIIA KHDAK için cerrahi ve platin bazlı kemoterapiyi takiben adjuvan (koruyucu) tedavi	Ocak 2023
<b>Enkorafenib</b> ( <i>Braftovi</i> ®) + <b>Binimetinib</b> ( <i>Mektovi</i> ®)	Kemoterapötik	BRAF V600E mutasyonu taşıyan metastatik KHDAK	Ekim 2023

\*MET: Mezenkimal epitelyal geçiş, RET: *Rearranged during Transfection*.

Tedavi protokolüne karar verilirken temel kriter, kanserin evresi (tümörün büyüklüğü, akciğerdeki lokalizasyonu, tümörün hangi lenf düğümlerine yayıldığına göre belirlenir) olmakla birlikte hastanın genel sağlık durumu ve tedaviyi tolere edebilirliği de dikkate alınmaktadır (32).

Erken evre (evre I-II, bazı kaynaklara göre IIIA (14) da dahil edilir.) KHDAK için önerilen tedavi seçeneği cerrahidir (8, 15, 33). Radikal radyoterapi (tümörü tamamen yok etmek için uygulanan radyoterapi), lokalize KHDAK için bir diğer potansiyel küratif tedavidir. Cerrahinin uygun olmadığı evre II KHDAK hastaları için eş zamanlı kemo-radyoterapi önerilmektedir. Ayrıca, erken evre hastaların tedavisinde hedefe yönelik tedavi veya immünoterapinin rolü henüz netleşmemiştir (33).

Genellikle, ilk tanıda hastaların % 70'ine lokal ileri evre veya metastatik akciğer kanseri (evre III veya IV) teşhisi konulmakta ve hastalarının yaklaşık % 60'ında uzak metastaz (21) bulunmaktadır. Bu durumda cerrahi seçeneği ortadan kalkmaktadır (10, 12). Cerrahiye uygun (rezektabl) evre IIIA KHDAK'li hastalar için standart tedavi, cerrahi ve takibinde kemoterapiden oluşmaktadır. Cerrahiye uygun olmayan evre IIIA hastaları için radyoterapi, kemoterapi ve/veya cerrahinin bir kombinasyonu önerilmektedir (10). Bazı evre IIIA kanserler için diğer bir tedavi seçeneği de kemoterapi ve ardından cerrahi ile birlikte nivolumab kullanımıdır. Cerrahi, radyasyon ve kemoradyasyonun terapötik etkisinin yeterli olmayacağı düşünüldüğünde, immünoterapötikler (pembrolizumab, emiplimab vb.) ilk tedavi seçeneği olarak değerlendirilebilir (32).

Cerrahi ile tümörün vücuttan tamamen uzaklaştırılmadığı lokal ileri evre KHDAK'li (evre IIIA-B) hastalar için sisplatin/karboplatin gibi bir kombine kemoterapi, eş zamanlı olarak torasik radyoterapi kürü uygulanmaktadır. Bu kemoterapi ve radyoterapi rejimi ile birlikte klinikte kullanılan herhangi bir hedefe yönelik ilaç bulunmamaktadır (8). Cerrahi, radyasyon ve kemoradyasyonun terapötik etkisinin yeterli olmayacağı düşünülüyorsa, evre IIIA'da olduğu gibi immünoterapötikle tedavi ilk seçenek olarak değerlendirilebilir (32).

Son zamanlarda, özellikle immün kontrol noktası inhibitörlerinin keşfinden sonra, akciğer kanseri tedavisi büyük ölçüde iyileştirilmiştir. Adjuvan tedavi olarak atezolizumab (PD-L1 inhibitörü), evre II-III hastaların sağkalımına önemli katkı sağlamaktadır. Atezolizumab, 2021 yılında, cerrahi veya kemoterapi alan KHDAK

hastaları (evre II-III) için ek veya adjuvan tedavi olarak FDA tarafından onaylanmıştır. Ulusal Kanser Enstitüsü tarafından yürütülen ve devam etmekte olan büyük ölçekli bir klinik çalışma olan *ALCHEMIST (Adjuvant Lung Cancer Enrichment Marker Identification and Sequencing Trials)* ile adjuvan tedavi olarak hedefe yönelik veya immünoterapinin etkinliği hakkında yakın zamanda değerli bulguların sağlanacağı öngörülmektedir (33).

Evre IV tanısı almış hastalar için; cerrahi, kemoterapi, hedefe yönelik tedavi, immünoterapi ve radyasyon tedavisi semptomları hafifletmekte ve sağkalım süresinde az da olsa bir artış sağlayabilmektedir. Benzer amaçlarla fotodinamik terapi veya lazer terapisi de kullanılmaktadır (10, 32).

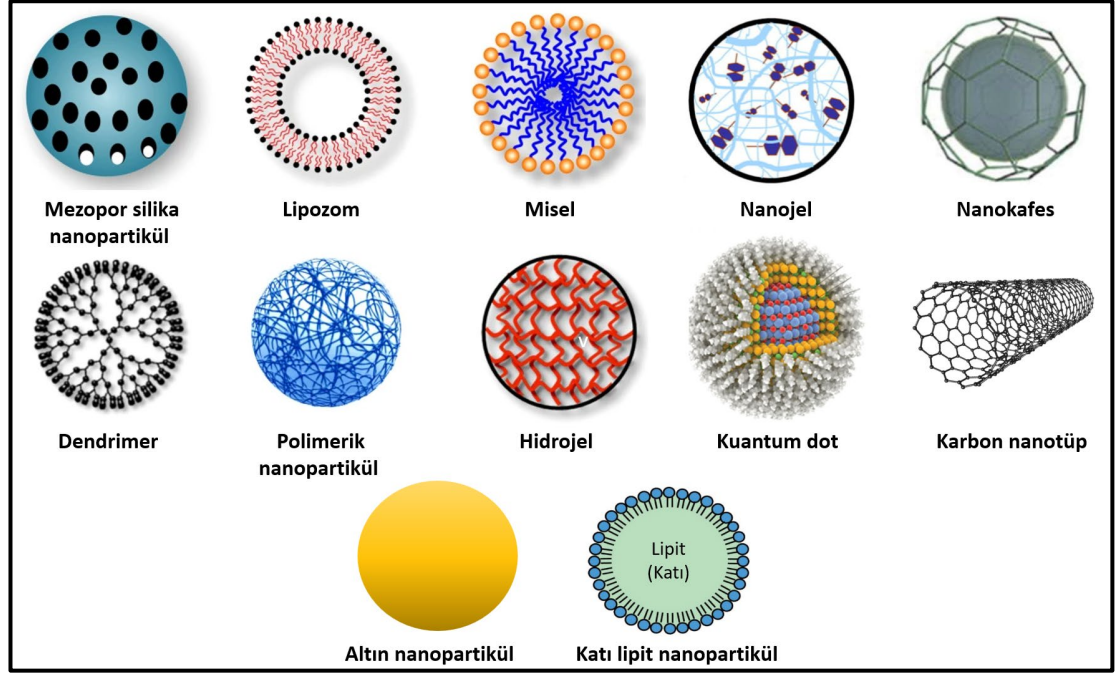
Sonuç olarak günümüzde tedavide çığır açıcı bir buluş olarak nitelendirilen immün kontrol noktası inhibitörleri ile sağkalım süresinde artış sağlanmasına rağmen, tüm hastalar immünoterapiden aynı derecede fayda görmemekte ve çoğu hastada hastalık ilerlemesini sürdürmektedir (12). KHDAK için immün kontrol noktası inhibitörleri ile gözlenen düşük tedavi etkinliğine çözüm olarak, günümüzde aşı geliştirme (Tedopi®, faz III, NCT02654587) çalışmaları devam etmektedir (34, 35).

Yukarıda açıklanan tüm sebepler, KHDAK için yapılan yenilikçi ilaç araştırmalarının önemini artırmaktadır. Söz konusu yeni tedavi seçeneklerinin etkin şekilde kullanılması için KHDAK yapısındaki uygun moleküler hedeflerin belirlenmesi ve optimum tedavi yaklaşımlarının en az yan etki veya toksisite ile uygulanması büyük önem taşımaktadır. Yakın zamanda pek çok nanosistem KHDAK tedavisinde kullanılmak amacıyla araştırılmıştır; ancak monoterapötik içeren nanopartikül (NP) formülasyonlarının kullanımı ile, KHDAK tedavisinde istenen sonuçlar elde edilememiştir (17). Bu sebeple tez kapsamında kombine etkin madde yüklemesi ile tedavi etkinliğinde artış planlanmış, hedefleme ligandı konjugasyonu ile en az yan etki ve artırılmış terapötik etki amaçlanmıştır.

## **2.2. Kanser Tedavisinde Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler**

Kanser karmaşık bir patofizyolojiye sahip olduğu için kemoterapide, düşük seçicilik, çoklu ilaç direnci, fizyolojik bariyerlerden düşük geçiş kabiliyeti gibi çeşitli zorluklarla karşılaşmaktadır (36). Geleneksel tedavi yöntemlerinin sınırlamalarının iyileştirilmesi amacıyla güncel stratejilerin geliştirilmesine ihtiyaç bulunmaktadır (3,

13, 37, 38). Bu amaçla, çok çeşitli nanosistemler hazırlanmakta (Şekil 2.3.) ve yoğun bir şekilde prelinik/klirik araştırmalar gerçekleştirilmektedir.



**Şekil 2.3.** Kanser tedavisinde kullanılmak üzere araştırılan nano boyutlu ilaç taşıyıcı sistemlere rnekler (39, 40).

Geleneksel kemoterapi ile kıyaslandığında nano boyutlu ilaç taşıyıcı sistemler ilaçların kanda kalış süresini artırma, tek bir taşıyıcıya sinerjistik etki için birden fazla ilacın enkapsülasyonu/adsorpsiyonu, peptit-protein gibi çabuk parçalanan yapıları kararlı bir şekilde hedef bölgeye taşıma, ilacın istenilen süre boyunca istenilen dozda kontrollü salımını sağlama, aktif ve pasif hedefleme ile sistemik yan etkilerin azaltılması, uyarılara (rneğin; sıcaklık, pH, enzim, manyetik alan) duyarlı ilaç taşıyıcı sistemler ile spesifik olarak tümör bölgesinde kontrollü/sürekli salım sağlama, kan-beyin bariyeri gibi biyolojik bariyerlerin açılması, hidrofobik veya düşük znrlğe sahip etkin maddelerin znrlğnn artırılması gibi çeşitli üstünlüklere sahiptir (41-44). Nanosistem temelli yaklaşımlar hedefleme sayesinde genellikle daha az toksiktir ve dolayısıyla hasta uyuncu daha yüksektir (45). Bu sistemler, özellikle kanser gibi teşhis ve tedavi seçenekleri kısıtlı olan hastalıkların tedavisine üzüm bulmak amacıyla uzun yıllardır araştırılmakta ve FDA tarafından onaylı 20 nanosistem rneği Tablo 2.3.'te yer almaktadır.

**Tablo 2.3.** FDA ve EMA onaylı nanosistem örnekleri.

Ticari ürün (Firma)	Nanosistem türü	Etkin madde(ler)	Hastalık/Kullanım amacı	Onay yılı	Referans
<b>CosmoFer®/INFeD®/Ferrisat®</b> (Pharmacosmos)	Demir dekstran kompleksi	Demir	<ul style="list-style-type: none"><li>• Demir eksikliği anemisi</li></ul>	1992	(46, 47)
<b>Doxil®/Caelyx™</b> (Janssen)	Nanolipozom	Doksorubisin HCl	<ul style="list-style-type: none"><li>• Multipl myelom</li><li>• AIDS ilişkili kaposi sarkomu</li><li>• Over (yumurtalık) kanseri</li></ul>	1995	(47, 48)
<b>Abelcet®</b> (Sigma-tau)	İlaç-lipit kompleksi	Amfoterisin B	<ul style="list-style-type: none"><li>• Mantar enfeksiyonları</li></ul>	1995	(49, 50)
<b>Feridex®</b> (Bayer)	Dekstran kaplı süperparamanyetik demir oksit kolloid	Demir oksit	<ul style="list-style-type: none"><li>• Manyetik rezonans görüntüleme sistemi</li></ul>	1996	(51)
<b>Copaxone®</b> (Teva)	Aminoasit polimer karışımı	Glatiramer asetat	<ul style="list-style-type: none"><li>• Multipl sklerozis (MS)</li></ul>	1996	(51)
<b>DepoCyt®</b> (Sigma-tau)	Nanolipozom	Sitarabin	<ul style="list-style-type: none"><li>• Lenfomatöz menenjit</li></ul>	1996	(49, 51)
<b>Ferrlecit®</b> (Sanofi)	Demir glukonat kolloid	Demir	<ul style="list-style-type: none"><li>• Kronik böbrek hastalığı olan hastalarda anemi tedavisi</li></ul>	1999	(46, 47)
<b>Venofer®</b> (Vifor)	Manyetik nanopartikül	Demir sükroz	<ul style="list-style-type: none"><li>• Kronik böbrek hastalarında demir replasmanı</li></ul>	2000	(50)
<b>Eligard®</b> (Tolmar)	PLGA nanopartikül	Löprolid asetat	<ul style="list-style-type: none"><li>• Prostat kanseri</li></ul>	2002	(50)
<b>Neulasta®</b> (Amgen)	Polimerik konjugat	Filgrastim	<ul style="list-style-type: none"><li>• Kemoterapi ilişkili nötropeni</li><li>• Myeloid olmayan maligniteler</li><li>• Proflaksi</li></ul>	2002	(49, 50)
<b>Emend®</b> (MSD)	Nanokristal	Aprepitant	<ul style="list-style-type: none"><li>• Antiemetik</li></ul>	2003	(49, 52)

**Tablo 2.3. (Devam)** FDA ve EMA onaylı nanosistem örnekleri.

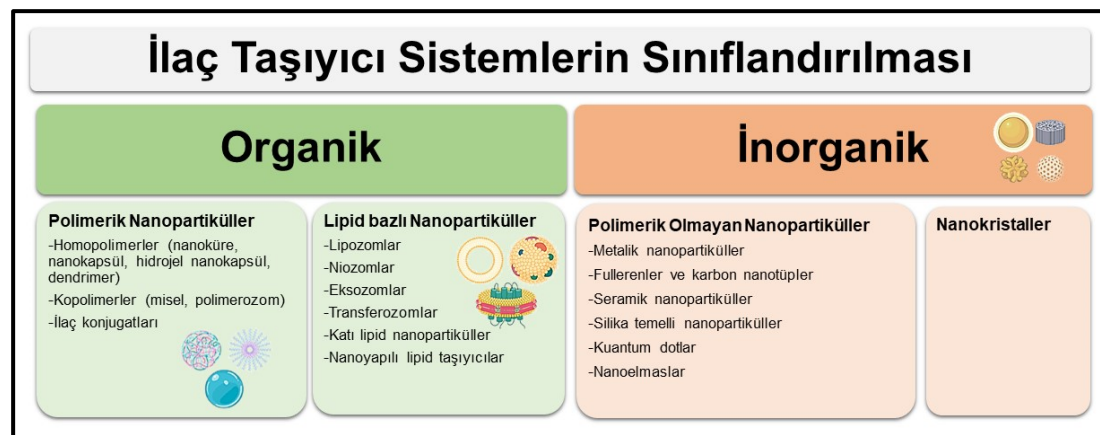
Ticari ürün (Firma)	Nanosistem türü	Etkin madde(ler)	Hastalık/Kullanım amacı	Onay yılı	Referans
<b>Macugen®</b> (Phizer)	PEGile anti-VEGF aptamer	Pegaptanib sodyum	<ul style="list-style-type: none"><li>• Neovasküler yaşa bağlı makula dejenerasyonu</li></ul>	2004	(53-55)
<b>Megace® ES</b> (Endo Pharms Inc)	Nanokristal	Megestrol	<ul style="list-style-type: none"><li>• Anoreksi</li><li>• Kaşeksi</li></ul>	2005	(51, 56)
<b>Abraxane®</b> (Abraxis BioScience and AstraZeneca)	Protein-ilaç nanokonjugatı	Paklitaksel	<ul style="list-style-type: none"><li>• Metastatik meme kanseri</li><li>• Metastatik KHDAK</li><li>• Metastatik pankreas adenokarsinomu</li></ul>	2005 2012 2013	(50, 57)
<b>Oncaspar®</b> (Enzon)	PEGile l-asparajinaz	Asparajinaz	<ul style="list-style-type: none"><li>• Akut lenfoblastik lösemi (ALL)</li></ul>	2006	(51, 54)
<b>Elestrin®</b> (Biosante)	Nanojel	Östradiol	<ul style="list-style-type: none"><li>• Vazomotor semptomlar/ menopoz döneminde ateş basması</li></ul>	2006	(57)
<b>Cimzia®</b> (UCB)	Polimerik konjugat	Sertolizumab pegol	<ul style="list-style-type: none"><li>• Crohn's hastalığı,</li><li>• Romatoid artrit,</li><li>• Psöriatik artrit,</li><li>• Ankilozan spondilit</li></ul>	2008 2009 2012 2013	(50, 52)
<b>Marqibo®</b> (Spectrum)	Nanolipozom (PEGile olmayan)	Vinkristin	<ul style="list-style-type: none"><li>• Philadelphia kromozom-negatif akut lenfoblastik lösemi (tersiyer)</li></ul>	2012	(58, 59)
<b>Adynovate®</b> (Baxalta)	Polimer-protein konjugatı	Antihemofilik faktör (rekombinant)	<ul style="list-style-type: none"><li>• Hemofili</li></ul>	2015	(49, 50, 55)
<b>Vyxeos®</b> (Jazz Pharma)	Nanolipozom	Daunorubisin ve sitarabin	<ul style="list-style-type: none"><li>• Akut miyeloid lösemi</li></ul>	2017	(60)

KHDAK tedavisi amacıyla çeşitli nanoformülasyonlar da klinik deneme aşamasındadır (Tablo 2.4.) (61).

**Tablo 2.4.** KHDAK tedavisi amacıyla araştırılan nanofarmasötiklere örnekler.

Tıbbi ürün/Klinik deney numarası	Nanosistem	İlaç	Klinik durum
<i>Lipoplatin</i>	Lipozom	Sisplatin	KHDAK için Faz III çalışmaları tamamlandı.
<i>NCT04033354</i>	Albumin – etkin madde konjugatı	HLX10 Nab-Paklitaksel	KHDAK için Faz III çalışmaları devam ediyor.
<i>NCT02667743</i>	Polimerik misel	Paklitaksel	KHDAK için Faz III çalışmaları devam ediyor.
<i>Lipusu/NCT02996214</i>	Lipozom	Paklitaksel	KHDAK için Faz IV çalışmaları devam ediyor.

Kanser tedavisinde, çok çeşitli polimerler, polisakkaritler, lipidler ve proteinler kullanılarak, amaca yönelik benzersiz yüzey, boyut, şekil ve morfolojik özelliklere sahip nanosistemler tasarlanabilmektedir (36). Nanosistemin hazırlanmasında kullanılan taşıyıcının türüne (polimerler, lipidler, inorganik nanotaşıyıcılar veya peptidler) bağlı olarak ilaç taşıyıcı sistemler sınıflandırılabilir (Şekil 2.4.) (62-64). Tez kapsamında PLGA temelli polimerik nanotaşıyıcı sistem hazırlandığı için, bu sistemler 2.2.1. başlığında detaylandırılmıştır.



**Şekil 2.4.** İlaç taşıyıcı nanosistemlerin sınıflandırılması.

Nanopartiküllerin yüzeyi, sistemin kan dolaşımındaki yarı ömrünü ve biyoyararlanımını optimize etmek veya nanosistemi spesifik bir dokuya hedeflemek üzere modifiye edilebilmektedir. Örneğin, nanopartiküller, bağışıklık sistemi bileşenleri tarafından opsonizasyon ve fagositozun azaltılmasını sağlamak ve

dolaşımında kalış sürelerini artırmak için PEG gibi bazı hidrofilik maddelerle kaplanabilmektedir (36, 43). PEG'in bu özelliğinden faydalanmak amacıyla tezde PEG ile modifiye edilmiş PLGA-PEG-Malemit polimeri tercih edilmiştir. Modifiye PLGA'nın uç bölümünde bulunan maleimit, nanopartiküllere hedefleme ligandının konjugasyonunu sağlamak amacıyla seçilmiştir.

### 2.2.1. Polimerik Nanopartiküller

Günümüzde yaygın şekilde çalışılan nanopartikül türü olan polimerik nanopartiküller, doğal veya sentetik polimerlerden oluşan, genellikle 1-1000 nm boyutlarında koloidal sistemlerdir (65, 66). Polimerik NP'ler, diğer nanopartikül türlerine kıyasla modifiye edilebilir kontrollü ve sürekli salım, doku ve hücrelerle biyouyumluluk, biyoparçalanırlık, amaca uygun yüzey modifikasyonu, yüksek stabilite, tekrarlanabilirlik gibi özelliklerinden dolayı ilaç taşıyıcı sistem olarak sıklıkla tercih edilmektedir. Bu amaçla hazırlanan nanopartiküllerde, terapötik madde(ler) polimerik matrisin içinde homojen dağıtılabılır veya enkapsüle edilebilir, aynı zamanda yüzeye adsorbe edilebilir veya konjuge edilebilir (63, 67).

Polimerik NP'lere yüklenecek ilacın fizikokimyasal özelliklerine veya uygulama yoluna bağlı olarak, NP'lerin üretimi için farklı yöntemler ve polimerler kullanılabilir. Genel olarak, önceden oluşturulmuş polimerlerin dispersiyonu veya monomerlerin polimerizasyonu olarak iki ana yöntem kullanılmaktadır. Tez kapsamında çalışılacak olan polimerin (PLGA) dispersiyonuna yönelik üretim yöntemleri; çözücü buharlaştırma, emülsifikasyon/çözücü difüzyonu, nanopresipitasyon, tuzla çöktürme (*salting-out*) olarak sıralanabilmektedir (65). Tez kapsamında kullanılacak olan etkin maddelerin sudaki çözünürlükleri dikkate alınarak çift emülsifikasyon/çözücü buharlaştırma yöntemi ile NP üretimi gerçekleştirilmiştir.

NP'lerin hazırlanmasında, toksisitenin en aza indirilmesi ve salım özelliklerinin optimize edilmesi amacıyla çoğunlukla biyolojik olarak parçalanabilen polimerler tercih edilmektedir. Yaygın olarak kullanılan biyoparçalanır sentetik polimerlere örnek olarak, poli (laktik asit) (PLA), poli (glikolik asit) (PGA), polikaprolakton (PCL) ve poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) verilebilmektedir (65).

### **Poli (laktik-ko-glikolik asit)**

PLGA, FDA ve EMA onaylı oluşu, biyouyumluluğu, uzun yıllar boyunca biyomedikal uygulamalarda güvenle kullanımı, günler, haftalar, hatta bazı durumlarda aylarca devam eden etkin madde salımı nedeniyle ilaç taşıyıcı sistemlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. PLGA'nın kopolimer oranları değiştirilerek (PLA:PGA) hidrofiliği veya hidrofobikliği artırılabilirken, farklı moleküler ağırlıkları kullanılarak salım özellikleri optimize edilebilmektedir (67). PLGA nanopartiküllerin yüzeyleri aktif hedefleme için kolayca modifiye edilebilir, bu da sistemik toksisite ve dolayısıyla yan etkileri en aza indirebilir ve ilaç direnci riskini azaltabilir. Örneğin, Adler ve arkadaşları (68), anti-EGFR monoklonal antikoru ile konjuge etkin madde yüklü PLGA NP'leri geliştirerek hücre yüzeylerinde EGFR'yi hedeflemenin, ilaç direncinin üstesinden gelmek ve EGFR'yi aşırı eksprese eden tümör hücreleri tarafından ilaç alımını artırmak için olası bir yol sunduğunu öne sürmüştür (69). Patel ve arkadaşları (70) tarafından yürütülen bir diğer çalışmada ise benzer şekilde dosetaksel yüklü PLGA nanopartiküllerine anti-EGFR antikoru konjugasyonu ile aktif hedefleme özelliği kazandırılmış ve bu nanopartiküller KHDAK kanserine yönelik hem *in vitro* (konjuge nanopartiküllerle daha yüksek hücre içine alım ve anti-proliferatif etki) hem de *in vivo* deney sonuçlarına (en yüksek antitümör etkinlik konjuge etkin madde yüklü NP'lerde) göre umut vaat eden sistemler olarak değerlendirilmiştir.

Yukarıda bahsedilen tüm üstünlüklerinden dolayı tez çalışmalarında temel olarak üç farklı PLGA türevi ile deneyler gerçekleştirilmiştir. Literatür incelemesi yapılarak optimum enkapsülasyon ve salım özellikleri elde etmek amacıyla PLGA'nın 50:50 (a/a) oranda PLA:PGA karışımı içeren formu ile çalışılmıştır (71, 72). Nanopartiküllerin kanda kalış süresini artırmak amacıyla PEG ile olan ve kovalan bağlarla ligand konjugasyonu sağlayan maleimit fonksiyonlu PLGA türevi tercih edilmiştir. Tüm bu üstünlüklere ek olarak asidik tümör mikroçevresinde pH'ya duyarlı salım gerçekleştirebilen histidinle modifiye edilmiş PLGA polimeri kullanılarak sağlıklı dokularda etkin madde salımının en aza indirilmesi amaçlanmıştır. Biyodağılım çalışmalarında organ/doku birikiminin görüntülenebilmesi amacıyla floresan işaretli PLGA türevleri ile çalışılmıştır. Seçilen PLGA türevlerine ilişkin ayrıntılı bilgiler Tablo 2.5.'te yer almaktadır.

**Tablo 2.5.** Tez kapsamında kullanılan polimerler.

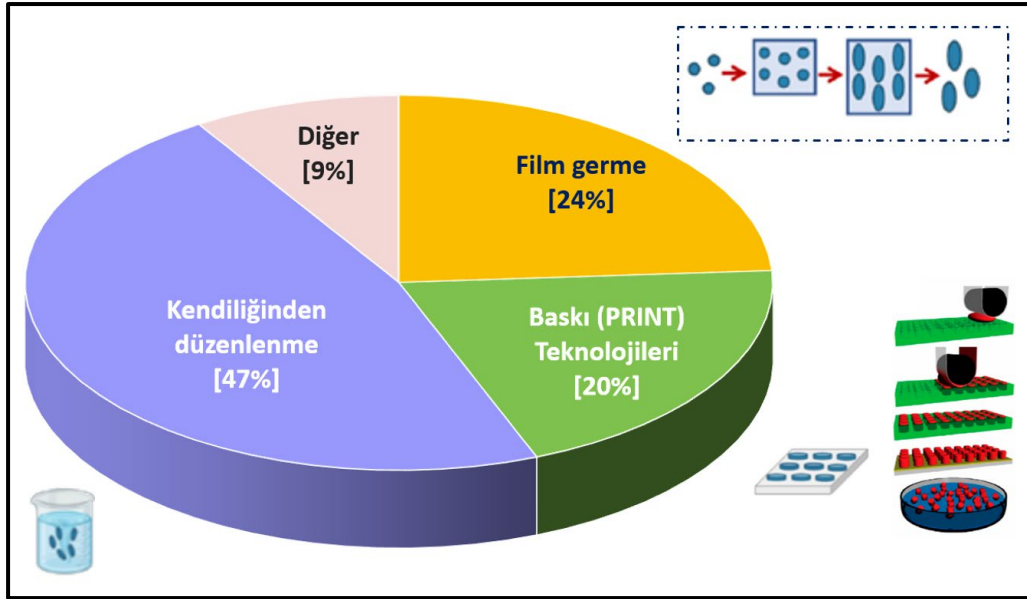
Polimerin adı	Kimyasal yapı
PLGA	PLA:PGA (50:50, a/a) karboksilik asit uçlu, MA:35000 Da
PLGA-Histidin	PLA:PGA (50:50, a/a), histidin konjuge, metil ester uçlu, MA:1000-5000 Da
PLGA-PEG-Maleimit	PLA:PGA (50:50, a/a), PEG ve maleimit konjuge, MA: PLGA:PEG, 20000:5000 Da
mPEG-PLGA-FKR560	Metoksi-PEG-b-PLGA, FKR560 uçlu, MA:5000-10000 Da
PLGA-FPI749	PLA:PGA (50:50, a/a), FPI749 uçlu, MA:20000-30000 Da

### 2.2.2. Nanosistemlerde Partikül Şeklinin Önemi

Günümüzde sıklıkla kullanılan nanopresipitasyon, kendiliğinden düzenlenme (*self-assembly*), emülsifikasyon/çözücü buharlaştırma gibi geleneksel üretim teknikleri ile hazırlanan NP'ler, doğada termodinamik enerji ve entropinin en aza indirilmek istenmesi sebebiyle çoğunlukla küre şeklinde oluşmaktadır (73). Küresel nanopartiküller; üretim kolaylığı, yüksek yüzey alanı, daha yüksek stabilite, biyoyumluluk, dispersiyon ortamında homojen dağılım ve daha iyi redispersiyon kapasitesi gibi üstünlüklere sahiptir. Bahsedilen nedenlerden dolayı küre veya küresele yakın şekildeki NP'ler günümüzde hala yoğun olarak araştırılmaktadır (74-76).

Nanopartiküllerin fizikokimyasal özelliklerinden biri olan şekil; kanda kalış süresi, biyodağılım, fagositoz, hücre içine alım, sitotoksite, aktif/pasif hedefleme, hücrel ve/veya vücuttan atılım gibi pek çok biyolojik sürece etki etmektedir (77, 78). Bu davranış, ilk olarak patojenlerin insan vücudundaki kaçış mekanizmalarında keşfedilmiş ve farklı şekillerdeki nanopartiküllerin küresel olanlara göre üstün olup olmayacağı araştırılmaya başlanmıştır (73, 79). Farklı şekiller, temel olarak nanopartiküllerin ana eksen uzunluğunun küçük eksen uzunluğuna oranı olarak tanımlanan en-boy oranına (*aspect ratio*, AR) göre tanımlanmaktadır (80). Yüksek en-boy oranına sahip partiküller, retikuloendotelial sistem hücrelerinden kaçabilme, hücrelerle artan etkileşim, *in vivo* biyodağılım ve tümör penetrasyonu açısından çeşitli üstünlükler sağlayabilmektedir (81). Farklı şekildeki nanopartiküller kendiliğinden düzenlenme, film germe, baskı teknolojileri (*Particle replication in non-wetting templates*, PRINT), nanopresipitasyon, çözücü buharlaştırma gibi pek çok farklı yöntemle üretilmektedir (86). Söz konusu her üretim yönteminin kendine özgü

üstünlük ve sınırlamaları bulunmaktadır. Tasarlanacak nanopartiküller sistemde kullanılacak polimer, istenilen partikül boyutu ve şekli, terapötik maddelerin stabilitesi, hastalık veya hedef bölge, maliyet, zaman gibi pek çok faktör, uygun yöntemin seçilmesine karar vermede etkilidir (87). Günümüzde laboratuvar koşullarında, yukarıda sözü edilen üretim teknikleri ile istenen boyut ve şekil aralığına sahip ilaç taşıyıcı sistemler üretilmesine rağmen, ölçek büyütme, kliniğe geçiş için zorlu ve kısıtlayıcı bir basamak olmaya devam etmektedir. Ölçek büyütmede en kritik parametreler olan tekrarlanabilirlik, otomatizasyona uygunluk ve yüksek verimliliğin her üretim tekniğinde uygulanabilmesi neredeyse imkansızdır. Tüm bu parametreler dikkate alındığında, ana olarak üç üretim yöntemi üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır (Şekil 2.5.) (87).



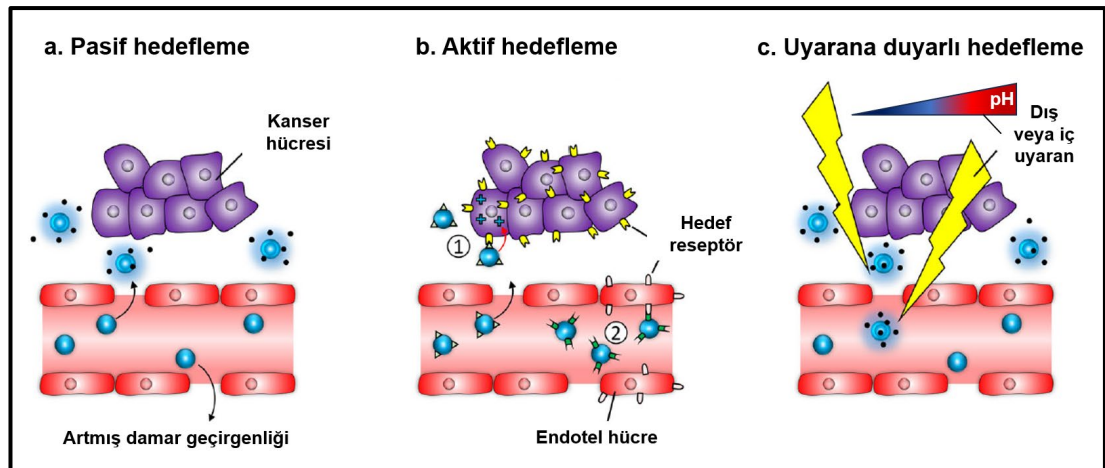
**Şekil 2.5.** Farklı şekillerde nanopartiküllerin üretimi amacıyla yaygın kullanılan yöntemler.

Tez kapsamında farklı şekillerde PLGA nanopartiküllerin hazırlanması amacıyla film germe yöntemi tercih edilmiştir. Tezde, çift emülsifikasyon/çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan küresel NP'ler kullanılarak çubuk ve eliptik disk şeklinde olacak şekilde literatürden uyarlanan film germe yöntemi ile hazırlanmıştır (88, 89). Bu yöntemin esası, polimerlerin camsı geçiş sıcaklığı (bir polimerin camsı, kırılğan halinden kauçuk benzeri yumuşak forma dönüşmeye başladığı sıcaklık,  $T_g$  (90)) üzerine çıkarılarak esnek forma kavuşması ve takibinde germe işlemi yapılarak nanopartiküllerin çubuk, eliptik disk gibi farklı şekillere dönüşebilmesidir (88).

### 2.3. Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Kanserli Dokuya Hedeflendirilmesi

Farklı kanser tiplerinin tedavisi için kemoterapi gibi çeşitli geleneksel tedavi stratejileri geliştirilmiştir (91). Bu tedavi stratejilerinin amaçlanan etki bölgesine zayıf seçicilik, hedef dışı etki, zayıf biyodağılım, hızlı klirens, sınırlı etkililik gibi sakıncaları bulunmaktadır (91, 92). Kemoterapötik maddelerin çoğu düşük çözünürlüğe sahip olduğu için etki sağlamak amacıyla hastalara yüksek dozlarda uygulama yapılmakta, bu durum toksisiteyi artırmaktadır (92). Bu sakıncaları en aza indirmek amacıyla ilaçların spesifik dokulara hedeflenmesi fikri, kemoterapinin kurucusu Paul Ehrlich'in yaklaşık bir asır önce "sihirli mermi (*magic bullet*)" kavramını geliştirmesine kadar uzanmaktadır. Bu teoride, konakçı organizmaya zarar vermeden bir patojeni seçici olarak hedefleme öngörülmüştür (93, 94). Bu fikirden ilham alan araştırmacılar, etkin maddelerin çözünürlüğünü artırmak ve geleneksel tedavilerde gözlenen hedef dışı etkileri azaltmak ve tedaviye direnci önlemek için nanosistemler geliştirmiş ve tümör dokusunda spesifik tutulumu artırma stratejileri üzerine yoğunlaşmıştır (69, 95-98).

Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin tümör bölgesine taşınabilmesi için çeşitli stratejiler mevcuttur. Tümöre hedeflendirme stratejileri temel olarak pasif ve aktif hedeflendirme olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Ayrıca, bazı kaynaklara göre, manyetik alan, ışık gibi harici veya pH, enzim gibi dahili bir uyarana maruz kaldığında nanopartiküllerden etkin madde salımının tetiklenmesi de bir hedefleme stratejisi olarak kabul edilmektedir (Şekil 2.6.) (63, 99).

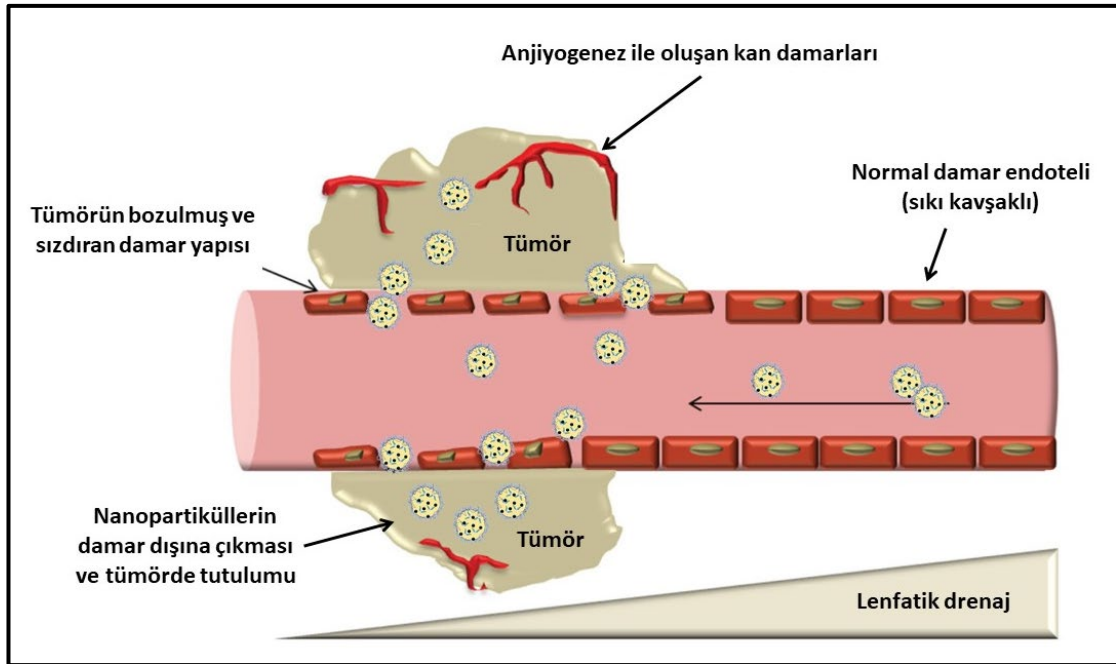


Şekil 2.6. Kanser hüresine ilaç taşıyıcı sistemlerin hedeflendirme mekanizmaları (63).

Nanopartiküllerin boyut ve yük değişimi veya yüzeylerine ligand modifikasyonu ile hedeflendirilmesi sonucu sağlıklı dokulardaki istenmeyen toksisite sınırlanırken intratümöral ilaç konsantrasyonlarının artırılması sağlanmaktadır (96).

### 2.3.1. Kanserde Pasif Hedeflendirme

Etkili bir kanser tedavisi için öncelikle hastalığın patofizyolojisinin anlaşılması gerekmektedir. Bilindiği üzere, tümör belirli bir büyüklüğe ulaştıktan sonra, komşu dokularda doğal olarak var olan damar ağı, tümör hücrelerinin beslenmesi için yeterli olmamaktadır. Oluşan yeni damarlar, normal damarlardan farklı olarak düzensiz bir epitel ve bazal membran bulundurmaktadır (99). Özellikle solid (katı) tümörlerdeki bütünlüğü bozulmuş-sızdıran damar yapısı ve lenfatik sistemin yetersiz drenajı, uygun boyutlardaki nanotaşıyıcıların hedef dokuya pasif olarak hedeflendirilmesine olanak sağlamaktadır. Tümöre hedefleme için günümüzde sıklıkla kullanılan bu strateji Maeda ve meslektaşları tarafından “artmış geçirgenlik ve tutulma (*Enhanced Permeability and Retention*, EPR) etkisi” olarak tanımlanmış (Şekil 2.7.) ve ilk kez solid fare tümörlerinde keşfedilmiştir (80, 99-101).



**Şekil 2.7.** Tümör dokusunda EPR etkisi ile nanopartiküllerin birikimi (Modifiye edilmiştir (102).

Pasif hedefleme büyük ölçüde difüzyon aracılı taşıma yoluyla sağlandığı için, nanotaşıyıcıların partikül boyutu, EPR etkilerini sağlamak için en önemli formülasyon

parametresi olarak kabul edilmektedir (92). Tümörlerdeki damarlar arası boşluklar, nanopartiküllerin nüfuz etmesine izin veren 100-780 nm boyutunda gözeneklere sahiptir (103). Genel olarak, nanopartiküllerin uygun bir şekilde difüzyona uğraması için 400 nm'den küçük boyutlarda olması gerekmektedir. 10 nm'den daha küçük boyutlardaki partiküller ise renal filtrasyonla hızlı bir şekilde vücuttan temizlenmektedir (92). Bazı kaynaklara göre 10-200 nm arasında boyutlar optimum tümör birikimi için tercih edilmektedir (80, 104, 105). Partikül boyutu yanında tümör dokusu birikiminde nanopartiküllerin şeklinin de etkili olduğu düşünülmektedir (92, 103). Mevcut literatür, nanopartikül şeklinin EPR üzerindeki etkisinin karmaşık olduğunu ve en yüksek tümör birikimi sağlayacak en uygun şeklin, nanopartiküllerin bileşiminde yer alan matriks özelliklerine ve kanser tipine bağlı olduğunu ileri sürmektedir (103). EPR etkisi büyük ölçüde tümör biyolojisine ve özellikle: anjiyogenez ve lenfanjiyogenez derecesine, perivasküler tümör büyümesinin derecesine ve tümör içi basıncına bağlıdır. Tüm bu faktörler, nanotaşıyıcıların fizikokimyasal özellikleriyle birlikte ilaç taşıma etkinliğini belirlemektedir (100).

Nano boyutlu ilaç taşıyıcı sistemlerin küçük boyutlarından dolayı retikuloendotelial sistem tarafından daha kolay yakalanma riski ve hızlı klirens olasılığı bulunmaktadır (92, 106). Bu riski elimine etmek amacıyla araştırmaların çoğunda nanopartiküller PEG ile modifiye edilmektedir (99). FDA onaylı, yüzeyi PEG ile modifiye edilmiş (PEGilasyon) bir lipozom olan Doxil® ve Caelyx© gibi EPR etkisinden faydalanan nanotaşıyıcılardan bazıları günümüzde tedavide başarıyla kullanılmaktadır (100). Şu anda, KHDAK tedavisinde EPR etkisinden faydalanan, klinik kullanım için FDA onaylı iki nano ilaç taşıyıcı sistem bulunmaktadır: Abraxane® (Celgene, ABD) ve Genexol-PM® (Samyang, Kore).

### **2.3.2. Kanserde Aktif Hedeflendirme**

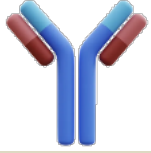


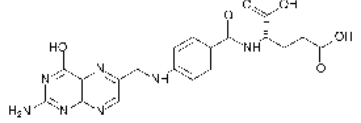
Kemoterapötiklerin hedef bölgeye taşınması amacıyla kullanılan NP'lerin büyük bir bölümü tümörleri "pasif" olarak hedeflemektedir (100). Tümör stroması içinde EPR aracılı pasif olarak biriken nanoformülasyonlar zaman içinde difüzyon mekanizmalarıyla kan dolaşımına yeniden katılabilmekte ve bu durum hedef dokuda ilacın konsantrasyonunun zamanla azalmasına neden olmaktadır. Ek olarak, bu tür nanoformülasyonların stromal alandan kanser hücreleri içine alınması, hücre

membranı aracılı süreçlere bağlıdır. Tümör dışına sızmayı önlemek ve EPR birikimli nanoformülasyonların hızlı hücre içi alımını teşvik etmek için geliştirilen strateji, aktif hedeflemedir.

Aktif hedeflemede, nanopartiküllerin yüzeyine çeşitli yöntemlerle (fiziksel veya kimyasal) konjuge edilen ligandlar aracılığı ile hedef bölgede partikül birikiminin artırılmasını ve bazı durumlarda da hedef hücreler tarafından partikülün hücre içine alımı amaçlanmaktadır (107). Hedeflendirme ligandları, hasta doku ve hücre yüzeyleri üzerindeki aşırı eksprese edilen antijen veya reseptörlere (HER2, folat reseptörü, EGFR, CD44, vb.) spesifik olarak seçilmektedir (37, 108, 109).

Aktif hedeflemenin ilk denemeleri 1980 yılında lipozomların yüzeyine kovalent olarak bağlanan antikorlarla başlatılmış, devamında peptitler, nükleik asitler, aptamerler gibi diğer çeşitli ligandlar ile denemeler devam etmiştir (Tablo 2.6.) (100). Günümüzde aktif hedefleme amacıyla en sık kullanılan ligandlar monoklonal antikorlardır (110). Aptamerler, hedef moleküllere yüksek afiniteyle seçici olarak bağlanabilen, üç boyutlu yapıya sahip kısa, tek zincirli DNA veya RNA molekülleridir (111) Aptamerler kimyasal olarak sentezlenebilir ve farmakokinetik özelliklerini değiştirmek veya stabiliteilerini artırmak amacıyla modifiye edilebilir (112). Peptitler hedefe göre kimyasal olarak sentezlenebilen kısa aminoasit polimerleridir (113). Peptitler, genellikle antikorlara ve diğer proteinlere göre reseptörlere karşı daha düşük afinite gösterirken, kolay üretilebilirlik ve antikora kıyasla küçük boyutları sayesinde hücre içine daha hızlı alım nedeniyle hedefleme ligandı olarak tercih edilebilmektedir (114). Antikorlar reseptörlere karşı yüksek afinite gösterirken boyutları sebebiyle konjuge nanopartiküllerin tümörlere penetrasyonlarını engelleyebilir. Boyuta bağlı penetrasyon sorununu çözmek amacıyla antikor fragmanlarının ligand olarak kullanımı araştırılmaktadır (112, 114).

**Tablo 2.6.** İlaç taşıyıcı sistemlerde aktif hedefleme amacıyla kullanılan hedefleme ligandları (97).

Hedefleme ligandı	Antikor	Aptamer	Peptit	Küçük molekül
				
<b>Üstünlük</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Kolay konjuge edilebilirlik</li> <li>Tedavi edici etki</li> <li>Yüksek afinite</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Düşük maliyet</li> <li>Düşük immünojenisite</li> <li>Yüksek afinite</li> <li>Küçük boyut</li> <li>Kolay kimyasal modifikasyon</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Küçük boyut</li> <li>Düşük maliyet</li> <li>Sistemik yaklaşımla geliştirilme</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Düşük maliyet</li> <li>Kolay konjuge edilebilirlik</li> <li>Yüksek stabilite</li> </ul>
<b>Sakınca</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Yüksek maliyet</li> <li>Sınırlı tümör penetrasyonu</li> <li>Yüksek immünojenisite</li> <li>Büyük boyut</li> <li>Afinite konjugasyon yöntemine göre değişken</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Çapraz reaktivite</li> <li>Modifiye edilmediği durumlarda düşük stabilite</li> <li>Çevresel ortama göre bağlanma afinitesi</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Biyodağılım değişken</li> <li>Toksik etki değişken</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Sistemik olmayan yaklaşım ile geliştirilme</li> <li>Düşük özgünlük</li> </ul>

Nanopartiküllerin hücre içine alınarak etki göstermesinin beklendiği durumlarda, aktif hedeflendirme daha da önemli hale gelmektedir. Örneğin, tedavide kullanılan nükleik asit ve proteinler gibi çoğu makromolekül, zayıf hücre membranı geçirgenliğine sahiptir ve *in vivo* ortamda kolayca denatüre olabilmektedir. Bu moleküllerin nanosistem içine enkapsüle edilmesi ile hem fizyolojik ortamdaki stabiliteleri artırılmakta hem de aktif hedefleme ligandının hücre yüzeyindeki spesifik reseptörlere bağlanması ile nanopartikülün hedef dokuda kalış süresi artırılarak hücre içine alım için gerekli koşullar sağlanmaktadır (115).

Ligandlar, kanser hücrelerinde eksprese edilen reseptörlere kolayca bağlanabilir ve esas olarak reseptör aracılı endositoz yoluyla nanotaşıyıcıların tümör bölgesine taşınmasına ve birikmesine aracılık edebilir. Ek olarak, hedef bölgede birden fazla bağlanma bölgesinin varlığı, daha iyi biyolojik tanıma ve reseptör aracılı endositoza katkı sağlamaktadır (100).

### 2.3.3. Kanserde Uyarana Duyarlı Hedefleme

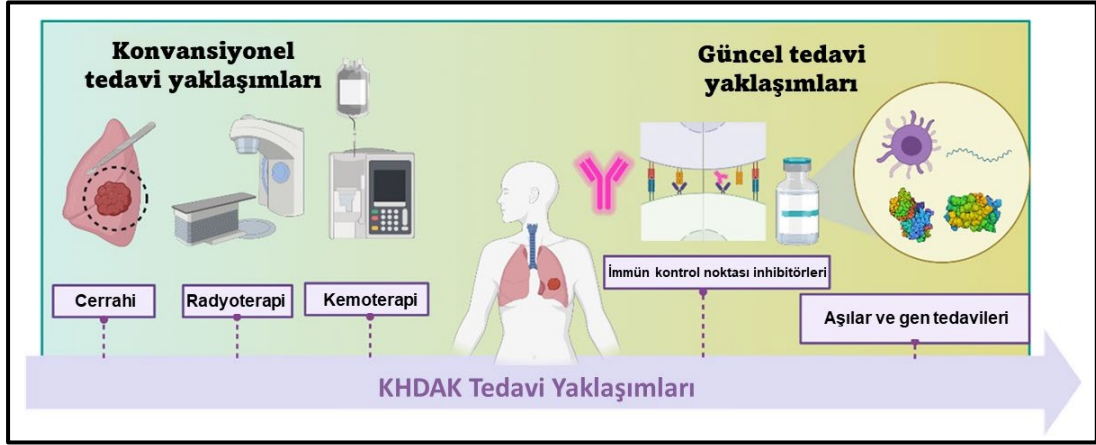
Normal dokuya kıyasla tümör mikroçevresi, asidik pH, hipoksik, hipoglisemik, yüksek miktarda glutasyon ve reaktif oksijen türleri içermesi gibi karakteristik özelliklere sahiptir. Bu özellikler, tümör dokusuna spesifik ilaç salımı için uyarana duyarlı ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasına olanak sağlamaktadır (116).

Tez kapsamında partikül boyutunu 400 nm'nin altında tutmanın yanı sıra, pH duyarlı bir polimerle çalışılmış ve partiküllere hedefleme ligandı konjuge edilerek tümör mikroçevresine üç ayrı mekanizma ile hedeflendirme yapılmıştır. Sağlıklı dokulara (pH 7,4) kıyasla, tümör dokularında pH değerinde önemli bir düşüş (5,6-6,8) gözlenmektedir (117). pH'ya duyarlı polimerler, pH'daki değişime yanıt veren, pozitif veya negatif yüklü, iyonize edilebilen fonksiyonel gruplar içermektedir. Bu polimerler, çevresel pH'daki küçük değişiklikleri algılayabilmektedir. pH değişimi ile polimerlerin; boyut, şekil, hidrofobiklik, parçalanma hızı gibi fiziksel özelliklerinde değişimler meydana gelmekte, bu sayede ilaç salımı istenen bölgede olmaktadır (118).

## 2.4. Kanser İmmünoterapisi

Kanser tedavisinde, uzun yıllardır kullanılan ve etkinliği kanıtlanmış tedavi seçeneklerinin yanında, son zamanlarda artan ilgi gören immünoterapi gibi yeni

tedaviler de kullanılmaktadır. İmmün kontrol noktası inhibitörlerinin de dahil olduğu immünoterapötikler, birçok kanser için klinik olarak onay alarak günümüzde kemoterapi kadar yaygın bir tedavi seçeneği olmaya başlamıştır (Şekil 2.8.).

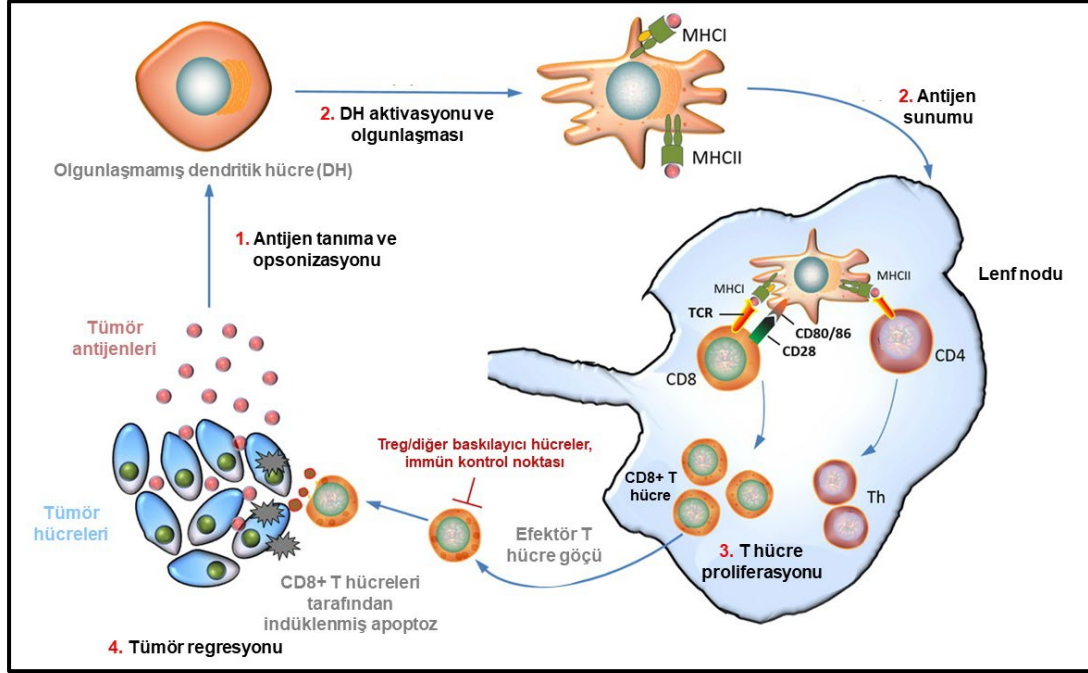


**Şekil 2.8.** KHDAK tedavisinin zaman içindeki gelişimi (23, 33, 119-121).

İmmün sistemin işleyişinde gözlenen problemler, kanser hücrelerinin yok edilememesine, kontrolsüz çoğalmasına, yayılmasına ve hatta ölüme neden olmaktadır (122). İmmünoterapi, çığır açan bir keşif olarak nitelendirilmekte ve literatürde kanser tedavisinin yeni sac ayağı olarak değerlendirilmektedir (123). Kanser immünoterapisi, konakçı bağışıklık sisteminin manipüle edilmesi veya bağışıklık sistemi bileşenlerinin kanser tedavisi amacıyla kullandığı yaklaşımlardan oluşmaktadır (122, 124). Bu tedavide temel amaç, tümör hücresi tarafından çeşitli yollarla baskılanmış olan immün sistemi yeniden aktive ederek, kanserin immün sistem tarafından görünür hale gelmesini sağlamaktır (124, 125). İmmünoterapötiklerin geliştirilmesinde, immünolojik sinapsı inhibe eden veya uyaran bir dizi ligand ve reseptöre odaklanılmaktadır (8). İmmünoterapi, bazı kanser tiplerinde tek başına etkili olurken, bazılarında ise diğer tedavi yöntemleri ile birlikte kullanıldığında etkinliğinin arttığı bilinmektedir (126).

Kanser immünoterapisinin geçmişi, Coley toksinleri olarak bilinen bakteriyel karışımın antitümör etkilerinin tarihsel olarak gözlemlenmesine ve antikörlerin kanser tedavisi için "sihirli mermiler" olabileceğinin kabul edilmesine dayanmaktadır (124). 2013 yılında Daniel S. Chen ve Ira Mellman tarafından tanımlanan "kanseri-immünite döngüsü", kanser hücreleri ve immün sistem arasındaki hassas ilişkinin anlaşılması ve immünoterapötiklerin geliştirilmesinde büyük bir öneme sahiptir. Genel olarak, T

hücresi immün yanıtının başlatılması bir dizi aşamalı olayı içermektedir (Şekil 2.9.) (127).



**Şekil 2.9.** Kanser immünte döngüsünün şematik gösterimi (127).

İnsan vücudunun eşsiz özelliklere sahip savunma sistemine rağmen, kanser hücreleri, efektör T hücreleri tarafından tanınma ve öldürülme aşamasında, çeşitli mekanizmalarla bağışık yanıtı kaçılabilmektedir. Bu mekanizmalar, tumor antijenleri veya majör histokompabilite kompleksi (*Major Histocompatibility Complex*, MHC) moleküllerinin ekspresyonlarının azaltılması, aktive T hücreleri üzerinde PD-1'e bağlanan çeşitli immünosupresif ligandların üretimi (programlanmış hücre ölüm ligandı-1 (PD-L1) ve PD-L2) gibi şekilde sıralanabilir. Sonuçta T hücre anerjisi (antijene karşı yanıt verememe) ve tükenmesi söz konusu olabilir (127, 128).

Tüm bu sebeplerden dolayı özellikle son 20 yılda tumor biyolojisi ve immünolojisi yoğun olarak araştırılmaktadır. Bu kapsamda, bağışıklık sistemini güçlendiren bileşenler (sitokinler, bağışıklık hücreleri ve monoklonal antikorlar (124)) üzerinde araştırmalar gerçekleştirilmiş (129) ve hedefe yönelik bazı immünoterapötikler (mAb veya tumor öze özgü adoptif T hücre transferi gibi) geliştirilmiştir. Hastaya özgü neopitop veya nükleik asit bazlı kişiselleştirilmiş kanser aşılıları gibi aktif immünoterapötik stratejiler de 2017 yılında kullanılmaya başlanmıştır (127, 129). Akciğer kanserli hastalarda bağışıklık sistemini modüle eden terapötik

yaklaşımlar geleneksel olarak aşılarla odaklanmıştır ancak muhtemelen yetersiz bağışıklık aktivasyonu nedeniyle genellikle etkisiz olmuştur. Bazı olumlu sonuçlar gösteren adaylar, örneğin TG4010 (tümörle ilişkili antijen ve interlökin-2'yi kodlayan virüs temelli bir aşı (130)), halen araştırılmaktadır (8).

Son yıllarda, iki yeni immünoterapi türünün onkoloji alanında belirgin bir etkisi olmuştur:

- Kontrol noktası inhibitörü mAb'lar: sitotoksik T-Lenfosit ilişkili antijen 4 (CTLA-4), PD-1 veya anti-PD-1 blokörleri,
- Kimerik antijene özgü reseptör (CAR) transfekte T hücreleri (CAR-T hücreleri) (128).

İmmün kontrol noktası blokajı ve adoptif hücre terapisi gibi immünoterapiler, özellikle diğer tedavi seçeneklerinin uygulanmasının mümkün olmadığı veya yetersiz kaldığı hastalarda tedavide devrim niteliğindedir (131). İKNİ, immün sistemin kanser hücrelerine karşı saldırıya geçmesini engelleyen baskılayıcı immün reseptörleri bloke etmekte ve sitotoksik T hücreleri (CD8+ T) de dahil olmak üzere anejrik hale gelmiş T hücrelerini üzerinde etki göstererek immün sistemin yeniden aktive etmektedir (126, 132). İKNİ'nin tümör hücrelerindeki çoklu direnç mekanizmalarını kırarak antitümör bağışıklığı önemli ölçüde artırdığı araştırmalarla gösterilmiştir (129). İmmün kontrol noktası inhibitörleri günümüzde immünoterapi için en uygun hedefler olarak tanımlanmıştır (128, 133). Yakın zamanda CTLA-4 ve PD-1 gibi T hücresi bağışıklık kontrol noktalarının keşfi, 2018 Nobel Fizyoloji veya Tıp ödülünün Dr. Allison ve Honjo'ya verilmesini sağlamıştır (128, 134). Tablo 2.7.'de tezin konusu olan KHDAK'ye yönelik ticarileşmiş İKNİ örnekleri bulunmaktadır.

**Tablo 2.7.** KHDAK evre III/IV popülasyonu tedavisinde kullanılan FDA onaylı immün kontrol noktası inhibitörlerine örnekler.

İlaç (Ticari ürün)	Hedef Reseptör	Onay Yılı (FDA)
İpilimumab (Yervoy®)	CTLA-4	2011
Nivolumab (Opdivo®)	PD-1	2015
Pembrolizumab (Keytruda®)	PD-1	2016
Atezolizumab (Tecentriq®)	PD-L1	2016
Durvalumab (Imfinzi®)	PD-L1	2018
Cemiplimab (Libtayo®)	PD-1	2019

KHDAK tedavisinde ortaya çıkan son terapötik yaklaşım, bağışıklık kontrol noktası blokajıdır (135). Klinik çalışmalar, İKNI'nin metastatik, lokal ilerlemiş ve erken evre KHDAK dahil kanser hastalarında prognozu önemli ölçüde iyileştirdiğini ve sağkalıma fayda sağladığını göstermiştir (136, 137). Diğer tüm tedavi yöntemlerinde olduğu gibi bu tedavinin de bazı yan etkileri mevcuttur. Klinik deneyimler doğrultusunda, İKNI'nin birden fazla organda inflamasyon ve doku hasarı ile ilişkili olabildiği ve otoimmün benzeri yan etkilere neden olabildiği tespit edilmiştir. İmmün sistem ile ilişkili yaygın yan etkiler: deri, gastrointestinal sistem, karaciğer, akciğer ve endokrin organlarda gözlenmektedir. Farklı İKNI türleri farklı tipte yan etkilere neden olmaktadır. Anti-CTLA-4 grubu daha çok döküntü, kolit ve hipofizit ile ilişkilendirilirken, anti-PD-1/PD-L1 ile pnömonit, hipotiroidizm, artralji ve vitiligo gözlemlendiği tespit edilmiştir. İKNI'lerle görülen en ölümcül yan etki miyokardittir (138).

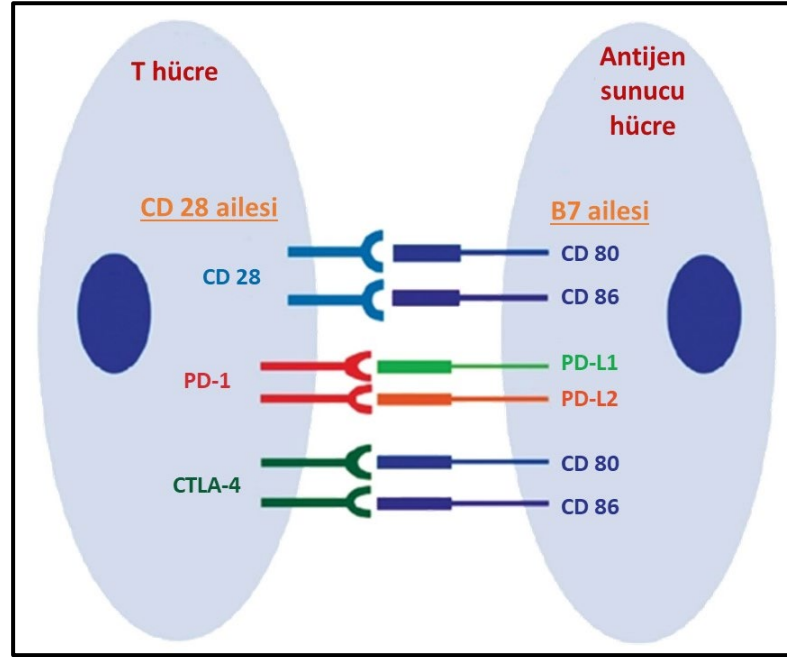
İmmünoterapötiklerle klinikte başarılı sonuçlar elde edilmiş olsa da her hasta için beklenen terapötik etki aynı ölçüde başarılamamaktadır, yani hastadan hastaya değişken klinik yanıtlar gözlenmektedir (123, 139). Ek olarak, yüksek maliyet sebebi ile her hasta immünoterapiden faydalanamamaktadır (122). Bu sebeple tez kapsamında yan etkileri azaltmak ve immünoterapinin etkinliğini artırmak amacıyla galunisertib ile kombine hedefli nanopartiküller geliştirilmiştir.

## 2.5. Nivolumab

İKNI ile immünoterapide yapılan son çalışmalar, ölümcül akciğer kanserinin tedavisi için yeni fırsatlar sunmaktadır. Akciğer kanserinde görülen yüksek mutasyon hızı, bu hastalığı programlanmış hücre ölümü proteini-1 antikoru (anti-PD-1) immünoterapisine karşı duyarlı hale getirmektedir. Dolayısıyla anti-PD-1 antikoru ile ileri evre akciğer kanseri hastalarının tedavisi sonucu ölüm riski önemli ölçüde azaltmaktadır (129).

PD-1, aktive olmuş T hücrelerinin yüzeyinde yüksek derecede eksprese edilen bir kontrol proteini olup CD28 ailesinin immün sistem inhibitör reseptörlerinden birisidir (Şekil 2.10.). Diğer bir değişle, T hücrelerinin vücudun kendi hücrelerine saldırmasını engellemek amacıyla kullanılan bir kontrol mekanizmasıdır (126, 129). Bu reseptör sitotoksik T hücrelerinin yanında; B hücreleri, doğal öldürücü hücreler

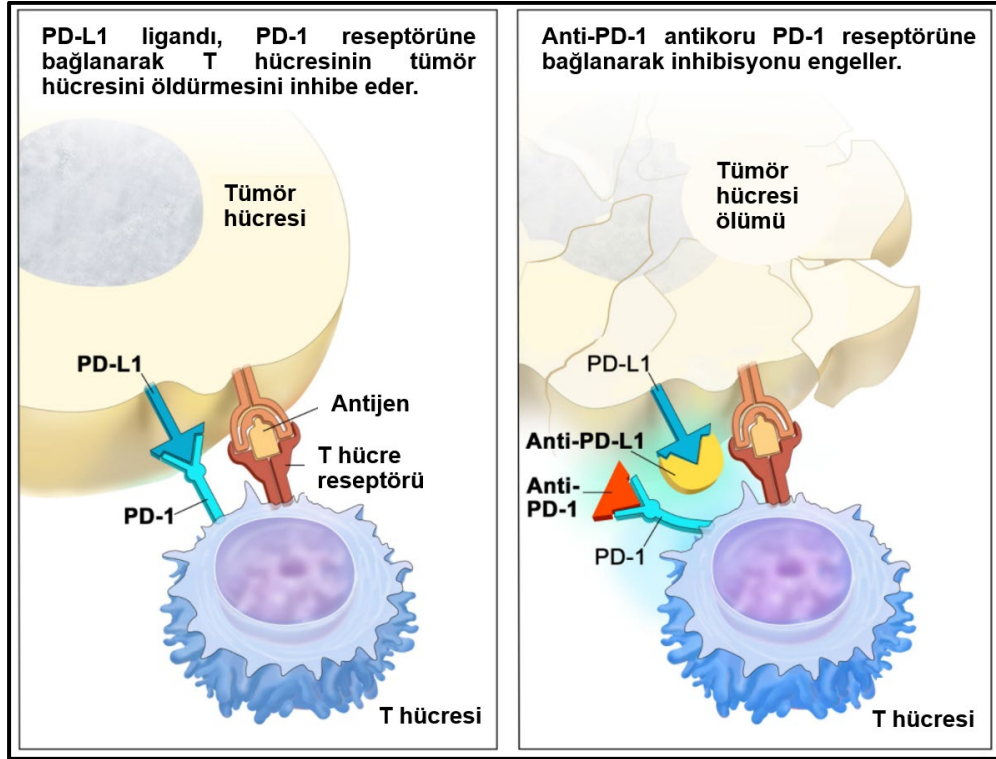
(*natural killer*, NK), monositler, dendritik hücreler ve düzenleyici T Lenfositleri (Treg) tarafından da eksprese edilmektedir (138).



**Şekil 2.10.** T hücre ve antijen sunucu hücreler arasındaki reseptör ligand etkileşimleri (Modifiye edilmiştir (140)).

Bugüne kadar PD-1/PD-L1 kontrol noktası blokaj tedavisi melanoma, KHDAK, küçük hücreli akciğer kanseri, renal hücreli karsinoma, klasik Hodgkin lenfoma, baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomu, kolorektal kanser dahil olmak üzere birçok malignitenin standart tedavisinin bir parçası olmuştur. Bu antikorlarla hepatosellüler karsinoma, mesane kanseri, pediatrik solid tümörler gibi malign durumların tedavisi için klinik çalışmalar devam etmektedir (141). PD-L1'in KHDAK hastalarının yaklaşık % 20-65'inde eksprese edildiği bilinmektedir (142). Sonuç olarak PD-1/PD-L1 yolağının hedeflenmesi, KHDAK ve diğer pek çok immün yanıtla ilişkili hastalıkta umut verici bir terapötik yaklaşım olarak kullanılmaya başlanmıştır (143).

İlk programlanmış ölüm ligand (PD-1) inhibitörlerinden biri olan Nivolumab (Anti-PD-1 antikor), immünoterapi ile kanserin tedavisinde çok önemli bir gelişme sağlamıştır (144). FDA tarafından 2015 yılında onay alan bu antikor, aktive T hücrelerinde eksprese edilen inhibitör bir immün kontrol noktası reseptörü olan PD-1'i bloke ederek etki göstermektedir (Şekil 2.11.). Böylece T hücrelerin proliferasyonu artarak hastanın doğal tümöre özgü T-hücre aracılı bağışık yanıtları yeniden aktive olmaktadır (129, 145-147).



**Şekil 2.11.** Anti-PD-1 antikorunu etki mekanizması.

Nivolumab, genetik olarak tasarlanmış, insan immüoglobulin G4 (IgG4) monoklonal antikorudur (142, 148) ve yaklaşık 146 kDa ağırlığındadır (149). Antikorun plazma yarı ömrü, doza ve kişiye bağlı olarak değişiklik göstermekle birlikte, i.v. uygulamada 12 gün (0,3, 1,0 veya 3,0 mg/kg) ile 20 gün (10,0 mg/kg) arasındadır (129). Farmakolojik stabilite çalışmalarına göre, 2–8 °C veya 40 °C koşullarında bir aylık bekleme süresi boyunca nivolumabın stabil kaldığı, terapötik etkinliğinde bir azalma görülmediği bilinmektedir (150).

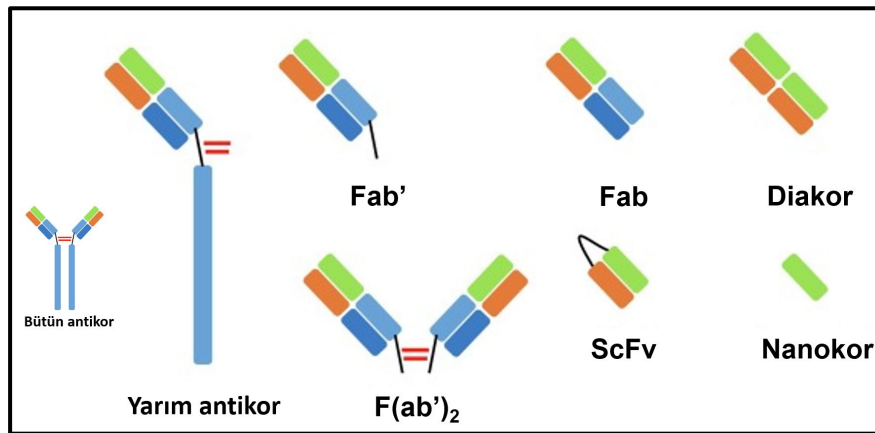
KHDAK tedavisinde nivolumab, genel olarak iyi tolere edilmiştir. Hastalarda en sık gözlenen (% 31) toksisite cilt toksisitesidir. En yaygın olanı döküntü (% 12), kaşıntı (% 9) ve vitiligo (% 3)'dur. İshal gibi gastrointestinal toksisiteler daha seyrek olarak gözlenmiş, pnömoni hastaların yalnızca % 3'ünde meydana gelmiştir. Hastaların sadece % 1'inde 3. veya 4. derece pnömoni oluşmuştur. Diğer toksisiteler arasında transaminazlardaki anormallikler (% 7), tiroid fonksiyon bozuklukları (% 3) ve infüzyonla ilişkili reaksiyonlar (% 3) yer almaktadır. Gözlenen toksisiteler, diğer PD-1 blokörlerine benzer bulunmuştur. Nivolumab için pnömoni oranları, dosetaksel (% 4,6) ve gefitinib (% 3,5) gibi KHDAK'de yaygın olarak kullanılan diğer ilaçların oranlarına benzer veya onlardan daha düşüktür. Bununla birlikte, nivolumab

günümüzde diğer bazı kemoterapötiklerle/immünoterapötiklerle kombinasyon halinde araştırılmasına rağmen pnömoninin kümülatif toksisite riski göz ardı edilmemelidir (142).

Tez kapsamında nivolumab, antikanser etkinliğe sahip TGF- $\beta$  inhibitörü galunisertib ile kombine edilerek immünoterapötik etkinliğinin artırılması planlanmış ve bu kombinasyonu içeren nanopartiküllerler hazırlanarak *in vitro* ve *in vivo* karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir.

### 2.5.1. Fragmente Antikor

Monoklonal antikorlar ve fragmanları, FDA onaylı ilk mürin antikorunu Orthoclone OKT<sup>®</sup>-3'ten başlayarak 30 yılı aşkın bir süredir tedavi amacıyla kullanılmaktadır (112). İlaç taşıyıcı nanopartiküllerinin en kritik özellikleri partikül boyutu, enkapsülasyon etkinliği ve salım profilidir (151). Fab fragmanları, antijen bağlanma spesifikliğini korudukları ve bütün antikora kıyasla daha küçük protein yapısında oldukları için biyolojik kompartmanlara ve tümörlere daha iyi nüfuz edebilmekte ayrıca, Fc fragmanına bağlı immünolojik sistem aktivasyonuna ilişkin istenmeyen etkileşimleri elimine etmeleri sebebiyle tercih edilmektedir (152). Fragmentasyonun Fc bölgesini içermemesi bazı durumlarda sakınca olarak görülüp, plazma yarı ömrünün kısalmasına, daha yüksek doz gereksinimine ve saflaştırma işlemi sırasında agregasyona yatkınlığa yol açabilmektedir (112). Araştırmalarda en sık kullanılan antikor fragmanlarına örnek olarak, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, tek zincirli değişken fragman (scFv), yarım antikor (monovalent IgG), diakorlar ve tek alanlı antikorlar (nanokorlar) verilebilir (Şekil 2.12.).



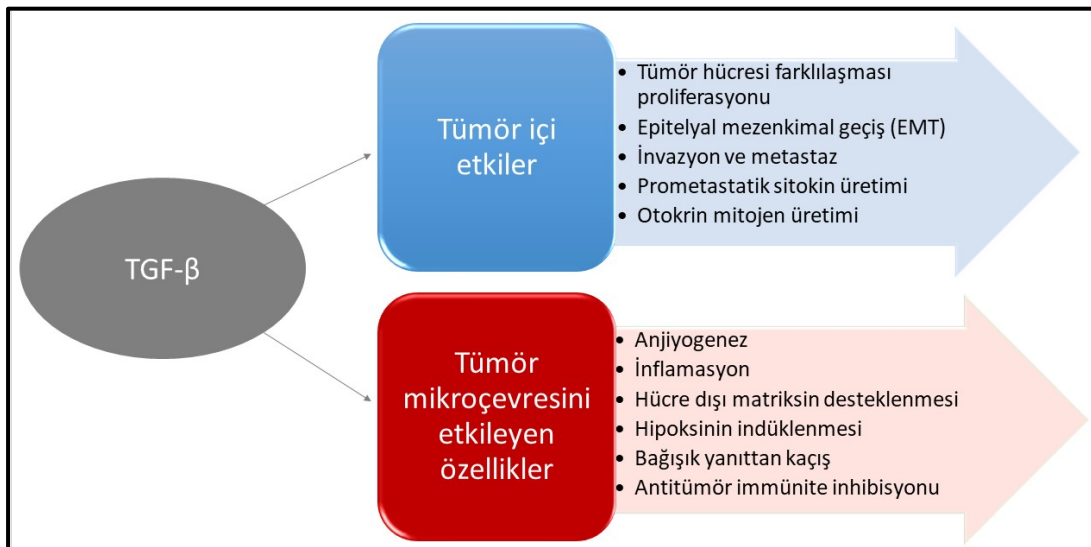
Şekil 2.12. Antikor fragman çeşitleri (112).

Tez çalışması kapsamında immünoterapötik etkin madde olan nivolumab fragmanite edilerek etkinliği *in vitro* ve *in vivo* denemelerle değerlendirilmiştir.

## 2.6. Galunisertib (TGF- $\beta$ İnhibitörü)

Dönüştürücü büyüme faktörü  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), birçok hücrede proliferasyonun, hücrenel farklılaşmanın, anjiyogenezin düzenlenmesinde etkili bir sitokindir. TGF- $\beta$ , T hücreleri ve monositlerin dahil olduğu çeşitli immün hücreler tarafından üretilmekte olup (153), immün yanıtların ve immün toleransın düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir (154, 155). Bunlara ilaveten, yardımcı T hücreleri (Th1 ve Th2), sitotoksik T lenfositler, makrofajlar, NK hücreler, B hücreleri ve polimorfonükleer lökositler (granülositler) dahil olmak üzere bağışıklık sisteminin tüm hücreleri üzerinde inhibitör etki göstermektedir (156) (şekil 2.13.).

TGF- $\beta$  sinyal yolağında gözlenen sorunlar, inflamatuvar ve kardiyovasküler hastalıklar, fibroz ve tümör oluşumu ve gelişimini tetikleyebilmektedir (157, 158). Bu sitokin, sağlıklı hücrelerde hücre büyümesini ve lezyonların ilerlemesini sınırlayarak tümör baskılayıcı etki göstermekte iken, kanserli hücrelerde; NK hücreleri ve sitotoksik CD8+ T lenfositlerin fonksiyonunun ve sayısının azalması, immün sistemi baskılayıcı bir rolü bulunan Treg sayısının artması, ve hücre invazyonunu artırarak metastaza yol açması sonucu antitümör bağışıklığı baskılamakta ve vücudun tümöre karşı savunmasız kalmasına neden olmaktadır (şekil 2.13.) (155, 156, 159).



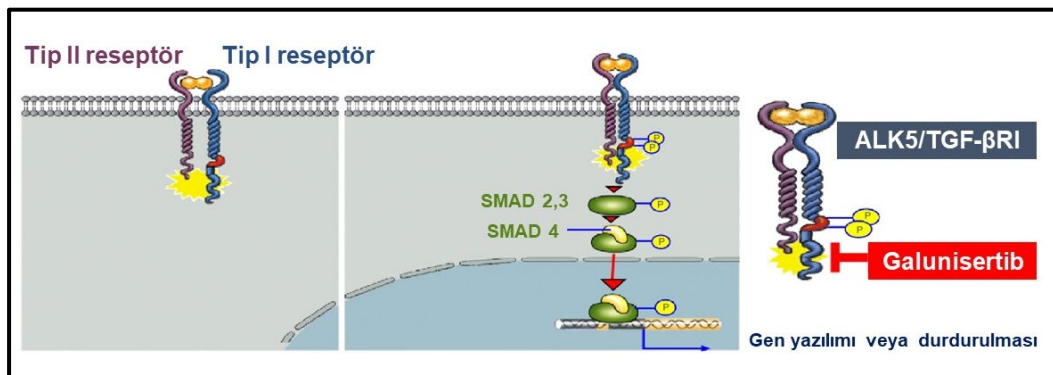
şekil 2.13. TGF- $\beta$  sinyali ve kanserdeki rolü (154, 155).

TGF- $\beta$  sinyali, KHDAK'de epitel-mezenkimal geçişin (EMT) en önemli indükleyicisidir. Bu sitokin seviyesindeki artış sonucu tümörde progresyon, invazyon ve metastaz eğilimi gözlenmektedir (137, 160). Sonuç olarak TGF- $\beta$ , tümör mikroçevresindeki immün yanıtı baskılamadaki etkileri sebebiyle tümör immün kaçışı ve kanser immünoterapisine karşı zayıf yanıtlardan sorumlu tutulmaktadır.

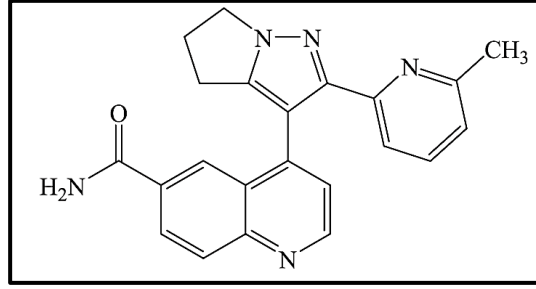
TGF- $\beta$  sinyalini bloke etmek için nötralize edici antikorlar (örneğin; lerdelimumab, metelimumab), aşılarda (örneğin; FANG<sup>TM</sup>), antisens oligonükleotidler ve küçük moleküler inhibitörlerin (örneğin; galunisertib, disitertid vb.) (161) kullanımları dahil olmak üzere çeşitli yaklaşımlar bulunmaktadır. Bu tedavilerin amacı, TGF- $\beta$ 'nin tümör gelişimini ve metastazını baskılayıcı özelliklerini korurken immün sistemi baskılayıcı faktörlerin elimine edilmesi ve immün yanıt etkinliğinin artırılmasıdır (154, 155). Bu etkilerinden dolayı TGF- $\beta$ 'nin inhibisyonu, kanser immünoterapisinin etkinliğini artırmak amacıyla kullanılabilir (154).

Araştırmalar, Şekil 2.13.'te bahsedilen bilgileri destekler nitelikte olup, TGF- $\beta$  inhibitör tedavisinin kanserdeki etkinliğinin yalnızca tümör hücreleri üzerindeki doğrudan içsel etkilerden kaynaklanmayabileceğini, aynı zamanda tümör mikroçevresinde etkili olan tümör dışı mekanizmaları da içerebildiğini göstermektedir (154). Bu durum, tezde belirtilen hipotezi destekler nitelikte olup, tümör mikroçevresine hedeflemenin doğru bir yaklaşım olduğunu göstermektedir.

Galunisertib (LY2157299 monohidrat), TGF- $\beta$  reseptör I (TGF- $\beta$ RI) kinazının küçük molekül bir inhibitörü olup, Şekil 2.14.'te belirtilen kanonik yolun aktivasyonunu ortadan kaldırarak, SMAD2'nin fosforilasyonunu spesifik olarak azaltmaktadır (137, 155). Bu molekül, nivolumabın immünoterapötik etkinliğini artırması amacıyla tercih edilmiştir.



Şekil 2.14. Galunisertib etki mekanizmasının şematik gösterimi (155).



**Şekil 2.15.** Galunisertibin kimyasal şekli (162).

Kimyasal formülü  $C_{22}H_{19}N_5O$  (162) olan galunisertibin literatürde sıkça karşılaşılan sinonimi LY2157299'dur (163). Şekil 2.15.'te görüldüğü üzere küçük molekül ağırlığına (369,42 g/mol (162)) sahip olan galunisertib, Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi'ne göre sınıf II ilaç grubundadır (164). Galunisertibin erime derecesi 241-242 °C (165) olarak hesaplanmış olup, yapılan klinik araştırmalarda, insan plazmasında yaklaşık  $-70^{\circ}C$ 'de saklandığında 567 güne kadar ve  $-20^{\circ}C$ 'de saklandığında 148 güne kadar stabil kaldığı belirlenmiştir (166). Galunisertibin plazma yarı ömrü, sağlıklı gönüllülerde tek doz oral uygulama (150 mg) sonrası 8,6 saat olarak belirlenmiştir. Galunisertib % 64,5 feçeste, %36,8 idrarda tespit edilmiş; temel olarak CYP3A4 enzimi ile metabolitlerin oluştuğu ve etkin maddenin metabolitlere dönüştükten sonra vücuttan atıldığı gözlenmiştir (167).

TGF- $\beta$  reseptörünün galunisertib ile inhibisyonu, tümör hücrelerine karşı sitotoksik T hücresi yanıtlarını sağlamakta ve bağışıklık hücrelerinin tümöre infiltrasyonuna izin vermektedir (137). Yukarıda belirtilen antitümör özelliklerinden dolayı galunisertibin; ilerlemiş kolorektal kanserde kapesitabinle kombine (NCT03470350, NCT05700656); ilerlemiş refrakter (inatçı) solid tümörler, tekrarlayan veya dirençli KHDAK ve hepatosellüler karsinomada nivolumabla kombine (NCT02423343); metastatik pankreas kanserinde durvalumabla kombine (NCT02734160); uterus veya yumurtalıkta gözlenen karsinosarkomada paklitaksel/karboplatinle kombine (NCT03206177) olarak kullanıldığı klinik çalışmaları mevcuttur (168).

Araştırmalarda galunisertib büyük çoğunlukla oral yolla kullanılmaktadır. Dolayısıyla hedef dışı dokularda TGF- $\beta$  sinyalinin inhibe edilmesi olası olduğu için, sağlıklı dokularda kardiyak toksisite (169) gibi istenmeyen etkiler gözlenebilmektedir (170). Yine de galunisertib prelinik çalışmalarda TGF- $\beta$ 'nın diğer küçük molekülle inhibitörlerine kıyasla daha az toksisite gösterdiği için klinik çalışmalara geçen en

umut verici aday olmuştur (171). Galunisertibin oral yolla kullanımına ilişkin klinik araştırmalar (NCT02423343) devam etmesine rağmen henüz onaylı bir tıbbi ürünü bulunmamaktadır.

TGF- $\beta$  yolağı yakın zamanda anti-PD-1/L1 kontrol noktası blokajına yönelik potansiyel bir direnç mekanizması olarak tanımlanmıştır. Dolayısıyla, glunisertib ile TGF- $\beta$ 'nin immün baskılayıcı etkilerinin inhibe edilmesi, kanser immünoterapisinin etkinliğini artırmak amacıyla kombinasyon fikrini oluşturmuştur (154, 172). Preklinik çalışmalarla, galunisertibin immün sistem üzerine etkileri monoterapi ile sınırlı kalırken, İKNI ile kombinasyon halinde güçlendiği, kanserin ilerlemesi ve anti-tümör T hücresi immünesinin gelişimini artırabileceği gösterilmiştir. Bu bulgulara dayanarak, galunisertibin anti-PD1 antikoru (nivolumab) ile kombinasyon halinde ileri evre KHDAK tedavisini amaçlayan klinik araştırma (NCT02423343) devam etmektedir, araştırmanın faz I ve faz II aşamaları tamamlanmıştır (157). Çalışmalarda ikili kombinasyonun güvenliliğinin, tolere edilebilirliğinin ve etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlanmaktadır. Bu çalışmalara yönelim olması, tezde söz konusu kombinasyon fikrinin akılcı bir yaklaşım olduğuna işaret etmektedir.

## 2.7. Hedeflendirme Ligandı Olarak Anti-EGFR Antikoru

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) sinyal yolağı, insan epitelyal kanserlerinde tanınan ilk onkojenik etmendır (173). Ligandları arasında epidermal büyüme faktörü (EGF) ve dönüştürücü büyüme faktörü-alfa (TGF- $\alpha$ ) bulunan EGFR, ErbB1 (HER-1) reseptör ailesinin bir üyesidir (174). Bu reseptör 170 kDa büyüklüğünde bir glikoprotein olup, ekstraselüler N- terminal ligand bağlanma bölgesine, hidrofobik transmembran bölgeye ve C terminali taşıyan tirozin kinaz bölgesine sahiptir (107).

EGFR'nin fizyolojik işlevi, epitelyal doku gelişimi ve homeostazını düzenlemektir. KHDAK gibi pek çok farklı kanser tipinde ise proliferasyon, anjiyogenez ve apoptoz gibi çeşitli metabolik süreçlerin düzenlenmesinde rol alarak tümör gelişimini destekleyici bir etki göstermektedir (175, 176). KHDAK, kolorektal kanser, pankreas, baş ve boyun kanserleri başta olmak üzere çok sayıda kanser tipinde EGFR'nin aşırı eksprese edildiği bilinmektedir (176, 177). Reseptörün seviyesindeki artış, kanser tiplerindeki agresiflik seviyesi ile de ilişkilendirilmektedir (107). Örneğin,

EGFR'nin, KHDAK teşhisi alan hastaların % 40-80'inde aşırı eksprese edildiği bilinmektedir (178).

Tez kapsamında hedeflendirme ligandı olarak, KHDAK'deki yüksek ekspresyon seviyeleri ve FDA onaylı bir antikör olması nedeniyle setuksimab (Erbix®) tercih edilmiştir. Setuksimab, EGFR'ye spesifik bir insan-fare kimerik IgG1 sınıfı monoklonal antikördür ve ~152 kDa ağırlığındadır (174, 179). Setuksimabın EGF reseptörüne hücre dışı bölgeden bağlanması, dimerizasyonu ve ardından hücre içi kinaz alanında reseptörün otofosforilasyon ile aktivasyonunu önlemektedir (174).

Setuksimab, ilerlemiş kolorektal, baş ve boyun kanserlerinin tedavisinde endike olsa da henüz KHDAK tedavisi amacıyla kullanım onayı bulunmamaktadır (180). İlerlemiş KHDAK hastalarında çeşitli faz II ve faz III çalışmalarında birinci basamak kemoterapi ile kombinasyon halinde klinik çalışmaları yapılmış ve tek başına kemoterapiye kıyasla setuksimab ile kombine tedavi sayesinde hayatta kalma süresinin arttığı gösterilmiştir (181). Tezde kullanılan anti-EGFR antikörünün ilaç taşıyıcı sistem formülasyonundaki asıl amacı, nanopartikülleri tümör dokusuna aktif olarak hedeflendirmesidir. Dolayısıyla doğrudan bir antikanser etki beklenmemektedir.

Sonuç olarak, nanopartiküller, tümör mikroçevresine lokalize edilebilmesi amacıyla akciğer kanserinde yüksek derecede eksprese edilen epidermal büyüme faktörü reseptörüne (EGFR) hedeflendirilmiştir. Ayrıca yukarıda belirtilen sebeplerden dolayı, anti-EGFR antikörünün, tümör hücre yüzeyindeki epidermal büyüme faktörü (EGF) reseptörünü bloke ederek anti-tümör etkinlik göstermesi beklendiği için antikanser etkinlik değerlendirilmesi yapılmıştır.

Önerilen tez, kombine halde anti-PD-1 antikörü F(ab')<sub>2</sub> fragmanı ve galunisertibi içermesi, pH'ya duyarlılığı, yüzeyinde anti-EGFR antikörünü içermesi ve tümör mikroçevresine hedeflendirilmiş olması nedenleriyle KHDAK'ye yönelik, etkinliği artırılmış, yenilikçi ve özgün bir immünoterapötik yaklaşım sunmaktadır. Hazırlanan kombine etkin madde yüklü hedefli nanosistemin sterilizasyonu aseptik ortamda dolum veya ultraviyole ışın ile sterilizasyon şeklinde gerçekleştirilebilir (182).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Araç ve Gereçler

##### 3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Amicon Ultra Santrifüj Tüpleri	Millipore, Almanya
Anti-EGFR Antikoru	Erbitux, Merck, Almanya
APC Anti-İnsan CD279 (PD-1) Antikoru	Biolegend, ABD
Asetik Asit	Sigma-Aldrich, ABD
Aseton	LAB-SCAN, İrlanda
Asetonitril (ACN)	Sigma-Aldrich, ABD
Bikinkoninik Asit (BCA) Protein Tayin Kiti	TAKARA, Çin
Blastisidin	Invivogen, ABD
Coomassie Blue R250	Sigma-Aldrich, ABD
DAPI (Çekirdek Boyası)	Sigma-Aldrich, ABD
Diklorometan (DCM)	Sigma-Aldrich, ABD
Dimetil Formamid (DMF)	Sigma-Aldrich, ABD
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich, ABD
DMEM	Biowest, ABD
EDTA (disodyum tuzu)	Sigma Aldrich, ABD
eFluor670 Proliferasyon Boyası	ThermoFisher Scientific, ABD
Ellman's Reaktifi	ThermoFisher Scientific, ABD
Etil Asetat (EA)	Sigma-Aldrich, ABD
Fare IgG1 K İzotip Primer Antikor	Biolegend, ABD
Fetal Sığır Serum (FBS)	Biochrom AG, Almanya
Fikol	Sigma Aldrich, ABD
FITC Annexin V Apoptoz Tespit Kiti	Biolegend, ABD
Galunisertib	Medchemexpress, ABD
Gliserin	Sigma Aldrich, ABD
Ham's F12 w/o L-Glutamin	Biowest, ABD
Hücre Yıkama Çözeltilisi	BD Biosciences, ABD
IdeS Proteaz	Promega, ABD

LEGENDplex™ İnsan CD8/NK Panel (13-plex)	Biolegend, ABD
Metanol (MetOH)	Sigma-Aldrich, ABD
Metiltiyazoliltetrazolyum (MTT)	Sigma, ABD
mPEG-PLGA-FKR560	PolySciTech, USA
N,N-Dimetilformamid	Applichem GmbH, Almanya
Nivolumab	Medchemexpress, ABD
Nivolumab SHIKARI ELISA Kit	Matriks Biotek, Türkiye
PBS pH 7,4 Tabletleri	Sigma Aldrich, ABD
Penisilin / Streptomisin	Biochrom AG, Almanya
PLGA Resomer® RG 50:50 503H	Boehringer Ingelheim, Almanya
PLGA-FPI749	PolySciTech, USA
PLGA-Histidin	PolySciTech, USA
PLGA-PEG-Maleimit	Nanosoft Polymers, ABD
Polivinil Alkol (30000 – 70000 Da)	Sigma Aldrich, ABD
RPMI 1640	Biowest, ABD
Saflaştırılmış Anti-Fare CD3/28 Antikoru	Ultra-LEAF™ Biolegend, ABD
Saflaştırılmış Anti-Fare CD3ε Antikoru	Ultra-LEAF™ Biolegend, ABD
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Sigma-Aldrich, ABD
Traut's Reaktifi (2-iminotiyolan HCl)	Sigma Aldrich, ABD
Tripan Mavisi	Sigma-Aldrich, ABD
Tripsin – EDTA Çözeltisi	Biochrom AG, Almanya
Zorbax Bonus RP; 4.6 x 75 mm; 3,5µm	Agilent, ABD

### 3.1.2. Biyolojik Maddeler

A549-Luc2 Hücre Hattı	ATCC, ABD
CD1 Nude Fare	Kobay D.H.L. A.Ş., Türkiye
L929 Hücre Hattı	ATCC, ABD

### 3.1.3. Kullanılan Cihazlar

Akım Sitometri Cihazı	BD FACSCanto™ II, ABD
Basınçlı Azot Tüpü	Linde, Türkiye
Çift Plakalı Isıtıcı (HP4668/22)	Philips, Hollanda
Etüv	Memmert, Almanya
Floresan Mikroskop	Leica, Wetzlar, Almanya
Hassas Terazî (XS 105)	Mettler Toledo, İsviçre
HPLC Cihazı (Agilent 1260 Infinity Diode Array Dedector)	Agilent Technologies, ABD
<i>İn vivo</i> Görüntüleme Sistemi Newton 7.0	Vilber, Fransa
İnkübatör (Heracell 150i)	Thermo Scientific/ ABD
Işık Mikroskobu	Olympus, Japonya
Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı (RT10)	IKA, Almanya
Jel Elektroforez Cihazı (Mini-Protean Tetra Cell)	Biorad Laboratories Inc., ABD
Laminar Akışlı Kabin (Hera Safe)	Thermo Scientific, ABD
Liyofilizatör (FreeZone 4.5)	Labconco, ABD
Mikropipet	Eppendorf, Almanya
Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyeli Ölçüm Cihazı	Zetasizer Nanoseries ZS, İngiltere
pH metre (HI 3220)	Hanna, Almanya
Plaka Okuyucu (Spectra Max Plus)	Molecular Devices, ABD
Q-100 DSC	TA Instruments, ABD
Santrifüj Aleti (Universal 320)	Hettich, Almanya
Santrifüj Aleti (FC5718R)	Ohaus, Kanada
Santrifüj Aleti (3-18KS)	Sigma, Almanya
Şiringa Ucu Filtre	Isolab, Almanya
Taramalı Elektron Mikroskobu	FEI Company, ABD
Tekstür Analiz Cihazı (XT-Plus)	Stable Micro Systems, İngiltere
Ultra Saf Su Sistemi (Milli Q)	Milipore, ABD

Ultrasonik Banyo (AL 04-12)	Advantage Lab, Almanya
Ultrasonik Prob (Sonopuls HD 4200)	Bandelin, Almanya
Vorteks	Nüvemix, Türkiye
Western Blot Transfer Cihazı	Power Blotter Thermo Scientific, ABD
Yatay Çalkalayıcılı Su Banyosu	Memmert, Almanya
Yüksek Kontrastlı Geçirimli Elektron Mikroskobu (Tecnai G2 Spirit Biotwin)	FEI Company, ABD

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Galunisertib için *In Vitro* Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu

Galunisertib için miktar tayin yöntemi olarak yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) kullanılmıştır. Geliştirilen yöntemin enkapsülasyon etkinliğini belirleme ve *in vitro* salım analizlerinde kullanılması planlanmıştır. HPLC yöntemi ile miktar tayini geliştirilmesi amacıyla farklı kolonlar, enjeksiyon hacimleri, mobil faz bileşimleri ve akış hızları kullanılarak ön denemeler literatürdeki çalışmalar (166, 183, 184) referans alınarak gerçekleştirilmiştir. En hassas sonuçlar, literatürde yer alan Zorbax Bonus RP kolonu (185) ile elde edilmiş, dolayısıyla bu kolon seçilerek çalışmalar sürdürülmüştür.

Galunisertibin en yüksek absorbans verdiği dalga boyunu belirlemek için HPLC ile elde edilen üç boyutlu UV spektrumu incelenmiştir. Spektrum taraması gerçekleştirilirken kör çözelti (maddenin çözündürüldüğü çözücü) olarak dimetilsülfoksit (DMSO):su karışımı kullanılmıştır. Galunisertibin maksimum absorbans gösterdiği dalga boyu ( $\lambda_{max}$ ) dikkate alınarak yapılan denemeler sonucunda, simetrik ve keskin bir pik ile elde edilebilen en uygun HPLC koşulları aşağıdaki şekilde belirlenmiştir (Tablo 3.1.).

**Tablo 3.1.** Galunisertibin HPLC ile miktar tayininde kullanılan analiz koşulları.

HPLC cihazı	Agilent 1260 Infinity Diyot Dizisi Dedektör HPLC
Akış hızı	1 mL/dakika
Kolon	Zorbax Bonus RP (USP-L60); 4,6 x 75 mm; 3,5 $\mu$ m
Kolon sıcaklığı	25 $\pm$ 1 °C
Mobil faz	Ultra saf su: % 0,1 Trifloroasetik asit: Asetonitril (74:17:9, h/h/h)
Enjeksiyon hacmi	40 $\mu$ L
Akış hızı	1,5 mL/dk
Dalga boyu	242 nm
Dedektör	Diyot Dizisi Dedektörü (DAD)-UV
Analiz türü	İzokratik elüsyon
Konsantrasyon aralığı	0,1-100 $\mu$ g/mL

Galunisertib için geliştirilen modifiye HPLC yönteminin validasyonu, Uluslararası Harmonizasyon Komitesi (ICH) Q2(R1) Kılavuzu'na göre aşağıdaki parametrelerin ölçümü/hesaplanması ve değerlendirilmesi ile valide edilmiştir.

- Doğrusallık (*Linearity*)
- Doğruluk (*Accuracy*)
- Kesinlik (*Precision*)
  - Tekrarlanabilirlik (*Repeatability*)
  - Tekrar Elde Edilebilirlik (*Reproducibility*)
- Duyarlılık (*Sensitivity*)
  - Saptama Sınırı (*Detection Limit*)
  - Miktar Tayini Sınırı (*Quantitation Limit*)
- Özgünlük (*Specificity*)
- Stabilité

Analitik yöntem validasyonu, miktar tayini yapılacak olan maddenin tayininde kullanılacak analitik yöntemin belirlenen koşullarda doğru, tekrarlanabilir ve özgün olduğunu garanti etmek için uygulanan protokoldür (186). HPLC analitik yönteminin doğrulanmasında aşağıdaki parametreler incelendikten sonra sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

### **Doğrusallık**

Doğrusallık, analitik bir yöntemin belirli bir konsantrasyon aralığında, analizi yapılan maddenin konsantrasyonu ile deney sonuçlarının direkt olarak orantılı olmasını sağlama yeteneğidir. Doğrusallığın belirlenmesinde en az 5 farklı konsantrasyon kullanılması önerilmektedir.

HPLC yönteminin “Doğrusallık” özelliğini belirlemek için, galunisertib DMSO ile çözüldükten sonra su eklenerek (final çözücü, DMSO:su 1:9, h:h) 1 mg/mL konsantrasyonda 6 adet stok çözeltisi hazırlanmıştır (n=6). Stok çözeltilerden hareketle DMSO:su (h/h, 1:9) karışımı ile gerekli seyreltmeler yapılarak; 0,1-0,25-0,5-1-5-10-25-50-100 µg/mL konsantrasyonlardaki standart çözeltiler oluşturulmuş ve HPLC analizleri gerçekleştirilmiştir. Sonrasında hazırlanan standart çözeltilerin konsantrasyonlarına karşı ölçülen pik alanları grafiğe geçirilmiş ve kalibrasyon doğrusu elde edilmiştir.

### Doğruluk

Doğruluk, kullanılan analitik yöntem ile elde edilen deney sonuçlarının gerçek değerlere yakınlığını ifade etmek için kullanılmaktadır. Galunisertinin miktar tayini için kullanılan yöntemin deney içi ve deneyler arası doğruluğunun değerlendirilmesinde aşağıda belirtilen formül kullanılmıştır (Formül 3.1.).

$$\text{Doğruluk (\% geri kazanım)} = \frac{\text{Ortalama tayin edilen konsantrasyon}}{\text{İlave edilen konsantrasyon}} \times 100 \quad (3.1.)$$

Doğruluk, % geri kazanım olarak tayin edilmiştir. Deney içi doğruluğun tespit edilebilmesi için kalibrasyon eğrisinde yer alan üç farklı konsantrasyonda (düşük, orta, yüksek; 0,5-5-50 µg/mL), her bir konsantrasyondan altı adet olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanmış ve aynı gün içinde art arda ölçümler gerçekleştirilmiştir.

Deneyler arası doğruluğun tespit edilebilmesi için ise kalibrasyon eğrisinde yer alan üç farklı konsantrasyonda (düşük, orta, yüksek; 0,5-5-50 µg/mL), her bir konsantrasyondan altı adet olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanmış ve birbirini takip eden üç gün tayinler gerçekleştirilmiştir. Doğruluk (bağıl hata) bulguları Formül 3.1. kullanılarak elde edilmiştir.

### Kesinlik

Kesinlik, analitik yöntemin tekrarlanabilirlik derecesinin ölçüsü olarak tanımlanmaktadır ve spesifik analiz koşulları altında elde edilen bağımsız analitik sonuçlar arasındaki uyumun derecesidir. Bir analitik yöntemin kesinliği, istatistiksel açıdan yeterli değerlendirmenin yapılacağı sayıda, aynı konsantrasyonda numunenin art arda ölçülerek, örnekler için varyasyon katsayısının (VK) hesaplanmasıyla belirlenmektedir (Formül 3.2.). Kesinlik, tekrarlanabilirlik ve tekrar elde edilebilirlik olarak ifade edilir.

$$\text{Varyasyon katsayısı (\%)} = \frac{\text{Serinin standart sapması (SS)}}{\text{Serinin aritmetik ortalaması (X)}} \times 100 \quad (3.2.)$$

Tekrarlanabilirlik çalışmaları, kullanılan analitik yöntemin farklı deney zamanlarında güvenilirliğinin kanıtlanması amacıyla yapılmaktadır. Tekrarlanabilirliğin tespiti için, kalibrasyon doğrusunda yer alan üç farklı

konsantrasyonda (düşük, orta, yüksek; 0,5-5-50 µg/mL) standart çözeltiler hazırlanmış, aynı konsantrasyondaki çözeltilerin pik alanları HPLC ile altı kez ayrı ayrı analiz edilip, hesaplanmıştır. Pik alanlarına karşılık gelen konsantrasyonlar için VK değerleri hesaplanmıştır.

Tekrar elde edilebilirlik kapsamında, aynı konsantrasyondaki çözeltiden hareketle, aynı analist, aynı laboratuvar ve aynı cihaz kullanılarak gerçekleştirilen ölçümlerde uyum ve uygunluk incelenir. Deneyler, üç farklı konsantrasyon düzeyinde uygun sayıda bağımsız çözelti kullanılarak aynı gün içinde ve farklı günlerde gerçekleştirilir. Deney içi tekrar elde edilebilirliğin tespiti için kalibrasyon doğrusunda yer alan üç farklı konsantrasyonda (düşük, orta, yüksek; 0,5-5-50 µg/mL) her bir konsantrasyondan altı adet olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanarak aynı gün içinde arka arkaya ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Deneyler arası tekrar elde edilebilirliğin tespiti için kalibrasyon doğrusunda yer alan üç farklı konsantrasyonda (düşük, orta, yüksek; 0,5-5-50 µg/mL), her bir konsantrasyondan altı ayrı standart çözelti hazırlanmış ve birbirini takip eden üç gün içerisinde analiz edilmiştir. Tekrar elde edilebilirliği değerlendirebilmek için, pik alanlarına karşılık gelen derişimler için varyasyon katsayısı değerleri hesaplanmıştır.

### **Duyarlılık**

Saptama sınırı (*Limit of Detection*, LOD), analizi yapılan maddenin kalitatif olarak saptanabildiği en düşük konsantrasyondur. Bu değer, sinyal:gürültü oranının 3:1 olduğu konsantrasyon ile ifade edilmektedir.

Miktar tayin sınırı (*Limit of Quantification*, LOQ), analitik yöntemin belirlenen şartlarda, analizi yapılan maddenin kabul edilebilir kesinlik ve doğruluk ile kantitatif olarak tayin edilebildiği en düşük konsantrasyon olarak tanımlanır. Bu değer, sinyal:gürültü oranının 10:1 olduğu konsantrasyon ile ifade edilmektedir.

### **Özgünlük**

Analitik bir yöntemin özgünlüğü; ortamda bulunan etkin madde dışındaki ekşiyanların, safsızlıkların veya parçalanma ürünlerinin varlığında, analiz edebilme yeteneğini göstermektedir. Bu ölçütlerin değerlendirilmesine yönelik olarak formülasyonda kullanılan diğer maddelerin (PLGA, PVA, nivolumab, anti-EGFR,

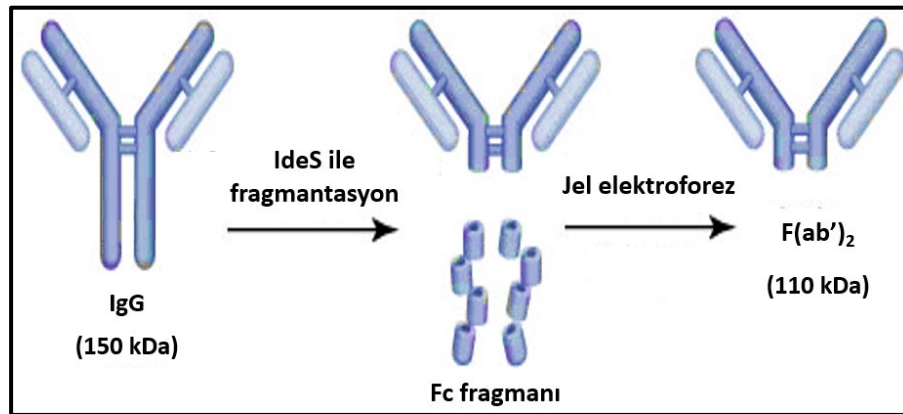
salım ortamı bileşenleri) formülasyonda buldukları konsantrasyonda çözeltileri hazırlanmış ve etkin madde analizinin yapıldığı koşullarda HPLC kullanılarak kromatogramları incelenmiştir.

### Stabilite

Galunisertibin analiz boyunca stabilitesini göstermek amacıyla 0,5-5-50 µg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltileri HPLC cihazı kullanılarak analiz edilmiş ve 24 saat boyunca laboratuvar koşullarında (21-25 °C) bekletilerek aynı numuneler tekrar analiz edilmiştir. Sonuçlar arasındaki farkın anlamlı olup olmadığı istatistiksel olarak test edilmiştir.

### 3.2.2. Nivolumab Antikorumunun Fragmentasyonu

Antikor fragmentasyonu amacıyla, IgG antikorumunun menteşe bölgesinin alt kısmından keserek F(ab')<sub>2</sub> ve Fc fragmanlarına ayıran IdeS (*Immunoglobulin-degrading enzyme from Streptococcus pyogenes*) enzimi tercih edilmiştir (Şekil 3.1.) (187).



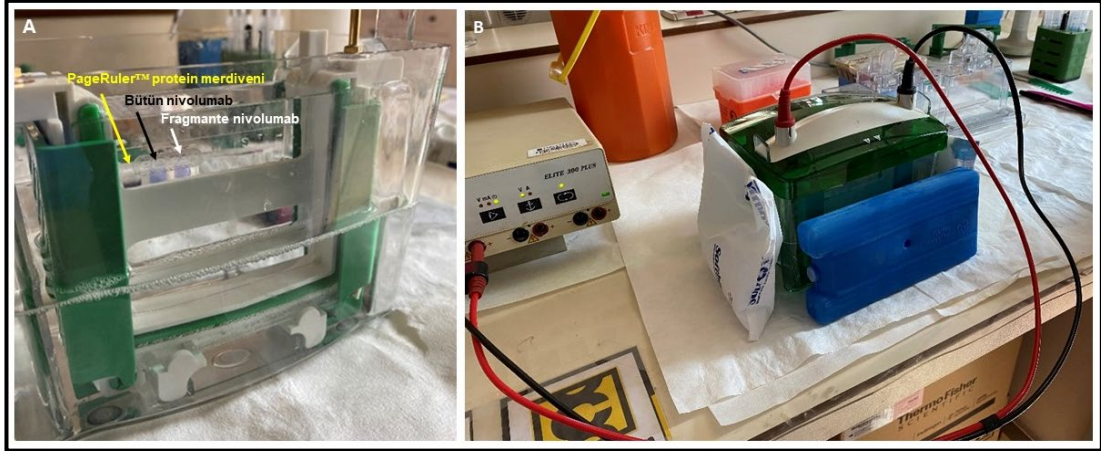
**Şekil 3.1.** Antikorumun IdeS ile fragmentasyonu (188).

1 ünite enzim, 1 µg antikoru fragmente edebilecek kapasiteye sahiptir. Dolayısıyla fragmentasyon amacıyla kullanılan enzim ve antikor oranı 1:1'dir. Çalışmada liyofilize halde temin edilen IdeS (5000 ünite), ürünün protokolünde belirtildiği şekilde 100 µL ultra saf su içinde disperse edilmiştir. PBS tamponu (pH 7,4) içinde disperse halde bulunan 1 mg/mL konsantrasyondaki nivolumab çözeltisinden 100 µL alınarak, üzerine 2 µL (100 ünite enzim) IdeS enzimi eklenmiş

ve 1 saat boyunca 37 °C'deki su banyosunda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda elde edilen F(ab')<sub>2</sub> ve Fc fragmanı karışımından Fc fragmanlarını uzaklaştırmak için 100 kDa ve 50 kDa nominal molekül ağırlık sınırına (NMWL) sahip Amicon® ultrasantrifüj filtreleri kullanılmıştır. Ultra filtrelere inkübasyon sonucu elde edilen fragmente antikor karışımı eklendikten sonra, filtreler düz şekilde Eppendorf® tüplerine yerleştirilmiş ve 10000 rpm'de 10 dk 25 °C'de santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Santrifüj sonrası filtreler Eppendorf® tüpünden çıkartılıp, yeni bir Eppendorf® tüpüne ters konumda yerleştirildikten sonra 700 rpm'de 1 dk 25 °C'de santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir.

Fragmantasyon işleminin doğrulanması ve ultra filtre kullanılarak F(ab')<sub>2</sub> ve Fc fragmanlarının birbirinden ayrıldığına doğrulanması amacıyla indirgen olmayan sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (*Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) yöntemi gerçekleştirilmiştir. SDS-PAGE analiz yöntemi, protein saflık analizi için yaygın olarak kullanılan popüler bir tekniktir (189).

SDS-PAGE analizi için ilk olarak yükleme (*stacker*) ve ayırma (*resolver*) jelleri hazırlanmıştır. Yükleme jeli için 1 mL *Stacker A*, 1 mL *Stacker B*, 10 µL amonyum persülfat (APS), 2 µL tetrametietilendiamin (TEMED) çözeltisi; ayırma jeli için ise 3 mL *Resolver A*, 3 mL *Resolver B*, 30 µL APS, 3 µL TEMED çözeltisi hazırlanmış ve plakalar arasına dökülmüştür. Jel oluşumu esnasında, yükleme jeli üzerine eklenen tarak sayesinde numunelerin tatbik edileceği kuyucuklar hazırlanmıştır. SDS-PAGE analizinde gerekli olan yürütme tamponu için tris, gliserin ve SDS'in sulu çözeltisi hazırlanmıştır. Elde edilen tampon, yürütmenin yapılacağı tank içine yerleştirilen jel düzeneğinin etrafına doldurulmuştur. Sonra, yükleme boyası (Tris HCl, bromofenol mavisi, SDS ve gliserolden oluşan), numunelerle 1:1 (10 µL:10 µL) oranında karıştırılarak kuyucuklara yüklenecek numuneler hazır hale getirilmiştir. Kuyucuklara sırasıyla 4 µL hazır protein çözeltisi (PageRuler™ protein merdiveni) ve 20 µL numune(ler) yüklenmiştir (Şekil 3.2.).



**Şekil 3.2.** Fragmentasyonun doğrulanması amacıyla yapılan SDS-PAGE analizi. A: numunelerin tatbiki; B: Elektrik akımı uygulaması.

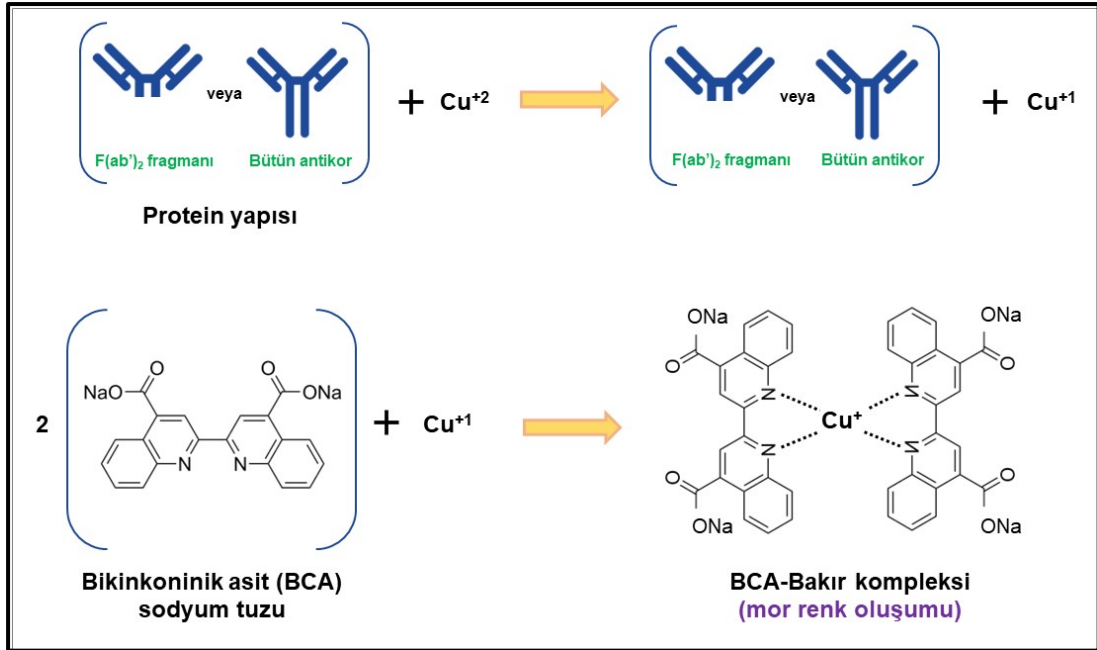
Tanka, 3 saat boyunca 50 voltluk elektrik akımı uygulanarak jelde protein yapılarının molekül ağırlıklarına göre yürümesi sağlanmıştır. 3 saatin sonunda elde edilen jelde bantların görünmesi için fiksasyon çözeltisi (distile su:izopropanol:asetik asit, 32,5:12,5:5, h/h/h) ve boya çözeltisi hazırlanmıştır. Tanktan çıkartılarak ayrılan jel, önce 50 dk fiksasyon çözeltisinde oda sıcaklığında bekletilmiş ardından bu çözelti ortamdaki uzaklaştırılarak Coomassie Blue R250 boya çözeltisi eklenerek gece boyu yatay çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında bekletilmiştir. Boyayı jelden uzaklaştırmak için yıkama çözelti (metanol:distile su:asetik asit, 25:20:5, h/h/h) hazırlanmış ve jel bu çözelti ile 3 kez yıkanarak sonuç görüntüleri elde edilmiştir.

### 3.2.3. Nivolumab için *In Vitro* Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu

Tez kapsamında geliştirilen nanopartiküllere antikor enkapsülasyonu gerçekleştirilmiştir. Nanopartiküllere yüklenen ve *in vitro* salım çalışmalarında nanopartiküllerden salınan antikor miktarının belirlenebilmesi için miktar tayini yöntemi geliştirilmiştir. Tezin ilk bölümlerinde fragmente nivolumab ile deneyler gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) yöntemi kullanılması planlanmış ancak, fragmente nivolumaba spesifik bir ELISA kit olmaması sebebiyle Anabilim Dalı bünyesindeki cihaz ve yöntemlerle ön denemeler gerçekleştirilerek bikinkoninik asit (*Bicinchoninic Acid*, BCA) analizinin çalışmalarda kullanılması uygun bulunmuştur.

### Fragmente Nivolumab için Bikinkoninik Asit (BCA) Yöntemi ile Miktar Tayini Geliştirilmesi

BCA testi, protein konsantrasyonunu tespit etmek için kullanılan kolorimetrik bir yöntemdir. Yöntemin çalışma prensibi, protein yapısının, BCA stok çözeltisi içindeki  $\text{Cu}^{+2}$  iyonlarını  $\text{Cu}^{+1}$  iyonlarına indirgemesi ve bu indirgenmiş iyonların bikinkoninik asit ile reaksiyona girerek mor renkli bir kompleks oluşturması esasına dayanmaktadır (190) (Şekil 3.3.). Numunelerin konsantrasyonları ELISA plaka okuyucu üzerinde 562 nm'deki absorbansın ölçülmesi ile belirlenmektedir (191). Bu yöntemin analizlerde kullanılma sebebi çok düşük konsantrasyonlardaki (0,02-2  $\mu\text{g/mL}$ ) bütün antikor veya fragmanlarının miktar tayinini doğru bir şekilde gerçekleştirebilmesidir (192).



Şekil 3.3. BCA protein analizi için BCA-bakır kompleksinin oluşumu.

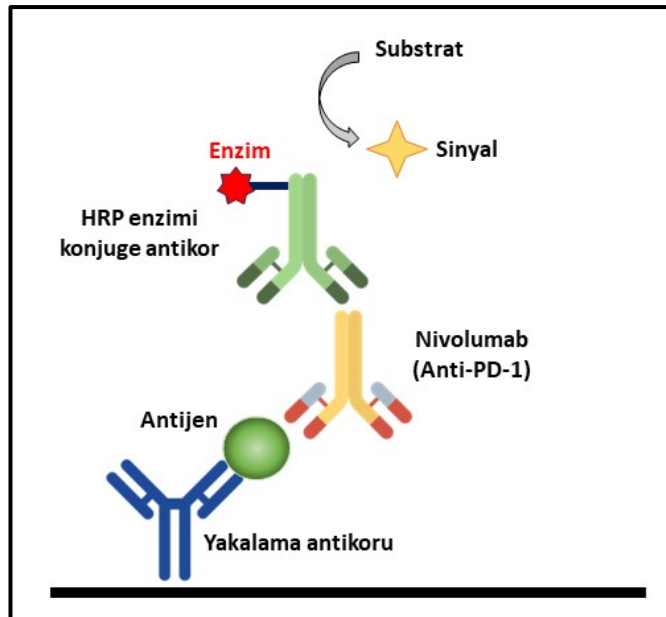
Bu amaçla öncelikle sığır serum albumin (*Bovine Serum Albumin*, BSA) standardı kullanılarak kalibrasyon doğrusu elde edilmiş ve kitin doğrusallığı teyit edilmiştir. Ek olarak, fragmente nivolumabın stok çözeltisi kullanılarak nivolumaba ilişkin spesifik kalibrasyon doğrusu oluşturulmuş ve analiz sonuçları bu kalibrasyon doğrusu dikkate alınarak değerlendirilmiştir.

Standart çözeltilerinin hazırlanması amacıyla 2 mg/mL konsantrasyondaki BSA stok çözeltisinden hareketle gerekli seyreltmeler yapılarak 5-10-20-50-100-150-

200 µg/mL konsantrasyonlardaki standart çözeltiler oluşturulmuştur. Elde edilen standartlar mikro plaka kuyucuklarına ikişer tekrarlı olarak eklenmiştir. Sırasıyla, önce 100 µL numune, ardından renk oluşumunu sağlamak amacıyla 100 µL BCA belirteci eklenmiş, plakanın kapağı kapatılarak 37 °C’de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bilinen konsantrasyonlardaki BSA standartlarının 562 nm dalga boyunda verdikleri absorbansın okunmasıyla elde edilen değerler, standart çözelti konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirilerek bir kalibrasyon denklemi elde edilmiştir. Ardından, konsantrasyonu bilinmeyen numunenin absorbans değerinden yola çıkarak bu denklem ile numune içindeki protein miktarı tayin edilebilmiştir.

### Nivolumab için ELISA Yöntemi ile Miktar Tayini Geliştirilmesi

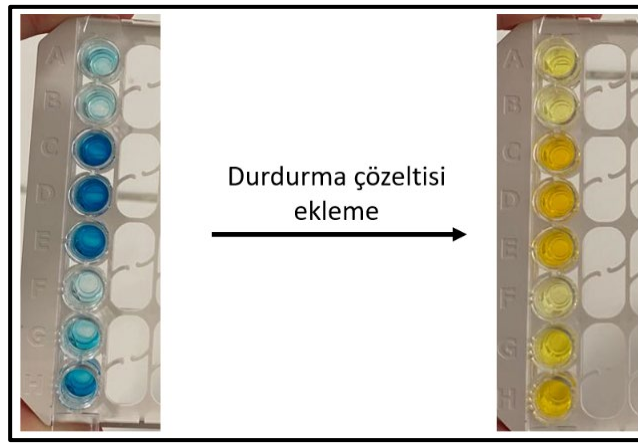
Fragmente antikorun immün yanıtta yetersiz kalması sebebiyle tez çalışmalarına fragmente olmayan bütün antikor ile devam edilmesine karar verilmiştir. ELISA yöntemi, fragmente nivolumabın miktar tayininde kullanılan BCA analizine kıyasla daha hassas ve doğru sonuçlar vermesi sebebiyle bütün antikorun miktar tayininde tercih edilmiştir (72). Nivolumab için kullanılan ELISA kiti, sandviç ELISA prensibine göre çalışmaktadır (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. Sandviç ELISA ile nivolumabın miktar tayininin şematik gösterimi.

Önceden nivolumab reaktanı ile kaplanmış ELISA plakaları (96-kuyucuklu düz zeminli immüno plaka) üzerine standart çözeltiler (0-0,03-0,1-0,3-1 µg/mL) ve

numuneler 100'er  $\mu$ L eklenerek oda sıcaklığında karanlık ortamda 1 saat boyunca inkübe edildikten sonra 3 kez yıkama çözeltisi ile yıkanmıştır. Ardından enzim (yaban turbu peroksidazı, HRP) konjuge antikor eklenerek 30 dk inkübasyon yapıp yeniden 3 kez yıkama yapılmıştır. Tetrametilbenzidin (TMB) kromojen substrat uygulamasını takiben 10 dk inkübasyon yapılmış ve reaksiyonun sonlandırılması amacıyla asidik yapıdaki durdurma çözeltisi uygulanarak, optik yoğunluk ölçümü (*Optical Density*, OD) ELISA plaka okuyucu ile 450/650 nm dalga boyunda yapılmıştır. Durdurma çözeltisi eklenmeden önce mavi renkte olan çözeltiler ortamın asidikleşmesi ile sarı renge dönüşmektedir (Şekil 3.5.). Rengin yoğunluğu, numune veya standart çözeltilerindeki nivolumab miktarı ile orantılıdır.



**Şekil 3.5.** ELISA analizinin son basamağında pH'ya bağlı gözlenen renk değişimi.

ELISA plaka okuyucu ile renklerin yoğunluğuna bağlı olarak okunan optik yoğunluk değerleri ile dört parametrelili lojistik (4PL) eğrisi (sigmoidal şekilde) elde edilmiştir. ELISA gibi biyoanalizler genellikle yalnızca belirli bir konsantrasyon aralığı boyunca doğrusal olduğu için kalibrasyon eğrisi oluşturmak için 4PL modeli kullanılması daha uygundur (193, 194).

#### **3.2.4. Farklı Geometrik Şekillerde PLGA Nanopartiküllerinin Hazırlanması**

Tez kapsamında küresel, çubuk (rod) ve eliptik disk olmak üzere üç farklı geometrik şekle sahip PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG nanopartikül formülasyonlarının geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda, ilk olarak küresel nanopartikül üretimi

yapılmış olup, bu nanopartiküllerden hareketle çubuk ve eliptik disk yapıda farklı şekle sahip nanopartiküllerin üretimi gerçekleştirilmiştir.

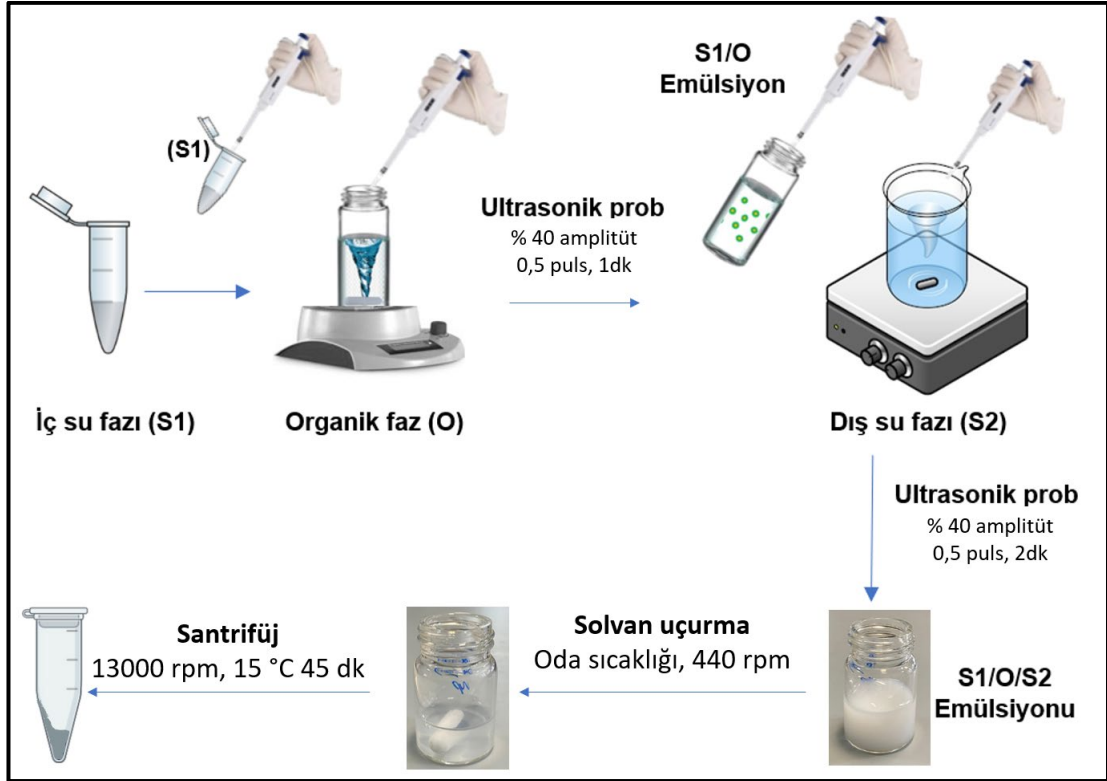
### Küresel Nanopartiküllerin Hazırlanması

Küresel nanopartiküller, çift emülsifikasyon/çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır (72). Bu yöntem sayesinde farklı çözünürlük özelliğine sahip iki etkin madde tek bir nano taşıyıcıya enkapsüle edilebilmiştir. Küresel nanopartiküllerin hazırlanmasında Tablo 3.2.'de belirtilen oran ve hacimlerde iç su fazı, organik faz ve dış su fazları hazırlanmıştır.

**Tablo 3.2.** Çift emülsifikasyon/çözücü buharlaştırma yöntemi ile boş veya kombine etkin madde yüklü nanopartikül üretimi için gerekli faz bileşimi ve miktarları.

Nanopartikül	Faz	İçerik	Hacim
Boş	İç su fazı (S1)	PVA'nın ultra saf su içerisindeki % 2'lik çözeltisi	750 µL
	Organik faz (O)	PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG (1,5:1,5:1 a/a/a)'in diklorometan:aseton (1:1,5 h/h) içerisindeki % 1'lik çözeltisi	2,5 mL
	Dış su fazı (S2)	PVA'nın ultra saf su içerisindeki % 0,5'lik çözeltisi	10 mL
Kombine etkin madde yüklü	(S1)	PVA'nın ultra saf su içerisindeki çözeltisi + Nivolumabın PBS 7,4 tamponundaki 1mg/mL stok çözeltisi	650 µL 100 µL
	(O)	PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG (1,5:1,5:1 a/a/a)'in diklorometan içerisindeki çözeltisi + 2 mg galunisertibin aseton içerisindeki çözeltisi	1 mL 1,5 mL
	(S2)	PVA'nın ultra saf su içerisindeki % 0,5'lik çözeltisi	10 mL

İç su fazı, manyetik karıştırıcı üzerindeki organik faza eklendikten sonra buz banyosunda ultrasonik prob yardımıyla homojenize edilmiş ve bu şekilde su/yağ emülsiyonu (primer emülsiyon) oluşturulmuştur. Oluşturulan bu emülsiyon, manyetik karıştırıcı üzerinde dış su fazına eklendikten sonra buz banyosunda ultrasonik prob yardımıyla homojenize edilmiş ve nihai su/yağ/su emülsiyonu (sekonder emülsiyon) oluşturulmuştur (Şekil 3.6.).



**Şekil 3.6.** Çift emülsifikasyon/çözücü buharlaştırma yöntemi ile nanopartikül üretiminin şematik gösterimi.

Elde edilen emülsiyondaki organik fazın (aseton ve DCM) uçurulması amacıyla, üretimin boyutuna göre belirlenen süre boyunca (2-4 sa) çeker ocak altında karıştırma işlemi yapılmıştır. Uçucu çözücülerin buharlaştırılmasının ardından santrifüj işlemi gerçekleştirilmiş ve süpernatant ayrılmıştır. Santrifüj işlemi 2 kez daha ultra saf su ile tekrarlanarak PVA'nın, organik çözücü kalıntılarının ve enkapsüle olmayan etkin maddelerin uzaklaştırılması sağlanmıştır (195).

### Çubuk Şeklindeki Nanopartiküllerin Hazırlanması

Çubuk şeklindeki nanopartiküller, küreselden hareketle film germe tekniği ile hazırlanmıştır. Bu amaçla, literatürdeki film germe yöntemi modifiye edilmiştir (88, 89). İçerisinde nanopartikülleri içeren PVA film (% 5 PVA) hazırlanmış ve uygun boyutlu bir kalıba dökülmüştür. Kuruyan film (Şekil 3.7.), germe aparatına (*tensile grip*) uygun olacak şekilde 3,7x7,5 cm ölçülerinde kesilmiştir. Modifiye yöntemde, tekstür analiz cihazı kullanılmış ve germe işlemi esnasında çift plakalı ısıtıcı ile ısı uygulaması yapılmıştır (80).



**Şekil 3.7.** Çubuk ve eliptik disk şeklindeki nanopartiküllerin üretiminde kullanılmak üzere hazırlanan küresel nanopartikül yüklü PVA film.

Cihaza yerleştirilen filme 3 dk boyunca 150 °C'ye ayarlı ısıtıcı uygulaması sonrası germe işlemi gerçekleştirilmiştir. Filmin 1,6 kat gerildiği noktada germe işlemi sonlandırılmıştır. Film, cihazdan alınarak manyetik karıştırıcı üzerinde 5 mL ultra saf suda çözülmüş, nanopartiküllerin PVA çözeltisinden uzaklaştırılması için 6000 rpm 18 °C koşullarında 4 kez 20 dk santrifüj yapılarak nihai nanopartiküller elde edilmiştir (88, 89).

### **Eliptik Disk Şeklindeki Nanopartiküllerin Hazırlanması**

Eliptik disk şekilli nanopartiküller, çubuk şeklindeki nanopartiküllerle aynı yöntem kullanılarak üretilmiştir. İki şeklin üretimi arasındaki tek fark germe oranıdır. Eliptik disk şeklindeki nanopartiküllerin üretiminde, filmin 2,25 kat gerildiği noktada germe işlemi sonlandırılmıştır. Film cihazdan alınarak manyetik karıştırıcı üzerinde 5 mL ultra saf suda çözülmüş, nanopartiküllerin PVA çözeltisinden uzaklaştırılması için 18 °C 6000 rpm'de 4 kez 20 dk santrifüj yapılarak nihai nanopartiküller elde edilmiştir.

### **3.2.5. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu**

Nanopartiküllerin karakterizasyonu kapsamında partikül boyutu, partikül boyutu dağılımı (polidispersite indeksi, PDI), zeta potansiyeli, morfolojik özellikler, enkapsülasyon etkinliği, termal özellikler ve *in vitro* salım özellikleri değerlendirilmiştir.

### Partikül Boyutu, Polidispersite İndeksi ve Zeta Potansiyeli

Etkin madde içermeyen küresel, çubuk (rod) ve eliptik disk şeklindeki nanopartiküller ve etkin madde yüklü olan küresel nanopartiküllerin partikül büyüklüğü, dağılımları (62) ve zeta potansiyelleri (196) dinamik ışık saçılımı esasına göre çalışan Malvern Nano ZS cihazı ile ölçülmüştür (Tablo 3.3.). Her formülasyon için art arda üç tekrarlı ölçüm yapılmıştır (n=3).

**Tablo 3.3.** Partikül büyüklüğü analizine ilişkin çalışma koşulları.

<i>Ölçüm sıcaklığı</i>	25 °C
<i>Işık saçılım açısı</i>	90 °
<i>Formülasyonlarda kullanılan polimerin (PLGA) refraktif indeksi</i>	1,40
<i>Dispersiyon ortamı</i>	Deiyonize su
<i>Dispersiyon ortamı refraktif indeksi</i>	1,33
<i>Küvet</i>	DTS 1070 ( <i>folded capillary zeta cell</i> )

### Morfolojik Özelliklerin İncelenmesi

Tez kapsamında hazırlanan farklı geometrik şekillerdeki PLGA nanopartiküllerinin morfolojik özellikleri transmisyon/geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile incelenmiştir. TEM analizi için Lantan hekzaborür (LaB6) elektron tabancalı, 20-120 kV aralığında hızlandırıcı voltaj altında çalışan yüksek kontrastlı geçirimli elektron mikroskobu (CTEM) ile Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'ndan hizmet alımı sağlanarak çalışmalar gerçekleştirilmiştir. TEM görüntülemesinin çalışma prensibi, bir elektron demetinin ultra ince numuneye gönderilmesi ve numunenin içinden geçerken numune ile etkileşime girmesi esasına dayanmaktadır (62). TEM analizi için hazırlanan nanopartikül dispersiyonları, karbon film kaplı bakır ızgaralar üzerine damlatılmış ve görüntüleme gerçekleştirilmiştir.

### Enkapsülasyon Etkinliği ve Yükleme Kapasitesinin Değerlendirilmesi

Enkapsülasyon etkinliği (EE) galunisertib ve nivolumab F(ab')<sub>2</sub> fragmanı yüklü PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG nanopartikülleri için indirekt yöntemle

değerlendirilmiştir (197). Enkapsülasyon etkinliği Formül 3.3. kullanılarak hesaplanmaktadır:

$$EE (\%) = \frac{\text{Formülasyona eklenen miktar} - \text{süpernatandaki miktar}}{\text{Formülasyona eklenen miktar}} \times 100 \quad (3.3.)$$

Galunisertib ve nivolumab F(ab')<sub>2</sub> fragmanı yüklü küresel nanopartiküller çift emülsifikasyon/çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlandıktan sonra, bu partiküllerin bir bölümü ile çubuk ve eliptik disk şeklindeki nanopartiküller film germe yöntemi ile hazırlanmıştır. Ardından 8000 rpm 15 °C koşullarında 45 dk santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonucunda elde edilen süpernatant hacimleri kaydedilmiş ve süpernatant 0,22 µm por açıklığına sahip selüloz asetat filtresinden süzülükten sonra galunisertib için süpernatant:DMSO (9:1 h/h) karışımı hazırlanarak HPLC analizi gerçekleştirilmiş, gerekli hesaplamalar yapılmıştır. Nivolumab F(ab')<sub>2</sub> fragmanı için süpernatant kullanılarak önceden geliştirilen BCA yöntemine göre miktar tayini yapılmıştır. Miktar tayininde süpernatant numunesi ile iki tekrarlı olacak şekilde çalışılmış ve ELISA plaka okuyucu ile 562 nm'de okuma yapılmıştır. Süpernatant için elde edilen absorbans değerlerinden blank absorbans değerleri çıkartılarak elde edilen değerlerin ortalaması alınıp, kalibrasyon doğrusu ile bilinmeyen konsantrasyon değeri hesaplanmıştır. Ek olarak, enkapsülasyon etkinlikleri belirlendikten sonra nanopartiküller liyofilize edilmiş ve toplam kuru ağırlıklar belirlenerek yükleme kapasitesi (YK) değerleri de Formül 3.4. kullanılarak hesaplanmıştır:

$$YK (\%) = \frac{\text{Formülasyona eklenen miktar (mg)} - \text{süpernatandaki miktar(mg)}}{\text{Liyofilize nanopartikül ağırlığı (mg)}} \times 100 \quad (3.4.)$$

Nanopartiküller için optimum şekle (küresel) karar verildikten sonra konjugasyon çalışmaları yapılmıştır. Konjuge nanopartiküller için enkapsülasyon etkinliği ve yükleme kapasitesi ayrıca hesaplanmıştır. Her iki etkin madde için de indirekt ölçüm yöntemi ile enkapsülasyon etkinliği tayin edilmiştir. Küresel nanopartiküllerin üretimi sırasında elde edilen süpernatant ve konjugasyon sonrası elde edilen süpernatantlar ayrı viallerde toplanmıştır. HPLC ve BCA analizi sonucuna göre toplam yüklenmeyen etkin madde miktarı bulunmuştur.

## Termal Özelliklerin İncelenmesi

PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG polimeri ile hazırlanan boş PLGA NP'lerin, etkin madde yüklü NP'lerin ve etkin maddelerin camsı geçiş sıcaklığı, faz geçiş sıcaklığı ve erime noktası gibi termal özellikleri Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (*Differential Scanning Calorimeter*, DSC) analizi ile belirlenmiştir. Analiz, Öztürk ve arkadaşlarının çalışmalarında (198) kullandıkları yöntem referans alınarak Hacettepe Üniversitesi bünyesinde gerçekleştirilmiştir.

**Tablo 3.4.** DSC analiz koşulları.

<i>Cihaz</i>	Q-100 DSC
<i>Atmosfer</i>	Azot (50 mL/dk)
<i>Analiz başlangıç ve bitiş sıcaklıkları</i>	25 - 300 °C
<i>Sıcaklık yükseltme ve soğutma hızı (ramp time)</i>	10 °C/dk
<i>Standart</i>	Alüminyum pan

Nivolumabın çözelti halinde temin edilmesi ve nanopartiküllerin çöktürme işlemi sonrası bir miktar dispersiyon ortamı içermesi sebebiyle numuneler, analiz öncesi liyofilize edilmiştir. Tablo 3.4.'te belirtilen koşullarda, liyofilize haldeki numunelerden (Tablo 3.5.) 5 mg tartılarak alüminyum örnek kabına yerleştirilmiş ve sıcaklık kademeli olarak artırılmıştır.

**Tablo 3.5.** DSC analizi amacıyla hazırlanan numunelerin bileşimi.

Numune	Bileşim
1	Galunisertib (katı toz) + nivolumab F(ab') <sub>2</sub> fragmanı (liyofilize) 1:1 oranında fiziksel karışımı
2	Galunisertib (katı toz) + nivolumab F(ab') <sub>2</sub> fragmanı (liyofilize) + etkin madde yüklü olmayan PLGA nanopartikül (liyofilize) 1:1:1 oranında fiziksel karışımı
3	Galunisertib yüklü nanopartikül (liyofilize) + nivolumab F(ab') <sub>2</sub> fragmanı yüklü nanopartikül (liyofilize) 1:1 oranında fiziksel karışımı

## *In Vitro* Salım Çalışması

Nanopartiküler sistemlerin ürün kalitesi, güvenliği ve etkinliğini değerlendirmede *in vitro* salım çalışmaları anahtar bir rol oynamaktadır. Literatür incelendiğinde, nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin *in vitro* salım profillerinin

eldesi için, üç adet yöntemin mevcut olduğu görülmüştür. Bunlar; sürekli akış (*continuous flow*), diyaliz membran ve tüp (*sample and separate*) yöntemidir (199, 200). Tez kapsamında salım yöntemi seçilirken dikkate alınan en önemli parametre, numunelerin analiz edilebilecek konsantrasyonlarda etkin madde içermesi olarak belirlenmiştir. Nanopartiküle yüklenen nivolumab F(ab')<sub>2</sub> fragmanının miktar tayini yapılabilmesi için düşük hacimde çalışılması gerekmektedir. Bu sebeple salım çalışmaları tüp yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Aynı tüpten tekrarlı numune alınması sonucunda, çoklu santrifüj işleminin nanopartiküllerde agregasyona sebep olduğu tespit edilmiş olup (201), her zaman noktası için ayrı santrifüj tüpü kullanılmıştır. Çalışmalar, fizyolojik pH'yı temsil eden pH 7,4 ortamı ve asidik tümör mikroçevresini temsil eden pH 6,8 ortamı olmak üzere iki farklı ortamda ve sink koşullarda gerçekleştirilmiştir (202, 203) (Tablo 3.6.).

**Tablo 3.6.** Salım deneylerine ilişkin bilgiler.

<i>Yöntem</i>	Tüp ( <i>sample and separate</i> )
<i>Cihaz</i>	Yatay çalkalayıcı, ısıtıcı su banyosu
<i>Salım ortamı</i>	pH 6,8 ve 7,4 fosfat tamponu
<i>Salım hacmi</i>	0,5 - 0,75 veya 1,0 mL
<i>Analiz süresi</i>	72 saat
<i>Sıcaklık</i>	37±0,1 °C
<i>Çalkalama hızı</i>	105 spm ( <i>stroke per minute</i> )
<i>Numune alım yöntemi</i>	Santrifüj (13500 rpm, 20-25 °C, 30 dk)

Salım çalışmasında önceden belirlenen zaman aralıklarında en son 72. saat olmak üzere örnekler alınmış, bu örnekler salınan galunisertib miktar tayini için valide edilmiş HPLC yöntemi ile, salınan nivolumab miktar tayini belirlenmesinde ise, fragmente antikor için mikro BCA kiti, bütün antikor için ELISA kiti kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir. Salınan madde miktarlarından yola çıkılarak zamana karşı % kümülatif salım grafikleri elde edilmiştir.

### 3.2.6. Farklı Geometrik Şekillerdeki Nanopartiküllerin Sağlıklı Hücreler Üzerindeki Toksisitesinin Değerlendirilmesi

Deney kapsamında, nanopartikülün geometrik şeklinin sağlıklı hücrelerin canlılığı üzerindeki etkisi analiz edilmiştir. Bu amaçla, metil-tiyazol-tetrazolyum

(MTT) yöntemi kullanılarak etkin madde yüklü olmayan (boş) nanopartiküllerin sitotoksosite profilleri değerlendirilmiştir. MTT testi, hücrelerin metabolik aktivitesinin değerlendirilmesine dayanan kolorimetrik bir testtir (204). Yöntemin çalışma prensibi, mitokondriyal aktivite gösteren hücrelerin (canlı hücreler), sarı renkli olan MTT (3,(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difenil tetrazolyum bromid) tuzunu mor renkli formazan kristallerine dönüştürmesine dayanmaktadır. Böylece, canlı hücre sayısındaki herhangi bir artış veya azalma, bir plaka okuyucu kullanılarak optik yoğunluğa (OD) etki eden formazan konsantrasyonu ölçülerek tespit edilebilmektedir (205). Hücre canlılıkları aşağıdaki formül (Formül 3.5.) kullanılarak hesaplanmaktadır:

$$\text{Canlılık (\%)} = \frac{\text{Numunelerin ortalama optik yoğunluğu}}{\text{Kontrol grubunun ortama optik yoğunluğu}} \times 100 \quad (3.5.)$$

Yöntem kapsamında, fare fibroblast hücreleri (L929) ile çalışılmıştır. Besiyeri içinde bulunan hücreler,  $2 \times 10^4$  hücre/kuyu (50  $\mu\text{L}$ ) olacak şekilde 96 kuyulu plakalara ekilmiştir. Hücreler, plakaya tutunması için % 5 karbondioksit ( $\text{CO}_2$ ) ve 37 °C koşullarındaki inkübatörde 24 saat bekletilmiştir. Hücrelerin plakaya tutunması ve yeterli sayıda olması şartı mikroskop ile teyit edildikten sonra 50  $\mu\text{L}$  hacimdeki küresel, çubuk ve eliptik disk şekilli nanopartikül formülasyonları 10-25-50-100-250-500  $\mu\text{g/mL}$  olacak şekilde altı farklı konsantrasyonda kuyucuklara eklenmiştir (n=4). 24 ve 48 saat inkübasyonu takiben, hücrelerin üzerine 25  $\mu\text{L}$  MTT eklenerek 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kuyulara 80  $\mu\text{L}$ , % 45'lik dimetilformamid (DMF) içinde çözülmüş % 23'lük SDS (pH 4,7) çözeltisi eklenerek plakalar gece boyu inkübatörde bekletilmiş ve bu sayede hücrelerin oluşturduğu formazon kristallerinin parçalanması sağlanmıştır. 12-15 saat sonunda plaka okuyucu ile spektrofotometrik olarak 570 nm'de OD değerleri ölçülmüş ve üç farklı şekil için % canlılık değerleri hesaplanmıştır (206). 24 ve 48 saat için % canlılık sonuçları ikili gruplar halinde (küresel-çubuk, küresel-eliptik disk, çubuk-eliptik disk) Mann-Whitney U testi ile test edilerek gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık (p değeri yorumlanarak) olup olmadığı Graphpad Prism 8 yazılımı kullanılarak tespit edilmiştir.

### 3.2.7. Farklı Şekillerdeki Nanopartiküllerin *In Vitro* Hücre İçine Alım Deneyi

Bu çalışmanın amacı, nanopartikül şeklinin A549 insan akciğer kanser hücrelerine alımında anlamlı bir farka sebep olup olmadığını araştırmaktır. Deneyin ilk aşamasında küresel, çubuk ve eliptik disk şeklindeki nanopartiküller PLGA/PLGA-His/mPEG-PLGA-FKR560 polimeri kullanılarak önceden geliştirilen çift emülsifikasyon/çözücü buharlaştırma ve film germe yöntemleriyle, karanlık koşullarda üretilmiştir. Partiküllerin üretiminde kullanılan bir polimer (mPEG-PLGA-FKR560) floresan boya işaretli olduğu için hücre içine alım düzeyi, akım sitometri analizi ile kantitatif olarak, floresan mikroskopisi ile kalitatif olarak tayin edilmiştir. Akım sitometri, çeşitli hücrelerin bir süspansiyon halinde lazer ışını ile aydınlatılan bir kanal boyunca tek tek geçmesi ve bu sırada büyüklüğü (*Forward Scatter Chanel*, FSC) ve granülaritesine (*Side Scatter Chanel*, SSC) göre sınıflandırılmasını sağlayarak kantitatif ölçüm yapan bir sistemdir (207, 208).

Farklı şekilli nanopartiküllerin KHDAK hücreleri tarafından alımını değerlendirmek için A549-Luc2 hücreleri 24 kuyulu bir plakaya, her kuyuda  $4 \times 10^5$  hücre/mL olacak şekilde ekilmiş (floresan mikroskopisi için 4 adet kuyunun tabanına özel cam plakalar eklenmiştir) ve bir gece hücrelerin plaka tabanına tutunması için % 5 CO<sub>2</sub> içeren 37 °C'ye ayarlı inkübatörde bekletilmiştir. Numuneler akım sitometri analizi için 3 tekrarlı (n=3), floresan mikroskopla inceleme için tekrarsız (n=1) olarak çalışılmıştır. İnkübasyonun ardından hücrelerin genel durumu mikroskop ile kontrol edilmiştir. Önceden hazırlanan nanopartiküller hücre kültürü ortamında redisperse edilerek, her kuyuya 200 µg/mL konsantrasyonda olacak şekilde uygulanmıştır. Plaka, 8 saat inkübasyona (% 5 CO<sub>2</sub> ve 37 °C koşullarında) bırakılmıştır.

İnkübasyon süresi sonunda kültür süpernatanı uzaklaştırılmış ve hücreler 0,5'er mL hücre yıkama çözeltisi ile yıkanarak hücre içine girmeyen nanopartiküller ortamdan uzaklaştırılmıştır. Akım sitometri analizinde kullanılacak hücreleri plaka tabanından kaldırmak amacıyla tripsinizasyon işlemi yapılmıştır. Elde edilen hücre süspansiyonları yuvarlak tabanlı cam tüplere aktarılmıştır. Santrifüj işlemi için tüplere 1'er mL daha hücre yıkama çözeltisi eklenip 1800 rpm, 25 °C koşullarında 5 dk santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrası süpernatantlar uzaklaştırılmış, ardından hücreleri tüpün tabanından kaldırmak için 1-2 sn vorteksleme işlemi yapılmıştır. Son olarak

akım sitometri cihazında okuma yapılmıştır. Cihazın sahip olduğu uygulamada partiküllerin en yüksek absorpsiyon verdiği kanal belirlenmiş (PE-A) ve analizler bu kanal aracılığıyla yapılmıştır. Kontrol grubu ve farklı şekillerdeki nanopartiküllerin analizi sırayla yapılmış ve sonuçlar ortalama floresan yoğunluk (*Median Fluorescence Intensity*, MFI) cinsinden sayısal olarak ifade edilmiştir. MFI değerleri, ImageJ Fiji programı (Madison, ABD) ile hesaplanmıştır.

Floresan mikroskop ile görüntüleme için inkübasyon süresinin sonunda kültür süpernatantı uzaklaştırılıp kuyuların tabanına yerleştirilen cam plakalar çıkarılmıştır. Mikroskop ile görüntüleme için 1:1000 oranında DAPI çekirdek boyası (4',6-diamidino-2-fenilindol diklorür) içeren görüntüleme ortamı [Gliserin:PBS tamponu (pH 8,5-9), h/h 9:1], lam üzerine 2-3 damla damlatılarak kuyulardan çıkarılan yuvarlak cam plakalar ortam damlatılmış lam üzerine yerleştirilmiştir. Lamlar 16 saat karanlık ortamda bırakılmış ve hücre çekirdeklerinin boyanması sağlanmıştır. Ardından floresan mikroskop ile görüntüleme yapılmıştır.

### **3.2.8. Farklı Geometrik Şekillerdeki Nanopartiküllerin Biyodağılım Çalışması**

Nanopartiküllerin boyut ve yüzey özelliklerine ek olarak, geometrik şekli de kanda kalış süresi, biyodağılım ve hücre içine alımı etkileyen önemli bir faktör olarak tanımlanmıştır (79). *In vivo* çalışmalar, Kobay D.H.L. A.Ş.'den alınan etik izin kapsamında (Protokol no: 354) yürütülmüştür. Deney kapsamında, nanopartikülün geometrik şeklinin tümör geliştirilen CD-1 nude farelerde biyodağılıma etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, küresel, çubuk ve eliptik disk olmak üzere üç farklı şekilde nanopartikül formülasyonu hazırlanmıştır.

Deneyde küçük hücreli olmayan akciğer kanseri tümör modeli geliştirilmesi için lusiferaz enzimi ekspresyon eden, A549 insan akciğer adenokarsinom hücre hattı (A549-Luc2) tercih edilmiştir (209). Çalışmalarda tümör gelişimini takip etmek amacıyla *in vivo* görüntüleme sistemi (*In vivo Imaging System*, IVIS) cihazı kullanılmış ve tümör modeli geliştirilen hayvanlara lusiferin (potasyum tuzu) çözeltisi uygulanarak ışımaya için gerekli reaksiyon oluşumu sağlanmıştır. Biyolojik ortamda lusiferin, lusiferaz enzimi ile tepkimeye girerek okside olmaktadır ve sonuçta biyoluminesans ışımaya sağlanmaktadır (Şekil 3.8.) (210).



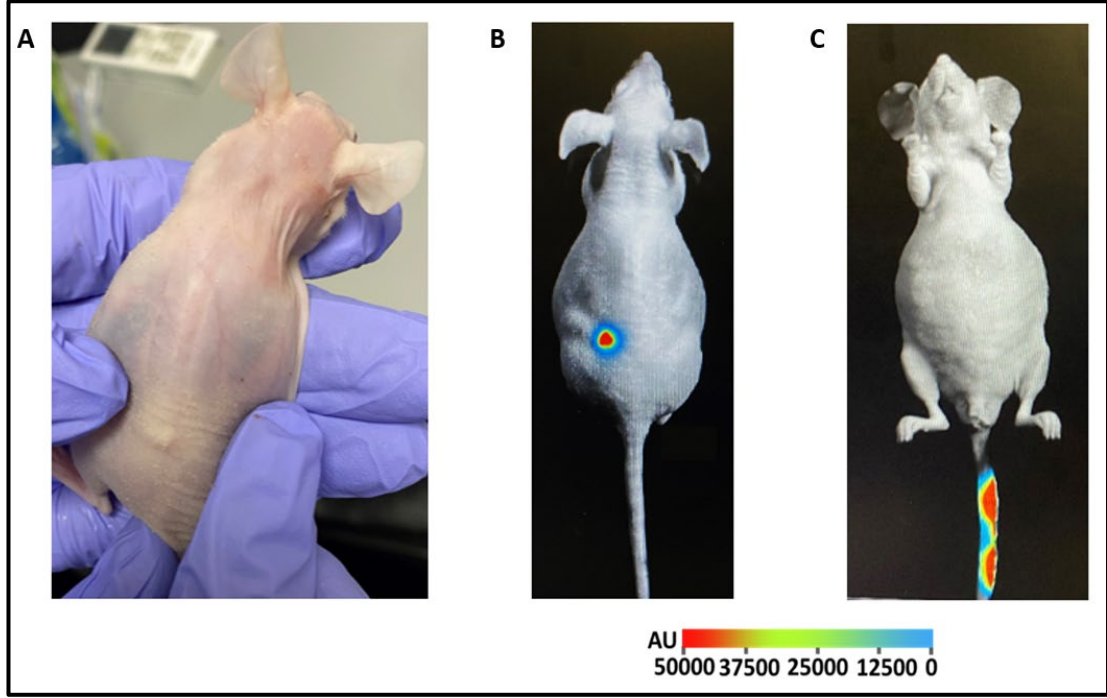
**Şekil 3.8.** Lusiferin ile biyoluminesans ışımaya reaksiyonu oluşum mekanizması.

KHDAK ksenograft modeli, heterotopik (subkütan enjeksiyon ile) veya ortotopik olarak bağışıklığı yetersiz hayvanlarda geliştirilebilmektedir. Akciğer kanserinin heterotopik olarak geliştirilmesi ve takip edilmesi kolay olmakla birlikte, lenfatik veya metastatik yayılımın olmaması nedeniyle kanserin doğal seyrini taklit yeteneği ortotopik modellere kıyasla zayıf kalmaktadır (209). Farklı şekillerdeki nanopartiküllerin biyodağılımının incelenmesi için heterotopik KHDAK ksenograft modeli kullanılmış, bu durumun sebebi alt başlıklarda deneysel verilerle desteklenerek izah edilmiştir.

Tez kapsamında geliştirilecek KHDAK kanser modeli için CD-1 nude fareler tercih edilmiştir. *In vivo* deneyler için ilk olarak insan A549-Luc2 hücre hattı azot tankından alınarak 5-6 mL hücre kültürü ortamı eklenmiştir. Bu hücre dispersiyonu 1800 rpm'de 20°C'de 5 dk santrifüj yapılarak süpernatant atılmış ve DMSO ortamdan uzaklaştırılmıştır. Hücre üzerine taze hücre kültürü ortamı [F-12K (Ham's F12 w/o L-Glutamine) + % 10 FBS + 8 µg/mL Blastisidin] eklenip T25 flaska ekim yapılmıştır. Yeterli inkübasyon süresinin sonunda % 80 sıkışma (konfluent) oranına ulaşan hücreler T75 flaska aktarılarak yeterli hücre sayısı elde edilmiştir. Sonraki pasajlarda ortam olarak % 10 oranında (FBS) ve % 1'lik penisilin/streptomisin içeren yüksek glukoz içeren *Dulbecco's Modified Eagle's* besiyeri (*high glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, DMEM) kullanılmıştır.

İlk olarak, ortotopik ksenograft KHDAK kanser modeli geliştirilmesi için deneme amaçlı bir adet CD-1 nude fareye 3 x 10<sup>6</sup> adet A549-Luc2 hücre kuyruk veninden intravenöz enjeksiyon ile verilmiş, diğer bir fareye ise heterotopik KHDAK kanser modeli geliştirilmesi için sırt bölgesinden subkütan enjeksiyon ile 10 x 10<sup>6</sup> adet A549-Luc2 hücresi, 10 µL matrijel (1 mg/mL) ile homojen karıştırılarak verilmiştir. Enjeksiyon için gerekli hücre sayılarına literatür incelemesi ile karar verilmiştir (209, 211). Enjeksiyonu takip eden günlerde hayvanların sağlık durumu, yem ve su ihtiyaçları takip edilmiş ve onuncu günde iki hayvana da intraperitoneal ksilazin – ketamin kompleksi enjeksiyonunu takiben kuyruk veninden lusiferin çözeltisi (6

mg/kg) uygulanmıştır. Tümör oluşumunu takip etmek amacıyla IVIS kullanılmış, görüntüleme modu olarak biyolüminesans tercih edilmiştir (Şekil 3.9.).



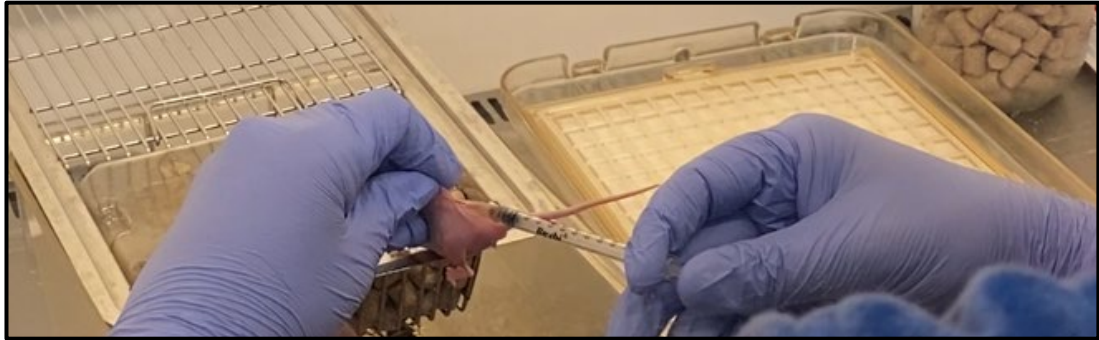
**Şekil 3.9.** A549-Luc2 hücre enjeksiyonunu takiben onuncu günde tümör oluşumu takibi: A. Subkütan hücre hattı enjeksiyonu yapılan farede oluşan tümörün görüntüsü; B. Subkütan hücre hattı enjeksiyonu yapılan farede IVIS ile tümör oluşumu takibi; C. İntravenöz hücre hattı enjeksiyonu yapılan farede IVIS ile tümör oluşumu takibi.

Şekil 3.9.-C görüntüsü incelendiğinde, kuyruk veninden A549 hücrelerinin enjeksiyonunu takiben 10. günde ortotopik tümör gelişimine dair olumlu bir bulguya rastlanmamış olup, hücrelerin bir kısmının kuyrukta tutulum gösterdiği tespit edilmiştir. Subkütan enjeksiyon yapılan farede ise gözle görülür bir tümör oluşumu mevcut olup biyolüminesans görüntüleme de enjeksiyon bölgesinden sinyal alınmıştır.

Enjeksiyonu takiben 16. günde görüntüleme işlemi aynı prosedür ile tekrarlanmış olup, intravenöz olarak hücrelerin enjekte edilen farede akciğerde tümör oluşumu gözlenmemiş, subkütan enjeksiyon yapılan farede ise tümörün dorsal flank bölgesinde yaşamaya ve gelişmeye devam ettiği gözlenmiştir. Kuyruk veninden enjeksiyon ile kanser hücrelerinin akciğere yerleşip tümör oluşturulmasının zor olduğu tespit edilmiş, literatür incelemesi yapılarak KHDAK tümörünün ortotopik olarak geliştirilmesi için intratorasik enjeksiyon denemesi yapılmıştır. Üç adet CD-1 nude fareye enjeksiyon öncesi düşük doz ketamin/ksilazin enjeksiyonu yapılarak

hayvanların enjeksiyon işlemine hazırlanması sağlandıktan sonra, sağ göğüs kafesine  $2 \times 10^6$  adet A549-Luc2 hücresi enjekte edilmiştir (209, 211). Hem enjeksiyon bölgesinden başka organ ve dokulara yayılımın önlenmesi hem de içeriğindeki sitokinler sayesinde tümör anjiyogenezini kolaylaştırması amacıyla, hücre çözeltisi 4:3 (h/h) oranında matrijel (1 mg/mL) ile karıştırılmıştır. İki adet nude fare enjeksiyonu takiben ölmüş, diğer fare ise yaşamaya devam etmiştir. Sonuç olarak hayvanlara torasik bölgeden standart şekilde enjeksiyon yapılamamakta, bu durumun sebebi enjektör iğnesinin giriş açısının ve vücut içinde enjeksiyonun yapılan bölgenin her enjeksiyonda değişmesi olarak belirlenmiştir. Bu denemelerden yola çıkarak *in vivo* biyodağılım deneyi için tümörün heterotopik olarak geliştirilmesine karar verilmiştir.

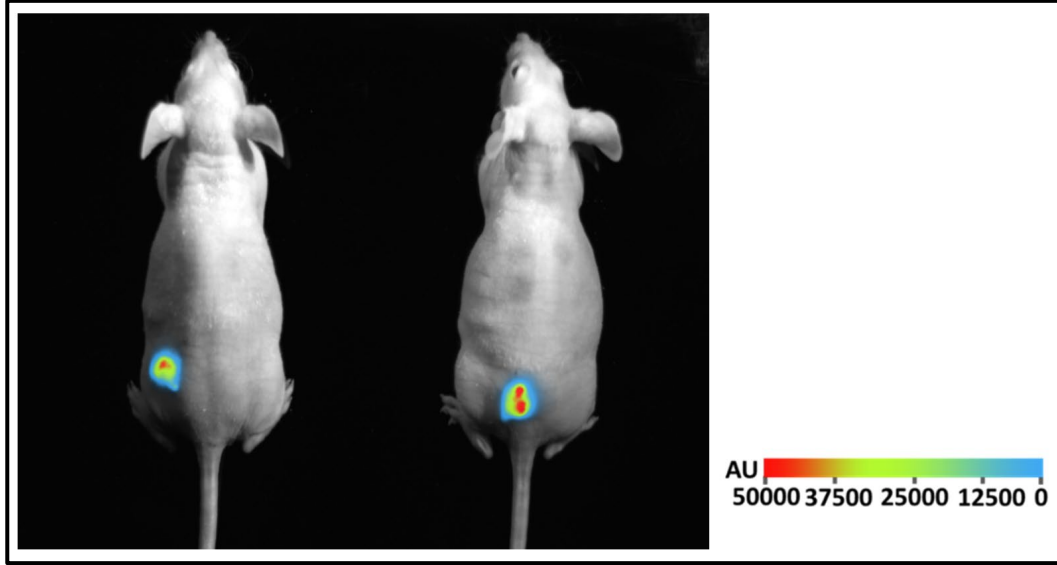
Deney için 6-8 haftalık, ortalama ağırlıkları 24,3 g olan 11 adet CD-1 nude (erkek) fareye  $30 \times 10^6$  adet A549-Luc2 hücresi, 1:1 (h/h) oranında matrijel ile karıştırıldıktan sonra dorsal flank bölgesine subkütan enjekte edilmiştir (Şekil 3.10.).



**Şekil 3.10.** Tümör oluşturulması amacıyla farelere A549-Luc2 hücrelerinin subkütan enjeksiyonu.

Prosedürde 9 adet fare ile çalışılacağı yazılmıştır, ancak sonuçların karşılaştırılabilir olması açısından Kobay D.H.L. A.Ş.'den alınan etik izin kapsamında (Protokol no: 354) 2 adet fare daha prosedüre eklenmiştir ve bu farelerde de tümör geliştirildikten sonra nanopartikül üretiminde kullanılan polimer çözeltisi intravenöz olarak enjekte edilmiştir.

Tümör gelişimini takip etmek amacıyla enjeksiyon sonrası 14. günde rastgele seçilen iki adet fare ile biyoluminesans görüntüleme yapılmıştır. Bunun için ilk olarak farelere 100'er  $\mu$ L ketamin/ksilazin enjeksiyonu yapılmış, ardından 6 mg/kg dozda lusiferin intravenöz yolla enjekte edilmiştir.



**Şekil 3.11.** Heterotopik KHDAC tümör modeli geliştirilen farelerin IVIS ile görüntülenmesi (enjeksiyon sonrası 14. gün).

IVIS görüntüsü incelendiğinde, tümör oluşumunun istenilen bölgede ve boyutta (0,5 cm çapta) olduğu gözlenmektedir. Tümörlerin merkezindeki ışmanın yoğunluğunun fazla olması (kırmızı renk bu anlama gelmektedir), oksijenle beslenmesi en zor olan hücrelerin dahi yaşadığını göstermektedir (Şekil 3.11.). Bu durum, *in vivo* deney sonuçlarının güvenilirliği için büyük önem arz etmektedir. Sonuç olarak, 11 adet nude fare nanopartikül enjeksiyonuna uygun bulunmuştur.

Tez kapsamında *in vivo* görüntüleme amaçlı kullanılan polimerlerden birisi mPEG-PLGA-FKR560'tur. Bu polimerin özelliği, terminal kısmına ekli olan floresan boya (FKR560) sebebiyle belirli dalga boylarında ışımaya yapabilmesidir. *In vivo* deneyler gerçekleştirilmeden önce polimer çözeltisi hazırlanıp IVIS cihazında okuma yapılarak polimerin en yüksek ışımaya yaptığı dalga boyu (580 nm) belirlenmiştir.

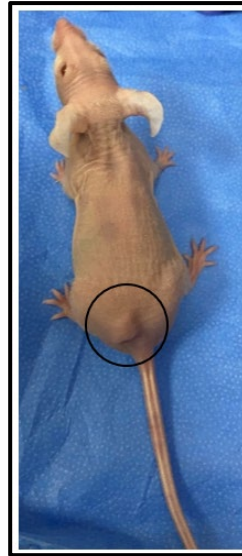
İlk olarak küresel nanopartiküller 100 mg PLGA/PLGA-His/mPEG-PLGA-FKR560 (1,5:1,5:1, a/a) polimer karışımı ile önceden geliştirilen ve optimize edilen çift emülsifikasyon/çözücü buharlaştırma yöntemi ile üretilmiş, ardından partiküllerin 3/4'lük kısmı çubuk ve eliptik disk şeklindeki nanopartiküllerin üretimi için ayrılmıştır. Bu partiküller bölüm 3.2.4.'te anlatılan film germe yöntemiyle üretilmiştir. Nanopartikül üretiminde kullanılan floresan boya sebebiyle tüm prosedürler gün ışığı ve oda ışığına asgari maruziyet olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan partiküller enjeksiyon öncesi 18 mg polimer/mL konsantrasyonda olacak şekilde serum fizyolojik ile resüspande edilmiştir. Ayrıca nanopartiküllerle aynı

konsantrasyonda PLGA/PLGA-His/mPEG-PLGA-FKR560 polimeri içeren bir çözelti hazırlanmıştır (Tablo 3.7.).

**Tablo 3.7.** *İn vivo* biyodağılım deney grupları.

Uygulanan formülasyon	Gruplardaki CD-1 nude fare sayıları
mPEG-PLGA-FKR560/PLGA-His/PLGA-PEG çözeltisi	2
mPEG-PLGA-FKR560/PLGA-His/PLGA-PEG KNP	3
mPEG-PLGA-FKR560/PLGA-His/PLGA-PEG ÇNP	3
mPEG-PLGA-FKR560/PLGA-His/PLGA-PEG EDNP	3

Tümör geliştirilen fareler, uygulanacak nanopartikül şekillerine göre üç gruba (n=3) ayrılmıştır. Sıra ile dokuz adet nude fareye 18 mg/mL konsantrasyonda 100 µL nanopartikül enjeksiyonu, iki adet nude fareye (n=2) ise 18 mg/mL konsantrasyonda 100 µL polimer çözeltisi enjeksiyonu kuyruk veninden yapılmıştır. Farelere nanopartikül ve polimer çözeltisi uygulamasını takiben 16. saatte ağırlık kontrolü yapılmış, tümör gelişimi ile farelerin ortalama ağırlığı 23,75 g olarak ölçülmüştür (Şekil 3.12.). Beklenen şekilde farelerde ağırlık azalması meydana gelmiştir.



**Şekil 3.12.** CD-1 nude farenin sırtında oluşturulan tümör (*enjeksiyon sonrası 15. gün*).

Fareler sakrifiye edildikten sonra, her gruptan bir adet farenin kalp, akciğer, karaciğer, dalak, böbrekler, tümör dokusu, kemik iliği ve beyinleri çıkarılarak serum fizyolojik içerisinde bekletilmiş ve plakaya dizilerek IVIS ile görüntülemesi yapılmıştır.

### 3.2.9. Optimum Özelliklere Sahip Nanopartikül Şeklinin Belirlenmesi

İlgili deneysel çalışmaların ardından, farklı geometrik şekillerin birbirleri ile kıyaslanması amacıyla *in vitro* ve *in vivo* parametreler sistematik olarak değerlendirilmiş ve bir tablo oluşturulmuştur. Buradan hareketle seçilen optimum şekilli nanopartikülle çalışmalara devam edilmiştir.

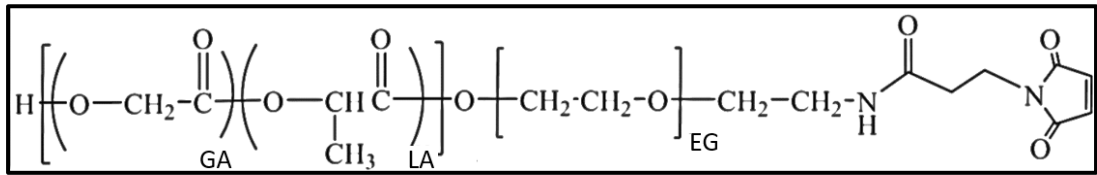
### 3.2.10. A549 Hücrelerinde Epidermal Büyüme Faktörü Reseptör (EGFR) Ekspresyonunun Gösterilmesi

Bu çalışmanın amacı, literatürde yüksek oranda EGFR eksprese ettiği bilinen A549 hücrelerinin, ekspresyon oranını deneysel olarak göstermektir. Bu doğrultuda akım sitometri analizi ile izotip antikor ve asıl antikor için iki tekrarlı olacak şekilde deneyler gerçekleştirilmiştir.

Deney için gerekli hücreler (yaklaşık  $6 \times 10^5$  hücre) dört ayrı yuvarlak tabanlı deney tüpüne ekilmiş ve her tüpe 2,5-3 mL hücre yıkama çözeltisi eklenmesini takiben tüpler, 1800 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmıştır. Yıkama işleminin ardından iki tüpe fikoeritrin (PE) konjuge anti-EGFR antikorunu, kalan iki tüpe PE konjuge IgG1 izotip kontrol antikorunu eklenip 2-3 sn vortekslenerek hücrelerin antikorlarla homojen karışımı sağlanmıştır. Antikorların hücre yüzeyindeki reseptörlere tutunması için deney tüpleri karanlık ortamda, 20 °C'de 20 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi bitiminde, reseptörlere bağlı olmayan antikorları ortamdaki uzaklaştırmak için tüplere 2,5-3 mL hücre yıkama çözeltisi eklenmesini takiben 1800 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmıştır. Sıra ile izotip ve anti-EGFR antikorunu içeren numunelerin analizi, akım sitometri cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Cihaz üç adet lazere sahiptir (Mavi, kırmızı ve viyole). Analizde tercih edilen antikorlara protein-pigment kompleksi (fikoeritrin, PE) konjuge halde olduğu için mavi lazer kullanılarak PE-A kanalında okumalar gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.11. Anti-EGFR Antikoru ile Konjugasyonun Gerçekleştirilmesi, Doğrulanması ve Konjuge Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

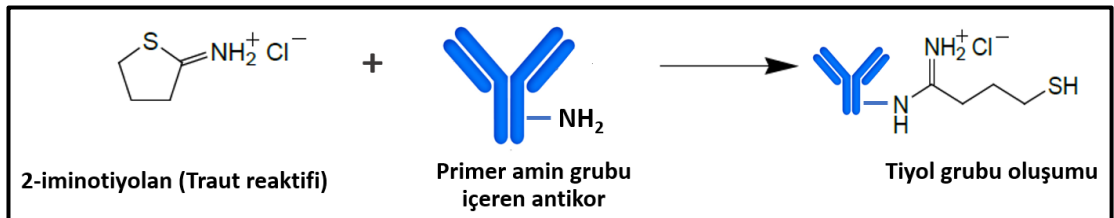
Tez kapsamında hedeflendirme ligandı olarak, önceki aşamalarda KHDAK hücre hattında yüksek derece eksprese edildiği doğrulanan EGF reseptörüne spesifik bağlanma özelliği bulunan anti-EGFR antikoru tercih edilmiştir. Tiyoeater aracılı bağlanma, kovalan konjugasyon çalışmalarında sıklıkla tercih edilmektedir (212-215). Bu konjugasyon yöntemi, maleimit grubu taşıyan nanopartiküller ile serbest tiyol grubu taşıyan antikorlar arasında veya serbest tiyol grubu taşıyan nanopartiküller ile maleimit grubu taşıyan antikorlar arasında gerçekleştirilebilmektedir (216, 217). Tezde tercih edilen PLGA-PEG-Mal kopolimeri, terminal ucunda maleimit grubu taşıması sebebiyle, konjugasyonu yapılacak olan antikor üzerinde serbest tiyol grubu oluşturulması gerekmektedir (Şekil 3.13.).



Şekil 3.13. PLGA-PEG-Maleimit kopolimer yapısı.

#### Antikora Tiyol Grubunun Eklenmesi

Literatür incelenerek, antikorun serbest primer amin grubunu (-NH<sub>2</sub>) tiyol grubuna (-SH) dönüştürmek için 2-iminotiyolan HCl reaktifi (özel adıyla Traut's reaktifi) tercih edilmiştir (Şekil 3.14.) (212, 213). Kimyasal reaksiyonun gerçekleşmesi için ortamın bazik olması (pH 8,0) ve reaksiyon sonucu oluşan sülfhidril gruplarının oksidasyonunu önlemek amaçlı etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) içermesi gerekmektedir (218).

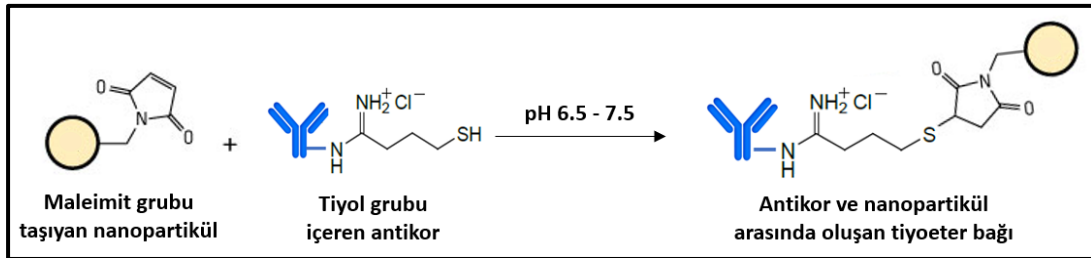


Şekil 3.14. Antikor üzerindeki primer amin grubunun tiyol grubuna dönüştürülmesi.

Deney düzeneğinin hazırlanması amacıyla, ilk olarak pH 7,4 tamponu hazırlanmış ve tamponun pH'sı, 0,01 M NaOH çözeltisi ile 8,0'e ayarlanmıştır. Tampona 2 mM EDTA eklenerek tiyolasyon için gerekli ortam hazır hale getirilmiştir. Tiyolleme amacıyla kullanılan 0,5 mg 2-iminotiyolan HCl, 0,2 mL pH 8,0 tamponu içerisinde çözülmüştür. Traut's çözeltisi üzerine 6 mg/mL anti-EGFR çözeltisinden 50 µL eklenmiş, manyetik karıştırıcı üzerinde 330 rpm, 25 °C koşullarında 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 30 kDa filtrelili tüpler kullanılarak Traut's reaktifinin fazlası ortamdaki uzaklaştırılmıştır.

### Nanopartiküllere Tiyole Antikorun Konjugasyonu

İlk olarak çift emülsifikasyon/çözücü buharlaştırma yöntemiyle PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-Mal (1,5:1,5:1, a/a/a) polimerleri kullanılarak boş küresel PLGA nanopartikülleri hazırlanmıştır. Organik çözücüsü uzaklaştırılan nanopartikül dispersiyonu 13000 rpm, 18 °C koşullarında 45 dk santrifüjlenmiştir. Hafif asidik ortamda tiyol grubu ve maleimit grubunun reaksiyon vermesi sonucu tiyoeter bağı oluşarak kimyasal konjugasyon sağlandığı bilinmektedir (Şekil 3.15.) (212).



**Şekil 3.15.** Nanopartiküllere tiyole antikor konjugasyonunun şematik gösterimi.

Reaksiyonun oluşumu için gerekli ortam 0,1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  içeren fosfat tamponu ile hazırlanmış, tamponun pH'sı 0,01 M HCl ile 7,2'ye ayarlanmış ve son olarak tampona 2 mM EDTA eklenmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen bir seri nanopartikülün yarısı (12,5 mg polimer içeren), pH 7,2 tamponu ile (2mM EDTA içeren) redisperse edildikten sonra üzerine tiyole antikor çözeltisi eklenmiş ve manyetik karıştırıcı üzerinde 25 °C oda sıcaklığında 45 dk karıştırma yapılarak konjugasyonun oluşması sağlanmıştır (219). Üretilen partiküllerin kalan yarısı, BCA analizinde kıyaslanabilir sonuçlar elde edilebilmesi açısından konjuge edilen partiküllerle aynı tamponlarla aynı koşullarda muamele edilmiştir. İnkübasyon

sonrasında nanopartiküller 30 kDa filtrelili tüplerden 6000 rpm, 18 °C koşullarında 15 dk santrifüj edilerek süpernatantlar uzaklaştırılmıştır, bu sayede konjuge olmayan anti-EGFR ortamdan uzaklaştırılmıştır.

Fragmente nivolumabdan bütün antikora geçiş sonrası gerçekleştirilen karakterizasyon çalışmalarında yükleme etkinliği değerleri benzer bulunmuş ancak etkin madde salımında düşme ( $p < 0,05$ ) gözlenmiştir. Literatür taraması sonucu salımın hızlandırılması amacıyla nanopartiküllerin yüzeyine nivolumab adsorpsiyonunun yapılmasına karar verilmiştir (220). Denemeler sonucunda 100 µg nivolumab nanopartiküllerin için yöntem 3.2.4.'te belirtildiği şekilde iç su fazına yüklenmiş ve konjugasyon işlemi yapıldıktan sonra süpernatant uzaklaştırılmadan 0,01 M NaOH ile ortamın pH'sı 8,0'e (nivolumabın yük taşımadığı pH (221)) getirilmiştir. Nanopartikül dispersiyonuna 100 µg nivolumab eklenerek 2 saat 25 °C'de 220 rpm'de manyetik karıştırıcıda karıştırma yapılmış ve takibinde 14 saat 4 °C derecede buzdolabında inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Inkübasyon süresi sonunda, adsorbe olmayan nivolumab ve konjuge olmayan Anti-EGFR'ı ortamdan uzaklaştırmak amacıyla 11000 rpm, 4 °C koşullarında 45 dk santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Nihai formülasyon için karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş ve deney sonuçları bulgular 4.10.2. başlığında verilmiştir.

### **Konjugasyonun Doğrulanması**

Konjugasyonun doğrulanması için BCA analiz kiti tercih edilmiştir. Bölüm 3.2.3.'te bahsedildiği şekilde BSA standart çözeltileri ile kalibrasyon doğrusu oluşturulmuş ve konjuge olmayan anti-EGFR'nin miktar tayininde bu denklem kullanılmıştır.

Süpernatantlar, standart çözeltiler ve blank (kör) çözeltisi 2 tekrarlı olacak şekilde 96 kuyulu düz tabanlı mikropalakaya 100'er µL olacak şekilde uygulanmıştır. Ardından hızla 100'er µL BCA belirteci her kuyuya eklenmiş ve plaka 37 °C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrası farklı kuyucuklarda farklı yoğunlukta mor renk oluşumu gözlenmiştir. ELISA plaka okuyucu ile 562 nm'de okuma yapılarak numuneler için absorbans değerleri elde edilmiştir. BCA testi ile, süpernatanda kalan (konjuge olmamış) antikör miktarı tayin edildikten sonra, konjugasyon etkinliği Formül 3.6. kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Konjugasyon etkinliği (\%)} = \frac{(\text{Eklenen antikor miktarı} - \text{Süpernatandaki miktar})}{\text{Eklenen antikor miktarı}} \times 100 \quad (3.6.)$$

### **Konjuge Nanopartiküllerin Karakterizasyonu**

Konjuge nanopartiküller, konjuge olmayan nanopartiküllerle aynı yöntemlerle karakterize edilmiştir. Hedefleme ligandı konjuge edilmiş PLGA nanopartiküllerinin morfolojik özellikleri, taramalı elektron mikroskobu (*Scanning Electron Microscope*, SEM) ile incelenmiştir. Görüntüleme, Quanta 400F Field Emission SEM cihazı ile Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'ndan hizmet alımı sağlanarak gerçekleştirilmiştir. Bu analizde numuneden yayılan ikincil elektronlar nanopartiküllerin yüzey özellikleri hakkında bilgi sağlamaktadır. Nanopartiküllerin analiz için kuru toz halinde olması gerekmektedir. Bu nedenle ultra saf su içindeki nanopartikül dispersiyonları vakumlu etüv ile kurutma yapılarak kuru toz haline getirilmiştir. Nanopartiküller iki tarafı yapışkanlı bir bant aracılığıyla örnek kabına (metal levha) yerleştirildikten sonra püskürterek kaplama yöntemiyle altınla kaplanmıştır. Ardından, hazırlanan numune ince bir elektron ışınıyla taranarak analiz edilmiş (100000x büyütme oranı ile) hem şekil hem de yüzey özellikleri hakkında bilgi edinilmiştir (62).

Enkapsülasyon etkinliğini değerlendirmek amacıyla, küresel nanopartiküllerin üretimi sonrası elde edilen süpernatant ve takibinde konjugasyon çalışmaları sonrası elde edilen süpernatantlar ile BCA/ELISA ve HPLC analizi gerçekleştirilmiştir. Yüklü olmayan etkin madde miktarı, üretim başlangıcında ortama eklenen etkin madde miktarından çıkarılarak % enkapsülasyon etkinliği hesaplanmıştır. *In vitro* salım analizi konjuge olmayan nanopartiküllerle gereç ve yöntem bölümü 3.2.5.'te anlatıldığı şekilde aynı yöntemle gerçekleştirilmiş, sonuçlar bölüm 4.10.2.'de verilmiştir.

### **3.2.12. *In Vitro* Sitotoksitesite Çalışmaları**

Anti-EGFR antikorunun ilaç taşıyıcı sistem formülasyonundaki asıl amacı hedeflendirme ligandı olarak rol oynamasıdır. Ancak, bu fonksiyonuna ek olarak EGF reseptör yolağı üzerinden antikanser etkisi de araştırılmıştır. Bu amaçla insan KHDAK hücre hattında sitotoksitesite deneyleri gerçekleştirilmiştir.

Bu kapsamda; anti-EGFR çözeltisi, konjugasyon yapılmamış etkin madde içermeyen küresel nanopartiküller (PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG KNP) ve anti-EGFR ile konjugasyon yapılmış etkin madde içermeyen küresel nanopartiküller (PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR KNP) hazırlanmıştır. Bu grupların hücreler üzerine toksisitesi 24, 48 ve 72 saatlik üç farklı zaman noktası için test edilmiştir. Sitotoksosite deneyi MTT yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiş olup, deneye ilişkin ayrıntılı bilgilendirme bölüm 3.2.6. başlığında yapılmıştır.

Yöntem kapsamında, A549-Luc2 hücre hattı ile çalışılmıştır. Besiyeri içinde bulunan hücreler, kuyu başına 50 µL olacak şekilde (10.000 hücre/kuyu) 96 kuyulu düz tabanlı plakalara ekilmiştir. Hücreler, plakaya tutunması için % 5 CO<sub>2</sub> ve 37 °C koşullarındaki inkübatörde 24 saat bekletilmiştir. Hücrelerin deney için uygun koşullarda olduğu mikroskop ile teyit edildikten sonra, hücre kültürü ortamında redisperse edilen 50 µL hacimdeki hedefleme ligandı konjuge olan veya olmayan boş nanopartikül formülasyonları ve anti-EGFR çözeltileri 1,5-500 µg/mL olacak şekilde dokuz farklı konsantrasyonda kuyucuklara eklenmiştir. Her konsantrasyon için dört tekrarlı (n=4) çalışılmıştır. 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu takiben, hücrelerin üzerine 25 µL MTT eklenerek 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kuyulara 80 µL, % 45'lik DMF çözeltisi içinde çözülmüş % 23'lük SDS (pH 4,7) çözeltisi eklenerek plakalar gece boyu inkübatörde bekletilmiştir. 12-15 saat sonunda plaka okuyucu ile spektrofotometrik olarak 570 nm'de absorbands değerleri ölçülmüş ve % canlılık değerleri hesaplanmıştır (206).

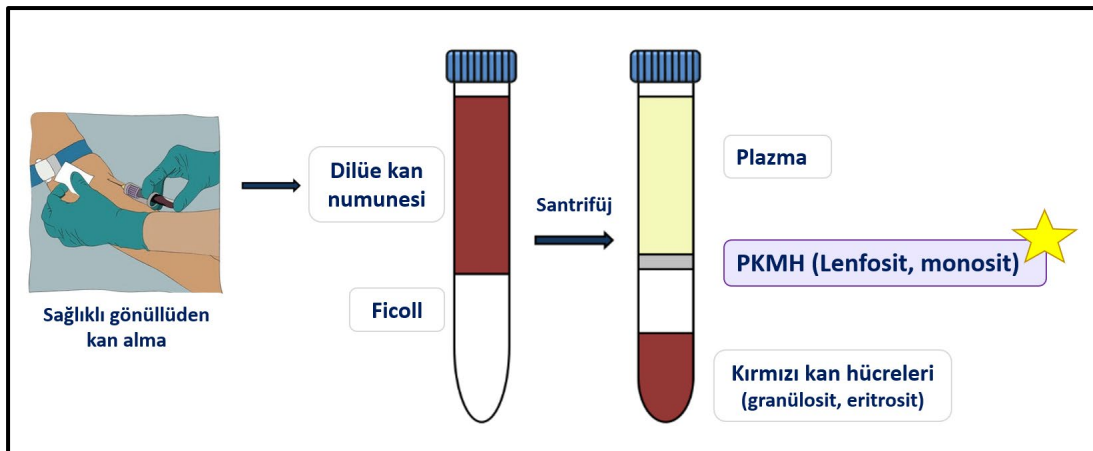
### **3.2.13. PD-1 ve TGF-β İnhibisyonunun T Hücre İmmün Yanıtlarına Olan Etkisinin Değerlendirilmesi**

Çalışmalarda kullanılacak hücre tipi periferik kan mononükleer hücreleri (PKMH) olduğu için deneyler Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul izni kapsamında (Onay numarası: GO 19/298) sağlıklı gönüllü insanlardan alınan kan örnekleri üzerinde gerçekleştirilmiştir. Deneylerde kullanılacak boncuk temelli analiz kitlerinin (*bead-based multiplex assay*) yüksek maliyetli olması, incelenecek deney grubu sayısının yüksek olması (6 grup: Nivolumab+galunisertib+anti-EGFR çözeltisi, PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-G-N KNP, PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR-G-N KNP, PLGA/PLGA-

His/PLGA-PEG-anti-EGFR KNP, serum fizyolojik, PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG KNP) ve deney tekrarı imkânı bulunmaması sebebiyle ön denemeler yapılmıştır. Ön denemeler için etkin maddeler çözelti halinde, konjuge boş nanopartiküller ve etkin madde yüklü polimerik nanopartiküllerin PKMH canlılıkları üzerine etkileri incelenmiş ve optimum (PKMH'ye toksik etki göstermeyen) polimer ve etkin madde konsantrasyonları tespit edilmiştir.

### PKMH Canlılık Deneyi

Etik izin doğrultusunda sağlıklı gönüllülerden alınan kan numuneleri PBS tamponu (1X) ile seyreltilip, üzerine 1:1 (h/h) oranda fikol (1,077 g/mL) eklenmiştir. 25 dk 400 g koşullarında santrifüj yapıldıktan sonra, PKMH toplanmış ve hücre sayımı yapılmıştır (Şekil 3.16.).



**Şekil 3.16.** Kan numunesinden PKMH izolasyonunun şematik gösterimi.

RPMI 1640 + % 10 FBS besiyeri içinde bulunan hücreler, kuyu başına 100  $\mu$ L olacak şekilde (100.000 hücre/kuyu) 96 kuyulu yuvarlak tabanlı plakalara ekilmiştir. 0,1  $\mu$ L anti-CD3/28 boncukları, uyarım için ortama eklenmiş ve % 5 CO<sub>2</sub> ve 37 °C koşullarındaki inkübatörde 24 saatlik inkübasyon sonrası, hücrelerin deneye uygunluk durumları mikroskopla gözlenmiştir. Hücre kültürü ortamında redisperse edilen 100  $\mu$ L hacimdeki konjuge boş nanopartikül, galunisertib çözeltisi, fragmante nivolumab çözeltisi ve fragmante nivolumab yüklü konjuge nanopartikül formülasyonları çeşitli konsantrasyonlarda kuyucuklara üç tekrarlı (n=3) olacak şekilde eklenmiştir. Ön denemeler için 24, 48 ve 72 saat; nihai *in vitro* ve *in vivo* deneyler için 72 saat inkübasyonu takiben her kuyuya 2  $\mu$ L propidyum iyodür (PI) çözeltisi eklenmiştir.

(222). Kullanılan boyanın (PI) çalışma mekanizması membran bütünlüğü bozulmuş olan hücre içine girerek ışımaya yapması esasına dayanmaktadır. Dolayısıyla % canlılık azaldıkça ışımaya miktarı artacaktır (223). Akım sitometri cihazında numuneleri analiz edebilmek için çeşitli kapılar (*gate*) açılmaktadır. Bu kapılarda hücreler, büyüklükleri ve granülaritelerine göre sıralanmaktadır. Ölü hücrelerin bulunduğu alan canlı hücrelerden farklı olmaktadır (222).

### **CD3/CD28 Uyarımı ve T Hücre Proliferasyonunun Optimizasyonu**

Sağlıklı gönüllülerden elde edilen PKMH'ler  $10^6$  hücre/100  $\mu$ L olacak şekilde PBS (1X) tamponu içerisinde süspansiyon edilip, üzerine eFluor670 proliferasyon boyası (5  $\mu$ M) eklenmiştir. Hücreler, oda sıcaklığında, karanlık koşullarda 15 dakika inkübe edildikten sonra, 1-2 mL FBS içeren RPMI 1640 hücre besiyeri eklenerek 1800 rpm 5 dakika santrifüj edilmiş ve boyanın fazlası ortamdan uzaklaştırılmıştır. Süpernatant atıldıktan sonra PKMH, FBS içeren RPMI 1640 besiyerinde süspansiyon edilmiş ve 200  $\mu$ L içerisinde 100.000 hücre olacak şekilde 96 kuyulu yuvarlak tabanlı plakalara eklenmiştir. Anti-CD3/28 boncuklarının miktarı önceden yapılan deneylerle test edilmiş, 0,05  $\mu$ L, 0,1  $\mu$ L ve 0,2  $\mu$ L ve boncuk PKMH'ye uygulanmış, 72 saat inkübe edilmiş ve 0,1  $\mu$ L uyarım için ideal bulunmuştur. T hücrelere sabit bir şekilde birinci ve ikinci sinyalin sağlanabilmesi için 0,1  $\mu$ L Anti-CD3/28 ticari boncuklarından eklenmiş, % 5 CO<sub>2</sub> ve 37 °C koşullarındaki inkübatörde 24 saat bekletilmiştir. Hücre kültürü ortamında redisperse edilen 100  $\mu$ L hacimdeki nivolumab çözeltisi (10  $\mu$ g/mL) ve nivolumab (bütün) yüklü konjuge nanopartikül (10  $\mu$ g/mL nivolumab içeren) kuyucuklara üç tekrarlı olacak şekilde eklenmiştir. 72 saat inkübasyon süresinin sonunda eFluor670 boyasının dilüsyonuna göre T hücre proliferasyon yüzdeleri akım sitometride belirlenmiştir. Deney sonuçlarında fragman antikorla immün yanıtta istenen cevap alınmadığı (Şekil 4.44.) için ek deney (PD-1 bloklama deneyi) planlanmıştır.

### **PD-1 Bloklama Deneyi**

Nivolumab, T hücreleri yüzeyindeki PD-1 reseptörünü bloke ederek bağışık yanıtın artmasını sağlamaktadır. Dolayısıyla, PD-1 bloklama deneyinin yapılma amacı, kullanılan antikorun (nivolumab) bütün veya fragman formlarının çalışır

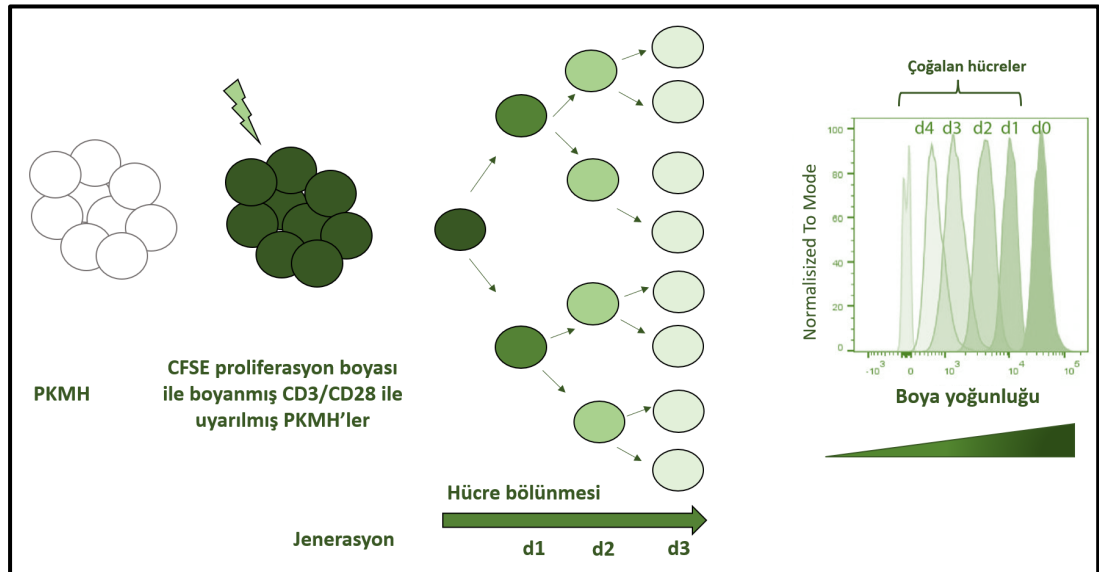
durumda olup olmadığını tespit etmektir. Deneyin yapılışında, RPMI 1640 + % 10 FBS besiyeri içinde bulunan PKMH kuyu başına 100 µL olacak şekilde 96 kuyulu yuvarlak tabanlı plakalara ekilmiş ve 0,1 µL anti-CD3/28 boncukları ile % 5 CO<sub>2</sub> ve 37 °C koşullarında 24 saatlik inkübasyon ile uyarım sağlanmıştır (172). Uyarılmış PKMH'ye 100 µL hacimde fragmente ve bütün nivolumab (10 µg/mL) eklenmiş ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol grubu olarak CD3 uyarımı yapılan PKMH kullanılmıştır. İnkübasyon sonrası akım sitometri tüplerine alınan hücelere allofikosyanin (APC) konjuge anti-insan PD-1 antikoruna eklenmiş ve 25 dk oda sıcaklığında, karanlık koşullarda beklenmiştir. Bağlanmayan antikorun uzaklaştırılması için hücreler 1 mL hücre yıkama çözeltisi ile yıkanmış ve 1800 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Son olarak, hücreler 150 µL hücre yıkama çözeltisi içinde yeniden süspanse edilmiş ve nivolumabın bütün ve fragmente formunun CD3+ T hücrelerinin yüzeyindeki PD-1'i blokaj kapasiteleri akım sitometrisi ile değerlendirilmiştir (224). Nivolumabın PD-1 blokaj etkinliğinin yüksek olduğu durumlarda, APC-konjuge antikorun T hücre yüzeyindeki PD-1 reseptörüne bağlanma miktarı az olacak, dolayısıyla akım sitometride ölçülen sinyalin şiddeti de zayıf olacaktır. Bu prensibe dayanarak yapılan ölçümler sonucunda Şekil 4.45.'teki grafik elde edilmiştir.

Deney sonucunda fragmente nivolumabın PD-1 blokajı yapmadığı tespit edilmiş, PD-1 blokajı deneyi bütün antikorun nanopartiküle yüklenmesi ile tekrarlanmıştır. Yukarıda bahsedildiği gibi PKMH Anti-CD3/28 boncukları ile uyarıldıktan sonra hücre kültürü ortamında redisperse edilen 100 µL hacimdeki PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG KNP, PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-N KNP ve nivolumab çözeltisi (10 µg/mL) kuyucuklara üç tekrarlı olacak şekilde eklenmiştir. 24 saat inkübasyonu takiben CD3+ T hücrelerin yüzeyindeki PD-1'i blokaj kapasiteleri akım sitometrisi ile değerlendirilmiştir (224). Bu prensibe dayanarak yapılan ölçümler sonucunda Şekil 4.46.'daki grafik elde edilmiştir.

### **T Hücre Proliferasyon Deneyi**

Nivolumabın PD-1'i bloke etmesi sonucu T hücre proliferasyonunda artış olması beklenmektedir (225). Bu deney nivolumabın tek başına ve nanopartiküle yüklü halde T hücrelerin çoğalması üzerine olumlu etki gösterip göstermediğinin

incelenmesi amacıyla yapılmıştır. Sağlıklı gönüllülerden izole elde edilen PKMH,  $10^6$  hücre/100  $\mu$ L olacak şekilde PBS (1X) tamponu içerisinde süspansiyon edilip, üzerine karboksiflorescein süksinimidil ester (CFSE) proliferasyon boyası (5  $\mu$ M) eklenmiştir. Hücreler, oda sıcaklığında, karanlık koşullarda 15 dakika inkübe edildikten sonra, 1-2 mL FBS içeren RPMI 1640 hücre besiyeri eklenerek 1800 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiş ve boyanın fazlası ortamdan uzaklaştırılmıştır. Süpernatant atıldıktan sonra PKMH, FBS içeren RPMI 1640 besiyerinde süspansiyon edilmiş ve 100  $\mu$ L içerisinde 100.000 hücre olacak şekilde 96 kuyulu yuvarlak tabanlı plakalara ekilmiş ve 0,1  $\mu$ L Anti-CD3/28 boncukları ile % 5 CO<sub>2</sub> ve 37 °C koşullarında 24 saatlik inkübasyon ile uyartım sağlanmıştır. Hücre kültürü ortamında redispersiyon edilen 100  $\mu$ L hacimdeki PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG KNP, PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-N KNP ve nivolumab çözeltisi (10  $\mu$ g/mL) kuyucuklara üç tekrarlı olacak şekilde eklenmiştir. 72 saat inkübasyon süresinin sonunda CFSE boyasının dilüsyonuna göre T hücre proliferasyon yüzdeleri akım sitometride belirlenmiştir (222). Hücreler çoğaldıkça bu boyanın konsantrasyonu azalacaktır (226). Bu durumda akım sitometri analizinde gözlenen pikler sola doğru kaymaya başlayacaktır. Çoğalmayan hücre pikleri (d0) “harici” seçilip kalan pikler (d1, d2, d3...) dikkate alınarak T hücrelerin ne kadar çoğaldığı tespit edilmiştir (Şekil 3.17.) (227).



Şekil 3.17. T hücre proliferasyonu ölçüm prensibinin şematik gösterimi (227).

### **PKMH Canlılık Deneyi (*İn Vivo* Gruplar için)**

Bu deneyin yapılma amacı, *in vivo* deneylerde farelere uygulanacak olan tüm çözelti ve nanoformülasyonların PKMH canlılığı üzerine olumsuz bir etki oluşturup oluşturmadığının belirlenmesidir. Bölüm 3.2.13. “PKMH Canlılık Deneyi” başlığında belirtildiği şekilde izole edilen PKMH, kuyu başına 100 µL olacak şekilde (100.000 hücre/kuyu) 96 kuyulu yuvarlak tabanlı plakalara ekilmiş ve 0,1 µL Anti-CD3/28 boncukları ile uyarımı sağlanmıştır. *İn vivo* deneylerde çalışılan her grup, öncelikle *in vitro* koşullarda test edilmiştir. Hücre kültürü ortamında redisperse edilen 100 µL hacimdeki ilaç çözeltisi (Nivolumab+galunisertib+anti-EGFR), hedefsiz kombine etkin madde yüklü NP (PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-G-N KNP), hedefli kombine etkin madde yüklü NP (PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR-G-N KNP), hedefli boş NP (PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR KNP), serum fizyolojik (kontrol grubu, gri), hedefsiz boş NP (PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG KNP) kuyucuklara üç tekrarlı olacak şekilde eklenmiştir. Deney gruplarının 72 saat inkübasyonu sonunda kuyulara 2 µL PI çözeltisi eklenmiştir ve akım sitometrisi ile analiz edilmiştir (222).

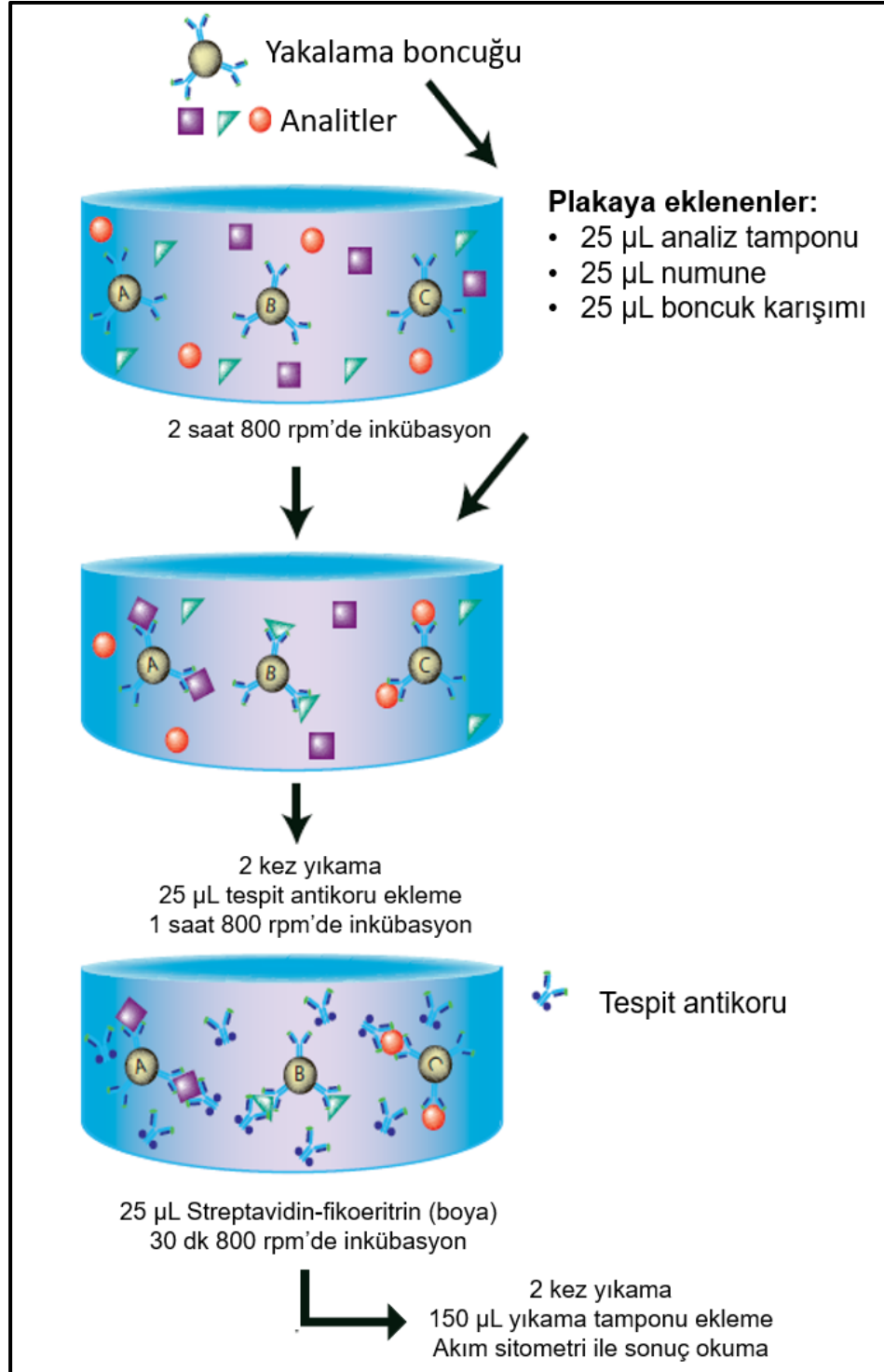
### **T Hücre Proliferasyon Deneyi (*İn Vivo* Gruplar için)**

Daha önceki aşamada gerçekleştirilen T hücre proliferasyon deneyi ile etkin nivolumab dozu tespit edilmiş, nivolumab yüklü nanopartiküllerin T hücre proliferasyonunu artırdığı tespit edilmiştir. *İn vivo* deneylerde çalışılacak olan her grup öncelikle *in vitro* olarak hücre kültürü koşullarda test edilmiştir. Bölüm 3.2.13. “T Hücre Proliferasyon Deneyi” başlığında anlatıldığı şekilde PKMH, CFSE boyası ile işaretlenmiş ve CD3/CD28 boncukları ile uyarılmıştır. Hücre kültürü ortamında redisperse edilen 100 µL hacimdeki ilaç çözeltisi (Nivolumab+galunisertib+anti-EGFR), hedefsiz kombine etkin madde yüklü NP (PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-G-N KNP), hedefli kombine etkin madde yüklü NP (PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR-G-N KNP), hedefli boş NP (PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR KNP), serum fizyolojik (kontrol grubu, gri), hedefsiz boş NP (PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG KNP) kuyucuklara üç tekrarlı olacak şekilde eklenmiştir. 72 saat inkübasyon süresinin sonunda CFSE boyasının dilüsyonuna göre T hücre proliferasyon yüzdeleri akım sitometride belirlenmiştir. T hücre proliferasyon deneyinden elde edilen süpernatantların bir kısmı CD8/NK ve yardımcı T hücre sitokin panellerini içeren

boncuk temelli kitler ile çeşitli interlökinler, Tümör Nekroz Faktörü- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IFN- $\gamma$  gibi sitokinlerin analizinde kullanılmıştır (Şekil 4.50.).

### **İnsan CD8/NK Boncuk Temelli Çoklu Analiz Kiti ile Sitokinlerin Analizi**

Bu deney, farelerden alınan doku örneklerindeki çeşitli sitokinler ile tedavi etkinliği arasındaki ilişkinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Kullanılan kit, boncuk (*bead*) temelli bir multipleks testtir. Boncuklar sayesinde sitokinler akım sitometride hücre boyutuna ulaşarak görünür hale gelmektedir. Bu analizde küçük (A) ve büyük (B) boyutlu iki set boncuk kullanılmaktadır. Her bir boncuk farklı bir analite spesifik bağlanmaktadır. Örneğin, A3 IL-17A'ya spesifik bağlanırken, A7 IL-6'ya spesifik bağlanmakta, B4 IFN- $\gamma$ 'ya spesifik bağlanırken, B5 granzim A'ya spesifik bağlanmaktadır. Kit, sandviç ELISA prensibine (boncuk-analit-tespit antikoru) dayanmaktadır. Deney prosedürü aşağıdaki adımlarla özetlenmiştir (Şekil 3.18.), bu prosedür *in vivo* numuneler için de aynı şekilde tekrarlanmıştır.



**Şekil 3.18.** CD8/NK boncuk temelli ELISA kit prosedürü şematik gösterimi.

Şekil 3.18.'de özetlenen ELISA analizine ilişkin detaylar aşağıda yer almaktadır:

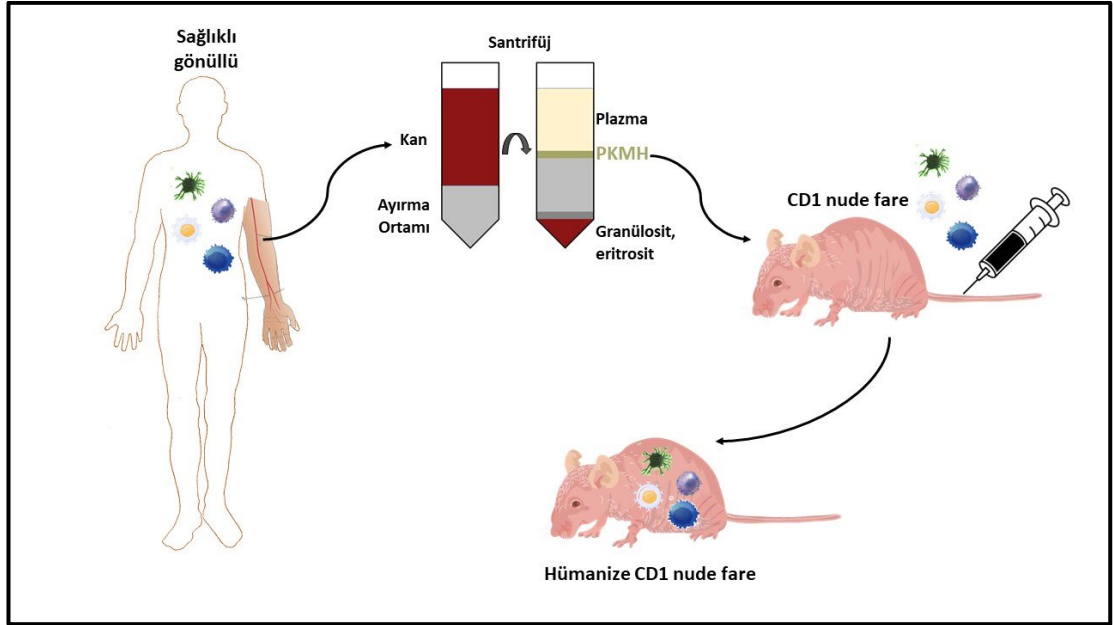
*İn vitro* numuneler kitin kalibrasyon aralığına girmesi amacıyla analiz tamponu ile 1:5 seyreltilmiştir. *İn vivo* numunelere herhangi bir seyreltme işlemi uygulanmamıştır. Kitin içinde bulunan stok çözeltisinden hareketle C1-C7 standartları

2,4 - 9,8 - 39,1 - 156,3 - 625 - 2500 - 10000 pg/mL konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. Analizde numune veya standartlar kuyucuklara ikişer tekrarlı olarak eklenmiştir (n=2). Şekil 3.18.'de belirtilen aşamalar sonunda sonuçların okunması amacıyla klasik ELISA analizlerinden farklı olarak plaka okuyucu yerine akım sitometri cihazı ile tayin yapılmıştır. Boncukların boyut ve iç floresan yoğunluklarına göre farklı alanlarda sinyal vermesi sebebiyle analite özgü popülasyonlar ayrı ayrı tespit edilmiş ve floresan sinyalleri kaydedilmiştir. Akım sitometriden elde edilen değerlerin anlamlı sayısal değerlere dönüştürülebilmesi (Şekil 4.50. ve 4.51.) amacıyla kitin temin edildiği Biolegend markasına ilişkin veri analizi yazılım programı kullanılmıştır (228).

### **3.2.14. Tümör Modelinin Geliştirilmesi ve Tümörün Değerlendirilmesi**

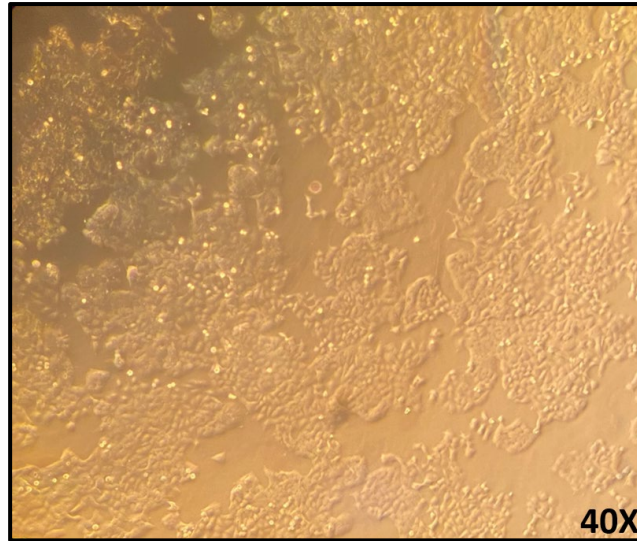
Mevcut prelinik modeller insan hastalıklarının altında yatan fizyolojik ve/veya patolojik mekanizmaları tam olarak yansıtmamaktadır. Tümör biyolojisi çok karmaşık olduğu için bir fare kanser modeli ile bu ortamın taklit edilmesi çok zordur (229). Ek olarak tedaviye yanıt ve direnç mekanizmaları insan fizyolojisini birebir yansıtmamaktadır. Bu sebeple immün yetmezliği olan farelerin insanlaştırılmasına yönelik araştırmalar yakın zamanda yaygınlaşmaya başlamıştır (139, 229-231).

CD-1 nude, BALB/c gibi bağışıklık yetersizliği olan fare türleri, T, B ve NK hücreleri üretmezler, sadece dendritik hücre ve makrofajlara sahiptir (229). Bu tür farelere insan kanser hücreleri, dokuları veya hastadan türetilmiş ksenograftlar aşılanabildiği için, kanser çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadırlar (229, 230). Tezde sağlıklı gönüllülerden alınan PKMH ile nude farelerin humanize edilmesinin amacı insandaki tümör mikroçevresini daha iyi taklit etmek ve insan tümörüne daha yakın bir kanser modeli elde etmektir (Şekil 3.19.) (139). *In vivo* çalışmalar, Kobay D.H.L. A.Ş.'den (Protokol no: 353) ve Hacettepe Üniversitesi Yerel Etik Kurulu'ndan (2019/09-01 sayılı karar) alınan etik izinler kapsamında yürütülmüştür.



**Şekil 3.19.** Nude farelerde PKMH ile humanizasyon işleminin şematik gösterimi.

*In vivo* deneyler için insan A549-Luc2 hücre hattı azot tankından alınarak T25 flaska ekilmiş ve % 80 sıkışma oranına ulaşan hücreler önce 10 adet T75 flaska ardından da 50 adet T175 flaska aktararak yeterli hücre sayısı elde edilmiştir. Hücrelerin genel durumu mikroskopta kontrol edildikten sonra (Şekil 3.20.) flasklardaki hücre kültürü ortamları uzaklaştırılmıştır.



**Şekil 3.20.** İnsan KHDAC hücre hattının (A549-Luc2) optik mikroskoptaki görüntüsü.

Flasktaki hücreler 8'er mL PBS ile yıkanmıştır. Devamında hücreler 500 µL 10X tripsin EDTA (Oda sıcaklığında 5-10 dk bekletildi) ile kaldırılmış ve tek bir falkon tüpe aktarılmıştır (Şekil 3.21.).



**Şekil 3.21.** T175 flaskta bulunan hücrelerin kaldırılması ve tek bir falkon tüpte toplanmasına ilişkin görsel.

Enzim aktivasyonunu inhibe etmek için üzerine hücre kültürü ortamı eklenen hücreler 4 kez 1800 rpm’de santrifüj edilerek PBS ile yıkanmıştır. 10 mL PBS eklenen hücreler sayılarak enjeksiyon için gerekli hücre sayısı/hacim belirlenmiştir (35, 232-234).  $30 \times 10^6$  adet A549-Luc2 hücresi/150 $\mu$ L, matrijel ile 1:1 (h/h) oranında karıştırıldıktan sonra 42 adet CD-1 nude (erkek) farenin dorsal flank bölgesine subkütan yol ile enjekte [28G (Gauge) iğne ile] edilmiştir (Şekil 3.22.).



**Şekil 3.22.** CD-1 nude farelere subkütan olarak A549-Luc2 hücrelerinin uygulanması.

Enjeksiyonu takip eden günlerde hayvanların sağlık durumu, yem ve su ihtiyaçları takip edilmiş ve on dördüncü günde farelerin tümör çapları ve ağırlık ölçümleri yapılarak toplam 8 gruba ayrılmıştır. 6 deney grubu anti-tümör yanıt için  $n=6$  olarak bölünmüş, 2 deney grubu biyodağılım incelemesi için  $n=3$  olacak şekilde belirlenmiştir.

Yapılan ön denemeler sonucunda, PKMH'nin tedavi boyunca haftada bir verilmesi kararlaştırılmıştır. Humanizasyon işlemi literatürde verilen protokole göre gerçekleştirilmiştir. Tümör geliştirilen farelere sağlıklı tek bir gönüllüden alınıp izole edilen PKMH,  $6 \times 10^6$  hücre/150  $\mu$ L olacak şekilde kuyruk veninden enjekte edilmiştir (231, 235). PKMH enjeksiyonunu takiben 48. saatte ilk tedavi uygulaması yapılmıştır. Buna göre ilaç çözeltisi veya etkin madde yüklü nanopartikül uygulanan her fareye bir enjeksiyonda 3 mg/kg nivolumab, 1,4 mg/kg galunisertib verilmiştir. Galunisertib, oral yolla kullanımı araştırılan bir kemoterapötik olması, nanosisteme enkapsüle edilerek i.v. enjeksiyon ile farelere uygulanmasına ilişkin literatürde az sayıda çalışma olması sebebiyle *in vivo* doz, hücre kültürü deneyleri ile belirlenmiştir.

Nanopartikül çökeltileri uygulama öncesinde serum fizyolojik ile redisperse edilmiş ve her fareye yarım seri nanopartikül/200  $\mu$ L hacimde kuyruk veninden uygulanmıştır. Her uygulama öncesi farelerin tümör çapları ve ağırlıkları kaydedilmiştir, ayrıca grupların genel fiziksel ve ruhsal sağlık durumları da değerlendirilmiştir. Toplam altı doz nanopartikül uygulaması, haftada iki kez (2 veya 3 gün ara ile) yapılmıştır. Deney sonunda, yüksek doz ketamin/ksilazin kompleksi uygulaması ile fareler sakrifiye edilmiş, tümör ve dalakları immün yanıt analizleri için ayrılmıştır.

Tümörler uygun büyüklüğe (0,5 cm çap) ulaştıktan sonra altı gruba ayrılan humanize CD-1 nude farelere farklı tedaviler toplam altı doz olarak kuyruk veninden uygulanmıştır. Tedavi süresi boyunca kumpas yardımı ile tümör çapları ölçülmüş ve ağırlıklar kaydedilmiştir. Tedavi protokolleri sonunda sakrifiye edilen farelerden çıkarılan tümör dokularının boyutları kumpasla ölçülmüştür.

### 3.2.15. İmmün Yanıtın *In Vivo* Olarak Değerlendirilmesi

Literatürde de bahsedildiği üzere T lenfositlere ilişkin sitokin analizlerinin yapılabilmesi amacıyla, *in vivo* deneylerin takibinde sakrifiye edilen farelerin tümör ve dalakları çıkarılmıştır. Tümör dokuları (n=5 (236, 237)) tartılıp ayrı ayrı falcon tüplere alınarak üzerine enzimatik sindirim çözeltisi ve 1'er mL DMEM eklenmiş ve 37 °C'deki yatay çalkalayıcı su banyosunda 3 saat inkübasyona bırakılmıştır (238). Dalak numunelerinde, tümör dokularından farklı olarak enzimatik sindirim yapılmamıştır. Ardından tümör ve dalak numuneleri hücre süzgeci üzerine 3 mL

DMEM eklenip ezilerek içinden PKMH ayrıştırılmıştır. Devamında hücre sayımı yapılmış ve numuneler ikiye ayrılarak deney hazırlıkları gerçekleştirilmiştir:

- Tümör ve dalak numunelerinin ilk bölümü, gerekli miktarda forbol 12-miristat 13-asetat (PMA) ve iyonomisin kombinasyonu ile 12 saat inkübe edilerek uyarım yapılmıştır. PMA/iyonomisin kombinasyonu, sitokin ekspresyonunu indüklemek amacıyla kullanılmıştır (239). İnkübasyonun sonunda, süpernatantlar toplanarak -80 °C’de immün yanıt deneyleri için saklanmıştır. Kilit immün yanıt (*essential immune response*) ve inflamasyon panellerini içeren boncuk temelli sitokin analiz kiti (*bead array*) kullanılarak analizler (n=2) gerçekleştirilmiştir.
- Tümör ve dalak numunelerinin diğer bölümü, akım sitometri analizi için CD45, CD3, CD8, CD25, CD38, PD-1, CD69 biyobelirteçleri boyanarak CD4+ ve CD8+ hücreler birbirinden ayrılmıştır. Dalak numunelerinde CD45+ hücre yüzdesi çok düşük bulunduğu için deneyler tümör numuneleri üzerinden gerçekleştirilmiştir. Tümör dokusu PMA/iyonomisin (50 ng/mL PMA, 0,5 µg/mL iyonomisin) ile 12 saat uyarılmış ve süpernatantlar toplanmıştır. Süpernatantlarla gerçekleştirilen (n=3) akım sitometri analiz sonuçları incelenerek gruplar arası farklılıklar kıyaslanmıştır.

### 3.2.16. Biyodağılım Çalışmaları

Tümör çapı uygun boyuta ulaşan (0,5 cm) CD-1 nude fareler çalışma öncesinde iki gruba (n=3) ayrılmıştır. Anti-EGFR antikoru ile hedeflendirilmiş ve izotip kontrol antikoru ile konjuge edilmiş floresan işaretli nanopartiküller, kuyruk veninden 200’er µL (yarım seri NP) uygulanmıştır. Enjeksiyonu takip eden 14. saatte ilk olarak farelere 100’er µL ketamin/ksilazin enjeksiyonu yapılmış, ardından 6 mg/kg dozda lusiferin intravenöz yolla enjekte edilmiştir. Çalışılan hücre hattı transfekte olup lusiferaz enzimi içermesi sebebiyle lusiferinle reaksiyona girip biyoluminesans ışımaya yapmaktadır (210). İlk olarak IVIS ile biyoluminesans görüntüleme yapılarak tümör oluşumunun istenilen bölgede ve boyutta (0,5 cm çapta) olduğu teyit edilmiştir. Nanopartiküllerin biyodağılımlarını IVIS ile inceleyebilmek amacıyla fareler sakrifiye edilmiş ve akciğer, kalp, karaciğer, dalak, böbrekler ve tümör dokusu çıkarılmıştır. Kullanılan floresan özellikli polimerin cihazda ışımaya yaptığı dalga boyu ve çekim süresini belirlemek için denemeler yapılmış, optimum sonuçların 780 nm *near infrared* dalga boyunda 5 sn süreyle alındığı tespit edilmiştir.

### 3.2.17. İstatistiksel Değerlendirme

Tez kapsamında elde edilen değerler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak ifade edilmiştir. Her bir deney, en az iki tekrarlı (istisna durumlar yöntem bölümünde belirtilmiştir) olarak gerçekleştirilmiştir. Veriler, uygun istatistiksel analizler (ANOVA, Mann-Whitney U, Kruskal-Wallis gibi) ve Graphpad Prism 8 yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir.  $p < 0,05$  olduğu durumlar anlamlı bir fark olarak değerlendirilmiştir.

### 3.2.18. Tez Çalışmaları Kapsamında Kullanılan Nanopartiküllere İlişkin Formülasyon Kodları

Tez kapsamında sonuçların daha anlaşılır sunulması amacıyla, üretilen nanopartiküllere formülasyon kodları verilmiştir. Söz konusu kodlar ve bu kodlara karşılık gelen formülasyon özellikleri Tablo 3.8.'de verilmiştir.

**Tablo 3.8.** Polimerik nanopartiküllere ilişkin formülasyon kodları.

Formülasyon Kodu	Formülasyon Bileşimi
PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG KNP	PLGA, PLGA-His ve PLGA-PEG karışımından oluşan (1,5:1,5:1, a/a/a) küresel nanopartiküller
PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG ÇNP	PLGA, PLGA-His ve PLGA-PEG karışımından oluşan (1,5:1,5:1, a/a/a) çubuk şeklindeki nanopartiküller
PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG EDNP	PLGA, PLGA-His ve PLGA-PEG karışımından oluşan (1,5:1,5:1, a/a/a) eliptik disk şeklindeki nanopartiküller
PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR KNP	PLGA, PLGA-His ve PLGA-PEG karışımından oluşan (1,5:1,5:1, a/a/a) küresel, anti-EGFR ile konjuge nanopartiküller
PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-N KNP	PLGA, PLGA-His ve PLGA-PEG karışımından oluşan (1,5:1,5:1, a/a/a) küresel, bütün nivolumab yüklü nanopartiküller
PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-G-N KNP	PLGA, PLGA-His ve PLGA-PEG karışımından oluşan (1,5:1,5:1, a/a/a) küresel, galunisertib ve bütün nivolumab yüklü nanopartiküller
PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-G-N <sub>F(ab')<sub>2</sub></sub> KNP	PLGA, PLGA-His ve PLGA-PEG karışımından oluşan (1,5:1,5:1, a/a/a) küresel, galunisertib ve fragmente nivolumab yüklü nanopartiküller
PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-G-N <sub>F(ab')<sub>2</sub></sub> ÇNP	PLGA, PLGA-His ve PLGA-PEG karışımından oluşan (1,5:1,5:1, a/a/a) çubuk şeklinde, galunisertib ve fragmente nivolumab yüklü nanopartiküller

**Tablo 3.8. (Devam)** Polimerik nanopartiküllere ilişkin formülasyon kodları.

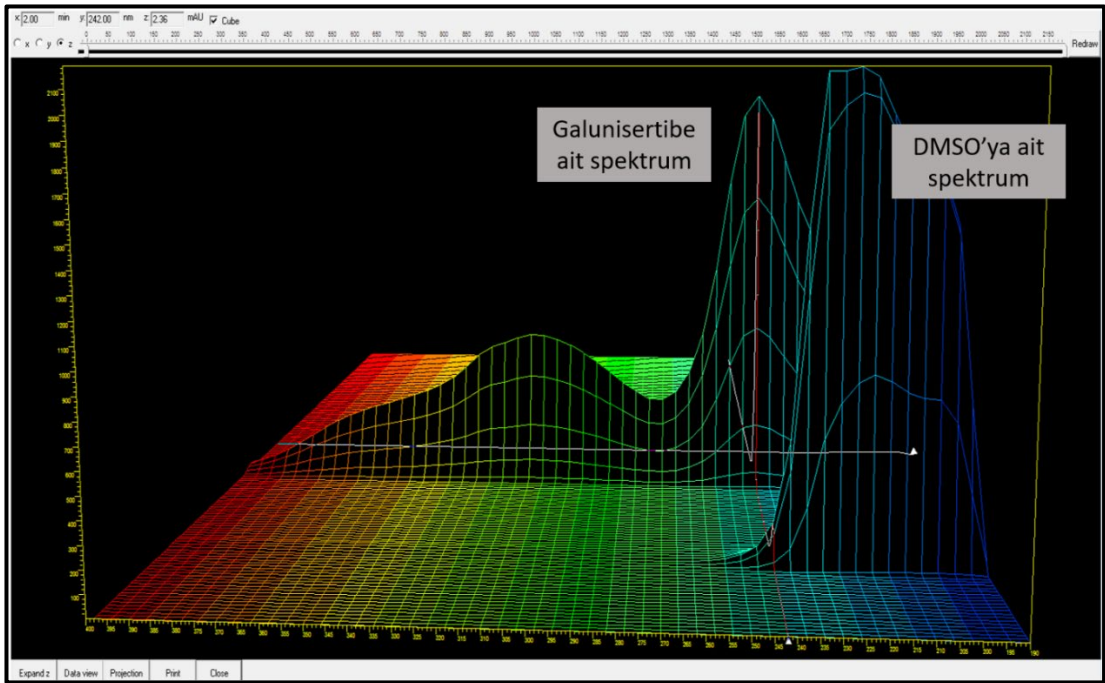
Formülasyon Kodu	Formülasyon Bileşimi
PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-G-N <sub>F(ab')<sub>2</sub></sub> ÇNP	PLGA, PLGA-His ve PLGA-PEG karışımından oluşan (1,5:1,5:1, a/a/a) çubuk şeklinde, galunisertib ve fragmente nivolumab yüklü nanopartiküller
PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-G-N <sub>F(ab')<sub>2</sub></sub> EDNP	PLGA, PLGA-His ve PLGA-PEG karışımından oluşan (1,5:1,5:1, a/a/a) eliptik disk şeklinde, galunisertib ve fragmente nivolumab yüklü nanopartiküller
PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR-N <sub>F(ab')<sub>2</sub></sub> KNP	PLGA, PLGA-His ve PLGA-PEG karışımından oluşan (1,5:1,5:1, a/a/a) küresel, anti-EGFR ile konjuge fragmente nivolumab yüklü nanopartiküller
PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR-N KNP	PLGA, PLGA-His ve PLGA-PEG karışımından oluşan (1,5:1,5:1, a/a/a) küresel, anti-EGFR ile konjuge bütün nivolumab yüklü nanopartiküller
PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR-G-N <sub>F(ab')<sub>2</sub></sub> KNP	PLGA, PLGA-His ve PLGA-PEG karışımından oluşan (1,5:1,5:1, a/a/a) küresel, anti-EGFR ile konjuge galunisertib ve fragmente nivolumab yüklü nanopartiküller
PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR-G-N KNP	PLGA, PLGA-His ve PLGA-PEG karışımından oluşan (1,5:1,5:1, a/a/a) küresel, anti-EGFR ile konjuge galunisertib ve bütün nivolumab yüklü nanopartiküller
mPEG-PLGA-FKR560/PLGA-His/PLGA-PEG KNP	mPEG-PLGA-FKR560, PLGA-His ve PLGA-PEG karışımından oluşan (1,5:1,5:1, a/a/a) küresel nanopartiküller
mPEG-PLGA-FKR560/PLGA-His/PLGA-PEG ÇNP	mPEG-PLGA-FKR560, PLGA-His ve PLGA-PEG karışımından oluşan (1,5:1,5:1, a/a/a) çubuk şeklinde nanopartiküller
mPEG-PLGA-FKR560/PLGA-His/PLGA-PEG EDNP	mPEG-PLGA-FKR560, PLGA-His ve PLGA-PEG karışımından oluşan (1,5:1,5:1, a/a/a) eliptik disk şeklinde nanopartiküller
PLGA-FPI749/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR KNP	PLGA-FPI749, PLGA-His ve PLGA-PEG karışımından oluşan (1,5:1,5:1, a/a/a) küresel, anti-EGFR ile konjuge nanopartiküller
PLGA-FPI749/PLGA-His/PLGA-PEG-İzo KNP	PLGA-FPI749, PLGA-His ve PLGA-PEG karışımından oluşan (1,5:1,5:1, a/a/a) küresel, izotip antikor ile konjuge nanopartiküller

## 4. BULGULAR

Bu bölümde tez kapsamında gerçekleştirilen deneylere ilişkin bulgular sunulmuş olup, bulguların literatür ile karşılaştırılarak yorumlanması tartışma bölümünde gerçekleştirilmiştir.

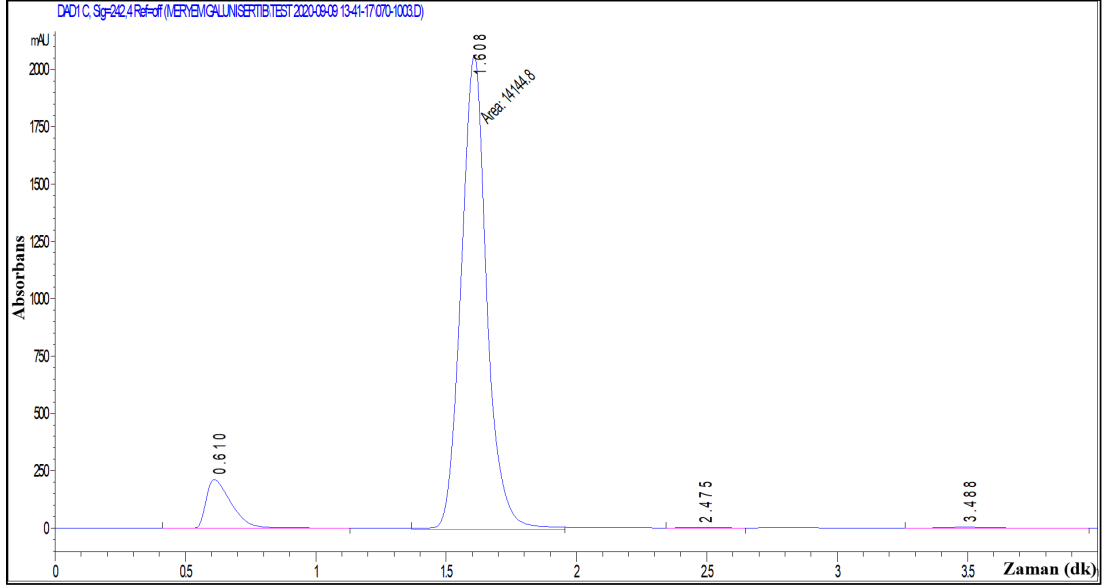
### 4.1. Galunisertib için *In Vitro* Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu

Galunisertibin en yüksek absorbans verdiği dalga boyunu belirlemek için HPLC cihazı ile elde edilen üç boyutlu UV spektrumu incelenmiş ve böylece, seçilen mobil faz ile en yüksek absorbansı veren dalga boyu ( $\lambda_{max}$ ), 242 nm olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Galunisertibin 1:9 (h/h) oranında DMSO:su içerisindeki UV spektrumunun üç boyutlu görüntüsü.

Yöntem bölümünde belirtilen koşullarda yapılan analizler sonucunda, HPLC ile alıkonma zamanı (tR) galunisertib için 1,608 dk olarak bulunmuştur. Galunisertibin 100 µg/mL konsantrasyondaki numunesi ile elde kromatogram Şekil 4.2.'de verilmiştir.

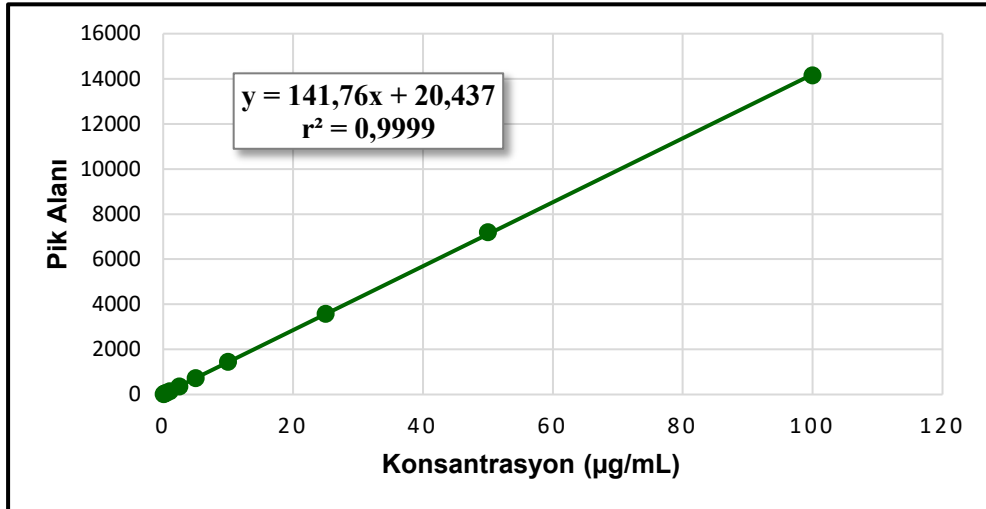


**Şekil 4.2.** Galunisertibe ilişkin (100 µg/mL) HPLC kromatogramı.

Galunisertibin miktar tayini için geliştirilen HPLC yönteminin Uluslararası Harmonizasyon Komitesi (ICH) Q2(R1) Kılavuzu'na göre gerçekleştirilen analitik yöntem validasyonuna ilişkin bulgular sırası ile aşağıda değerlendirilmiştir:

### Doğrusallık

Yöntem bölümünde belirtildiği gibi prosedür uygulanmış ve galunisertib için, standart çözelti konsantrasyonlarına karşı, HPLC analiz sonucu elde edilen pik alanları ile kalibrasyon doğrusu grafiği oluşturulmuştur (Şekil 4.3.). Korelasyon katsayısı, galunisertib için  $r^2=0,9999$  bulunarak yöntemin doğrusallığı kanıtlanmıştır.



**Şekil 4.3.** Galunisertibe ilişkin kalibrasyon doğrusu ve denklemi.

Elde edilen kalibrasyon doğrusu incelendiğinde korelasyon katsayısı ( $r^2$ ) 1'e çok yakın bulunmuştur. Bu durum, 0,1-100 ppm konsantrasyon aralığında hazırlanan standart çözeltilerin konsantrasyon ve absorpsiyon değerleri arasında doğrusal bir ilişki olduğunu göstermektedir.

### Doğruluk

Yöntem 3.2.1. bölümünde verilen formül (Formül 3.1.) kullanılarak yapılan hesaplamalara göre, galunisertib için deney içi (gün içi) ve deneyler arası (günler arası) geri kazanım değerleri Tablo 4.1.'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.1.** Galunisertib için deney içi ve deneyler arası % geri kazanım değerleri.

	İlave edilen konsantrasyon ( $\mu\text{g/mL}$ )	Hesaplanan konsantrasyon ( $\mu\text{g/mL}$ )	Doğruluk (% Geri kazanım)
<b>Gün içi *</b>	0,5	0,41 $\pm$ 0,004	82,43 $\pm$ 0,74
	5	5,04 $\pm$ 0,09	100,82 $\pm$ 1,84
	50	50,44 $\pm$ 0,38	100,87 $\pm$ 0,75
<b>Günler arası *</b>	0,5	0,41 $\pm$ 0,004	81,62 $\pm$ 0,79
	5	5,10 $\pm$ 0,05	101,98 $\pm$ 1,02
	50	50,59 $\pm$ 0,15	101,19 $\pm$ 0,30

\*: Gün içi ve günler arası tayinde her konsantrasyon için  $n=6$  çalışılmıştır.

Tablo incelendiğinde, geri kazanım değerlerinin % 82-102 arasında olduğu belirlenmiştir. Üç konsantrasyon için de doğruluk değerleri literatür ile uyumlu bulunmuştur (240, 241).

### Keskinlik

Analitik yöntem validasyonu kapsamında keskinlik parametresi için tekrarlanabilirlik ve tekrar elde edilebilirlik parametreleri değerlendirilmiştir. Galunisertibe ilişkin tekrarlanabilirlik ve tekrar elde edilebilirlik değerlendirmeleri aşağıdaki tablolarda (Tablo 4.2. ve 4.3.) gösterilmektedir.

**Tablo 4.2.** Galunisertib için HPLC ile tekrarlanabilirliğin değerlendirilmesi.

İlave edilen konsantrasyon ( $\mu\text{g/mL}$ )	Hesaplanan konsantrasyon ( $\mu\text{g/mL}$ )	Ortalama $\pm$ SS*	VK (%)**
0,5	0,40	0,41 $\pm$ 0,003	0,74
	0,41		
	0,41		
	0,41		
	0,41		
	0,41		
5	5,04	5,04 $\pm$ 0,003	0,06
	5,04		
	5,04		
	5,04		
	5,04		
	5,03		
50	50,55	50,56 $\pm$ 0,008	0,02
	50,57		
	50,57		
	50,56		
	50,56		
	50,56		

\*SS: Standart sapma, \*\*VK: Varyasyon katsayısı.

**Tablo 4.3.** Galunisertib için HPLC ile tekrar elde edilebilirliğin değerlendirilmesi

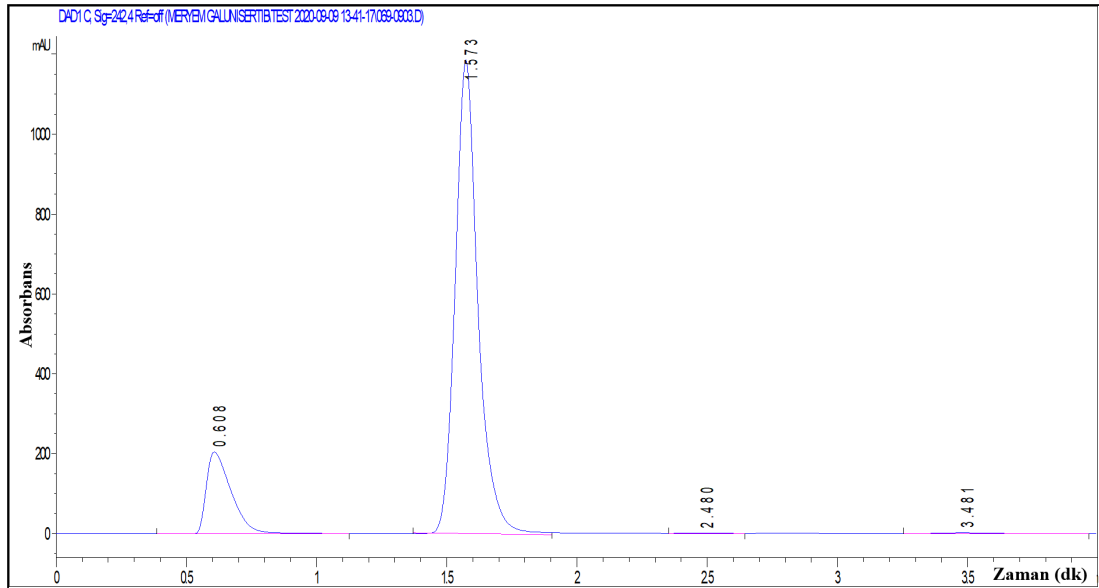
	İlave edilen konsantrasyon ( $\mu\text{g/mL}$ )	Hesaplanan konsantrasyon ( $\mu\text{g/mL}$ )	VK (%)**
Gün içi *	0,5	0,41 $\pm$ 0,004	0,97
	5	5,04 $\pm$ 0,09	1,83
	50	50,44 $\pm$ 0,2	0,39
Günler arası *	0,5	0,41 $\pm$ 0,01	2,22
	5	5,09 $\pm$ 0,05	1,00
	50	50,59 $\pm$ 0,15	0,30

\* Gün içi ve günler arası tayinde her konsantrasyon için n=6 çalışılmıştır. \*\*VK: Varyasyon katsayısı.

Tablo 4.2. ve 4.3.'te görüldüğü gibi, pik alanlarına karşılık gelen konsantrasyonlar için varyasyon katsayısı değerleri hesaplanmıştır. Hesaplanan % varyasyon katsayısı değerlerinin % 2'den küçük olduğu görülmekte olup, HPLC yönteminin tekrarlanabilirliği ve tekrar elde edilebilirliği gösterilmiştir.

## Özgünlük

Analitik bir yöntemin özgünlüğü; etkin maddenin ortamda bulunan ekşiyanların, safsızlıkların veya parçalanma ürünlerinin varlığında, analiz edebilme yeteneğini göstermektedir. Bu ölçütlerin değerlendirilmesine yönelik olarak formülasyonda kullanılan diğer maddelerin (PLGA, PVA vb.) formülasyonda buldukları konsantrasyonda çözeltileri hazırlanmış ve etkin madde analizinin yapıldığı koşullarda HPLC kullanılarak kromatogramları incelenmiştir.



**Şekil 4.4.** Galunisertib için geliştirilen HPLC yönteminin özgünlüğüne ilişkin kromatogram.

Galunisertibin miktar tayini koşullarında elde edilen kromatogram incelendiğinde formülasyonda kullanılan yardımcı maddelere ilişkin herhangi bir pik gözlenmemiştir. Galunisertib piki dışında gözlenen tek pik (~ 0,62 dk), galunisertibin çözünmesi amacıyla kullanılan DMSO'ya aittir. Sonuç olarak, yardımcı maddelerin etkin madde piki ile girişim yapmadığı görülmüştür.

## Duyarlılık

Galunisertib miktar tayini yöntemiyle en düşük konsantrasyonda elde edilen pik ve pik alanı kullanılarak, HPLC yazılımı yardımıyla, yöntemin duyarlılığı için saptama sınırı (LOD) 12,79 ng/mL, yöntemin duyarlılığı için kabul edilebilir doğruluk ve kesinlikte ölçülebilen konsantrasyon (LOQ) ise 42,64 ng/mL olarak tespit

edilmiştir. Geliştirilen HPLC yöntemi ile ng (nanogram) seviyesinde hassas ve doğru bir şekilde ölçüm yapılabildiği gözlenmiştir. Elde edilen LOD ve LOQ değerleri tez çalışması kapsamında gerçekleştirilecek analizlerin sonuçlarının değerlendirilmesi için yeterli seviyededir.

### Stabilite

Stabilite analizi kapsamında, galunisertib çözeltisinin deneyler kapsamında veya analiz süresince maruz kalabileceği 24 saatlik bekleme süresinin etkisi incelenmiştir. Çözeltiler, başlangıç noktasında ve 21-25 °C’de 24 saat bekletildikten sonra HPLC ile analiz edilmiş ve elde edilen konsantrasyonlar karşılaştırılmıştır. Varyasyon katsayısı değerleri % 2’nin altında bulunarak galunisertibin analiz süresi boyunca stabil kaldığı gösterilmiştir (Tablo 4.4.).

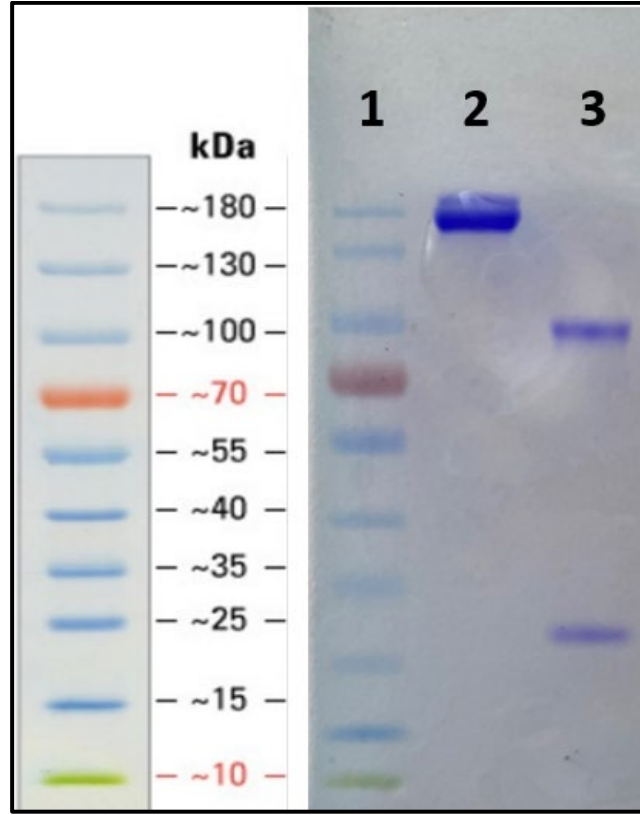
**Tablo 4.4.** Galunisertibe ilişkin stabilite analiz sonuçları.

Konsantrasyon (µg/mL)	Zaman (sa)	Hesaplanan konsantrasyon (µg/mL)	%VK
0,5	0	0,33 ± 0,001	0,30
0,5	24	0,33 ± 0,001	0,30
5	0	4,58 ± 0,004	0,09
5	24	4,59 ± 0,01	0,26
50	0	46,89 ± 0,002	0,004
50	24	46,92 ± 0,004	0,008

Her konsantrasyon için iki farklı zamanda elde edilen veriler arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

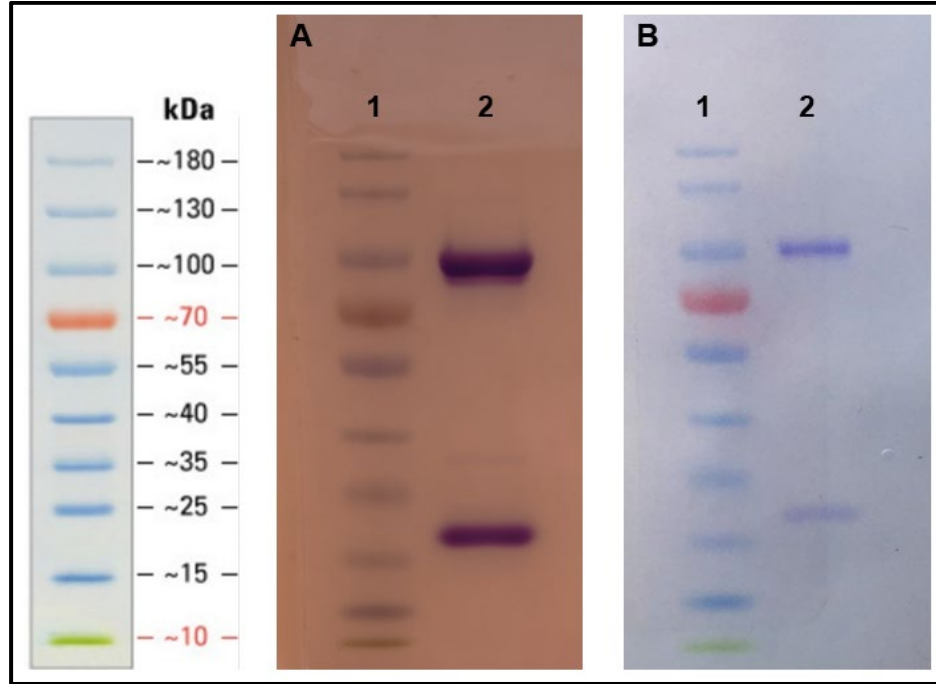
### 4.2. Nivolumab Antikorumun Fragmantasyonu ve Fragmantasyonun Doğrulanması

Nivolumab, IdeS enzimi ile inkübe edilerek  $F(ab')_2$  ve Fc fragmanlarına ayrılmıştır. Fragmantasyonun doğrulanması amacıyla gerçekleştirilen SDS-PAGE analizine ilişkin sonuçlar Şekil 4.5.’te yer almaktadır.



**Şekil 4.5.** Bütün ve fragmente edilmiş nivolumaba ilişkin SDS-PAGE bantları:1. PageRuler™ protein merdiveni (10-180 kDa aralığında bantlara sahip); 2. Bütün nivolumab antikorunu; 3. IdeS enzimi ile 1 saat inkübasyon sonrası elde edilen  $F(ab')_2$  ve Fc fragmanları karışımı.

Şekil 4.5.'teki 3 numaralı alan incelendiğinde, ~100 kDa seviyesinde  $F(ab')_2$  fragmanı, ~27-30 kDa seviyesinde ise Fc fragmanı bant vermiştir. Başarılı bir şekilde yapılan fragmentasyonun ardından antikorun istenen bölümü olan  $F(ab')_2$  fragmanı iki farklı por çapına sahip ultra filtre yardımıyla ayrılmış ve bu işlemin doğrulanması için SDS-PAGE analizi tekrarlanmıştır (Şekil 4.6.).



**Şekil 4.6.** Antikor fragmanlarına uygulanan ultrafiltrasyon işlemi sonrası elde edilen SDS-PAGE bantları: A1 ve B1. PageRuler™ protein merdiveni; A2. 50 kDa ultra filtreden süzülen F(ab')<sub>2</sub> ve Fc antikor fragmanı karışımı; B2. 100 kDa filtreden süzülen F(ab')<sub>2</sub> ve Fc antikor fragmanı karışımı.

Şekil 4.6. A ve B'deki SDS-PAGE analiz sonuçları incelendiğinde nitel olarak antikor miktarı hakkında yorum yapılabilmektedir. Bantların genişliği ve koyuluğu dikkate alınarak 50 kDa filtrelili tüp ile Fc fragmanının ortamdaki miktarı daha az uzaklaştırılabildiği, 100 kDa filtrelili tüp ile Fc fragmanlarının çoğunluğunun ortamdaki miktarı uzaklaştırıldığı gözlenmektedir. Yapılan tüm SDS-PAGE jel elektroforez analizlerinin sonucunda fragmantasyon işlemi için IdeS enzimi, fragman karışımından Fc fragmanlarının uzaklaştırılması için ise 100 kDa filtrelili tüplerin kullanılması uygun bulunmuştur.

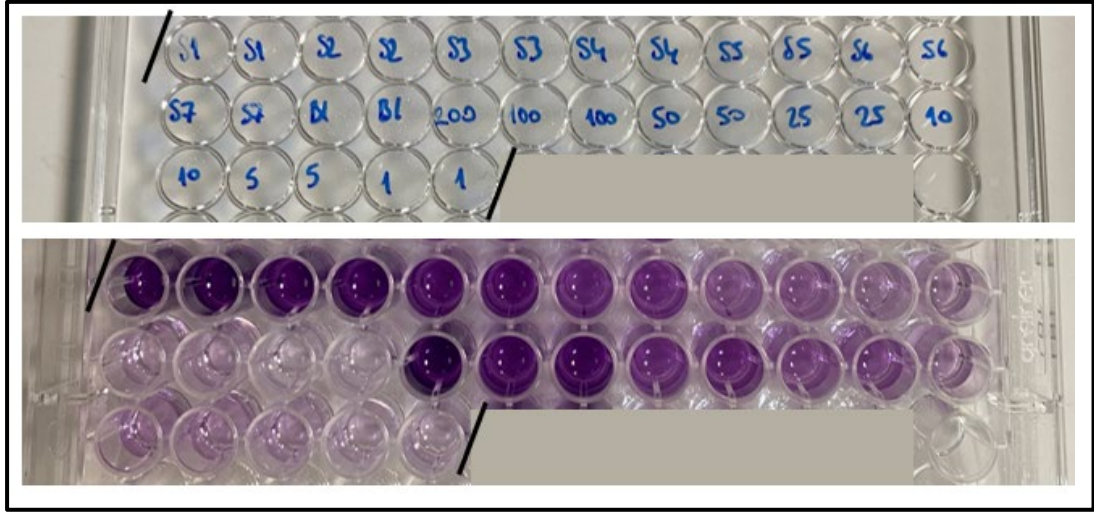
### 4.3. Nivolumab için *In Vitro* Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu

#### 4.3.1. Fragmente Nivolumab için Miktar Tayini Geliştirilmesi

Tez kapsamında öncelikle fragmente nivolumab kullanılmış, ancak ileri çalışmalarda fragmantasyonun immün yanıtta yetersiz kaldığı belirlenmiş ve bu sebeple bütün antikorla çalışmalara devam edilmiştir. Nivolumabın fragmente formu için BCA, bütün formu için ELISA miktar tayini yöntemleri geliştirilmiştir.

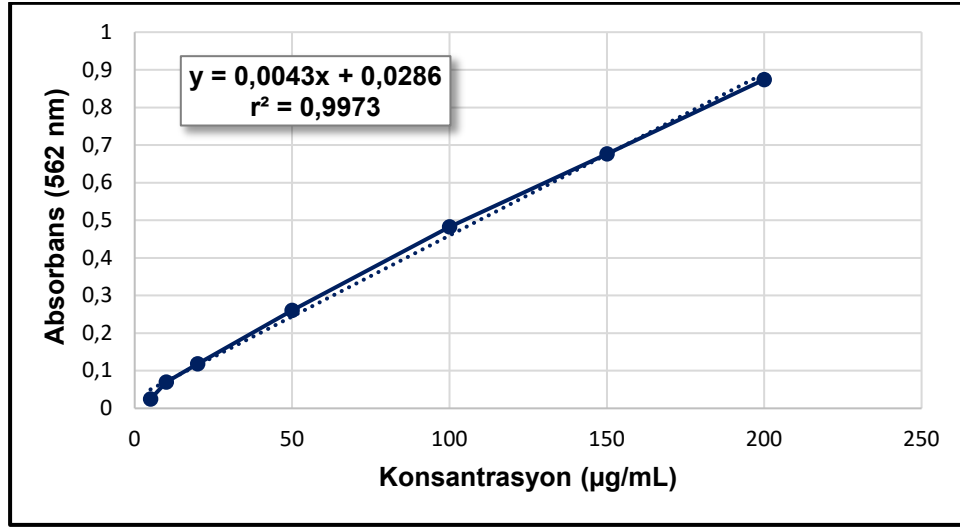
### Bikinkoninik Asit (BCA) Yöntemi ile Miktar Tayini Geliştirilmesi

Protein yapıları için hassas bir miktar tayin yöntemi olan BCA yöntemi ile BSA ve fragmante nivolumabın nicel analizi gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonrası farklı kuyucuklarda farklı yoğunlukta mor renk oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.7.). ELISA plaka okuyucu ile 562 nm’de okuma yapılarak absorbans değerleri elde edilmiştir.

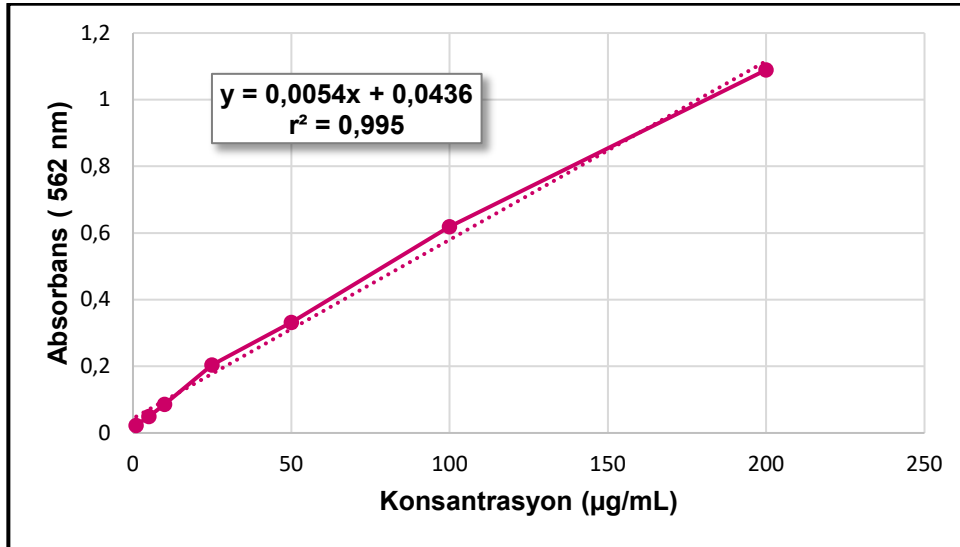


**Şekil 4.7.** BSA ve fragmante nivolumabın farklı konsantrasyonlardaki standart/numunelerine ilişkin BCA analizi plaka görüntüsü (S:BSA standartı, B:Blank, 200-1 değerleri: Fragmante nivolumab numune konsantrasyonlarını ( $\mu\text{g/mL}$ ) temsil etmektedir.)

Plaka okuyucu ile elde edilen blank (analiz tamponu) değerleri absorbans değerlerinden çıkartıldıktan sonra deney sonuçlarının ortalaması alınmış ve konsantrasyon değerlerine karşı grafiğe geçirilmiştir. BSA ve fragmante nivolumab için kalibrasyon doğrusu çizilmiş, doğruya ilişkin denklemler ve  $r^2$  değerleri Şekil 4.8. ve 4.9.’da verilmiştir.



Şekil 4.8. BSA standartları için BCA tayini sonucu elde edilen kalibrasyon doğrusu.

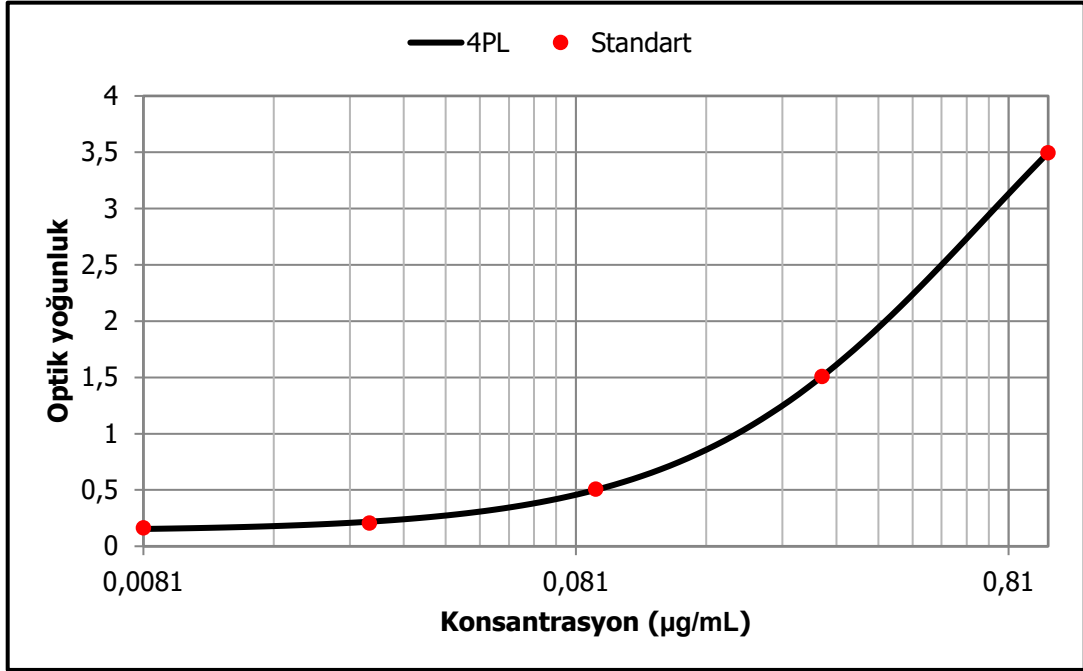


Şekil 4.9. Fragmente nivolumab standartları için BCA tayini sonucu elde edilen kalibrasyon doğrusu.

BSA ve fragmente nivolumaba ilişkin kalibrasyon doğruları incelendiğinde, korelasyon katsayıları ( $r^2$ ) 1'e oldukça yakın bulunmuştur. BCA kitinde BSA ile elde edilen kalibrasyon doğrusu bilinmeyen numune analizlerinde kullanılabilir ancak fragmente nivolumab ile elde edilen doğrunun da yüksek doğrusallığa sahip olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak fragmente antikor miktar tayini amacıyla BCA yönteminin kullanılmasına karar verilmiştir.

### 4.3.2. Nivolumab için Miktar Tayini Geliştirilmesi

Nivolumaba spesifik kit protokolü dikkate alınarak gerçekleştirilen ELISA analizi sonucunda elde edilen optik yoğunluk değerleri ile kalibrasyon eğrisi (Şekil 4.10.) oluşturulmuş, eğriye ilişkin denklem değerleri Tablo 4.5.'te verilmiştir.



Şekil 4.10. ELISA analizine ilişkin kalibrasyon eğrisi.

Tablo 4.5. Nivolumab 4PL kalibrasyon eğrisine ilişkin değerler.

Parametre	Sonuç
a (analiz ile elde edilecek en düşük değer)	0,14
b (analiz ile elde edilecek en yüksek değer)	1,28
c (bükülme noktası - S şeklindeki eğri üzerinde a ve d'nin ortasındaki nokta)	0,72
d (eğrinin eğimi)	5,70
MSE (ortalama kare hatası)	0,00005
$r^2$ (korelasyon katsayısı)	1
SS (Hataların karelerinin toplamı, varyans)	0,0003
SYX (Hataların standart sapması)	0,016

#### 4.4. Küresel ve Farklı Şekli PLGA Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu

İlk olarak küresel nanopartiküller çift emülsifikasyon/çözücü buharlaştırma yöntemiyle başarılı bir şekilde üretilmiş ve farklı şekillerdeki PLGA nanopartiküller, daha önce gereç ve yöntem bölümü 3.2.4.'te açıklandığı şekilde film germe yöntemiyle (n=3) hazırlanmıştır.

##### 4.4.1. Partikül Boyutu, Polidispersite İndeksi ve Zeta Potansiyelin Değerlendirilmesi

Çift emülsifikasyon/çözücü buharlaştırma yöntemi ile, yöntem bölümünde anlatıldığı şekilde hazırlanan boş ve kombine etkin madde yüklü (galunisertib ve nivolumab) nanopartiküllerin partikül boyutu, polidispersite indeksi (PDI) ve zeta potansiyel değerleri Tablo 4.6.'da verilmiştir. Analizler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve sonuçlar ortalama  $\pm$  SS olarak verilmiştir.

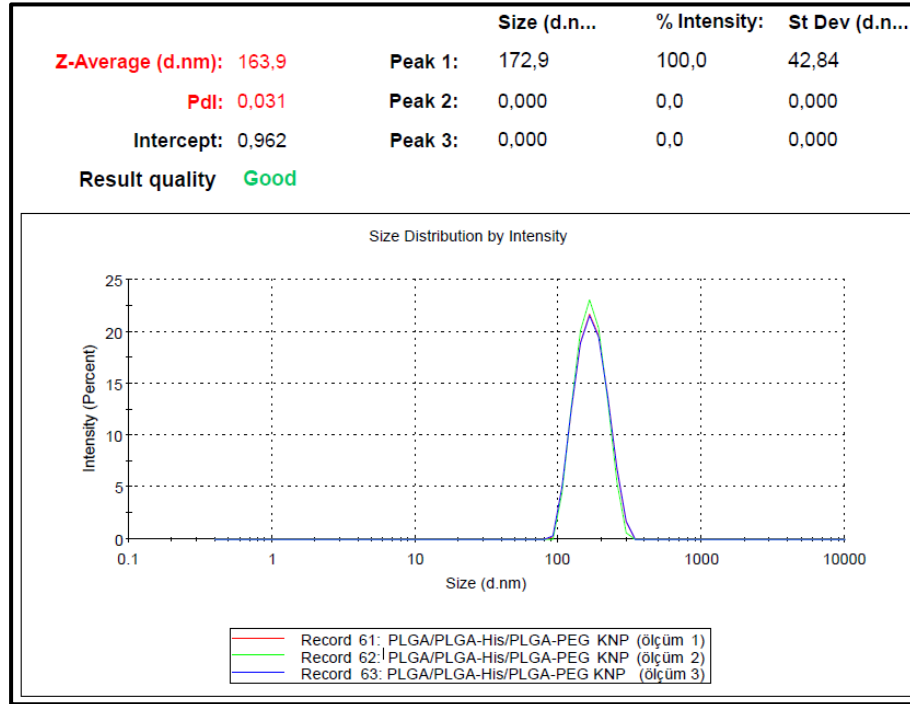
**Tablo 4.6.** Farklı geometrik şekillerdeki boş ve etkin madde yüklü nanopartiküllere ilişkin partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri.

Formülasyon Kodu	Partikül Boyutu (nm)	En-boy oranı*	Polidispersite İndeksi (PDI)	Zeta Potansiyel (mV)
PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG KNP	163,2 $\pm$ 0,70	1	0,04 $\pm$ 0,01	-18,3 $\pm$ 0,36
PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG ÇNP	375,3 $\pm$ 3,55	4,0 $\pm$ 0,5	0,11 $\pm$ 0,03	-0,62 $\pm$ -0,03
PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG EDNP	294,3 $\pm$ 1,60	7,5 $\pm$ 0,5	0,22 $\pm$ 0,01	-12,9 $\pm$ 0,70
PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-G-NF(ab') <sub>2</sub> KNP	184,2 $\pm$ 2,11	-	0,06 $\pm$ 0,02	-15,1 $\pm$ 0,36
PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-G-NF(ab') <sub>2</sub> ÇNP	403,8 $\pm$ 23,17	-	0,37 $\pm$ 0,01	-0,31 $\pm$ 0,08
PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-G-NF(ab') <sub>2</sub> EDNP	312,9 $\pm$ 5,40	-	0,08 $\pm$ 0,03	-12,2 $\pm$ 0,40

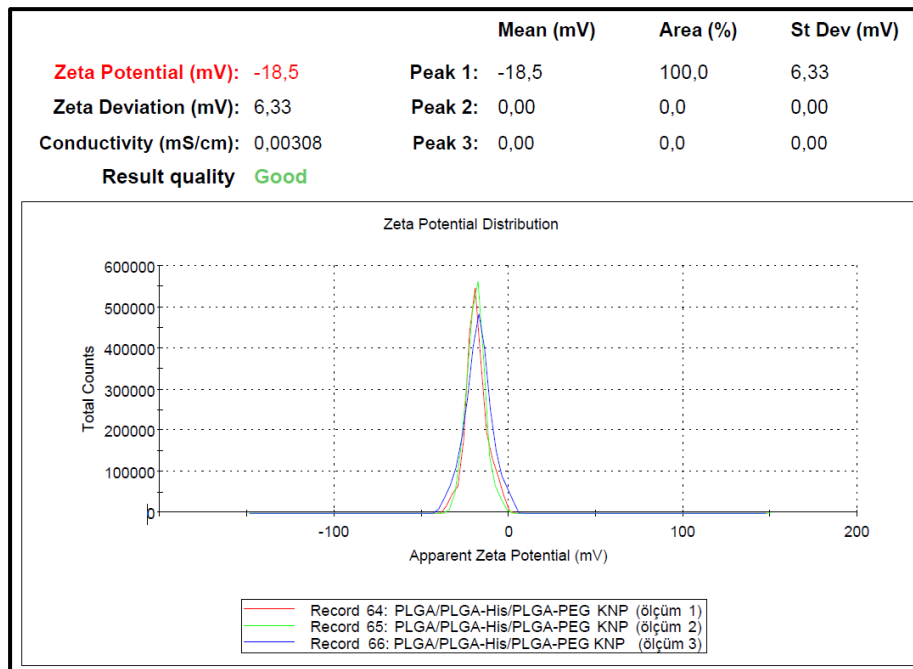
\* En-boy oranı TEM görüntülerinden elde edilmiştir.

Tablo 4.6. incelendiğinde küresel nanopartiküllere kıyasla daha büyük ve farklı boyutlarda çubuk ve eliptik disk şeklinde olduğu varsayılan nanopartiküller tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ). Nanopartiküllerdeki şekil değişimini doğrulamak amacıyla ek

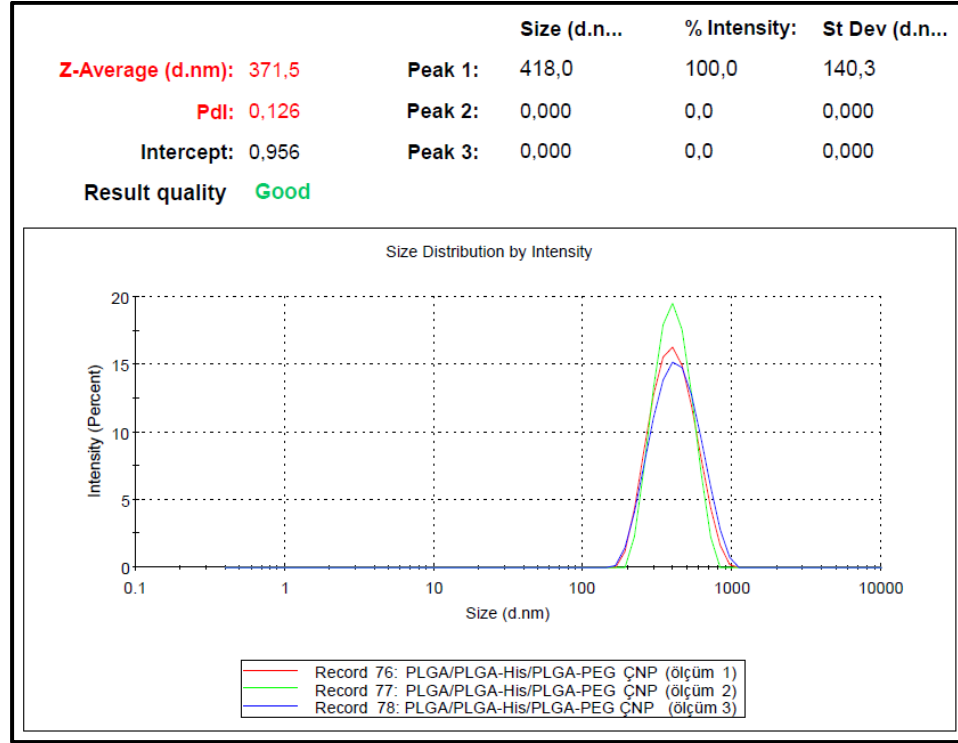
olarak TEM analizi gerçekleştirilmiştir. Tablo 4.6.'da sonuçları verilen boş nanopartikül analizlerine ilişkin ayrıntılı bilgileri içeren Nano ZS grafikleri Şekil 4.11.-4.16.'da yer almaktadır.



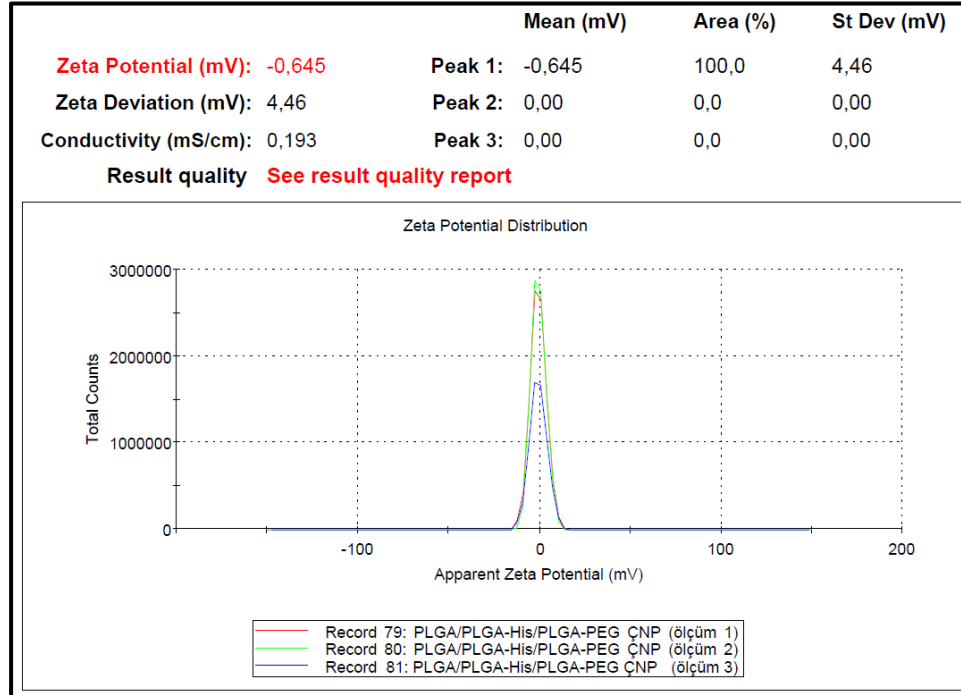
Şekil 4.11. PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG KNP'ye ilişkin partikül boyutu ve polidispersite indeksi.



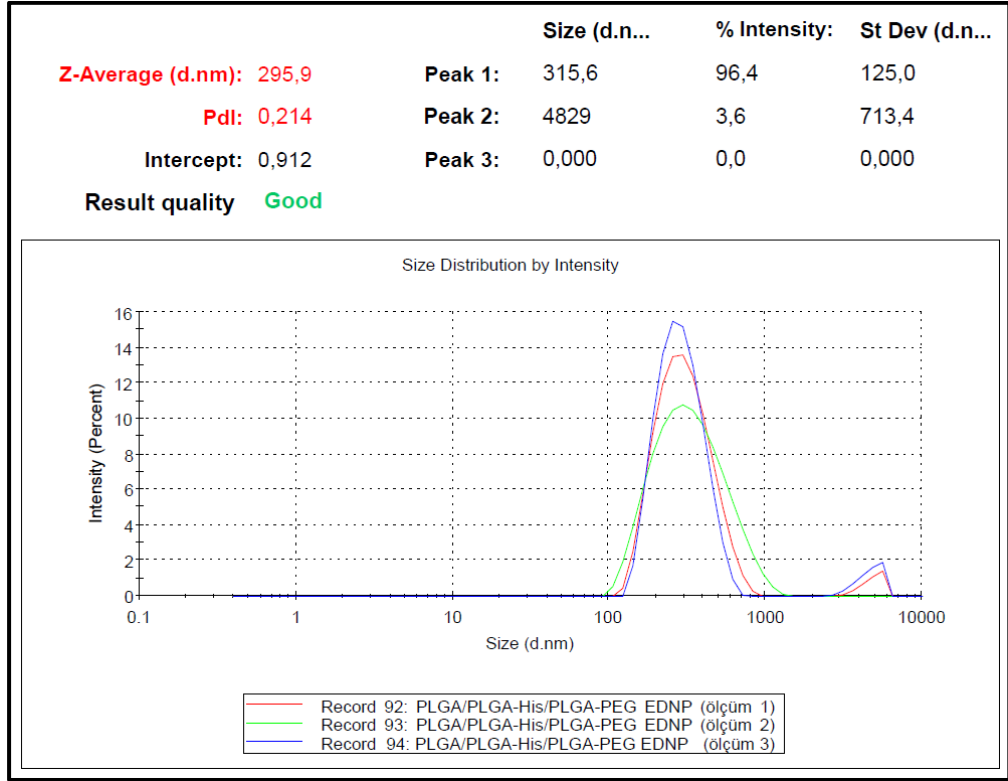
Şekil 4.12. PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG KNP'ye ilişkin zeta potansiyel dağılımı.



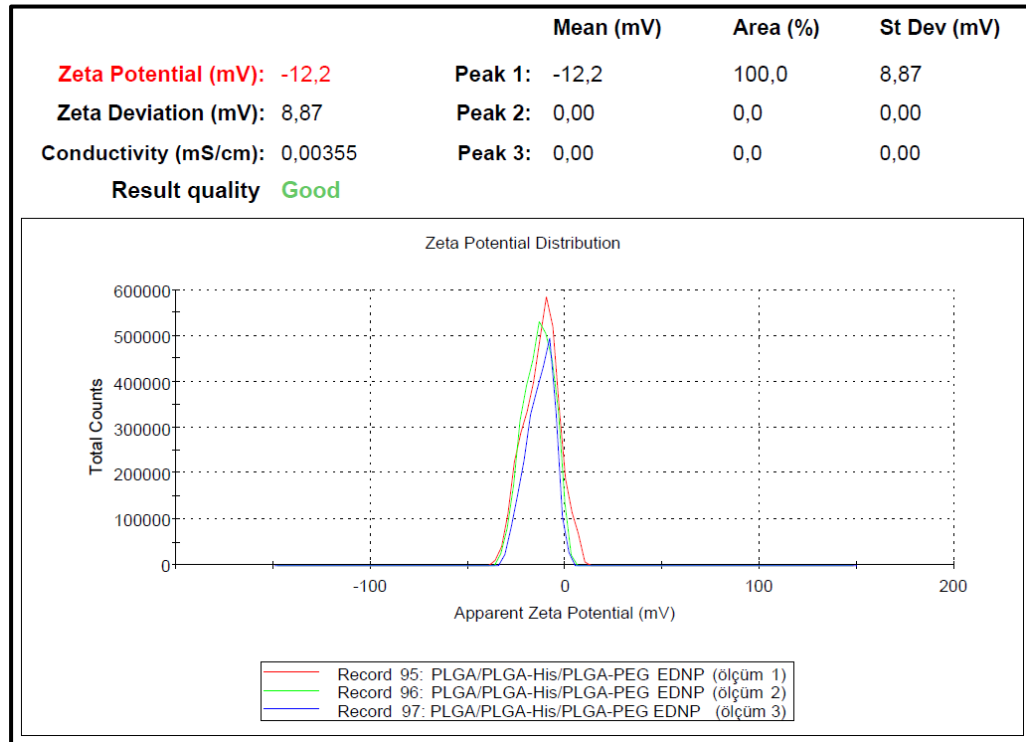
Şekil 4.13. PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG ÇNP'ye ilişkin partikül boyutu ve polidispersite indeksi.



Şekil 4.14. PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG ÇNP'ye ilişkin zeta potansiyel dağılımı.



Şekil 4.15. PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG EDNP'ye ilişkin partikül boyutu ve polidispersite indeksi.



Şekil 4.16. PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG EDNP'ye ilişkin zeta potansiyel dağılımı.

Nano ZS sonuçları incelendiğinde, boş ve kombine etkin madde yüklü küresel nanopartiküllerin hem aktif hem de pasif hedefleme için uygun boyutlara sahip olduğu görülmektedir (100, 242). En düşük polidispersite indeksi küresel nanopartiküllerde elde edilirken, şekil değişimi yapılan nanopartiküllerde çoklu santrifüj işlemi dolayısıyla PDI değerlerinde kabul sınırları ( $PDI < 0,2$  (243)) içinde bir artış gözlenmiştir. Hem boş hem de kombine etkin madde yüklü nanopartiküller için en yüksek mutlak zeta potansiyeli, küresel nanopartiküllerde gözlenmiştir.

#### 4.4.2. Enkapsülasyon Etkinliği ve Yükleme Kapasitesinin Değerlendirilmesi

Farklı şekillerdeki PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-G-N nanopartiküllerinin enkapsülasyon etkinlikleri indirekt yöntem ile değerlendirilmiş ve sonuçlar Tablo 4.7.'de verilmiştir.

**Tablo 4.7.** Farklı geometrik şekillerdeki nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinlikleri ve yükleme kapasitelerinin değerlendirilmesi.

Formülasyon	Galunisertib		Nivolumab	
	EE* (%)	YK** (%)	EE (%)	YK (%)
PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-G-N <sub>F(ab')<sub>2</sub></sub> KNP	9,59 ± 0,29	0,76 ± 0,02	59,20 ± 2,31	0,23 ± 0,01
PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-G-N <sub>F(ab')<sub>2</sub></sub> ÇNP	9,09 ± 0,42	0,72 ± 0,03	56,21 ± 1,57	0,22 ± 0,01
PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-G-N <sub>F(ab')<sub>2</sub></sub> EDNP	9,08 ± 0,47	0,71 ± 0,03	56,03 ± 1,77	0,22 ± 0,01

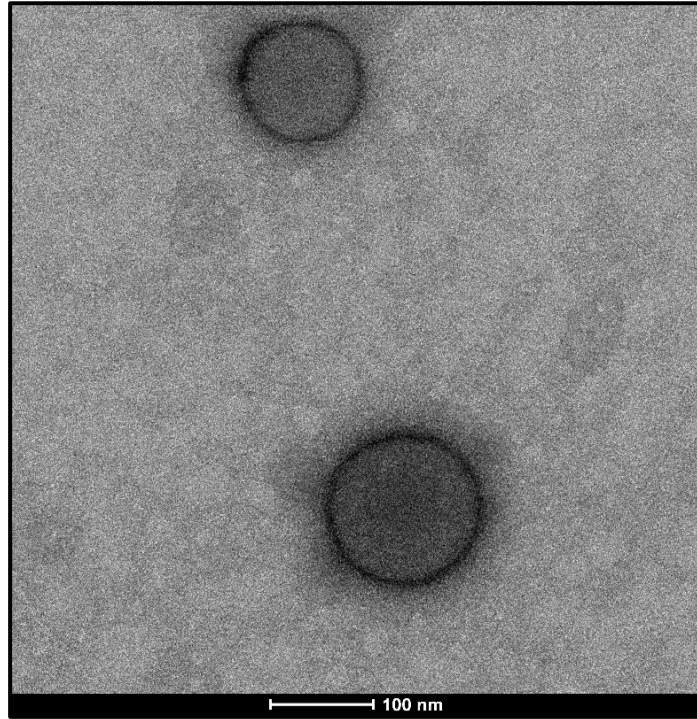
\*EE: Enkapsülasyon etkinliği, \*\*YK: Yükleme kapasitesi.

Tezin ilk aşamalarında, PLGA temelli nanopartiküllere yüklü galunisertibin enkapsülasyon etkinliği (% 4,38) düşük bulunmuştur. Nanosistemlere birden fazla etkin maddenin yüklenmesi durumunda, benzer yükleme etkinliği kayıpları gözlenebilmektedir (244). Galunisertibin nanopartiküllere etkin ve verimli bir şekilde yüklenebilmesi için çeşitli stratejiler denenmiş (formülasyona eklenen galunisertib miktarının artırılması, nanopartiküllerin üretim aşamasında ultrasonik karıştırıcı yerine yüksek hızlı homojenizatör kullanılması, farklı organik çözücülerde galunisertibin çözülmesi vb.), sonuç olarak formülasyonda galunisertibin çözündüğü

organik faz bileşimi değiştirilmiştir. Bu denemeler sonucunda, küresel nanopartiküller için % 4,38 olan enkapsülasyon etkinliği % 9,59'a çıkarılarak yaklaşık iki kat artırılmıştır. Her iki madde için yükleme kapasiteleri de incelenmiş ve sonuçlar Tablo 4.7.'de verilmiştir. Üç şekil için de benzer enkapsülasyon etkinlikleri ve yükleme kapasiteleri gözlenmiştir ( $p>0,05$ ).

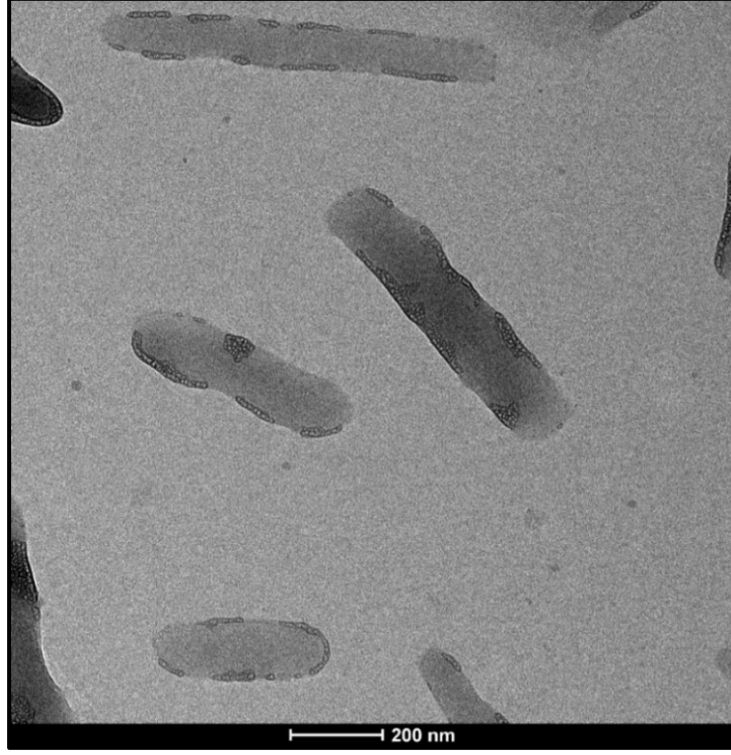
#### 4.4.3. Farklı Geometrik Şekillerdeki Nanopartiküllerin Morfolojik Özelliklerinin Değerlendirilmesi

Malvern Nanoziser ZS ile gerçekleştirilen karakterizasyon çalışmalarının devamında, şekil değişiminin doğrulanması amacıyla boş nanopartiküllerin TEM analizi ile görüntülenmesi gerçekleştirilmiştir. Çift emülsifikasyon/çözücü buharlaştırma yöntemi ile üretilen nanopartiküllerin küresele yakın homojen bir görünüme sahip olduğu Şekil 4.17.'de görülmektedir.

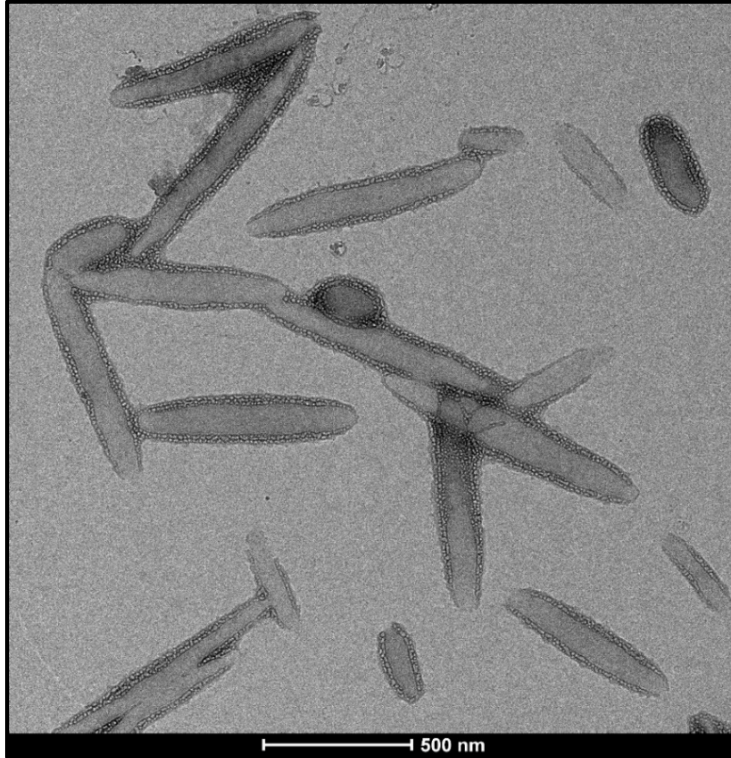


**Şekil 4.17.** PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG KNP'ye ilişkin TEM analiz görüntüsü.

Isıtma ile yapılan germe işlemi sonrası Nano ZS ile yapılan ölçümlerde şekil değişikliğine işaret eden, küresel NP'lere kıyasla daha büyük partikül boyutları elde edilmiş, bu nanopartiküller için TEM analizi yapıldığında çubuk ve eliptik disk şeklinin başarıyla üretildiği doğrulanmıştır (Şekil 4.18. ve 4.19.).



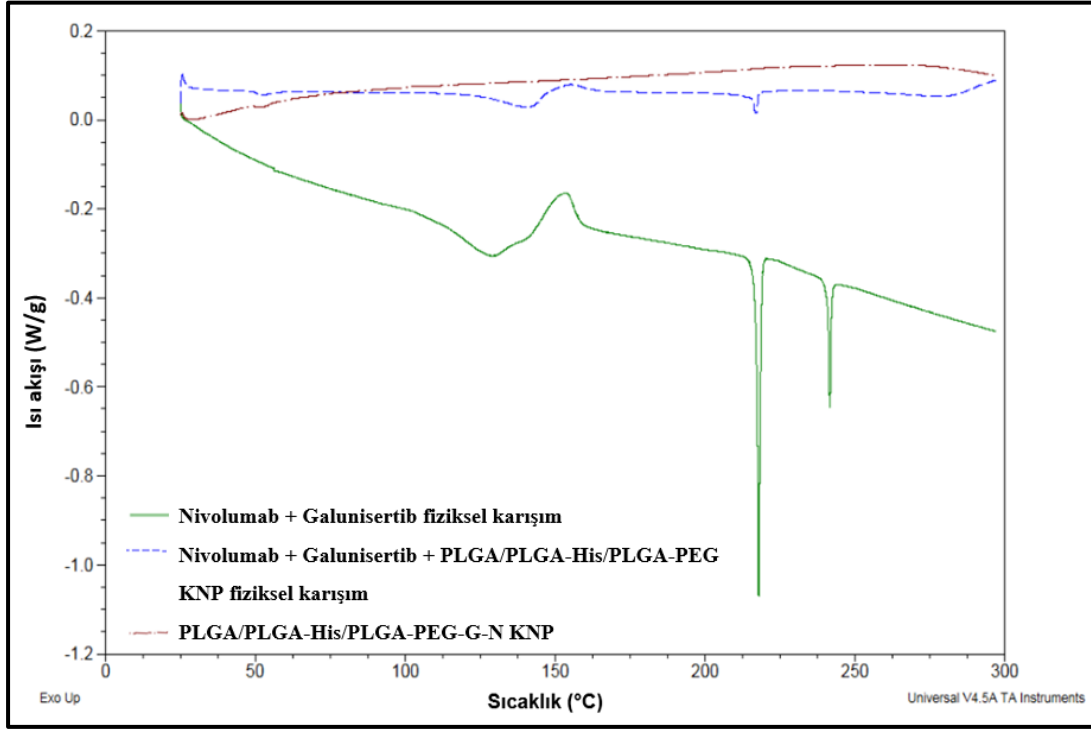
**Şekil 4.18.** PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG ÇNP'ye ilişkin TEM analiz görüntüsü.



**Şekil 4.19.** PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG EDNP'ye ilişkin TEM analiz görüntüsü.

#### 4.4.4. Termal Özelliklerin Değerlendirilmesi

Galunisertib, nivolumab F(ab')<sub>2</sub> fragmanı, boş nanopartikül, galunisertib ve nivolumab F(ab')<sub>2</sub> fragmanı yüklü nanopartiküllerin fiziksel karışımlarını içeren DSC termogramları Şekil 4.20.'de sunulmuştur.



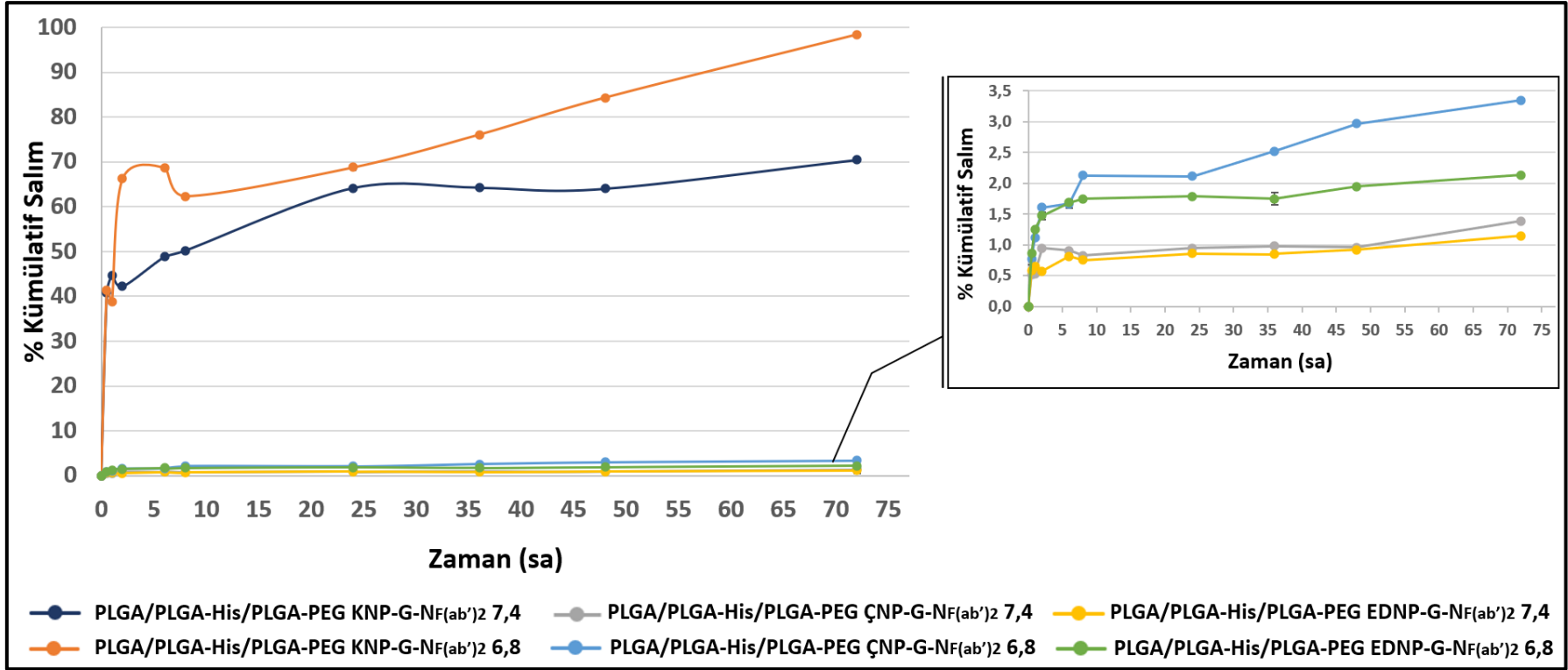
**Şekil 4.20.** Etken maddelerin fiziksel karışımı, etken maddeler ve boş nanopartiküllerin fiziksel karışımı ve kombine etkin madde yüklü PLGA nanopartiküllerine ilişkin DSC termogramları.

Etken maddelerin fiziksel karışımında (yeşil), 218,22 °C'de nivolumab fragmanına ilişkin pik, 241,0 °C'de (245) galunisertibe ilişkin termogram piki görülmektedir. Yapısında ağırlıklı olarak PLGA bulunan PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG polimerinin camsı geçiş sıcaklığının 40-60 °C arasında olduğu bilinmektedir (88, 246). Mavi ve kırmızı renkli termogramlardaki 50 °C bölgesinde gözlenen pikin, PLGA'nın camsı geçiş sıcaklığına ilişkin olduğu düşünülmektedir. Boş PLGA nanopartikülleri ile etken maddelerin fiziksel karışımını içeren numuneye ilişkin termogram incelendiğinde (mavi), nanopartikül oranına kıyasla numune içerisinde az miktarda kalan etken maddelere ilişkin erime piklerini görmek zorlaşmış, buna rağmen nivolumab piki ve galunisertibin yapısında bulunan (monohidrat) suyun buharlaşma piki (~130-135 °C) gözlenmiştir. Kombine etkin madde yüklü nanopartikül

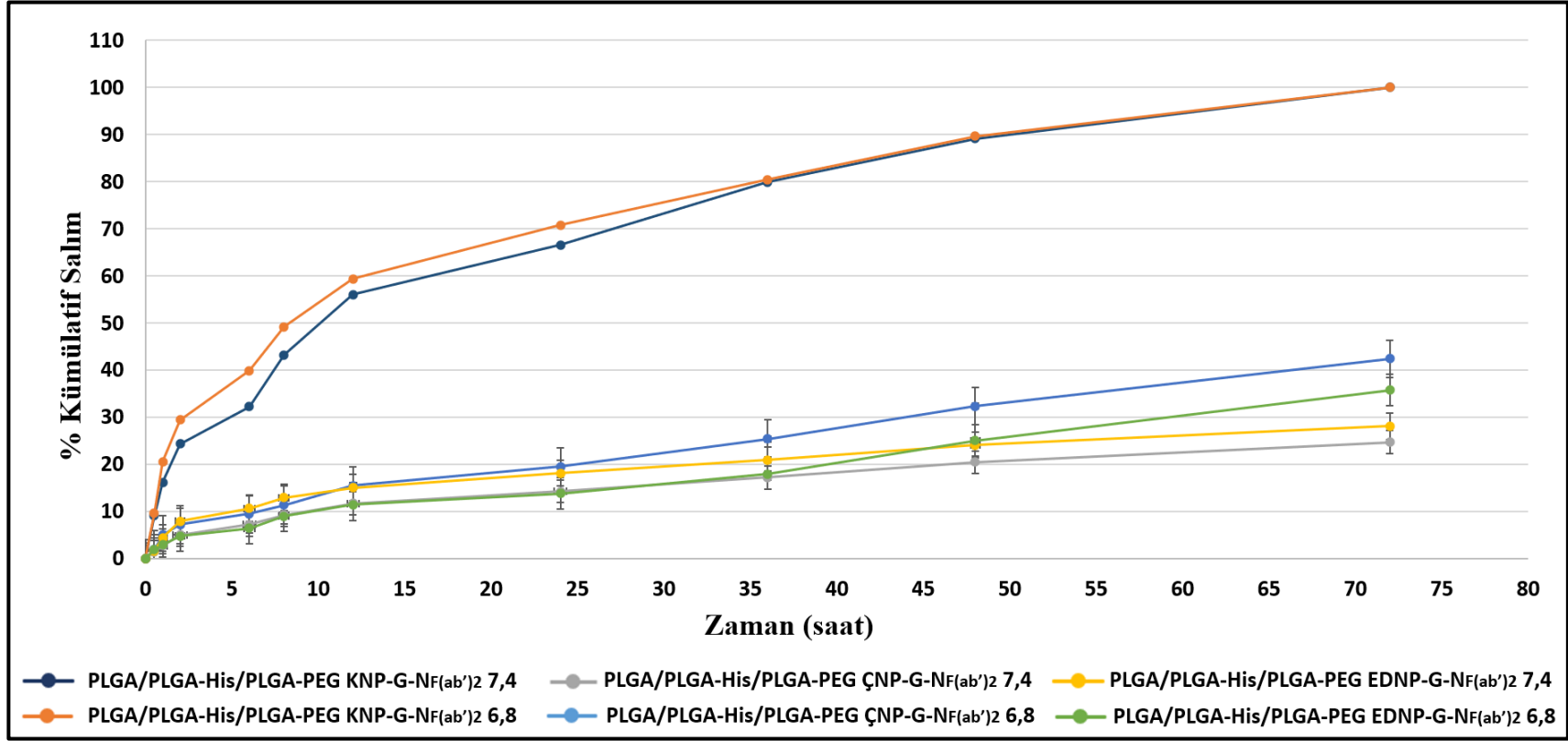
numunesine ilişkin termogram incelendiğinde, etkin maddeler nanopartiküle yüklendiği için etkin maddelere ilişkin erime pikleri kaybolmuştur. Sonuç olarak, DSC analizi ile etkin maddelerin nanopartikül içine başarı ile enkapsüle edildiği doğrulanmıştır.

#### **4.4.5. Farklı Şekildeki Nanopartiküllerden Etkin Madde Salımının Değerlendirilmesi**

Gereç ve yöntem bölümü 3.2.5'te anlatıldığı üzere, etkin maddelerin kombine halde yüklendiği nanopartiküllerin, tüp yöntemi ile pH 6,8 ve pH 7,4 olarak iki farklı ortamda 72 saatlik salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Galunisertib için HPLC ile elde edilen sonuçlar Şekil 4.21.'de, fragmante nivolumab için BCA yöntemleri ile elde edilen sonuçlar Şekil 4.22.'de sunulmuştur.



Şekil 4.21. Farklı şekillerdeki PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-G-NF(ab')<sub>2</sub> nanopartiküllerinden galunisertibin *in vitro* salım profili (Standart sapma değerleri grafikler üzerine eklenmiş olup, değerlerin küçük (<% 2) olması nedeniyle grafik üzerinde fark edilememektedir.).

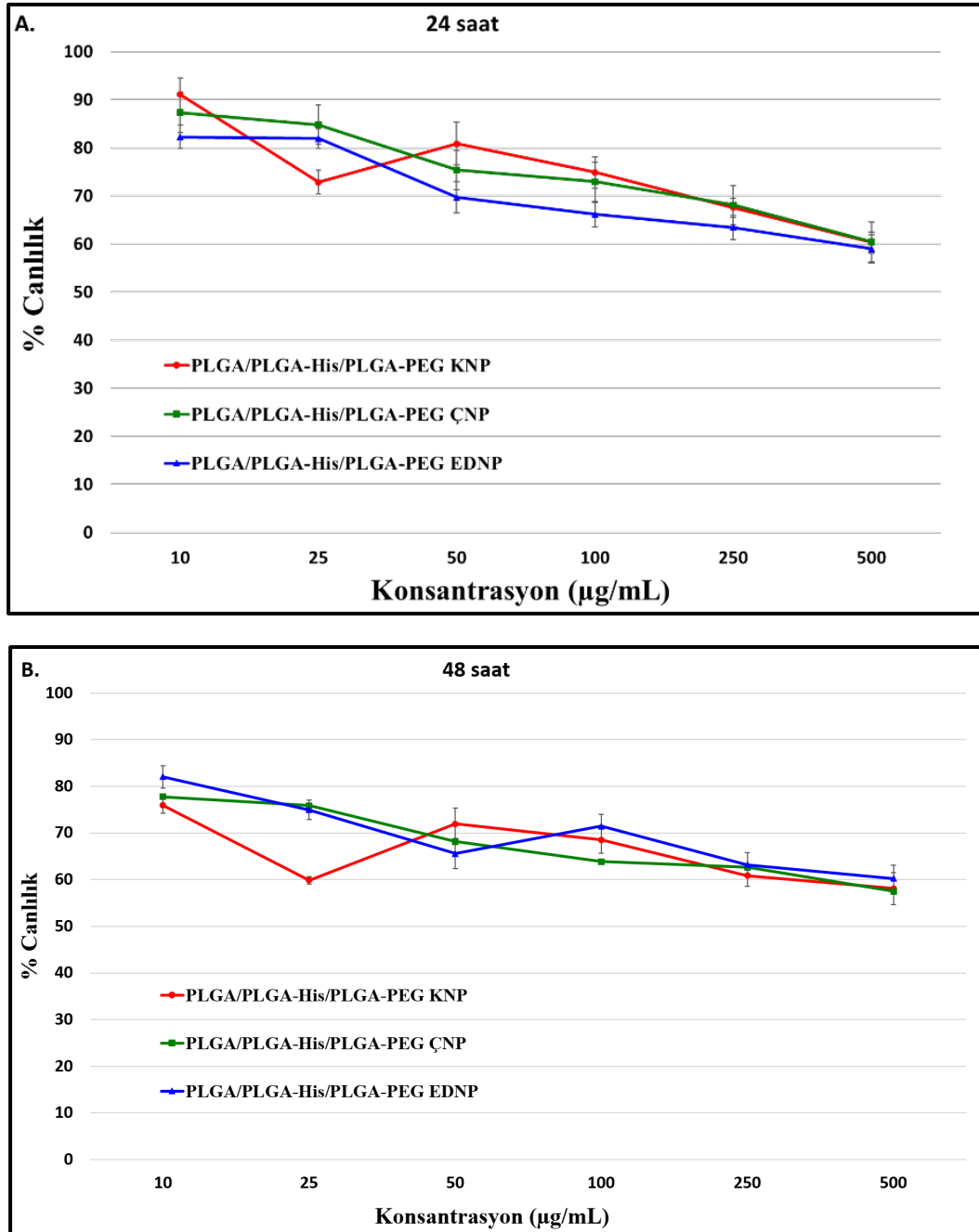


Şekil 4.22. Farklı şekillerdeki PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-G-NF(ab')<sub>2</sub> nanopartiküllerinden nivolumabın *in vitro* salım profili.

Salım çalışması sonucu elde edilen profiller değerlendirildiğinde, her iki pH için küresel nanopartiküllerden iki etkin maddenin de % 50'si ilk 10 saatte salınmıştır. Küresel nanopartiküllere yüklenen galunisertibin tamamı pH 6,8 ortamında 72. saatte salınırken, 7,4 ortamında yaklaşık % 70 salım gözlenmiştir. Nivolumab salımının tüm şekiller için 72 saate kadar devam ettiği, küresel nanopartiküllerde % 100'e ulaştığı görülmektedir.

#### 4.5. Farklı Şekillerdeki Nanopartiküllerin *İn Vitro* Toksisitesinin Değerlendirilmesi

Gereç ve yöntem bölümü 3.2.6.'da belirtildiği üzere gerçekleştirilen MTT analizi sonucu elde edilen % canlılık değerlerine ilişkin grafikler Şekil 4.23.'te verilmektedir.

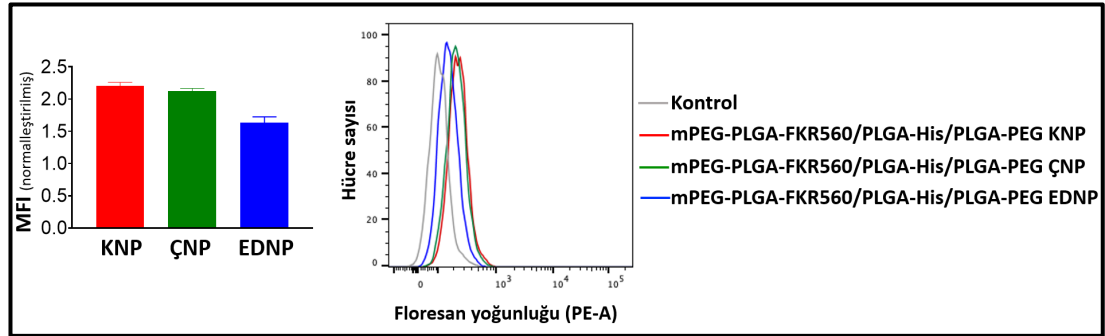


Şekil 4.23. Farklı şekillerdeki nanopartiküllerle gerçekleştirilen MTT testine ilişkin % canlılık sonuçları (A. 24 sa; B. 48 sa).

Şekil 4.23.-A'daki hücre canlılıkları incelendiğinde, uygulanan nanopartikül konsantrasyonunun artışına bağlı olarak KNP için % 91,09 ile % 60,30, ÇNP için % 87,32 ile % 60,45 ve EDNP için % 82,24 ile % 59,98 arasında bulunmuştur. Süre artışına bağlı olarak canlılık değerlerinde düşüş gözlenmiş ve KNP için % 75,92 ile % 58,12, ÇNP için % 77,77 ile % 57,49 ve EDNP için % 82,04 ile % 60,22 arasında bulunmuştur. 24 ve 48 saat için % canlılık sonuçları ikili gruplar halinde Mann-Whitney U testi ile analiz edilmiş ve gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık olmadığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak, nanopartiküllerin küresel, çubuk veya eliptik disk şeklinde olması, sağlıklı hücreler üzerinde benzer canlılık profili göstermiştir ( $p>0,05$ ).

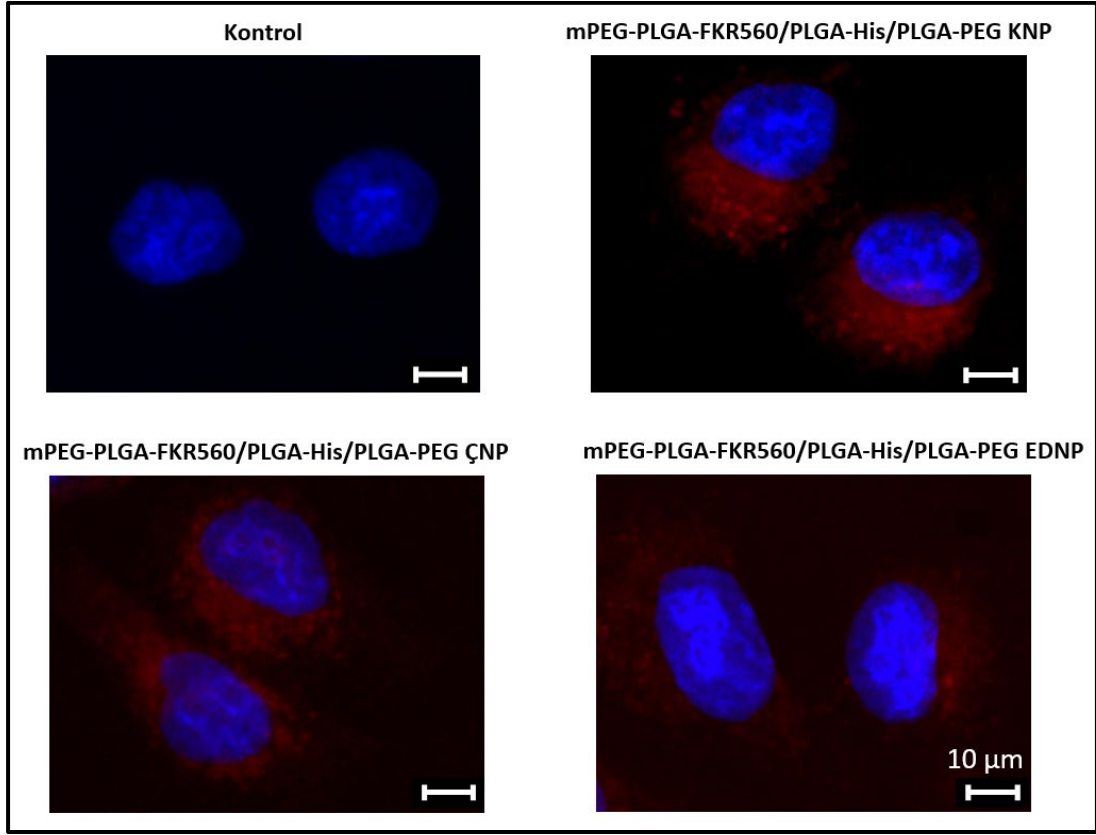
#### 4.6. Farklı Şekillerdeki Nanopartiküllerin Hücre İçine Alımının Değerlendirilmesi

Gereç ve yöntem bölümü 3.2.7.'de bildirildiği üzere, floresan özellikli mPEG-PLGA-FKR560 ile hazırlanan, etkin madde yüklü olmayan üç farklı şekildeki nanopartiküllerin, A549-Luc2 hücre içine alımları değerlendirilmiş ve üç şekil arasında kıyaslama yapılmıştır. Nanopartiküllerden elde edilen MFI değerleri, kontrol grubundan elde edilen MFI değerlerine bölünerek (normalleştirilmiş MFI) Şekil 4.24.'teki grafikte sunulmuştur.



Şekil 4.24. A549-Luc2 hücre içine alım deneyi akım sitometri analiz sonuçları.

Akım sitometri analizi sonucunda elde edilen MFI değerleri incelendiğinde, KNP'nin KHDAK hücrelerine giriş yeteneği ÇNP ve EDNP'ye kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Ayrıca, floresan mikroskop ile görüntüleme yapılarak nanopartiküllerin A549-Luc2 hücrelerine girme yetenekleri kalitatif olarak tayin edilmiştir (Şekil 4.25.).



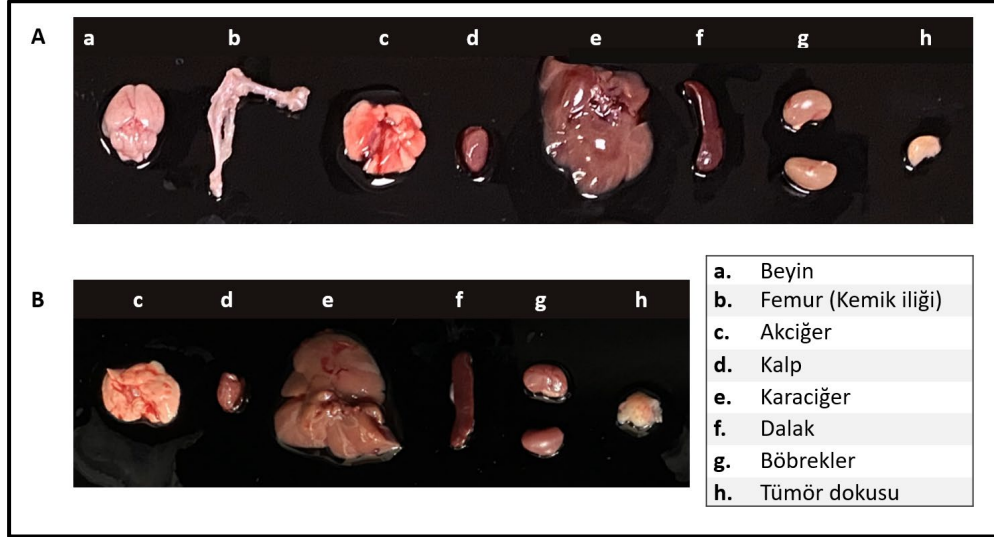
**Şekil 4.25.** A549-Luc2 hücre içine alım deneyi floresan mikroskop sonuçları (Mavi ışığa yanan bölge, hücrelerin çekirdeğini; kırmızı ışığa yanan bölge, hücre içine alınan nanopartikülleri göstermektedir.).

Işıma şiddetleri dikkate alındığında, kontrol grubuna nanopartikül uygulaması yapılmadığı için mavi renkteki çekirdeklerin çevresinde floresan özellikli polimerden kaynaklanan kırmızı renkli bir ışığa gözlenmemiştir. Nanopartiküllerin uygulandığı gruplar için inceleme yapıldığında, KHDAK hücresi içine girme yeteneği, küresel>çubuk>eliptik disk şeklinde sıralanmaktadır. Floresan mikroskopla elde edilen sonuçlar akım sitometri analiz sonuçlarını destekler nitelikte olup, küresel nanopartiküllerin A549-Luc2 hücre içine alım miktarının en yüksek olduğu belirlenmiştir.

#### 4.7. Farklı Geometrik Şekillerdeki Nanopartiküllerin Biyodağılımlarının Değerlendirilmesi

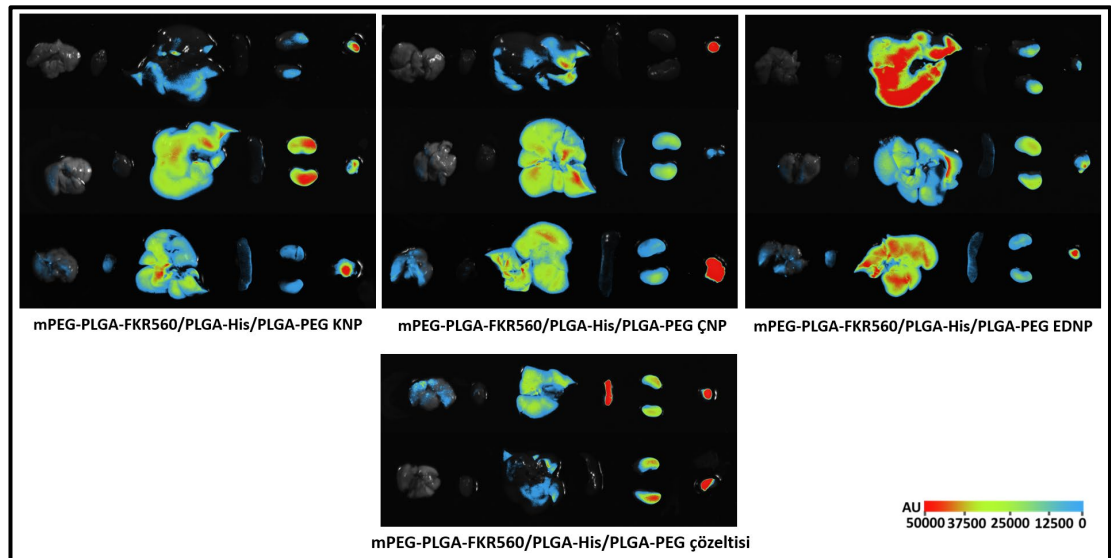
Floresan özellikli polimer kullanarak üç farklı şekilde üretilen boş nanopartiküllerin CD-1 nude farelere uygulanmasını takiben 16. saatte fareler kurban edilmiştir. Farelerin kalp, akciğer, karaciğer, dalak, böbrek, tümör dokusu,

kemik iliği ve beyinleri çıkarılarak serum fizyolojik içerisinde bekletilmiş ve plakaya Şekil 4.26.'daki gibi dizilerek IVIS ile görüntülemeleri yapılmıştır.



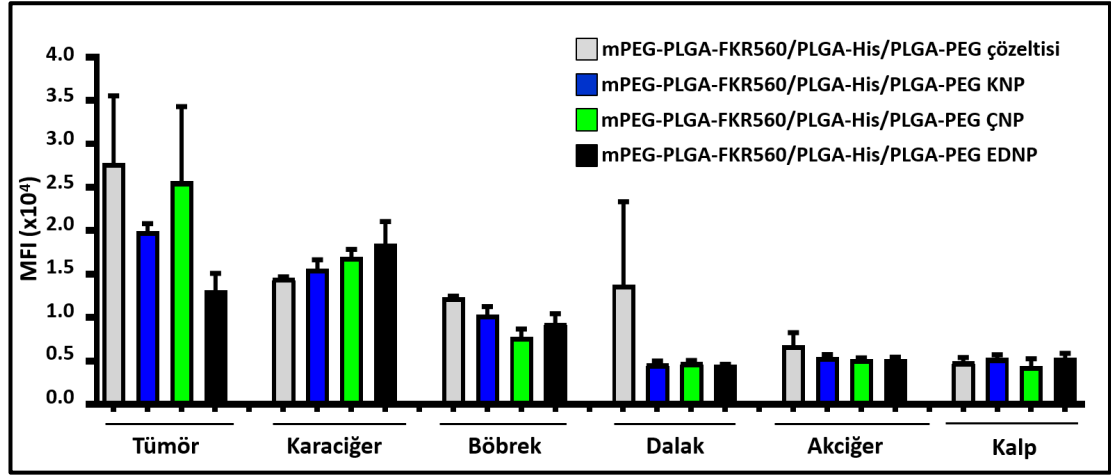
**Şekil 4.26.** IVIS cihazı ile görüntüleme için CD-1 nude farelerden sakrifiye işlemi sonrası elde edilen doku ve organlar: A. Beyin ve kemik iliği çıkarılan ilk grup fareler için temsili görüntü; B. Beyin ve kemik iliği çıkarılmayan ikinci grup fareler için temsili görüntü.

Beyin ve kemik iliği sadece ilk grup farelerden çıkarılmış, görüntüleme sonucu bu organ ve dokularda nanopartiküllere bağlı bir ışımaya görülmediği tespit edilerek kalan farelerin akciğer, kalp, karaciğer, dalak, böbrekler ve tümör dokusu çıkarılarak görüntüleme yapılmıştır (Şekil 4.27.).



**Şekil 4.27.** Sıra ile akciğer, kalp, karaciğer, dalak, böbrekler ve tümör dokusu çıkarılan farelerin IVIS görüntüsü.

IVIS cihazı ile organlardaki ışımaya ortalama floresans yoğunluk (MFI) cinsinden hesaplanmış ve bir grafik halinde sunulmuştur (Şekil 4.28.).



Şekil 4.28. Polimer çözeltisi ve nanopartiküllerin organlardaki biyodağılımı.

Tümör dokusunda birikimin kıyaslanması, ikili gruplar halinde (KNP-ÇNP, KNP-EDNP, ÇNP-EDNP) yapılmış ve çalışılan üç farklı şekildeki PLGA temelli NP'nin, heterotopik KHDAK tümörü geliştirilmiş CD-1 nude farelerde benzer biyodağılım gösterdiği belirlenmiştir ( $p > 0,05$ ).

#### 4.8. Optimum Özelliklere Sahip Nanopartikül Şeklinin Belirlenmesi

Gereç ve yöntem bölümü 3.2.1. – 3.2.8.’deki söz konusu deneylere ilişkin sonuçlar Tablo 4.8.’de birleştirilmiş ve optimum şeklin belirlenmesi amacıyla parametrelerin önem derecelerine göre sistematik değerlendirme yapılmıştır.

**Tablo 4.8.** Farklı şekillerdeki nanopartikül formülasyonlarına ilişkin *in vitro* ve *in vivo* karakterizasyon sonuçları.

NP şekline ilişkin seçim kriterleri	Küresel NP	Çubuk şeklindeki NP	Eliptik disk şeklindeki NP	İstatistiksel değerlendirme*	Tercih edilen NP şekli
<i>Partikül büyüklüğü ve dağılımı (Boş nanopartikül)</i>	163,2 ± 0,70	375,5 ± 3,55	294,3 ± 1,60	KNP-ÇNP, p>0,05 KNP-EDNP, p>0,05 ÇNP-EDNP, p>0,05 KNP-ÇNP-EDNP, p<0,05	Küresel**
<i>Partikül büyüklüğü ve dağılımı (Kombine etkin madde yüklü nanopartikül)</i>	184,2 ± 2,11	403,8 ± 23,17	312,9 ± 5,40	KNP-ÇNP, p>0,05 KNP-EDNP, p>0,05 ÇNP-EDNP, p>0,05 KNP-ÇNP-EDNP, p<0,05	Küresel**
<i>Zeta Potansiyel (Boş nanopartikül)</i>	-18,3 ± 0,36	-0,62 ± -0,03	-12,9 ± 0,70	KNP-ÇNP, p>0,05 KNP-EDNP, p>0,05 ÇNP-EDNP, p>0,05 KNP-ÇNP-EDNP, p<0,05	Küresel***
<i>Zeta Potansiyel (Kombine etkin madde yüklü)</i>	-15,1 ± 0,36	-0,31 ± 0,08	-12,2 ± 0,40	KNP-ÇNP, p>0,05 KNP-EDNP, p>0,05 ÇNP-EDNP, p>0,05 KNP-ÇNP-EDNP, p>0,05	Küresel***

**Tablo 4.8. (Devam)** Farklı şekillerdeki nanopartikül formülasyonlarına ilişkin *in vitro* ve *in vivo* karakterizasyon sonuçları.

NP şekline ilişkin seçim kriterleri	Küresel NP	Çubuk şeklindeki NP	Eliptik disk şeklindeki NP	İstatistiksel değerlendirme*	Tercih edilen NP şekli
<i>Üretim basamakları, verim, maliyet</i>	Az basamak, yüksek verim, düşük maliyet	Çok basamak, düşük verim, yüksek maliyet	Çok basamak, düşük verim, yüksek maliyet	-	Küresel
<i>Enkapsülasyon etkinliği (%) (Galunisertib)</i>	9,59	9,09	9,08	KNP-ÇNP-EDNP, p>0,05	Küresel=Çubuk=Elipitik disk
<i>Enkapsülasyon etkinliği (%) (Nivolumab)</i>	59,20	56,21	56,03	KNP-ÇNP-EDNP, p>0,05	Küresel=Çubuk=Elipitik disk
<i>Galunisertib için in vitro salım****, Ph 7,4 (%)</i>	70,457	1,385	1,148	KNP-ÇNP, p<0,05 KNP-EDNP, p<0,05 ÇNP-EDNP, p> 0,05	Küresel
<i>Galunisertib için in vitro salım, pH 6,8 (%)</i>	98,411	3,351	2,136	KNP-ÇNP, p<0,05 KNP-EDNP, p<0,05 ÇNP-EDNP, p> 0,05	Küresel
<i>Nivolumab için in vitro salım****, pH 7,4</i>	100,000	24,700	28,100	KNP-ÇNP, p<0,05 KNP-EDNP, p<0,05 ÇNP-EDNP, p> 0,05	Küresel
<i>Nivolumab için in vitro salım, pH 6,8</i>	100,000	42,400	35,800	KNP-ÇNP, p<0,05 KNP-EDNP, p<0,05 ÇNP-EDNP, p> 0,05	Küresel

**Tablo 4.8. (Devam)** Farklı şekillerdeki nanopartikül formülasyonlarına ilişkin *in vitro* ve *in vivo* karakterizasyon sonuçları.

NP şekline ilişkin seçim kriterleri	Küresel NP	Çubuk şeklindeki NP	Eliptik disk şeklindeki NP	İstatistiksel değerlendirme*	Tercih edilen NP şekli
<i>Sağlıklı hücreler (L929) üzerine toksisite (24 ve 48 saat sonuçları için)</i>	*****	*****	*****	p>0,05	Küresel=Çubuk=Eliptik disk
<i>İn vivo biyodağılım (MFI, tümör)</i>	7200 ± 381	6629 ± 211	6354,5 ± 908,5	p>0,05	Küresel=Çubuk=Eliptik disk
<i>Hücre içine alım - akım sitometrisi</i>	2,206 ± 0,043	2,121 ± 0,037	1,632 ± 0,076	KNP-ÇNP, p>0,05 KNP-EDNP, p>0,05 ÇNP-EDNP, p>0,05 KNP-ÇNP-EDNP, p<0,05	Küresel=Çubuk=Eliptik disk
<i>Hücre içine alım – mikroskop ile inceleme</i>	-	-	-	Sonuçlar kalitatif olduğu için istatistiksel bir kıyaslama yapılamamaktadır.	Küresel=Çubuk=Eliptik disk

\* Serilerin ikili gruplar halinde kıyaslaması (küresel-çubuk, küresel-eliptik disk ve çubuk-eliptik disk) Mann-Whitney U testi ile, üçlü gruplar halinde kıyaslaması Kruskal-Wallis analizi ile yapılmıştır.

\*\*Partikül boyutunun 200 nm altında olması pasif hedefleme için istenilen bir durumdur. Küresel nanopartiküller bu şartı sağlamaktadır.

\*\*\*Zeta potansiyelin mutlak değerinin yüksek olması, dispersiyon ortamı içerisinde aynı yüklü partiküllerin birbirini iterek agregasyonun önüne geçilmesi açısından önemlidir. Üç şekil kıyaslandığı zaman, en stabil şekil küresel nanopartiküller olarak görünmektedir.

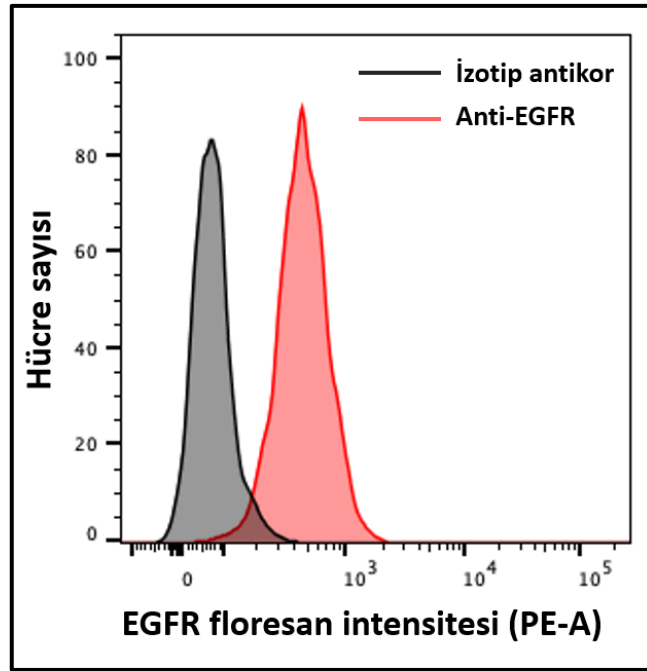
\*\*\*\**In vitro* salım analizinde on farklı zaman noktası için elde edilen sonuçlar ikili gruplar halinde kıyaslanmıştır.

\*\*\*\*\*Deneyde çalışılan altı farklı konsantrasyon ve iki farklı zaman noktası için elde edilen sonuçlar ikili gruplar şeklinde (KNP-ÇNP vb.) kıyaslanmıştır.

Sonuç olarak, farklı şekillerde nanopartiküller için elde edilen tüm deney sonuçları ve Tablo 4.8. incelendiğinde, tezin sonraki aşamaları için optimum özelliklere sahip olduğuna karar verilen nanopartikül şekli küresel olarak belirlenmiş ve sonraki aşamada planlanan deneyler küresel nanopartiküller dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir.

#### 4.9. A549 Hücrelerinde Epidermal Büyüme Faktörü Reseptör (EGFR) Ekspresyonunun Gösterilmesi

Gereç ve yöntem bölümü 3.2.10. başlığı altında anlatıldığı şekilde yürütülen deney prosedürüne göre, tez kapsamında çalışılan insan KHDAK hücrelerinin (A549-Luc2) yüzeyinde bulunan EGFR'nin, hangi oranda eksprese/ifade edildiği, akım sitometri analizi ile tespit edilmiş ve analiz sonuçları Şekil 4.29.'da histogram grafiği şeklinde sunulmuştur. Grafikte, izotip antikorun verdiği floresan intensite değeri negatif olarak işaretlenerek (hücrelerden kaynaklanan spesifik olmayan ışımaya), anti-EGFR antikorunun pozitif olduğu alan okunmuş ve EGF reseptörünün pozitiflik oranı % 93,6±0,4 olarak bulunmuştur.

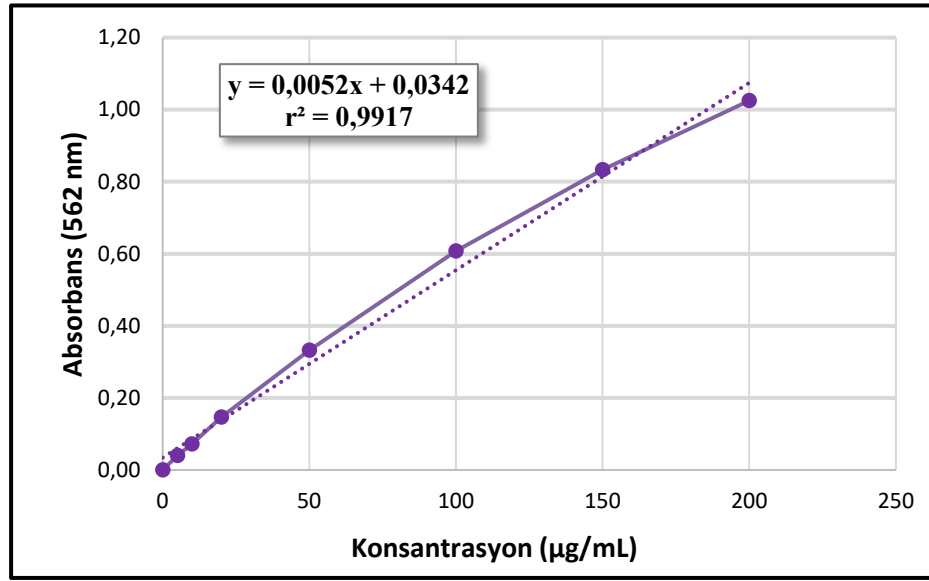


Şekil 4.29. A549-Luc2 hücrelerinde EGFR ekspresyon düzeyini gösteren akım sitometri görüntüsü.

## 4.10. Ligand Konjugasyonunun Değerlendirilmesi ve Konjuge Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

### 4.10.1. Ligand Konjugasyonunun Doğrulanması

Yapısındaki amin grubu (-NH<sub>2</sub>), Traut's reaktifi ile tiyol grubuna (-SH) dönüştürülen anti-EGFR'ın PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG KNP'lere konjugasyonu sağlanmıştır. Konjugasyon etkinliği, BCA analizi ile hesaplanmıştır. Hesaplamalarda kullanılan BCA kalibrasyon doğrusu ve denklemi, farklı konsantrasyonlardaki BSA standart çözeltilerinden hareketle elde edilmiş ve Şekil 4.30.'da sunulmuştur.



Şekil 4.30. BCA testi ile protein miktar tayinininde kullanılan kalibrasyon doğrusu ve denklemi.

Konjugasyon işlemi sonrası nanopartikül süpernatantları ile gerçekleştirilen BCA analizine ilişkin sonuçlar, ELISA plaka okuyucu ile 562 nm'de okuma yapılarak elde edilmiştir. Konjugasyon yapılmayan nanopartiküllerden elde edilen konsantrasyonlar, konjuge nanopartiküllerden elde edilen konsantrasyonlardan çıkarılarak NP'lere konjuge olmayan serbest anti-EGFR miktarı hesaplanmıştır (Tablo 4.9.).

**Tablo 4.9.** Konjugasyonun doğrulanması amacıyla yapılan BCA analizine ilişkin veriler.

	Abs.* 1	Abs. 2	Abs. 1 (blank çıkarılmış)	Abs. 2 (blank çıkarılmış)	Abs. ortalaması	Kons. (µg/mL)
PLGA/PLGA- His/PLGA-PEG-anti- EGFR KNP süpernatanı	0,11	0,12	0,05	0,07	0,06	4,87
PLGA/PLGA- His/PLGA-PEG KNP süpernatanı	0,09	0,09	0,03	0,04	0,04	0,06
Blank**	0,05	0,05	-	-	0,05	-

\*Abs: Absorbans, \*\*Blank: Analiz tamponu.

BCA testi ile, süpernatanda kalan (konjuge olmamış) antikor miktarı tayin edildikten sonra, ortalama konjugasyon etkinliği, Formül 3.6. kullanılarak % 94,88±0,31 olarak bulunmuştur.

#### 4.10.2. Ligand Konjuge Edilmiş Nanopartiküllerin *İn Vitro* Karakterizasyon Çalışmaları

Konjugasyon yapılmayan küresel nanopartiküller için gerçekleştirilen analizler, konjuge nanopartiküller için de tekrarlanmıştır.

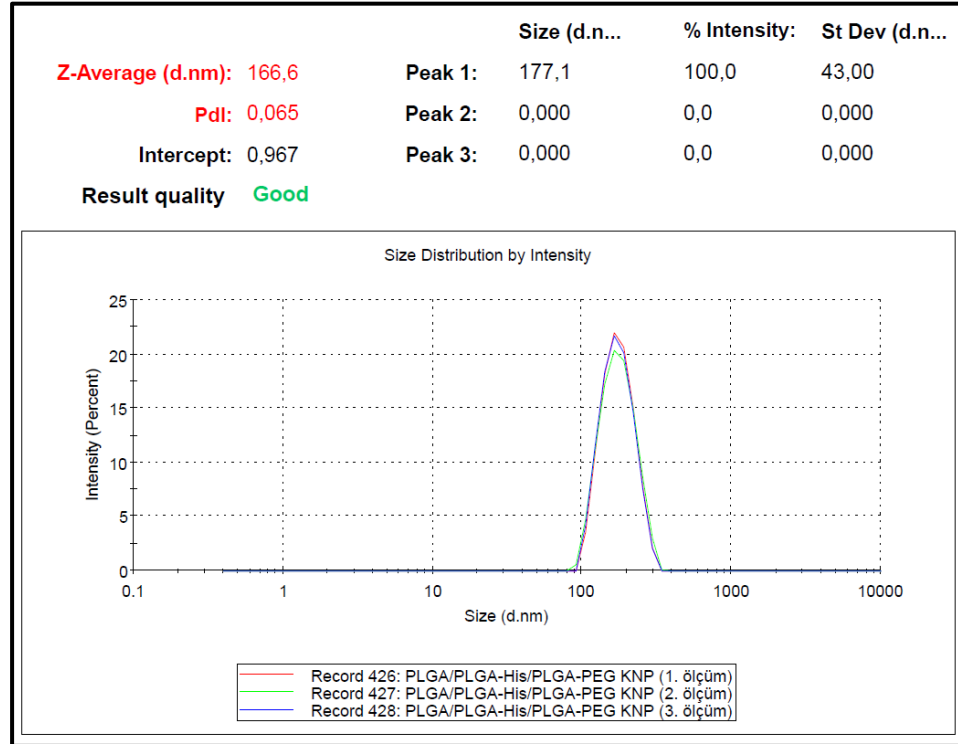
#### Partikül Boyutu, Polidispersite İndeksi ve Zeta Potansiyelin İncelenmesi

Boş konjuge olmayan, boş anti-EGFR konjuge ve kombine etkin madde yüklü konjuge küresel polimerik nanopartiküllerin partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyelleri bölüm 3.2.5.'te belirtildiği şekilde DLS yöntemi ile ölçülmüş ve sonuçlar Tablo 4.10., Şekil 4.31.-4.36.'da sunulmuştur.

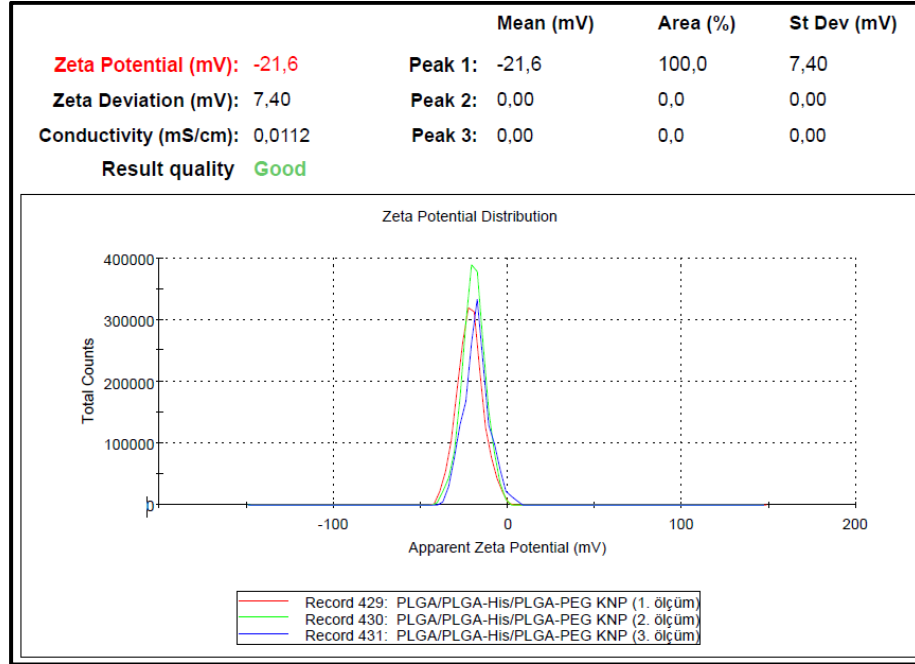
**Tablo 4.10.** Nanopartiküllerin partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel değerleri.

Formülasyon Kodu	Partikül Boyutu (nm)	Polidispersite İndeksi (PDI)	Zeta Potansiyel (mV)
PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG KNP	166,6	0,07	-21,6
	166,7	0,05	-19,5
	166,5	0,03	-17,9
Ortalama ± SS	<b>166,6 ± 0,10</b>	<b>0,05 ± 0,05</b>	<b>-19,7 ± 1,86</b>
PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR KNP	198,0	0,22	-18,8
	198,5	0,18	-19,9
	197,8	0,19	-19,7
Ortalama ± SS	<b>198,1 ± 0,36</b>	<b>0,19 ± 0,02</b>	<b>-19,5 ± -0,59</b>
PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR-G-N KNP	176,2	0,025	-28,6
	180,8	0,045	-26,8
	177,9	0,054	-29,9
Ortalama ± SS	<b>178,3 ± 2,33</b>	<b>0,04 ± 0,02</b>	<b>-28,4 ± 1,56</b>

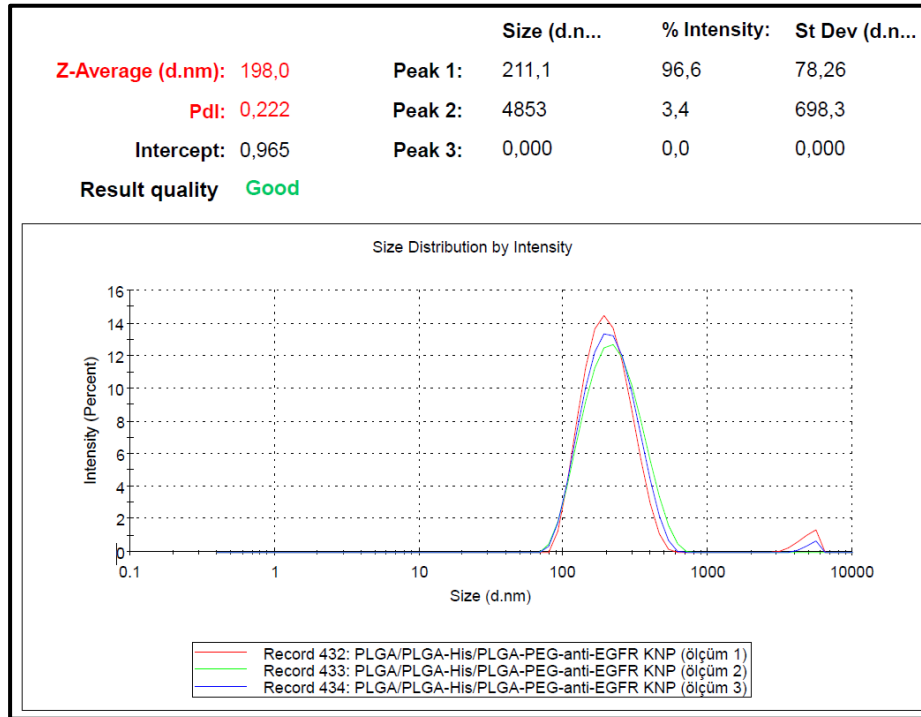
Tablo 4.10.'da verilen değerlere ilişkin Nano ZS grafikleri aşağıda yer almaktadır.



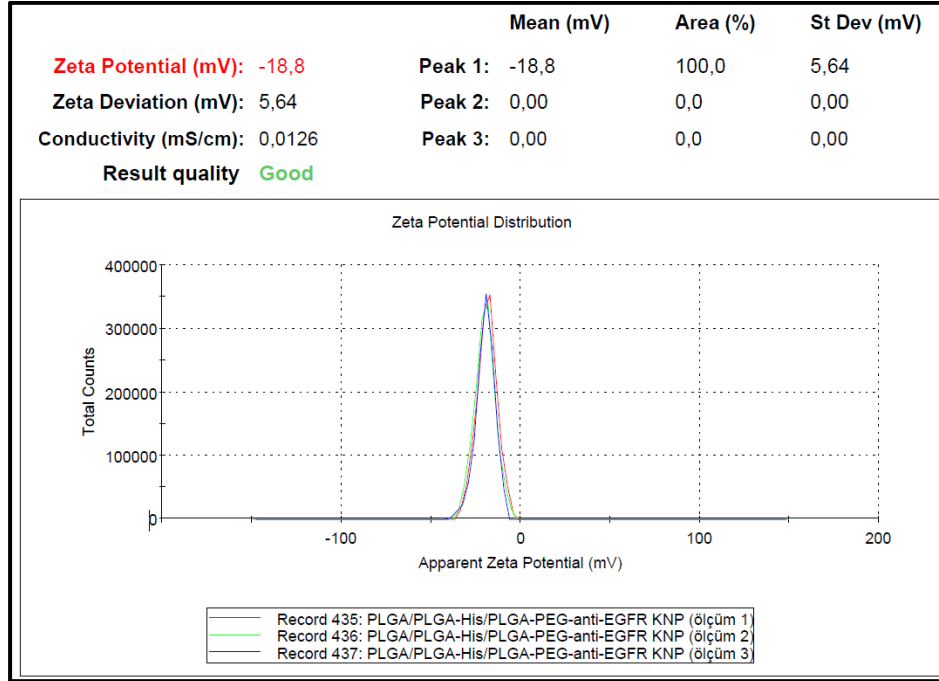
**Şekil 4.31.** PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG KNP'nin partikül boyutu ve polidispersite indeksi.



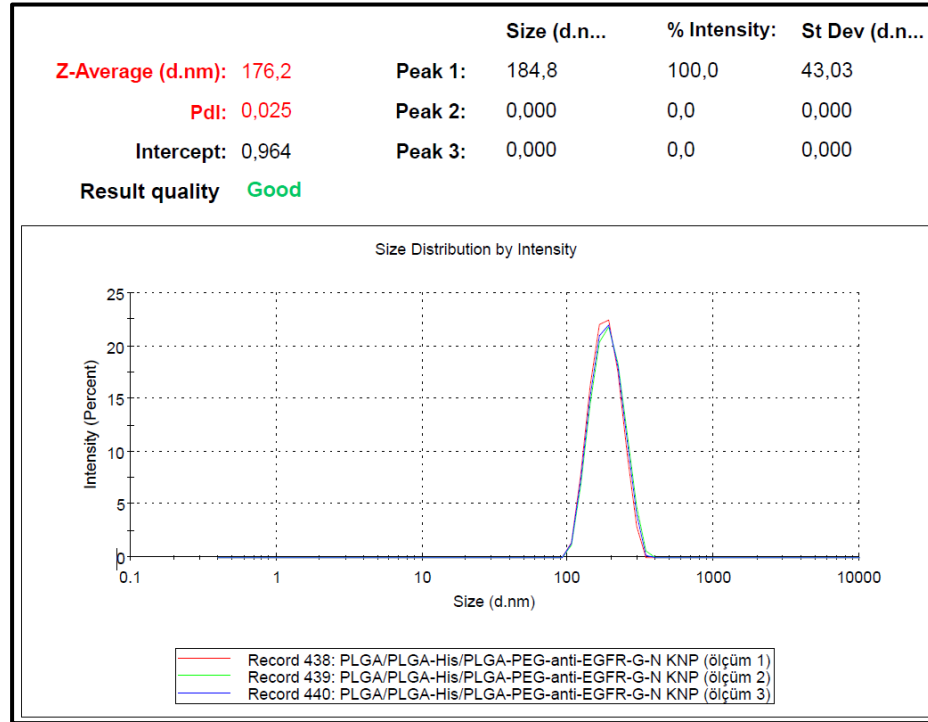
Şekil 4.32. PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG KNP'nin zeta potansiyel dağılımı.



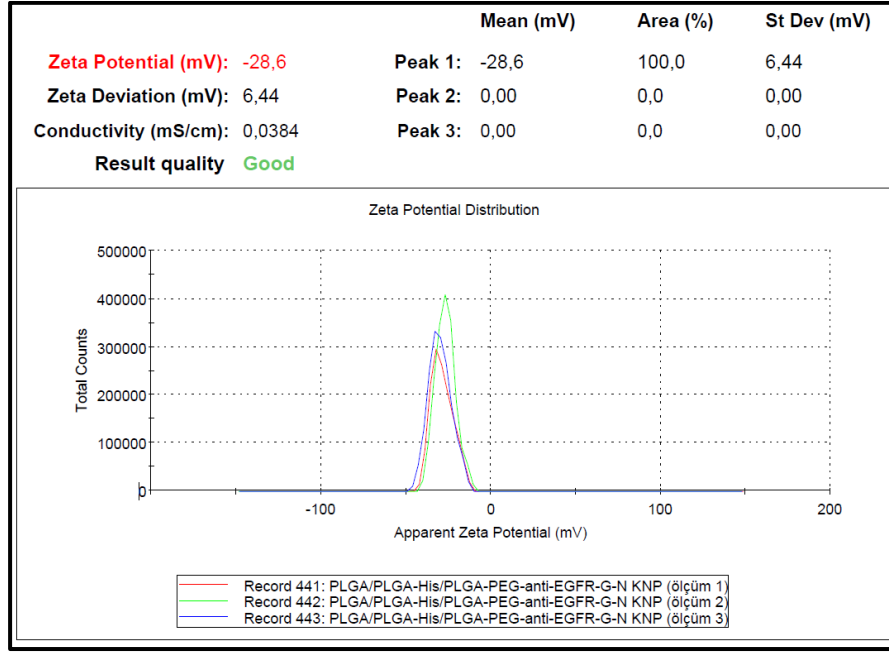
Şekil 4.33. PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR KNP'nin partikül boyutu ve polidispersite indeksi.



Şekil 4.34. PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR KNP'nin zeta potansiyel dağılımı.



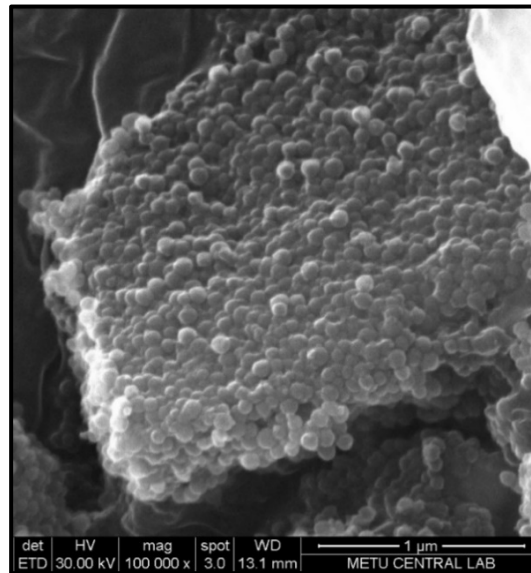
Şekil 4.35. PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR-G-N KNP'nin partikül boyutu ve polidispersite indeksi.



**Şekil 4.36.** PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR-G-N KNP'nin zeta potansiyel dağılımı.

### Morfolojik İnceleme

Antikor ile konjuge edilmiş nanopartiküllerin morfolojik analizi taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile gerçekleştirilmiştir. Hedeflendirme ligandı konjuge edilmiş nanopartiküller için hem şekil hem de yüzey özellikleri hakkında bilgi edinilmiştir (Şekil 4.37.).



**Şekil 4.37.** PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR KNP'ye ilişkin SEM analiz görüntüsü.

SEM görüntüsü incelendiğinde, benzer boyutlara ve pürüzsüz yüzeye sahip küresel/küresele yakın şekillerde nanopartiküllerin olduğu değerlendirilmiştir.

### Enkapsülasyon Etkinliği ve Yükleme Kapasitesi Çalışmaları

Nanopartiküllerin üretimini takiben ve konjugasyon sonrası elde edilen süpernatantlar ile BCA, ELISA ve HPLC analizleri yapılmıştır. Konjuge nanopartiküllere ilişkin indirekt tayinle hesaplanan enkapsülasyon etkinlikleri hem galunisertib hem de nivolumab için Tablo 4.11.'de verilmiştir.

**Tablo 4.11.** Konjugasyonun enkapsülasyon etkinliği ve yükleme kapasitesine olan etkisi.

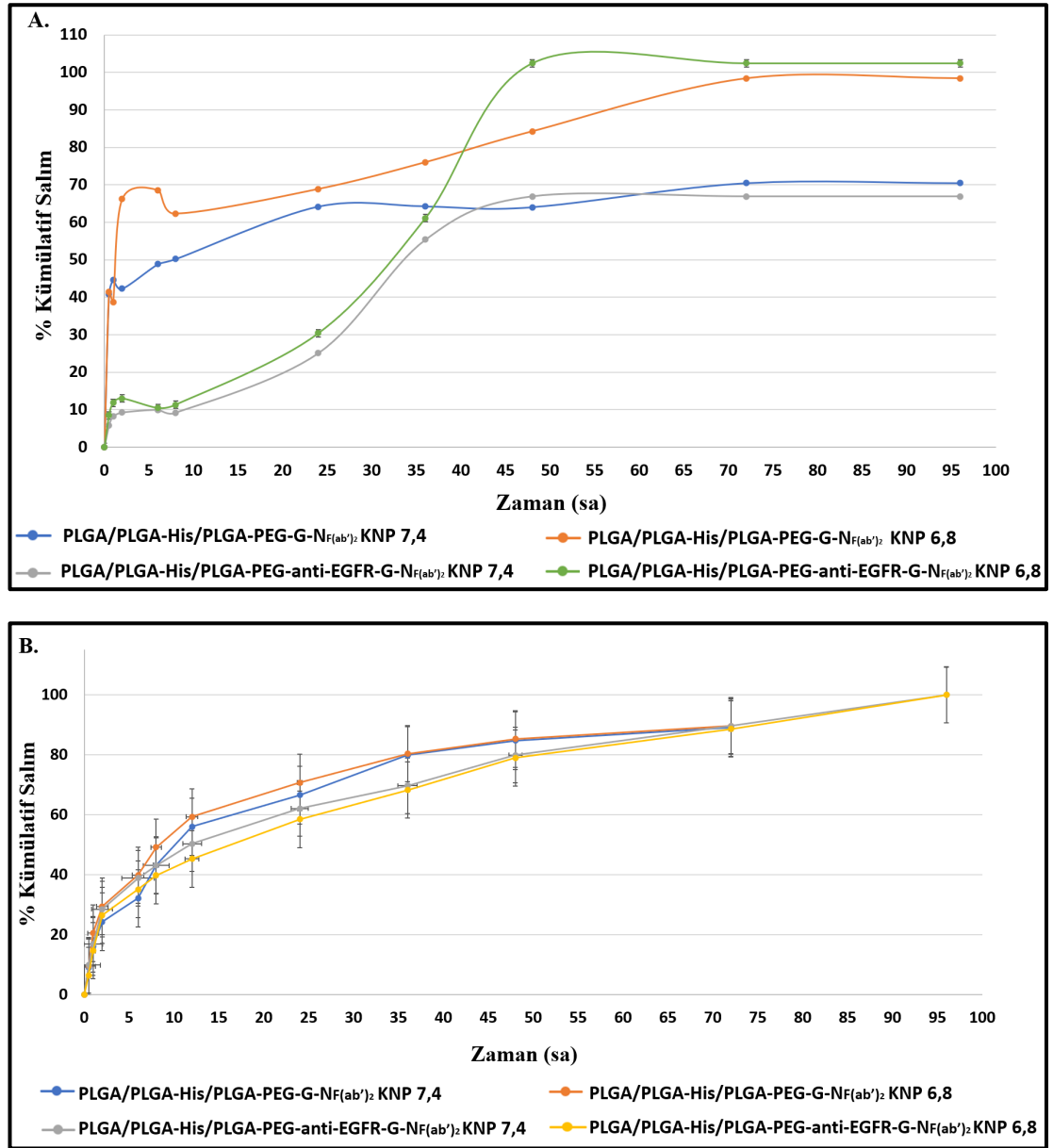
Formülasyon	Galunisertib		Nivolumab	
	EE* (%)	YK** (%)	EE (%)	YK (%)
PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-G-NF(ab') <sub>2</sub> KNP	9,59 ± 0,56	0,77 ± 0,45	59,203 ± 3,4	0,24 ± 3,5
PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR-G-NF(ab') <sub>2</sub> KNP	7,53 ± 0,24	0,60 ± 0,18	50,256 ± 2,9	0,20 ± 2,7
PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR-G-N KNP	10,77 ± 0,89	0,86 ± 0,62	70,893 ± 2,7	0,28 ± 2,8

\*EE: *Enkapsülasyon etkinliği*, \*\*YK: *Yükleme kapasitesi*.

Galunisertibe ilişkin enkapsülasyon etkinlikleri incelendiğinde, fragmente nivolumabla hazırlanan nanopartiküllerde; konjugasyon sonrası % 9,59 olan EE değeri azalarak % 7,53'e düşmüştür. Nihai formülasyonda (PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR-G-N KNP) ise enkapsülasyon etkinliği % 10,77 bulunarak konjugasyonun ve antikor boyutunun enkapsülasyon etkinliğinde anlamlı bir değişime neden olmadığı değerlendirilmiştir (p>0,05). Nivolumab için başlangıçta % 59,2 olan enkapsülasyon değeri konjugasyonu takiben % 50,3'e düşmüştür (p>0,05). Tezin sonraki bölümlerinde nanopartiküllere bütün haldeki nivolumab hem yüklenmiş hem de yüzeye adsorpsiyonu yapılarak sonuçta nihai formülasyonda EE değerinde artırılarak (p>0,05) % 70,9 olarak ölçülmüştür. YK değerleri incelendiğinde, % 0,60 ile % 0,86 arasında olan galunisertib ve % 0,20 ile % 0,28 arasında olan nivolumab için formülasyonlar arası anlamlı fark bulunmamıştır (p>0,05).

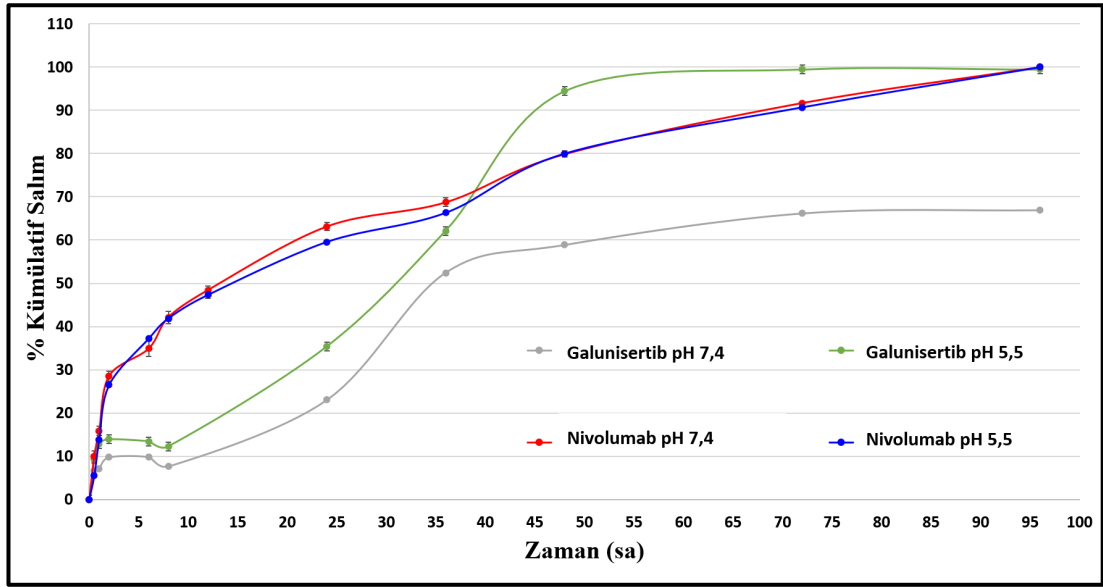
### *In Vitro* Salım Çalışmaları

Konjugasyon yapılmamış galunisertib ve nivolumab  $F(ab')_2$  fragmanı yüklü nanopartiküllere ilişkin salım çalışmasının ayrıntıları gereç ve yöntem bölümü 3.2.7. ve 3.2.11.'de sunulmuştur. Kombine etkin madde yüklü (fragmente ve bütün) antikor konjuge nanopartiküllere ilişkin salım çalışmaları konjuge olmayan nanopartiküllerde olduğu gibi sink koşullar altında, tüp yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiş (200) ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.38.-4.39.'da sunulmuştur.



**Şekil 4.38.** pH 6,8 ve 7,4 koşullarında PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-G-N<sub>F(ab')</sub><sub>2</sub> KNP ve PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR-G-N<sub>F(ab')</sub><sub>2</sub> KNP'den galunisertib (A) ve fragmente nivolumaba (B) ilişkin salım profilleri.

Şekil 4.38.'de, galunisertib için salım profili (A grafiği) incelendiğinde, pH 7,4 ortamında hem konjuge hem de konjuge olmayan NP'lerde salımın 72 saatin sonunda % 70'lerde kaldığı; pH 6,8 koşullarında ise antikör konjugasyonu olmayan nanopartiküllerden galunisertib salımının 72 saat sonunda, konjuge olan NP'lerde ise 48 saat sonunda % 100'e ulaştığı sonuçları elde edilmiştir. Nivolumab için konjugasyon ve pH değişikliklerinin salım üzerindeki etkisi incelenmiş ve 72 saatte incelenen tüm gruplar için benzer olarak % 90 salım olduğu gözlenmiştir.



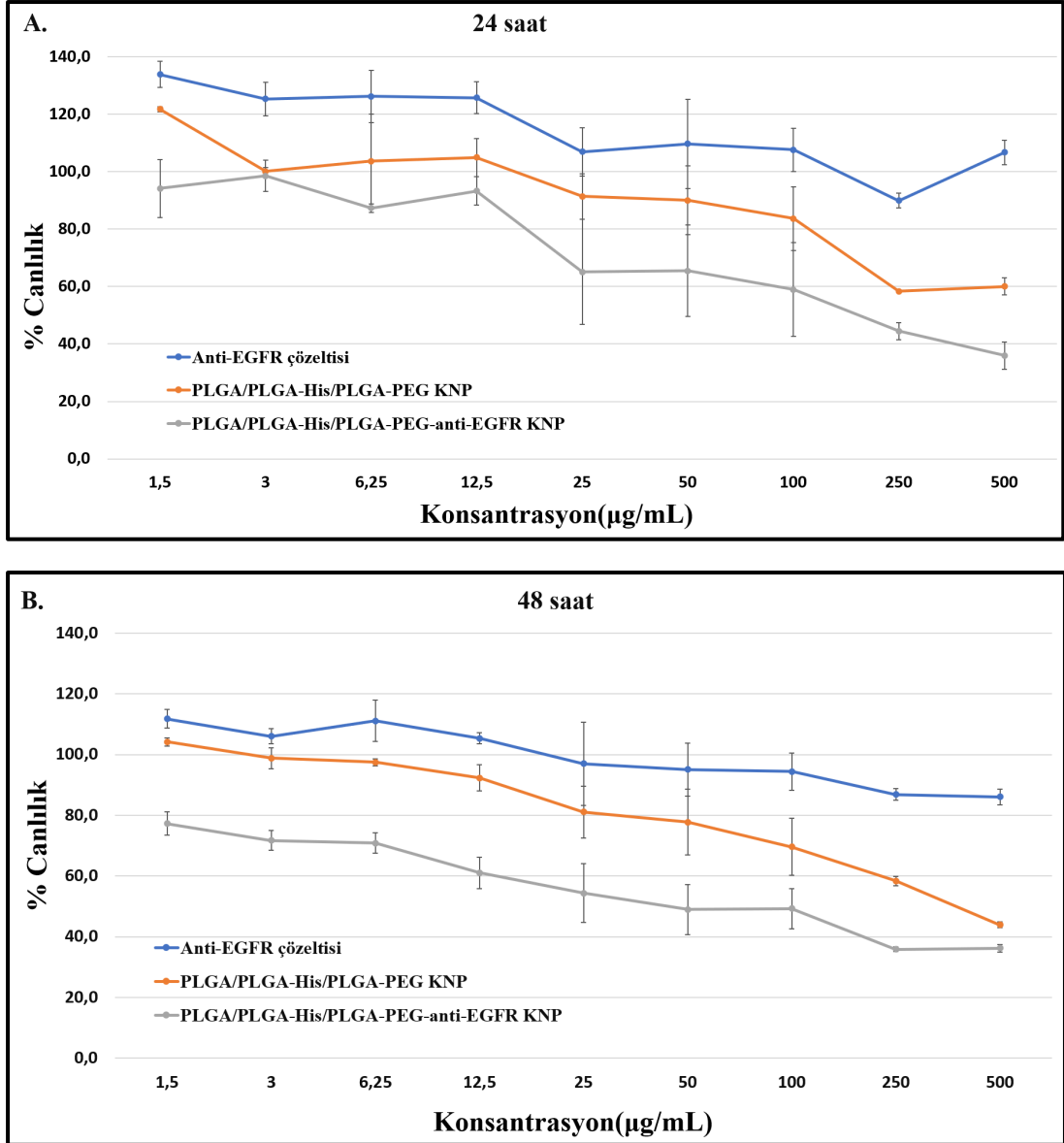
Şekil 4.39. pH 5,5 ve 7,4 koşullarında PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR-G-N KNP'den galunisertib ve nivolumaba ilişkin salım profilleri.

Bütün nivolumab ile devam eden çalışmalarda salım özelliklerinin aynı kalıp kalmadığı incelenmiş ve 72 saat sonuçları galunisertib için % 100, nivolumab için % 90 bulunarak önceki salım çalışmaları ile benzerlik doğrulanmıştır. *In vitro* salım deneyi sonuçları KINETDS 3.0 uygulaması kullanılarak analiz edilmiş ve hem galunisertib hem de nivolumabın tüm koşullarda nanopartiküllerden salım profilinin Weibull salım kinetiğine uygun olarak gerçekleştiği belirlenmiştir.

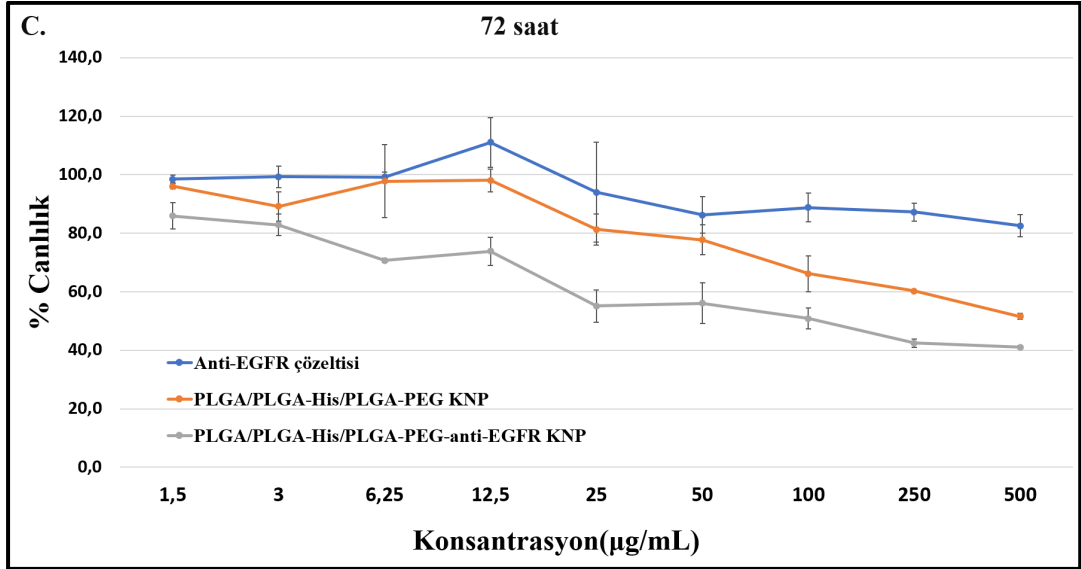
#### 4.11. *In Vitro* Sitotoksisite Çalışmaları

Hem galunisertib hem de nivolumabın kanser hücreleri üzerine doğrudan sitotoksik etkisi bulunmamaktadır. Her iki madde de etkilerini immün sistem üzerinden göstermektedir. Dolayısıyla, bu maddelere yönelik sitotoksisite testleri yapılmamıştır. Nanopartiküllere konjuge edilen anti-EGFR'nin hedeflemenin yanında

sitotoksik etkisinin de gözlenebileceği literatürde belirtilmiştir (247, 248). Bu sebeple anti-EGFR'nin KHDAK hücrelerine karşı sitotoksik etkisi MTT analizi ile incelenmiştir. Deneyde, anti-EGFR çözeltisi, konjugasyon yapılmamış boş nanopartiküller ve anti-EGFR ile konjuge boş nanopartiküller A549 hücrelerine uygulanmış ve üç farklı zaman noktasında MTT analizi gerçekleştirilmiştir. Deney sonuçları Şekil 4.40.'ta verilmiştir.



Şekil 4.40. Konjugasyonun sitotoksosite üzerine etkisi (A: 24 sa, B: 48 sa, C:72 sa).



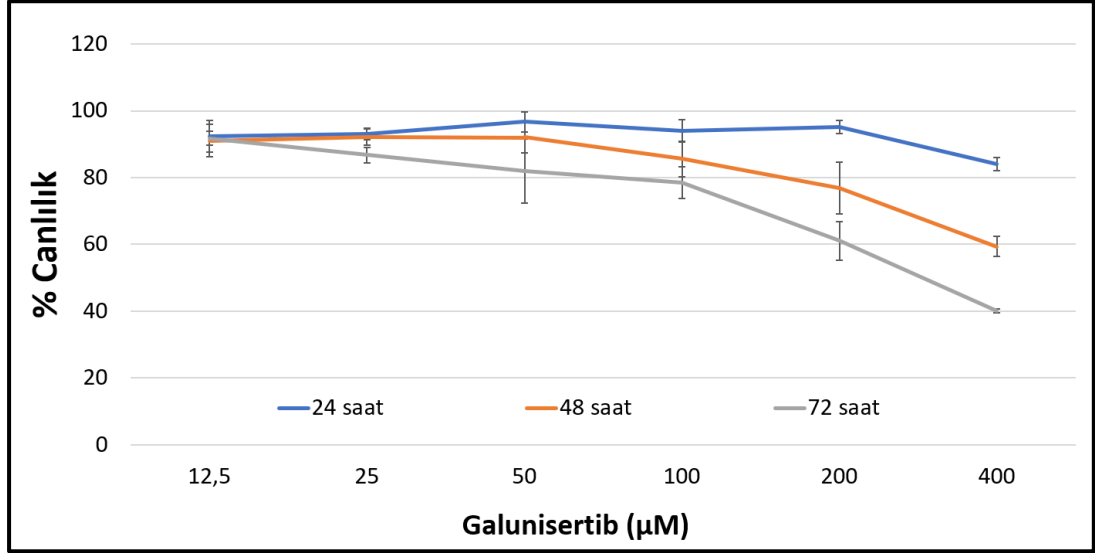
**Şekil 4.40. (Devam)** Konjugasyonun sitotoksosite üzerine etkisi (A: 24 sa, B: 48 sa, C:72 sa).

Şekil 4.40.'ta görüldüğü üzere, PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR KNP grubu konsantrasyon artışına bağlı olarak 24. saatte % 94'ten % 36'ya, 48. saatte % 77'den % 36'ya ve 72. saatte % 86'dan % 41'e düşen canlılık değerleri göstermiş, KHDAK hücreleri üzerinde üç zaman noktasında da en yüksek sitotoksik etkiyi ( $p < 0,05$ ) sağlamıştır. 24, 48 ve 72 saat için % canlılık sonuçları t testi ile ikişerli gruplar halinde test edilerek gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık ( $p$  değeri yorumlanarak) olup olmadığı Graphpad Prism 8 yazılımı kullanılarak incelenmiştir. 72. saatte PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG KNP ve PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR KNP gruplarının canlılıkları benzer bulunmuş olup ( $p > 0,05$ ), diğer tüm gruplar arası kıyaslamalarda canlılıklar arasındaki farkın anlamlı olduğu ( $p < 0,05$ ) değerlendirilmiştir.

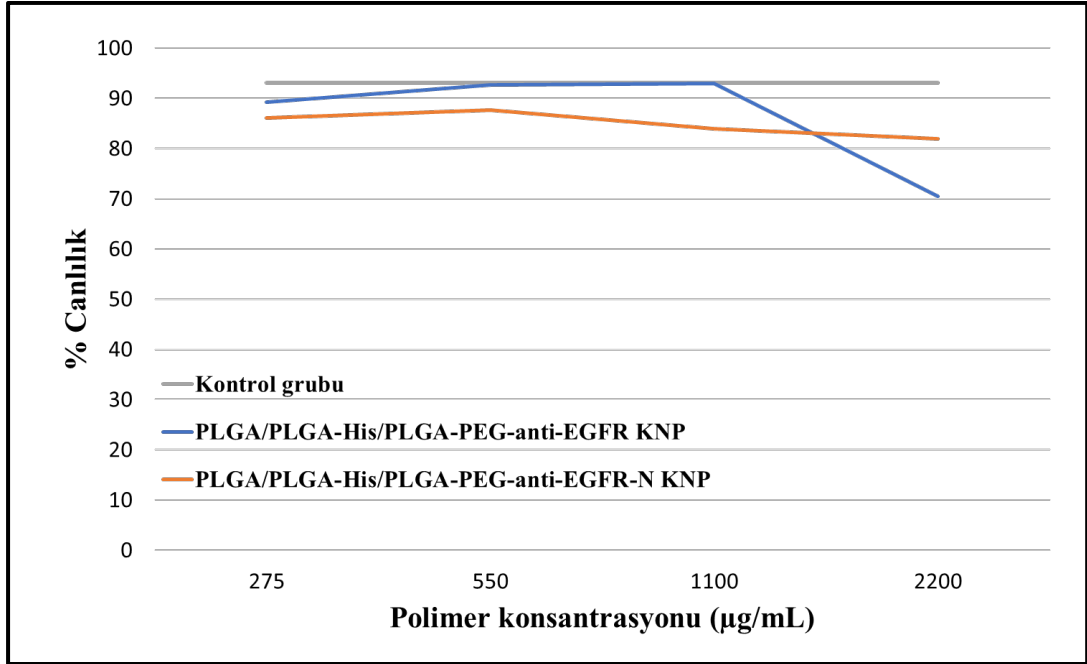
#### 4.12. PD-1 ve TGF- $\beta$ İnhibisyonunun T Hücre İmmün Yanıtlarına Olan Etkisinin Değerlendirilmesi

Deney kapsamında kullanılan boncuk temelli sitokin analiz kitlerinin yüksek maliyetli olması ve altı adet deney grubu olması sebebiyle ön denemeler gerçekleştirilmiş, ek olarak PKMH canlılık ve T hücre proliferasyon deneylerinin optimizasyonu yapılmıştır. Etkin madde çözeltileri, konjuge boş nanopartiküller ve etkin madde yüklü nanopartiküllerin PKMH canlılıkları üzerine etkileri incelenmiş, sonuçta optimum (PKMH'ye toksik etki göstermeyen) polimer ve etkin madde

konsantrasyonları sırasıyla 1100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ve galunisertib için 50  $\mu\text{M}$  olarak tespit edilmiştir.

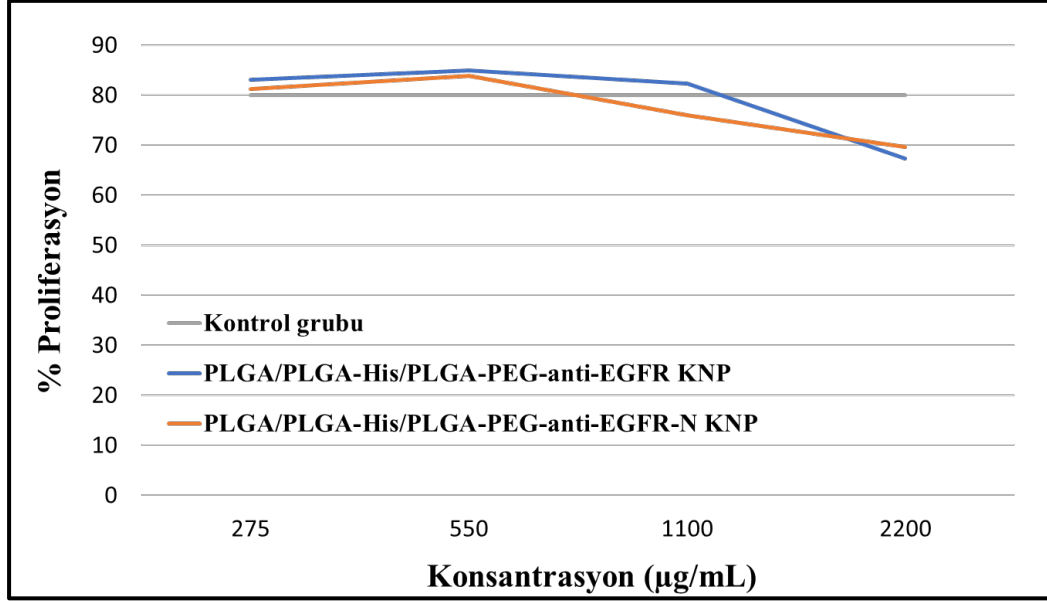


**Şekil 4.41.** Galunisertib'in farklı konsantrasyonları için PKMH hücreleri üzerindeki canlılığın değerlendirilmesi.



**Şekil 4.42.** PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR KNP ve PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR-N KNP'nin PKMH canlılığı üzerine etkisi (72 sa).

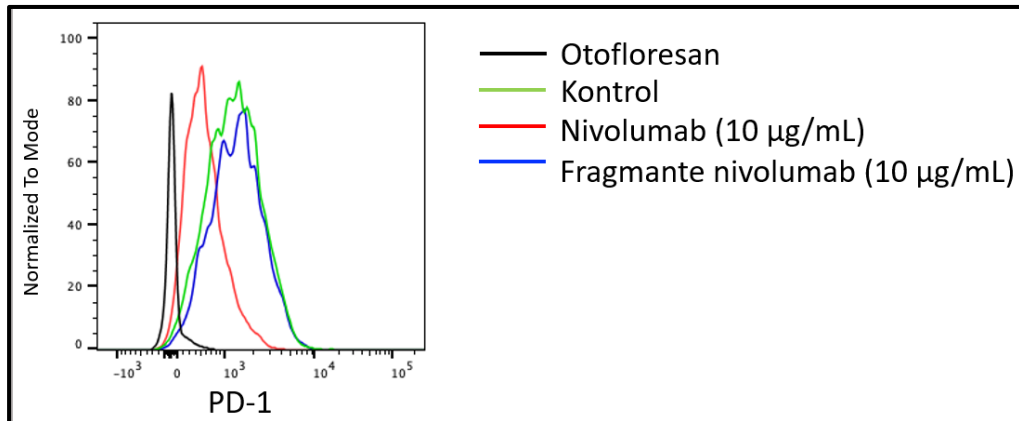
Şekil 4.42.'de PKMH canlılığı bakılan gruplar için T hücre proliferasyonu da incelenmiş ve sonuçlar Şekil 4.43.'te sunulmuştur.



**Şekil 4.43.** PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR KNP ve PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR-N KNP'nin T hücre proliferasyonu üzerine etkisi (72 sa).

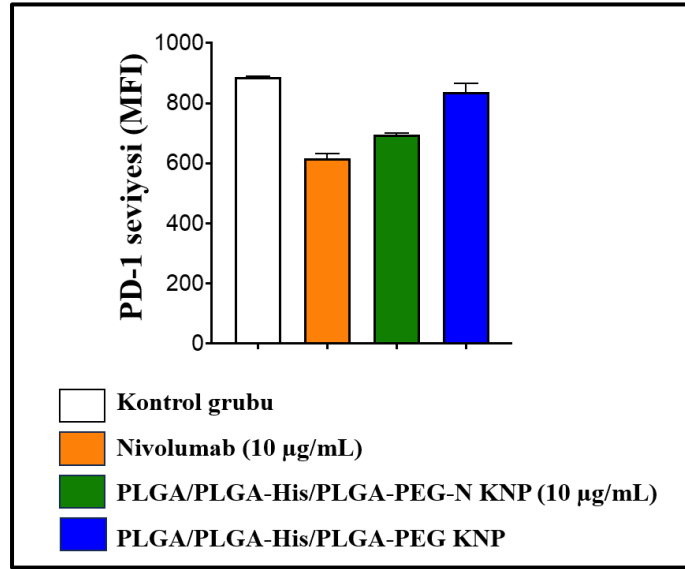
#### PD-1 Bloklama Deneyi

Şekil 4.43.'te sunulan T hücre proliferasyon deney sonuçları dikkate alınarak fragmanite antikorla immün yanıtta istenen cevap alınmadığı tespit edilmiş, bu durumun fragmantasyona bağlı olup olmadığını araştırmak amacıyla ek deney (PD-1 bloklama deneyi) planlanmıştır. Bu deney için bütün (intakt) ve fragmanite antikor aynı koşullarda ve aynı konsantrasyonda CD3+ T hücreleri üzerine uygulanmıştır. Antikorların blokaj seviyeleri akım sitometri ile analiz edilmiş ve sonuçlar Şekil 4.44.'te verilmiştir.



**Şekil 4.44.** Bütün ve fragmanite nivolumabın T hücreleri yüzeyinde bulunan PD-1 reseptör blokajına etkileri.

PD-1 reseptörü bloke olduğunda (nivolumab reseptöre bağlandığında) APC konjuge antikör reseptöre bağlanamayacağı için cihazdan alınan floresan sinyal düşük olacaktır. Bu prensibe dayanarak Şekil 4.44. incelendiğinde, bütün haldeki nivolumabın reseptör blokajı sağladığı, fragmente nivolumabın ise kontrol grubu ile aynı alanda sinyal vermesi sebebiyle reseptör blokajı yapmadığı tespit edilmiştir. Şekil 4.43. ve 4.44. sonuçları dikkate alınarak çalışmalara bütün nivolumabla devam edilmesine karar verilmiştir. Bütün antikörün nanopartiküle yüklü olmasının blokaja etkinliği ayrıca araştırılmış ve sonuçlar Şekil 4.45.'te verilmiştir.

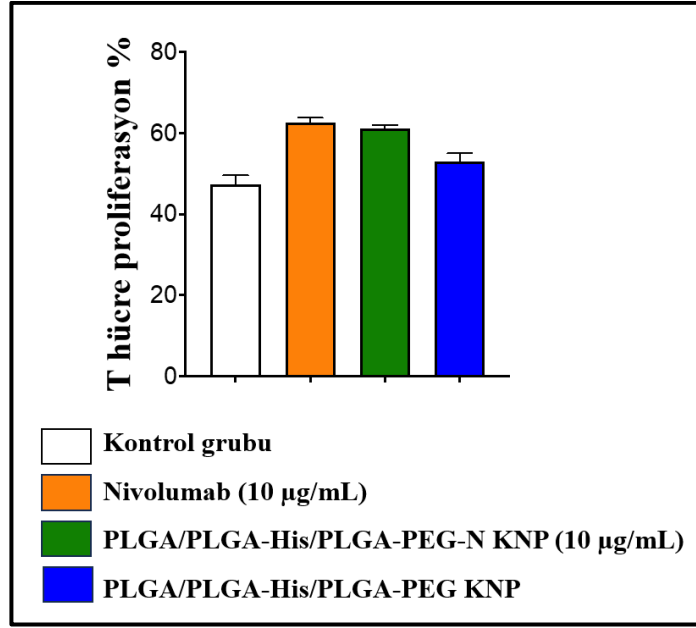


**Şekil 4.45.** Nivolumabın çözelti ve nanopartiküle yüklü halde PD-1 bloklama üzerine etkisinin değerlendirilmesi.

Bütün halde nivolumab yüklü nanopartiküllerin de çözeltisine benzer şekilde ( $p>0,05$ ) PD-1 blokasyonu yaptığı tespit edilmiş olup formülasyon ileri aşama deneyler için uygun bulunmuştur.

### T Hücre Proliferasyon Deneyi

PD-1 bloklama deneyindeki gruplar için T hücre proliferasyon deneyleri gereç ve yöntem bölümü 3.2.13.'te belirtilen şekilde tekrarlanmış ve sonuçta nivolumab yüklü nanopartikül ve çözelti grubunda kontrol grubuna kıyasla yüksek ve benzer proliferasyon değerleri gözlenmiştir (Şekil 4.46.).

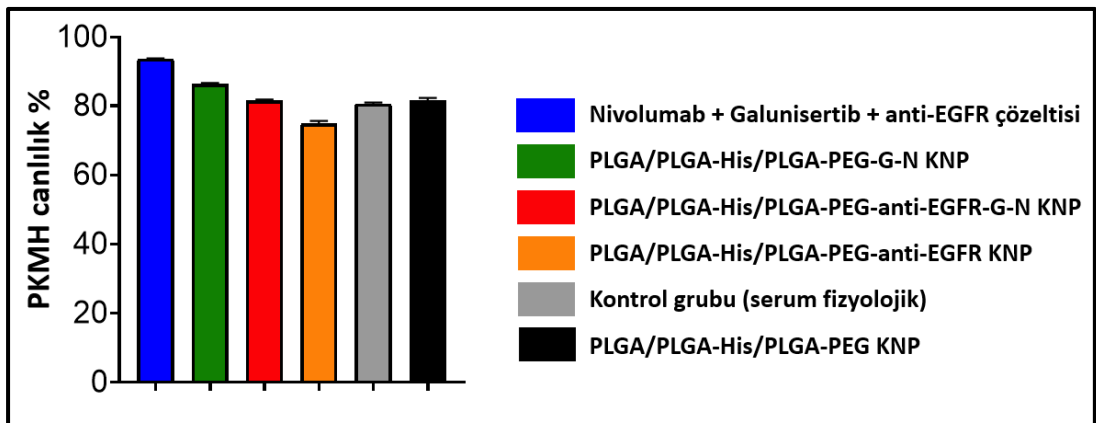


**Şekil 4.46.** Nivolumabın çözelti ve nanopartiküle yüklü halde T hücre proliferasyonu üzerine etkisinin değerlendirilmesi.

Ön deneylerde istenen sonuçlara ulaşılmasını takiben, *in vivo* deney grupları ile çalışmalar tekrarlanmıştır.

#### PKMH Canlılık Deneyi (*İn Vivo* Deney Gruplarına İlişkin)

PKMH, bağışık yanıtta istenen T hücrelerini içerdiği için canlılıkların yüksek olması (% 80-85) beklenmektedir (249, 250). *İn vivo* deneylerde kullanılacak grupların *in vitro* koşullarda PKMH'ye toksik olup olmadığının teyit edilmesi amacıyla yapılan deneylere ilişkin sonuçlar Şekil 4.47.'de verilmiştir.

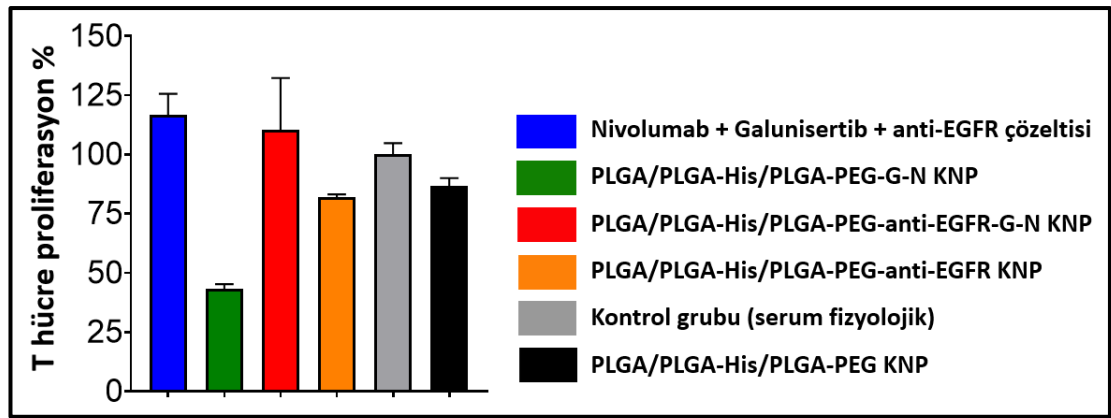


**Şekil 4.47.** *İn vivo* deneyde kullanılacak nanopartikül ve çözelti gruplarına ilişkin PKMH canlılık yüzdeleri.

PKMH canlılık sonuçları incelendiğinde, PLGA/PLGA His/PLGA-PEG-anti-EGFR KNP grubu (turuncu) hariç tüm gruplar, literatürde T hücre proliferasyon deneyleri için ön şart olarak belirtilen yüzdelerde canlılık sağlamıştır. İncelenen zaman noktası (72 sa) dahilinde, nihai formülasyonun (kırmızı), immün sistem hücreleri üzerinde deneyi olumsuz yönde etkilemeyecek şekilde güvenle kullanılabilceği tespit edilmiştir.

### T Hücre Proliferasyon Deneyi (*In Vivo* Deney Gruplarına İlişkin)

Etkin madde içeren gruplarda T hücre proliferasyonunun kontrol grubuna kıyasla yüksek olması beklenmektedir. *In vivo* deneyler sonrası yapılacak immün yanıt analizinin *in vitro* koşullarla kıyaslanması amacıyla gerçekleştirilen T hücre proliferasyon deneylerine ilişkin sonuçlar Şekil 4.48.'de yer almaktadır.



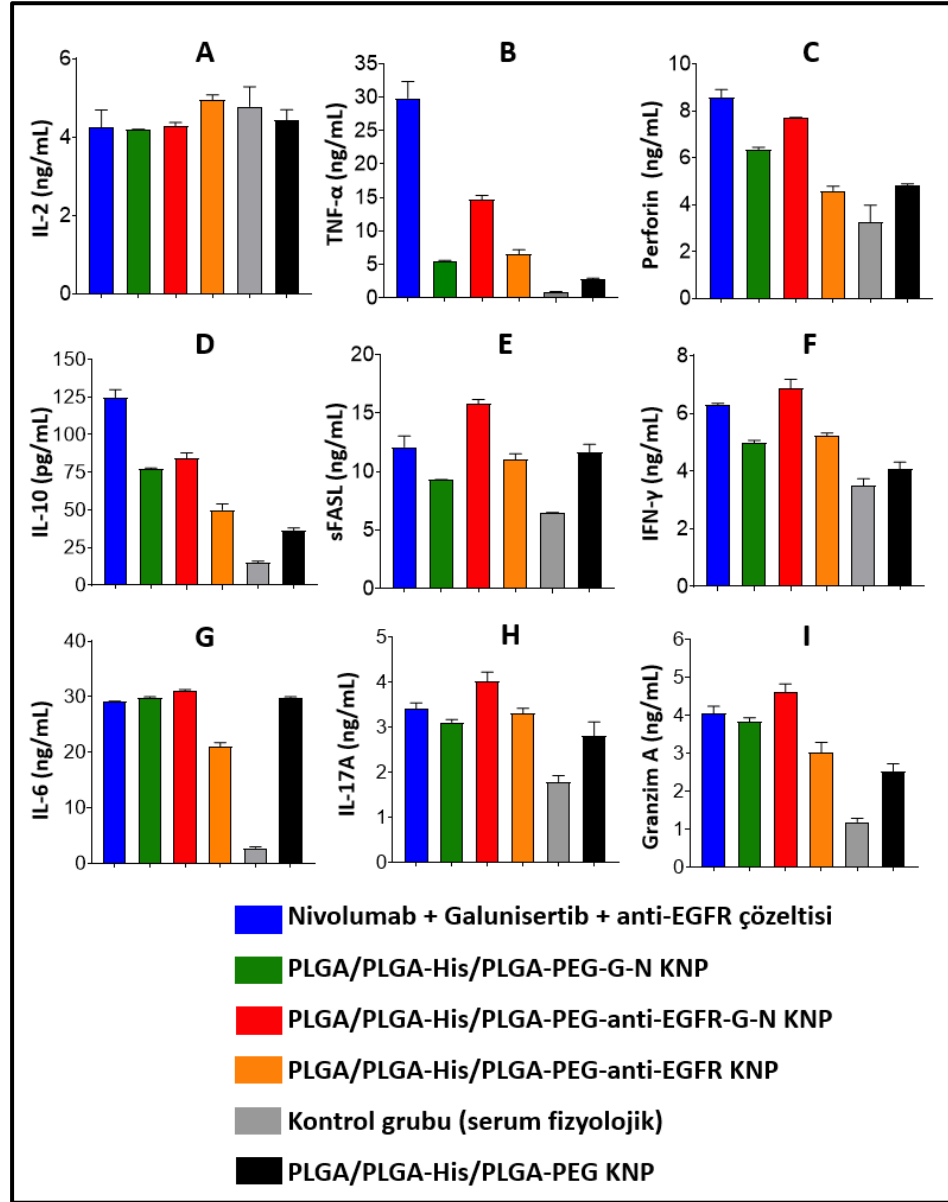
Şekil 4.48. *In vivo* deneyde kullanılacak nanopartikül ve çözelti gruplarına ilişkin T hücre proliferasyon yüzdeleri.

Şekil 4.48. incelendiğinde, asıl tedavi grubunda (kırmızı) ilaç çözeltisine (lacivert) benzer ve kontrol grubuna kıyasla yüksek bir yüzde T hücre proliferasyonu gözlenmiş olup, nihai formülasyon *in vivo* deneyler için uygun bulunmuştur. Sonuç olarak, *in vitro* koşullarda elde edilen PKMH canlılıkları ve T hücre proliferasyonları *in vivo* deneyleri birebir yansıtmamakla birlikte *in vitro* salım analizinde olduğu gibi fizyolojik ortamdaki davranışa ilişkin bir öngörü sağlamıştır.

### İnsan CD8/NK Boncuk Temelli Çoklu Analiz Kiti ile Sitokinlerin Analizi

Hem *in vitro* hem de *in vivo* numuneler boncuk temelli kit ile analiz edilmiştir. Sitokin seviyeleri akım sitometri ile değerlendirilmiş ve kitin temin edildiği Biolegend

markasına ilişkin veri analizi yazılım programı aracılığı ile anlamlı sayısal verilere dönüştürülerek aşağıdaki grafikler hazırlanmıştır (Şekil 4.49. ve 4.50.).

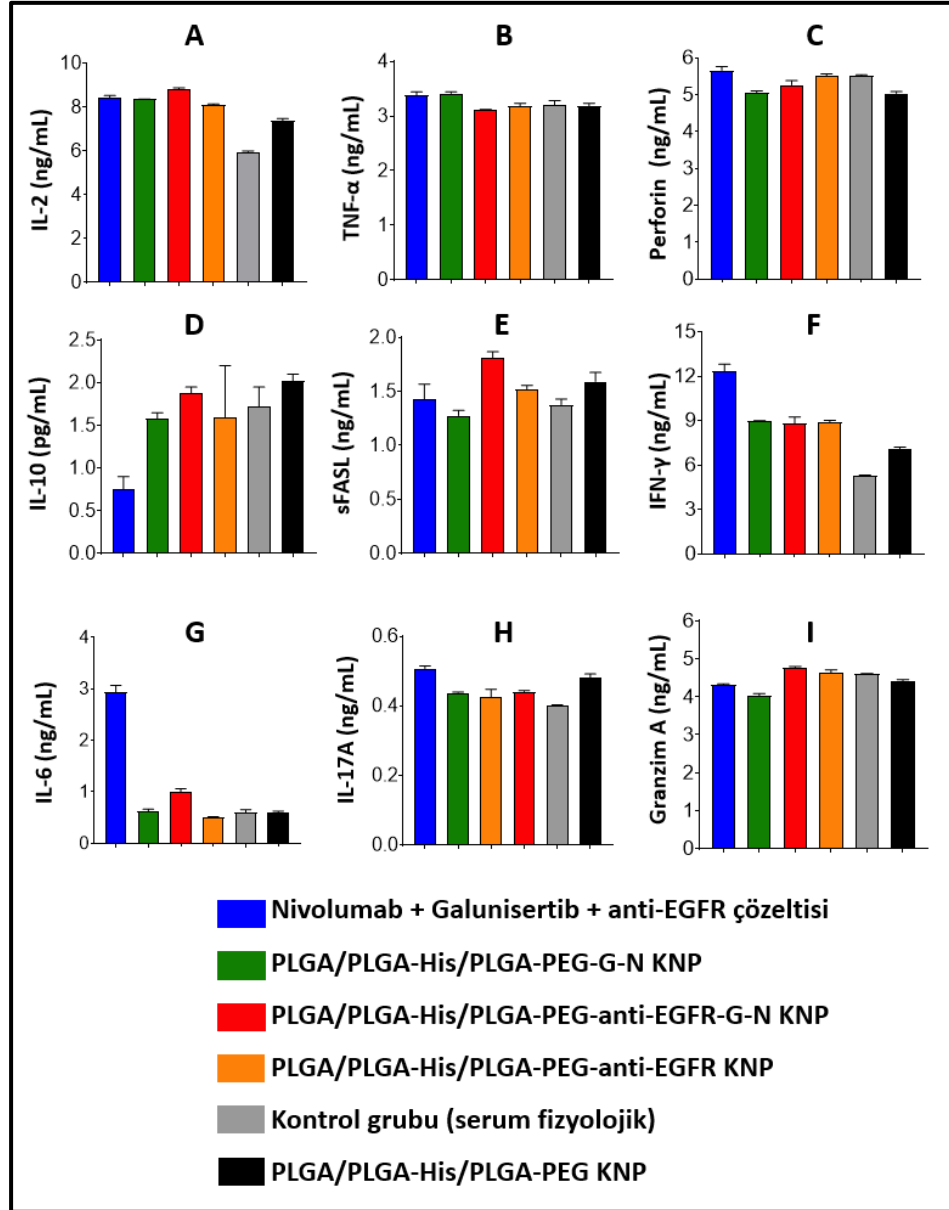


Şekil 4.49. *In vitro* numuneler için CD8/NK boncuk temelli çoklu analiz kiti ile yapılan sitokin analizi sonuçları.

Şekil 4.49.'da, PKMH hücre kültürüne uygulanan formülasyon ve çözeltilerin 72 saat inkübasyon sonrası toplanan süpernatantları ile gerçekleştirilen boncuk temelli sitokin analiz sonuçları görülmektedir. Genel olarak tüm sitokin seviyeleri incelendiğinde, immün yanıtın kombine çözelti (lacivert) ve aktif hedefli etkin madde yüklü nanopartiküllerle (yeşil) artırılmış olabileceği söylenebilir. Bu biyobelirteçlerin seviyelerinin doğru ölçümü, bağışıklık tepkilerinin ve birçok hastalık sürecinin

derinlemesine anlaşılması için kritik öneme sahiptir. Şekildeki sitokinlerin ayrıntılı incelemesi 5.11.6. başlığında yapılmıştır.

CD8/NK boncuk temelli çoklu analiz kiti ile *in vitro* numunelerle aynı anda *in vivo* numunelerin de analizi yapılmış, sonuçlar Şekil 4.50.'de verilmiştir. Analizin yorumlanmasına ilişkin ayrıntılar Bölüm 5.11.'de yer almaktadır.



Şekil 4.50. *In vivo* tümör numuneleri için CD8/NK boncuk temelli çoklu analiz kiti ile yapılan sitokin analizi.

T lenfositlerde bulunan yüzey farklılaşma antijenleri (*Cluster of Differentiation*, CD), T hücre reseptörleri (*T Cell Receptor*, TCR) ile iletişim halinde olarak TCR'nin sinyal iletimini ve antijenik uyarım gücünü artıran hücre yüzey

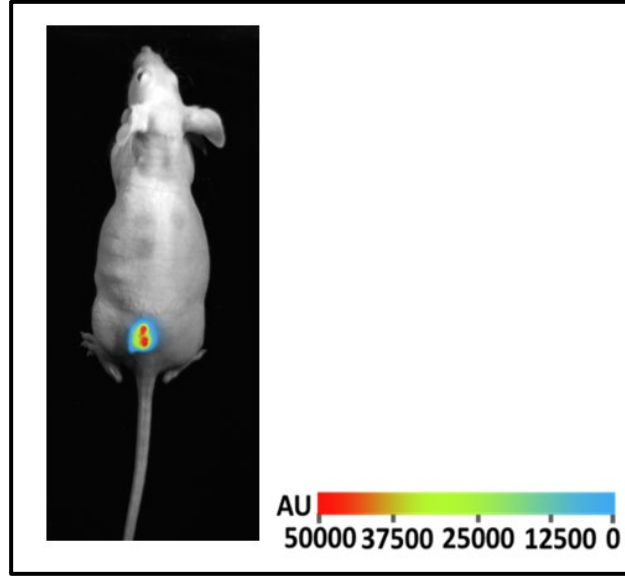
reseptörleridir (251). İmmünoterapinin etkinliği, kit ile sitokin seviyelerinin incelenmesinin yanında ayrıca akım sitometri analizi ile değerlendirilmiş ve potansiyel biyobelirteçlerin (CD) seviyelerine ilişkin sonuçlar Şekil 4.51.'de sunulmuştur.



Şekil 4.51. *In vivo* tümör numuneleri için CD biyobelirteçlerinin akım sitometri ile analizi.

### 4.13. Tümör Modelinin Geliştirilmesi, Nanopartiküllerin Uygulanması ve Tümörün Değerlendirilmesi

Nude farelere dorsal flank bölgesinden insan KHDAK hücreleri uygulamasını takiben 14. günde tümör çapları kumpas yardımıyla ölçülmüş (tümör çapları ~0,5 cm), ek olarak IVIS ile tümörün incelemesi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.52.).



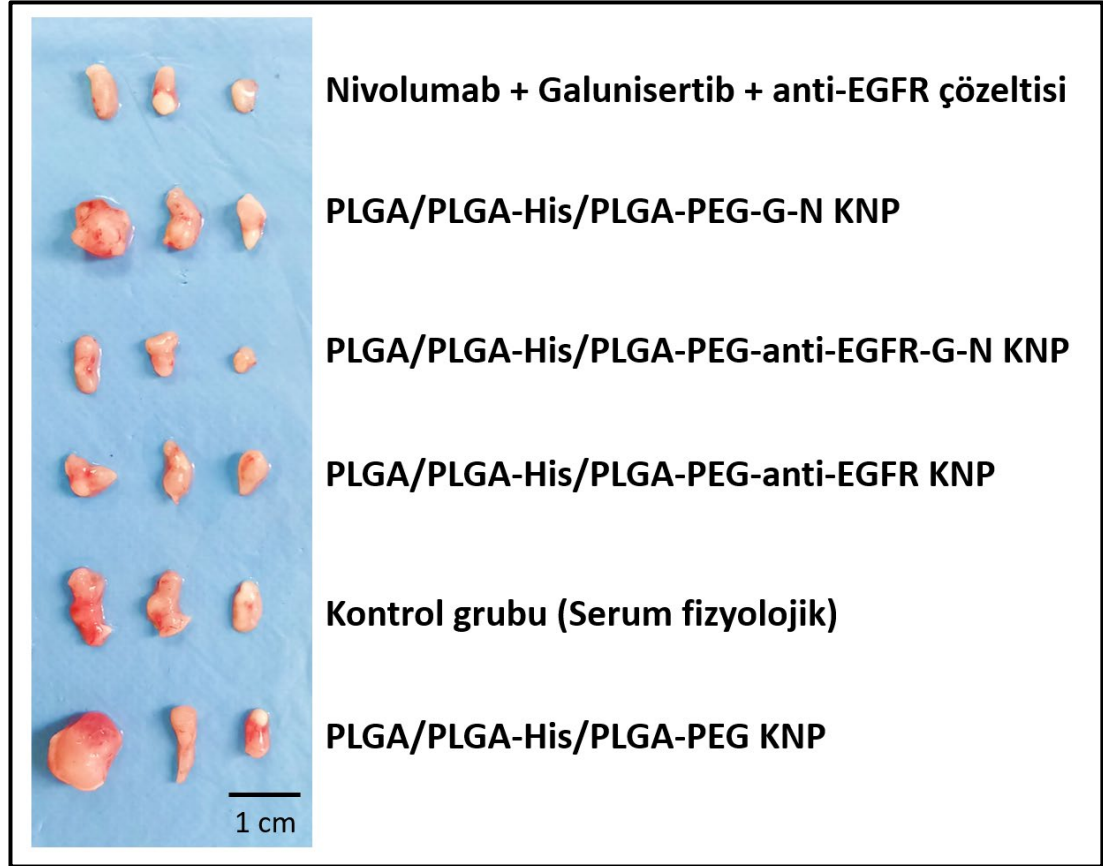
**Şekil 4.52.** Farelerde heterotopik tümör gelişiminin IVIS ile takibi.

Şekil 4.52. incelendiğinde, tümör dokusundaki floresan yoğunluğun yüksek olması (tümörün orta bölgesinde kırmızı alan bulunması), tümör hücrelerinin canlı kaldığını göstermektedir. Sonuçlar dikkate alınarak tümör geliştirilen fareler, *in vivo* deneylere uygun bulunmuştur.

### Tedaviyi Takiben Tümörün Değerlendirilmesi

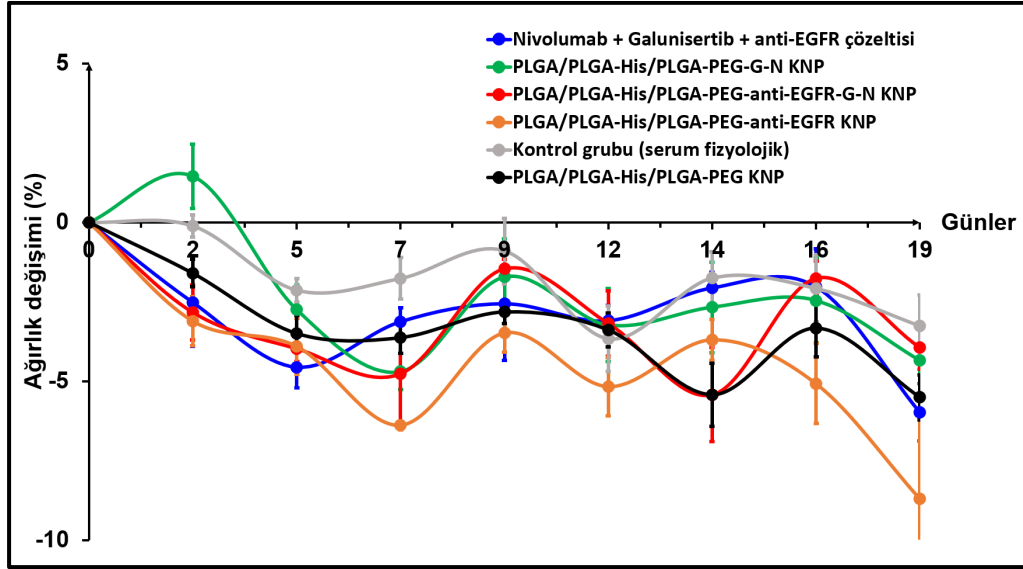
Tümörler uygun büyüklüğe (0,5 cm çap) ulaştıktan sonra altı gruba ayrılan humanize CD-1 nude farelere bir hafta aralıklarla PKMH enjeksiyonu yapılmış ve farklı tedaviler toplam altı doz olarak kuyruk veninden uygulanmıştır. Tedavi süresi boyunca ağırlıklar kaydedilmiş (Şekil 4.54.) ve kumpas yardımı ile tümör çapları ölçülmüştür (Şekil 4.55.). Yöntem bölümü 3.2.14.'te bildirilen tedavi protokolleri sonunda kurban edilen farelerden çıkarılan tümör dokuları görüntülenmiş ve temsili görüntüler Şekil 4.53.'te verilmiştir. Nitel olarak PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-G-N KNP (yeşil) ve PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG KNP (siyah) gruplarında tümör çapında

diğer gruplara kıyasla (PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR KNP ve kontrol grubu) büyümenin daha fazla olduğu gözlenmiştir. Bu gözlem, Şekil 4.55.'teki nicel verilerle desteklenmiştir.



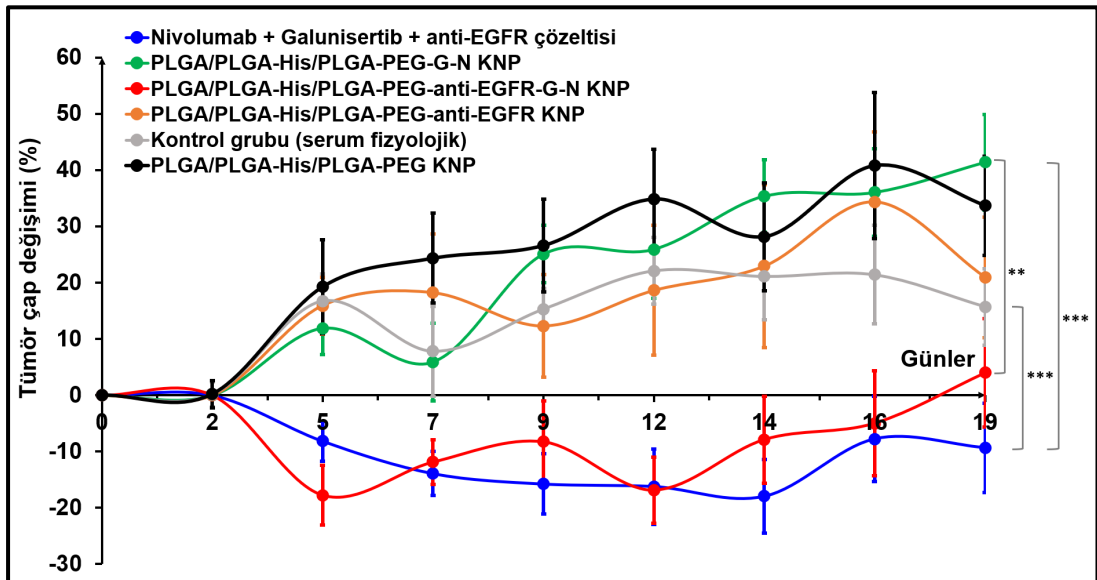
**Şekil 4.53.** Sakrifiye edilen farelerden elde edilen tümör dokularına ilişkin temsili görüntüler.

Farelerin tedavi süresince ölçülen ağırlıkları temel alınarak hazırlanmış olan zamana karşı % ağırlık değişim grafiği Şekil 4.54.'te verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, tüm gruplarda farelerin ağırlıklarının deney başlangıcına göre azaldığı gözlenmiştir. Ağırlıktaki azalmanın asıl tedavi grubu (PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR-G-N KNP, kırmızı) ve kontrol grubunda (serum fizyolojik, gri) en az olduğu gözlenmektedir. Bu durum, sözü edilen iki gruptaki farelerin refah seviyelerinin deney süresince iyi olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.54. Tedavi süresince farelerin ağırlıklarındaki değişim.

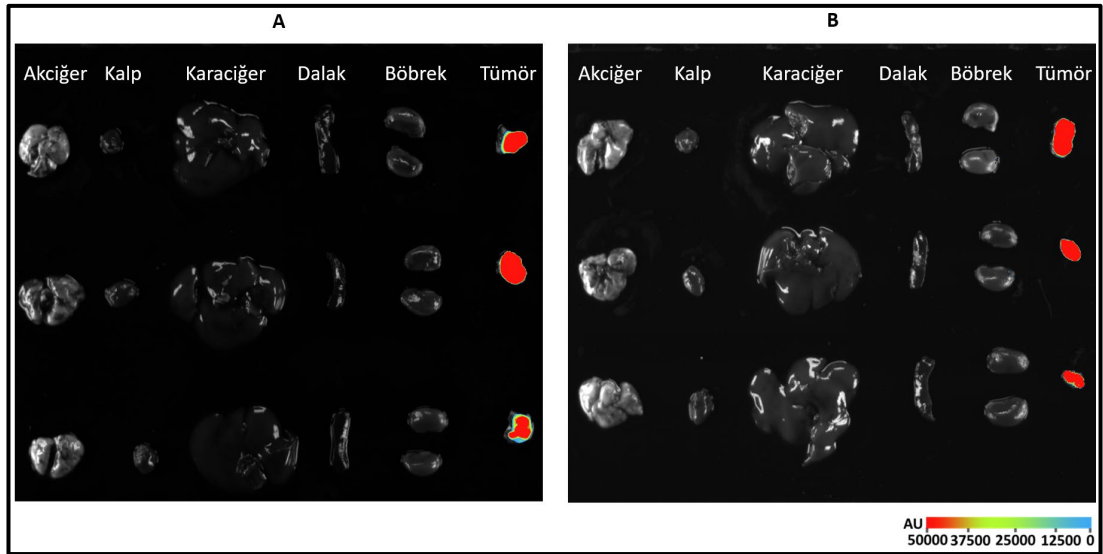
Tedavi süresince farelerdeki tümör dokusunun boyutunda gerçekleşen değişiklikler (% çap değişimi) Şekil 4.55.'te sunulmuştur. Sonuçlar incelendiğinde, etkin madde yüklü hedefsiz nanopartikül ve hedefsiz boş nanopartikül gruplarında tümör büyüklüğünün başlangıç (0,5 cm) boyutlarına göre yaklaşık % 35-40 artmış olduğu, tedavi süresince tümör boyutunda küçülmenin sadece kombine ilaç çözeltisi (Nivolumab+galunisertib+anti-EGFR çözeltisi) ve hedeflendirilmiş kombine etkin madde yüklü nanopartikül (PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR-G-N KNP) (6. doz uygulaması hariç) gruplarında olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.55. Tedavi sürecince farelerdeki tümör dokusunun boyutlarında değişim (\*\*p<0,01; \*\*\*p<0,005, t testi ile hesaplanmıştır.).

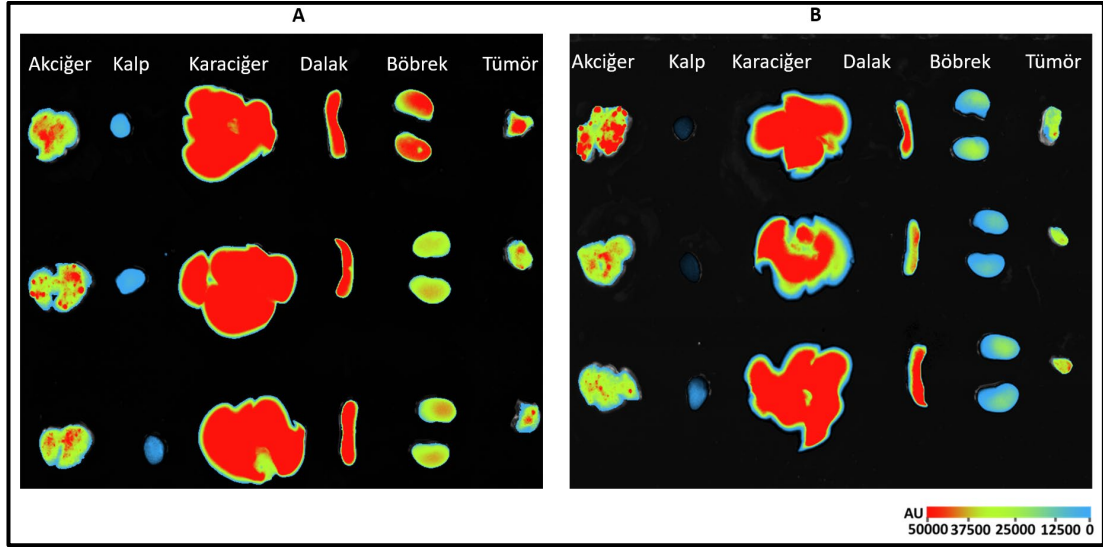
#### 4.14. Biyodağılım Çalışmaları

Anti-EGFR antikoruna ile hedeflendirilmiş veya izotip kontrol antikoruna konjuge edilmiş (kontrol grubu) floresan işaretli nanopartiküller, iki gruba ayrılan KHDAK tümörü geliştirilmiş CD-1 nude farelere (her grup n=3), biyodağılımı kıyaslamak amacıyla uygulanmıştır. Enjeksiyon sonrası 14 saatte düşük doz anestezik uygulanan fareler IVIS ile görüntülenerek deneyin sonlandırılması uygun bulunmuş, ardından yüksek doz anestezik ile sakrifiye edilen farelerden çıkarılan organlar ile tümör dokularının floresan görüntülenmesi IVIS cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Antikor konjuge boş nanopartiküllerin biyodağılımına ilişkin sonuçlar aşağıda verilmiştir (Şekil 4.56.-4.58.).



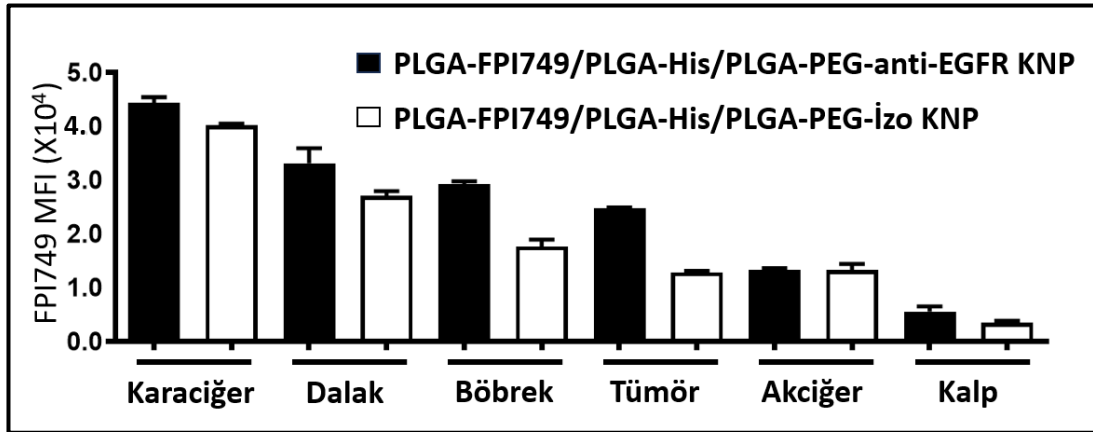
**Şekil 4.56.** Tümör modeli geliştirilen humanize nude farelerin IVIS ile biyoluminesans görüntülenmesi: A. PLGA-FPI749/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR KNP uygulanan grup; B. PLGA-FPI749/PLGA-His/PLGA-PEG-İzo KNP uygulanan grup.

Şekil 4.56.'daki IVIS görüntüsü incelendiğinde, tümörün istenilen bölgede ve boyutta (0,5 cm çapta) olduğu görüntüleme ile teyit edilmiştir. Tümörde gözlenen ışımaya, lusiferaz enzimi içeren A549 hücrelerinin lusiferinle reaksiyonundan kaynaklanan biyoluminesans ışımadır. Diğer organlarda herhangi bir ışımaya gözlenmemesi hücrelerin bu organlara metastaz yapmadığını göstermektedir.



**Şekil 4.57.** Tümör modeli geliştirilen humanize nude farelerde nanopartiküllerin organlardaki birikiminin IVIS ile görüntülenmesi: A. PLGA-FPI749/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR KNP uygulanan grup; B. PLGA-FPI749/PLGA-His/PLGA-PEG-İzo KNP uygulanan grup.

IVIS ile organlar ve tümör dokularında gözlenen ışımalara ilişkin (Şekil 4.57.) MFI değerleri tespit edilmiş ve Şekil 4.58.'de bir grafik halinde sunulmuştur (252).



**Şekil 4.58.** Antikor konjuge floresan özellikli nanopartiküllerin biyodağılımı.

Şekil 4.58. incelendiğinde, aktif hedeflendirilmiş nanopartiküllerin en yoğun olarak karaciğer, dalak ve böbreklerde birikim gösterdiği görülmektedir. Hedefli ve izotip antikor konjuge nanopartiküllerin çeşitli organ ve dokulardaki birikim davranışı, tümör dokusu haricinde benzer bulunmuştur ( $p>0,05$ ). Elde edilen sonuçlara göre, biyodağılım açısından boş hedefli nanopartiküllerin tümör çevresindeki birikimi izotip kontrole kıyasla daha yüksek bulunmuştur ( $p>0,05$ ).

## 5. TARTIŞMA

Tez çalışmaları kapsamında, KHDAK'nin tedavisi amacıyla tümöre aktif olarak hedeflendirilmiş kombine etkin madde yüklü polimerik ilaç taşıyıcı nanosistem geliştirilmesi planlanmıştır. Tasarlanan sistem başarılı bir şekilde hazırlanarak *in vitro* ve *in vivo* karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bulgular bölümünde sunulan sonuçlar, bu bölümde literatürle kıyaslama yapılarak bilimsel olarak tartışılmıştır.

### 5.1. Galunisertibin Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu

Tez çalışmaları kapsamında, galunisertib için HPLC ile miktar tayini literatürdeki yöntem modifiye edilerek geliştirilmiş ve analitik yöntemin validasyonu başarıyla tamamlanmıştır. Galunisertibin henüz aday bir ilaç molekülü olması sebebiyle, HPLC analizine ilişkin literatürde sınırlı sayıda veri yer almaktadır. Ding ve arkadaşları (166) tarafından gerçekleştirilen HPLC analizinde galunisertib için maksimum absorptans ( $\lambda_{max}$ ) 235 nm'de elde edilmiştir. Galunisertib için üç boyutlu UV spektrum incelemesi (Şekil 4.1., s.87) sonucu elde edilen  $\lambda_{max}$  değerinin (242 nm) literatür ile uyumlu olduğu belirlenmiştir. Keskin ve düzgün bir pike sahip olan galunisertibin alıkonma zamanı 1,608 dakika olarak bulunmuştur. Çalışmalarda tercih edilen kolonun (C14 alkil zincirine gömülü bir polar amid grubu içeren ters faz kolon) boyunun kısa olması (75 mm) ve sabit fazın fonksiyonelleştirilmiş alkil grupları içermesi sebebiyle alıkonma süresinin kısa olması beklenen bir durum olup, zaman ve çözücü kaybı açısından üstünlük sağlamaktadır. 0,1-100 µg/mL konsantrasyon aralığında gerçekleştirilen doğrusal çalışmaları sonucunda, çalışılan standart çözelti konsantrasyonları ile HPLC analizi sonucu elde edilen pik alanları arasında doğrusal bir orantı olduğu tespit edilmiştir. Analize ilişkin bulgular Şekil 4.3.'te (s.88) verilmiş olup galunisertibin kalibrasyon doğrusu için korelasyon katsayısı ( $r^2$ ) değeri 0,999 bulunmuştur. Literatürde de bildirildiği (253) üzere,  $r^2$  değeri 1'e ne kadar yakınsa, konsantrasyon ve pik alanı arasındaki ilişki o kadar güçlüdür. Sonuçta elde edilen bulgular doğrultusunda çalışan konsantrasyon aralığı için HPLC yönteminin doğrusallığı gösterilmiştir. Doğruluk çalışmaları düşük, orta ve yüksek (0,5-50-100

$\mu\text{g/mL}$ ) olmak üzere kalibrasyon aralığında bulunan üç farklı konsantrasyonda gerçekleştirilmiş ve % geri kazanım değerlerinin, Tablo 4.1.'de (s.89) verildiği üzere % 81-102 arasında olduğu görülmüştür. Geri kazanım değerlerinin, 100 ppm için % 90-107; 10 ppm, 1 ppm ve 100 ppb için % 80-110 aralığında olması gerektiği bildirilmiştir (240, 241). Gereç ve yöntem bölümünde verilen Formül 3.1. kullanılarak yapılan hesaplamalara göre, galunisertib için gün içi ve günler arası geri kazanım değerleri sınırlar dahilinde bulunarak, geliştirilen miktar tayini yönteminin doğruluğu gösterilmiştir.

Yöntemin kesinliği düşük, orta ve yüksek (0,5-50-100  $\mu\text{g/mL}$ ) olmak üzere kalibrasyon aralığında bulunan üç farklı konsantrasyonda, tekrarlanabilirlik ve tekrar elde edilebilirlik parametreleri ile değerlendirilmiştir. Tekrarlanabilirlik ve tekrar elde edilebilirlik çalışmaları kapsamında elde edilen bulgular Tablo 4.2. ve Tablo 4.3.'te (s.90) sunulmuştur. Üç konsantrasyon aralığı için hesaplanan % varyasyon katsayılarının % 2'ye eşit veya daha küçük olması beklenmektedir (254). Değerlendirilen her iki parametre için de varyasyon katsayıları en fazla % 2,2 olarak belirlenmiş ve yöntemin tekrarlanabilirlik ve tekrar elde edilebilirliğinin (gün içi ve günler arası) sağlandığı tespit edilmiştir.

Özgünlük çalışmaları kapsamında formülasyonda kullanılan yardımcı maddeler olan PVA ve PLGA türevlerinin (PLGA, PLGA-His, PLGA-PEG-Mal) formülasyonda kullanılan konsantrasyondaki çözeltileri ve salım ortamı bileşenleri ile HPLC analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analiz sonucunda, DMSO ( $t_R$ : 0,62 dk) piki haricinde polimerlere ve tampon tuzlarına ilişkin herhangi bir pik gözlenmemiş olup, enkapsülasyon etkinliği ve salım çalışmaları kapsamında elde edilen etkin madde pikleri ile girişim olmayacağı, geliştirilen yöntemin galunisertib için özgün olduğu tespit edilmiştir.

Duyarlılık çalışmaları kapsamında, etkin maddelerin en düşük konsantrasyonu için (0,1  $\mu\text{g/mL}$ ) elde edilen kromatogram kullanılarak, HPLC'nin yazılımı yardımıyla galunisertib için LOQ değeri 42,64 ng/mL, LOD değeri 12,79 ng/mL olarak tespit edilmiştir. Geliştirilen HPLC yöntemi ile ng (nanogram) seviyesinde hassas ve doğru bir şekilde ölçüm yapılabildiği gösterilmiştir. Stabilité çalışmaları kapsamında etkin maddelerin 0,5-5-100  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlanmış ve 21-25 °C'de (laboratuvar koşulları) 24 saat bekletildikten sonra analiz edilmiştir. Analizlere

ilişkin sonuçlar Tablo 4.4.'te (s.92) sunulmuş olup analiz başlangıcı ve 24 saatte yapılan analizler arasında anlamlı fark olmadığı ( $VK < \% 2$ ,  $p > 0,05$ ), galunisertibin analiz süresi boyunca kararlı kaldığı gösterilmiştir.

## 5.2. Nivolumabın Fragmantasyonu ve Miktar Tayini Yöntemi Geliştirilmesi

Nivolumabın fragmantasyon çalışmaları kapsamında, uygun pH ve sıcaklık koşullarında IdeS enzimi ile inkübasyon yapılmıştır. Elde edilen  $F(ab')_2$  ve Fc fragmanları, SDS-PAGE jel analizi ile incelenmiş ve sonuçta Şekil 4.5.'te (s.93) 3 numaralı alanda görüldüğü üzere bütün antikordan (~170-175 kDa seviyesinde gözlenen bant) farklı konumlarda iki ayrı bant gözlenmiştir. Antikor yaklaşık 150 kDa ağırlığında olmasına rağmen, jel üzerinde ilerlemekte zorlandığı için 180 kDa'a yakın bir konumda bant verdiği tespit edilmiştir. Bu duruma benzer sonuçlar indirgen olmayan SDS-PAGE jel elektroforez analizinde gözlenebilmektedir (220). Enzimle inkübe edilmiş numunenin olduğu bölümde (3 numara) bütün antikora ilişkin bant olmaması, fragmantasyon işleminin % 100 verimle başarıldığını göstermektedir. 3 no'lu numune ayrıntılı incelendiğinde, ~100 kDa seviyesinde  $F(ab')_2$  ve ~27-30 kDa seviyesinde Fc bantları gözlenmiştir. Fragmanların yaklaşık molekül ağırlıkları dikkate alındığında, enzimin doğru bölgeden kesim yaptığı doğrulanmıştır. Sonuç olarak, fragmantasyon başarıyla gerçekleştirilmiş ve analiz sonuçları literatürle uyumlu bulunmuştur (255, 256).

BSA ve fragmente nivolumaba ilişkin kalibrasyon doğruları (Şekil 4.8. ve 4.9., s.96) incelendiğinde korelasyon katsayıları 1'e oldukça yakın bulunmuş, bu durum çalışılan aralıkta konsantrasyon ve absorbans değerleri arasında doğrusal bir ilişki olduğunu göstermiştir. Doğrusallığa ek olarak, oldukça düşük konsantrasyon aralığında (1-200 ppm) hassas bir miktar tayini gerçekleştirilebilmiştir. Nivolumab, tezin ilk bölümünde fragmente olarak kullanılmış ancak hücre kültürü çalışmalarında düşük immün yanıt tespit edilmiş, sonrasında bütün antikorla çalışmalara devam edilmiştir. Bütün antikor için sandviç ELISA yöntemi ile miktar tayini yapılmıştır. Tablo 4.5. incelendiğinde (s.97) elde edilen eğrinin  $r^2$  değeri 1 bulunmuş olup, çalışılan konsantrasyon aralığında analiz sonuçlarının doğrusal olacağı kanıtlanmıştır. MSE, tahmin edilen sonuçların gerçek sayıdan ne kadar farklı olduğuna ilişkin bilgi

vermektedir. Analiz sonucunda elde edilen ortalama kare hatası (MSE) değerinin çok küçük olması (0,00005), ELISA ile miktar tayininde gerçek değerlere oldukça yakın sonuçlar elde edilebileceğini göstermektedir. Standart sapma ve varyans değerleri de 0'a oldukça yakın bulunmuş olup, bilindiği üzere bu değerlerin küçük olması analiz sonuçlarının güvenilirliğini artırmaktadır. Sonuç olarak, elde edilen kalibrasyon eğrisi ile nanopartiküllere enkapsüle olan ve nanopartikülden salınan bütün haldeki nivolumab miktarı, bölüm 4.10.2.'de verilen grafiklerde olduğu gibi güvenilir verilerle analiz edilebilmiştir.

### **5.3. Polimerik Nanopartiküllerin retimi ve Karakterizasyonu**

Küresel nanopartiküller çift emülsifikasyon/çözücü buharlaştırma yöntemiyle başarılı bir şekilde üretilmiş, ardından farklı şekilli PLGA temelli nanopartiküller, daha önce bölüm 3.2.4.'te belirtildiği şekilde film germe yöntemi ile hazırlanmıştır. Deney sonuçları, nanopartikül şeklindeki değişimin filmin germe oranıyla kontrol edilebileceğini göstermektedir. Tez kapsamında modifiye edilen film germe işlemi, nanopartiküllerin geniş bir en-boy oranında üretilmesini sağlamasına rağmen (86), düşük zeta potansiyel değerleri, nanopartiküle yüklü ilacın bir kısmının çoklu yıkama işlemlerinden dolayı kaybedilmesi, yüklü ilacın salımında azalma gibi bazı sakıncalar içermektedir. Hazırlanan farklı şekillerdeki nanopartiküllere ilişkin karakterizasyon çalışmaları, alt başlıklarda ayrıntılı olarak tartışılmıştır.

#### **5.3.1. Partikül Boyutu, Polidispersite İndeksi ve Zeta Potansiyelin Değerlendirilmesi**

Nanopartikül üretimini takiben yapılan ilk karakterizasyon çalışması, partikül boyutu ve zeta potansiyeli lmdr. Partikül boyutu ölümünde en sık kullanılan yöntem dinamik ışık saçılımı (DLS) metodu olup, tez kapsamında bu yöntem kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir. Dinamik ışık saçılımı, küresel nanopartiküller için optimize bir yöntemdir (257). DLS analizinin teorik varsayımına göre, boyutu llen partikülle aynı ortalama difüzyon katsayısına sahip olan kavramsal bir kürenin çapı tanımlanabildiği için küresel olmayan nanopartiküller için llen hidrodinamik çaplar, genellikle gerçek boyutlarla tutarlı olmamaktadır (253, 254) Dolayısıyla, gerçekleştirilen deneylerde çubuk ve eliptik disk şeklindeki

nanopartiküllerin partikül boyutu ölçümlerinin asıl amacı, nanopartikül şeklinde değişim sağlanıp sağlanmadığına ilişkin kestirim yapılması ve bu sayede yüksek maliyetli olan SEM ve TEM analizleri için seçilecek numunelerin daha doğru bir şekilde belirlenebilmesi olmuştur.

Farklı geometrik şekillerdeki boş ve etkin madde yüklü nanopartiküllere ilişkin partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerlerine ilişkin Tablo 4.6. (s.98) incelendiğinde küresel nanopartiküllere kıyasla daha büyük ve farklı boyutlarda çubuk ve eliptik disk şeklinde olduğu varsayılan nanopartiküller tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ). Etkin madde içermeyen, boş KNP, ÇNP ve EDNP'lere ilişkin partikül boyutları sırasıyla  $163,2 \pm 0,70$  (AR:  $\sim 1,0$ ),  $375,5 \pm 3,55$  (AR:  $4,0 \pm 0,5$ ) ve  $294,3 \pm 1,60$  nm (AR:  $7,5 \pm 0,5$ ) olarak ölçülmüştür (Şekil 4.11., 4.13., 4.15., s.99-101). DLS yönteminin çalışma prensibi, dispersiyon ortamı içerisinde Brownian hareketi yapan küresel partiküllere gönderilen ışınların saçılma açısı yardımıyla hidrodinamik çapın ölçülmesidir (258). En-boy oranındaki değişikliğin (ÇNP ve EDNP) numunelere gönderilen lazer ışınlarının, küresel nanopartiküllere kıyasla daha farklı açılarla saçılım yapmasına neden olduğu ve bu sebeple ortalama partikül boyutunda bir artışa neden olduğu düşünülmektedir. Bu duruma benzer çalışmalar literatürde mevcuttur. Örneğin tez çalışmalarımıza benzer şekilde, Choi ve arkadaşları (89) tarafından paklitakselin PLGA nanopartiküllerine yüklendiği ve film germe yöntemi ile küresel nanopartiküllerden iki farklı şekilde nanopartikülün üretildiği bir çalışmada, DLS yöntemi ile analiz sonucunda elde edilen ortalama partikül boyutlarının germe oranı ile ilişkili olarak yaklaşık 152 nm'den 204 nm ve 257 nm'ye ulaştığı tespit edilmiştir. Amini ve arkadaşlarının (197) gerçekleştirdiği bir diğer araştırmada imipenem ile fonksiyonelleştirilmiş küresel ve çubuk şeklinde altın nanopartiküller üretilmiş, şekil değişikliği DLS ve TEM yöntemleri ile incelenmiştir. DLS sonuçları incelendiğinde küresel altın nanopartiküllerin ortalama partikül boyutları yaklaşık 10-15 nm iken daha yüksek en-boy oranına sahip çubuk şeklindeki nanopartiküllerin boyutları 40-55 nm olarak ölçülmüştür. Nano ZS sonuçları şekil değişimine yönelik bir öngörü olup, TEM analizi ile üretilen NP'lerin şekli doğrulanmıştır. Farklı şekildeki nanopartiküllerin üretiminde öncü olan Mitragotri ve grubu tarafından yapılan bir diğer çalışmada (259) ise küresel polistiren nanopartiküller üretilmiş ve takibinde film germe yöntemiyle çubuk ve disk şekline dönüştürülmüştür. DLS analizi ile elde edilen ortalama partikül

boyutları sırasıyla küresel, çubuk ve disk şekli için 245 nm, 394 nm ve 293 nm olarak bildirilmiş olup, çalışmalarımızla benzer boyut artışları gözlenmiştir. Literatür örneklerinden de anlaşılacağı üzere, özellikle küreselden hareketle farklı şekillerde NP'lerin hazırlandığı yöntemlerde (örneğin; film germe yöntemi) NP boyutu değişmektedir, dolayısıyla DLS analiz sonuçları şekil değişiminin başarıyla sağlandığına ilişkin bir gösterge niteliğindedir. Nanopartiküllere galunisertib ve fragmante nivolumab yüklenmesini takiben DLS analizleri tekrarlanmış ve etkin madde yüklemenin tüm şekiller için partikül boyutu üzerinde bir artışa neden olmadığı ( $p>0,05$ ) belirlenmiştir. Polimerik nanopartiküllerde etkin maddeler polimerin ağısı yapısı içerisine enkapsüle olduğu için, boyutta artış olmaması beklenen bir durumdur. Nanopartiküllerdeki şekil değişimini doğrulamak amacıyla boş nanopartiküller için ayrıca TEM analizi gerçekleştirilmiş, sonuçların yorumlanması bölüm 5.3.3.'te yapılmıştır.

İlaç taşıyıcı sistem olarak nanopartiküllerin PDI değerinin 0,2'den küçük olması nanopartikül dispersiyonunun monodispers bir dağılıma sahip olduğunu göstermektedir (243, 260, 261). Tablo 4.6.'da yer alan PDI değerleri incelendiğinde: kombine etkin madde yüklü çubuk nanopartiküller (PDI: 0,37) hariç tüm nanopartiküller için  $PDI<0,2$  koşulunun sağlandığı (0,04 ila 0,22 aralığında) yorumu yapılabilir. Küresel olmayan nanopartiküllerin PDI değerindeki artışın ( $p>0,05$ ) üretim yöntemi ve filmin uzaklaştırılması amacıyla yapılan çoklu santrifüj işlemlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Patil ve arkadaşlarının (262) yaptığı benzer bir çalışmada emülsifikasyon/çözücü buharlaştırma yöntemiyle hazırlanan küresel polimerik (Eudragit® S100) nanopartiküllerinden hareketle film germe yöntemiyle çubuk benzeri nanopartiküller üretilmiş, iki farklı şekil için partikül boyutu ve PDI değerlerindeki değişim DLS yöntemi ile incelenmiştir. Nanopartiküllerin hem boyut (86,29 nm'den 552,4 nm'ye) hem de PDI değerindeki artışın (0,09'dan 0,293'e) çalışmalarımızla uyumlu olduğu bulunmuştur. Partikül boyutu ve PDI değerindeki artış, küresel NP'lerin film germe işlemi sırasında çubuk benzeri şekle dönüştürülmüş olabileceğini düşündürmüş olup, şekil değişimi SEM ve TEM analizleri ile doğrulanmıştır.

Zeta potansiyeli, koloidal sistemlerin stabilitesi için önemli bir parametre olup, küresel, çubuk ve eliptik disk şekline sahip nanopartikül formülasyonlarının zeta

potansiyelleri Malvern Nano ZS ile tayin edilmiş ve Şekil 4.12., 4.14., 4.16.'da (s.99-101) sonuçlara ilişkin grafikler verilmiştir. Zeta potansiyelin mutlak değerinin yüksek olması, dispersiyon ortamında bulunan aynı yüklü partiküllerin birbirini iterek agregasyonun önüne geçilmesi açısından önemlidir. Yüksek stabilite için zeta potansiyelinin  $\pm 25$  mV'tan büyük olması (263) (bazı kaynaklara göre  $\pm 30$  mV (264, 265)) önerilmektedir (263). Boş nanopartiküllerle elde edilen zeta potansiyel değerleri küresel nanopartiküller için en yüksek iken (-18,3 mV), eliptik disk şekline sahip nanopartiküllerde bu değer daha düşük olduğu (-12,9 mV) tespit edilmiştir ( $p > 0,05$ ). Bu durum literatür ile uyumlu bulunmuştur. Örneğin, Cao ve grubu (195) tarafından üretilen küresel PLGA nanopartikülleri film germe yöntemi ile çubuk şekline dönüştürülmüş ve zeta potansiyelin yaklaşık -40 mV'den -18,5 mV olarak düştüğü (mutlak değer olarak) belirlenmiş, bu durumun da üretim yönteminden kaynaklı NP yüzeyinde kalan PVA kalıntılarından olabileceği belirtilmiştir. Genel olarak üç şekil için zeta potansiyeli değerleri yüksek stabilite için verilen değer dışında olmakla birlikte, modifiye polimer yapısında bulunan PEG'in, PLGA'nın negatif yükünü (266-268) nötral değerlere kaydırması nedeniyle daha düşük değerler elde edilmiştir (269).

Deney sonuçlarımızı destekleyen bir literatür örneği olarak, Pamujula ve arkadaşları (270) tarafından meme kanserinde kullanılmak amacıyla hazırlanan PLGA nanopartikülleri verilebilir. Bu çalışmada, çeşitli oranlarda (% 5, 10, 15) PEG içeren PLGA (50:50) nanopartikülleri çift emülsifikasyon/çözücü buharlaştırma yöntemiyle hazırlanmış ve Nano ZS ile zeta potansiyelleri incelendiğinde sadece PLGA ile hazırlanan nanopartiküllerin -26,24 mV gibi yüksek bir zeta potansiyele sahip olmasının yanında, % 15 diblok PEG içeren PLGA nanopartiküllerinin -2,8 mV gibi neredeyse nötral bir değere sahip olduğu tespit edilmiştir. Zeta potansiyeli en düşük olan PEG ile PLGA nanopartiküller aynı zamanda en düşük partikül boyutuna (114 nm) sahip olmasından kaynaklı, meme kanseri hücrelerine (4T1) en yüksek alımı göstermiştir.

KNP ve EDNP formülasyonlarının zeta potansiyeli anyonik iken (mutlak değer  $> 10$  mV), ÇNP yaklaşık olarak nötrdür (mutlak değer  $< 10$  mV). Yıkama işlemleri sonrası nanopartikül yüzeyinde kalan yüzey aktif madde (PVA) zeta potansiyeli etkileyebilmektedir. PVA içeren film kullanılarak hazırlanan ÇNP ve EDNP'lerin, PVA'da bulunan hidroksil grupları (-OH) nedeniyle küresel nanopartiküllere kıyasla

daha düşük bir zeta potansiyel değeri göstermiş olduğu düşünülmektedir. Bu durum yukarıda da bahsedildiği üzere literatürle uyumlu bulunmuştur (195). Sonuçlar neticesinde, PVA kalıntılarının uzaklaştırılması amacıyla film germe sonrası yıkama işlemlerinin artırılması gerektiği tespit edilmiştir. Bölüm 4.4.5.'te de görüldüğü üzere (s.107 ve s.108) ÇNP ve EDNP'lerde salım KNP'lere kıyasla düşük olup, yıkama prosedürü sayısının artırılması (>4 kez) yüklü ilacın daha fazla kaybına ve nanopartiküllerde agregasyon problemine sebep olduğu için yıkama prosedüründe değişiklik yapılmamıştır. Nano ZS'nin ölçüm prensibi, hem partikül boyutu hem de zeta potansiyeli açısından küresel şekiller için optimize olduğu için farklı şekillerdeki nanopartiküllerin zeta potansiyeli ölçümüne yönelik elektroakustik ölçüm yöntemi tercih edilerek daha kesin sonuçlar elde edilebilir (271, 272).

### **5.3.2. Enkapsülasyon Etkinliği ve Yükleme Kapasitesinin Değerlendirilmesi**

Nanopartiküllere yüklenen etkin madde miktarlarının belirlenebilmesi ve bu sayede tezin ileri aşamalarında gerçekleştirilecek *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda kullanılacak nanopartikül dozunu öngörmek amacıyla enkapsülasyon etkinliği ve ilaç yükleme kapasitesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Nivolumab fragmanı ve galunisertib yüklü PLGA temelli nanopartiküller için elde edilen sonuçlar Tablo 4.7.'de (s.102) verilmiştir. Galunisertibin, henüz onay almış bir preparatı olmaması sebebiyle literatürde sınırlı sayıda nanoboyutlu ilaç taşıyıcı sisteme yükleme çalışması bulunmaktadır (273-275). Galunisertibin PLGA nanopartiküllerine yüklenmesine ilişkin bir çalışma olmadığı için elde edilen enkapsülasyon etkinliklerinin literatürle kıyaslaması yapılamamıştır. Ancak, enkapsülasyon etkinliğinin *in vivo* doz için yeterli olduğu ileri çalışmalarda (*in vitro* salım ve hücre kültürü çalışmaları) tespit edilmiştir. Galunisertibin nanosisteme enkapsüle edildiği nanosistemler genellikle lipit yapılı (274, 276) olmakla birlikte polimerik yapılı matrikslerin kullanıldığı çalışmalar da bulunmaktadır. Örneğin Huang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (275) kolorektal kanser tedavisinde kullanılmak üzere galunisertib ve Klorin e6 molekülleri ve PEG-blok-poli (2-diizopropilmetakrilat) di blok kopolimeri kullanılarak nanopresipitasyon yöntemi ile polimerik nanopartiküller hazırlanmış ve galunisertibin yükleme kapasitesi çalışmalarımıza benzer şekilde düşük (% 3,35) bulunmuştur.

Antikorların nanopartiküllere yüklenmesi son 10 yılda yaygın hale gelmiş ve antikorun hedef bölgeye ulaşana kadar dayanıklı kalmasını sağlamak amacıyla bir strateji olarak polimerik nanopartiküller kullanılmıştır. Antikorlar, büyük boyutlarından dolayı (~150 kDa (277)), küçük moleküllere kıyasla nispeten düşük ve değişken enkapsülasyon etkinliklerine sahiptir. Ek olarak, antikorların tedavi edici dozu düşük olduğu için % yükleme kapasitesi ölçümünde birim dönüşümü yapılması ( $\mu\text{g}$ 'dan  $\text{mg}$ 'a) sonuçların çok düşük yüzdede olmasına neden olmaktadır (278). Örneğin, Ordikhani ve arkadaşları (72) tarafından anti-PD-1 yüklü mPEG-PLGA (50:50) nanopartikülleri çift emülsifikasyon/çözücü buharlaştırma yöntemiyle hazırlanmış ve enkapsülasyon etkinliği ~% 26,2 bulunmuştur. Colzani ve arkadaşları (279) tarafından yapılan benzer bir çalışmada ise trastuzumab (MA: 148 kDa) yüklü PLGA (50:50) nanopartikülleri çift emülsifikasyon/çözücü buharlaştırma yöntemi hazırlanmış ve enkapsülasyon etkinliklerini % 37,5, yükleme etkinliklerini ise % 2,9 olarak hesaplamışlardır. Aynı yöntemle (çift emülsifikasyon) hazırlanan PLGA (50:50) nanopartiküllere bevasizumabın yüklendiği bir diğer çalışmada (280) ise enkapsülasyon etkinliği % 82,5 bulunurken, ilaç yükleme kapasitesi % 1,62 bulunmuştur. Tez kapsamında antikor fragmanı ile çalışılmasının en önemli tercih sebeplerinden birisi nanopartiküllere daha yüksek %'de etkin madde enkapsülasyonunu sağlamaktır. Bu strateji ile galunisertibin de yükleme etkinliğinin artırılması planlanmıştır. Nivolumab için literatürde  $\text{F}(\text{ab}')_2$  fragmanının nanosisteme yüklendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu durum, tezin özgün yanlarından birisini oluşturmaktadır. Literatür incelemesi yapıldığında, fragmante antikorların çoğunlukla hedefleme ligandı olarak tercih edildiği görülmektedir (112, 281-283). Yakın zamanda, literatürde, fragmante antikorların enkapsülasyonuna ilişkin çalışmaların da yapılmaya başladığı görülmektedir (284).

Nivolumab  $\text{F}(\text{ab}')_2$  fragmanının enkapsülasyon etkinliği (% 59,20) galunisertibe (% 9,59) kıyasla anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Bu durumun sebebi, nivolumabın iç su fazına eklenmesi, dolayısıyla dış su fazı ile arasında oluşan organik faz engeli sayesinde maddenin dış faza kaçma olasılığının düşmesi olarak yorumlanmıştır (285). Yükleme kapasitesi değerleri incelendiğinde ise, yüksek enkapsülasyon değerine rağmen yukarıda bahsedildiği üzere antikorların düşük dozda

kullanımı sebebiyle düşük yükleme kapasitesi ( $\sim$  % 0,2) değerleri gözlenmiştir. Bu duruma benzer örnekler literatürde mevcuttur. Örneğin, Gdowski ve arkadaşları (278) tarafından hazırlanan PLGA (50:50) nanopartiküllerine Annexin A2 antikorunu yüklemiş ve enkapsülasyon etkinliğini % 16-22 arasında bulmasına rağmen, yükleme kapasitesi değerleri % 0,3-1,12 arasında bulunmuştur. Benzer bir çalışma Caputo ve arkadaşları (286) tarafından gerçekleştirilmiş, trastuzumab yüklü PLGA (50:50) nanopartiküller için EE ve YK değerleri sırasıyla % 58,7 ve % 1,4 bulunmuştur.

Tüm bu tartışmanın yanında üç farklı şeklin EE% ve YK% değerleri kıyaslandığı zaman, her iki etkin madde için ÇNP ve EDNP üretiminde yer alan çoklu yıkama işlemleri sebebiyle nanopartiküllere yüklü/adsorbe olan etkin maddede bir miktar kayıp ( $p>0,05$ ) gözlenmiştir. Sonuç olarak küresel nanopartiküller için EE% ve YK% değerleri, *in vitro* salım sonuçları (Şekil 4.21. ve 4.22., s.107 ve s.108) da dikkate alınarak hücre kültürü çalışmaları için yeterli ve uygun bulunmuş olup, ÇNP ve EDNP'nin EE ve YK değerleri uygun olmasına rağmen, salım sonuçları dikkate alınarak sonraki aşamalar için yetersiz etkinlik gözlenebileceği öngörülmüştür.

### 5.3.3. Morfolojik Analiz

Tez kapsamında, farklı şekillerdeki nanopartiküllerin görüntülenmesi TEM analizi ile gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.17.'deki (s.103) görüntünün incelenmesi sonucunda, PLGA küresel nanopartiküllerinin düzgün yüzey morfolojisine sahip oldukları ve küresel/küresele yakın şekil gösterdikleri belirlenmiştir. Nano ZS ile elde edilen küresel partikül boyutları ( $\sim$ 178 nm) ile TEM görüntülerindeki ölçek kullanılarak ölçülen boyutlar kıyaslandığında, beklendiği şekilde TEM ile daha küçük boyutlar elde edildiği ( $\sim$ 130-140 nm) tespit edilmiştir. DLS yöntemi ile nanopartikülün bir dispersiyon ortamı içindeki difüzyon katsayısı baz alınarak hidrodinamik çap ölçümü yapılması ve çok sayıda partikül boyutu incelenerek sonuçların ortalama değer olarak verilmesi bu farklılığın nedeni olarak verilebilir. Buna karşılık TEM analizinde az sayıda partikül incelenmesi, partiküllerin kuru ve tek haldeki geometrik boyutlarının ölçümünün yapılması da boyut farkının sebeplerindedir (287, 288). Örneğin, nanopartikülün DLS yönteminde kısa veya uzun kenarına göre konumlanması, saçılan ışımın açısını doğrudan etkilediği için küresel NP'lerdeki gibi tek tip bir saçılım görmek mümkün olmamaktadır. Çubuk ve eliptik disk şeklindeki

nanopartiküllere ilişkin TEM görüntüleri incelendiğinde (Şekil 4.18 ve 4.19., s.104) her iki şeklin başarıyla üretildiği doğrulanmıştır. Hem çubuk hem de eliptik disk şeklindeki nanopartiküllerin partikül yüzeyindeki kalıntıların film üretiminde kullanılan PVA'ya ilişkin olduğu, yıkama işlemine rağmen bir miktar PVA'nın NP yüzeyinden uzaklaştırılmadığı düşünülmektedir.

#### 5.3.4. DSC Analizi

Nanopartiküllerin *in vitro* karakterizasyon çalışmaları kapsamında, DSC analizi ile termal özelliklerinin belirlenmesi ve etkin madde enkapsülasyonlarının doğrulanması gerçekleştirilmiştir. Elde edilen termogramlar, polimerik matriks içindeki etkin madde-polimer etkileşimini tespit etmek amacıyla kullanılmıştır. Şekil 4.20.'de (s.105) verilen DSC termogramı incelendiğinde, etkin maddelerin fiziksel karışımında (yeşil renkli termogram), 218,22 °C'de nivolumab fragmanı; 241,0 °C'de ise galunisertibe ilişkin erime pikleri (etkin maddenin erimesine bağlı ekzotermik pik (289)) görülmektedir. Analiz sonucunda, galunisertib (245) ve nivolumab için elde edilen erime pikleri literatürle uyumlu bulunmuştur. Galunisertibin monohidrat formunun literatüre benzer şekilde 130-135 °C arasında verdiği pikin dehidratasyona ve faz geçişine bağlı olduğu tespit edilmiştir (290). Bu pik zayıf da olsa boş NP-etkin madde fiziksel karışımında (mavi renkli termogram) gözlenmekle birlikte, nanopartiküllerde enkapsülasyona bağlı olarak kaybolmuştur. Literatürde, antikorlar için genellikle 70-90 °C'de erime pikleri gözlenmekte (291, 292) ancak antikorun bütün veya fragmente halde olması erime derecesini değiştirmektedir (293). Nanopartikül numunesinde (kırmızı renkli termogram) etkin maddelere özgü piklerin bulunmadığı gözlenmiştir. Bu durum enkapsülasyonun başarıyla gerçekleştiğini göstermektedir (294, 295).

#### 5.3.5. *In Vitro* Salım Çalışmaları

72 saat süresince gerçekleştirilen salım çalışması sonucu elde edilen profiller değerlendirildiğinde, küresel nanopartiküllerden hem galunisertib (Şekil 4.21., s.107) hem de nivolumabın (Şekil 4.22., s.108) çubuk ve eliptik disk şekilli nanopartiküllere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir farkla ( $p < 0,05$ ) yüksek salımı gözlenmiştir. Bu durumun birincil sebebi, farklı şekillerde nanopartiküllerin üretimi sırasında yapılan

çoklu yıkama işlemleri sonucu nanopartiküle enkapsüle ve/veya adsorbe olan etkin maddelerin bir bölümünün kaybedilmesidir (89). Sonuca yönelik, kombine etkin madde yüklü ÇNP ve EDNP'lerden germe işlemi sonrası yapılan yıkama işlemlerinden elde edilen süpernatantlar toplanarak analiz edilmiş ve yıkamada kaybedilen etkin madde miktarları, başlangıçta enkapsüle olan etkin madde miktarının ~% 5'i olarak ölçülmüştür. Farklı şekillerdeki nanopartiküllerin yüzeyindeki PVA tabakasının yıkama ile tamamen uzaklaştırılmadığı, bu sebeple nanopartiküllerin yüzeyinde kalan PVA'nın salım için bir sterik engel oluşturduğu da düşünülmektedir (195). Ek olarak, partikül şeklinin herhangi bir üretim yönteminden bağımsız salım profilinde farklılık oluşturduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (89, 296-298). Örneğin, Yan ve arkadaşları (297) tarafından tümör tedavisinde kullanılmak üzere hazırlanan çubuk ve kuyruklu yıldız şeklindeki hidroksikamptotesin yüklü PEG-b-PLGA nanopartikülleri hazırlanmış ve diyaliz membran yöntemi ile pH 7,4 koşullarında salım çalışması gerçekleştirilmiştir. Polimerik kabuk sebebiyle kontrollü ve uzun süreli salım sağlayan NP'ler için elde edilen salım profilleri incelendiğinde, 400. saatin sonunda nanoçubuklardan yüklü ilacın % 90 salımı gerçekleşirken, kuyruklu yıldız şeklindeki NP'lerden salımın % 70'lerde kaldığı gözlenmiştir. Bir diğer çalışmada, Gharebaghi ve grubu (298) meme kanseri tedavisi amacıyla metotreksat yüklü küresel ve solucan benzeri şekilde PEGile polikaprolakton NP'ler hazırlamış ve diyaliz membran yöntemi ile pH 7,4 koşullarında salım analizi gerçekleştirmiştir. Solucan benzeri NP'lerin kümülatif salımda platoya 120 saat içinde ulaştığı, küresel NP'lerin ise daha hızlı salım yaparak platoya 72 saat içinde ulaştığı belirlenmiştir.

Antikor, peptit/protein gibi makromoleküllerin enkapsüle/konjuge olduğu PLGA nanosistemlerle yapılan salım çalışmaları incelendiğinde, birkaç haftaya kadar uzayabilen salım profilleri gözlenmiştir (278, 299, 300). Tez kapsamında nivolumabın salım profilini iyileştiren yaklaşımlardan faydalanılmıştır. Örneğin, çalışmalarımız kapsamında tercih edilen polimer bileşimi hidrofobik yapıdaki galunisertib ve hidrofilik yapıdaki nivolumabın optimum salımını sağlayacak şekilde (50:50 PLA:PGA, PEGile) seçilmiş ve üçlü polimer bileşimi etkin maddelerin optimum salımını sağlayacak şekilde belirlenmiştir. Ek olarak nanopartiküllerin yüzeyi PEG ile modifiye ederek hidrofiliklikliği artırılmıştır (301). Bir diğer yaklaşım olan histidin

konjuge PLGA polimeri sayesinde, tümör mikroçevresindeki düşük pH koşullarında salım hızlandırılmıştır. pH duyarlı polimerlerle hazırlanan nanosistemlerin, düşük pH'da daha hızlı parçalandığı ve etkin madde salımının pH 7,4 ortamına kıyasla daha hızlı gerçekleştiği bilinmektedir (302). Her iki etkin madde için salım profilleri incelendiğinde pH 6,8 ortamında etkin madde salımının, pH 7,4 ortamına kıyasla daha yüksek olduğu görülmekte olup, bu durum literatürle uyumlu bulunmuştur (303, 304). Geliştirilen nanopartiküllerin, *in vitro* koşullarda düşük pH'da artan etkin madde salımı göstermesi, tümör mikroçevresini taklit etmesi açısından değerli bir bulgu özelliği taşımaktadır. Buna rağmen, tek başına *in vitro* salım sonuçlarından yola çıkılarak salım profili hakkında kesin bir sonuca ulaşmak mümkün değildir. Her ne kadar salım çalışmaları sırasında sink koşulu sağlanmış olsa da nanopartiküllerin *in vivo* uygulamadaki davranışını, fizyolojik etkileşimleri birebir taklit etmek olanaksız görülmektedir. Genellikle, *in vitro* çalışmalarla elde edilen sonuçlar ile *in vivo* çalışmalar arasında farklılıklar gözlenebilmektedir (305).

#### 5.4. Farklı Şekillerdeki Nanopartiküllerin *İn Vitro* Sitotoksosite Çalışmaları

Şekil değişikliğinin PLGA nanopartiküllerinin toksisitesini etkileyip etkilemediğini araştırmak için planlanan MTT çalışmaları, 10-500 µg/mL konsantrasyon aralığında, 24 ve 48 saat olarak iki zaman noktasında, L929 hücreleri üzerinde gerçekleştirilmiştir. Şeklin toksisite üzerine etkisi incelendiğinde (Şekil 4.23, s.109), uygulanan nanopartikül miktarına bağlı olarak her iki zaman noktasında üç şekil için de tüm konsantrasyonlarda benzer hücre canlılıkları bulunmuştur ( $p>0,05$ ).

Toksisitede şekle bağlı fark gözlenmesi için üç grup arasında hücre içine alımların farklı olması gerekmektedir. Literatürde benzer şekilde, silika, altın veya polistiren temelli nanopartiküllerin farklı şekillerinin kıyaslandığı çalışmalarda şeklin küreselden çubuklara, silindirlere, disklere veya solucan benzeri geometrilere dönüştürülmesi hücre canlılığını anlamlı derecede etkilememiştir (306-309). Örneğin, Zhao ve arkadaşlarının (296) gerçekleştirdiği bir çalışmada yaklaşık 150 nm boyuttaki etkin madde içermeyen küresel (AR:~1), kısa çubuk (AR: ~2) ve uzun çubuk (AR: ~4) şeklindeki mezopor silika nanopartiküllerin insan kolon karsinoma (Caco-2) hücreleri üzerindeki toksisiteyi incelenmiş ve üç şekil için de 50-1000 ppm konsantrasyon

aralığında benzer ve düşük toksisite profili gözlenmiştir. Farklı şekillerdeki nanopartiküllerin hücre içine alım süresi ve miktarı bazı durumlarda istatistiksel açıdan anlamlı farklılık gösterebilmektedir. Bu kapsamda, sağlıklı hücreler üzerinde özellikle en-boy oranı yüksek olan nanopartiküllerin küresel olanlara kıyasla daha yavaş hücre içine alındığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (279, 280).

### 5.5. Farklı Şekillerdeki Nanopartiküllerin Hücre İçine Alımının Değerlendirilmesi

Kontrol grubu ve farklı şekillerdeki nanopartiküllerin akım sitometri ile analizi yapılmış ve sonuçlar MFI cinsinden sayısal olarak ifade edilmiştir (Şekil 4.24., s.110). MFI değerleri üç farklı şekil için kıyaslandığı zaman, en yüksek hücre içine alımı küresel nanopartiküllerin gösterdiği belirlenmiştir. Nanopartiküllerin hücrelerle etkileşimi ve endositozu nanopartikül şekli ile doğrudan ilişkilidir (74, 78). KNP'lerin, ÇNP ve EDNP'lere kıyasla hücreler tarafından daha yüksek alım oranı temas açısı ile açıklanabilir. Nanopartikülün hücre ile temas eden en geniş yüzeyi ile hücre membranı arasındaki açı (temas açısı,  $\theta$ ), nanopartiküllerin hedef hücre içine alımı amaçlandığında dikkate alınması gereken önemli bir parametredir. Küresel NP'ler tüm açılardan bakıldığında simetrik bir şekle sahip olduğu için, temas açısından ( $\theta$ ) bağımsız olarak hücre içine alınmaktadır. Bununla birlikte, çubuk, eliptik disk, iğne vb. şekillerde olan yüksek en-boy oranına sahip nanopartiküller ise uzun eksen hücre membranında dik konumlandığı zaman hücreye daha hızlı alınırken, uzun eksen membrana paralel konumlandığında alım yavaşlamaktadır (310). Deney sonuçları incelendiğinde, EDNP'lerin (AR:  $7,5 \pm 0,5$ ) ÇNP (AR:  $4,0 \pm 0,5$ ) ve KNP (AR:  $\sim 1,0$ )'lere kıyasla daha yavaş hücre içine alınması, NP'lerin en-boy oranları arasındaki fark ile ilişkilendirilmiştir. Özellikle, yüksek AR değerine ( $\sim 20$ ) sahip partiküller uzun eksenleri hücre membranına paralel olacak şekilde hizalanmakta ve dolayısıyla hücre içine alımları daha yavaş olmaktadır (310). Örneğin Zhang ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir çalışmada (83) küresel (AR:  $\sim 1$ , 90 nm boyut) ve iğne (AR:  $\sim 18$ , 30 nm boyut) şeklindeki PLGA-PEG nanopartiküllerin insan karaciğer kanseri (HEPG2) hücrelerine alımı incelenmiş ve küresel NP'lerin iğne şeklindeki NP'lere kıyasla hücre içine iki kattan daha fazla alındığı belirlenmiştir. Tüm bu bilgiler doğrultusunda, literatürde aksini gösteren çalışmalar (259, 311, 312) olmakla birlikte

genel görüş; küresel nanopartiküllerin çubuk, tüp veya fiber gibi yüksek en-boy oranlı NP'lere kıyasla hücre içine daha kolay alındığı yönündedir (310, 313). Küresel şekilli partiküllerin fagositik hücreler tarafından alımı, farklı şekilli NP'lerden daha yüksek olmakla birlikte, diğer hücreler (örneğin; kanser hücreleri) tarafından alımı da daha kolay olmaktadır (314). Tez kapsamında gerçekleştirilen KHDAK hücreleri içine alım deney sonuçları, yukarıda bahsedilen literatür örneklerini destekler niteliktedir.

Hücre içine alımın değerlendirilmesi amacıyla ek olarak floresan mikroskop ile görüntüleme yapılmış ve nanopartiküllerin KHDAK hücrelerine giriş özellikleri kalitatif olarak da tayin edilmiştir. Polimerin (mPEG-PLGA-FKR560) floresan özelliği kullanılarak elde edilen ışımaya şiddetleri dikkate alındığında, nanopartiküllerin KHDAK hücresi içine girme yeteneği, küresel>çubuk>eliptik disk şeklinde sıralanmaktadır. Bu durum akım sitometri analiz sonuçlarını destekler nitelikte olup, küresel PLGA nanopartiküllerin A549-Luc2 hücrelerine giriş yeteneğinin en yüksek olduğunu göstermektedir. Nanopartiküllerin hücrelerle etkileşiminde şeklin yanında boyut ve zeta potansiyelin de etkisi bulunmaktadır. Hazırlanan nanopartiküller farklı boyut ve zeta potansiyellere sahip olduğu için hücre içine alımda bu iki fizikokimyasal parametrenin de etkili olma olasılığı dikkate alınmalıdır. Nötral veya zayıf yüklü (<10 mV) NP'lere kıyasla, yüksek pozitif veya negatif zeta potansiyele sahip NP'ler, çeşitli hücre tiplerinde farklı alım davranışları gösterebilir (74). Pozitif yüklü nanopartiküller hücre yüzeyindeki negatif yüklü proteoglikanlara bağlanarak hücreye alıma olumlu yönde etki edebilirken (313, 315, 316) aksine, fagositik hücreler anyonik NP'lerin alımını daha fazla tercih etmektedir (51). Ancak genel görüşün aksine, belirli koşullar altında, negatif yüklü nanopartiküller, yüzeyinde pozitif yüklü proteinleri taşıyan hücrelere bağlanabilir ve bu durum bir hedefleme stratejisi olarak kullanılabilir (317). Bu durumun bir örneği olarak, Patil ve arkadaşları (318) tarafından hazırlanan negatif yüklü (-42,5 mV) seryum oksit NP'lerin, insan akciğer adenokarsinom hücreleri (A549) tarafından pozitif yüklü muadillerine (+41,6 mV) kıyasla daha yüksek oranda alımı bildirilmiştir. Hücresel membranın negatif yüklü olmasına rağmen katyonik alanlar da bulundurmasının, negatif zeta potansiyele sahip seryum oksit NP'lerin belirtilen katyonik alanlara bağlanarak hücre yüzeyinde daha yüksek oranda birikmesine sebep olduğu düşünülmektedir. Tez kapsamında, aynı hücre hattı kullanarak gerçekleştirdiğimiz hücresel alım deneyine ilişkin sonuçlar incelendiğinde,

en yüksek negatif zeta potansiyel değerine sahip olan küresel (Tablo 4.6.) NP'lerin KHDAK hücreleri tarafından en yüksek oranda alım göstermesi, Patil ve grubu tarafından yapılan çalışma sonuçlarını destekler niteliktedir. EDNP'nin (-12,9 mV) ÇNP'ye (-0,62 mV) kıyasla yüksek negatif zeta potansiyele sahip olmasına rağmen daha düşük hücre alım göstermesinin sebebinin ise NP boyutlarının farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Her iki NP'ye ilişkin TEM görüntülerinden hareketle hesaplanan AR değerleri (EDNP: ~7,5; ÇNP: ~4,0) kıyaslandığı zaman EDNP'lerin uzun kenarının ÇNP'ye kıyasla daha büyük olmasının hücre içine alımı yavaşlattığı düşünülmektedir.

Çalışmalarımızda üç farklı şekildeki NP'lerin her biri farklı boyutta olduğu için boyuta bağlı bir alım da söz konusudur. Literatürde, nanopartiküllerin tümör hücreleri tarafından boyuta bağlı alım gösterdiğini bildiren çalışmalar mevcuttur (319-322). İlaç taşıyıcı nanosistemlerde, EPR etkisinden yararlanarak tümöre hedefleme amacıyla genellikle 50-200 nm boyutlarında nanopartiküller tercih edilmektedir (242). Bu literatürü destekleyen bir çalışma Choi ve arkadaşları (319) tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, farklı boyutlarda (70, 100, 200, 400, 600, 1000 nm) floresan özellikli kumarin-6 yüklü PLGA nanopartiküllerinin epitelyal karsinoma hücrelerine alımı (4 sa) incelenmiş ve partikül boyutu küçüldükçe tümör hücrelerine alımın arttığı, en yüksek hücre içine alımın 70 nm boyutuna sahip NP'lerde gözlemlendiği belirlenmiştir. Bir diğer çalışmada, Tang ve arkadaşları (323) tarafından iki farklı boyutta (50 ve 200 nm) üretilen silika nanokonjugatları floresan görüntüleme amacıyla rodaminle işaretlenmiş ve serviks kanser hücre hattı (HeLa) ile hücre içine alım çalışmaları 1 saat inkübasyon süresi ile gerçekleştirilmiştir. Sonuçta 50 nm boyutundaki NP'lerin 200 nm'ye kıyasla tümör hücreleri içine alımının daha yüksek olduğu belirlenmiştir ( $p < 0,05$ ). Tez kapsamında hazırlanan farklı şekillerdeki NP'lerle literatüre benzer sonuçlar elde edilmiş; şekilden bağımsız düşünüldüğünde, en küçük partikül boyutuna sahip KNP'lerin A549 hücrelerine alımı en yüksek bulunmuş, en büyük boyuta (TEM görüntüleri dikkate alındığında) sahip EDNP'lerin alımı en düşük bulunmuştur. Sonuç olarak, hücre alımında deney sonuçlarının değerlendirilmesinde, nanopartiküllerin en önemli fizikokimyasal parametrelerinden olan partikül boyutu, zeta potansiyel ve partikül şekli bir bütün olarak incelendiğinde, sonuçlar literatürle uyumlu bulunmuş olup küresel şeklin hedefli ilaç taşıyıcı sistem olarak

kullanılmasının üstünlük sağlayabileceği değerlendirilmiştir.

### 5.6. Biyodağılım Çalışmaları

Biyodağılım çalışmaları, heterotopik tümör geliştirilmesini takiben polimer çözeltisi ile küresel, çubuk ve eliptik disk şeklindeki NP'lerin CD-1 nude farelere (n=3) uygulanmasıyla gerçekleştirilmiştir. Uygulamayı takiben 16. saatte sakrifiye edilen farelerin çeşitli organ ve tümör dokuları çıkarılarak IVIS cihazında görüntülemesi (Şekil 4.27., s.112) gerçekleştirilmiştir. IVIS görüntülerinden elde edilen ortalama floresans yoğunluklar ile oluşturulan grafik (Şekil 4.28., s.113) incelendiğinde, polimer çözeltisinin tümör ve karaciğerde yüksek miktarda biriktiği tespit edilmiştir. Polimerin çözelti halinde olduğu durumlarda, NP'lere kıyasla küçük olması sebebiyle hızlı bir eliminasyona uğraması ve bu sebeple karaciğerde birikmesi beklenen bir durumdur (324). Çubuk şeklindeki nanopartiküllerin diğer iki şekle kıyasla tümör dokusunda en fazla birikim yaptığı görülmektedir, ancak bu durum istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde, üç şekil arasında anlamlı bir fark olmadığı ( $p>0,05$ ) tespit edilmiştir. Kıyaslamalar, ikili gruplar halinde (küresel-çubuk, küresel-eliptik disk, çubuk-eliptik disk, Mann Whitney U Testi) ve üç grup aynı anda değerlendirilecek şekilde (Kruskal-Wallis Testi) yapılmıştır. Farklı şekiller için diğer organlardaki MFI değerleri de istatistiksel açıdan değerlendirilmiş ve herhangi bir organda birikim açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir ( $p>0,05$ ). Bu durum, çalışmamızda tercih edilen PLGA/PLGA-His/mPEG-PLGA-FKR560 polimeri ile üretilmiş farklı şekillerdeki nanopartiküllerin, KHDAK tümörü geliştirilmiş CD-1 nude farelerde benzer biyodağılım davranışına sahip olduğunu göstermektedir. Akiyama ve arkadaşları (325) iki farklı AR değerine sahip (1,7 ve 5,0) çubuk şeklinde PEGile altın nanopartikül hazırlayarak kolon kanseri geliştirilmiş farelere uygulamış ve 72 saat sonunda nanopartiküllerin biyodağılımlarını değerlendirmiştir. Her iki nanopartikül de tümör dokusunda çalışmalarımızda olduğu şekilde benzer biyodağılım göstermiştir. Bir diğer çalışmada, Shao ve arkadaşları (326) küresel (AR:1,0-1,2), kısa çubuk (AR:2,0-2,5) ve uzun çubuk (AR:3,5-4,0) manyetik mezopor silika nanopartiküller hazırlamış ve karaciğer kanseri geliştirilmiş farelerde iki farklı zaman noktasında (3 ve 24 sa) biyodağılımlarını değerlendirmiştir. Kısa çubuk nanopartiküller her iki zaman noktasında küresel NP'lerle benzer tümör birikimi

gösterirken, uzun çubuk NP'ler istatistiksel olarak anlamlı olarak daha yüksek birikim göstermiştir. Her üç şekil de kalp ve akciğerde iki zaman noktasında benzer biyodağılım göstermiştir. Sonuçta, tez kapsamında hazırlanan üç şekil arasında en-boy oranı farklı (KNP:1, ÇNP:4, EDNP:7,5) olmasına rağmen biyodağılımın önemli derecede etkilenmediği, en-boy oranının artırılmasının (~20) anlamlı farkın gözlenmesine etki edebileceği düşünülmektedir (296). Şekle ek olarak farklı fizikokimyasal parametrelerin de (boyut, yüzey özellikleri vb.) biyodağılıma etkileri göz ardı edilmemelidir.

*In vivo* deneylerde istatistiksel anlamlılığın gözlenebilmesi için önemli bir parametre denek sayısıdır. Literatürde n=3 olarak gerçekleştirilen biyodağılım çalışmaları (327-329) olmakla birlikte biyodağılım sonuçlarında standart sapmanın yüksek olması sebebiyle denek sayısının artırılmasının sonuçların anlamlılığına olumlu katkı yapabileceği düşünülmektedir. Tez çalışmasında, biyodağılımı analiz etmek için tek bir zaman noktası (16. saat) incelenmiştir. Farklı zaman noktalarında analiz yapmanın ve denek sayısını artırmanın birikim oranının daha doğru saptanması için faydalı olacağı düşünülmektedir (328). Örneğin Jasinski ve arkadaşlarının (330) yaptığı bir araştırmada benzer boyutlarda ancak üç farklı şekildeki (kare, üçgen ve beşgen yapı) RNA nanopartikül için biyodağılım çalışmaları yapılmış, çalışmada 12 ve 24 saatte organlardaki birikim değerlendirilmiştir. 12 saatte organlar arası anlamlı birikim farkı bulunurken 24 saatte benzer birikimler gözlenmiştir. Bu çalışma, zaman noktalarının dinamik bir süreç olan biyodağılım üzerine etkisini göstermektedir.

### 5.7. Optimum Şeklin Belirlenmesi

Üç şekil kıyaslandığında, küresel nanopartiküllerin partikül boyutu hem boş hem de etkin madde yüklü nanopartiküller için optimum olarak belirlenmiştir. Boyut, nanopartiküllerin fagositozu için kritik bir parametredir. Araştırmalarda, intravenöz enjeksiyon yoluyla uygulanacak formülasyonlar için çoğunlukla 2 ila 200 nm arasında partikül boyutlarının tercih edildiği gözlenmektedir. Büyük nanopartiküller (>200 nm) makrofajlar tarafından yüksek alıma uğrayacağı için EPR etkisinden faydalanılamayacak (96, 327, 328) ve sonuçta tümörde birikimi düşük seviyede kalacaktır (322). Tez kapsamında üretilen ÇNP ve EDNP'nin partikül boyutlarının 200 nm üzerinde (TEM incelemesi) olmasının, şekle bağlı fagositozdan kaçış yeteneğinin

beklenildiği şekilde sağlanamamasına (Karaciğerde birikme: EDNP>ÇNP>KNP,  $p>0,05$ ) ve sonuçta tümör dokusunda küresellere kıyasla anlamlı derecede yüksek birikim sağlanamamasına neden olduğu düşünülmektedir. Etkin madde yüklü NP'lere hedefleme ligandının konjugasyonu yapıldığı zaman partikül boyutunun daha da artacağı düşünüldüğünde (331-333), ÇNP ve EDNP'nin büyük boyutları sebebiyle RES'ten kaçamama ve tümör mikroçevresinde düşük birikim gibi risklere sahip olduğu tespit edilmiştir. Ancak, literatür incelemesi yapıldığında, küresel NP'lerin makrofajlar tarafından fagositozunun, benzer boyuttaki yüksek AR'li partiküllerin alımına kıyasla daha fazla olduğu gözlenmektedir (310). Örneğin, Geng ve grubu tarafından yapılan bir çalışmada (334), en-boy oranı yaklaşık 4 olan 100 nm uzunluğundaki nano zincirlerin bir RES organı olan karaciğerdeki birikme oranı, benzer boyuttaki (100 nm hidrodinamik çap) nanokürelere kıyasla önemli ölçüde daha düşük bulunmuştur. Nano zincirlerin yüksek en-boy oranı, RES'ten kaçmayı ve daha uzun süre kan dolaşımında kalmayı ve bu sayede tümör dokusuna nanokürelere kıyasla daha yüksek birikimi sağlamıştır [91]. Bu çalışmada partikül boyutları sabit tutularak sadece şeklin biyodağılım üzerindeki etkisi incelenmiştir. Koşullar, tez kapsamında ürettiğimiz nanopartiküllerde geçerli olmadığı için (farklı şekil ve farklı partikül boyutu) birebir kıyaslama yapmak mümkün olmamaktadır.

Zeta potansiyel değerleri incelendiği zaman küresel nanopartiküllerin ÇNP ve EDNP'lere kıyasla kolloidal stabilitesinin daha yüksek olduğu gözlenmektedir. Üretim yöntemi açısından kıyaslama yapıldığında, küresel nanopartiküllerden hareketle film germe yöntemi kullanılarak germe, ısıtma, yıkama vb. ek işlemler ile çubuk ve eliptik disk şeklinde NP'ler üretilmekte, bu durum hem zaman hem de maliyet açısından bir yük oluşturmaktadır. Ek olarak, üretim sırasında yüklü olan galunisertib ve nivolumabın bir bölümü de kaybedildiği için (daha düşük enkapsülasyon etkinliği) gerekli NP miktarında artışa neden olacaktır. Bu bakış açısı ile tıbbi ürün olma potansiyeli yüksek olan şekil küresel olarak belirlenmiştir.

*In vitro* salım analizi sonuçları, ileri aşamalarda gerçekleştirilecek olan hücre kültürü ve *in vivo* deneylerin takip edeceği yolu tahmin etmek açısından önemli bir ön değerlendirme sağlamaktadır. Partiküllerin yeterli düzeyde etkin madde salımı gerçekleştirilememesi durumunda aktif hedefleme tek başına terapötik etki açısından yetersiz kalacaktır. ÇNP ve EDNP'ye kıyasla, KNP'lerin her iki etkin madde için daha

yüksek salım yüzdesine sahip olması ( $p < 0,05$ ) *in vivo* deneyler için kritik bir parametredir. Üç şekil de sağlıklı hücreler üzerinde benzer toksisite göstermiş olup, kanser hücreleri tarafından benzer oranlarda alınmıştır. Biyodağılım sonuçları kıyaslandığı zaman, her üç NP, KHDAK tümör modeli oluşturulan CD-1 nude farelerde tümör dokusunda benzer birikim yapmıştır.

Borzęcka ve grubu (335) tarafından küresel ve çubuk olarak iki farklı şekilde ve dört farklı boyutta (100 nm küresel-AR:1; 200 nm çubuk-AR:1,9; 400 nm çubuk-AR:2,4; 500 nm çubuk-AR:4,9), foto duyarlaştırıcı madde konjuge mezopor silika nanopartiküller hazırlanmış ve mesane kanseri hücre hatlarında (HT-1376 ve UM-UC-3) hücre içine alımları ve fototoksisiteleri incelenmiştir. Her iki hücre hattında da en düşük hücre içine alım küresellerde gözlenirken, en yüksek hücre içine alım 400 nm boyuttaki çubuk NP'lerde gözlenmiştir. Hücresel alım sonuçları dikkate alındığında küresel NP'lerin en düşük fototoksisite değeri göstermesi beklenirken, aksine küresel NP'ler en yüksek antitümör etkinlik gösteren grup olmuştur. Bu sonuçların çalışma grubu tarafından yorumlanması, tez çalışmalarımıza benzer şekilde, kıyaslanan NP'lerin şeklin yanında başka parametrelerin de farklılığından (yüzeydeki foto duyarlaştırıcı madde konsantrasyonu, NP boyutu ve zeta potansiyel, hücre tipi vb.) kaynaklandığı şeklinde yapılmıştır.

Cao ve arkadaşları (336) tarafından farklı lipit bileşimleri (kısa ve uzun zincir) ile benzer zeta potansiyel (-12 ile -15 mV arasında) ve partikül boyutu değerlerine sahip küresel (~72-95 nm) ve yıldız şeklindeki (~81-122 nm) NP'ler hazırlanmıştır. Karaciğer kanseri hücreleri (HepG2) ile gerçekleştirilen hücresel alım deneyine göre yıldız şeklindeki nanopartiküller küresellere kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı derecede yüksek alım göstermiş ve bu sonuçlar *in vivo* biyodağılım verileri (artmış tümör birikimi) ile desteklenmiştir. Bu çalışmada NP bileşiminde kullanılan kısa ve uzun zincirli lipitlerin yıldız şeklindeki nanopartiküllerde oluşturduğu kol benzeri yapıların artmış yüzey alanı sağlaması ve bu sayede hücrelerle daha iyi etkileşim ile artmış hücresel alım gösterdiği yorumu yapılmıştır.

Barua ve arkadaşları tarafından yapılan bir diğer araştırmada küresel çubuk ve disk şeklinde polistiren nanopartikülleri hazırlanmış, NP'lerin üç farklı meme kanseri hücresine (BT-474, SK-BR-3 ve MDA-MB-231) alımları incelenmiştir. Hücresel alımda şeklin yanında aktif hedeflemenin de etkisini değerlendirme için ayrı bir grup

olarak hedefleme ligandı olarak trastuzumab üç şekildeki NP'lere adsorbe edilmiştir. BT-474 hücreleri üzerinden değerlendirme yapıldığında, yüzeyde hedefleme ligandı bulunmadığı durumlarda hücre alım sırasıyla küre>çubuk>disk bulunmuş; ligand adsorpsiyonu sonrası ise çubuk>disk>küre şeklinde alım olduğu belirlenmiştir. Çubuk şeklinin küresellere kıyasla daha yüksek alım göstermesinin, NP yüzeyindeki hedefleme ligandlarının tümör hücreleri ile daha fazla etkileşime girmesinden kaynaklandığı belirtilmiştir.

Literatür örneklerinden de anlaşılacağı üzere farklı şekillerin kıyaslandığı çalışmalarda NP boyutu, zeta potansiyel, yüzey modifikasyonunun yanı sıra, çalışılan hücre hattı, hazırlanan NP materyalinin tipi (metalik, polimerik vb.) sonuçlarda farklılık oluşturabilmektedir. İncelenen her çalışma diğerlerine kıyasla özgünlük göstermekte dolayısıyla genel bir sonuca varmak için şekil dışındaki diğer tüm parametrelerin aynı tutulması gerekliliği olmaktadır.

Günümüzde, geleneksel küresel nanopartiküller, üretim ve karakterizasyon kolaylıkları nedeniyle literatürde sözü edilen diğer şekillere (çubuk, üçgen, yıldız, disk vb.) kıyasla baskın NP şekli olmaya devam etmektedir. Sonuç olarak, farklı şekillerde nanopartiküller için elde edilen tüm deney sonuçları, Tablo 4.8. (s.114) ve literatür örnekleri incelendiğinde tezin sonraki aşamaları için optimum özelliklere sahip olduğuna karar verilen nanopartikül şekli küreseldir.

### **5.8. A549 Hücrelerinde EGFR Ekspresyonunun Gösterilmesi**

Kanser tedavisindeki zorluklardan birisi, tümör hücreleri üzerinde nanopartikülleri hedefleyecek derecede spesifik ve yüksek oranda reseptör bulunmamasıdır. EGFR ekspresyon seviyeleri KHDAK alt tiplerinde farklılık gösterebilmektedir (337). Reseptör ekspresyonunun hedef dokuda yüksek olması aktif hedefleme için yeni bir umut ışığı olmakta ve dolayısıyla antikor aracılı hedeflemenin kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Tez kapsamında, aktif hedeflendirme amacıyla anti-EGFR antikorunun nanopartiküllere konjuge edilmesi planlanmıştır. Hedeflemenin başarıyla sağlanacağından emin olmak için ligandın (anti-EGFR antikor) bağlanması planlanan reseptörün (EGFR) tezte çalışılan hücre hattında (A549-Luc2 insan KHDAK hücre hattı) hangi oranda eksprese edildiğini belirlemek kritiktir. Deney sonucunda elde edilen % 94'e yakın ekspresyon oranı (Şekil 4.29.,

s.117), anti-EGFR ile konjuge edilen nanopartiküllerin tümöre aktif hedeflendirilmesinde önemli bir başarı ölçütüdür. Ek olarak, EGFR antagonistlerinin metastatik KHKDAK'nin tedavisi amacıyla kullanıldığı da bilinmektedir (173). Nanopartiküllere konjuge edilen anti-EGFR antikoru, yüksek ekspresyon oranı sayesinde EGFR'ye istenilen seviyede bağlanabilir ve tümör hücrelerinin büyümesini yavaşlatarak antikanser etkinlik de sağlayabilir (338). Sözü edilen bu etki, tezin ileri aşamalarında yürütülen *in vitro* ve *in vivo* deneylerle ayrıca tartışılmıştır.

### 5.9. Antikor Konjugasyon Çalışmaları

Tez kapsamında, PLGA temelli nanopartiküllere aktif hedefleme amacıyla, anti-EGFR antikoru konjuge edilmiştir. Polimerdeki maleimit grubu ile tiyole anti-EGFR arasında tiyoeter bağı (bir tür kovalan bağ) oluşturulmuştur. Kovalan konjugasyon, fiziksel konjugasyona kıyasla daha kararlı, tekrarlanabilir ve geri dönüşümsüz olduğu için, hedefleme ligandlarının nanopartiküllere bağlanması amacıyla sıklıkla tercih edilen bir yaklaşımdır. Bu özelliklerine ek olarak fiziksel konjugasyonun aksine kan bileşenleri hedefleme ligandıyla rekabet etmediği için *in vivo* koşullarda hedefleme başarısı daha yüksektir (112). Konjugasyonda kullanılan anti-EGFR antikoru protein yapıda olup, konjugasyon etkinliğini belirlemek amacıyla BCA analizi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla BCA kit protokolüne uyularak BSA ile yapılan analiz sonucu kalibrasyon denklemi  $y = 0,0052x + 0,0342$  şeklinde bulunmuş ve  $r^2 = 0,9917$  olarak hesaplanmıştır. Konjugasyonu sonrasında süpernatantlar kullanılarak BCA testi ile indirekt yolla hesaplanan konjugasyon etkinliği değerlendirildiğinde (% 94,88±0,31), konjugasyonun başarı ile gerçekleştirildiği sonucuna ulaşılabilir. Konjugasyon verimliliğinin yüksek olması, tümöre aktif hedeflendirmede anahtar rol oynamaktadır.

Wilhelm ve arkadaşları (339) tarafından 2005-2015 yılları arasındaki seçilmiş pasif ve aktif hedeflendirilmiş nanoboyutlu ilaç taşıyıcı sistem çalışmalarının (117 adet çalışma bildirilmiş) incelemesi yapılmış, sonuçta uygulanan nanopartikül dozunun yalnızca yaklaşık % 0,7'sinin solid (katı) tümörlere ulaşabildiği tespit edilmiştir. Daha ayrıntılı inceleme yapıldığında, aktif hedefleme özelliğine sahip nanopartiküllerin (ilaç yükleme etkinliği % 0,9) pasif hedefli olanlara kıyasla (ilaç yükleme etkinliği % 0,6) hedef bölgeye çok küçük bir farkla (% 0,2 fark) daha yüksek ilaç taşıma etkinliği

gösterdiği tespit edilmiştir. Tez kapsamında, literatürde yoğun çalışmalara rağmen düşük tedavi başarısının gözlendiği bir alan olan solid tümörlerde aktif hedeflemeye yönelik bir nanosistem geliştirilmiş ve hedeflemenin tümör dokusu çevresinde birikimini artırdığına yönelik *in vivo* bulgular elde edilmiştir.

Hedefleme başarısında önemli bir parametre, nanopartikül yüzeyindeki ligand yoğunluğudur. Yüksek ligand yoğunluğunda, avidite kurallarına göre bağlanma olasılığı artacağı için nanopartiküllerin hedef reseptöre daha iyi bağlanması beklenmelidir (340) ancak ligand yoğunluğunun artmasının; NP'nin hayalet (*stealth*) özelliğini kaybetmesi, EPR etkisini azaltacak şekilde hidrodinamik çapının büyümesi, ligandın NP'nin hedef hücrelerle bağlanmasını engelleyecek ölçüde sterik engel oluşturması gibi sakıncaları mevcuttur. Bu kapsamda değişken ligand yoğunluğuna sahip nanopartiküllerin hücresel alımı veya tümör hedeflenmesine ilişkin yapılan *in vitro* çalışmalar incelenmiş ve sonuçta ligand yoğunluğunun artmasının hücresel bağlanmada bir üst sınıra kadar arttığı, belirli bir seviyeden sonra sabit veya azalmış bir bağlanma gözlendiği tespit edilmiştir (340). *In vivo* sistemler, *in vitro* deney düzeneklerine kıyasla çok daha karmaşıktır ve nanopartiküllerin RES'ten kaçarak tümör dokusuna ulaşması için çok fazla fizyolojik engel bulunmaktadır. Bu sebeple *in vitro* çalışmalardan farklı olarak *in vivo* ortamda nanopartikül üzerindeki hedefleme ligandı yoğunluğunun artırılmasının, tümör dokusundaki reseptöre ulaşma ve reseptöre bağlanma özelliğini artırdığı gösterilmiştir (341, 342). Tez kapsamında gerçekleştirilen konjugasyon deney sonuçları incelendiğinde, % 100'e yakın bir konjugasyon verimliliğinin elde edilmesi, tezin devamında gerçekleştirilecek *in vivo* deneylerdeki aktif hedefleme başarısı için olumlu bir öngörü niteliği taşımaktadır.

### **Konjuge Nanopartiküllerin *In Vitro* Karakterizasyonları**

Yukarıda bahsedilen önemli kriterler göz önünde bulundurularak yüksek verimle konjuge edilmiş boş ve etkin madde yüklü nanopartiküllerin hazırlanmasını takiben *in vitro* karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Tablo 4.10.'daki (s.120) partikül boyutu ölçümleri değerlendirildiğinde, antikor konjugasyonu yapılmamış boş nanopartiküllerin ~167 nm, anti-EGFR konjuge edilmiş boş nanopartiküllerin ise ~198 nm boyuta sahip olduğu belirlenmiştir. Nanopartiküllerdeki boyut artışının konjugasyon sebebiyle olduğu tespit edilmiş, boyut artışı literatürle uyumlu

bulunmuştur (70, 332, 333, 343). Konjuge olan ve olmayan boş NP'ler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir boyut farkı bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Antikor konjuge, kombine etkin madde yüklü nanopartiküllerin partikül boyutu (~178 nm), aktif hedeflendirmenin temelini oluşturan pasif hedeflendirme (EPR etki) için (<200 nm) uygun bulunmuştur (344). Nihai formülasyonda, nivolumabın bir bölümü nanopartikülün içerisine yüklenmiş, bir bölümü ise nanopartikülün yüzeyine adsorbe ettirilmiştir. Sonuçta elde edilen partikül boyutu boş konjuge nanopartiküllere kıyasla yaklaşık 20 nm küçük olup, iki formülasyon arasında istatistiksel açıdan anlamlı boyut farkı bulunmamıştır. Literatür incelemesi yapıldığında, tez çalışmalarımıza benzer şekilde, çeşitli boyutlardaki (küçük veya makromolekül) etkin maddelerin yüklenmesini takiben partikül boyutunun benzer kaldığı (345, 346) veya daha düşük olduğu (347, 348) durumlarla karşılaşılmıştır. Bölüm 5.3.1.'de bahsedildiği gibi, nanopartiküller ilaç taşıyıcı sistemlerin homojen partikül boyutu dağılımına sahip olması için PDI değerinin 0,2'den küçük olması gerekmektedir (243). Konjuge boş nanopartiküllerde PDI değerinde artış gözlenmiş ancak her üç formülasyon (PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG KNP, PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR KNP, PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR-G-N KNP) için PDI değerleri 0,2'nin altında ve hedefe uygun bulunmuştur. PDI değerinin yükselmesinin bir sebebi, nanopartiküllere uygulanan çoklu santrifüj (örneğin; konjugasyon için ek santrifüj işlemi uygulanması) ve redispersiyon işlemleri nedeniyle oluşan agregasyon problemi (349-351). Şekil 4.33.'te (s.121) görüldüğü gibi konjuge boş nanopartiküllerdeki agregat partikül yüzdesi toplam popülasyonun % 3,4'ünü oluşturmaktadır. Kombine etkin madde yüklü konjuge nanopartiküller için PDI değeri 0,04 bulunmuştur. Özetle nihai formülasyonda monodispers bir dağılım sağlandığı düşünülebilir.

Konjuge olan (Şekil 4.34., s.122) ve olmayan (Şekil 4.32., s.121) boş nanopartiküller yaklaşık -20 mV zeta potansiyel değerine sahiptir. Yüzey yükünün mutlak değer olarak 20 mV veya daha yüksek olması formülasyonun fiziksel açıdan stabil olduğunun bir göstergesidir (352). Kombine etkin madde yüklü konjuge nanopartiküller için ise -28,4 mV zeta potansiyel değeri elde edilmiştir, bu durum, formülasyonun uzun süreli saklama koşullarında stabilitesini koruyacağına ilişkin bilgi sağlamaktadır. Boş konjuge nanopartiküllere kıyasla zeta potansiyelinin daha

negatif hale gelmesi, negatif yüke (353, 354) sahip olan nivolumabın NP yüzeyine adsorpsiyonu sebebiyle beklenen bir durumdur. Konjugasyona ve etkin madde enkapsülasyonuna bağlı zeta potansiyel değişimi kıyaslandığı zaman, istatistiksel açıdan anlamlı bir fark gözlenmemiş olsa da ( $p>0,05$ ) zeta potansiyelin nihai formülasyonda mutlak olarak en yüksek değere sahip olması, ilaç taşıyıcı sistemin hem *in vitro* hem de *in vivo* koşullarda dayanıklılığını göstermektedir. Konjugasyonda antikor kullanılmasına rağmen PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG KNP ile PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR KNP arasında zeta potansiyel değerleri ( $\sim -20$  mV) benzerdir. Bu durumun bir sebebi, anti-EGFR'nin nivolumaba kıyasla daha düşük dozda kullanılması ve bu sebeple nanopartikülün yüzey yüküne daha az etki etmesi olabilir. Bir diğer sebep, anti-EGFR konjugasyonunun kovalan bağlarla gerçekleşmesine bağlı olarak polimer-antikor etkileşimlerinin NP yüzeyinde düzenli ve seyrek olmasına karşılık (340) nivolumabın adsorpsiyonun zayıf etkileşimler ile gerçekleşmesi olabilir. Antikorum NP yüzeyindeki konumlanmasının rastgele ve yüzeyi kaplayacak şekilde olması, yüzey yükünde daha büyük bir değişime sebep olabilir (355).

Tez kapsamında, anti-EGFR konjuge nanopartiküllerin görüntülenmesi SEM analizi ile gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.37. (s.123) incelendiğinde, gerçekleştirilen analiz sonucunda, üzüm salkımı benzeri kümeleşmiş haldeki nanopartiküllerin küresel, pürüzsüz bir yüzeye sahip olduğu ve homojen dağılım gösterdiği görülmektedir. Ek olarak, SEM görüntülerinin literatürde PLGA temelli, peptit/antikor konjuge nanopartikül görüntüleri ile uyumlu oldukları tespit edilmiştir (219, 356, 357).

Konjugasyon işleminin yükleme etkinliğine olan etkisini incelemek amacıyla, BCA, ELISA ve HPLC yöntemleri ile analizler gerçekleştirilmiştir. Tablo 4.11. (s.124) incelendiğinde, galunisertibin konjuge olmayan nanopartiküllerde % 9,59 olan EE% değeri konjugasyon sonucu % 7,53'e düşmüş, nivolumabın konjuge olmayan nanopartiküllerde % 59,20 olan EE değeri % 50,26'ya düşmüştür. Bu durumun konjugasyon prosedürü sırasında etkin maddenin salımından kaynaklandığı düşünülmektedir (358, 359). Konjugasyon sırasında nanopartiküller bir dipsersiyon ortamında belirli bir süre manyetik karıştırıcıda olduğu için nanopartikül yüzeyinde/yüzeyine yakın bölümde olan ilacın salımı olmuş olabilir. Nivolumabın nanopartiküllere bütün halde yüklenmesi amacıyla çeşitli denemeler gerçekleştirilmiş,

ilk denemelerde salım özelliği düşük bulunarak iç su fazına ek olarak yüzeye adsorpsiyon yapılması kararlaştırılmıştır. Bu sayede, enkapsülasyon etkinliğinin de sadece iç faza yüklemeye kıyasla artırılması sağlanarak % 70,89 olarak tespit edilmiştir. *In vitro* salım analizi tümör mikroçevresini simüle etmek amacıyla pH 5,5 (360) ve fizyolojik pH'yı simüle etmek amacıyla 7,4 ortamlarında, konjuge olmayan nanopartiküllerle aynı yöntemle gerçekleştirilmiştir. Tümör mikroçevresinin 5,5-7,4 aralığında olduğu bilinmekte olup (361) pH:5,5 tamponu kanserli dokuyu taklit etmek için salım çalışmalarında sıklıkla tercih edilmektedir (362-364). Enkapsülasyon etkinliğinin artırılması (hem iç su fazına yükleme hem de NP yüzeyine adsorpsiyon ile) bütün yapıdaki nivolumabın salım profilinin fragmente nivolumab ile karşılaştırılabilir ( $p>0,05$ ) hale getirilmesini sağlamıştır. Ek olarak, galunisertib enkapsülasyonu % 10,77 değeri ile iyileştirilmiştir ( $p>0,05$ ).

Şekil 4.38.'de (s.125), galunisertib için salım profili incelendiğinde, antikor konjuge NP'lerde tümör mikroçevresini taklit eden pH 6,8 ortamında 48 saat sonunda % 100 salım gerçekleşmiştir. Aynı koşullarda antikor konjugasyonu olmayan NP'lerden galunisertib salımı 72 saat sonunda % 100'e erişmektedir. Antikor konjuge edilmiş NP'lerde galunisertibin ilk 24 saatteki salımı % 60'lardan % 25'lere gerilemiştir. Bu durum, yüzeye adsorbe olan ve/veya nanopartiküllerin yüzeyinin yakınında bulunan ilacın, konjugasyon amacıyla yapılan yıkama ve karıştırma işlemlerinde kaybedilmiş olması ile ilişkilendirilebilir (70). Ek olarak, NP'lerin yüzeyine makromoleküllerin konjugasyonu ile polimerin yapısal karmaşıklığı arttığı için etkin maddenin nanosistemden salımı zorlaşmış olabilir (295). Fragmente nivolumabın *in vitro* salım profili (Şekil 4.38.) incelendiğinde antikor konjugasyonunun ve pH'nın salım üzerindeki etkisinin anlamlı olmadığı ( $p>0,05$ ) görülmektedir. Şekil 4.39.'da (s.126) bütün nivolumab ve galunisertibin yüklü olduğu konjuge NP'lerin salım profilleri verilmiş olup, pH 5,5 ortamında nivolumabın 96 saat sonunda % 100 salıma ulaştığı gösterilmiştir. Bütün nivolumabın, fragmente nivolumab yüklü NP'lerle benzer salım profiline sahip olduğu ( $p>0,05$ ) görülmektedir. *In vitro* salım deneyi sonuçları KINETDS 3.0 uygulaması kullanılarak analiz edilmiş ve hem galunisertib hem de nivolumabın tüm koşullarda nanopartikülden salım profilinin Weibull salım kinetiğine uygun olarak gerçekleştiği belirlenmiştir. Weibull modeli, hem ani hem de uzatılmış salım yapan ilaç taşıyıcı sistemlerin salım kinetiğini

inceleme açısından uygun bir modeldir (365, 366). Sonuç olarak, geliştirilen formülasyon kapsamında hazırlanan NP'lerden her iki etkin madde de ani salım yapmadan kontrollü salım göstermiştir.

### 5.10. *In Vitro* Sitotoksosite Çalışmaları

Antikor çözeltisi, konjuge olmayan ve anti-EGFR konjuge boş nanopartiküllerin A549 hücreleri üzerindeki sitotoksiteleri MTT analizi ile değerlendirilmiştir. 24, 48 ve 72 saat sonunda elde edilen hücre canlılıkları incelendiğinde (Şekil 4.40., s.127) tüm zaman noktaları ve tüm konsantrasyonlar için antikor konjuge nanopartiküllerin *in vitro* antikanser etkinliği daha yüksek ( $p<0,05$ ) bulunmuştur. Bu deneyden yola çıkarak antikor konjuge edilmiş boş nanopartiküllerin anti-EGFR antikoruna kıyasla KHDAK tümör hücrelerini öldürmede daha başarılı olduğu söylenebilir. Bu durum, nanopartiküle yüklü etkin maddelerin yanında hedeflendirme ligandından kaynaklı da bir antikanser etkinlik sağlandığını göstermektedir. Çalışmamıza benzer bir araştırma, Qian ve arkadaşları (248) tarafından gerçekleştirilmiştir. Setuksimab tek başına ve altın nanopartiküllere konjuge halde A549 hücrelerine uygulanmış ve grupların sitotoksitesi CCK-8 (*Cell Counting Kit 8*) yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Antikoronun tek başına sitotoksik etkisinin zayıf kaldığı, altın nanopartiküllere konjuge edildiğinde toksisitesinin arttığı tespit edilmiştir. Aynı gruplar *in vivo* olarak da nude farelerde geliştirilen KHDAK tümör modeli ile araştırılmış, setuksimab konjuge nanopartiküller, setuksimab çözeltisine kıyasla tümör boyutunda daha fazla küçülme sağlamıştır ( $p<0,05$ ). Tasarlanan immünoterapötik nanopartikül ilaç taşıyıcı sistemin hedeflendirme ligandı olan anti-EGFR antikorundan antikanser etki elde edilmesi tez önerisinde de belirtilmiş olup tezin özgün değerleri arasında yer almaktadır. Bu yönüyle amaçlanan hedefe başarıyla ulaşılmıştır. Setuksimabın tek başına KHDAK tedavisinde yetersiz kalması sebebiyle paklitaksel, karboplatin, sisplatin, gemsitabin ve anti-PD-1 gibi çeşitli kemoterapötik/immünoterapötiklerle kombine kullanımı günümüzde araştırılmaya devam etmektedir (367, 368).

### 5.11. PD-1 ve TGF- $\beta$ İnhibisyonunun T Hücre İmmün Yanıtlarına Olan Etkisinin Değerlendirilmesi

PD-1/PD-L1 etkileşimi, bağışıklık hücrelerinin kanser hücrelerine karşı savunma yapmasını önleyen bir kontrol mekanizması olduğu için, bu etkileşimi bloke eden antikorlar (tez kapsamında, nivolumab), tümör mikroçevresindeki tükenmiş T hücrelerini yeniden canlandırmaktadır (369). Ancak, yakın zamanda gerçekleştirilen çalışmalar, TGF- $\beta$ 'nın tümörle ilişkili fibroblast aktivitesini modüle ederek tümör stromasındaki kolajen liflerin miktarını artırdığını; yoğun lifli tabakanın ise lenfosit infiltrasyonunu (tümör dokusuna T lenfositlerin giriş kabiliyeti) azaltarak immün gözetimden kaçmaya neden olduğunu göstermiştir. Bu durumda tümör anti-PD-1/PD-L1 tedavisine yanıt vermemekte, çözüm olarak TGF- $\beta$  sinyal yolunun antagonize edilmesi anti-PD-1/PD-L1 terapötik direncini önemli ölçüde kırarak antitümör immünoterapinin etkinliğini artırmaktadır (370). Dolayısıyla bu deneylerde kombine ilaç çözümleri/nanopartiküllerde artmış bir immün yanıt sağlaması beklenmektedir. İmmün yanıtın önemli göstergelerinden biri sitokin seviyelerinde gözlenen değişimlerdir. Kanser patofizyolojisi henüz tam aydınlatılmadığı için sitokinlerin immün yanıtta aktive/inhibe edici etkileri henüz netleşmemiştir. Örneğin, IL-10 kanserde T hücreleri üzerinde hem aktive edici hem de inhibe edici bir role sahiptir (371). Yine de yapılan bazı çalışmalarda ortak görüşler mevcuttur. Örneğin, Andorsky ve arkadaşları (372) tarafından lenfoma hücre hatlarında anti-PD-L1'in immün yanıtlara olan etkisi akım sitometri ve ELISA ile analiz edilmiştir. PD-L1 blokajının inflamatuvar sitokinler olan IFN- $\gamma$ , granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör, IL-1, IL-6, IL-8, IL-13, TNF- $\alpha$  seviyelerini artırdığı belirlenmiştir. Niu ve grubu (373) tarafından karaciğer kanseri geliştirilen farelerde anti-TGF- $\beta$ /VEGF bispesifik antikor ile kombine olarak anti-PD-1 uygulanmasını takiben T hücre immün yanıtları akım sitometri ile analiz edilmiştir. Tümöre infiltre olan CD8<sup>+</sup> T hücrelerinin miktarında artış gözlemlendiği, bu hücrelerdeki IFN- $\gamma$ , CD25<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup> ve granzim B seviyelerinin toplam T hücre popülasyonuna oranla arttığı belirlenmiştir.

Bu kapsamda PKMH canlılık, T hücre proliferasyon ve sitokin analiz sonuçları tartışılmıştır. Sitokin analizlerinin yüksek maliyetli olması sebebiyle ön denemeler yapılarak etkin madde ve polimer konsantrasyonlarının deneye uygunluk durumları değerlendirilmiştir.

Tez kapsamında, immün sistem hücrelerinin yeniden aktive edilerek bağışıklık yanıtının güçlendirilmesi amaçlandığı için çalışılan etkin madde ve polimerlerin PKMH hücreleri üzerinde toksik etki göstermeyen dozda kullanılması gerekmektedir. Bu sebeple ön denemeler gerçekleştirilerek PKMH'lere uygulanabilecek polimer ve etkin madde konsantrasyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır. İmmün yanıt deneylerinde kullanılacak PKMH'lerde ölüm oranının en fazla % 15 olması tolere edilmektedir (250, 374). T hücre immün yanıt deneyinin 72 saatlik inkübasyon ile yapılması planlanmıştır, dolayısıyla bu deneyin ön koşulu, PKMH canlılıklarının 72. saatte % 85'ten yüksek olmasıdır. Bu amaçla farklı konsantrasyonlarda galunisertib çözeltileri PKMH hücrelerine uygulanmış ve Şekil 4.41. (s.129) incelendiğinde, galunisertibin sitotoksik etki göstermeyen (72 saatte en yüksek konsantrasyonda canlılık % 40'a kadar düşmekte), güvenli aralıkta çalışılabilecek en yüksek konsantrasyonu (24, 48 ve 72 saat için % 80 üzerinde canlılık sağlayan konsantrasyon) 50 µM olarak belirlenmiştir.

Galunisertibin i.v. uygulamaları yakın zamanda denenmiştir, ancak literatürde farklı etkin madde ve polimerlerle hazırlanan kombinasyonların uygulamasında kullanılan dozun doğrudan teze uyarlanması mümkün olmamıştır. Dolayısıyla tez kapsamında *in vivo* dozun belirlenmesinde özellikle hücre kültürü çalışmaları dikkate alınmıştır. Yine de galunisertib için literatürde kullanılan i.v. dozu (5-50 mg/kg) (274, 275) dikkate alınarak, bu konsantrasyonların nanopartikül içerisinde sunulabilmesi için daha fazla nanopartiküle ihtiyaç duyulacağı tespit edilmiş olup, daha yüksek polimer konsantrasyonlarda (275-2200 µg/mL) deney tekrarı yapılmıştır (Şekil 4.42.). Şekil 4.42. (s.129) incelendiğinde düşük konsantrasyonlarda (275-1100 µg/mL) nanopartiküller için kontrol grubuna kıyasla PKMH canlılığında önemli bir düşüş gözlenmemiştir ( $p>0,05$ ). 2200 µg/mL konsantrasyonunda PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR KNP'nin canlılık değerlerinde keskin bir düşüş gözlenirken (% 93'ten % 70,5'a) nivolumab yüklü konjuge nanopartiküller en yüksek konsantrasyonda dahi % 82 gibi kabul edilebilir bir hücre canlılığı sağlamıştır.

PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR KNP ve PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR-N KNP, T hücre proliferasyonu açısından değerlendirilmiş (Şekil 4.43., s.130), 2200 µg/mL konsantrasyonda her iki grubun T hücre çoğalma yüzdeleri % 70'in altında kalırken, daha düşük konsantrasyonlardaki proliferasyon değerleri,

kontrol grubuna yakın ( $p>0,05$ ) ve sonraki deneyler için uygun bulunmuştur. Canlılık ve proliferasyon deneyleri birlikte yorumlandığında 1100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ve daha düşük konsantrasyonlarda NP'lerin *in vivo* deneylerde güvenle kullanılabilceği belirlenmiştir.

### 5.11.1. PD-1 Bloklama Deneyleri

T hücreleri üzerinde bulunan PD-1 reseptörlerinin İKNİ aracılı bloke edilmesi ile PD-1/PD-L1 sinyalizasyonu engellenmekte ve baskılanmış efektör T hücre yanıtları yeniden sağlamaktadır (375). Dolayısıyla tez kapsamında bütün haldeki nivolumabtan hareketle IdeS enzimi kullanılarak üretilen F(ab')<sub>2</sub> fragmanının da PD-1 reseptörünü başarıyla inhibe etmesi, tedavi etkinliği için gereklidir. Ön denemelerde fragmante antikora immün yanıt alınmadığı tespit edilmiş olup anti CD3/CD28 boncukları ile uyarılan T hücrelerine bütün ve fragmante nivolumab uygulanarak PD-1 bloklama deneyleri gerçekleştirilmiştir. Deneyin ilk bölümünde nivolumab (bütün veya fragmante) ile bloke olmayan reseptörler, ortama floresan işaretli anti-PD-1 antikoru eklenmesini takiben akım sitometri analizinde daha yüksek MFI değerleri gözlenmesine neden olmaktadır. Sonuçta, bloke olmayan PD-1 reseptör seviyeleri (Şekil 4.44., s.130) incelendiğinde, fragmante nivolumabın CD3+ T hücreleri üzerinde kontrol grubu ile benzer bir etkisi mevcut olup PD-1 reseptörlerini bloke edemediği, aksine bütün haldeki nivolumab ile PD-1 reseptörlerinde blokaj olduğu tespit edilmiştir. Bu sebeple, bütün nivolumab nanopartiküllere yüklenerek yeniden PD-1 blokaj seviyeleri değerlendirilmiştir. Nivolumab yüklü nanopartiküllerin, çözelti ile benzer etki gösterme durumları incelendiğinde (Şekil 4.45., s.131), kontrol ve boş nanopartikül grubuna kıyasla hem nivolumab çözeltisi hem de nivolumab yüklü nanopartiküllerde PD-1 blokajı olduğu belirlenmiştir. Nivolumabın nanopartiküle yüklenmesi durumunda PD-1 bloklama kapasitesinde çözelti grubuna kıyasla bir miktar azalma gözlenmesine rağmen devam ettiği tespit edilmiştir. Boş nanopartiküllerde ise kontrol grubuna benzer sonuç elde edilmiş olup bloklama olmadığı söylenebilir. Sonuç olarak nivolumabın bütün halde yüklü olduğu nanopartiküller, *in vivo* deneylerde terapötik amaçlı kullanılmak üzere uygun bulunmuştur.

PD-1 bloklama deneyindeki gruplar (nivolumab çözeltisi, PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG KNP, PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-N KNP) için T hücre proliferasyon deneyleri yapılmış (Şekil 4.46., s.132) ve sonuçta kontrol grubu ve boş NP'ye kıyasla nivolumab içeren gruplarda (çözelti ve etkin madde yüklü NP) reseptör blokajı sonrası beklenen şekilde proliferasyonun daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu durum bütün nivolumabın immün yanıt üzerindeki etkinliğini doğrulamaktadır. Sonuç olarak, bütün antikör yüklenerek revize edilen formülasyon, *in vivo* deneyler için uygun bulunmuştur.

Bu deneyin anlamlılığının bir ölçüsü, çalışılan hücre hattının (A549-Luc) PD-L1 ekspresyon seviyesidir. Yapılan klinik araştırmalarda KHDAK teşhisi konulan hastaların % 24-60'ında PD-L1 reseptörünün eksprese olduğu belirlenmiştir. Nivolumabla tedaviye rağmen, hastalardan düşük yanıt alınmasının bir sebebi olarak düşük reseptör seviyeleri gösterilmektedir (376). Tez kapsamında çalışılan hücrelerin elde edildiği kaynağa bağlı olarak PD-1 ve PD-L1 ekspresyon seviyesi değişebilmektedir. Yan ve arkadaşları (377) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, sağlıklı ve akciğer kanseri tanısı almış hastaların immün yanıtla ilişkili reseptör (PD-1 ve PD-L1) seviyeleri incelenmiştir. Sağlıklı kişilere kıyasla akciğer kanseri hastalarında hem PD-1 hem de PD-L1 reseptörlerinin anlamlı derecede arttığı tespit edilmiştir. Yine aynı çalışmada, çeşitli akciğer kanseri hücre hatlarının reseptör seviyeleri ayrı ayrı incelenmiş; sonuçta A549 hücrelerinin PD-1 ve PD-L1 reseptör ekspresyon seviyeleri normal akciğer fibroblast hücreleri (MRC-5) ile kıyaslandığında daha yüksek bulunmuştur ( $p>0,05$ ) (377). Yan ve grubunun yapmış olduğu çalışmaları destekler nitelikte, yapılan son araştırmalarda KHDAK de dahil melanoma, karaciğer, tiroit gibi çeşitli kanser hücreleri üzerinde de PD-1 reseptör ekspresyonu olabildiği ancak bu reseptörlerin T hücrelerde olan davranışın aksine tümör baskılayıcı fonksiyonu olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun, İKNİ'lerle tedaviye yönelik direnç gelişiminin bir sebebi olduğu düşünülmektedir (375, 378).

### 5.11.2. PKMH Canlılık Deneyi (*In Vivo* Deney Gruplarına İlişkin)

Bu deneyler kapsamında, *in vivo* deneylerde çalışılacak tüm deney gruplarının *in vitro* ortamda PKMH hücreleri üzerine toksik etki gösterip göstermediği incelenmiştir. PKMH canlılık sonuçları incelendiğinde (Şekil 4.48., s.133), deneyden

beklenen sonuç nanopartiküllerin sağlıklı hücreler üzerine toksik etki yapmamasıdır. PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR KNP (turuncu) hariç tüm gruplarda % 80 ve üzeri canlılık gözlenmiştir. Canlılığın yüksek olması (>% 80 (379)), planlanan T hücre immün yanıt deneyleri için bir ön şart oluşturmakta olup, ilaç çözeltisi ve asıl tedavi grubu olan (kırmızı) nanopartiküllerde bu koşul beklendiği şekilde sağlanmıştır.

### 5.11.3. T Hücre Proliferasyon Deneyi (*In Vivo* Deney Gruplarına İlişkin)

Bu deneyler kapsamında *in vivo* deney gruplarının *in vitro* koşullarda T hücre proliferasyonu üzerinde beklenen etkilerinin gözlenip gözlenmediği kontrol edilmiştir. Nivolumab, T hücre yüzeyindeki PD-L1 ve PD-L2 reseptörlerine bağlanarak sitokin üretimini artırmakta ve dolayısıyla T hücrenin çoğalmasını (proliferasyonunu) desteklemektedir (147). Galunisertib ise TGF- $\beta$ 1 reseptörünü inhibe ederek CD8+ T hücrelerinin baskılanan proliferasyon özelliğini geri kazandırmaktadır (154). Dolayısıyla nivolumab ve galunisertibin olduğu gruplarda (Nivolumab+galunisertib+anti-EGFR çözeltisi (lacivert), PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-G-N KNP (yeşil), PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR-G-N KNP (kırmızı) proliferasyonda artış beklenmektedir. *In vivo* deneyde kullanılacak nanopartikül ve çözelti gruplarına ilişkin T hücre proliferasyon yüzdeleri (Şekil 4.48.) incelendiğinde, asıl tedavi grubunda (PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR-G-N KNP) ilaç çözeltisine (Nivolumab+galunisertib+anti-EGFR) benzer bir yüzde T hücre proliferasyonu gözlenmiş olup, formülasyon *in vivo* deneyler için uygun bulunmuştur. Bu grafikte dikkat çeken önemli bir detay, üretilen nanopartiküllerin hedefli ve hedefsiz olma durumunun proliferasyon üzerine olan etkisidir. Anti-EGFR ile hedefleme yapılan kombine etkin madde yüklü nanopartikül grubunda T hücre proliferasyonu yaklaşık % 110 iken hedefsiz kombine etkin madde yüklü nanopartikül grubunda % 43'tür. Deney gruplarının *in vivo* koşullardaki yanıtının benzerliği, tartışma bölümü 5.12.'de incelenmiş ve hedeflemenin immün yanıt üzerindeki olumlu etkisi kanıtlanmıştır. Anti-EGFR ile hedeflendirilmiş nanopartiküllerde (boş veya etkin madde içeren) proliferasyonun hedefli olmayan kombine etkin madde yüklü gruba kıyasla yüksek olması ( $p>0,05$ ) anti-EGFR'nin T hücre proliferasyonunda olumlu etkisi olabileceğini göstermektedir (380) ancak boş ve hedeflendirilmemiş nanopartiküllerde (siyah) de proliferasyonun yüksek olması proliferasyona etki eden

tek parametrenin yalnızca anti-EGFR antikoruna bağlı olmayabileceğini göstermektedir. Bulgularımızı destekler nitelikte bir çalışma, Yang ve grubu (381) tarafından anti-EGFR'ın T hücre proliferasyonu üzerindeki etkinliğinin incelenmesine yönelik gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, meme kanseri tümör modeli geliştirilmiş farelerde setuksimab tedavisini takiben tümör antijenine özgü T hücrelerinden IFN- $\gamma$  üretiminin arttığı, ayrıca tümöre özgü T hücresi popülasyonunun setuksimab ile aktive edildiği ve anti-EGFR'ın antitümör etkiye aracılık ettiği sonucuna ulaşmıştır. Sonuçta, tez kapsamında gerçekleştirilen T hücre proliferasyon deneylerinin sonucunda tümör mikroçevresine hedeflendirilmiş nivolumab ve galunisertib yüklü nanopartikül grubunda elde edilen yüksek (% 110) proliferasyon sonuçları *in vivo* deneyler için uygun bulunmuştur.

#### **5.11.4. CD8/NK Boncuk Temelli Çoklu Analiz Kiti ile Yapılan *In Vitro* Sitokin Analizi**

Sitokinler çoğunlukla bir uyarana yanıt olarak belirli bir süre boyunca salgılanan ve dolaşımdaki yarı ömürleri kısa olan, güçlü ve karmaşık immün aracı polipeptit yapıları moleküllerdir (382). Bağışık yanıtta önemli rol oynayan CD8<sup>+</sup> T ve NK hücreleri; IL-2, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$  vb. sitokinleri üretmekte, tümör hücrelerini yok etmek için ayrıca FasL, granzimler ve perforin gibi proteinlerden de faydalanmaktadır (383). Bağışıklık sisteminin kanser hücrelerini tanıma ve yok etme yeteneği göz önüne alındığında, son yıllarda sitokinlerin kanser tedavisi amacıyla kullanılmasına ilgi artmaktadır (382, 384). Sitokinlerin, kanser hücreleri, antijen sunucu hücreler gibi sitokin reseptörlerini taşıyan çeşitli hücrelerin hedef reseptöre bağlanmasını takiben, hücre içi ve hücreler arası sinyalizasyon tetiklenmekte ve böylece proliferasyon veya farklılaşma gibi belirli hücre fonksiyonlarında değişiklikler meydana gelmektedir. Hedef hücrelerin farklı sitokinlere farklı süre ve konsantrasyonlarda maruz kalma durumunda sinerji veya antagonizma gözlemlenmektedir. Bu sebeple nihai immün yanıtın ne olacağı yüksek derecede karmaşıklık içermektedir (382, 385). Çeşitli sitokinler (örneğin; IFN- $\gamma$ ), doğrudan antiproliferatif veya proapoptotik aktivite yoluyla veya dolaylı olarak bağışıklık hücrelerinin tümör hücrelerine karşı sitotoksik aktivitesini uyararak tümör hücresi büyümesini sınırlandırmaktadır. Bu biyobelirteçlerin seviyelerinin doğru ölçümü,

bağışıklık tepkilerinin ve birçok hastalık sürecinin derinlemesine anlaşılması için kritik öneme sahiptir. T hücresi aktivasyonunun gücü ve süresi, esas olarak antijen sunan hücrelerden kaynaklı ko-stimülasyon, ko-inhibisyon molekülleri ve sitokinlerle belirlenmektedir (386).

PKMH hücre kültürüne uygulanan formülasyon ve çözeltilerin 72 saat inkübasyon sonrası toplanan süpernatantları ile gerçekleştirilen boncuk temelli sitokin analizlerine ilişkin grafikler Şekil 4.49.'da (s.134) verilmiş olup, sitokin seviyelerine ilişkin ayrıntılı inceleme aşağıda yapılmıştır:

Şekil 4.49.-A (IL-2): IL-2, çoğunlukla yardımcı T hücreleri (CD4+) tarafından üretilmekte olup daha düşük düzeyde sitotoksik T hücreleri (CD8+) tarafından da üretilmektedir. Bu sitokin, T hücreleri için ana büyüme faktörüdür. Ayrıca B hücrelerinin büyümesini teşvik edebilir, NK hücreleri ve monositleri aktive edebilir. IL-2, T hücreleri üzerinde otokrin etkilidir. Dolayısıyla T hücrelerin aktivasyonu, yine T hücreleri yüzeyinde bulunan IL-2 reseptör ekspresyonu ve IL-2 üretimi ile sonuçlanır. Sonuçta hücrelerden salımı artan IL-2, IL-2 reseptörüne bağlanarak T hücre proliferasyonunu teşvik etmektedir (387). Bu bilgiler ışığında T hücre aktivasyonundan sonra IL-2 sekresyonunun artması istenen bir durumdur. Tüm deney gruplarında benzer bir IL-2 seviyesi mevcut olup, asıl tedavi grubu ve çözelti grubunda da benzer sonuçların alınması olumlu olarak değerlendirilmiştir.

Şekil 4.49.-B (TNF- $\alpha$ ): Tümör nekroz faktörü- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), makrofajlar ve T hücreleri tarafından üretilen bir sitokindir. İnflamasyonda, immün yanıtta ve kanserde merkezi rol oynamaktadır (388). TNF, naif (antijen ile henüz etkileşime girmemiş) ve efektör T hücrelerin (CD4+, CD8+, Treg) aktivasyonunu ve proliferasyonunu destekleyebilirken, yüksek düzeyde aktive olan efektör T hücrelerinin apoptozunu indükleyerek immünsüpresif bir molekül gibi davranabilmektedir (389, 390). TNF, immünoterapinin toksik yan etkilerine aracılık edebilir ayrıca immün kontrol noktası inhibitörlerine karşı dirence neden olabilir (388). TNF'nin, aktive CD8+ T lenfositlerin hücre ölümünü indükleyerek CD8+ T hücrelerine karşı doğrudan olumsuz bir etki gösterdiğini ortaya koyan çalışmalar mevcuttur (388, 390). Kanser Genomu Atlası veri tabanından elde edilen veriler, TNF'nin KHDAK'de bir biyobelirteç olabileceğini, TNF sitokini ve reseptörlerinin KHDAK'de karmaşık bir role (çift yönlü) sahip olabileceğini göstermektedir (388). Grafik incelendiğinde, kontrol

grubundaki farelerde TNF- $\alpha$  sekresyon seviyeleri 0,9 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Hedeflendirilmiş kombine etkin madde yüklü nanopartiküllerin (PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR-G-N KNP, kırmızı) kontrol grubuna kıyasla TNF- $\alpha$  sekresyonunun (14,7 ng/mL) arttığı tespit edilmiş, kombine ilaç çözeltisi grubunda (Nivolumab+galunisertib+anti-EGFR, lacivert) bu sekresyonun daha da artarak 29,8 ng/mL seviyelerine geldiği belirlenmiştir. LGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR-G-N KNP grubundaki farelerde TNF seviyelerinin çözelti grubuna kıyasla düşük olması, hedefli kombine etkin madde yüklü nanopartiküllerin immün yanıtta daha etkin rol almış olabileceğine işaret etmektedir.

Şekil 4.49.- C ve I (Perforin ve Granzim A): Kanser hücrelerinin CD8+ T hücreler tarafından öldürülmesi, granzimlerin salınması ile gerçekleşmektedir (391). Perforin ve granzimler NK hücre sitotoksitesisi açısından da önemlidir (392). TGF- $\beta$ 'nın, perforin ve granzimlerin üretimini azaltarak CD8+ T hücrelerinin sitotoksik fonksiyonunu belirgin şekilde baskıladığı bildirilmiştir (170, 393). Sonuç olarak yüksek perforin ve granzim seviyeleri, daha hızlı sitotoksik aktivite sağlamaktadır (394). Kombine etkin madde içeren gruptaki (Nivolumab+galunisertib+anti-EGFR çözeltisi, PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-G-N KNP ve PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR-G-N KNP) kontrol grubuna kıyasla artmış granzim A ve perforin seviyeleri galunisertibin tümör mikroçevresinde etkili olduğunu gösterebilir. Galunisertib varlığında bu sitokin seviyelerinin arttığını gösteren çalışmalar mevcuttur (392, 395).

Şekil 4.49.-D (IL-10): İnterlökin-10 (IL-10), bağışıklık yanıtlarını düzenleyen, T ve B lenfositleri tarafından üretilen güçlü bir antiinflamatuvar sitokindir. Ayrıca antitümör CD8+ T hücresi yanıtlarını artırdığı da prelinik çalışmalarla gösterilmiştir. IL-10'un antiinflamatuvar etkisi iyi tanımlanmış olmasına rağmen, tümör immünesindeki rolü hakkındaki bildirimler tartışmalıdır. Yapılan araştırmaların bir bölümü, artan IL-10 seviyelerinin immün yanıtı artırdığını gösterirken, diğer çalışmalarda immün yanıtı baskılayıcı etki gözlenmiştir (396). IL-10'un, CD4+ T hücrelerinin aktivasyonunu ve sitokin sekresyonunu doğrudan inhibe ettiği bilgisinin yanında, *in vitro* koşullarda CD8+ T hücrelerinin çoğalmasını ve sitotoksik aktivitesini indüklediği de bilinmektedir. Bununla birlikte, IL-10'un *in vivo* olarak IL-10 aracılı tümör reddi sırasında CD8+ T hücreleri üzerinde doğrudan etki edip etmediği veya

CD8+ T hücrelerinin aktivasyonunun diğer hücrelerin aracılık ettiği ikincil bir olay olup olmadığı bilinmemektedir (397). Sonuç olarak, *in vitro* koşullarda antitümör yanıtta olumlu etkisi olduğu düşünülen IL-10 için grafik D incelendiğinde, kontrol grubunda 15 pg/mL olarak gözlenen sitokin sekresyonunun, beklendiği şekilde, nivolumab+galunisertib+anti-EGFR çözeltisi grubu (125 pg/mL) ve PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR-G-N KNP grubunda (84,5 pg/mL) arttığı ve bu artışın PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR KNP grubuna (36,2 pg/mL) kıyasla daha fazla olduğu ( $p>0,05$ ) gözlenmiştir. Bu durum nivolumab ve galunisertibin immün yanıt üzerinde destekleyici bir fonksiyonu olabileceğine işaret etmektedir.

Şekil 4.49.-E (FasL): Fas'ın (APO-1 veya CD95 olarak da bilinir) da dahil olduğu çeşitli ölüm reseptörleri (DR3, DR4, DR5, TNFR1), ilgili ligandları tarafından (Fas için FasL) aktive edildiğinde apoptozu tetikleyebilir. FasL ağırlıklı olarak aktive T lenfositlerde ve NK hücrelerinde eksprese edilmektedir. FasL ve Fas'ın ekspresyonunun IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  veya IFN- $\gamma$  varlığında arttığı bilinmektedir. FasL'nin membrana bağlı formu (mFasL) proteinazlar tarafından parçalandıktan sonra çözümlü form olan sFasL'ye dönüşerek hücre yüzeyinden salınabilir (398). FasL aynı zamanda tümör hücrelerinin yüzeyinde de bulunabilir ancak incelenen numuneler sadece PKMH'leri içerdiği için bu deney kapsamında FasL artışı istenen bir durumdur, çünkü bu ligandın tümör hücresi üzerindeki Fas reseptörü ile etkileşmesi ile tümör hücrelerinin apoptozunun tetiklenmesini sağlayacaktır. Kit ile T hücre yüzeyinden salınan FasL seviyeleri (sFasL) incelenmiştir. Grafik E ve F kıyaslandığında IFN- $\gamma$  seviyeleri ile paralel FasL seviyeleri olduğu gözlenmiştir. PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR-G-N KNP grubunda sFasL seviyesi 15,8 ng/mL olarak ölçülmüş, beklendiği şekilde kontrol grubuna (6,5 ng/mL) kıyasla en fazla sekresyon artışı bu grupta olmuştur. Ayrıca, etkin madde veya hedefleme ligandı içeren tüm gruplarda (nivolumab+galunisertib+anti-EGFR çözeltisi, PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-G-N KNP, PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR-G-N KNP, PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR KNP) kontrol ve PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG KNP gruplarına kıyasla artmış FasL sekresyonları gözlenmiştir.

Şekil 4.49.-F (IFN- $\gamma$ ): IFN- $\gamma$ , çoğunlukla sitotoksik T, yardımcı T hücreleri 1 (Th-1) ve NK hücreleri tarafından üretilen önemli bir sitokindir. Hem doğal hem de adaptif bağışıklık yanıtında önemli fonksiyonları bulunmaktadır (387). Örneğin en

temel fagosite edici hücre olan makrofajlar, başta IFN- $\gamma$  olmak üzere T lenfosit kaynaklı sitokinlerle karşılaşınca aktive olmaktadır (399). IFN- $\gamma$  seviyesinin artması bağışık yanıt için istenen bir durumdur. TGF- $\beta$ , CD8+ T hücrelerinde IFN- $\gamma$  ekspresyonunu baskılamaktadır (170, 400). Dolayısıyla galunisertib içeren gruplarda IFN- $\gamma$  seviyesinin artması beklenmektedir. PD-1'in blokajı, interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) salgılanmasıyla birlikte T hücrelerini aktive etmektedir. Bu durumda nivolumab içeren nivolumab+galunisertib+anti-EGFR çözeltisi, PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-G-N KNP, PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR-G-N KNP gruplarında artmış IFN- $\gamma$  seviyeleri beklenmektedir. Deney sonuçları incelendiğinde, kontrol grubunda 3,5 ng/mL seviyesinde IFN- $\gamma$  sekresyonu tespit edilmiştir. Nivolumab+galunisertib+anti-EGFR çözeltisi (6,3 ng/mL) ve PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR-G-N KNP gruplarında (6,9 ng/mL) artmış IFN- $\gamma$  sekresyonu gözlenmiştir. Ek olarak PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-G-N KNP grubuna (4,9 ng/mL) kıyasla PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR-G-N KNP grubunda artmış IFN- $\gamma$  sekresyonu olduğu görülmektedir. Bu durum tümör mikroçevresine hedeflemenin immün yanıtı olumlu bir etkisi olduğunu gösterebilir.

Kanser öncüsü (prealign) hücrelerin proliferasyonunu ve anjiyogenezini indükleyen, metastaz için elverişli bir ortam sağlayan inflamasyon, kanserin gelişiminde görev yapmaktadır. Kanser tiplerinin yaklaşık % 25'i bir tür enfeksiyon veya inflamatuvar reaksiyonla ilişkilendirilmiştir. Tümör mikroçevresindeki proinflamatuvar sitokinler (IL-1, IL-6, IL-11, IL-15, IL-17, IL-23, TNF- $\alpha$ ), tümör hücresi çoğalmasının ve farklılaşmasını desteklemektedir (177). İnflamatuvar sitokinler yalnızca tümöre infiltre olan bağışıklık hücreleri tarafından üretilmez, aynı zamanda tümör hücreleri de lökositleri tümör bölgesine çekmek için bu sitokinleri aşırı eksprese edebilmektedir (177).

Şekil 4.49.-G (IL-6): IL-6, inflamasyonu ve inflamasyonun aracılık ettiği hastalıkları (örneğin; kanser) yönlendirmedeki rolü iyi bilinen bir proinflamatuvar sitokindir (177). IL-6 sinyalizasyonu sağlıklı dokularda T hücre proliferasyonunu destekleyici etki göstermesine rağmen (401), kanserde immün yanıtı baskılayıcı etki göstermektedir (402). Örneğin, Huseni ve arkadaşları (403) tarafından yürütülen klinik çalışmada renal hücreli karsinoma olan hastalardan tedavi öncesi ve PD-L1 ve IL-6 reseptörünün kombine blokajı sonrası alınan tümör örnekleri incelenmiştir. Kombine

blokaj tedavisinin tümörün sinerjistik gerilemesini sağladığı ve tek başına anti-PD-L1'e kıyasla anti-tümör CD8+ sitotoksik T lenfosit yanıtlarını önemli ölçüde iyileştirdiği belirlenmiştir. Dolayısıyla IL-6 seviyelerinin düşük olması immün yanıt için istenen bir durum olarak düşünülmektedir. G grafiği incelendiğinde, IL-6 seviyeleri kontrol grubu (serum fizyolojik) ve boş hedefli nanopartikül (PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR KNP) grubu haricinde benzer ve nispeten yüksek çıkmıştır. Bu durum, beş ve altıncı doz NP/çözelti uygulamasında gözlenen tümör dokusunun büyüme eğilimi ve ilaç direnci gelişimi ihtimali ile ilişkilendirilebilir.

Şekil 4.49.-H (IL-17A): IL-17A, CD4+ T yardımcı hücreleri, CD8+ sitotoksik T hücreleri tarafından salgılanan inflamatuvar bir sitokindir. Bu sitokin, CD4+ ve CD8+ T hücre infiltrasyonunu baskılayarak tümör büyümesini teşvik edebilir. Ancak son zamanlarda yapılan bazı çalışmalarda, IL-17A'nın bağışıklık hücreleri yoluyla antitümör etkinlik gösterdiği de tespit edilmiştir. Dolayısıyla IL-17A'nın tümör progresyonu üzerindeki rolü henüz net bir şekilde belirlenmemiştir (404).

Genel olarak *in vitro* PKMH numunelerine ilişkin sitokin seviyeleri değerlendirildiğinde, immün yanıtın kombine çözelti ve aktif hedefli kombine etkin madde yüklü nanopartiküllerle artırılmış olabileceği söylenebilir. *In vitro* analiz bir öngörü niteliğinde olup *in vivo* deneylere ilişkin kestirim yapılmasını sağlamaktadır. Nanopartiküllerin canlı sistemlerdeki davranışı (Bölüm 5.11.7., 5.11.8. ve 5.12.), kliniğe geçiş için daha kıyaslanabilir sonuçlar elde edilmesini sağlayacaktır.

#### **5.11.5. CD8/NK Boncuk Temelli Çoklu Analiz Kiti ile Yapılan *In Vivo* Sitokin Analizi**

Sitokin seviyelerinin immün yanıtı değerlendirmedeki rolüne ilişkin prelinik ve klinik çalışmalar mevcuttur. Örneğin, Su ve grubu (405) tarafından kolon kanseri geliştirilmiş BALB/C farelere tedavi amacıyla tekli veya kombine halde uygulanan PD-1v, IL-2/15, IL-12 ve GM-CSF rekombinant plazmidlerinin takibinde hem tümör çapları hem de boncuk temelli analiz ile sitokin seviyeleri değerlendirilmiştir. Kombine tedavide tümör çapında en az büyüme gözlenmiştir. Benzer yanıtlar sitokin analizleri ile de desteklenmiştir, örneğin IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 ve IL-5 sitokin seviyeleri kontrol grubuna kıyasla kombine tedavi alan grupta anlamlı derecede ( $p < 0,0001$ ) artmıştır. Lao ve grubu (399) tarafından anti-PD-1 tedavisi alan KHDAK hastalarla

gerçekleştirilen bir klinik araştırmada, tedaviye yanıt veren hastaların hem CD4+ hem de CD8+ hücrelerinde tedavi öncesine kıyasla IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  ve CD69 seviyelerinin arttığı belirlenmiştir ( $p < 0,05$ ).

Sitokin analizlerde kıyaslamalar genellikle, kontrol grubu veya tedavi grupları arasında ikili olarak yapılmaktadır. Ek olarak sitokinin ortamdaki varlığının yanında bağışıklık hücrelerinin sitokine ne kadar süre boyunca maruz kaldığı da immün yanıtın değerlendirilmesi için önemlidir. Örneğin, TNF- $\alpha$  gibi bazı sitokinlerin kısa süreli maruziyeti antiproliferatif etki sağlarken, bu sitokinlerin sürekli maruziyetinde beklenenin aksi yanıtlar gözlenebilmektedir (382).

Sitokinler hakkında genel bilgi, bir önceki başlığın (5.11.6.) açıklamalarında verilmiştir. Dolayısıyla bu bölümde sadece sitokinler ile tedavi etkinliği arasındaki ilişki incelenmiş ve *in vitro* analiz sonuçları ile karşılaştırma yapılmıştır.

Şekil 4.50.-A (IL-2): T hücre aktivasyonundan sonra IL-2 sekresyonunun artması istenen bir durumdur. Kontrol grubuna (serum fizyolojik) kıyasla, tüm deney gruplarında benzer ve artmış bir IL-2 seviyesi mevcut olup, etkin madde kombinasyonu içeren gruplarda en yüksek IL-2 seviyelerinin gözlenmesi olumlu olarak değerlendirilmiştir. *In vitro* analize kıyasla kontrol grubu ve PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG KNP grubu hariç tüm grupların IL-2 seviyesi yaklaşık iki kat artmıştır.

Şekil 4.50.-B (TNF- $\alpha$ ): *In vitro* deneylere kıyasla özellikle nivolumab+galunisertib+anti-EGFR çözeltisi ve PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR-G-N KNP gruplarında TNF- $\alpha$  değerlerinde düşüş gözlenmesi, kullanılan çözelti ve nanoformülasyonların *in vivo* koşullarda daha farklı ve immün yanıt artırıcı etki gösterebileceğine işaret etmektedir. Bu sitokin seviyesinin azalması immün yanıt açısından olumlu olarak değerlendirilmiştir.

Şekil 4.50.-C ve I (Perforin ve Granzim A): TGF- $\beta$ 'nın, perforin, granzimlerin üretimini azaltarak CD8+ T hücrelerinin sitotoksik fonksiyonunu belirgin şekilde baskıladığı bildirilmiştir (393). Kontrol grubu ve boş nanopartikül grubu, etkin madde veya hedefleme ligandı içeren nanopartiküller kıyaslandığında, gruplarda çok yakın sitokin seviyeleri elde edilmiş, dolayısıyla sonuçlar kıyaslanamamıştır.

Şekil 4.50.-D (IL-10): İnterlökin-10 (IL-10), bağışıklık yanıtlarını düzenleyen, T ve B lenfositleri tarafından üretilen güçlü bir antiinflamatuvar sitokindir. Kontrol

grubunda 1,7 pg/mL seviyesinde IL-10 sekresyonu gözlenmiştir. Nivolumab tedavisi alan hastaların serum numuneleri ile yapılan analizlerde antitümör yanıtta olumlu etkisi olduğu tespit edilen IL-10'un (371, 406) D grafiğindeki seviyeleri incelendiğinde, çözelti grubunda IL-10 sekresyonunda azalma gözlenirken (0,75 pg/mL), PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-G-N KNP (1,6 pg/mL) ve PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR-G-N KNP (1,9 pg/mL) gruplarındaki artmış IL-10 seviyeleri, nanopartiküllerin çözeltiye kıyasla daha güçlü bir immün yanıt sağlamış olabileceğine işaret edebilir.

Şekil 4.50.-E (FasL): FasL ve Fas'ın ekspresyonunun IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  veya IFN- $\gamma$  varlığında arttığı bilinmektedir (398). Tümör mikroçevresinde FasL artışı istenen bir durumdur, çünkü bu ligandın tümör hücresi üzerindeki Fas reseptörü ile etkileşmesi ile tümör hücrelerinin apoptozunun tetiklenmesini sağlanmaktadır. Kontrol grubunda 1,4 ng/mL olarak ölçülen sitokin sekresyonu, asıl tedavi grubunda (PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR-G-N KNP, kırmızı) beklenen şekilde artmıştır (1,8 ng/mL) ve diğer tüm gruplara kıyasla en yüksek FasL seviyesi gözlenmiştir ( $p > 0,05$ ).

Şekil 4.50.-F (IFN- $\gamma$ ): TGF- $\beta$ , CD8+ T hücrelerinde IFN- $\gamma$  ekspresyonunu baskılamaktadır (400). Dolayısıyla galunisertib içeren gruplarda IFN- $\gamma$  seviyesinin artması beklenmektedir. Kontrol grubundaki farelerde 5,3 ng/mL IFN- $\gamma$  üretimi gözlenmiştir. Galunisertib ve nivolumabın kombine olduğu çözelti grubunda diğer gruplara kıyasla daha yüksek IFN- $\gamma$  seviyeleri (12,3 ng/mL) gözlenmiştir. Kontrol ve boş NP gruplarına kıyasla; PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-G-N KNP (yeşil), PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR-G-N KNP (kırmızı) ve PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR KNP (turuncu) gruplarında da IFN- $\gamma$  sekresyonunun arttığı belirlenmiştir. Bu durum immün yanıtta etkin madde ve hedefleme ligandının pozitif rolü olabileceğine işaret etmektedir.

Şekil 4.50.-G (IL-6): IL-6 sinyalizasyonu, immün yanıtı baskılayıcı etki göstermektedir. Kontrol grubunda 0,6 ng/mL seviyelerinde IL-6 sitokini sekresyonu ölçülmüştür. Çözelti grubunda artmış IL-6 seviyeleri (2,9 ng/mL), çözelti grubuna karşı ilaç direnci gelişmiş olabileceğine işaret edebilir. PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-G-N KNP (yeşil), PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR-G-N KNP (kırmızı) gruplarında benzer ve düşük IL-6 seviyeleri kontrollü salım sayesinde ilaç

direnci gelişiminin önlenmesine ve bu sayede etkin immün yanıtta işaret edebilir.

**Şekil 4.50.-H (IL-17A):** IL-17A, CD4+ T yardımcı hücreleri, CD8+ sitotoksik T hücreleri tarafından salgılanan inflamatuvar bir sitokindir. Bu sitokin, CD4+ ve CD8+ T hücre infiltrasyonunu baskılayarak tümör büyümesini teşvik edebilir. Ancak son zamanlarda yapılan bazı çalışmalarda, IL-17A'nın bağışıklık hücreleri yoluyla antitümör etkinlik gösterdiği de tespit edilmiştir. Dolayısıyla IL17A'nın tümör progresyonu üzerindeki rolü henüz net bir şekilde belirlenmemiştir (404).

Sonuç olarak, sitokin seviyeleri değerlendirildiğinde, immün yanıtın nivolumab+galunisertib+anti-EGFR çözeltisi ve PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR-G-N KNP grubunda artırılmış olabileceği söylenebilmekte, yanıtlar *in vitro* deneyleri çoğunlukla destekler niteliktedir.

#### **5.11.6. *In Vivo* Tümör Numunelerindeki Yüzey Farklılaşma Antijenlerinin Akım Sitometri ile Analizi**

Yüzey farklılaşma antijenleri, bağışık yanıt sinyalizasyonunda kritik rollere sahiptir ve bu moleküllerin birçoğu lökosit tipine özgü farklılaşmaları sağlamaktadır. Örneğin yardımcı T hücreleri yüzeylerinde CD4, sitotoksik T hücreleri CD8 moleküllerini bulundurmakta ve bu sayede immün fenotiplemede birbirlerinden kolaylıkla ayırt edilebilmektedirler (407). CD8+ T hücrelerinde aktivasyonu, bir dizi etkileşimin gerekliliğini içeren karmaşık bir yapıdır. T hücresi reseptörü, antijen sunucu hücre ile karşılaştığı zaman MHC tarafından sunulan antijenle bağlanmayı takiben hücre içi sinyalizasyon CD3 kompleksi tarafından gerçekleştirilmektedir, ancak yanıtın başlatılması ve artırılması için CD8 ko-reseptörüne ihtiyaç duyulmaktadır. T hücresinin anerjiye (antijene karşı tepkisizlik) veya apoptoza yönelmemesi ve aktivasyonun güçlenmesi için, TCR sinyalinden gelen ilk aktive edici sinyalin, bağımsız, ortak bir uyarıcı sinyal tarafından takip edilmesi gereklidir. Bu ikinci sinyale, CD8+ T hücreleri üzerinde bulunan CD28 reseptörlerinin antijen sunucu hücrelerde bulunan CD80 veya CD86 ile etkileşimi aracılık etmektedir (132). Aşağıda analiz sonuçları tartışılan diğer CD molekülleri de T hücrelerin yeniden aktive olup olmadığına ilişkin bir öngörü sağlamaktadır.

CD45, T hücrelerinde en bol bulunan hücre yüzeyi glikoproteinlerinden birisidir (132), bu özelliği sayesinde tümör ve dalak dokularından boyama ile ayırt

edilerek CD molekül analizleri gerçekleştirilmiştir. İmmünoterapi etkinliği sitokin analizi dışında ayrıca akım sitometri analizi ile değerlendirilmiş ve potansiyel biyobelirteçlerin (CD) seviyelerine ilişkin grafikler (Şekil 4.51., s.136) aşağıda tartışılmıştır:

Şekil 4.51.-A ve B: PD-1, CD4+ ve CD8+ T hücrelerinin aktivasyonu sonucunda eksprese edilmektedir (386, 408). PD-1'in tümörlü hastaların T hücrelerinde daha yüksek düzeyde eksprese edildiği çalışmalarla gösterilmiştir (386). T hücreleri üzerindeki PD-1'in aktivasyonunun, T hücresi tükenmesine ve sonuçta tümör büyümesine yol açtığı bilinmektedir. Klinik çalışmalarda, PD-1'in CD4+ T hücreleri üzerindeki yüzey ekspresyonunun, KHDAK hastalarında düşük klinik yanıtla ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla bu biyobelirteç, tedaviye yanıt hakkında potansiyel bir öngörü sağlamaktadır (409). Nivolumab PD-1 blokörü olduğu için, sonuçlardan beklenen, nivolumab uygulanan gruplarda (Nivolumab+galunisertib+anti-EGFR çözeltisi, PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-G-N KNP, PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR-G-N KNP) en düşük PD-1+ yüzdelерinin gözlenmesidir. A grafiği incelendiğinde kontrol grubu hariç tüm gruplarda PD-1+ yüzdesi azalmıştır. Nivolumab içermeyen (PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR KNP ve PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG KNP) gruplardaki düşüşün sebebinin ek deneylerle araştırılması planlanmaktadır. CD8+ T lenfositlerde daha yüksek PD-1 ekspresyonu, T hücresi yanıtlarının inhibisyonu ve azalan antitümör aktivite ile ilişkilidir (386). Örneğin, A grafiğinde kontrol grubunun PD-1 seviyesi % 40 civarında iken, B grafiğinde bu yüzde 50'lere ulaşmıştır. PD-1 yolunun inhibe edilmesinin, sitotoksik T hücrelerinin (CD8+ T) anti-tümör aktivitesini artırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur (409). B grafiği incelendiğinde, CD8+ T hücrelerin PD-1 ekspresyonu, anti-PD-1 antikoru ile tedavi edilen gruplarda (Nivolumab+galunisertib+anti-EGFR çözeltisi ve PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR-G-N KNP) beklendiği şekilde azalmıştır. Asıl tedavi grubunda (kırmızı), ilaç çözeltisine (lacivert) kıyasla daha etkili bir reseptör blokasyonu olduğu gözlenmiştir. PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR KNP ve PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG KNP grubunda nivolumab bulunmamasına rağmen PD-1 değerinin kontrol grubuna kıyasla düşük olması yorumu zorlaştırmaktadır. PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-G-N KNP grubunda hedefleme ligandı bulunmaması önceki *in vitro*

ve *in vivo* deney sonuçları ile bağlantılı olarak immün yanıtta istenen etkinin alınamamasına neden olmuştur.

Şekil 4.51.-C ve D: CD25 geç aktivasyon biyobelirtecidir. CD25, IL-2 reseptörünün bir parçasıdır ve aktif T lenfositlerde ve Treg yüzeyinde yüksek miktarlarda eksprese edilmektedir (410). Bu belirtece ilişkin grafikler incelendiğinde beklenen yanıtların alınmadığı tespit edilmiştir. Her biyobelirtecin ekspresyon kinetiği birbirinden farklıdır. Örneğin, CD69 ekspresyonu CD25'ten daha önce olmaktadır, bu durum deneyin hangi aşamada sonlandırıldığına bağlı olarak değişiklik gösterebilir. Lee ve arkadaşlarının (411) T hücrelerine bağımlı bispesifik antikorlarla T hücre aktivasyonunu değerlendirdikleri bir çalışmada CD25 ve CD69 pozitiflik düzeylerinin antikorun konsantrasyonuna bağlı değişimini incelemişlerdir. Her iki biyobelirtecin yüksek ekspresyonu T hücre aktivasyonunda istenen bir durumdur. CD69'un konsantrasyon artışıyla korele olarak deney süresince CD25'e kıyasla daha fazla eksprese edildiği tespit edildiği ve bu durumun testin zaman ölçeğinden kaynaklandığı belirtilmiştir.

Şekil 4.51.-E ve F: CD45, T hücrelerinde bol bulunan bir transmembran proteindir. T hücreleri, antijeni tespit etmek ve yanıt vermek için CD45'e ihtiyaç duyar çünkü CD45, TCR kompleksinin fosforilasyonu için gerekli olan lenfosit özgül protein tirozin kinazı, kısa adıyla Lck'yı, aktive eder. Dolayısıyla CD45 pozitiflik immün yanıt için istenen bir durum olduğu düşünülebilir. T hücresi fonksiyonu için CD45'in gerekli olduğu kabul edilmektedir; ancak farklı deneysel gözlemler bunun TCR sinyalinin olumlu veya olumsuz etkileyebileceğini göstermektedir. Bu karmaşık durumun nedeni, CD45'in farklı yolları etkileyen substratlara sahip olmasıdır (412).

Şekil 4.51.-G ve H: CD69 erken aktivasyon biyobelirtecidir yani T hücrelerin aktive olması durumunda bu belirtecin yüksek olması beklenmektedir (413). Yue ve arkadaşları (413) tarafından yapılan bir *in vitro* araştırmada PBMC'lerden elde edilen ve CD3/CD28 uyarımı yapılmış T hücrelerine nivolumab (10 µg/mL) uygulaması ile hem CD4 hem de CD8 hücrelerinde CD69 seviyelerinde artış gözlenmiştir. Tez kapsamında CD-1 nude farelerden çıkarılan tümör dokularından elde edilen T hücreleri ile yapılan akış sitometri sonuçları incelendiğinde hem CD4+ hem de CD8+ T hücreleri için çözelti grubundaki (Nivolumab+galunisertib+anti-EGFR) CD69 pozitifliği diğer gruplara kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Bu durum çözelti

grubunda nivolumabın nanopartikül gruplarına kıyasla daha etkin bir şekilde T hücre proliferasyonu sağlamış olabileceğini göstermektedir, ancak tek bir biyobelirteç üzerinden bu yorumu yapmak mümkün olmamaktadır.

Şekil 4.51.-I ve J: CD38 aktivasyon biyobelirteçidir. Hem CD4+ hem de CD8+ T hücrelerinde artmış olması beklenmektedir. Nivolumab içeren; nivolumab+galunisertib+anti-EGFR çözeltisi, PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-G-N KNP, ve PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR-G-N KNP gruplarında CD4+ T hücrelerinde beklenen sonuç alınmış olmasına ve en iyi sonuçların hedefli kombine etkin madde yüklü nanopartiküllerde alınmış olmasına rağmen, CD8+ T hücrelerinde CD38+'lığının azalma eğilimine ilişkin gerekçe; literatürde CD38'in T hücreleri için PD-1 gibi bir bağışıklık kontrol noktası görevi görebileceğine ilişkin bulgular olarak gösterilebilir (414).

Şekil 4.51.-K: CD45, esas olarak bağışık hücrelerine eksprese edilmektedir. CD45+'lık T hücrelerini tümör hücrelerinden ayırt etmek amacıyla kullanılmaktadır. CD45+ hücrelerinin tümörde birikimi beklenen şekilde en çok çözelti (Nivolumab+galunisertib+anti-EGFR) grubundadır.

Sonuç olarak, *in vivo* deneylerden elde edilen tümör dokuları ile hem boncuk temelli sitokin analizleri hem de akım sitometri analizleri gerçekleştirilmiştir. Analizler ile KHDAK tedavisinin immün yanıt üzerindeki etkinliği incelenmiş ve özellikle ilaç çözeltisi ile hedefli kombine etkin madde yüklü nanopartikül gruplarının immün yanıt üzerine olumlu etkisi tespit edilmiş olup, bu durum tez çalışmasında seçilen kombinasyonun fayda sağladığını göstermiştir. *In vivo* boncuk temelli analiz bulguları genel olarak *in vitro* bulgularla uyumlu bulunmuştur.

### **5.12. *In Vivo* Çalışmalar Sonrası Tümörün Değerlendirmesi**

Tez kapsamında ilk olarak A549-Luc2 insan KHDAK hücrelerinin CD-1 nude farelere enjeksiyonu ile heterotopik olarak tümör modeli geliştirilmiş, ardından farelere sağlıklı gönüllülerden alınan PKMH'lerin enjeksiyonu ile humanizasyon işlemi yapılmıştır. Nanopartiküller, gerekli tedavi dozunu sağlayacak şekilde (3 mg/kg nivolumab, 1,4 mg/kg galunisertib) literatüre uyumlu olarak hazırlanmış ve tedavi süresince farelere kuyruk veninden uygulanmıştır.

Tümör çapı değişimi grafiğinde (Şekil 4.55., s.139), kombine etkin madde

yüklü hedefsiz nanopartikül (PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-G-N KNP) ve hedefsiz boş nanopartikül (PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG KNP) gruplarında tümör büyüklüğünün başlangıç (0,5 cm) boyutlarına göre yaklaşık % 35-40 artmış olduğu, tedavi süresince tümör boyutunda küçülmenin sadece kombine ilaç çözeltisi (nivolumab+galunisertib+anti-EGFR) ve hedeflendirilmiş kombine etkin madde yüklü nanopartikül (PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR-G-N KNP) (6. doz uygulması hariç) gruplarında olduğu gözlenmiştir. 4. dozdan sonra nivolumab+galunisertib+anti-EGFR çözeltisi ve PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR-G-N KNP gruplarındaki tümör çap artışının ilaç direncinden kaynaklanabileceği ya da fareleri tedavi süresince humanize etmek amacıyla uygulanan PKMH dozunun yetersiz gelmiş olabileceği düşünülmektedir (415). Tümör çapında küçülmenin görülüşü çözelti (nivolumab, galunisertib, anti-EGFR antikoru) ve hedeflendirilmiş kombine etkin madde yüklü nanopartikül grubu, tez kapsamında seçilen kombinasyonun başarılı olduğunu net bir şekilde ortaya koymaktadır. Ancak, hedeflendirilmiş kombine etkin madde yüklü nanopartikül grubunun çözeltiliye kıyasla tümör çapını daha az küçültmesi ( $p>0,05$ ) polimerik nanopartiküllerin farenin kuyruk veninden verilmesi sırasında, bilhassa üst üste uygulama sonrasında venin deforme olması ve nanopartikül formülasyonlarının uygulanmasında yaşanan zorluklar olarak düşünülmektedir.

PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-G-N KNP ve PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR-G-N KNP gruplarını kıyaslamak da literatüre katkı açısından oldukça önemlidir. Bu kıyaslama aktif hedeflemenin tedavideki rolünü açık bir şekilde göstermektedir. PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-G-N KNP ve PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR-G-N KNP gruplarındaki tümör çapları 19 günlük tedavi sonrası incelendiğinde, hedefli NP'lerde % 4 çap artışına rağmen hedefsiz NP'lerde ~% 40 çap artışı gözlenmiştir ( $p<0,01$ ). İki grup arasındaki tek farkın hedefleme olduğu dikkate alınır, anti-EGFR ile yapılan hedeflemenin başarılı olduğu açık bir şekilde gözlenmektedir. Bu sonuçlar, KHDAK gibi agresif tümörlerde tek başına pasif hedeflemenin yetersiz olabileceğini düşündürmektedir (43, 415, 416). Ayrıca, *in vivo* sonuçlar, Şekil 4.49.'daki (s.134) *in vitro* T hücre proliferasyon deneyinde gözlenen sonuçları destekler niteliktedir.

Kontrol grubu (serum fizyolojik) incelendiğinde, PLGA/PLGA-His/PLGA-

PEG-G-N KNP, PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR KNP ve PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG KNP gruplarına kıyasla tümör çaplarındaki artış daha düşüktür ve farelerin genel anlamda deney süresi boyunca refah seviyeleri iyi düzeyde bulunmuştur. Bu durumun temel sebebinin kuyruk venine yapılan serum fizyolojik uygulamasının nanopartiküllerde olduğu gibi vende deformasyona yol açmaması, bu sebeple PKMH'nin farelere daha etkin bir şekilde uygulanması olduğu düşünülmektedir. PKMH sayesinde etkin madde uygulanmaksızın bağışık yanıtın tek başına da bir miktar güçlendirildiği düşünülmektedir. Literatürde bu görüşü destekleyen araştırmalar bulunmaktadır. Örneğin, Liu ve ark. (417) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada tek başına insan akciğer adenokarsinoma hücreleri (Am1010) ve akciğer kanseri hücreleri + PKMH kombinasyonu şeklinde NOD/SCID farelere intraperitoneal yolla enjekte edilmiş, üç haftanın sonunda tümör boyutları incelendiğinde PKMH kombine olan grupta, sadece kanser hücreleri verilen gruba kıyasla tümör boyutları daha küçük bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Bu durum PKMH'nin tek başına tümör gelişimi üzerinde inhibitör etkisi olduğunu göstermektedir. PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-G-N KNP, PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR KNP ve PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG KNP grubunda kuyruk veninden yapılan nanopartikül uygulamalarının vücutta homojen dağılmamış olması ihtimali ve son uygulamalarda venin deforme olması sebebiyle etkili sonuç alınamamış olabileceği düşünülmektedir.

Farelerin tedavi süresince ölçülen ağırlıkları temel alınarak hazırlanmış olan zamana karşı % ağırlık değişim grafiği, Şekil 4.54.'te (s.139) verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, tüm gruplarda farelerin ağırlıkların başlangıca göre azaldığı, kilo kaybı yaşandığı gözlenmiştir. Ağırlıktaki azalmanın asıl tedavi grubu (kırmızı) ve kontrol grubunda (gri) en az olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubundaki ağırlık düşüşünün az olması hem serum fizyolojik uygulaması hem de PKMH ile bağışık yanıtın desteklenmesi ile ilişkilendirilmiştir. PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-G-N KNP ve PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR-G-N KNP grubunda gözlenen yan etkilerin az olması, ilaçların doğrudan çözelti halinde değil bir nanosisteme enkapsüle edilerek verilmesi ile ilişkilendirilmiştir. Sadece hedef bölgesinde ve kontrollü salım ile ani toksisite belirtilerinin önlenmesi literatürle uyumludur (43, 418). Çözelti grubunda gözlenen % 5 ağırlık değişiminin en önemli sebebinin farelerde tedavinin ilk

dozundan itibaren başlayan ishal olduğu düşünülmektedir. Hem kemoterapötiklerin hem de immünoterapötiklerin ortak yan etkilerinden olan ishal, çalışmalarda farelerde gözlenmekte ve ağırlık kaybına sebep olmaktadır (419, 420). PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-G-N KNP ve PLGA/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR-G-N KNP grubunda bu yan etki gözlenmezken çözelti grubunda ishalin gözlenmesi, antikanser ilaçların güncel tedavi yaklaşımı olan ilaç taşıyıcı sistemlere yüklenmesinin üstünlüklerine örnek olarak verilebilir.

Tümör çapındaki değişim açısından tümöre hedefli nanopartiküllerle aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmayan galunisertib, nivolumab ve anti-EGFR çözeltisi uygulanan grup da tez kapsamında literatürde ilk kez kombine halde nanosisteme enkapsüle edilen bu iki maddenin önerildiği gibi etkili olduğunu doğrulamaktadır. Bu noktada nanotaşıyıcı sistemin üstünlüğü kombine çözelti grubuna göre yan etki profilinin iyileştirilmesi yönünde olmuştur. Tez kapsamında elde edilen bulguların hedefli kombinasyon tedavisinin akciğer kanserinde kullanımına ilişkin etkinliği artırılmış, yenilikçi ve özgün immünoterapötik yaklaşım bir yaklaşım ortaya koyduğu ve klinik kullanım için umut vaat edeceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, tez kapsamında önerilen galunisertib+nivolumab kombinasyonunun, öngörülerimiz ile uyumlu olarak, nanopartiküle yüklenmesi ile etkin ve güvenli bir yaklaşım olabileceği gösterilmiştir. Anti-EGFR antikoru ile konjuge nanopartiküllerin hedefsiz nanopartiküllere kıyasla tedavi etkinliğini anlamlı derecede artırması, aktif hedeflemenin nanosistemlerin tedavi etkinliğinde önemli bir faktör olduğunun göstergesi olduğu şeklinde değerlendirilmiştir.

### **5.13. Biyodağılımın Değerlendirilmesi**

Biyodağılım çalışmaları floresan işaretli izotip veya anti-EGFR antikoru konjuge nanopartiküllerin farelerin kuyruk venine uygulanmasını takiben 14. saatte organ ve tümör dokularının görüntülenmesi ile gerçekleştirilmiştir. Antikor konjuge floresan özellikli nanopartiküllerin biyodağılımı (Şekil 4.58., s.141) incelendiğinde, nanopartiküllerin yaklaşık 200 nm boyutlara sahip olması ve i.v. uygulamanın bir sonucu olarak öncelikli olarak retiküloendotelial sistem organlarında (karaciğer ve dalak) birikime uğradığı tespit edilmiştir (313, 421). Cai ve arkadaşlarının (422)

osteosarkom tedavisinde kullanılmak üzere hazırladıkları 249 nm partikül boyutuna sahip PLGA nanopartiküller için, 24 saatlik biyodağılım çalışmaları sonucunda çalışmalarımıza benzer şekilde en yüksek birikimin karaciğer ve dalakta olduğu gözlenmiştir. Ek olarak, hedefli nanopartiküllerin karaciğerde ve böbrekte birikmesi, nanopartiküllerin vücuttan atılım yolları nedeniyle, beklenen bir durumdur (423). PLGA-FPI749/PLGA-His/PLGA-PEG-anti-EGFR KNP'nin uygulandığı gruptan beklenti, PLGA-FPI749/PLGA-His/PLGA-PEG-İzo KNP'nin uygulandığı gruba kıyasla EGFR ekspresyonunun yoğun olduğu tümör dokusunda artmış bir birikimdir. Sonuçlar bu beklentiyi destekler niteliktedir ve aktif hedeflendirilmiş nanopartiküllerin tümör dokusunda daha fazla birikime uğradığı görülmektedir ( $p>0.05$ ). Sun ve arkadaşları (424) tarafından floresan özellikli kumarin 6 yüklü, hedefsiz veya CD konjuge pegile polikaprolakton nanopartikülleri üretilmiş ve glioma tümörü geliştirilen farelere uygulanmıştır. 24 saatin sonunda vücuttaki birikim incelendiğinde hedefsiz nanopartiküllere kıyasla hedefli nanopartiküller tümör dokusunda daha fazla birikim göstermiştir. Tez sonuçlarımıza benzer sonuçlar elde edilen bir diğer biyodağılım çalışmasında, Venugopal ve arkadaşları (425) tarafından floresein izotiyosinat yüklü, hedefsiz ve anti-EGFR hedefli PLGA nanopartikülleri nanoçöktürme yöntemi ile üretilmiş ve heterotopik olarak üçlü negatif meme kanseri geliştirilen farelere uygulanmıştır. 24 saatin sonunda hedefsiz nanopartiküllerden gelen floresan ışımaya tüm vücutta gözlenirken hedefli nanopartiküllere ilişkin sinyaller en fazla tümör dokusundan alınmıştır.

Bunun yanı sıra, hedeflendirmeden bağımsız olarak nanopartiküllerin boyutu, zeta potansiyel değeri ve bileşimindeki polimer özelliklerinden dolayı her iki nanopartikülün de (izotip antikör ve anti-EGFR konjuge) akciğerde biriktiği gözlemlenmiştir. Bu durum, söz konusu nanopartiküllerin KHDAK tedavisi için geliştirilmiş olması nedeniyle, olumlu ve ümit vadeden bir gelişme olarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, tezin hipotezinde nanopartiküllerin tümör mikroçevresine hedeflendirilmesi planlanmıştır. Bu bağlamda sonuçlar, hedefleme ligandının başarılı bir şekilde çalıştığını göstermektedir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar ile elde edilen sonuçlar özetlenecek olursa:

- Güncel olarak KHDAK'nin tedavisinde immünoterapötik olarak kullanılan nivolumab, etkinliğinin artırılması amacıyla tez kapsamında TGF- $\beta$  inhibitörü galunisertib ile kombine edilmiştir. Bu kombinasyonun tümör mikroçevresine hedeflendirilerek etkinliğinin artırılması ve olası yan etkilerin azaltılması amacıyla nanopartiküler bir ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmiştir. Kanda kalış süresinin optimizasyonu ve tümör hücreleri ile etkileşimlerinin iyileştirilmesi fikri ile tez kapsamında, farklı geometrik şekillere sahip PLGA nanopartikülleri üretilmiş ve *in vitro/in vivo* karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen deneysel sonuçlar, kullanılan etkin maddeler, nanosistemin kompozisyonu, çalışılan hücre hattı ve geliştirilen tümör modeli için optimum nanopartikül şekli küre olarak belirlenmiştir. İdeal nanopartikül şeklinin formülasyon bileşenleri ve test edilecek hastalık modeline göre değişkenlik gösterebileceği görülmüştür.
- İmmünoterapötik olarak kullanılan anti-PD-1, boyutunun küçültülmesi amacıyla fragmente edilmiştir. Ancak, bütün antikor ile karşılaştırmalı olarak elde edilen deneysel bulgulara göre fragmente antikorun immün yanıtı yetersiz bulunmuştur. Antikorların fragmentasyonuna yönelik çok sayıda çalışma yapılıyor olsa da fragmentasyonun doğrulanması, fragmente antikorun stabilitesi ve etkinliği kapsamlı bir şekilde araştırılmalıdır.
- Tez kapsamında iki aşamada gerçekleştirilen *in vivo* deneylerin ortotopik tümör modeli ile gerçekleştirilmesi planlanmıştır. Ancak, akciğerde tümör geliştirilmesinde % 50 başarıya ulaşılabilmıştır. Bu nedenle tümör modeli heterotopik olarak sırt bölgesinde geliştirilmiştir. Bu durumun üstesinden gelebilmek için ortotopik tümör modeli geliştirilmesine yönelik daha başarılı yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulduğu görülmüştür.
- Tez kapsamında önerilen galunisertib+nivolumab kombinasyonunun, önerildiği üzere etkili bir kombinasyon seçeneği olduğu *in vitro* ve *in vivo*

çalışmalar ile gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar ile, bu kombinasyonun hem çözelti formunda hem de nanopartikül formunda etkili bir kombinasyon olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Etkin maddeler çözelti formunda farelerde ishale yol açarken aktif hedeflendirilmiş nanopartikül formunda ishal gözlenmemiştir. Bu durum, bilhassa kronik kullanımın yaratacağı yan etkilerin üstesinden gelebilmek için tümöre hedeflendirilmiş nanopartikül formülasyonlarının daha güvenilir olabileceğini göstermektedir.

- Tezin ilk aşamalarında farklı şekillerin kıyaslanması amacıyla yapılan çalışmalar Farmasötik Teknoloji alanında uluslararası öneme sahip 20. *International Pharmaceutical Technology Symposium*'unda sözlü bildiri olarak sunulmuştur. Farklı şekillerdeki nanopartiküllerin üretimi ve karakterizasyonuna ilişkin “*Effects of Particle Geometry for PLGA-Based Nanoparticles: Preparation and In Vitro/In Vivo Evaluation*” başlıklı bilimsel araştırma makalesi, eczacılık alanının önde gelen, prestijli dergilerinden biri olan *Pharmaceutics*'te (impact faktörü: 6,53) 03.01.2023 tarihinde yayınlanmıştır.
- Sonuç olarak, konvansiyonel dozaj şekillerine göre formülasyonu ve üretim prosesi oldukça kompleks olan aktif hedeflendirilmiş polimerik nanopartiküllerin planlanan yüksek etkinlik ve düşük yan etki profilini gösterebilmeleri ve endüstriyel boyutta üretilerek klinikte kullanım onayı alabilmeleri için yapılan her bir çalışma bilime katkı açısından büyük önem taşımaktadır. Yapılan araştırmaların sonucunda elde edilen bulguların oluşturduğu bilgi havuzu formülasyondan üretime her bir parametrenin önemli olduğu nanoteknolojik ilaçlarda araştırmacılara yön vermektedir. Yüksek maliyet ve yoğun emek gerektiren bu çalışmalardan elde edilen değerli bulgular, spesifik hasta grupları için kişiselleştirilmiş tedavi seçeneği oluşturabilecek formülasyonlar için büyük önem taşımaktadır.

## 7. KAYNAKLAR

1. Chhikara BS, Parang K. Global Cancer Statistics 2022: the trends projection analysis. *Chemical Biology Letters*. 2023;10(1):451-.
2. Gaidai O, Xing Y, Balakrishna R, Sun J, Bai X. Prediction of death rates for cardiovascular diseases and cancers. *Cancer Innovation*. 2023.
3. Abd-Aziz N, Kamaruzman NI, Poh CL. Development of microRNAs as potential therapeutics against cancer. *Journal of oncology*. 2020;2020.
4. Oczkowski M, Dziendzikowska K, Pasternak-Winiarska A, Włodarek D, Gromadzka-Ostrowska J. Dietary factors and prostate cancer development, progression, and reduction. *Nutrients*. 2021;13(2):496.
5. Zugazagoitia J, Guedes C, Ponce S, Ferrer I, Molina-Pinelo S, Paz-Ares L. Current challenges in cancer treatment. *Clinical therapeutics*. 2016;38(7):1551-66.
6. Soerjomataram I, Bray F. Planning for tomorrow: global cancer incidence and the role of prevention 2020–2070. *Nature reviews Clinical oncology*. 2021;18(10):663-72.
7. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International journal of cancer*. 2021;149(4):778-89.
8. Hirsch FR, Scagliotti GV, Mulshine JL, Kwon R, Curran WJ, Wu Y-L, et al. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. *The Lancet*. 2017;389(10066):299-311.
9. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2021;71(3):209-49.
10. Lemjabbar-Alaoui H, Hassan OU, Yang Y-W, Buchanan P. Lung cancer: Biology and treatment options. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*. 2015;1856(2):189-210.
11. Latimer KM, Mott TF. Lung cancer: diagnosis, treatment principles, and screening. *American family physician*. 2015;91(4):250-6.
12. Li W, Liu J-B, Hou L-K, Yu F, Zhang J, Wu W, et al. Liquid biopsy in lung cancer: significance in diagnostics, prediction, and treatment monitoring. *Molecular cancer*. 2022;21(1):25.
13. Amreddy N, Babu A, Muralidharan R, Munshi A, Ramesh R. Polymeric nanoparticle-mediated gene delivery for lung cancer treatment. *Polymeric Gene Delivery Systems*. 2018:233-55.
14. Thai A. A.; Solomon, BJ; Sequist, LV; Gainor, JF; Heist, RS Lung cancer. *Lancet*. 2021;398:535-54.

15. Mithoowani H, Febbraro M. Non-small-cell lung cancer in 2022: A review for general practitioners in oncology. *Current Oncology*. 2022;29(3):1828-39.
16. Rüttinger D, Hatz R, Jauch KW, Fox BA. Novel strategies for lung cancer immunotherapy. *General Thoracic Surgery: Seventh Edition: Wolters Kluwer Health Adis (ESP)*; 2011. p. 4075-98.
17. Ghosh S, Javia A, Shetty S, Bardoliwala D, Maiti K, Banerjee S, et al. Triple negative breast cancer and non-small cell lung cancer: Clinical challenges and nano-formulation approaches. *Journal of Controlled Release*. 2021;337:27-58.
18. Šutić M, Vukić A, Baranašić J, Försti A, Džubur F, Samaržija M, et al. Diagnostic, predictive, and prognostic biomarkers in non-small cell lung cancer (NSCLC) management. *Journal of personalized medicine*. 2021;11(11):1102.
19. NCI. Non-Small Cell Lung Cancer Treatment (PDQ®) 2023 [Erişim tarihi: 24.09.2023, Available from: [https://www.cancer.gov/types/lung/patient/non-small-cell-lung-treatment-pdq#\\_164](https://www.cancer.gov/types/lung/patient/non-small-cell-lung-treatment-pdq#_164)].
20. Goldstraw P, Ball D, Jett JR, Le Chevalier T, Lim E, Nicholson AG, et al. Non-small-cell lung cancer. *The Lancet*. 2011;378(9804):1727-40.
21. Huang BW, Wang WQ, Cai JS, Zhang SW. Investigations of the distant metastatic non-small cell lung cancer without local lymph node involvement: Real world data from a large database. *The Clinical Respiratory Journal*. 2023.
22. Whatcott CJ, Han H, Posner RG, Hostetter G, Von Hoff DD. Targeting the tumor microenvironment in cancer: why hyaluronidase deserves a second look. *Cancer discovery*. 2011;1(4):291-6.
23. García-Fernández C, Fornaguera C, Borrós S. Nanomedicine in non-small cell lung cancer: From conventional treatments to immunotherapy. *Cancers*. 2020;12(6):1609.
24. Carbone DP, Reck M, Paz-Ares L, Creelan B, Horn L, Steins M, et al. First-line nivolumab in stage IV or recurrent non-small-cell lung cancer. *New England Journal of Medicine*. 2017;376(25):2415-26.
25. Brown A, Kumar S, Tchounwou PB. Cisplatin-based chemotherapy of human cancers. *Journal of cancer science & therapy*. 2019;11(4).
26. Gandin V, Hoeschele JD, Margiotta N. Special Issue "Cisplatin in Cancer Therapy: Molecular Mechanisms of Action 3.0". MDPI; 2023. p. 7917.
27. Society AC. Targeted Drug Therapy for Non-Small Cell Lung Cancer: ACS; 2022 [Erişim tarihi: 24.09.2023, Available from: <https://www.cancer.org/cancer/types/lung-cancer/treating-non-small-cell/targeted-therapies.html>].
28. Greillier L, Tomasini P, Barlesi F. Necitumumab for non-small cell lung cancer. Expert opinion on biological therapy. 2015;15(8):1231-9.
29. Foundation LCR. FDA approvals in lung cancer treatment 2023 [Erişim tarihi: 19.09.2023, Available from: ]

<https://www.lungcancerresearchfoundation.org/research/why-research/treatment-advances/>.

30. Li B, Zhang J, Su Y, Hou Y, Wang Z, Zhao L, et al. Overexpression of PTEN may increase the effect of pemetrexed on A549 cells via inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway and carbohydrate metabolism. *Molecular Medicine Reports*. 2019;20(4):3793-801.
31. Leonetti A, Sharma S, Minari R, Perego P, Giovannetti E, Tiseo M. Resistance mechanisms to osimertinib in EGFR-mutated non-small cell lung cancer. *British journal of cancer*. 2019;121(9):725-37.
32. Society AC. Treating Non-Small Cell Lung Cancer 2023 [Erişim tarihi: 09.10.2023, Available from: <https://www.cancer.org/cancer/types/lung-cancer/treating-non-small-cell/by-stage.html>].
33. Cheng Y, Zhang T, Xu Q. Therapeutic advances in non-small cell lung cancer: Focus on clinical development of targeted therapy and immunotherapy. *MedComm*. 2021;2(4):692-729.
34. Desai A, Peters S. Immunotherapy-based combinations in metastatic NSCLC. *Cancer Treatment Reviews*. 2023:102545.
35. Zhao L, Wang W-J, Zhang J-N, Zhang X-Y. 5-Fluorouracil and interleukin-2 immunochemotherapy enhances immunogenicity of non-small cell lung cancer A549 cells through upregulation of NKG2D ligands. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2014;15(9):4039-44.
36. Mohajer F, Mirhosseini-Eshkevari B, Ahmadi S, Ghasemzadeh MA, Mohammadi Ziarani G, Badiei A, et al. Advanced Nanosystems for Cancer Therapeutics: A Review. *ACS Applied Nano Materials*. 2023;6(9):7123-49.
37. Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature Nanotechnology*. 2007;2(12):751-60.
38. Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nano-enabled medical applications*. 2020:61-91.
39. Yaqoob AA, Ahmad H, Parveen T, Ahmad A, Oves M, Ismail IM, et al. Recent advances in metal decorated nanomaterials and their various biological applications: A review. *Frontiers in chemistry*. 2020;8:341.
40. Hajebi S, Rabiee N, Bagherzadeh M, Ahmadi S, Rabiee M, Roghani-Mamaqani H, et al. Stimulus-responsive polymeric nanogels as smart drug delivery systems. *Acta biomaterialia*. 2019;92:1-18.
41. Dang Y, Guan J. Nanoparticle-based drug delivery systems for cancer therapy. *Smart Materials in Medicine*. 2020;1:10-9.

42. Patra JK, Das G, Fraceto LF, Campos EVR, Rodriguez-Torres MdP, Acosta-Torres LS, et al. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *Journal of nanobiotechnology*. 2018;16(1):1-33.
43. Yao Y, Zhou Y, Liu L, Xu Y, Chen Q, Wang Y, et al. Nanoparticle-based drug delivery in cancer therapy and its role in overcoming drug resistance. *Frontiers in molecular biosciences*. 2020;7:193.
44. Norouzi M, Amerian M, Amerian M, Atyabi F. Clinical applications of nanomedicine in cancer therapy. *Drug discovery today*. 2020;25(1):107-25.
45. Kroschinsky F, Stölzel F, von Bonin S, Beutel G, Kochanek M, Kiehl M, et al. New drugs, new toxicities: severe side effects of modern targeted and immunotherapy of cancer and their management. *Critical Care*. 2017;21:1-11.
46. Brandis JE, Kihn KC, Taraban MB, Schnorr J, Confer AM, Batelu S, et al. Evaluation of the physicochemical properties of the iron nanoparticle drug products: brand and generic sodium ferric gluconate. *Molecular Pharmaceutics*. 2021;18(4):1544-57.
47. Anselmo AC, Mitragotri S. Nanoparticles in the clinic. *Bioengineering & translational medicine*. 2016;1(1):10-29.
48. Barenholz Y. Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *Journal of Controlled Release*. 2012;160(2):117-34.
49. Bobo D, Robinson KJ, Islam J, Thurecht KJ, Corrie SR. Nanoparticle-based medicines: a review of FDA-approved materials and clinical trials to date. *Pharmaceutical research*. 2016;33(10):2373-87.
50. Agrahari V, Agrahari V. Facilitating the translation of nanomedicines to a clinical product: challenges and opportunities. *Drug Discovery Today*. 2018;23(5):974-91.
51. Fröhlich E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *International journal of nanomedicine*. 2012;5577-91.
52. Farjadian F, Ghasemi A, Gohari O, Roointan A, Karimi M, Hamblin MR. Nanopharmaceuticals and nanomedicines currently on the market: challenges and opportunities. *Nanomedicine*. 2019;14(1):93-126.
53. Supuran CT. Agents for the prevention and treatment of age-related macular degeneration and macular edema: a literature and patent review. *Expert opinion on therapeutic patents*. 2019;29(10):761-7.
54. Dinndorf PA, Gootenberg J, Cohen MH, Keegan P, Pazdur R. FDA drug approval summary: pegaspargase (Oncaspar®) for the first-line treatment of children with acute lymphoblastic leukemia (ALL). *The oncologist*. 2007;12(8):991-8.
55. Shreffler, Pullan, Dailey, Mallik, Brooks. Overcoming Hurdles in Nanoparticle Clinical Translation: The Influence of Experimental Design and Surface Modification. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(23):6056.

56. NanoCrystal MA. Megestrol Acetate NCD Oral Suspension–Par Pharmaceutical. 2007.
57. Dhapte V, Pokharkar V. Nanosystems for drug delivery: Design, engineering, and applications. *Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles*: Elsevier; 2019. p. 321-45.
58. Dawidczyk CM, Russell LM, Searson PC. Nanomedicines for cancer therapy: state-of-the-art and limitations to pre-clinical studies that hinder future developments. *Frontiers in chemistry*. 2014;2:69.
59. Silverman JA, Deitcher SR. Marqibo®(vincristine sulfate liposome injection) improves the pharmacokinetics and pharmacodynamics of vincristine. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2013;71(3):555-64.
60. Bhardwaj V, Kaushik A, Khatib Z, Nair M, McGoron A. Recalcitrant issues and new frontiers in nano-pharmacology. *Front Pharmacol*. 2019; 10: 1369.
61. Holder JE, Ferguson C, Oliveira E, Lodeiro C, Trim CM, Byrne LJ, et al. The use of nanoparticles for targeted drug delivery in non-small cell lung cancer. *Frontiers in Oncology*. 2023;13:1154318.
62. Bhatia S. Nanoparticles types, classification, characterization, fabrication methods and drug delivery applications. *Natural polymer drug delivery systems*: Springer; 2016. p. 33-93.
63. Aghebati-Maleki A, Dolati S, Ahmadi M, Baghbanzhadeh A, Asadi M, Fotouhi A, et al. Nanoparticles and cancer therapy: Perspectives for application of nanoparticles in the treatment of cancers. *Journal of cellular physiology*. 2020;235(3):1962-72.
64. Khan I, Saeed K, Khan I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian journal of chemistry*. 2019;12(7):908-31.
65. Zielińska A, Carreiró F, Oliveira AM, Neves A, Pires B, Venkatesh DN, et al. Polymeric nanoparticles: production, characterization, toxicology and ecotoxicology. *Molecules*. 2020;25(16):3731.
66. Chan JM, Valencia PM, Zhang L, Langer R, Farokhzad OC. Polymeric nanoparticles for drug delivery. *Cancer Nanotechnology: Methods and Protocols*. 2010:163-75.
67. Tabatabaei Mirakabad FS, Nejati-Koshki K, Akbarzadeh A, Yamchi MR, Milani M, Zarghami N, et al. PLGA-based nanoparticles as cancer drug delivery systems. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2014;15(2):517-35.
68. Adler MJ, Dimitrov DS. Therapeutic antibodies against cancer. *Hematology/Oncology Clinics*. 2012;26(3):447-81.
69. Duwa R, Banstola A, Emami F, Jeong J-H, Lee S, Yook S. Cetuximab conjugated temozolomide-loaded poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for targeted nanomedicine in EGFR overexpressing cancer cells. *Journal of drug delivery science and technology*. 2020;60:101928.

70. Patel J, Amrutiya J, Bhatt P, Javia A, Jain M, Misra A. Targeted delivery of monoclonal antibody conjugated docetaxel loaded PLGA nanoparticles into EGFR overexpressed lung tumour cells. *Journal of microencapsulation*. 2018;35(2):204-17.
71. Ding D, Zhu Q. Recent advances of PLGA micro/nanoparticles for the delivery of biomacromolecular therapeutics. *Materials Science and Engineering: C*. 2018;92:1041-60.
72. Ordikhani F, Uehara M, Kasinath V, Dai L, Eskandari SK, Bahmani B, et al. Targeting antigen-presenting cells by anti-PD-1 nanoparticles augments antitumor immunity. *JCI insight*. 2018;3(20).
73. Liu Y, Tan J, Thomas A, Ou-Yang D, Muzykantov VR. The shape of things to come: importance of design in nanotechnology for drug delivery. *Therapeutic delivery*. 2012;3(2):181-94.
74. Wang W, Gaus K, Tilley RD, Gooding JJ. The impact of nanoparticle shape on cellular internalisation and transport: what do the different analysis methods tell us? *Materials Horizons*. 2019;6(8):1538-47.
75. Haryadi BM, Hafner D, Amin I, Schubel R, Jordan R, Winter G, et al. Nonspherical nanoparticle shape stability is affected by complex manufacturing aspects: Its implications for drug delivery and targeting. *Advanced healthcare materials*. 2019;8(18):1900352.
76. Ahmad T, Bustam MA, Irfan M, Moniruzzaman M, Asghar HMA, Bhattacharjee S. Green synthesis of stabilized spherical shaped gold nanoparticles using novel aqueous *Elaeis guineensis* (oil palm) leaves extract. *Journal of Molecular Structure*. 2018;1159:167-73.
77. Zhu X, Vo C, Taylor M, Smith BR. Non-spherical micro-and nanoparticles in nanomedicine. *Materials Horizons*. 2019;6(6):1094-121.
78. Durymanov MO, Rosenkranz AA, Sobolev AS. Current approaches for improving intratumoral accumulation and distribution of nanomedicines. *Theranostics*. 2015;5(9):1007.
79. Truong NP, Whittaker MR, Mak CW, Davis TP. The importance of nanoparticle shape in cancer drug delivery. *Expert opinion on drug delivery*. 2015;12(1):129-42.
80. Kaplan M, Öztürk K, Öztürk SC, Tavukçuoğlu E, Esendağlı G, Calis S. Effects of Particle Geometry for PLGA-Based Nanoparticles: Preparation and In Vitro/In Vivo Evaluation. *Pharmaceutics*. 2023;15(1):175.
81. Zhao X, Suryawanshi S, Hruska M, Feng Y, Wang X, Shen J, et al. Assessment of nivolumab benefit–risk profile of a 240-mg flat dose relative to a 3-mg/kg dosing regimen in patients with advanced tumors. *Annals of Oncology*. 2017;28(8):2002-8.
82. Hao N, Li L, Zhang Q, Huang X, Meng X, Zhang Y, et al. The shape effect of PEGylated mesoporous silica nanoparticles on cellular uptake pathway in Hela cells. *Microporous and mesoporous materials*. 2012;162:14-23.

83. Zhang B, Sai Lung P, Zhao S, Chu Z, Chrzanowski W, Li Q. Shape dependent cytotoxicity of PLGA-PEG nanoparticles on human cells. *Scientific reports*. 2017;7(1):7315.
84. Zhou Z, Ma X, Jin E, Tang J, Sui M, Shen Y, et al. Linear-dendritic drug conjugates forming long-circulating nanorods for cancer-drug delivery. *Biomaterials*. 2013;34(22):5722-35.
85. Park JH, von Maltzahn G, Zhang L, Derfus AM, Simberg D, Harris TJ, et al. Systematic surface engineering of magnetic nanoworms for in vivo tumor targeting. *small*. 2009;5(6):694-700.
86. Jindal AB. The effect of particle shape on cellular interaction and drug delivery applications of micro-and nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*. 2017;532(1):450-65.
87. Kapate N, Clegg JR, Mitragotri S. Non-spherical micro-and nanoparticles for drug delivery: Progress over 15 years. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2021.
88. Champion JA, Katare YK, Mitragotri S. Making polymeric micro-and nanoparticles of complex shapes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(29):11901-4.
89. Choi J-S, Park J-S. Design and evaluation of the anticancer activity of paclitaxel-loaded anisotropic-poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles with PEGylated chitosan surface modifications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020;162:1064-75.
90. Patrone PN, Dienstfrey A, Browning AR, Tucker S, Christensen S. Uncertainty quantification in molecular dynamics studies of the glass transition temperature. *Polymer*. 2016;87:246-59.
91. Rahim MA, Jan N, Khan S, Shah H, Madni A, Khan A, et al. Recent advancements in stimuli responsive drug delivery platforms for active and passive cancer targeting. *Cancers*. 2021;13(4):670.
92. Wakaskar RR. Passive and active targeting in tumor microenvironment. *Int J Drug Dev Res*. 2017;9(2):37-41.
93. Wen Y, Schreiber CL, Smith BD. Dual-targeted phototherapeutic agents as magic bullets for cancer. *Bioconjugate Chemistry*. 2020;31(3):474-82.
94. Tewabe A, Abate A, Tamrie M, Seyfu A, Abdela Siraj E. Targeted drug delivery—from magic bullet to nanomedicine: principles, challenges, and future perspectives. *Journal of Multidisciplinary Healthcare*. 2021:1711-24.
95. Çalış S, Atar KÖ, Arslan FB, Eroğlu H, Çapan Y. Nanopharmaceuticals as Drug-Delivery Systems: For, Against, and Current Applications. *Nanocarriers for Drug Delivery*: Elsevier; 2019. p. 133-54.
96. Yu MK, Park J, Jon S. Targeting strategies for multifunctional nanoparticles in cancer imaging and therapy. *Theranostics*. 2012;2(1):3.

97. Valcourt DM, Harris J, Riley RS, Dang M, Wang J, Day ES. Advances in targeted nanotherapeutics: from bioconjugation to biomimicry. *Nano research*. 2018;11:4999-5016.
98. Tian H, Zhang T, Qin S, Huang Z, Zhou L, Shi J, et al. Enhancing the therapeutic efficacy of nanoparticles for cancer treatment using versatile targeted strategies. *Journal of hematology & oncology*. 2022;15(1):1-40.
99. Pattni BS, Torchilin VP. Targeted drug delivery systems: Strategies and challenges. *Targeted drug delivery: Concepts and design: Springer*; 2015. p. 3-38.
100. Attia MF, Anton N, Wallyn J, Omran Z, Vandamme TF. An overview of active and passive targeting strategies to improve the nanocarriers efficiency to tumour sites. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2019;71(8):1185-98.
101. Subhan MA, Yalamarty SSK, Filipczak N, Parveen F, Torchilin VP. Recent advances in tumor targeting via EPR effect for cancer treatment. *Journal of personalized medicine*. 2021;11(6):571.
102. Jhaveri AM, Torchilin VP. Multifunctional polymeric micelles for delivery of drugs and siRNA. *Frontiers in pharmacology*. 2014;5:77.
103. Ikeda-Imafuku M, Wang LL-W, Rodrigues D, Shaha S, Zhao Z, Mitragotri S. Strategies to improve the EPR effect: A mechanistic perspective and clinical translation. *Journal of Controlled Release*. 2022;345:512-36.
104. Zheng M, Mei T, Deng C, Xin J, Aras O, An F, et al. The Influence of PEG Chain Length on the in vivo Tumor Accumulation of Self-assembled Amphiphilic Drug-PEG Polymeric Micelles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2023:132823.
105. Chen Z, Kankala RK, Long L, Xie S, Chen A, Zou L. Current understanding of passive and active targeting nanomedicines to enhance tumor accumulation. *Coordination Chemistry Reviews*. 2023;481:215051.
106. Wei Y, Quan L, Zhou C, Zhan Q. Factors relating to the biodistribution & clearance of nanoparticles & their effects on in vivo application. *Nanomedicine*. 2018;13(12):1495-512.
107. Master AM, Qi Y, Oleinick NL, Gupta AS. EGFR-mediated intracellular delivery of Pc 4 nanoformulation for targeted photodynamic therapy of cancer: in vitro studies. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2012;8(5):655-64.
108. Rosenblum D, Joshi N, Tao W, Karp JM, Peer D. Progress and challenges towards targeted delivery of cancer therapeutics. *Nature communications*. 2018;9(1):1-12.
109. Onzi G, Guterres SS, Pohlmann AR, Frank LA. Active targeting of nanocarriers. *The ADME Encyclopedia: A Comprehensive Guide on Biopharmacy and Pharmacokinetics: Springer*; 2021. p. 1-13.

110. Tiwari H, Rai N, Singh S, Gupta P, Verma A, Singh AK, et al. Recent advances in nanomaterials-based targeted drug delivery for preclinical cancer diagnosis and therapeutics. *Bioengineering*. 2023;10(7):760.
111. Fu Z, Xiang J. Aptamer-functionalized nanoparticles in targeted delivery and cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(23):9123.
112. Arslan FB, Ozturk K, Calis S. Antibody-mediated drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2021;596:120268.
113. Heuer-Jungemann A, Feliu N, Bakaimi I, Hamaly M, Alkilany A, Chakraborty I, et al. The role of ligands in the chemical synthesis and applications of inorganic nanoparticles. *Chemical reviews*. 2019;119(8):4819-80.
114. Goddard ZR, Marín MJ, Russell DA, Searcey M. Active targeting of gold nanoparticles as cancer therapeutics. *Chemical Society Reviews*. 2020;49(23):8774-89.
115. Argenziano M, Arpicco S, Brusa P, Cavalli R, Chirio D, Dosio F, et al. Developing actively targeted nanoparticles to fight cancer: Focus on Italian research. *Pharmaceutics*. 2021;13(10):1538.
116. Niculescu A-G, Grumezescu AM. Novel tumor-targeting nanoparticles for cancer treatment—A review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(9):5253.
117. Lin B, Chen H, Liang D, Lin W, Qi X, Liu H, et al. Acidic pH and high-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dual tumor microenvironment-responsive nanocatalytic graphene oxide for cancer selective therapy and recognition. *ACS applied materials & interfaces*. 2019;11(12):11157-66.
118. KAPLAN M, ÇALIŞ S. Biyopolimerler ve Akıllı Polimerlere Genel Bakış, Akıllı Polimerlerin Biyomedikal Alandaki Uygulamaları: Geleneksel Derleme. *Journal of Literature Pharmacy Sciences*. 2021;10(3).
119. Olivares-Hernández A, del Portillo EG, Tamayo-Velasco Á, Figuero-Pérez L, Zhilina-Zhilina S, Fonseca-Sánchez E, et al. Immune checkpoint inhibitors in non-small cell lung cancer: from current perspectives to future treatments—a systematic review. 2023.
120. Qin S, Tang X, Chen Y, Chen K, Fan N, Xiao W, et al. mRNA-based therapeutics: powerful and versatile tools to combat diseases. *Signal transduction and targeted therapy*. 2022;7(1):166.
121. Jaklitsch MT, Strauss GM, Healey EA, Decamp Jr MM, Liptay MJ, Sugarbaker DJ. An historical perspective of multi-modality treatment for resectable non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 1995;12:S17-S32.
122. Mukherjee AG, Wanjari UR, Namachivayam A, Murali R, Prabakaran D, Ganesan R, et al. Role of Immune Cells and Receptors in Cancer Treatment: An Immunotherapeutic Approach. *Vaccines*. 2022;10(9):1493.

123. Li F, Li C, Cai X, Xie Z, Zhou L, Cheng B, et al. The association between CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and the clinical outcome of cancer immunotherapy: A systematic review and meta-analysis. *EClinicalMedicine*. 2021;41.
124. Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*. 2011;480(7378):480-9.
125. Naran K, Nundalall T, Chetty S, Barth S. Principles of immunotherapy: implications for treatment strategies in cancer and infectious diseases. *Frontiers in microbiology*. 2018;9:3158.
126. Özlük AA, Oytun MG, Güneç D. Kanser immünoterapisi. *İstanbul Bilim Üniversitesi Florence Nightingale Transplantasyon Dergisi*. 2017;2(1):21-3.
127. Huang P, Wang X, Liang X, Yang J, Zhang C, Kong D, et al. Nano-, micro-, and macroscale drug delivery systems for cancer immunotherapy. *Acta biomaterialia*. 2019;85:1-26.
128. Schirmacher V. From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment. *International journal of oncology*. 2019;54(2):407-19.
129. Guo L, Zhang H, Chen B. Nivolumab as programmed death-1 (PD-1) inhibitor for targeted immunotherapy in tumor. *Journal of Cancer*. 2017;8(3):410.
130. Quoix E, Ramlau R, Westeel V, Papai Z, Madroszyk A, Riviere A, et al. Therapeutic vaccination with TG4010 and first-line chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: a controlled phase 2B trial. *The lancet oncology*. 2011;12(12):1125-33.
131. Zhu S, Zhang T, Zheng L, Liu H, Song W, Liu D, et al. Combination strategies to maximize the benefits of cancer immunotherapy. *Journal of hematology & oncology*. 2021;14(1):156.
132. Raskov H, Orhan A, Christensen JP, Gögenur I. Cytotoxic CD8+ T cells in cancer and cancer immunotherapy. *British journal of cancer*. 2021;124(2):359-67.
133. Bianco A, Perrotta F, Barra G, Malapelle U, Rocco D, De Palma R. Prognostic factors and biomarkers of responses to immune checkpoint inhibitors in lung cancer. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(19):4931.
134. Esfahani K, Roudaia L, Buhlaiga N, Del Rincon S, Papneja N, Miller W. A review of cancer immunotherapy: from the past, to the present, to the future. *Current Oncology*. 2020;27(s2):87-97.
135. Eser PÖ, Jänne PA. TGF $\beta$  pathway inhibition in the treatment of non-small cell lung cancer. *Pharmacology & therapeutics*. 2018;184:112-30.
136. Centanni M, Moes DJA, Trocóniz IF, Ciccolini J, van Hasselt JC. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of immune checkpoint inhibitors. *Clinical pharmacokinetics*. 2019;58:835-57.

137. Nadal E, Saleh M, Aix SP, Ochoa-de-Olza M, Patel SP, Antonia S, et al. A phase Ib/II study of galunisertib in combination with nivolumab in solid tumors and non-small cell lung cancer. *BMC cancer*. 2023;23(1):708.
138. Wang D, Bauersachs J, Berliner D. Immune Checkpoint Inhibitor Associated Myocarditis and Cardiomyopathy: A Translational Review. *Biology*. 2023;12(3):472.
139. Chuprin J, Buettner H, Seedhom MO, Greiner DL, Keck JG, Ishikawa F, et al. Humanized mouse models for immuno-oncology research. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2023;20(3):192-206.
140. Xia S, Chen Q, Niu B. CD28: a new drug target for immune disease. *Current Drug Targets*. 2020;21(6):589-98.
141. Wu X, Gu Z, Chen Y, Chen B, Chen W, Weng L, et al. Application of PD-1 blockade in cancer immunotherapy. *Computational and structural biotechnology journal*. 2019;17:661-74.
142. Sundar R, Cho B-C, Brahmer JR, Soo RA. Nivolumab in NSCLC: latest evidence and clinical potential. *Therapeutic advances in medical oncology*. 2015;7(2):85-96.
143. Zhang P, Wang Y, Miao Q, Chen Y. The therapeutic potential of PD-1/PD-L1 pathway on immune-related diseases: Based on the innate and adaptive immune components. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2023;167:115569.
144. Boone N, Van Bodegraven A. Less is more: a cost benefit analysis of a changed posology for nivolumab. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 2020;76(5):739-40.
145. Kiriu T, Yamamoto M, Nagano T, Hazama D, Sekiya R, Katsurada M, et al. The time-series behavior of neutrophil-to-lymphocyte ratio is useful as a predictive marker in non-small cell lung cancer. *PloS one*. 2018;13(2):e0193018.
146. Fessas P, Lee H, Ikemizu S, Janowitz T, editors. A molecular and preclinical comparison of the PD-1-targeted T-cell checkpoint inhibitors nivolumab and pembrolizumab. *Seminars in oncology*; 2017: Elsevier.
147. Niu M, Yi M, Li N, Luo S, Wu K. Predictive biomarkers of anti-PD-1/PD-L1 therapy in NSCLC. *Experimental Hematology & Oncology*. 2021;10(1):1-13.
148. Shiravand Y, Khodadadi F, Kashani SMA, Hosseini-Fard SR, Hosseini S, Sadeghirad H, et al. Immune checkpoint inhibitors in cancer therapy. *Current Oncology*. 2022;29(5):3044-60.
149. Eigentler TK, Hassel JC, Berking C, Aberle J, Bachmann O, Grünwald V, et al. Diagnosis, monitoring and management of immune-related adverse drug reactions of anti-PD-1 antibody therapy. *Cancer treatment reviews*. 2016;45:7-18.
150. Le Guyader G, Vieillard V, Mouraud S, Do B, Marabelle A, Paul M. Stability of nivolumab in its original vials after opening and handing in normal saline bag for intravenous infusion. *European Journal of Cancer*. 2020;135:192-202.

151. Feczko T, Tóth J, Dósa G, Gyenis J. Optimization of protein encapsulation in PLGA nanoparticles. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. 2011;50(8):757-65.
152. Kirley TL, Norman AB. Multi-domain unfolding of the Fab fragment of a humanized anti-cocaine mAb characterized by non-reducing SDS-PAGE. *Biochemical and biophysical research communications*. 2020;533(3):580-5.
153. Merrill JE, Martínez-Maza O. Cytokines in AIDS-associated nervous and immune system dysfunction. *Methods in Neurosciences*. 17: Elsevier; 1993. p. 243-66.
154. Holmgaard RB, Schaer DA, Li Y, Castaneda SP, Murphy MY, Xu X, et al. Targeting the TGF $\beta$  pathway with galunisertib, a TGF $\beta$ RI small molecule inhibitor, promotes anti-tumor immunity leading to durable, complete responses, as monotherapy and in combination with checkpoint blockade. *Journal for immunotherapy of cancer*. 2018;6(1):1-15.
155. Herbertz S, Sawyer JS, Stauber AJ, Gueorguieva I, Driscoll KE, Estrem ST, et al. Clinical development of galunisertib (LY2157299 monohydrate), a small molecule inhibitor of transforming growth factor-beta signaling pathway. *Drug design, development and therapy*. 2015:4479-99.
156. Prud'Homme GJ. Pathobiology of transforming growth factor  $\beta$  in cancer, fibrosis and immunologic disease, and therapeutic considerations. *Laboratory investigation*. 2007;87(11):1077-91.
157. Batlle E, Massagué J. Transforming growth factor- $\beta$  signaling in immunity and cancer. *Immunity*. 2019;50(4):924-40.
158. MedChemExpress. TGF-beta/Smad [Erişim tarihi: 09.09.2023, Available from: [https://www.medchemexpress.com/Targets/TGF-beta\\_Smad.html](https://www.medchemexpress.com/Targets/TGF-beta_Smad.html)].
159. Rausch MP, Hahn T, Ramanathapuram L, Bradley-Dunlop D, Mahadevan D, Mercado-Pimentel ME, et al. An orally active small molecule TGF- $\beta$  receptor I antagonist inhibits the growth of metastatic murine breast cancer. *Anticancer research*. 2009;29(6):2099-109.
160. Hao Y, Baker D, Ten Dijke P. TGF- $\beta$ -mediated epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(11):2767.
161. Neuzillet C, Tijeras-Raballand A, Cohen R, Cros J, Faivre S, Raymond E, et al. Targeting the TGF $\beta$  pathway for cancer therapy. *Pharmacology & therapeutics*. 2015;147:22-31.
162. Sulochana SP, Trivedi RK, Srinivas NR, Mullangi R. A concise review of bioanalytical methods of small molecule immuno-oncology drugs in cancer therapy. *Biomedical Chromatography*. 2020:e4996.
163. Holmgaard RB, Schaer DA, Li Y, Castaneda SP, Murphy MY, Xu X, et al. Targeting the TGF $\beta$  pathway with galunisertib, a TGF $\beta$ RI small molecule inhibitor,

promotes anti-tumor immunity leading to durable, complete responses, as monotherapy and in combination with checkpoint blockade. *Journal for immunotherapy of cancer*. 2018;6(1):47.

164. O'Dwyer PJ, Litou C, Box KJ, Dressman JB, Kostewicz ES, Kuentz M, et al. In vitro methods to assess drug precipitation in the fasted small intestine—a PEARRL review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2019;71(4):536-56.

165. Chemicals LmpTR. L486320 2020 [Erişim tarihi: 20.10.2023, Available from: <https://www.trc-canada.com/product-detail/?L486320>].

166. Ding X, Gueorguieva I, Wesley JA, Burns LJ, Coutant CA. Assessment of in vivo clinical product performance of a weak basic drug by integration of in vitro dissolution tests and physiologically based absorption modeling. *The AAPS journal*. 2015;17:1395-406.

167. Cassidy KC, Gueorguieva I, Miles C, Rehmel J, Yi P, Ehlhardt WJ. Disposition and metabolism of [<sup>14</sup>C]-galunisertib, a TGF- $\beta$  RI kinase/ALK5 inhibitor, following oral administration in healthy subjects and mechanistic prediction of the effect of itraconazole on galunisertib pharmacokinetics. *Xenobiotica*. 2018;48(4):382-99.

168. ClinicalTrials.gov. Galunisertib 2023 [Erişim tarihi: 10.09.2023, Available from: <https://clinicaltrials.gov/search?intr=galunisertib>].

169. Kim B-G, Malek E, Choi SH, Ignatz-Hoover JJ, Driscoll JJ. Novel therapies emerging in oncology to target the TGF- $\beta$  pathway. *Journal of Hematology & Oncology*. 2021;14:1-20.

170. Yingling JM, McMillen WT, Yan L, Huang H, Sawyer JS, Graff J, et al. Preclinical assessment of galunisertib (LY2157299 monohydrate), a first-in-class transforming growth factor- $\beta$  receptor type I inhibitor. *Oncotarget*. 2018;9(6):6659.

171. Huang C-Y, Chung C-L, Hu T-H, Chen J-J, Liu P-F, Chen C-L. Recent progress in TGF- $\beta$  inhibitors for cancer therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2021;134:111046.

172. Park BV, Freeman ZT, Ghasemzadeh A, Chattergoon MA, Rutebemberwa A, Steigner J, et al. TGF $\beta$ 1-mediated SMAD3 enhances PD-1 expression on antigen-specific T cells in cancer. *Cancer discovery*. 2016;6(12):1366-81.

173. Troiani T, Napolitano S, Della Corte CM, Martini G, Martinelli E, Morgillo F, et al. Therapeutic value of EGFR inhibition in CRC and NSCLC: 15 years of clinical evidence. *ESMO open*. 2016;1(5):e000088.

174. Reade CA, Ganti AK. EGFR targeted therapy in non-small cell lung cancer: potential role of cetuximab. *Biologics: Targets and Therapy*. 2009:215-24.

175. Sigismund S, Avanzato D, Lanzetti L. Emerging functions of the EGFR in cancer. *Molecular oncology*. 2018;12(1):3-20.

176. Martinelli E, De Palma R, Orditura M, De Vita F, Ciardiello F. Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in cancer therapy. *Clinical & Experimental Immunology*. 2009;158(1):1-9.

177. Ray K, Ujvari B, Ramana V, Donald J. Cross-talk between EGFR and IL-6 drives oncogenic signaling and offers therapeutic opportunities in cancer. *Cytokine & growth factor reviews*. 2018;41:18-27.
178. Tasdemir S, Taheri S, Akalin H, Kontas O, Onal O, Ozkul Y. Increased EGFR mRNA expression levels in non-small cell lung cancer. *The Eurasian Journal of Medicine*. 2019;51(2):177.
179. Mazarella L, Guida A, Curigliano G. Cetuximab for treating non-small cell lung cancer. *Expert opinion on biological therapy*. 2018;18(4):483-93.
180. FDA. FDA D.I.S.C.O. Burst Edition: FDA approvals of Erbitux (cetuximab) for K-Ras wild type, EGFR-expressing colorectal cancer or squamous cell carcinoma of the head and neck and Trodelvy (sacituzumab govitecan) for patients with unresectable locally advanced or metastatic triple negative breast cancer: fda; 2021 [Erişim tarihi: 12.11.2023, Available from: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-disco-burst-edition-fda-approvals-erbitux-cetuximab-k-ras-wild-type-egfr-expressing-colorectal>].
181. Pirker R, Filipits M. Cetuximab in non-small-cell lung cancer. *Translational Lung Cancer Research*. 2012;1(1):54.
182. Tapia-Guerrero Y, Del Prado-Audelo M, Borbolla-Jiménez F, Giraldo Gomez D, García-Aguirre I, Colín-Castro C, et al. Effect of UV and gamma irradiation sterilization processes in the properties of different polymeric nanoparticles for biomedical applications. *Materials*. 2020;13(5):1090.
183. APExBIO. LY2157299 High Performance Liquid Chromatography: APExBIO; 2020 [Erişim tarihi: 09.10.2023, Available from: <https://www.apexbt.com/ly2157299.html>].
184. Tibben M, Huijberts S, Li W, Schinkel A, Gebretensae A, Rosing H, et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometric assay for the quantification of galunisertib in human plasma and the application in a pre-clinical study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2019;173:169-75.
185. Ding X, Gueorguieva I, Wesley JA, Burns LJ, Coutant CA. Assessment of in vivo clinical product performance of a weak basic drug by integration of in vitro dissolution tests and physiologically based absorption modeling. *The AAPS journal*. 2015;17(6):1395-406.
186. Shabir GA. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of chromatography A*. 2003;987(1-2):57-66.
187. Sjögren J, Olsson F, Beck A. Rapid and improved characterization of therapeutic antibodies and antibody related products using IdeS digestion and subunit analysis. *Analyst*. 2016;141(11):3114-25.

188. Rosenstein S, Vaisman-Mentesh A, Levy L, Kigel A, Dror Y, Wine Y. Production of F (ab')<sub>2</sub> from Monoclonal and Polyclonal Antibodies. *Current Protocols in Molecular Biology*. 2020;131(1):e119.
189. Zhang Y, Wang Y, Li Y. Major cause of antibody artifact bands on non-reducing SDS-PAGE and methods for minimizing artifacts. *Protein Expression and Purification*. 2019;164:105459.
190. Otieno B, Krause C, Rusling J. Bioconjugation of antibodies and enzyme labels onto magnetic beads. *Methods in enzymology*. 571: Elsevier; 2016. p. 135-50.
191. Bainor A, Chang L, McQuade TJ, Webb B, Gestwicki JE. Bicinchoninic acid (BCA) assay in low volume. *Analytical biochemistry*. 2011;410(2):310-2.
192. Javadian FS, Basafa M, Behravan A, Hashemi A. Solubility assessment of single-chain antibody fragment against epithelial cell adhesion molecule extracellular domain in four *Escherichia coli* strains. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2021;19:1-8.
193. Masdor NA. Detection Limit of the Four-Parameter Logistic Model for the Quantitative Detection of Serum Squamous Cell Carcinoma Antigenin Cervical Cancer Based on Surface Plasmon Resonance Biosensor. *Journal of Environmental Microbiology and Toxicology*. 2021;9(2):30-2.
194. Klumpp-Thomas C, Kalish H, Drew M, Hunsberger S, Snead K, Fay MP, et al. Standardization of ELISA protocols for serosurveys of the SARS-CoV-2 pandemic using clinical and at-home blood sampling. *Nature communications*. 2021;12(1):113.
195. Cao J, Choi J-S, Oshi MA, Lee J, Hasan N, Kim J, et al. Development of PLGA micro-and nanorods with high capacity of surface ligand conjugation for enhanced targeted delivery. *Asian journal of pharmaceutical sciences*. 2019;14(1):86-94.
196. Hackley VA, Clogston JD. Measuring the hydrodynamic size of nanoparticles in aqueous media using batch-mode dynamic light scattering. *Characterization of nanoparticles intended for drug delivery*: Springer; 2011. p. 35-52.
197. Amini A, Kamali M, Amini B, Najafi A. Enhanced antibacterial activity of imipenem immobilized on surface of spherical and rod gold nanoparticles. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2018;52(6):065401.
198. Öztürk K, Ertürk AS, Sarısözen C, Tulu M, Çalış S. Cytotoxicity and in vitro characterization studies of synthesized Jeffamine-cored PAMAM dendrimers. *Journal of microencapsulation*. 2014;31(2):127-36.
199. D'Souza S. A review of in vitro drug release test methods for nano-sized dosage forms. *Advances in Pharmaceutics*. 2014;2014.
200. Weng J, Tong HH, Chow SF. In vitro release study of the polymeric drug nanoparticles: development and validation of a novel method. *Pharmaceutics*. 2020;12(8):732.
201. Kim Y, Park EJ, Kim TW, Na DH. Recent Progress in Drug Release Testing Methods of Biopolymeric Particulate System. *Pharmaceutics*. 2021;13(8):1313.

202. Feng L, Dong Z, Tao D, Zhang Y, Liu Z. The acidic tumor microenvironment: a target for smart cancer nano-theranostics. *National Science Review*. 2018;5(2):269-86.
203. Imtiyaz Z, He J, Leng Q, Agrawal AK, Mixson AJ. pH-Sensitive Targeting of Tumors with Chemotherapy-Laden Nanoparticles: Progress and Challenges. *Pharmaceutics*. 2022;14(11):2427.
204. Bahuguna A, Khan I, Bajpai VK, Kang SC. MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. *Bangladesh Journal of Pharmacology*. 2017;12(2):Online: Apr 8-2017.
205. Van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Cancer cell culture: methods and protocols*. 2011:237-45.
206. Gürbüz MU, Öztürk K, Ertürk AS, Yoyen-Ermis D, Esendagli G, Çalış S, et al. Cytotoxicity and biodistribution studies on PEGylated EDA and PEG cored PAMAM dendrimers. *Journal of Biomaterials science, Polymer edition*. 2016;27(16):1645-58.
207. McKinnon KM. Flow cytometry: an overview. *Current protocols in immunology*. 2018;120(1):5.1. -5.1. 11.
208. Youli Z, Shahjahan M, Chang C. Basic principles of flow cytometry. basic concepts of molecular pathology. *Molecular Pathology Library*. 2009;2:139-46.
209. Mordant P, Loriot Y, Lahon B, Castier Y, Lesèche G, Soria J-C, et al. Bioluminescent Orthotopic Mouse Models of Human Localized Non-Small Cell Lung Cancer: Feasibility and Identification of Circulating Tumour Cells. *PLoS ONE*. 2011;6(10):e26073.
210. Dikmen ZG, Gellert G, DOĞAN P, Mason R, Antich P, Richer E, et al. A new diagnostic system in cancer research: Bioluminescent imaging (BLI). *Turkish Journal of Medical Sciences*. 2005;35(2):65-70.
211. Li B, Torossian A, Li W, Schleicher S, Niu K, Giacalone NJ, et al. A novel bioluminescence orthotopic mouse model for advanced lung cancer. *Radiation research*. 2011;176(4):486-93.
212. Tang X, Li A, Xie C, Zhang Y, Liu X, Xie Y, et al. The PI3K/mTOR dual inhibitor BEZ235 nanoparticles improve radiosensitization of hepatoma cells through apoptosis and regulation DNA repair pathway. *Nanoscale research letters*. 2020;15(1):1-16.
213. Koopaei MN, Dinarvand R, Amini M, Rabbani H, Emami S, Ostad SN, et al. Docetaxel immunonanocarriers as targeted delivery systems for HER 2-positive tumor cells: preparation, characterization, and cytotoxicity studies. *International journal of nanomedicine*. 2011;6:1903.
214. Juan A, Cimas FJ, Bravo I, Pandiella A, Ocaña A, Alonso-Moreno C. An overview of antibody conjugated polymeric nanoparticles for breast cancer therapy. *Pharmaceutics*. 2020;12(9):802.

215. Wang X, Jing Z, Yan T, Huang X, Zhang Y, Wang Z, et al. PD-L1 Antibody Conjugated Dihydrotanshinone I-loaded Polymeric Nanoparticle for Targeted Cancer Immunotherapy Combining PD-L1 Blockade with Immunogenic Cell Death. 2023.
216. Karra N, Benita S. The ligand nanoparticle conjugation approach for targeted cancer therapy. *Current drug metabolism*. 2012;13(1):22-41.
217. Wang Y, Zhang X-M, Sun Y, Chen H-L, Zhou L-Y. Cetuximab-decorated and NIR-activated nanoparticles based on Platinum (IV)-prodrug: Preparation, characterization and in-vitro anticancer activity in epidermoid carcinoma cells. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*. 2021;20(1):371.
218. Ma X, Bussonniere A, Liu Q. A facile sonochemical synthesis of shell-stabilized reactive microbubbles using surface-thiolated bovine serum albumin with the Traut's reagent. *Ultrasonics sonochemistry*. 2017;36:454-65.
219. Vasconcelos A, Vega E, Pérez Y, Gómara MJ, García ML, Haro I. Conjugation of cell-penetrating peptides with poly (lactic-co-glycolic acid)-polyethylene glycol nanoparticles improves ocular drug delivery. *International journal of nanomedicine*. 2015;10:609.
220. Kufleitner J, Wagner S, Worek F, von Briesen H, Kreuter J. Adsorption of obidoxime onto human serum albumin nanoparticles: drug loading, particle size and drug release. *Journal of microencapsulation*. 2010;27(6):506-13.
221. Goyon A, Excoffier M, Janin-Bussat M-C, Bobaly B, Fekete S, Guillarme D, et al. Determination of isoelectric points and relative charge variants of 23 therapeutic monoclonal antibodies. *Journal of Chromatography B*. 2017;1065:119-28.
222. Kursunel MA, Taskiran EZ, Tavukcuoglu E, Yanik H, Demirag F, Karaosmanoglu B, et al. Small cell lung cancer stem cells display mesenchymal properties and exploit immune checkpoint pathways in activated cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2022;71(2):445-59.
223. Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature protocols*. 2006;1(3):1458-61.
224. Ding G, Shen T, Yan C, Zhang M, Wu Z, Cao L. IFN- $\gamma$  down-regulates the PD-1 expression and assist nivolumab in PD-1-blockade effect on CD8+ T-lymphocytes in pancreatic cancer. *BMC cancer*. 2019;19(1):1-11.
225. Lee J, Ahn E, Kissick HT, Ahmed R. Reinvigorating exhausted T cells by blockade of the PD-1 pathway. *Onco Therapeutics*. 2015;6(1-2).
226. Musthaffa Y, Nel HJ, Ramnoruth N, Patel S, Hamilton-Williams EE, Harris M, et al. Optimization of a method to detect autoantigen-specific T-cell responses in type 1 diabetes. *Frontiers in Immunology*. 2020;11:587469.
227. FlowMetric. Optimization of Cell Proliferation Analysis Using Flow Cytometry: FlowMetric; 2023 [Erişim tarihi: 18.11.2023, Available from: <https://www.flowmetric.com/cytometry-blog/optimization-cell-proliferation-flow-cytometry>].

228. Biolegend. Instrument Setup and Data Analysis 2023 [Erişim tarihi: 18.11.2023, Available from: <https://www.biolegend.com/fr-ch/immunoassays/legendplex/support>].
229. Ito R, Takahashi T, Ito M. Humanized mouse models: Application to human diseases. *Journal of cellular physiology*. 2018;233(5):3723-8.
230. Ye W, Chen Q. Potential applications and perspectives of humanized mouse models. *Annual Review of Animal Biosciences*. 2022;10:395-417.
231. Morillon YM, Sabzevari A, Schlom J, Greiner JW. The development of next-generation PBMC humanized mice for preclinical investigation of cancer immunotherapeutic agents. *Anticancer research*. 2020;40(10):5329-41.
232. Zou Y, Wei J, Xia Y, Meng F, Yuan J, Zhong Z. Targeted chemotherapy for subcutaneous and orthotopic non-small cell lung tumors with cyclic RGD-functionalized and disulfide-crosslinked polymersomal doxorubicin. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2018;3(1):32.
233. Xu X, Prestwich GD. Inhibition of tumor growth and angiogenesis by a lysophosphatidic acid antagonist in an engineered three-dimensional lung cancer xenograft model. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*. 2010;116(7):1739-50.
234. Kong M, Fan J, Dong A, Cheng H, Xu R. Effects of polyphyllin I on growth inhibition of human non-small lung cancer cells and in xenograft. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2010;42(11):827-33.
235. Verma B, Wesa A. Establishment of humanized mice from peripheral blood mononuclear cells or cord blood CD34+ hematopoietic stem cells for immunology studies evaluating new therapeutic agents. *Current protocols in pharmacology*. 2020;89(1):e77.
236. Lv M, Chen M, Zhang R, Zhang W, Wang C, Zhang Y, et al. Manganese is critical for antitumor immune responses via cGAS-STING and improves the efficacy of clinical immunotherapy. *Cell Research*. 2020;30(11):966-79.
237. Tan JH, Hwang YY, Chin HX, Liu M, Tan SY, Chen Q. Towards a better preclinical cancer model—human immune aging in humanized mice. *Immunity & Ageing*. 2023;20(1):49.
238. Yoshida T, Okuyama H, Endo H, Inoue M. Spheroid cultures of primary urothelial cancer cells: Cancer tissue-originated spheroid (CTOS) method. *Urothelial Carcinoma: Methods and Protocols*. 2018:145-53.
239. Mandala W, Harawa V, Munyenembe A, Soko M, Longwe H. Optimization of stimulation and staining conditions for intracellular cytokine staining (ICS) for determination of cytokine-producing T cells and monocytes. *Current Research in Immunology*. 2021;2:184-93.

240. Marson BM, Concentino V, Junkert AM, Fachi MM, Vilhena RO, Pontarolo R. Validation of analytical methods in a pharmaceutical quality system: An overview focused on HPLC methods. *Química Nova*. 2020;43:1190-203.
241. Analysis AOMo. Appendix F: guidelines for standard method performance requirements2016.
242. Jana NR. *Colloidal Nanoparticles: Functionalization for Biomedical Applications*: CRC Press; 2019.
243. Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, Hasanzadeh Davarani F, Javanmard R, Dokhani A, et al. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*. 2018;10(2):57.
244. Hamidi M, Azimi K, Mohammadi-Samani S. Co-encapsulation of a drug with a protein in erythrocytes for improved drug loading and release: phenytoin and bovine serum albumin (BSA). *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 2011;14(1):46-59.
245. Book C. LY 2157299 2023 [Erişim tarihi: 06.10.2023, Available from: <https://www.chemicalbook.com/price-india/LY-2157299.htm>].
246. Elbatany RS, Parvathaneni V, Kulkarni NS, Shukla SK, Chauhan G, Kunda NK, et al. Afatinib-loaded inhalable PLGA nanoparticles for localized therapy of non-small cell lung cancer (NSCLC)—development and in-vitro efficacy. *Drug delivery and translational research*. 2021;11:927-43.
247. Kurai J, Chikumi H, Hashimoto K, Yamaguchi K, Yamasaki A, Sako T, et al. Antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by cetuximab against lung cancer cell lines. *Clinical Cancer Research*. 2007;13(5):1552-61.
248. Qian Y, Qiu M, Wu Q, Tian Y, Zhang Y, Gu N, et al. Enhanced cytotoxic activity of cetuximab in EGFR-positive lung cancer by conjugating with gold nanoparticles. *Scientific reports*. 2014;4(1):7490.
249. Bourguignon P, Clément F, Renaud F, Le Bras V, Koutsoukos M, Burny W, et al. Processing of blood samples influences PBMC viability and outcome of cell-mediated immune responses in antiretroviral therapy-naïve HIV-1-infected patients. *Journal of Immunological Methods*. 2014;414:1-10.
250. Yi P-C, Zhuo L, Lin J, Chang C, Goddard A, Yoon OK. Impact of delayed PBMC processing on functional and genomic assays. *Journal of Immunological Methods*. 2023:113514.
251. ARAS ŞY, SARI EK. İmmun Sistem Hücrelerinde CD Molekülleri. *Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*. 2017;10(2):206-14.
252. Öztürk K, Esendağlı G, Gürbüz MU, Tülü M, Çalış S. Effective targeting of gemcitabine to pancreatic cancer through PEG-cored Flt-1 antibody-conjugated dendrimers. *International journal of pharmaceutics*. 2017;517(1-2):157-67.
253. Li X, Huang A, Liao X, Chen J, Xiao Y. Restricted access supramolecular solvent based magnetic solvent bar liquid-phase microextraction for determination of non-

steroidal anti-inflammatory drugs in human serum coupled with high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2020;1634:461700.

254. Sammartano A, Migliari S, Serreli G, Scarlattei M, Baldari G, Ruffini L. Validation of the HPLC analytical method for the determination of chemical and radiochemical purity of Ga-68-DOTATATE. *Indian Journal of Nuclear Medicine: IJNM: The Official Journal of the Society of Nuclear Medicine, India*. 2023;38(1):1.

255. Valedkarimi Z, Nasiri H, Aghebati-Maleki L, Abdolizadeh J, Esparvarinha M, Majidi J. Production and characterization of anti-human IgG F (ab')<sub>2</sub> antibody fragment. *Human Antibodies*. 2018;26(4):171-6.

256. de Araujo AEV, de Souza NP, de Sousa APB, Lara FA, Senna JPM. Production and characterization of F (Ab')<sub>2</sub> fragments obtained by enzymatic digestion from murine anti-MRSA PBP2a monoclonal antibodies. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2018;185:72-80.

257. Sandhu R, Singh N, Dhankhar J, Kama G, Sharma R. Dynamic light scattering (DLS) technique, principle, theoretical considerations and applications. *Nanotechnol Biochem Tech Assess Qual Saf Milk Milk Prod*. 2018:135-7.

258. Stetefeld J, McKenna SA, Patel TR. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical reviews*. 2016;8:409-27.

259. Banerjee A, Qi J, Gogoi R, Wong J, Mitragotri S. Role of nanoparticle size, shape and surface chemistry in oral drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2016;238:176-85.

260. Leng D, Thanki K, Fattal E, Foged C, Yang M. Engineering of budesonide-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles using a quality-by-design approach. *International journal of pharmaceutics*. 2018;548(2):740-6.

261. Baby T, Liu Y, Middelberg AP, Zhao C-X. Fundamental studies on throughput capacities of hydrodynamic flow-focusing microfluidics for producing monodisperse polymer nanoparticles. *Chemical Engineering Science*. 2017;169:128-39.

262. Patil A, Dyawanapelly S, Dandekar P, Jain R. Fabrication and Characterization of Non-spherical Polymeric Particles. *Journal of Pharmaceutical Innovation*. 2020:1-12.

263. Shnoudeh AJ, Hamad I, Abdo RW, Qadumii L, Jaber AY, Surchi HS, et al. Synthesis, characterization, and applications of metal nanoparticles. *Biomaterials and bionanotechnology: Elsevier*; 2019. p. 527-612.

264. Gumustas M, Sengel-Turk CT, Gumustas A, Ozkan SA, Uslu B. Effect of polymer-based nanoparticles on the assay of antimicrobial drug delivery systems. *Multifunctional systems for combined delivery, biosensing and diagnostics: Elsevier*; 2017. p. 67-108.

265. Lowry GV, Hill RJ, Harper S, Rawle AF, Hendren CO, Klaessig F, et al. Guidance to improve the scientific value of zeta-potential measurements in nanoEHS. *Environmental Science: Nano*. 2016;3(5):953-65.
266. Gupta H, Aqil M, Khar RK, Ali A, Bhatnagar A, Mittal G. Sparfloxacin-loaded PLGA nanoparticles for sustained ocular drug delivery. *Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine*. 2010;6(2):324-33.
267. H. Gupta MA, R.K. Khar, A. Ali, A. Bhatnagar, G. Mittal,. Sparfloxacin-loaded PLGA nanoparticles for sustained ocular drug delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 2010;6:324-33.
268. Mura S HH, Nicolas J, Le Droumaguet B, Gueutin C, Zanna S, Tsapis N, Fattal E. . Influence of surface charge on the potential toxicity of PLGA nanoparticles towards calu-3 cells. *Int J Nanomed*. 2011;6:2591-605.
269. Mura S, Hillaireau H, Nicolas J, Le Droumaguet B, Gueutin C, Zanna S, et al. Influence of surface charge on the potential toxicity of PLGA nanoparticles towards Calu-3 cells. *International journal of nanomedicine*. 2011:2591-605.
270. Pamujula S, Hazari S, Bolden G, Graves RA, Chinta DD, Dash S, et al. Cellular delivery of PEGylated PLGA nanoparticles. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2012;64(1):61-7.
271. Park S, Sinha N, Hamad-Schifferli K. Effective size and zeta potential of nanorods by Ferguson analysis. *Langmuir*. 2010;26(16):13071-5.
272. O'brien R, Cannon D, Rowlands W. Electroacoustic determination of particle size and zeta potential. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1995;173(2):406-18.
273. Tramontano C, Martins JP, De Stefano L, Kemell M, Correia A, Terracciano M, et al. Microfluidic-Assisted Production of Gastro-Resistant Active-Targeted Diatomite Nanoparticles for the Local Release of Galunisertib in Metastatic Colorectal Cancer Cells. *Advanced healthcare materials*. 2023;12(6):2202672.
274. Zhu S, Sun F, Zhao P, Liang G, Sun X, Zeng L, et al. Brain-targeting biomimetic nanoparticles for codelivery of celastrol and LY2157299 for reversing glioma immunosuppression. *International Journal of Pharmaceutics*. 2022;619:121709.
275. Huang S, Ding D, Lan T, He G, Ren J, Liang R, et al. Multifunctional nanodrug performs sonodynamic therapy and inhibits TGF- $\beta$  to boost immune response against colorectal cancer and liver metastasis. *Acta Biomaterialia*. 2023;164:538-52.
276. Zhou M, Wang J, Pan J, Wang H, Huang L, Hou B, et al. Nanovesicles loaded with a TGF- $\beta$  receptor 1 inhibitor overcome immune resistance to potentiate cancer immunotherapy. *Nature Communications*. 2023;14(1):3593.
277. Janeway C, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. *Immunobiology: the immune system in health and disease*: Garland Pub. New York; 2001.

278. Gdowski A, Ranjan A, Mukerjee A, Vishwanatha J. Development of biodegradable nanocarriers loaded with a monoclonal antibody. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(2):3990-5.
279. Colzani B, Pandolfi L, Hoti A, Iovene PA, Natalello A, Avvakumova S, et al. Investigation of antitumor activities of trastuzumab delivered by PLGA nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*. 2018:957-73.
280. Sousa F, Cruz A, Fonte P, Pinto IM, Neves-Petersen MT, Sarmiento B. A new paradigm for antiangiogenic therapy through controlled release of bevacizumab from PLGA nanoparticles. *Scientific Reports*. 2017;7(1):3736.
281. Richards DA, Maruani A, Chudasama V. Antibody fragments as nanoparticle targeting ligands: a step in the right direction. *Chemical science*. 2017;8(1):63-77.
282. Singh K, Canakci M, Kanjilal P, Williams N, Shanthalingam S, Osborne BA, et al. Evaluation of Cellular Targeting by Fab' vs Full-Length Antibodies in Antibody-Nanoparticle Conjugates (ANCs) Using CD4 T-cells. *Bioconjugate chemistry*. 2022;33(3):486-95.
283. Alibakhshi A, Kahaki FA, Ahangarzadeh S, Yaghoobi H, Yarian F, Arezumand R, et al. Targeted cancer therapy through antibody fragments-decorated nanomedicines. *Journal of Controlled Release*. 2017;268:323-34.
284. Amano A, Sanjo N, Araki W, Anraku Y, Nakakido M, Matsubara E, et al. Peripheral administration of nanomicelle-encapsulated anti-A $\beta$  oligomer fragment antibody reduces various toxic A $\beta$  species in the brain. *Journal of Nanobiotechnology*. 2023;21(1):36.
285. Iqbal M, Zafar N, Fessi H, Elaissari A. Double emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation. *International journal of pharmaceutics*. 2015;496(2):173-90.
286. Caputo TM, Barisciano G, Mulè C, Cusano AM, Aliberti A, Muccillo L, et al. Development of High-Loading Trastuzumab PLGA Nanoparticles: A Powerful Tool Against HER2 Positive Breast Cancer Cells. *International Journal of Nanomedicine*. 2023:6999-7020.
287. McComiskey KP, Tajber L. Comparison of particle size methodology and assessment of nanoparticle tracking analysis (NTA) as a tool for live monitoring of crystallisation pathways. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2018;130:314-26.
288. Souza TG, Ciminelli VS, Mohallem NDS, editors. A comparison of TEM and DLS methods to characterize size distribution of ceramic nanoparticles. *Journal of Physics: Conference Series*; 2016: IOP Publishing.
289. Saganowska P, Wesolowski M. DSC as a screening tool for rapid co-crystal detection in binary mixtures of benzodiazepines with co-formers. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2018;133:785-95.

290. Wang XSXSJ, inventor; Hangzhou Solipharma Co. , Ltd., assignee. Cocrystal of 2- ( 6 - Methyl - Pyridine - 2 - Yl ) -3 - Yl [ 6 - Amide - Quinoline - 4 - Yl ] -5,6 - Dihydro 4h - Pyrrole [ 1,2 - B ] Pyrazole , Preparation Method Therefor , and Pharmaceutical Composition, US patent no: 10,995,083 B2. Washington, DC: U.S; Patent and Trademark Office;2021.
291. Sinha-Datta Srijit Khan U, Wadgaonkar D. Label-free interaction analysis as a tool to demonstrate biosimilarity of therapeutic monoclonal antibodies. *Biosimilars*. 2015;83-91.
292. Harn N, Allan C, Oliver C, Middaugh C. Highly concentrated monoclonal antibody solutions: direct analysis of physical structure and thermal stability. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2007;96(3):532-46.
293. Mabry R, Lewis KE, Moore M, McKernan PA, Bukowski TR, Bontadelli K, et al. Engineering of stable bispecific antibodies targeting IL-17A and IL-23. *Protein Engineering, Design & Selection*. 2010;23(3):115-27.
294. Sun S-B, Liu P, Shao F-M, Miao Q-L. Formulation and evaluation of PLGA nanoparticles loaded capecitabine for prostate cancer. *International journal of clinical and experimental medicine*. 2015;8(10):19670.
295. Jose S, Cinu TA, Sebastian R, Shoja M, Aleykutty N, Durazzo A, et al. Transferrin-conjugated docetaxel–PLGA nanoparticles for tumor targeting: influence on MCF-7 cell cycle. *Polymers*. 2019;11(11):1905.
296. Zhao Y, Wang Y, Ran F, Cui Y, Liu C, Zhao Q, et al. A comparison between sphere and rod nanoparticles regarding their in vivo biological behavior and pharmacokinetics. *Scientific reports*. 2017;7(1):1-11.
297. Yang X, Wu S, Li Y, Huang Y, Lin J, Chang D, et al. Integration of an anti-tumor drug into nanocrystalline assemblies for sustained drug release. *Chemical Science*. 2015;6(3):1650-4.
298. Gharebaghi F, Dalali N, Ahmadi E, Danafar H. Preparation of wormlike polymeric nanoparticles coated with silica for delivery of methotrexate and evaluation of anticancer activity against MCF7 cells. *Journal of biomaterials applications*. 2017;31(9):1305-16.
299. Roberts R, Smyth JW, Will J, Roberts P, Grek CL, Ghatnekar GS, et al. Development of PLGA nanoparticles for sustained release of a connexin43 mimetic peptide to target glioblastoma cells. *Materials Science and Engineering: C*. 2020;108:110191.
300. Chen M, Ouyang H, Zhou S, Li J, Ye Y. PLGA-nanoparticle mediated delivery of anti-OX40 monoclonal antibody enhances anti-tumor cytotoxic T cell responses. *Cellular immunology*. 2014;287(2):91-9.
301. Shrestha N, Xu Y, Prévost JR, McCartney F, Brayden D, Frédérick R, et al. Impact of PEGylation on an antibody-loaded nanoparticle-based drug delivery system for the treatment of inflammatory bowel disease. *Acta biomaterialia*. 2022;140:561-72.

302. Swetha KL, Maravajjala KS, Sharma S, Chowdhury R, Roy A. Development of a tumor extracellular pH-responsive nanocarrier by terminal histidine conjugation in a star shaped poly (lactic-co-glycolic acid). *European Polymer Journal*. 2021;147:110337.
303. Palanikumar L, Al-Hosani S, Kalmouni M, Nguyen VP, Ali L, Pasricha R, et al. pH-responsive high stability polymeric nanoparticles for targeted delivery of anticancer therapeutics. *Communications biology*. 2020;3(1):1-17.
304. Wang S-J, Huo Z-J, Liu K, Yu N, Ma Y, Qin Y-H, et al. Ligand-conjugated pH-sensitive polymeric micelles for the targeted delivery of gefitinib in lung cancers. *RSC Advances*. 2015;5(89):73184-93.
305. Patel BK, Parikh RH, Patel N. Targeted delivery of mannosylated-PLGA nanoparticles of antiretroviral drug to brain. *International journal of nanomedicine*. 2018;13(sup1):97-100.
306. Zhang Y, Tekobo S, Tu Y, Zhou Q, Jin X, Dergunov SA, et al. Permission to enter cell by shape: nanodisk vs nanosphere. *ACS applied materials & interfaces*. 2012;4(8):4099-105.
307. Herd HL, Malugin A, Ghandehari H. Silica nanoconstruct cellular toleration threshold in vitro. *Journal of controlled release*. 2011;153(1):40-8.
308. Chithrani BD, Ghazani AA, Chan WC. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano letters*. 2006;6(4):662-8.
309. Fernando D, Sulthana S, Vasquez Y. Cellular uptake and cytotoxicity of varying aspect ratios of gold nanorods in HeLa cells. *ACS Applied Bio Materials*. 2020;3(3):1374-84.
310. Toy R, Peiris PM, Ghaghada KB, Karathanasis E. Shaping cancer nanomedicine: the effect of particle shape on the in vivo journey of nanoparticles. *Nanomedicine*. 2014;9(1):121-34.
311. Dasgupta S, Auth T, Gompper G. Shape and orientation matter for the cellular uptake of nonspherical particles. *Nano letters*. 2014;14(2):687-93.
312. Huang X, Teng X, Chen D, Tang F, He J. The effect of the shape of mesoporous silica nanoparticles on cellular uptake and cell function. *Biomaterials*. 2010;31(3):438-48.
313. Sukhanova A, Bozrova S, Sokolov P, Berestovoy M, Karaulov A, Nabiev I. Dependence of nanoparticle toxicity on their physical and chemical properties. *Nanoscale research letters*. 2018;13:1-21.
314. Yoo J-W, Mitragotri S. Polymer particles that switch shape in response to a stimulus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(25):11205-10.
315. Ding S, Khan AI, Cai X, Song Y, Lyu Z, Du D, et al. Overcoming blood-brain barrier transport: Advances in nanoparticle-based drug delivery strategies. *Materials today*. 2020;37:112-25.

316. Díaz-Torres R, López-Arellano R, Escobar-Chávez J, García-García E, Domínguez-Delgado C, Ramírez-Noguera P. Effect of size and functionalization of pharmaceutical nanoparticles and their interaction with biological systems. *Handbook of Nanoparticles Switzerland*: Springer. 2016:1041-60.
317. Forest V, Pourchez J. Preferential binding of positive nanoparticles on cell membranes is due to electrostatic interactions: A too simplistic explanation that does not take into account the nanoparticle protein corona. *Materials Science and Engineering: C*. 2017;70:889-96.
318. Patil S, Sandberg A, Heckert E, Self W, Seal S. Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential. *Biomaterials*. 2007;28(31):4600-7.
319. Choi J-S, Cao J, Naeem M, Noh J, Hasan N, Choi H-K, et al. Size-controlled biodegradable nanoparticles: preparation and size-dependent cellular uptake and tumor cell growth inhibition. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2014;122:545-51.
320. Karthikeyan C, Varaprasad K, Kim S, Jangid AK, Lee W, Hameed ASH, et al. Size-dependent cellular uptake of sodium alginate passivated tin dioxide nanoparticles in triple-negative breast cancer cells. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 2023;123:476-87.
321. Vyas SP, Goswami R. Size-dependent cellular uptake and TLR4 attenuation by gold nanoparticles in lung adenocarcinoma cells. *Nanomedicine*. 2019;14(3):229-53.
322. Liu X, Wu F, Tian Y, Wu M, Zhou Q, Jiang S, et al. Size dependent cellular uptake of rod-like bionanoparticles with different aspect ratios. *Scientific Reports*. 2016;6(1):24567.
323. Tang L, Gabrielson NP, Uckun FM, Fan TM, Cheng J. Size-dependent tumor penetration and in vivo efficacy of monodisperse drug-silica nanoconjugates. *Molecular pharmaceutics*. 2013;10(3):883-92.
324. Varan G, Varan C, Öztürk SC, Benito JM, Esendağlı G, Bilensoy E. Therapeutic efficacy and biodistribution of paclitaxel-bound amphiphilic cyclodextrin nanoparticles: analyses in 3D tumor culture and tumor-bearing animals in vivo. *Nanomaterials*. 2021;11(2):515.
325. Akiyama Y, Mori T, Katayama Y, Niidome T. Conversion of rod-shaped gold nanoparticles to spherical forms and their effect on biodistribution in tumor-bearing mice. *Nanoscale research letters*. 2012;7:1-6.
326. Shao D, Lu M-m, Zhao Y-w, Zhang F, Tan Y-f, Zheng X, et al. The shape effect of magnetic mesoporous silica nanoparticles on endocytosis, biocompatibility and biodistribution. *Acta biomaterialia*. 2017;49:531-40.
327. De Silva L, Fu J-Y, Htar TT, Wan Kamal WHB, Kasbollah A, Muniyandy S, et al. Biodistribution study of niosomes in tumor-implanted BALB/C mice using scintigraphic imaging. *Frontiers in Pharmacology*. 2022;12:778396.

328. Janát-Amsbury M, Ray A, Peterson C, Ghandehari H. Geometry and surface characteristics of gold nanoparticles influence their biodistribution and uptake by macrophages. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2011;77(3):417-23.
329. Cirstoiu-Hapca A, Buchegger F, Lange N, Bossy L, Gurny R, Delie F. Benefit of anti-HER2-coated paclitaxel-loaded immuno-nanoparticles in the treatment of disseminated ovarian cancer: Therapeutic efficacy and biodistribution in mice. *Journal of Controlled Release*. 2010;144(3):324-31.
330. Jasinski DL, Li H, Guo P. The effect of size and shape of RNA nanoparticles on biodistribution. *Molecular therapy*. 2018;26(3):784-92.
331. Arslan FB, Öztürk K, Tavukçuoğlu E, Öztürk SC, Esendağlı G, Çalış S. A novel combination for the treatment of small cell lung cancer: Active targeted irinotecan and static co-loaded PLGA nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 2023;632:122573.
332. Zhou Y, Que K-T, Tang H-M, Zhang P, Fu Q-M, Liu Z-J. Anti-CD206 antibody-conjugated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-based PLGA nanoparticles selectively promote tumor-associated macrophages to polarize to the pro-inflammatory subtype. *Oncology Letters*. 2020;20(6):1-.
333. Zumaya ALV, Rimpelová S, Štějdířová M, Ulbrich P, Vilčáková J, Hassouna F. Antibody conjugated PLGA nanocarriers and superparamagnetic nanoparticles for targeted delivery of oxaliplatin to cells from colorectal carcinoma. *International journal of molecular sciences*. 2022;23(3):1200.
334. Geng Y, Dalhaimer P, Cai S, Tsai R, Tewari M, Minko T, et al. Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery. *Nature nanotechnology*. 2007;2(4):249-55.
335. Borzęcka W, Pereira PM, Fernandes R, Trindade T, Torres T, Tome JP. Spherical and rod shaped mesoporous silica nanoparticles for cancer-targeted and photosensitizer delivery in photodynamic therapy. *Journal of Materials Chemistry B*. 2022;10(17):3248-59.
336. Cao S, Liu X, Li X, Lin C, Zhang W, Tan CH, et al. Shape matters: Comprehensive analysis of star-shaped lipid nanoparticles. *Frontiers in Pharmacology*. 2020;11:539.
337. Prabhakar CN. Epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer. *Translational lung cancer research*. 2015;4(2):110.
338. Amendt C, Staub E, Friese-Hamim M, Störkel S, Stroh C. Association of EGFR Expression Level and Cetuximab Activity in Patient-Derived Xenograft Models of Human Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2014;20(17):4478-87.
339. Wilhelm S, Tavares AJ, Dai Q, Ohta S, Audet J, Dvorak HF, et al. Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nature reviews materials*. 2016;1(5):1-12.

340. Alkilany AM, Zhu L, Weller H, Mews A, Parak WJ, Barz M, et al. Ligand density on nanoparticles: A parameter with critical impact on nanomedicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2019;143:22-36.
341. Reuter KG, Perry JL, Kim D, Luft JC, Liu R, DeSimone JM. Targeted PRINT hydrogels: the role of nanoparticle size and ligand density on cell association, biodistribution, and tumor accumulation. *Nano letters*. 2015;15(10):6371-8.
342. Shoffstall AJ, Everhart LM, Varley ME, Soehnlen ES, Shick AM, Ustin JS, et al. Tuning ligand density on intravenous hemostatic nanoparticles dramatically increases survival following blunt trauma. *Biomacromolecules*. 2013;14(8):2790-7.
343. Ma LL, Tam JO, Willsey BW, Rigdon D, Ramesh R, Sokolov K, et al. Selective targeting of antibody conjugated multifunctional nanoclusters (nanoroses) to epidermal growth factor receptors in cancer cells. *Langmuir*. 2011;27(12):7681-90.
344. Dai Y, Xu C, Sun X, Chen X. Nanoparticle design strategies for enhanced anticancer therapy by exploiting the tumour microenvironment. *Chemical Society Reviews*. 2017;46(12):3830-52.
345. Varan C, Bilensoy E. Cationic PEGylated polycaprolactone nanoparticles carrying post-operation docetaxel for glioma treatment. *Beilstein journal of nanotechnology*. 2017;8(1):1446-56.
346. Varela-Fernández R, García-Otero X, Díaz-Tomé V, Regueiro U, López-López M, González-Barcia M, et al. Mucoadhesive PLGA nanospheres and nanocapsules for lactoferrin controlled ocular delivery. *Pharmaceutics*. 2022;14(4):799.
347. Risnayanti C, Jang Y-S, Lee J, Ahn HJ. PLGA nanoparticles co-delivering MDR1 and BCL2 siRNA for overcoming resistance of paclitaxel and cisplatin in recurrent or advanced ovarian cancer. *Scientific reports*. 2018;8(1):7498.
348. Umerska A, Gaucher C, Oyarzun-Ampuero F, Fries-Raeth I, Colin F, Villamizar-Sarmiento MG, et al. Polymeric nanoparticles for increasing oral bioavailability of curcumin. *Antioxidants*. 2018;7(4):46.
349. Crucho CI, Barros MT. Formulation of functionalized PLGA polymeric nanoparticles for targeted drug delivery. *Polymer*. 2015;68:41-6.
350. Paswan SK, Saini T. Purification of drug loaded PLGA nanoparticles prepared by emulsification solvent evaporation using stirred cell ultrafiltration technique. *Pharmaceutical Research*. 2017;34:2779-86.
351. Hernández-Giottonini KY, Rodríguez-Córdova RJ, Gutiérrez-Valenzuela CA, Peñuñuri-Miranda O, Zavala-Rivera P, Guerrero-Germán P, et al. PLGA nanoparticle preparations by emulsification and nanoprecipitation techniques: Effects of formulation parameters. *Rsc Advances*. 2020;10(8):4218-31.
352. Honary S, Zahir F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (Part 2). *Tropical journal of pharmaceutical research*. 2013;12(2):265-73.

353. Filoti DI, Shire SJ, Yadav S, Laue TM. Comparative study of analytical techniques for determining protein charge. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2015;104(7):2123-31.
354. Yang D, Kroe-Barrett R, Singh S, Laue T. IgG charge: practical and biological implications. *Antibodies*. 2019;8(1):24.
355. Tripathi K, Driskell JD. Quantifying bound and active antibodies conjugated to gold nanoparticles: A comprehensive and robust approach to evaluate immobilization chemistry. *ACS omega*. 2018;3(7):8253-9.
356. Lee NK, Wang C-PJ, Lim J, Park W, Kwon H-K, Kim S-N, et al. Impact of the conjugation of antibodies to the surfaces of polymer nanoparticles on the immune cell targeting abilities. *Nano convergence*. 2021;8(1):1-11.
357. Mondal L, Mukherjee B, Das K, Bhattacharya S, Dutta D, Chakraborty S, et al. CD-340 functionalized doxorubicin-loaded nanoparticle induces apoptosis and reduces tumor volume along with drug-related cardiotoxicity in mice. *International Journal of Nanomedicine*. 2019:8073-94.
358. Du N, Song L-P, Li X-S, Wang L, Wan L, Ma H-Y, et al. Novel pH-sensitive nanoformulated docetaxel as a potential therapeutic strategy for the treatment of cholangiocarcinoma. *Journal of nanobiotechnology*. 2015;13:1-11.
359. Zhang J, Zhang M, Ji J, Fang X, Pan X, Wang Y, et al. Glycyrrhetic acid-mediated polymeric drug delivery targeting the acidic microenvironment of hepatocellular carcinoma. *Pharmaceutical research*. 2015;32:3376-90.
360. Dhavale RP, Dhavale R, Sahoo S, Kollu P, Jadhav S, Patil P, et al. Chitosan coated magnetic nanoparticles as carriers of anticancer drug Telmisartan: pH-responsive controlled drug release and cytotoxicity studies. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*. 2021;148:109749.
361. Kikuchi R, Iwai Y, Tsuji T, Watanabe Y, Koyama N, Yamaguchi K, et al. Hypercapnic tumor microenvironment confers chemoresistance to lung cancer cells by reprogramming mitochondrial metabolism in vitro. *Free Radical Biology and Medicine*. 2019;134:200-14.
362. Dong X, Wei C, Chen H, Qin J, Liang J, Kong D, et al. Real-time imaging tracking of a dual fluorescent drug delivery system based on zinc phthalocyanine-incorporated hydrogel. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2016;2(11):2001-10.
363. Howaili F, Özliseli E, Küçüktürkmen B, Razavi SM, Sadeghizadeh M, Rosenholm JM. Stimuli-responsive, plasmonic nanogel for dual delivery of curcumin and photothermal therapy for cancer treatment. *Frontiers in Chemistry*. 2021;8:602941.
364. Yu S, Wu G, Gu X, Wang J, Wang Y, Gao H, et al. Magnetic and pH-sensitive nanoparticles for antitumor drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2013;103:15-22.
365. Barzegar-Jalali M. Kinetic analysis of drug release from nanoparticles. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 2008;11(1):167-77.

366. Corsaro C, Neri G, Mezzasalma AM, Fazio E. Weibull Modeling of Controlled Drug Release from Ag-PMA Nanosystems. *Polymers*. 2021;13(17):2897.
367. Sgambato A, Casaluca F, Maione P, Rossi A, Ciardiello F, Gridelli C. Cetuximab in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): the showdown? *Journal of thoracic disease*. 2014;6(6):578.
368. Liang S, Lin M, Niu L, Xu K, Wang X, Liang Y, et al. Cetuximab combined with natural killer cells therapy: an alternative to chemoradiotherapy for patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *American Journal of Cancer Research*. 2018;8(5):879.
369. Liu R, Zeng L-W, Li H-F, Shi J-G, Zhong B, Shu H-B, et al. PD-1 signaling negatively regulates the common cytokine receptor  $\gamma$  chain via MARCH5-mediated ubiquitination and degradation to suppress anti-tumor immunity. *Cell Research*. 2023:1-17.
370. Yi M, Li T, Niu M, Wu Y, Zhao Z, Wu K. TGF- $\beta$ : A novel predictor and target for anti-PD-1/PD-L1 therapy. *Frontiers in Immunology*. 2022;13:1061394.
371. Harper TA, Bacot SM, Fennell CJ, Matthews RL, Zhu C, Yue P, et al. IL-10 signaling elicited by Nivolumab-induced activation of the MAP kinase pathway does not fully contribute to Nivolumab-modulated heterogeneous T cell responses. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(21):11848.
372. Andorsky DJ, Yamada RE, Said J, Pinkus GS, Betting DJ, Timmerman JM. Programmed death ligand 1 is expressed by non-Hodgkin lymphomas and inhibits the activity of tumor-associated T cells. *Clinical cancer research*. 2011;17(13):4232-44.
373. Niu M, Yi M, Wu Y, Lyu L, He Q, Yang R, et al. Synergistic efficacy of simultaneous anti-TGF- $\beta$ /VEGF bispecific antibody and PD-1 blockade in cancer therapy. *Journal of Hematology & Oncology*. 2023;16(1):94.
374. Navas A, Giraldo-Parra L, Prieto MD, Cabrera J, Gómez MA. Phenotypic and functional stability of leukocytes from human peripheral blood samples: considerations for the design of immunological studies. *BMC immunology*. 2019;20(1):1-8.
375. Gane E, Verdon DJ, Brooks AE, Gaggar A, Nguyen AH, Subramanian GM, et al. Anti-PD-1 blockade with nivolumab with and without therapeutic vaccination for virally suppressed chronic hepatitis B: a pilot study. *Journal of hepatology*. 2019;71(5):900-7.
376. Yu H, Boyle TA, Zhou C, Rimm DL, Hirsch FR. PD-L1 expression in lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology*. 2016;11(7):964-75.
377. Yan F, Pang J, Peng Y, Molina JR, Yang P, Liu S. Elevated cellular PD1/PD-L1 expression confers acquired resistance to cisplatin in small cell lung cancer cells. *PloS one*. 2016;11(9):e0162925.

378. Wang X, Yang X, Zhang C, Wang Y, Cheng T, Duan L, et al. Tumor cell-intrinsic PD-1 receptor is a tumor suppressor and mediates resistance to PD-1 blockade therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2020;117(12):6640-50.
379. Bhattacharjee S, Goswami S, Das S, Bhattacharjee S, Bhaladhare S. pH-responsive, stable, and biocompatible functional nanogels based on chitosan (CS)/poly methacrylic acid (PMAA) polymers: Synthesis and characterization. *Materials Today Communications*. 2023;36:106541.
380. Zeboudj L, Maître M, Guyonnet L, Laurans L, Joffre J, Lemarie J, et al. Selective EGF-receptor inhibition in CD4+ T cells induces anergy and limits atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology*. 2018;71(2):160-72.
381. Yang X, Zhang X, Mortenson ED, Radkevich-Brown O, Wang Y, Fu Y-X. Cetuximab-mediated tumor regression depends on innate and adaptive immune responses. *Molecular Therapy*. 2013;21(1):91-100.
382. Berraondo P, Sanmamed MF, Ochoa MC, Etxeberria I, Aznar MA, Pérez-Gracia JL, et al. Cytokines in clinical cancer immunotherapy. *British journal of cancer*. 2019;120(1):6-15.
383. Salem ML, Atia I, Elmashad NM. Higher cytotoxic activities of CD8+ T cells and natural killer cells from peripheral blood of early diagnosed lung cancer patients. *BMC immunology*. 2023;24(1):24.
384. Conlon KC, Miljkovic MD, Waldmann TA. Cytokines in the treatment of cancer. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 2019;39(1):6-21.
385. Esendağlı G. Sitokinler ve Kemokinler. Temel ve Klinik Nöroimmünoloji. Ankara: ADA Basın Yayın Ltd. Şti, 2013. KARABUDAK DR, GÜÇ, DR DİCLE. Temel ve Klinik Nöroimmünoloji. , editor: Ankara: ADA Basın Yayın Ltd. Şti, 2013.; 2013.
386. Shi L, Chen S, Yang L, Li Y. The role of PD-1 and PD-L1 in T-cell immune suppression in patients with hematological malignancies. *Journal of hematology & oncology*. 2013;6:1-6.
387. Mayer G. Immunology – Chapter Thirteen “Cytokines And Immunoregulation” 2017 [Erişim tarihi: 20.10.2023, Available from: <https://www.microbiologybook.org/bowers/imm-reg-ver2.htm>].
388. Gong K, Guo G, Beckley N, Zhang Y, Yang X, Sharma M, et al. Tumor necrosis factor in lung cancer: Complex roles in biology and resistance to treatment. *Neoplasia*. 2021;23(2):189-96.
389. Mehta AK, Gracias DT, Croft M. TNF activity and T cells. *Cytokine*. 2018;101:14-8.
390. Bertrand F, Rochotte J, Colacios C, Montfort A, Andrieu-Abadie N, Levade T, et al. Targeting TNF alpha as a novel strategy to enhance CD8+ T cell-dependent immune response in melanoma? *Oncoimmunology*. 2016;5(1):e1068495.

391. Yao Y, Chen S, Cao M, Fan X, Yang T, Huang Y, et al. Antigen-specific CD8+ T cell feedback activates NLRP3 inflammasome in antigen-presenting cells through perforin. *Nature Communications*. 2017;8(1):15402.
392. Tran HC, Wan Z, Sheard MA, Sun J, Jackson JR, Malvar J, et al. TGF $\beta$ R1 blockade with galunisertib (LY2157299) enhances anti-neuroblastoma activity of the anti-GD2 antibody dinutuximab (ch14. 18) with natural killer cells. *Clinical Cancer Research*. 2017;23(3):804-13.
393. Tang N, Cheng C, Zhang X, Qiao M, Li N, Mu W, et al. TGF- $\beta$  inhibition via CRISPR promotes the long-term efficacy of CAR T cells against solid tumors. *JCI insight*. 2020;5(4).
394. Zöphel D, Angenendt A, Kaschek L, Ravichandran K, Hof C, Janku S, et al. Faster cytotoxicity with age: Increased perforin and granzyme levels in cytotoxic CD8+ T cells boost cancer cell elimination. *Aging Cell*. 2022;21(8):e13668.
395. Otegbeye F, Ojo E, Moreton S, Mackowski N, Lee DA, de Lima M, et al. Inhibiting TGF-beta signaling preserves the function of highly activated, in vitro expanded natural killer cells in AML and colon cancer models. *PloS one*. 2018;13(1):e0191358.
396. Wang L, Liu J-Q, Talebian F, Liu Z, Yu L, Bai X-F. IL-10 enhances CTL-mediated tumor rejection by inhibiting highly suppressive CD4+ T cells and promoting CTL persistence in a murine model of plasmacytoma. *Oncoimmunology*. 2015;4(7):e1014232.
397. Emmerich J, Mumm JB, Chan IH, LaFace D, Truong H, McClanahan T, et al. IL-10 directly activates and expands tumor-resident CD8+ T cells without de novo infiltration from secondary lymphoid organs. *Cancer research*. 2012;72(14):3570-81.
398. Zhu J, Petit P-F, Van den Eynde BJ. Apoptosis of tumor-infiltrating T lymphocytes: a new immune checkpoint mechanism. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2019;68(5):835-47.
399. DİNİZ G, YAŞIN Y, ÇOBAN C, EVCİMEN Ş, KARAKAYALI M. Bağışıklık Sistemi: Güvenilir Bir Dost mu, İşbirlikçi Bir Düşman mı? *Forbes Journal of Medicine*. 2022;3(1).
400. MaruYama T, Chen W, Shibata H. TGF- $\beta$  and Cancer Immunotherapy. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2022;45(2):155-61.
401. Markey KA, Hill GR. Cytokines in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Cytokine Effector Functions in Tissues: Elsevier*; 2017. p. 219-36.
402. Rašková M, Lacina L, Kejík Z, Venhauerová A, Skaličková M, Kolář M, et al. The Role of IL-6 in Cancer Cell Invasiveness and Metastasis—Overview and Therapeutic Opportunities. *Cells*. 2022;11(22):3698.
403. Huseni MA, Wang L, Klementowicz JE, Yuen K, Breart B, Orr C, et al. CD8+ T cell-intrinsic IL-6 signaling promotes resistance to anti-PD-L1 immunotherapy. *Cell Reports Medicine*. 2023;4(1).

404. Wang D, Yu W, Lian J, Wu Q, Liu S, Yang L, et al. Th17 cells inhibit CD8+ T cell migration by systematically downregulating CXCR3 expression via IL-17A/STAT3 in advanced-stage colorectal cancer patients. *Journal of hematology & oncology*. 2020;13(1):1-15.
405. Su H, Geng H, Cai L, Xu M, Xing W, Long W, et al. Immune-check blocking combination multiple cytokines shown curative potential in mice tumor model. *Cancer Medicine*. 2023.
406. Yamazaki N, Kiyohara Y, Uhara H, Iizuka H, Uehara J, Otsuka F, et al. Cytokine biomarkers to predict antitumor responses to nivolumab suggested in a phase 2 study for advanced melanoma. *Cancer science*. 2017;108(5):1022-31.
407. Tian H-f, Xing J, Tang X-q, Chi H, Sheng X-z, Zhan W-b. Cluster of differentiation antigens: essential roles in the identification of teleost fish T lymphocytes. *Marine Life Science & Technology*. 2022;4(3):303-16.
408. Konkel JE, Frommer F, Leech MD, Yagita H, Waisman A, Anderton SM. PD-1 signalling in CD4+ T cells restrains their clonal expansion to an immunogenic stimulus, but is not critically required for peptide-induced tolerance. *Immunology*. 2010;130(1):92-102.
409. Zheng H, Liu X, Zhang J, Rice SJ, Wagman M, Kong Y, et al. Expression of PD-1 on CD4+ T cells in peripheral blood associates with poor clinical outcome in non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. 2016;7(35):56233.
410. Adamczyk M, Bartosińska J, Raczkiwicz D, Kowal M, Surdacka A, Krasowska D, et al. The Expression of Activation Markers CD25 and CD69 Increases during Biologic Treatment of Psoriasis. *Journal of Clinical Medicine*. 2023;12(20):6573.
411. Lee HY, Register A, Shim J, Contreras E, Wu Q, Jiang G, editors. Characterization of a single reporter-gene potency assay for T-cell-dependent bispecific molecules. *MAbs*; 2019: Taylor & Francis.
412. Courtney AH, Shvets AA, Lu W, Griffante G, Mollenauer M, Horkova V, et al. CD45 functions as a signaling gatekeeper in T cells. *Science signaling*. 2019;12(604):eaaw8151.
413. Yue P, Harper T, Bacot SM, Chowdhury M, Lee S, Akue A, et al. BRAF and MEK inhibitors differentially affect nivolumab-induced T cell activation by modulating the TCR and AKT signaling pathways. *Oncoimmunology*. 2019;8(1):e1512456.
414. Wu P, Zhao L, Chen Y, Xin Z, Lin M, Hao Z, et al. CD38 identifies pre-activated CD8+ T cells which can be reinvigorated by anti-PD-1 blockade in human lung cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2021;70:3603-16.
415. Rotow J, Bivona TG. Understanding and targeting resistance mechanisms in NSCLC. *Nature Reviews Cancer*. 2017;17(11):637-58.
416. Zhou J, Sun M, Jin S, Fan L, Zhu W, Sui X, et al. Combined using of paclitaxel and salinomycin active targeting nanostructured lipid carriers against non-small cell lung cancer and cancer stem cells. *Drug delivery*. 2019;26(1):281-9.

417. Liu X, Li H, Liu J, Guan Y, Huang L, Tang H, et al. Immune reconstitution from peripheral blood mononuclear cells inhibits lung carcinoma growth in NOD/SCID mice. *Oncology Letters*. 2014;8(4):1638-44.
418. Ezike TC, Okpala US, Onoja UL, Nwike PC, Ezeako EC, Okpara JO, et al. Advances in drug delivery systems, challenges and future directions. *Heliyon*. 2023.
419. Mohammed AI, Celentano A, Paolini R, Low JT, McCullough MJ, O'Reilly LA, et al. Characterization of a novel dual murine model of chemotherapy-induced oral and intestinal mucositis. *Scientific Reports*. 2023;13(1):1396.
420. Cheng Y, Ling F, Li J, Chen Y, Xu M, Li S, et al. An updated review of gastrointestinal toxicity induced by PD-1 inhibitors: from mechanisms to management. *Frontiers in Immunology*. 2023;14:1190850.
421. Mitchell MJ, Billingsley MM, Haley RM, Wechsler ME, Peppas NA, Langer R. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2021;20(2):101-24.
422. Cai J-X, Liu J-H, Wu J-Y, Li Y-J, Qiu X-H, Xu W-J, et al. Hybrid cell membrane-functionalized biomimetic nanoparticles for targeted therapy of osteosarcoma. *International Journal of Nanomedicine*. 2022:837-54.
423. Zhao Y, Sultan D, Liu Y. Biodistribution, excretion, and toxicity of nanoparticles. *Theranostic Bionanomaterials: Elsevier*; 2019. p. 27-53.
424. Sun Z, Zhang Y, Cao D, Wang X, Yan X, Li H, et al. PD-1/PD-L1 pathway and angiogenesis dual recognizable nanoparticles for enhancing chemotherapy of malignant cancer. *Drug Delivery*. 2018;25(1):1746-55.
425. Venugopal V, Krishnan S, Palanimuthu VR, Sankarankutty S, Kalaimani JK, Karupiah S, et al. Anti-EGFR anchored paclitaxel loaded PLGA nanoparticles for the treatment of triple negative breast cancer. In-vitro and in-vivo anticancer activities. *PloS one*. 2018;13(11):e0206109.

## 8. EKLER

## EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni 1



Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı Sanayi ve Ticaret A.Ş.  
İsli 21. Cadde 520. Sokak 2/2  
Yenimahalle Ankara

KOBAY DHL A.Ş. YEREL ETİK KURULU BAŞVURU ONAYI		
<b>BAŞVURU BİLGİLERİ</b>	Protokol Numarası	354
	Protokol Adı	: Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanserinin Tedavisine Yönelik Tümör Mikroçevresine Hedeflendirilmiş İmmünoterapötik İçeren Nanotaşıyıcı Sistem Geliştirilmesi ve in-vitro/in-vivo Olarak Değerlendirilmesi
	Başvuru Tarihi	06.02.2019
	Sorumlu Araştırmacı Adı-Unvanı	Dr.Öğr.Üyesi Kıvılcım Öztürk Atar
	Sorumlu Araştırmacı Çalıştığı Kurum	Hacettepe Üniversitesi
	Yardımcı Araştırmacılar	Prof. Dr. Sema Çalış Prof. Dr. Güneş Esendağlı Dr Öğr. Ü.Kıvılcım Öztürk Atar Öğr. Gör Dr. Süleyman Can Öztürk Meryem Kaplan
<b>KARAR BİLGİLERİ</b>	Onay Numarası	354
	Onay Tarihi	04.03.2019
	Onaylanan Hayvan Türü ve Sayısı	9 adet CD1 Nude Fare
	Onay Bilgileri	Proje Amaç, Gereçe, Yaklaşım Ve Yöntem Yönünden İncelenmiş Çalışmanın Gerçekleşmesinde etik Sakınca Bulunmadığına Karar Verilmiştir.
<b>KOBAY DHL A.Ş. YEREL ETİK KURUL ÜYELERİ</b>	Etik Kurul Başkanı Veteriner Hekim A.Begüm BUĞDAYCI AÇIKKOL	
	Etik Kurul Başkan Yardımcısı Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI	
	Etik Kurul Üyesi Sorumlu Veteriner Hekim Salih SALAR	
	Etik Kurul Üyesi Uzman Biyolog Uygur SAÇIK	
	Etik Kurul Üyesi Turgut ALTUN	
	Etik Kurul Üyesi Adil KIŞ	
	Etik Kurul Üyesi Uzman Diğdem Yöyen ERMIŞ	
	Etik Kurul Üyesi Ali VAROL	

**EK-1 devam: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni 1 - devamı**

09.07.2021

Sn. Kıvılcım ÖZTÜRK ATAR

Yürütücüsü olduğunuz "Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanserinin Tedavisine Yönelik Tümör Mikroçevresine Hedeflendirilmiş İmmünoterapötik İçeren Nanotaşıyıcı Sistem Geliştirilmesi ve invitro/in-vivo Olarak Değerlendirilmesi" başlıklı çalışmanız 04.03.2019 tarihinde 354 protokol numarası ile onaylanmıştır. 06.07.2021 tarihli dilekçeniz ile ön çalışma yapabilmek için etik kurulda belirlenen 9 adet nude fareye ilave 2 adet nude fare kullanılması gerekliliği talebiniz kurulumuzca incelenmiş olup ön deney için ilave hayvan kullanımınız uygun bulunmuştur.

A.Begüm BUĞDAYCI AÇIKKOL  
Yönetim Kurulu Başkanı  
Veteriner Hekim

KOBAY DENEY HAYVANLARI  
LABORATUVAN SANAYİ VE TİCARET A.Ş.

Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı Sanayi ve Ticaret A.Ş.  
Merkez Ofis : Uzay Çağı Caddesi, 1308. Sokak No:6 (Odtü Teknokent) Yenimahalle - Ankara  
Şube Ofis : İ.O.S.B 21.Cadde 520.Sokak No:2/2 Yenimahalle – Ankara

## EK-1 devam: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni 2



**T.C.**  
**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557 - 455

Konu : ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

**Toplantı Tarihi** : 28 ŞUBAT 2019 PERŞEMBE  
**Toplantı No** : 2019/06  
**Proje No** : GO 19/298(Değerlendirme Tarihi: 28.02.2019)  
**Karar No** : 2019/06-21

Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Dr. Öğr. Üyesi Kıvılcım Öztürk ATAR'ın sorumlu araştırmacı olduğu, Prof. Dr. Sema ÇALIŞ, Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI, Öğr. Gör. Dr. Süleyman Can ÖZTÜRK ile birlikte çalışacakları ve Ecz. Meryem KAPLAN'ın doktora tezi olan, GO 19/298 kayıt numaralı, "**Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanserinin Tedavisine Yönelik Tümör Mikroçevresine Hedeflendirilmiş İmmünoterapötik İçeren Nanotayıyıcı Sistem Geliştirilmesi ve in-vitro/in-vivo Olarak Değerlendirilmesi**" başlıklı proje önerisi araştırmacının gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, 01 Mart 2019-01 Mart 2021 tarihleri arasında geçerli olmak üzere etik açıdan **uygun bulunmuştur**. Çalışmanın ayrıca Hayvan Deneyleri Etik Kuruluna başvurularak onay alınması gerekmektedir. Çalışma tamamlandığında sonuçlarını içeren bir rapor örneğinin Etik Kurulumuza gönderilmesi gerekmektedir.

- |   |   |
|---|---|
| 1. Prof. Dr. Nurten AKARSU (Başkan)     | 9 Doç. Dr. Gözde GİRGİN (Üye)           |
| 2. Prof. Dr. Sevdâ F. MÜFTÜOĞLU (Üye)   | 10 Doç. Dr. Fatma Visal OKUR (Üye)      |
| 3. Prof. Dr. M. Yıldırım SARA (Üye)     | 11. Doç. Dr. Can Ebru KURT (Üye)        |
| 4. Prof. Dr. N. Nedir SAĞLAM (Üye)      | 12. Doç. Dr. H. Hüsrev TURNAGÖL (Üye)   |
| 5. Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN (Üye)      | 13. Dr. Öğr. Üyesi Özay GÖKÖZ (Üye)     |
| 6. Prof. Dr. Mintaze Kerem GÜNEL (Üye)  | 14. Dr. Öğr. Üyesi Müge DEMİR (Üye)     |
| 7. Prof. Dr. Oya N. İnan EMİROĞLU (Üye) | 15. Öğr. Gör. Dr. Meltem ŞENGELEN (Üye) |
| 8. Doç. Dr. M. Özgür UYANIK (Üye)       | 16. Av. Meltem ONURLU (Üye)             |

Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu  
06100 Sıhhiye-Ankara  
Telefon: \_\_\_\_\_

Ayrıntılı Bilgi için: \_\_\_\_\_

## EK-1 devam: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni 3



Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı Sanayi ve Ticaret A.Ş.  
İzmir 21. Cadde 520. Sokak 2/2  
Yatırım Yatırım Anonim

KOBAY DHL A.Ş. YEREL ETİK KURULU BAŞVURU ONAYI		
<b>BAŞVURU BİLGİLERİ</b>	Protokol Numarası	353
	Protokol Adı	Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanserinin Tedavisine Yönelik Tümör Mikroçevresine Hedeflendirilmiş İmmünoterapötik İçeren Nanotaşıyıcı Sistem Geliştirilmesi ve in-vitro/in-vivo Olarak Değerlendirilmesi
	Başvuru Tarihi	06.02.2019
	Sorumlu Araştırmacı Adı-Unvanı	Dr. Öğr. Üyesi Kıvılcım Öztürk Atar
	Sorumlu Araştırmacı Çalıştığı Kurum	Hacettepe Üniversitesi
	Yardımcı Araştırmacılar	Prof. Dr. Sema Çalış Prof. Dr. Güneş Esendağlı Dr. Öğr. Ü. Kıvılcım Öztürk Atar Öğr. Gör. Dr. Süleyman Can Öztürk Meryem Kaplan
<b>KARAR BİLGİLERİ</b>	Onay Numarası	353
	Onay Tarihi	04.03.2019
	Onaylanan Hayvan Türü ve Sayısı	58 adet CD34+ humanize fare
	Onay Bilgileri	Proje Amaç, Gerekece, Yaklaşım Ve Yöntem Yönünden İncelenmiş Çalışmanın Gerçekleşmesinde etik Sakınca Bulunmadığına Karar Verilmiştir.
<b>KOBAY DHL A.Ş. YEREL ETİK KURUL ÜYELERİ</b>	Etik Kurul Başkanı Veteriner Hekim A. Begüm BUĞDAYCI AÇIKKOL	
	Etik Kurul Başkan Yardımcısı Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI	
	Etik Kurul Üyesi Sorumlu Veteriner Hekim Salih SALAR	
	Etik Kurul Üyesi Uzman Biyolog Uygur SAÇIK	
	Etik Kurul Üyesi Turgut ALTUN	
	Etik Kurul Üyesi Adil KIŞ	
	Etik Kurul Üyesi Uzman Diğdem Yöyen ERMİŞ	
	Etik Kurul Üyesi Ali VAROL	

## EK-1 devam: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni 4



T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı : 52338575 - 94

**HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI**

TOPLANTI TARİHİ	: 04.09.2019 (ÇARŞAMBA)
TOPLANTI SAYISI	: 2019/09
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 2019/56
KARAR NUMARASI	: 2019/09- 01
ONAY BİTİŞ TARİHİ	: 04.09.2024
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Dr. Öğr. Üyesi Kıvılcım Öztürk ATAR
HAYVAN DENEYLERİNDE	: Dr. Öğr. Üyesi Kıvılcım Öztürk ATAR, Prof. Dr.
GÖREVLİ ARAŞTIRMACILAR	: Sema ÇALIŞ, Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI, Ecz. Meryem KAPLAN
DİĞER YARDIMCI	:
ARAŞTIRMACILAR	: Öğr. Gör. Dr. Süleyman Can ÖZTÜRK
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	: 48 Adet CD34+humanize Fare (6-8 Hafta)

Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Dr. Öğr. Üyesi Kıvılcım Öztürk ATAR'ın araştırma yürütücüsü olduğu 2019/56 kayıt numaralı "**Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanserinin Tedavisine Yönelik Tümör Mikroçevresine Hedeflendirilmiş İmmünoterapötik İçeren Nanotaşıyıcı Sistem Geliştirilmesi ve in-vitro/in-vivo Olarak Değerlendirilmesi**" isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir. Kurul üyesi Prof. Dr. Sema ÇALIŞ ve Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI çıkar çatışması nedeniyle tartışma ve oylamaya katılmamıştır.

Araştırma yürütücüsü en geç, onay bitiş tarihinden sonraki 1 ay içerisinde proje sonuç raporunu Kurulumuza teslim etmekle yükümlüdür.

Prof. Dr. Sema ÇALIŞ  
Etik Kurul Başkanı

## EK-1 devam: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni 4 - devamı

**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURULU İMZA SİRKÜLERİ**

TOPLANTI TARİHİ : 04.09.2019 (ÇARŞAMBA)  
TOPLANTI SAYISI : 2019/09  
TOPLANTI SAATİ : 13.30  
PROJE NUMARASI : 2019/56  
KARAR NUMARASI : 2019/09-01

(KATILMADI) Prof. Dr. Sema ÇALIŞ (Başkan)	(İZİNLİ) Prof. Dr. Nüket Ömek BÜKEN (Üye)	Prof. Dr. M. Yılmaz SARA
(İZİNLİ) Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR (Üye)	(İZİNLİ) Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI (Üye)	Prof. Dr. Abdullah C. AKMAN (Üye)
Prof. Dr. Ersay KONUŞ	Prof. Dr. Aytekin AKYOL (Üye)	Doç. Dr. Meltem TUNCER (Üye)
Doç. Dr. İlyas ONBAŞILAR (Üye)	Doç. Dr. M. Alper ÇETİNKAYA (Üye)	(İZİNLİ) Dr. Öğr. Üyesi Banu Cahide TEL (Üye)
Mevlüt ÖKSÜZOĞLU (Üye)	Serdar ÇAKIROĞLU (Üye)	Avukat Yasemin ÖZSELÇUK (Üye)

**EK-2: Dijital Makbuz ve Orijinallik Raporu****Dijital Makbuz**

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

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Meryem Kaplan  
Ödev başlığı: Doktora Tezi  
Gönderi Başlığı: Doktora Tezi  
Dosya adı: MERYEM\_KAPLAN\_TEZ\_04.02.2024\_turnitin.pdf  
Dosya boyutu: 10.31M  
Sayfa sayısı: 216  
Kelime sayısı: 46,037  
Karakter sayısı: 314,564  
Gönderim Tarihi: 04-Şub-2024 07:32ÖS (UTC+0300)  
Gönderim Numarası: 2285823331



## EK-2 devam: Dijital Makbuz ve Orijinallik Raporu - devamı

FARKLI ŞEKİLLİ NANOPARTİKÜLLERİN GELİŞTİRİLMESİ, İMMÜNÖTERAPÖTİK VE KEMOTERAPÖTİK MADDE YÜKLÜ OPTİMUM ŞEKİLLİ NANOPARTİKÜLLERİN KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERİ ÜZERİNE ANTİKANSER ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Meryem KAPLAN

216 sayfa

### ORJİNALLİK RAPORU

<b>%6</b>	<b>%6</b>	<b>%0</b>	<b>%3</b>
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

### BİRİNCİL KAYNAKLAR

<b>1</b>	<b>openaccess.hacettepe.edu.tr</b> İnternet Kaynağı	<b>%3</b>
<b>2</b>	<b>acikbilim.yok.gov.tr</b> İnternet Kaynağı	<b>%2</b>
<b>3</b>	<b>openaccess.hacettepe.edu.tr:8080</b> İnternet Kaynağı	<b>%1</b>

Alıntılarını çıkart      üzerinde      Eşleşmeleri çıkar      < %1  
Bibliyografyayı Çıkart      Kapat

EK-3: Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası

581/5796




**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

**DENEY HAYVANLARI KULLANIM SERTİFİKASI**

**Sayın MERYEM KAPLAN**

06.03.2019 - 22.03.2019 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi HADYEK tarafından Ankara İlinde düzenlenen "Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası" eğitimini başarı ile tamamlayarak A kategorisi sertifikası almaya hak kazanmıştır.

Prof. Dr. SEMA ÇALIŞ  
HADYEK BAŞKANI

Prof. Dr. Haluk ÖZEN  
Rektör



## EK-3 devam: Deneysel Hayvanları Kullanım Sertifikası - devamı

Ders Adı	Ders Saati	
	Teorik	Uygulama
Mevzuat, Etik, Hayvan Davranışları ve 3R*	3	
Deneysel hayvanlarının anatomisi, fizyolojisi, histolojisi ve biyokimyası	5	4
Kan ve örnek alma teknikleri	1	4
Tutuş teknikleri	1	4
İlaç verme ve enjeksiyon teknikleri	1	4
Anestezi ve ötenazi teknikleri	2	4
Ağrı, ıstırap, sıkıntı ve insani sonlandırma noktalarının belirlenmesi	2	
Laboratuvar işleyişi (temizlik, güvenlik, çalışma sağlığı)*	2	4
Deneysel hayvanlarının beslenmesi	2	
Hayvan hastalıkları a) mikrobiyolojik, virolojik, parazitolojik, mikolojik b) klinik dışı vurumlar c) sağlık tarama programları	4	4
Biyoistatistik (mümkün olan en düşük hayvan sayısının belirlenmesi)*	2	
Standardizasyon a) Genetik standardizasyon b) Mikrobiyolojik standardizasyon c) Bakım-barındırma d) Araştırma	3	
Spesifik deneysel modelleri	4	4
Hayvan deneylerinin tasarlanması*	2	4
Temel Cerrahi	2	
Deneysel hayvanlarının yetiştirilmesi	2	4
Alternatif Yöntemler*	2	
<b>TOPLAM</b>	<b>40</b>	<b>40</b>

**Başarı Puanı** : 99

**Sertifikanın geçerli olduğu hayvan türü/türleri** : Fare (Mus musculus) , Sıçan (Rattus norvegicus) , Kobay (Cavia porcellus) , Tavşan (Oryctolagus cuniculus)

Bu Sertifika Orman ve Su İşleri Bakanlığı'nın 30.11.2017 tarih ve 2017/7 sayılı Genelgesine uygun olarak düzenlenmiştir.

## EK-4: Tez Kapsamında Üretilen Yayın



pharmaceutics



Article

# Effects of Particle Geometry for PLGA-Based Nanoparticles: Preparation and In Vitro/In Vivo Evaluation

Meryem Kaplan <sup>1,2</sup>, Kıvılcım Öztürk <sup>1</sup>, Süleyman Can Öztürk <sup>3</sup>, Ece Tavukçuoğlu <sup>4</sup>, Güneş Esendağlı <sup>4</sup> and Sema Calis <sup>1,\*</sup><sup>1</sup> Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Hacettepe University, Ankara 06100, Turkey<sup>2</sup> Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Süleyman Demirel University, Isparta 32260, Turkey<sup>3</sup> Centre for Laboratory Animals Research and Application, Hacettepe University, Ankara 06100, Turkey<sup>4</sup> Department of Basic Oncology, Hacettepe University Cancer Institute, Ankara 06100, Turkey

\* Correspondence: scalis@hacettepe.edu.tr or semahacettepe@gmail.com

**Abstract:** The physicochemical properties (size, shape, zeta potential, porosity, elasticity, etc.) of nanocarriers influence their biological behavior directly, which may result in alterations of the therapeutic outcome. Understanding the effect of shape on the cellular interaction and biodistribution of intravenously injected particles could have fundamental importance for the rational design of drug delivery systems. In the present study, spherical, rod and elliptical disk-shaped PLGA nanoparticles were developed for examining systematically their behavior in vitro and in vivo. An important finding is that the release of the encapsulated human serum albumin (HSA) was significantly higher in spherical particles compared to rod and elliptical disks, indicating that the shape can make a difference. Safety studies showed that the toxicity of PLGA nanoparticles is not shape dependent in the studied concentration range. This study has pioneering findings on comparing spherical, rod and elliptical disk-shaped PLGA nanoparticles in terms of particle size, particle size distribution, colloidal stability, morphology, drug encapsulation, drug release, safety of nanoparticles, cellular uptake and biodistribution. Nude mice bearing non-small cell lung cancer were treated with 3 differently shaped nanoparticles, and the accumulation of nanoparticles in tumor tissue and other organs was not statistically different ( $p > 0.05$ ). It was found that PLGA nanoparticles with 1.00, 4.0  $\pm$  0.5, 7.5  $\pm$  0.5 aspect ratios did not differ on total tumor accumulation in non-small cell lung cancer.

**Keywords:** nanoparticles; particle shape; anisotrop; human serum albumin; cellular uptake; biodistribution; drug delivery; PLGA



Citation: Kaplan, M.; Öztürk, K.; Öztürk, S.C.; Tavukçuoğlu, E.; Esendağlı, G.; Calis, S. Effects of Particle Geometry for PLGA-Based Nanoparticles: Preparation and In Vitro/In Vivo Evaluation.

*Pharmaceutics* 2023, 15, 175. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010175>

Academic Editors: Giovanni Dal Poggetto, Paola Lauritzen and Armin Mooradian

Received: 23 October 2022

Revised: 3 December 2022

Accepted: 27 December 2022

Published: 3 January 2023



Copyright © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

The National Nanotechnology Initiative (NNI, 2010) describes nanotechnology as “the understanding and control of matter at dimensions between approximately 1 and 100 nm, where unique phenomena enable novel applications” [1]. Over the past three decades, nanotechnology has emerged as a promising strategy to resolve the technological impasses incurred in various branches of science. Nanotechnology provides improvements of treatment efficiency by increasing the stability and solubility of encapsulated pharmaceuticals, contributing to transport across membranes, prolonging blood residence time, localizing drugs at the therapeutic site and exhibiting endosomal escape [2–4]. Moreover, targeting by affinity ligands facilitates the uptake of nanoparticles by the tumor cells themselves, allowing for prolonged tissue retention and increased cellular uptake [2]. It is also possible to design these systems so that controlled drug release can take place from the matrix, which may include both organic and inorganic materials [5]. It is important to note that nanoparticles clear rapidly from the systemic circulation via phagocytic uptake, mainly by the macrophages in the liver and spleen. A surfactant such as PEG or poloxamer can be used to modify the surface of nanoparticles to increase their stability in vivo [6–8]. Despite

## 9. ÖZGEÇMİŞ