

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PAKLİTAKSEL NANOPARTİKÜLLERİNİN KALİTE
TASARIMI İLE GELİŞTİRİLMESİ VE
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Uzm. Ecz. Fırat YERLİKAYA

Farmasötik Teknoloji Programı

DOKTORA TEZİ

ANKARA

2013

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PAKLİTAKSEL NANOPARTİKÜLLERİNİN KALİTE
TASARIMI İLE GELİŞTİRİLMESİ VE
DEĞERLENDİRİLMESİ

Uzm. Ecz. Fırat YERLİKAYA

Farmasötik Teknoloji Programı

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Yılmaz ÇAPAN

ANKARA

2013

Anabilim Dalı : Farmasötik Teknoloji
Program : Doktora
Tez Başlığı : Paklitaksel Nanopartiküllerinin Kalite Tasarımı ile
Geliştirilmesi ve Değerlendirilmesi
Öğrenci Adı-Soyadı : Fırat YERLİKAYA
Savunma Sınavı Tarihi : 28.02.2013

Bu çalışma jürimiz tarafından doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Yılmaz ÇAPAN

(Tez Danışmanı) Hacettepe Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. İmran VURAL

Hacettepe Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. R. Neslihan GÜRSOY

Hacettepe Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Ergun KARAAĞAOĞLU

Hacettepe Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Füsun ACARTÜRK

Gazi Üniversitesi

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Ersin FADILLIOĞLU

Müdür

TEŞEKKÜR

Doktora programına başladığım ilk günden bu yana bana son derece özverili, sorumlu, yardımsever ve hassas davranan; deneyimini, bilgisini ve bilim insanlığının getirdiği vizyonu her an benimle paylaşan değerli danışman hocam Prof. Dr. Yılmaz Çapan'a en büyük teşekkürlerimi sunarım.

Kendisinden aldığım eşsiz ilham ve vizyon için Dr. Mansoor A. Khan'a, istatistiksel deney tasarımı çalışmalarında bana sınırsız destek veren Prof. Dr. Ergun Karaağaoğlu'na, fizikokimyasal karakterizasyon çalışmalarında son derece önemli yardımlarını aldığım Prof. Dr. Olgun Güven'e, hücre kültürü çalışmalarım için Prof. Dr. İmran Vural'a, bana bilimsel yöntemi öğreten yüksek lisans tez danışmanım Doç. Dr. Betül Arıca'ya, tez çalışmalarımı yapabilmem için gerekli akademik ortamı sağlayan anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Sema Çalış'a, arkadaşlarım Dr. Can Sarısözen'e, Uzm. Ecz. Seçil Toktaş'a, Ecz. Adem Şahin'e, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı idari personeline ve tez çalışmalarına verdiği samimi destekten ötürü Drogosan İlaçları Genel Müdür Yardımcısı Dr. Nizam M. Emritte'ye teşekkür ederim.

Karşılıksız ve şartsız, her zaman yanımda olan, zor günlerimdeki en büyük destekçim, sevgili eşim Nihal Yerlikaya'ya; kardeşime, anneme ve babama varlıkları için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Yerlikaya, F. Paklitaksel nanopartiküllerinin kalite tasarımı ile geliştirilmesi ve değerlendirilmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Teknoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2013. Kalite Tasarımı, FDA tarafından başlatılan, bilgi ve bilimsel yaklaşım esaslı bir girişimdir. Bu tez çalışmasının amacı Y/S emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemiyle hazırlanan paklitaksel nanopartiküllerini kalite tasarımı yaklaşımıyla geliştirmek ve karakterize etmektir. Buna ek olarak; prosesteki değişkenlik kaynaklarını belirlemek ve kontrol etmek, ayrıca formülasyon bileşenleri ve proses parametrelerinin nanopartiküllerin kritik kalite özellikleri üzerine etkisini anlamak da hedeflenmiştir. Bunun için öncelikle çeşitli formülasyon ve proses parametrelerinin paklitaksel nanopartiküllerinin kritik kalite özellikleri (partikül büyüklüğü, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliği) üzerine etkilerinin değerlendirildiği bir risk değerlendirmesi çalışması yapılmıştır. Ishikawa diyagramı kullanılarak potansiyel risk faktörleri belirlendikten sonra Plackett-Burman deney tasarımı kullanılarak önemsiz risk faktörleri elenmiş ve son olarak Box-Behnken deney tasarımı kullanılarak paklitaksel nanopartikülleri optimize edilmiştir. Optimize edilen paklitaksel nanopartikül formülasyonu daha sonra FTIR, XRD, DSC, SEM, AFM ve gaz kromatografisi ile karakterize edilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda paklitaksel ile PLGA arasında herhangi bir geçimsizlik olmadığı, paklitakselin nanopartiküllere tamamen enkapsüle olduğu ve enkapsülasyon sırasında kristal halden amorf hale geçtiği görülmüştür. Gaz kromatografisi analizlerinde ise hazırlanan paklitaksel formülasyonunda diklorometan kalıntısı saptanmamıştır. Yapılan *in vitro* sitotoksikite testi geliştirilen paklitaksel nanopartiküllerinin serbest paklitaksele göre antitümör aktivite yönünden daha etkin olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak, bu tez çalışması formülasyon ve proses parametrelerinin kalite tasarımı yaklaşımıyla anlaşılmasının kompleks ilaç taşıyıcı sistemlerinin optimizasyonundaki önemini ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: paklitaksel, kalite tasarımı, deney tasarımı, Plackett-Burman, Box-Behnken

ABSTRACT

Yerlikaya, F. Development and evaluation of paclitaxel nanoparticles using quality by design. Hacettepe University Institute of Health Sciences, Ph.D. Thesis in Pharmaceutical Technology, Ankara, 2013. Quality by design is an FDA initiative that is a science and knowledge-based approach to pharmaceutical development. The aim of this study was to develop and characterize paclitaxel nanoparticles prepared by *o/w* emulsification-solvent evaporation method and to identify and control critical source of variability in the process, and understand the impact of formulation components and process parameters on the critical quality attributes using a quality by design approach. For this, a risk assessment study was performed with various formulation and process parameters regarding their impacts on critical quality attributes of paclitaxel nanoparticles which were determined as particle size, zeta potential and encapsulation efficiency. The potential risk factors were identified using an Ishikawa diagram and screened by Plackett-Burman design and finally paclitaxel nanoparticles were optimized using Box-Behnken design. The optimized nanoparticle formulation was further characterized by FTIR, XRD, DSC, SEM, AFM and gas chromatography. These studies showed that there was no incompatibility between paclitaxel and PLGA, paclitaxel completely encapsulated into the nanoparticles and transformed from crystalline state to amorphous state while encapsulating. In addition, no dichloromethane residue was detected in paclitaxel nanoparticles. *In vitro* cytotoxicity test showed that the developed paclitaxel nanoparticles were more efficient than free paclitaxel in terms of antitumor activity. In conclusion, this study demonstrated that understanding the formulation and the process parameters with the philosophy of quality by design is useful for the optimization of complex drug delivery systems.

Keywords: paclitaxel, quality by design, design of experiments, Plackett-Burman, Box-Behnken

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
TABLolar DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kalite Tasarımı	3
2.2. Deney Tasarımı.....	5
2.2.1. Plackett-Burman Deney Tasarımı.....	6
2.2.2. Box-Behnken Deney Tasarımı	9
2.3. Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler	10
2.4. Paklitaksel.....	11
2.4.1. Onaylanmış ve Araştırma Aşamasındaki Ürünler	12
2.4.2. Paklitaksel ile Yapılan İlaç Taşıyıcı Sistem Çalışmaları	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	15
3.1. Kullanılan Maddeler ve Ekipman	15
3.2. Paklitaksel Nanopartiküllerinin Hazırlanması	17
3.3. Risk Faktörlerinin Belirlenmesi: Ishikawa Diyagramı	18
3.4. Risk Analizi: Plackett-Burman Deney Tasarımı	18
3.5. Paklitaksel Nanopartiküllerinin Optimizasyonu: Box-Behnken Deney Tasarımı.....	20

3.6. Enkapsülasyon Etkinliği ve <i>In Vitro</i> İlaç Salımı Çalışmalarında Kullanılan Analitik Yöntemin Validasyonu	23
3.6.1. Kromatografik Şartlar ve Sistem	23
3.6.2. Stok ve Standart Çözeltiler	24
3.6.3. Sistem Uygunluğu	24
3.6.4. Özgünlük.....	24
3.6.5. Doğrusallık ve Aralık	24
3.6.6. Doğruluk ve Kesinlik.....	25
3.6.7. Saptama ve Tayin Sınırı.....	25
3.7. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi.....	25
3.8. X-Işını Difraktometrisi	25
3.9. Termogravimetrik Analiz	26
3.10. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri	26
3.11. Taramalı Elektron Mikroskopisi.....	26
3.12. Atomik Kuvvet Mikroskopisi	27
3.13. Partikül Büyüklüğü Dağılımı.....	27
3.14. Yüzey Yüğü	27
3.15. Enkapsülasyon Etkinliği	27
3.16. <i>In Vitro</i> İlaç Salımı	28
3.17. Çözücü Kalıntısı	28
3.18. <i>In Vitro</i> Sitotoksosite	29
4. BULGULAR.....	30
4.1. Risk Faktörlerinin Belirlenmesi: Ishikawa Diyagramı	30
4.2. Risk Analizi: Plackett-Burman Deney Tasarımı	30
4.3. Paklitaksel Nanopartiküllerinin Optimizasyonu: Box-Behnken Deney Tasarımı.....	38

4.4. Enkapsülasyon Etkinliği ve <i>In Vitro</i> İlaç Salımı Çalışmalarında Kullanılan Analitik Yöntemin Validasyonu	48
4.4.1. Sistem Uygunluğu	49
4.4.2. Özgünlük.....	50
4.4.3. Doğrusallık ve Aralık	51
4.4.4. Doğruluk ve Kesinlik.....	52
4.4.5. Saptama ve Tayin Sınırı.....	53
4.5. Fourier Dönüştümlü Kızılötesi Spektroskopisi.....	53
4.6. X-Işını Difraktometresi.....	55
4.7. Termogravimetrik Analiz	55
4.8. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre.....	56
4.9. Taramalı Elektron Mikroskopisi.....	58
4.10. Atomik Kuvvet Mikroskopisi	60
4.11. Partikül Büyüklüğü Dağılımı.....	62
4.12. Yüzey Yüğü	64
4.13. Enkapsülasyon Etkinliği	66
4.14. <i>In Vitro</i> İlaç Salımı	68
4.15. Çözücü Kalıntısı	69
4.16. <i>In Vitro</i> Sitotoksosite	70
5. TARTIŞMA.....	72
5.1. Paklitaksel Nanopartiküllerinin Kritik Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi	72
5.2. Paklitaksel Nanopartiküllerin Üretim Yöntemi ile Formülasyon Bileşenlerinin Seçilmesi ve Risk Değerlendirmesi Kapsamında Kritik Formülasyon ve Proses Parametrelerinin Belirlenmesi.....	72
5.3. Formülasyon ve Proses Parametrelerinin Paklitaksel Nanopartiküllerinin Kritik Kalite Özellikleri Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi	74

5.4. Paklitaksel Nanopartiküllerinin Fizikokimyasal Özelliklerinin Değerlendirilmesi.....	76
5.5. <i>In Vitro</i> İlaç Salımı	77
5.6. Çözücü Kalıntısı	78
5.7. <i>In Vitro</i> Sitotoksosite	78
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	79
KAYNAKLAR	81

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i> , Atomik Kuvvet Mikroskopisi
CV	<i>Coefficient of Variation</i> , Değişim Katsayısı
DMEM	Dulbecco's Modifiye Eagle Ortamı
DMF	Dimetilformamid
DMSO	Dimetil sülfoksit
DoE	<i>Design of Experiments</i> , Deney Tasarımı
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i> , Diferansiyel Taramalı Kalorimetri
EPR	<i>Enhanced Permeation and Retention</i> , Artmış Geçirgenlik ve Alıkonma
FBS	Fetal bovin serumu
FDA	<i>United States Food and Drug Administration</i> , Amerikan İlaç ve Gıda Dairesi
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared</i> , Fourier Dönüşümlü Kızılötesi
HLB	<i>Hydrophile-Lipophile Balance</i> , Hidrofil-Lipofil Dengesi
ICH	<i>The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i> , Beşeri İlaçların Ruhsatlandırılmaları için Teknik Gerekliliklerin Uyumu üzerine Uluslararası Konferans
LOD	<i>Limit of Detection</i> , Saptama Sınırı
LOQ	<i>Limit of Quantitation</i> , Tayin Sınırı
MS	<i>Mass Spectroscopy</i> , Kütle Spektroskopisi
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid
PAT	<i>Process Analytical Technology</i> , Proses Analitik Teknoloji
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> , Fosfat Tamponlu Tuz
PDI	Polidispersite İndeksi

PLGA	Poli(laktik-ko-glikolik asit)
PTFE	Politetrafloroetilen
PVA	Polivinil alkol
PVC	Polivinil klorür
QbD	<i>Quality by Design</i> , Kalite Tasarımı
RSM	<i>Response Surface Methodology</i> , Yüzey Cevap Metodolojisi
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i> , Taramalı Elektron Mikroskopisi
SNEDDs	<i>Self-nano-emulsified drug delivery systems</i> , Kendiliğinden Emülsifiye Olan İlaç Taşıyıcı Sistemler
SS	Standart Sapma
TGA	Termogravimetrik Analiz
UPLC	<i>Ultra High Pressure Liquid Chromatography</i> , Ultra Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
XRD	<i>X-Ray Diffraction</i> , X-Işını Difraktometresi
Y/S	Su-içinde-yağ

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Paklitakselin kimyasal yapısı.....	12
Şekil 3.1. Paklitaksel nanopartiküllerinin üretim akış şeması.	17
Şekil 4.1. Nanopartikül özelliklerini etkileyebilecek formülasyon ve proses değişkenlerini gösteren bir Ishikawa diyagramı.	30
Şekil 4.2. Partikül büyüklüğü için ana etken grafikleri.....	32
Şekil 4.3. Zeta potansiyeli için ana etken grafikleri.....	33
Şekil 4.4. Enkapsülasyon etkinliği için ana etken grafikleri.....	34
Şekil 4.5. Partikül büyüklüğü, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliği için anlamlı formülasyon ve proses değişkenlerini gösteren Pareto grafikleri.	37
Şekil 4.6. Normal olasılık grafikleri: a) partikül büyüklüğü, b) zeta potansiyeli ve c) enkapsülasyon etkinliği.....	40
Şekil 4.7. Paklitaksel nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü üzerine PLGA miktarı, sürfaktan konsantrasyonu ve homojenizasyon hızının etkisini gösteren kontur grafikleri.....	42
Şekil 4.8. Paklitaksel nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü üzerine PLGA miktarı, sürfaktan konsantrasyonu ve homojenizasyon hızının etkisini gösteren yüzey cevap grafikleri.....	43
Şekil 4.9. Paklitaksel nanopartiküllerinin enkapsülasyon etkinliği üzerine PLGA miktarı, sürfaktan konsantrasyonu ve homojenizasyon hızının etkisini gösteren kontur grafikleri.	44
Şekil 4.10. Paklitaksel nanopartiküllerinin enkapsülasyon etkinliği üzerine PLGA miktarı, sürfaktan konsantrasyonu ve homojenizasyon hızının etkisini gösteren yüzey cevap grafikleri.....	45
Şekil 4.11. Paklitaksel nanopartikülleri için tasarım aralığı. Beyaz bölgeler hedeflenen partikül büyüklüğü (< 400 nm) ve enkapsülasyon etkinliği (> %50) için uygun faktör düzeylerini, kırmızı ve yeşil çizgiler ise sırasıyla partikül büyüklüğü (400 nm) ve enkapsülasyon etkinliği (%50) için limit değerleri göstermektedir.....	47

Şekil 4.12. Paklitakselin DMSO içerisindeki çözeltisine ilişkin kütle spektrumu.....	49
Şekil 4.13. Paklitakselin DMSO içerisindeki 5 µg/ml konsantrasyondaki çözeltisine ilişkin örnek kromatogram.....	50
Şekil 4.14. Örnek kromatogramlar: a) plasebo nanopartiküller, b) paklitakselin DMSO içerisindeki çözeltisi, c) DMSO, d) <i>in vitro</i> ilaç salım ortamı.....	51
Şekil 4.15. Paklitaksel analitik yöntemine ilişkin regresyon doğrusu. Y pik alanını ve X paklitaksel konsantrasyonunu göstermektedir.....	52
Şekil 4.16. FTIR spektrumları: a) paklitaksel, b) PLGA, c) paklitaksel-PLGA fiziksel karışımı ve d) paklitaksel nanopartikülleri.....	54
Şekil 4.17. Paklitaksel ve paklitaksel nanopartiküllerine ilişkin X-ışını difraktogramları. Mavi desen paklitaksele, kırmızı desen ise paklitaksel nanopartiküllerine aittir.....	55
Şekil 4.18. TGA termogramları: a) paklitaksel ve b) PLGA.....	56
Şekil 4.19. Paklitaksel, PLGA, paklitaksel-PLGA fiziksel karışımı ve paklitaksel nanopartiküllerine ilişkin DSC termogramları.....	57
Şekil 4.20. Paklitaksel nanopartiküllerinin SEM görüntüleri.....	59
Şekil 4.21. Paklitaksel nanopartiküllerinin AFM görüntüleri.....	61
Şekil 4.22. Partikül büyüklüğü dağılımı histogramları: a) PBD11 ve b) BBD06.....	64
Şekil 4.23. Plackett-Burman deney tasarımı formülasyonlarının <i>in vitro</i> ilaç salımı profilleri ($n = 3$, hata çubukları standart sapmaları göstermektedir).....	68
Şekil 4.24. Gaz kromatografisi kromatogramları: a) diklorometanın DMSO içerisindeki 20 ppm'lik çözeltisi, b) DMSO ve c) DMSO içerisinde çözündürülmüş paklitaksel nanopartikülleri.....	70
Şekil 4.25. 48 saat inkübasyon sonrasında kontrol gruplarına karşı paklitaksel çözeltisi, paklitaksel nanopartikülleri ve plasebo nanopartiküllerin sitotoksosite sonuçları ($n = 5$, hata çubukları standart sapmayı göstermektedir).	71

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. 11 faktörlü ve 12 deneyli bir Plackett-Burman tasarım matrisi. Pozitif değerler faktörlerin yüksek düzeyini, negatif değerler ise faktörlerin düşük düzeylerini göstermektedir.....	7
Tablo 2.2. Üç düzeyli ve üç faktörlü bir Box-Behnken tasarım matrisi. Pozitif değerler faktörlerin yüksek düzeylerini, negatif değerler faktörlerin düşük düzeyini, sıfır değeri ise faktörler için orta düzeyi ifade etmektedir.	9
Tablo 3.1. Tez çalışmasında kullanılan maddeler.....	15
Tablo 3.2. Tez çalışmasında kullanılan ekipman.....	16
Tablo 3.3. Plackett-Burman deney tasarımında kullanılan faktörler ve düzeyleri.....	19
Tablo 3.4. Plackett-Burman tasarımı deney matrisi.....	20
Tablo 3.5. Box-Behnken deney tasarımında kullanılan faktörler ve düzeyleri.....	21
Tablo 3.6. Box-Behnken deney tasarımında sabit düzeyde kullanılan formülasyon ve proses parametreleri.....	21
Tablo 3.7. Box-Behnken tasarımı deney matrisi.....	22
Tablo 4.1. Plackett-Burman deney tasarımı ile elde edilen bağımlı değişken değerleri.....	31
Tablo 4.2. Plackett-Burman deney tasarımı ile elde edilen bağımlı değişken değerlerinin istatistiksel analizi.....	35
Tablo 4.3. Bağımlı değişkenler için varyans analizi sonuçları.....	36
Tablo 4.4. Box-Behnken deney tasarımı ile elde edilen bağımlı değişken değerleri.....	38
Tablo 4.5. Faktörlerin kestirmlenen regresyon katsayıları ve ilgili p değerleri.....	39
Tablo 4.6. Arzulanabilirlik fonksiyonu temel alınarak geliştirilen optimum paklitaksel nanopartikül formülasyonuna ilişkin deneysel ve kestirimsel değerler... ..	48
Tablo 4.7. Paklitaksel analitik yöntemine ilişkin doğruluk ve kesinlik parametreleri sonuçları ($n = 3$).....	52

Tablo 4.8. Plackett-Burman ve Box-Behnken deney tasarımı kapsamında hazırlanan formülasyonların partikül büyüklüğü dağılımı verileri ($n = 3$, SS: standart sapma, CV: değişim katsayısı).....	63
Tablo 4.9. Plackett-Burman ve Box-Behnken deney tasarımı kapsamındaki formülasyonlara ilişkin zeta potansiyeli değerleri ($n = 3$, SS: standart sapma, CV: değişim katsayısı).....	65
Tablo 4.10. Plackett-Burman ve Box-Behnken deney tasarımı kapsamındaki formülasyonlara ilişkin enkapsülasyon etkinliği değerleri ($n = 3$, SS: standart sapma, CV: değişim katsayısı).....	67

1. GİRİŞ

Kalite Tasarımı (*Quality by Design*, QbD) bir ürünün tasarım aşamasından ticarileştirildiği aşamaya kadar, ürünün tüm yaşam döngüsünü kapsayacak şekilde geliştirilmesini hedefleyen bir tasarım konseptidir ve Birleşik Devletler İlaç ve Gıda Dairesi (*United States Food and Drug Administration*, FDA) tarafından başlatılan bir girişimdir. QbD ürünün ve prosesin ürün geliştirme süreci içerisinde ve ürünün bütün yaşam döngüsü boyunca anlaşılmasını vurgulayan yeni bir paradigmadır. Literatürdeki çalışmalardan da görüleceği üzere QbD çalışmalarının temelini ürünün ve prosesin bilimsel olarak anlaşılması, dolayısıyla istatistiksel deney tasarımları (*Design of Experiments*, DoE) oluşturmaktadır.

Konvansiyonel deney tasarımlarının pek çok dezavantajı vardır. Her bir deneyde bir faktörü değiştirip diğer faktörleri sabit tutmak, özellikle değişken sayısı fazla ise, çok sayıda deney yapılmasına neden olmaktadır. Ek olarak, konvansiyonel tasarımlar ile faktörlerin etkileşim etkilerini incelemek mümkün değildir. İstatistiksel deney tasarımları konvansiyonel yaklaşıma göre daha az deney sayısı ile daha doğru sonuçlar elde edilmesini sağlamaktadır. Ayrıca, verilerin ekstrapolasyonu ve grafiklenebilmesi sayesinde deney tasarımları ile ürün ve prosesin optimizasyonu mümkündür. Literatürde, deney sayısının azaltılması ve daha kullanışlı veri elde edilmesini sağlayabilecek çok sayıda deney tasarımı tanımlanmıştır. Bir deney tasarımında amaç eğer çok sayıda değişkeni “etkili” ve “etkisiz” şeklinde sınıflandırmak ise Plackett-Burman gibi birinci dereceden tasarımlar tercih edilebilir. Ancak amaç bir cevap değişkenini matematiksel olarak kestirimlemek (*estimation*) veya bir prosesi optimize etmek ise Box-Behnken tasarımı gibi ikinci dereceden modellerin tercih edilmesi gereklidir. Literatür örneklerinde de görüldüğü üzere deney tasarımının oluşturulmasında ve analizinde uygun yazılımların kullanılması çalışmadan elde edilecek verilerin niteliği yönünden önemlidir. Bu tez çalışmasında Minitab® 16 (Minitab Inc., ABD) yazılımı deney tasarımlarının oluşturulmasında, regresyon ve varyans analizlerinde ve grafiklerin oluşturulmasında kullanılmıştır.

Farmasötik nanoteknoloji, kontrollü salım ve hedeflendirme gibi yenilikleri sayesinde terapötik etkinliğin artırılması, yan etkilerin azaltılması ve ilaç uygulama sıklığının azaltılması gibi önemli avantajlar sunmaktadır ve günümüzde modern

bilimin ilgi odaklarından birisidir. Nanopartiküller ilaçların dokulardaki dağılımını değiştirebildiğinden ilaçların farmakokinetik özelliklerini iyileştirebilmekte ve yan etkileri azaltabilmektedir. Buna ek olarak, nanopartiküller, küçük partikül boyutlarının bir fonksiyonu olarak tümör dokularının bir özelliği olan Artmış Geçirgenlik ve Alıkonma (*Enhanced Permeation and Retention*, EPR) etkisi dolayısıyla bu dokularda toplanabilmekte ve pasif olarak hedeflendirilebilmektedirler. Sıralanan tüm bu özelliklerinden ötürü nanopartiküller antikanser ilaçların taşınması için uygun sistemler olarak görülmektedir.

Paklitaksel katı tümörlerin tedavisinde başarılı bir antikanser ilaçtır ve metastatik over, meme ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde kullanımı FDA tarafından onaylanmıştır. Bu çalışmada, sudaki düşük çözünürlüğü ve literatürde çeşitli ilaç taşıyıcı sistemlerdeki fizikokimyasal özelliklerinin oldukça detaylı açıklanmış olması nedeniyle model etkin madde olarak paklitaksel seçilmiştir.

Sunulan bu tez çalışmasının amacı paklitaksel yüklü poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) nanopartikülleri geliştirmek, geliştirilen paklitaksel nanopartiküllerinin kritik kalite özellikleri olan partikül büyüklüğü, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliği üzerine formülasyon ve proses parametrelerinin etkisini Plackett-Burman ve Box-Behnken istatistiksel deney tasarımları kullanarak QbD konseptinde değerlendirmek ve hazırlanan nanopartiküllerin fiziksel ve kimyasal karakterizasyonunu yapmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kalite Tasarımı

QbD bir ürünün tasarım aşamasından ticarileştirildiği aşamaya kadar, ürünün tüm yaşam döngüsünü kapsayacak şekilde geliştirilmesini hedefleyen bir tasarım konseptidir ve FDA tarafından başlatılan bir girişimdir (1). Beşeri İlaçların Ruhsatlandırılmaları için Teknik Gerekliliklerin Uyumuna Üzerine Uluslararası Konferans (*The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*, ICH), QbD'yi aşağıdaki şekilde tanımlamaktadır (çeviri) (2): “*QbD önceden belirlenmiş hedeflerle başlayan ve ürün ile prosesi ve proses kontrolünü anlamayı vurgulayan, güvenilir bilime ve kalite risk yönetimine dayalı sistematik bir farmasötik geliştirme yaklaşımıdır*”

ICH'e göre (2) QbD konseptinde bir farmasötik geliştirme çalışmasının aşağıdaki bileşenleri içermesi gereklidir:

- Hedef ürün kalite profilinin belirlenmesi (*Quality Target Product Profile*, QTPP): Hedef ürün kalite profili ilaç ürününün güvenlik ve etkinlik özelliklerini içine alacak şekilde hedeflenen ürün kalitesinin bir özetidir.
- Kritik kalite özelliklerinin belirlenmesi (*Critical Quality Attributes*, CQAs): Kritik kalite özellikleri bir ilaç ürününün performansını belirlemek amacıyla belirli sınırlar içerisinde olması gereken ürüne ilişkin fiziksel, kimyasal, biyolojik ve mikrobiyolojik özelliklerdir. Kritik kalite özellikleri genellikle hedef ürün kalite profilinden türetilir.
- Hedef ürün kalite profilini karşılayabilecek bir üretim yönteminin ve formülasyonun belirlenmesi: Ön deneyler, araştırmacıların bilgi birikimi ve literatürde yer alan bilgiler derlenerek hedeflenen ürün özelliklerini taşıyacağı öngörülen bir formülasyon ve üretim yöntemi belirlenir.
- Kritik materyal özellikleri (*Critical Material Attributes*, CMAs) ile kritik proses parametrelerinin (*Critical Process Parameters*, CPPs) belirlenmesi ve kritik kalite özelliklerine risk yaklaşımı ile bağlanması: Bu basamakta, risk değerlendirme yaklaşımıyla kritik materyal özellikleri ve kritik proses

parametreleri belirlenir. Başlangıç aşamasında bu parametrelerin sayısı oldukça yüksek olabileceğinden öncelikle risk faktörlerinin belirlenmesi çalışmaları ve bu çalışmaları takiben istatistiksel deney tasarımları ile risk faktörlerinin sayısı basamaklı olarak azaltılabilir. Daha düşük sayıdaki risk faktörü ileri deney tasarımları ile değerlendirilip formülasyon ve prosesin daha net bir şekilde anlaşılması sağlanabilir.

- Tasarım aralığının kurulması (*Design Space*): Tasarım aralığı ürünün performansını etkilediği gösterilen değişkenlerin ve bu değişkenlerin etkileşimlerinin çok yönlü bir kombinasyonudur (3). Bu bağlamda, tasarım aralığının kritik materyal özellikleri ve kritik proses parametrelerinin kritik kalite özellikleri ile ilişkisi olduğu söylenebilir.
- Materyallerden veya prostesten kaynaklanan değişkenliğin kontrol edilebilmesi için bir kontrol stratejisinin belirlenmesi: Bu aşamada geliştirilen formülasyonun bitmiş ürün özellikleri ve üretim yöntemindeki ara basamaklar ile bu basamaklarda elde edilen yarı ürünlerin karakterizasyonu yapılarak elde edilen sonuçların kritik kalite özellikleri ile uyumu araştırılır.

QbD ürünün ve prosesin ürün geliştirme süreci içerisinde ve ürünün bütün yaşam döngüsü boyunca anlaşılmasını vurgulayan yeni bir paradigmadır. FDA tarafından yayımlanan proses analitik teknoloji (*Process Analytical Technology, PAT*) kılavuzunu (1) takiben bir çok çalışma yayınlanmıştır.

Shah ve diğ., (4) kendiliğinden emülsifiye olan ilaç taşıyıcı sistemleri (*self-nano-emulsified drug delivery systems, SNEDDs*) ultrasonik rezonatör teknolojisi kullanarak QbD yaklaşımıyla karakterize etmiştir ve bu teknolojinin nanoemülsiyonların formülasyon parametrelerinin fiziksel özellikleri üzerine etkisini değerlendirmedeki önemini göstermiştir. Benzer bir çalışmada Zidan ve diğ., (5) siklosporin A içeren SNEDD sistemlerindeki değişkenliği QbD yöntemiyle açıklamıştır ve nano-damlacık boyutlarının bu sistemlerin değişkenliği üzerindeki etkisini açıklamıştır. Xie ve diğ., (6) formülasyon bileşenlerinin ve test parametrelerinin farmasötik tozların segregasyon sonuçlarına etkisini QbD prensipleri ile değerlendirmiştir ve toz karışımlarının kritik fiziksel parametrelerinin segregasyon eğilimine etkisini göstermiştir. Verma ve diğ., (7) bir nanosüspansiyon

üretim yöntemini anlamak ve bir tasarım aralığı elde etmek amacıyla QbD konsepti uygulamıştır. Wu ve diğ., (8,9) toz karıştırma kinetiklerini, karıştırma işleminin son noktasının tayini ve toz karışımlarının tekdüzeliğini incelemek için QbD-PAT yaklaşımı uygulamıştır ve kantitatif kemometrik yöntemlerin karıştırma işlemi için gerçek zamanlı serbest bırakmadaki etkisini göstermiştir. Bir diğer çalışmada, Wu ve Khan (10) bir farmasötik beraber çöktürme işlemini gerçek zamanlı izlemek için QbD-PAT sistemini kullanmıştır. Mockus ve diğ., (11) liyofilize sodyum etakrinat parenteral formülasyonu geliştirmek ve formülasyon ile proses parametrelerinin etkilerini inceleyebilmek için QbD prensiplerinden faydalanmıştır ve pH, etkin madde konsantrasyonu ve tampon molaritesi ile bir tasarım aralığı elde etmiştir. Aksu ve diğ., (12,13) yapay zeka teknikleri kullanarak direkt basım ve yaş granülasyon ile hazırlanan ramipril tabletlerin kritik kalite özelliklerini kontrol etmiştir. Xu ve diğ., (14) dondurma-çözme yöntemiyle hazırlanan süperoksit dismutaz içeren lipozomlarda D-optimal istatistik deney tasarımını kullanmış ve formülasyon bileşenlerinin matematiksel ilişkisini ortaya koymuştur. Bir başka çalışmada, Xu ve diğ., (15) Plackett-Burman ve merkezi kompozit deney tasarımlarını ardışık olarak kullanarak hidrofilik bir etkin madde içeren lipozom formülasyonları üzerinde QbD prensiplerini uygulamıştır. Awotwe-Otoo ve diğ., (16) kromatografik yöntemlerin geliştirilmesi amacıyla QbD yaklaşımını değerlendirmiştir ve proteinlerin kromatografik analizlerinde QbD yaklaşımının etkin olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Adam ve diğ., (17) istatistiksel yöntemlerin ve kompleks bilgisayar sistemlerinin bir kombinasyonu olan *Discrete Element Method* simülasyonunu kullanarak bir karıştırma işlemi için tasarım aralığı elde etmiştir.

Literatürdeki çalışmalardan da görüleceği üzere QbD çalışmalarının temelini ürünün ve prosesin bilimsel olarak anlaşılması, dolayısıyla istatistiksel deney tasarımları oluşturmaktadır.

2.2. Deney Tasarımı

Konvansiyonel deney tasarımlarının pek çok dezavantajı vardır. Her bir deneyde bir faktörü değiştirip diğer faktörleri sabit tutmak, özellikle değişken sayısı fazla ise, çok sayıda deney yapılmasına neden olmaktadır. Ek olarak, konvansiyonel

tasarımlar ile faktörlerin etkileşim etkilerini incelemek mümkün değildir. İstatistiksel deney tasarımları konvansiyonel yaklaşıma göre daha az deney sayısı ile daha doğru sonuçlar elde edilmesini sağlamaktadır. Ayrıca, verilerin ekstrapolasyonu ve grafiklenebilmesi sayesinde deney tasarımı ile ürün ve prosesin optimizasyonu mümkündür (18).

Literatürde, deney sayısının azaltılması ve daha kullanışlı veri elde edilmesini sağlayabilecek çok sayıda deney tasarımı tanımlanmıştır. Bir deney tasarımında amaç eğer çok sayıda değişkeni “etkili” ve “etkisiz” şeklinde sınıflandırmak ise Plackett-Burman gibi birinci dereceden tasarımlar tercih edilebilir. Ancak amaç bir cevap değişkenini matematiksel olarak kestirimlemek veya bir prosesi optimize etmek ise Box-Behnken tasarımı gibi ikinci dereceden modellerin tercih edilmesi gereklidir (19,20).

2.2.1. Plackett-Burman Deney Tasarımı

Plackett-Burman deney tasarımı bağımsız değişkenlerin anlamlılık derecelerine göre elenmesini sağlayan etkili ve sık kullanılan bir deney tasarımıdır. Bu tasarımda toplam deney sayısı dördün katı olmakla birlikte ikinin kuvveti olmayan bir sayıdır (ör; 12, 20, 28, ...) ve incelenen maksimum faktör sayısı toplam deney sayısından bir azdır (11, 19, 27, ...) (Tablo 2.1). Sadece faktörlerin ana etkileri değerlendirildiğinde Plackett-Burman deney tasarımı son derece etkin bir yaklaşımdır. Ancak ana etkenler ile iki faktör etkileşmelerinin etkisi üst üste geçtiğinden (*counfound*) iki faktör etkileşmelerinin ihmal edilmesi gerekmektedir. Dolayısıyla bu tasarım genellikle faktörlerin etkili/etkisiz şeklinde sınıflandırıldığı başlangıç aşamalarındaki çalışmalarda tercih edilmektedir. Bu çalışmayı takiben belirlenen kritik faktörler daha ileri deney tasarımlarına dahil edilir. Plackett-Burman tasarımı “doğru” bir tasarım olarak nitelendirilir çünkü tüm serbestlik dereceleri ana etkiler tarafından kullanılmaktadır (20).

Tablo 2.1. 11 faktörlü ve 12 deneyli bir Plackett-Burman tasarım matrisi. Pozitif değerler faktörlerin yüksek düzeyini, negatif değerler ise faktörlerin düşük düzeylerini göstermektedir.

Deney	Faktörler										
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	X_{10}	X_{11}
1	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+
2	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-
3	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+
4	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+
5	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+
6	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
7	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
8	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-
9	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+
10	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
11	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

İki düzeyli tam faktöriyel tasarımlarda çok sayıda faktör söz konusu olduğunda deney sayısı son derece fazladır (2^k ; k faktör sayısıdır). Dolayısıyla, k sayıda faktörün $k + 1$ sayıda deney ile incelenebildiği Plackett-Burman gibi iki düzeyli fraksiyonel faktöriyel tasarımlar kullanışlı olabilmektedir. Bu şekilde harcanan zaman ve deney materyallerinde anlamlı azalmalar sözkonusu olur.

Plackett-Burman deney tasarımı Hadamard matrisleri baz alınarak düzenlenmiştir ve veriler birinci dereceden polinomial model ile açıklanır (Formül 2.1) (18):

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i \quad (2.1)$$

Model açık ifadesi aşağıdaki şekildedir (Formül 2.2):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \dots + \beta_i X_i \quad (2.2)$$

Burada, Y cevap değişkenini, X_1-X_i faktörleri, β_0 sabiti ve $\beta_1-\beta_i$ faktörlerin katsayılarını göstermektedir (21).

İki düzeyli deney tasarımlarında bağımsız değişkenlerin düzeylerini belirlemek çok önemli bir noktadır. Eğer düşük ve yüksek düzey arasındaki aralık çok dar ise aslında anlamlı bir faktör anlamsız olarak değerlendirilebilir veya tam tersi bir durumda, iki düzey arasındaki aralık çok geniş ise normal şartlar altında anlamsız bir faktör anlamlı olarak değerlendirilebilir ve diğer faktörlerin etkilerini maskeleyebilir (22).

Literatürde Plackett-Burman deney tasarımının kullanıldığı çok sayıda çalışma bulunmaktadır:

Khan ve diğ., (21) yedi faktörlü, on iki deneyli bir Plackett-Burman tasarımı kullanarak çeşitli yardımcı maddeler ve proses parametrelerinin ana etkilerini incelemişler ve X-Stat[®] yazılımını kullanmışlardır. Bu amaçla cevap değişkeni olarak kümülatif ilaç salımı belirlenmiş ve gecikme süresi ile ilacın toplam %50'sinin salındığı zaman kısıtlayıcılar olarak değerlendirilmiştir. Yapılan kantitatif analizde en anlamlı faktörler belirlenmiş ve varyans analizi ile bu faktörlerin anlamlılığı test edilmiştir.

Rahman ve diğ., (23) yaptığı bir diğer çalışmada Y/S emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemiyle hazırlanan siklosporin A içeren PLGA nanopartikülleri Plackett-Burman deney tasarımı ile incelenmiştir.

Jin ve diğ., (24) paroksetin HCl'nin matris tabletlerden salımı üzerine formülasyon bileşenlerinin etkisini yedi faktörlü, on iki deneyli bir Plackett-Burman tasarımı yardımıyla Design-Expert[®] yazılımını (Stat-Ease Inc., ABD) kullanarak çalışmışlardır. Çalışılan bağımsız değişkenlerle her bir bağımlı değişken arasındaki matematiksel ilişkinin anlaşılması için polinomial denklemler kurulmuştur. Varyans analizi sonucunda faktörlerin cevap değişkenleri üzerinde anlamlı etkilerinin olduğu görülmüştür.

Literatür örneklerinde de görüldüğü üzere deney tasarımının oluşturulmasında ve analizinde uygun yazılımların kullanılması çalışmadan elde edilecek verilerin

niteliği yönünden çok önemlidir. Bu tez çalışmasında Minitab® 16 (Minitab Inc., ABD) yazılımı deney tasarımlarının oluşturulmasında, regresyon ve varyans analizlerinde ve grafiklerin oluşturulmasında kullanılmıştır.

2.2.2. Box-Behnken Deney Tasarımı

Box-Behnken deney tasarımı bir yüzey cevap metodolojisidir ve cevap değişkenlerinin optimize edilmesi amacıyla az sayıda faktör söz konusu olduğunda tercih edilmektedir (19). Bu tasarım ikinci dereceden bir model olup deney kombinasyonları kübik modelin kenarları ve kenarların orta noktalarından oluşmaktadır (Tablo 2.2) (25).

Tablo 2.2. Üç düzeyli ve üç faktörlü bir Box-Behnken tasarım matrisi. Pozitif değerler faktörlerin yüksek düzeylerini, negatif değerler faktörlerin düşük düzeyini, sıfır değeri ise faktörler için orta düzeyi ifade etmektedir.

Deney	Faktörler		
	X_1	X_2	X_3
1	-	-	0
2	+	-	0
3	-	+	0
4	+	+	0
5	-	0	-
6	+	0	-
7	-	0	+
8	+	0	+
9	0	-	-
10	0	+	-
11	0	-	+
12	0	+	+
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

Bu tasarımda tüm faktörler üç düzey almaktadır. Her bir deneyde iki faktör uç değer alırken (düşük veya yüksek) bir faktör her zaman orta düzey almaktadır. Böylece bu tasarım üç düzeyli bir tam faktöriyel tasarımın alt kümesi olmaktadır (26). Faktör kombinasyonlarında aynı anda tüm faktörler uç değerler almadığı için deneylerin fiziksel olarak yapılması açısından Box-Behnken deney tasarımı literatürde tanımlanmış diğer tasarımlara göre avantajlıdır.

Box-Behnken deney tasarımında deney sayısı (N) aşağıdaki şekilde hesaplanır (Formül 2.3) (27):

$$N = 2k(k - 1) + C_0 \quad (2.3)$$

Burada k faktör sayısını ve C_0 merkez nokta sayısını göstermektedir. Böylece, üç faktörlü ve üç merkez noktalı bir deney tasarımında on beş deney sayısı söz konusu olmaktadır. Faktör sayısının artması ile deney sayısı da artmaktadır. Literatürde Box-Behnken deney tasarımının kullanıldığı çok sayıda çalışma bulunmaktadır (4,16,25,28).

2.3. Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler

Farmasötik nanoteknoloji, kontrollü salım ve hedeflendirme gibi yenilikleri sayesinde terapötik etkinliğin artırılması, yan etkilerin azaltılması ve ilaç uygulama sıklığının azaltılması gibi önemli avantajlar sunmaktadır ve günümüzde modern bilimin ilgi odaklarından birisidir (21).

Nanopartiküller ilaçların dokulardaki dağılımını değiştirebildiğinden ilaçların farmakokinetik özelliklerini iyileştirebilmekte ve yan etkileri azaltabilmektedir. Buna ek olarak, nanopartiküller, küçük partikül boyutlarının bir fonksiyonu olarak tümör dokularının bir özelliği olan EPR etkisi ile tümör dokusunda toplanabilmekte ve bu özelliklerinden dolayı pasif olarak hedeflendirilebilmektedirler. Sıralanan tüm bu özelliklerinden ötürü nanopartiküller antikanser ilaçların taşınması için uygun sistemler olarak görülmektedir (29).

Literatürde nanopartikül hazırlanması için bir çok yöntem tanımlanmış olup, bu yöntemler arasında en çok tercih edilenlerden birisi de Y/S emülsiyon oluşturma-

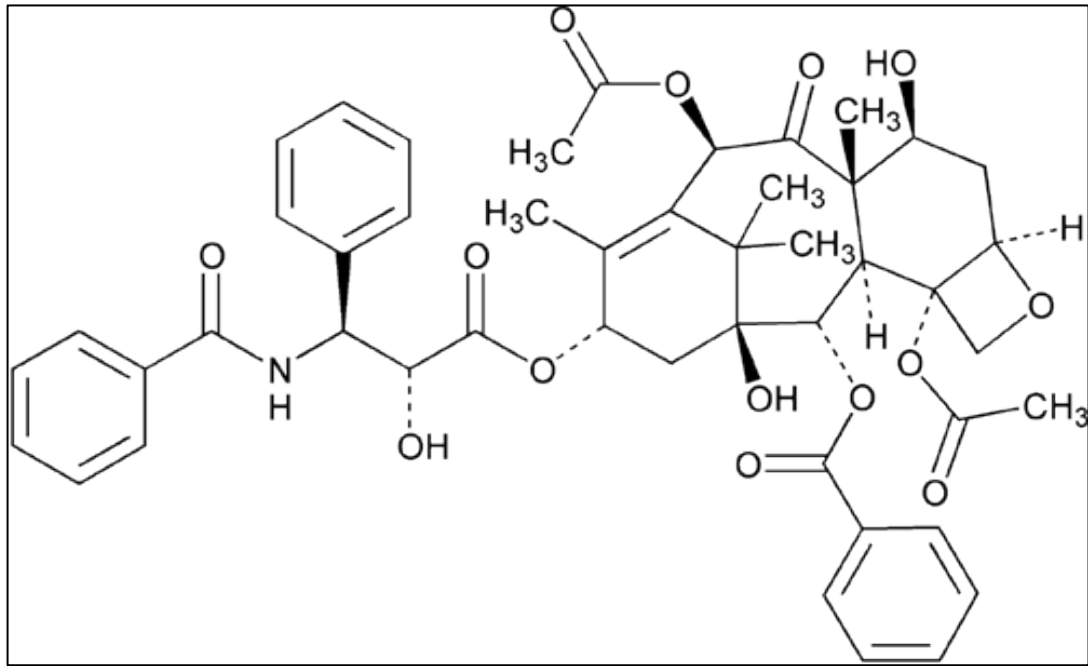
çözücü buharlaştırma yöntemidir. Bu yöntemin sıklıkla tercih edilme nedenleri arasında uygulama kolaylığı ve çoğu antikanser ilacın hidrofobik olması dolayısıyla sadece su ile karışmayan organik çözücülerde çözünmesi gösterilmektedir. Bu yöntemde ilaç ve polimer organik çözücü içerisinde çözündürülür ve elde edilen yağ fazı bir sürfaktan içeren su fazı ile emülsifiye edilir. Literatürdeki birçok çalışmada organik çözücü olarak genellikle diklorometan ve sürfaktan olarak ise polivinil alkol (PVA) tercih edilmektedir. Diklorometanın tercih edilme nedeni dış faza yavaş difüze olması nedeniyle polimerlerin hızlı bir şekilde çökmesini sağlaması ve dolayısıyla yüksek enkapsülasyon etkinliği değerlerine ulaşılmasını sağlamasıdır. Bununla beraber aseton ve etil asetat gibi su ile karışabilen yada yarı-karışabilen çözücüler emülsifikasyon işlemi esnasında su fazına hızla difüze olurlar ve bu şekilde daha küçük damlacık boyutları elde edildiğinden nanopartiküllerin de daha küçük olması mümkündür (30).

PLGA hem hidrofilik hem de hidrofobik etkin maddelerin taşınması için uygun bir polimerdir. PLGA, FDA tarafından insanlarda kullanım için onaylanmıştır ve Lupron Depot® (TAP, ABD), Nutropin Depot® (Genentech, ABD), Suprecur® MP (Aventis, Fransa), Sandostatin LAR® Depot (Novartis, İsviçre) gibi bazı PLGA bazlı formülasyonlar günümüzde global olarak klinikte kullanılmaktadır (31). Etkin maddelerin PLGA bazlı ilaç taşıyıcı sistemlerden salımı temel olarak polimerin hidrolitik parçalanmasına bağlıdır ve kopolimer oranı, polimer terminal grubu, polimer molekül ağırlığı gibi yapısal özellikleri değiştirilerek salım hızı ayarlanabilir. PLGA'nın parçalanma ürünleri toksik değildir, dolayısıyla PLGA biyoparçalanabilir ve biyouyumlu bir polimerdir (32). PVA ise vinil asetat ve vinil alkolün bir kopolimeridir ve PLGA'nın yüzeyi ile etkileşme özelliğinden ötürü taşıyıcı sistem olarak PLGA'nın tercih edildiği nanopartikül formülasyonlarında sıklıkla kullanılmaktadır (30).

2.4. Paklitaksel

Paklitaksel katı tümörlerin tedavisinde başarılı bir antikanser ilaçtır ve metastatik over, meme ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde kullanımı FDA tarafından onaylanmıştır. Paklitaksel bir diterpenoit psödoalkaloittir ve *Taxus brevifolia* bitkisinin kabuklarından izole edilmiştir. Paklitakselin moleküler formülü

$C_{47}H_{51}NO_{14}$ şeklindedir (33) (Şekil 2.1). Paklitakselin sudaki çözünürlüğü çok düşüktür ($\log P = 3,96$) ve intestinal permeabilitesi de düşük olduğundan biyofarmasötik sınıflandırma sistemine göre Sınıf 4 ilaç olarak kabul edilmektedir. Yüksek molekül ağırlığına sahip paklitaksel (853,9 Da), aynı zamanda bir P-glikoprotein substratıdır (34) ve metabolize edici enzimlere yüksek afinite gösterir. Sonuç olarak, paklitaksel oral olarak uygulandığında %10'dan daha düşük bir biyoyararlanım göstermektedir (35).



Şekil 2.1. Paklitakselin kimyasal yapısı (36).

2.4.1. Onaylanmış ve Araştırma Aşamasındaki Ürünler

Taxol®

Taxol® Bristol-Myers Squibb (New York, ABD) firması tarafından geliştirilen bir ilaç ürünüdür. Paklitaksel, sudaki zayıf çözünürlüğünden dolayı çözünürlüğünü arttırmak ve parenteral uygulamayı mümkün kılmak için Cremophor® EL (polioksietilen kastor yağı) ve etanol karışımı (1:1) içerisindeki 6 mg/ml konsantrasyondaki çözeltisi ile formüle edilmiştir. Bununla beraber, Cremophor® EL hipersensitivite, nefrotoksisite ve nörotoksisite gibi ciddi yan etkiler oluşturabilmekte ve endotelial fonksiyonlarda neden olduğu değişikliklerden dolayı vazodilatasyon, nefes almada zorluk, letarji ve hipotansiyon riski yaratmaktadır (37). Ayrıca,

Cremophor[®] EL ile intravenöz uygulama kitlerinde sıklıkla kullanılan polivinil klorür (PVC) arasında kimyasal geçimsizlik olduğu da literatürde bildirilmiştir (38).

Abraxane[®]

Abraxane[®] Abraxis BioSciences (Los Angeles, ABD) tarafından geliştirilmiş bir nanopartikül formülasyonudur ve bu formülasyonda paklitaksel albumine bağlanarak taşıyıcı sistem elde edilmiştir. Bu sistem 2005 yılında FDA tarafından tekrarlayan metastatik meme kanseri tedavisi için onaylanmıştır (39).

Nanoxel[™]

Nanoxel[™] (Dabur Pharma, Ghaziabad, Hindistan) henüz araştırma aşamasında olan ve Faz III klinik çalışmaları devam eden bir ilaç taşıyıcı sistemdir. pH duyarlı tümör hedeflendirme mekanizması ile tasarlanan bu sistemin paklitakselin etkinliğini ve güvenliğini arttırdığı iddia edilmektedir (40).

Nanotax[®]

Nanotax[®] (CritiTech, Inc., Lawrence, ABD) paklitakselin su içerisindeki bir nanokristal süspansiyonudur ve over ile pankreatik tümörlerin tedavisi için tasarlanmıştır. Formülasyonun Faz I klinik çalışmaları 2008 yılında başlamıştır ve halen devam etmektedir (40).

Klinik çalışmaları devam eden lipozomal paklitaksel sistemleri de bulunmaktadır (Faz IV, Shveong Luye Pharmaceutical Co., Ltd., Çin; Faz I, Insys Therapeutics Inc., ABD) (40).

2.4.2. Paklitaksel ile Yapılan İlaç Taşıyıcı Sistem Çalışmaları

Literatürde paklitaksel ve PLGA kullanılarak yapılan bir çok çalışma vardır.

Danhier ve diğ., (41) PLGA-polietilen glikol bazlı nanopartiküler geliştirmiş ve Taxol[®] ile kıyaslandığında daha düşük IC₅₀ değerlerini hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak elde etmişlerdir. Ek olarak, Danhier ve diğ., (42) yayınladığı başka bir çalışmada ilk çalışmada geliştirilen formülasyonların tümöre spesifik olması

sağlanmıştır. Heslinga ve diğ., (43) küresel olmayan paklitaksel yüklü PLGA nanopartikülleri geliştirmiş ve bu şekliyle biyolojik membranlardan geçişi iyileştirdiklerini iddia etmişlerdir. Jin ve diğ., (44) hipoksik insan tümör hücreleri üzerinde paklitaksel yüklü PLGA nanopartiküllerinin sitotoksik etkilerini incelemiş ve ilaç taşıyıcı sistemin serbest paklitakसे oranla daha etkin olduğunu göstermiştir. Bharwaj ve diğ., (34) paklitaksel yüklü PLGA nanopartiküllerini katyonik bir sürfaktan ile stabilize edip sıçanlardaki oral kullanım güvenliğini incelemiştir ve paklitakselin oral olarak kullanımının mümkün olduğunu iddia etmiştir. Ong ve diğ., (45) mikroporöz matrisli PLGA köpük formülasyonları geliştirmiş ve çok formulu glioblastomanın operasyon sonrası kemoterapisinde paklitakselin bu formülasyonlardan uzatılmış salımını *in vitro* ve *in vivo* olarak araştırmış ve implant sistemleri ile köpük formülasyonlarının birlikte kullanımının etkin olduğunu göstermiştir. Shavi ve diğ., (46) paklitaksel yüklü PLGA nanopartikül formülasyonlarını emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemiyle hazırlamış ve geliştirilen formülasyonların *in vivo* farmakokinetik parametrelerini konvansiyonel çözelti formülasyonu ile karşılaştırmış ve nanopartikül formülasyonunun eğri altında kalan alan değerinin çözelti formülasyonuna oranla daha yüksek olduğunu göstermiştir. Reul ve diğ., (47) çözücü değiştirme yöntemi ile lipofilik ve amfifilik dendritik polimerler kullanarak paklitaksel formülasyonları geliştirmiş ve partikül boyutları göreceli olarak küçük nanopartiküller elde etmişlerdir. Kollipara ve diğ., (35) istatistiksel deney tasarımı kullanarak kritik formülasyon ve proses parametrelerinin paklitaksel nanopartikülleri üzerine etkisini incelemiş ve oral kullanımda etkinliğini göstermiştir. Chakravarthi ve diğ., (48) intratümör ve intravenöz yollarla uygulanan paklitaksel nanopartikülleri ve mikropartikülleri geliştirmiş ve mukozaya adhezyon yetenekleri dolayısıyla mikropartikül formülasyonlarını daha etkin olarak değerlendirmişlerdir.

Sunulan bu tez çalışmasında QbD yaklaşımıyla paklitaksel nanopartikülleri geliştirilmiş ve formülasyon ile proses parametrelerinin geliştirilen nanopartiküllerin kritik kalite özellikleri üzerine etkileri risk değerlendirmesi ve istatistiksel deney tasarımları kullanılarak araştırılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Maddeler ve Ekipman

Tez çalışması kapsamında kullanılan tüm maddeler Tablo 3.1’de, ekipman ise Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Tez çalışmasında kullanılan maddeler.

Madde	Marka
Paklitaksel	Sigma-Aldrich Co., ABD
Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) (laktik asit:glikolik asit oranı 50:50, asit ve ester terminal grupları, 7-17 kDa ve 24-38 kDa molekül ağırlıkları)	Sigma-Aldrich Co., ABD
Diklorometan	Sigma-Aldrich Co., ABD
Polivinil alkol (PVA)	Sigma-Aldrich Co., ABD
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma-Aldrich Co., ABD
Polisorbat 80	Sigma-Aldrich Co., ABD
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich Co., ABD
Dimetilformamid (DMF)	Sigma-Aldrich Co., ABD
3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid (MTT)	Sigma-Aldrich Co., ABD
Metanol	Sigma-Aldrich Co., ABD
Formik asit	Sigma-Aldrich Co., ABD
Fosfat tampon tuzu (PBS) tabletleri	Sigma-Aldrich Co., ABD
Fetal bovin serumu (FBS)	BioChrom AG, Almanya
Penisilin-Streptomisin	BioChrom AG, Almanya
L-Glutamin	BioChrom AG, Almanya
Dulbecco’s modifiye Eagle’s ortamı (DMEM)	BioChrom AG, Almanya

Kullanılan tüm kimyasallar ekstra saf veya kromatografi kalitesindedir.

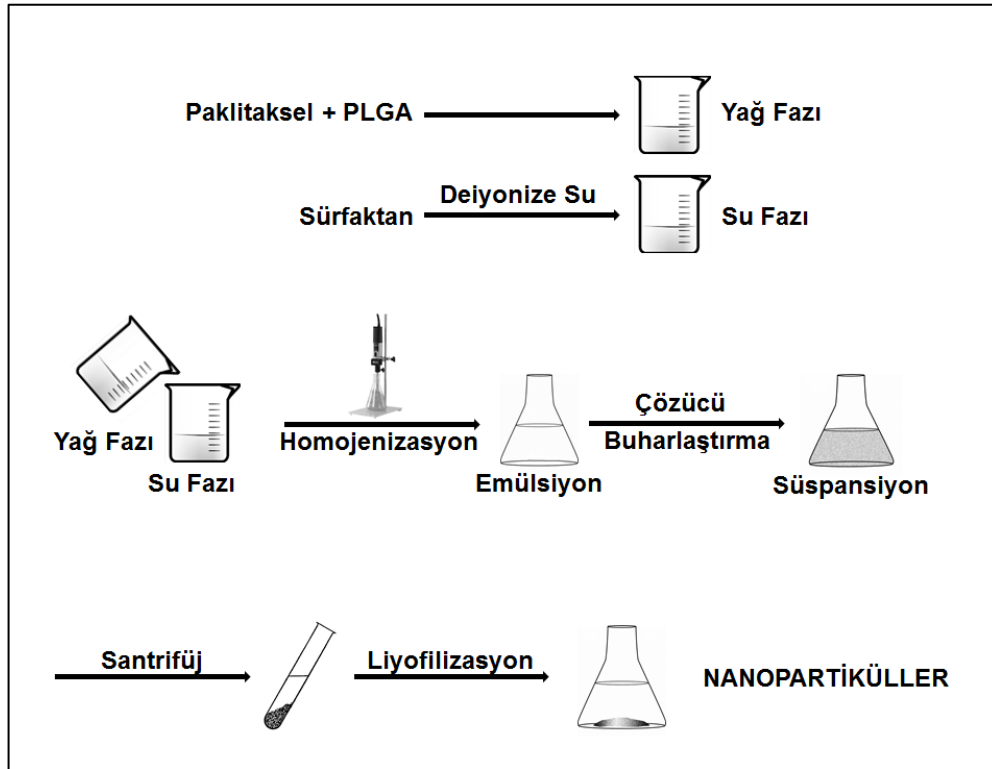
Tablo 3.2. Tez çalışmasında kullanılan ekipman.

Ekipman	Marka	Kurum*
Manyetik karıştırıcı	Variomag, Almanya	
Homojenizatör	IKA Ultra Turrax, Almanya	
Evaporatör	IKA Rotary Evaporator, Almanya	
Santrifüj	Hermle Z 383 K, Almanya	
Liyofilizatör	Heto PowerDry PL3000, Danimarka	
İstatistik yazılımı	Minitab® 16, ABD	
Ultra yüksek basınçlı sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (UPLC-MS)	Waters Acquity, ABD	Drogsan İlaçları San. ve Tic. A.Ş., Ankara
Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektrometresi	Shimadzu IRPrestige-21, Japonya	Drogsan İlaçları San. ve Tic. A.Ş., Ankara
X-Işını Difraktometresi	Miniflex System, Japonya	ODTÜ Fen Fakültesi Fizik Bölümü, Ankara
Termogravimetre (TGA)	Perkin-Elmer Pyris 1, ABD	Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü, Ankara
Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC)	TA Instruments Tzero™ Q200, ABD	Drogsan İlaçları San. ve Tic. A.Ş., Ankara
Taramalı elektron mikroskobu (SEM)	FEI, ABD	ODTÜ Merkez Laboratuvarı, Ankara
Atomik kuvvet mikroskobu (AFM)	Veeco MultiMode V, ABD	ODTÜ Merkez Laboratuvarı, Ankara
Partikül büyüklüğü dağılımı ve zeta potansiyeli ölçüm cihazı	Malvern Instruments Zetasizer Nano ZS, İngiltere	
Yatay çalkalayıcılı su banyosu	Memmert, Almanya	
Gaz kromatografisi	Agilent 7697A Headspace, ABD	Drogsan İlaçları San. ve Tic. A.Ş., Ankara

*Kurumu belirtilmemiş ekipman Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'nda bulunmaktadır.

3.2. Paklitaksel Nanopartiküllerinin Hazırlanması

Nanopartiküller Y/S emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemiyle hazırlanmıştır (49). Paklitaksel ve PLGA 5 ml diklorometanda çözündürülmüş ve elde edilen yağ fazı sürfaktan içeren 40 ml hacimdeki su fazı üzerine dökülmüş ve hemen homojenize edilmiştir. Homojenizasyondan sonra diklorometan vakum altında uçurulmuştur. Nanopartikülleri içeren süspansiyon oda sıcaklığında, 13500 devir/dk hızda, 30 dk boyunca santrifüj edilmiş (Z 383 K, Hermle, Almanya) ve süpernatant fazı ayrılmıştır. Yüklenmemiş paklitaksel ve sürfaktan kalıntılarını uzaklaştırmak için elde edilen pellet deiyonize su ile iki defa yıkanmıştır. Santrifüj ile toplanan nanopartiküller 1 ml deiyonize suda disperse edilip, 24 saat boyunca, -60 °C sıcaklıkta, 0,04 hPa basınç altında liyofilize edilmiştir (Heto PowerDry PL3000, Danimarka). Liyofilize nanopartiküller daha sonra kullanılmak amacıyla desikatör içerisinde, 4 °C sıcaklıkta saklanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Paklitaksel nanopartiküllerinin üretim akış şeması.

3.3. Risk Faktörlerinin Belirlenmesi: Ishikawa Diyagramı

Paklitaksel nanopartiküllerinin kritik kalite özelliklerini etkileyebilecek formülasyon ve proses parametrelerini belirlemek ve faktörlerin potansiyel etkilerini değerlendirmek amacıyla Ishikawa diyagramı oluşturulmuştur (50). Bilimsel bilgi birikimine dayanarak ortalama partikül büyüklüğü, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliği parametrelerinin paklitaksel nanopartiküllerinin terapötik etkinliğini etkileyeceği düşünüldüğünden bu parametreler kritik kalite özellikleri olarak kabul edilmiştir. Oluşturulan Ishikawa diyagramı üzerinde yapılan risk değerlendirilmesi sonucunda belirlenen parametreler ileri çalışmalara dahil edilmiştir.

3.4. Risk Analizi: Plackett-Burman Deney Tasarımı

Paklitaksel nanopartiküllerinin kritik kalite özelliklerini etkileyebileceği öngörülen formülasyon ve proses parametrelerinin anlamlılığının istatistiksel olarak değerlendirilmesi için Plackett-Burman deney tasarımı uygulanmıştır (23). Oniki deney ile sekiz faktör incelenmiştir. Faktörlerin düzeyleri ön deneylerin sonuçları ve literatür bilgisi esas alınarak belirlenmiştir. Formülasyonların hazırlanması aşamasında meydana gelen bazı teknik problemlerden dolayı (aşırı köpürme, düşük verim vb.) organik çözücü tipi ve yağ-su fazı hacimleri oranı gibi bazı potansiyel risk faktörleri deney tasarımına dahil edilmemiştir. Seçilen faktörler ve düzeyleri Tablo 3.3'te gösterilmiştir.

Tablo 3.3. Plackett-Burman deney tasarımında kullanılan faktörler ve düzeyleri.

Faktör	Düzy	
	Düşük	Yüksek
X_1 : Paklitaksel miktarı (mg)	1	2
X_2 : PLGA miktarı (mg)	20	40
X_3 : PLGA molekül ağırlığı (kDa)	7-17	24-38
X_4 : PLGA terminal grubu	Asit	Ester
X_5 : Sürfaktan tipi	SDS	PVA
X_6 : Sürfaktan konsantrasyonu (%)	1	3
X_7 : Homojenizasyon hızı (devir/dk)	11000	16000
X_8 : Homojenizasyon süresi (dk)	1	3

Deney matrisinin oluşturulması, randomizasyonu ve istatistiksel analizler için Minitab[®] 16 (Minitab Inc., ABD) yazılımı kullanılmıştır (Tablo 3.4). Birinci dereceden polinomial modelin oluşturulması için çoklu doğrusal regresyon analizleri ve varyans analizi uygulanmıştır (Formül 3.1):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \dots + \beta_8 X_8 \quad (3.1)$$

Bu eşitlikte Y cevap değişkenini, X_1 - X_8 faktörleri, β_0 sabiti ve β_1 - β_8 ise faktörlerin katsayılarını göstermektedir.

Tablo 3.4. Plackett-Burman tasarımı deney matrisi.

Formülasyon kodu	X_1 (mg)	X_2 (mg)	X_3 (kDa)	X_4	X_5	X_6 (%)	X_7 (devir/dk)	X_8 (dk)
PBD01	2	20	24-38	Ester	SDS	1	16000	3
PBD02	2	40	7-17	Asit	SDS	1	11000	3
PBD03	1	40	24-38	Ester	PVA	1	11000	1
PBD04	2	20	24-38	Asit	SDS	3	11000	1
PBD05	2	40	7-17	Asit	PVA	1	16000	1
PBD06	2	40	24-38	Ester	PVA	3	11000	3
PBD07	1	40	24-38	Asit	SDS	3	16000	1
PBD08	1	20	24-38	Asit	PVA	1	16000	3
PBD09	1	20	7-17	Asit	PVA	3	11000	3
PBD10	2	20	7-17	Ester	PVA	3	16000	1
PBD11	1	40	7-17	Ester	SDS	3	16000	3
PBD12	1	20	7-17	Ester	SDS	1	11000	1

Bütün formülasyonlar üçer defa hazırlanmıştır. Cevap değişkenleri ortalama partikül büyüklüğü (Y_1), zeta potansiyeli (Y_2) ve enkapsülasyon etkinliğidir (Y_3).

3.5. Paklitaksel Nanopartiküllerinin Optimizasyonu: Box-Behnken Deney Tasarımı

Plackett-Burman deney tasarımını ve istatistiksel olarak anlamlı bulunan kritik formülasyon ve proses parametrelerinin belirlenmesini takiben paklitaksel nanopartiküllerinin optimizasyonu için üç düzeyli-üç faktörlü bir yüzey cevap yöntemi olan Box-Behnken deney tasarımı uygulanmıştır. Düşük ve yüksek düzeyler Plackett-Burman deney tasarımından doğrudan alınmıştır ve üçüncü düzey olarak düşük ve yüksek düzeylerin ortasındaki değer kabul edilmiştir (Tablo 3.5).

Tablo 3.5. Box-Behnken deney tasarımında kullanılan faktörler ve düzeyleri.

Faktör	Düzye		
	Düşük	Orta	Yüksek
X_1 : PLGA miktarı (mg)	20	30	40
X_2 : Sürfaktan konsantrasyonu (%)	1	2	3
X_3 : Homojenizasyon hızı (devir/dk)	11000	13500	16000

Plackett-Burman deney tasarımı kapsamında değerlendirilen ancak etkileri istatistiksel olarak anlamlı bulunmayan veya belirli bir düzeyde kullanılmaları zorunluluğu ortaya çıkan beş faktörün Box-Behnken deney tasarımında kullanılan sabit düzeyleri Tablo 3.6'da gösterilmiştir.

Tablo 3.6. Box-Behnken deney tasarımında sabit düzeyde kullanılan formülasyon ve proses parametreleri.

Formülasyon ve proses parametreleri	Düzye
Paklitaksel miktarı (mg)	2
PLGA molekül ağırlığı (kDa)	7-17
PLGA terminal grup tipi	Asit
Sürfaktan tipi	PVA
Homojenizasyon süresi (dk)	3

Deney matrisinin oluşturulması, deneylerin randomize edilmesi ve istatistiksel analizler için Minitab® 16 (Minitab Inc., ABD) yazılımı kullanılmıştır (Tablo 3.7). Bütün formülasyonlar üçer defa hazırlanmıştır.

Tablo 3.7. Box-Behnken tasarımı deney matrisi.

Formülasyon kodu	X_1 (mg)	X_2 (devir/dk)	X_3 (%)
BBD01	20	11000	2
BBD02	40	11000	2
BBD03	20	16000	2
BBD04	40	16000	2
BBD05	20	13500	1
BBD06	40	13500	1
BBD07	20	13500	3
BBD08	40	13500	3
BBD09	30	11000	1
BBD10	30	16000	1
BBD11	30	11000	3
BBD12	30	16000	3
BBD13	30	13500	2
BBD14	30	13500	2
BBD15	30	13500	2

Her bir cevap değişkeni için uygulanan çoklu regresyon analizinin ardından kurulan ikinci dereceden polinomial model aşağıdaki şekildedir (Formül 3.2):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 \quad (3.2)$$

Eşitlikte Y cevap değişkenini, X_1 - X_3 faktörlerin ana etkilerini, $X_1 X_2$, $X_1 X_3$, $X_2 X_3$ faktörlerin etkileşim etkilerini, X_1^1 , X_2^2 , X_3^3 faktörlerin ikinci dereceden (*quadratic*) etkilerini, β_0 sabiti ve β_1 - β_3 faktörlerin katsayılarını göstermektedir. Faktörlerin cevap değişkenleri üzerindeki etkilerinin anlamlılığının ve modelin bütününe test edilmesi için regresyon katsayılarının (β_1 - β_3) p değerleri varyans analizi ile belirlenmiştir.

Faktörlere ve cevap değişkenlerine ilişkin polinomial eşitlikler oluşturulduktan sonra geliştirilen matematiksel model kullanılarak formülasyon ve proses değişkenleri paklitaksel nanopartiküllerinin ortalama partikül büyüklüğü (Y_1),

zeta potansiyeli (Y_2) ve enkapsülasyon etkinliği (Y_3) esas alınarak optimize edilmiştir (25). Bunun için kontur ve yüzey cevap grafikleri oluşturularak bir tasarım aralığı elde edilmiştir.

Optimize edilen paklitaksel nanopartikül formülasyonu cevap değişkenlerinin kestirilen ve gözlenen değerlerinin korelasyonunu değerlendirmek ve fizikokimyasal özelliklerini inceleyebilmek amacıyla karakterize edilmiştir.

3.6. Enkapsülasyon Etkinliği ve *In Vitro* İlaç Salımı Çalışmalarında Kullanılan Analitik Yöntemin Validasyonu

Nanopartiküllere yüklenen ve *in vitro* ilaç salım çalışmalarında nanopartiküllerden salınan paklitaksel miktarının tayini amacıyla bir analitik yöntem geliştirilmiş ve valide edilmiştir (51). Yöntem detayları ve incelenen analitik yöntem parametreleri ilerleyen bölümlerde verilmiştir.

3.6.1. Kromatografik Şartlar ve Sistem

Geliştirilen analitik yöntem ultra yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (*ultra high pressure liquid chromatography*, UPLC) ile ayırım ve kütle spektroskopisi (*mass spectroscopy*, MS) ile tayin esasına dayanmaktadır. UPLC-MS cihazı dörtlü pompa sistemi, otomatik örnekleyici, termostatlı kolon kompartmanı ve tek kuadropollü kütle spektrometresinden oluşmaktadır. Verilerin işlenmesi için Empower[®] 2 yazılımı kullanılmıştır. Sabit fazı içeren kolon olarak Acquity UPLC BEH Phenyl (1,7 μ m; 100 mm x 2,1 mm) tercih edilmiştir. Hareketli fazın akış hızı izokratik şartlarda 0,5 ml/dk, enjeksiyon hacmi 1,7 μ l ve termostatlı kolon sıcaklığı 40 °C olarak ayarlanmıştır.

Analizler için elektrosprey iyonizasyon kaynağı içeren tek kuadropollü bir kütle spektrometresi kullanılmıştır ve kütle spektrometresi pozitif iyon modunda uygulanmıştır. Nebülizasyon (30 l/saat) ve kurutma (500 l/saat) gazı olarak azot tercih edilmiştir. Kaynak ve desolvasyon sıcaklıkları sırasıyla 120 °C ve 250 °C olarak ayarlanmıştır. Kapiler gerilim 3 kV, koni gerilimi 50 V ve ekstraktör gerilimi 3 V'tur. Molekül 876,0 Da (m/z) atom ağırlığında iyonlaşmaktadır.

Hareketli faz ise metanol:su:formik asitten (70:30:1) oluşmaktadır ve analizlerden önce beş dakika boyunca degaze edilmiştir.

3.6.2. Stok ve Standart Çözeltiler

Paklitakselin stok çözeltileri 1 mg paklitakselin 10 ml'lik balon jöje içerisinde DMSO ile çözündürülmesi ve hacmine tamamlanmasıyla hazırlanmıştır ($n = 3$). Standart çözeltiler ise 0,10; 0,25; 0,50; 0,75; 1,0 ve 10,0 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlar elde edilecek şekilde stok çözeltinin DMSO ile seyreltilmesinden elde edilmiştir. Hazırlanan örnekler analizlerden önce 0,22 μm politetrafloroetilen (PTFE) filtrelerden süzölmüştür.

3.6.3. Sistem Uygunluğu

Kromatografik sistemin performansını değerlendirmek için 5 $\mu\text{g/ml}$ paklitaksel standart çözeltisi kullanılarak sistem uygunluk testi yapılmıştır ($n = 6$).

3.6.4. Özgünlük

Geliştirilen analitik yöntemin analizi yapılacak maddeyi ortamda bulunan diğer maddelerden ayırt edebilme yeteneğini gösterebilmek için özgünlük testleri yapılmıştır. Bunun için DMSO'nun, DMSO içerisinde çözöndürölen plasebo nanopartiköllerin, *in vitro* salım ortamının ve paklitakselin DMSO içerisindeki 5 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyondaki çözeltisinin kromatogramları alınmış ve görsel olarak karşılaştırılmıştır.

3.6.5. Doğrusallık ve Aralık

Geliştirilen analitik yöntem ile elde edilen sonuçların paklitaksel konsantrasyonu ile korelasyonunu incelemek için 0,10-10,0 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon aralığında doğrusallık çalışmaları yapılmıştır. En küçük kareler yöntemi kullanılarak basit doğrusal regresyon analizi uygulanmış ve *t* testi ile regresyon katsayısı ve interseptin anlamlılığı test edilmiştir ($n = 3$). Enkapsölasyon etkinliği ve *in vitro* ilaç salım çalışmalarından elde edilebilecek konsantrasyon değerleri göz önünde bulundurularak geliştirilen yöntem 0,10 ile 10,0 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon aralığında valide edilmiştir.

3.6.6. Doğruluk ve Kesinlik

Geliştirilen analitik yöntemin gerçek değerlere ne derece yakın sonuç verdiğini ve elde edilen değerlerin tekrarlanabilirliğini test edebilmek için üç ayrı konsantrasyonda (0,10, 1,0 ve 10,0 µg/ml) paklitaksel standart çözeltileri üçer defa hazırlanmış ve plasebo nanopartiküller eklenerek bu örnekler analiz edilmiştir. Yöntemin günler arasındaki değişkenliğini gözlemleyebilmek için aynı prosedür üç ardışık gün boyunca tekrarlanmıştır. Doğruluk parametresi için validasyon sonuçları geri kazanım (%), kesinlik için ise bağıl standart sapma (%) olarak ifade edilmiştir.

3.6.7. Saptama ve Tayin Sınırı

Analitik yöntemin duyarlılık parametresinin değerlendirilmesi için saptama limiti (*limit of detection*, LOD) ve tayin limiti (*limit of quantitation*, LOQ) değerleri sinyal-gürültü oranı yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır.

3.7. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi

Paklitaksel ve PLGA'nın formülasyonlardaki moleküler durumlarını değerlendirmek için paklitaksel, PLGA, paklitaksel-PLGA fiziksel karışımı ve paklitaksel nanopartiküllerinin Fourier dönüşümlü kızılötesi (*Fourier transform infrared*, FTIR) spektrumları incelenmiştir. Bunun için IRPrestige-21 spektrometresi (Shimadzu, Japonya) ile 4000-750 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında, 4 cm⁻¹ çözünürlükte her bir örnek için 10 tarama yapılmıştır. Örnekler herhangi bir hazırlama işlemine tabi tutulmadan, doğrudan analiz edilmiştir.

3.8. X-Işını Difraktometrisi

Nanopartiküllere yüklenen ve/veya yüzeye adsorbe olan paklitakselin kristal veya amorf olup olmadığının anlaşılması için X-ışını difraktometresi (*X-ray diffraction*, XRD) analizleri yapılmıştır. Bunun için sürekli modda Miniflex System (Rigaku, Japonya) XRD cihazı kullanılmıştır. Paklitaksel ve paklitaksel nanopartikülleri herhangi bir örnek hazırlama prosedürüne tabi tutulmadan doğrudan analiz edilmiştir. 2θ tarama aralığı 10-90°, tarama hızı 2°/dk ve adım büyüklüğü

0,05° olarak belirlenmiştir. X-ışını kaynağı olarak Cu K α ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$) seçilmiş, gerilim 30 kV ve akım 15 mA olarak ayarlanmıştır.

3.9. Termogravimetrik Analiz

Paklitaksel ve PLGA maddelerinin parçalanmaya başlama sıcaklıklarının belirlenebilmesi için termogravimetrik analizler (TGA) Perkin-Elmer Pyris 1 (Massachusetts, ABD) cihazı kullanılarak yapılmıştır. Bunun için yaklaşık olarak 1 mg paklitaksel tartılmış ve TGA fırın sıcaklığı 25 °C'den 300 °C'ye 10 °C/dk hızla arttırılmıştır. PLGA için yaklaşık olarak 6 mg örnek tartılmış ve 25-400 °C sıcaklık aralığında çalışılmıştır. Her iki analiz için 20 ml/dk debide ve 1,5 bar basınçta azot gazı örneklerin üzerinden geçirilmiştir.

3.10. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri

Paklitaksel ve PLGA arasındaki olası fizikokimyasal geçimsizliklerin belirlenmesi ve enkapsülasyon öncesi-sonrası paklitakselin fiziksel halinin değerlendirilmesi amacıyla diferansiyel taramalı kalorimetri (*differential scanning calorimetry*, DSC) analizleri indiyum ile kalibre edilmiş Tzero™ Q200 DSC (TA Instruments, ABD) cihazı ile yapılmıştır. Bunun için 2'şer mg paklitaksel, PLGA, paklitaksel-PLGA fiziksel karışımı ve paklitaksel nanopartikülleri tartılmış ve bu örneklerin herbiri alüminyum panlara alınarak hermetik olarak kapatılmıştır. Örnek içermeyen eşdeğer bir pan referans olarak kullanılmıştır. Tüm örnekler 20 °C/dk hız ile 30-240 °C aralığında taranmıştır. 50 ml/dk debide azot gazı örneklerin üzerinden geçirilerek oksidasyon oluşumu engellenmiştir.

3.11. Taramalı Elektron Mikroskopisi

Nanopartiküllerin yüzey özelliklerinin, küreselliklerinin ve dağılımlarının incelenmesi için taramalı elektron mikroskopisi (*scanning electron microscopy*, SEM) çalışmaları Quanta 400F yüksek çözünürlüklü alan emisyonu SEM (FEI, ABD) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Yüksek vakum ortamında hızlandırma gerilimi 10 kV olarak uygulanmıştır. Analizden önce liyofilize nanopartiküller çift taraflı karbon bantlara yerleştirilmiş ve altın-palladyum alaşımı ile 3-5 nm kalınlıkta püskürterek kaplanmıştır.

3.12. Atomik Kuvvet Mikroskopisi

SEM çalışmalarına ek olarak geliştirilen nanopartiküllerin şekillerini, boyutlarını ve dağılımını değerlendirebilmek için atomik kuvvet mikroskopisi (*atomic force microscopy*, AFM) çalışmaları yapılmıştır. Görüntülemeler MultiMode V AFM (Veeco, ABD) ve AS-12 prob ile vurmali modda yapılmıştır. Nanopartiküllerin deiyonize su içerisindeki dispersiyonundan bir damla mikroskop lamına alınmış ve 24 saat boyunca kurumaya bırakıldıktan sonra görüntüleme yapılmıştır.

3.13. Partikül Büyüklüğü Dağılımı

Nanopartiküllerin hidrodinamik çapları foton korelasyon spektroskopisi esasıyla çalışan Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., İngiltere) cihazı kullanılarak 173° açıda ölçülmüştür. Bu amaçla 1 mg liyofilize nanopartikül 10 ml %0,5 (a/h) polisorbata 80 çözeltisi içinde 5 dk sonikasyon yardımıyla disperse edilmiş ve ölçümler 25 °C'de yapılmıştır. Ortalama değerler ve polidispersite indeksleri (PDI) üç tekrar üzerinden hesaplanmıştır. Veri analizleri Zetasizer 7 (Malvern Instruments Ltd., İngiltere) yazılımı ile yapılmıştır.

3.14. Yüzey Yükü

Nanopartikül dispersiyonlarının stabilitesinin önemli bir göstergesi olduğundan geliştirilen paklitaksel nanopartiküllerinin zeta potansiyelleri ölçülmüştür. Analizler için standart kapiler elektroforez tüpleri tercih edilmiş ve Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., İngiltere) cihazı kullanılmıştır. 1 mg nanopartikül deiyonize suda disperse edilmiş ve her bir örnek için zeta potansiyelleri üçer defa ölçülmüştür.

3.15. Enkapsülasyon Etkinliği

Enkapsülasyon etkinliği nanopartiküllere yüklenen paklitaksel miktarının formülasyon hazırlama aşamasında yağ fazına eklenen paklitaksel miktarına oranı olarak hesaplanmıştır (Formül 3.3). Bu oranın belirlenebilmesi için 1 mg nanopartikül 10 ml DMSO içerisinde çözündürülmüş ve 0,22 µm PTFE şırınga

filtresinden süzülerek UPLC-MS sistemine enjekte edilmiştir. Her bir analiz üç defa tekrarlanmıştır.

$$\text{Enkapsülasyon etkinliği (\%)} = \frac{\text{Nanopartiküllere yüklenen paklitaksel miktarı}}{\text{Formülasyonda kullanılan paklitaksel miktarı}} \times 100 \quad (3.3)$$

3.16. *In Vitro* İlaç Salımı

Nanopartiküllerden *in vitro* paklitaksel salımı pH 7,4 PBS ortamında UPLC-MS sistemi kullanılarak ölçülmüştür. Paklitakselin sudaki çözünürlüğü düşük olduğundan (~0,3 µg/ml) sink koşul sağlanması için %0,5 (a/h) konsantrasyonda polisorbitat 80 kullanılmıştır (52). 1 mg nanopartikül tartılarak 10 ml salım ortamı içeren polipropilen tüplere aktarılmış ve yatay çalkalayıcı ısıtıcılı su banyosunda 37 ± 0,5 °C sıcaklıkta, 100 devir/dk hızda deney gerçekleştirilmiştir. Salım çalışmalarının birinci gününde 1., 2., 4., 8. ve 24. saatlerde, takip eden günlerde ise bir hafta boyunca günlük örnekler alınmıştır. Belirlenen zaman noktalarında polipropilen tüpler 13500 devir/dk hızda, 30 dk boyunca santrifüj edilmiş; süpernatant bütün olarak alınarak 0,22 µm PTFE filtrelerden süzülmüş ve UPLC-MS sisteminde doğrudan analiz edilmiştir. Sink koşulun devamlılığını sağlayabilmek için her örnek alma işleminden sonra 10 ml taze salım ortamı tüplere eklenmiş ve ardından tüpler vortekslenerek agrege olan nanopartiküllerin tekrar disperse olması sağlanmıştır (53). Salım analizleri her bir örnek için üçer defa tekrarlanmıştır.

3.17. Çözücü Kalıntısı

Nanopartiküllerin üretim yönteminde emülsiyon oluşturma basamağında organik çözücü olarak diklorometan kullanıldığından çözücü buharlaştırma işleminin etkinliğini değerlendirebilmek için nanopartiküllerdeki diklorometan kalıntısı araştırılmıştır. Bu amaçla DB 624 kolon (30 m x 450 µm x 2,55 µm) ve alev iyonlaştırıcı dedektör (*flame ionization detector*) içeren 7697A Headspace (Agilent, ABD) gaz kromatografisi cihazı kullanılmıştır. 10 mg nanopartikül 5 ml DMSO içerisinde çözündürülmüş ve gaz kromatografisi sistemine enjekte edilmiştir. Diklorometanın DMSO içerisindeki 20 ppm (a/a) konsantrasyondaki çözeltisi referans olarak kullanılmıştır.

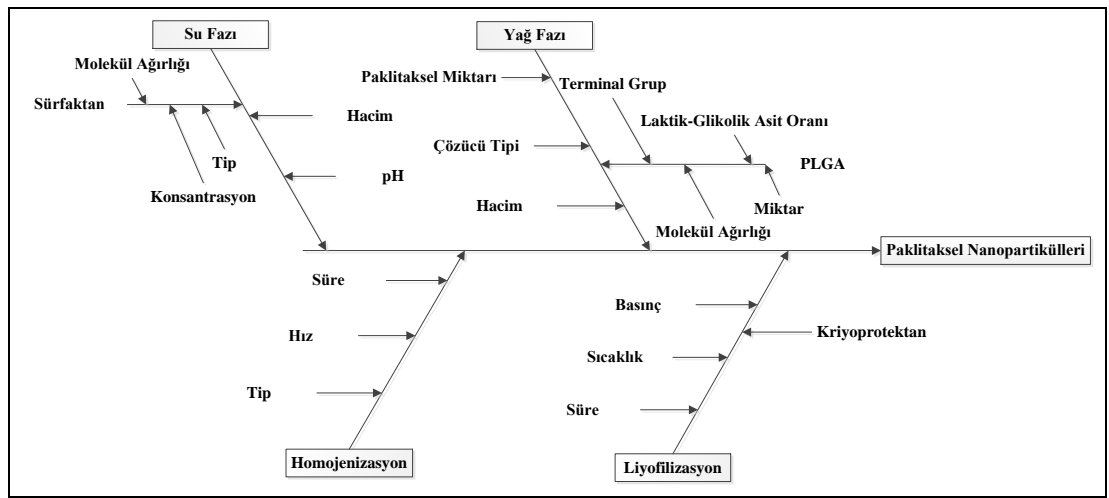
3.18. *In Vitro* Sitotoksosite

Paklitaksel nanopartiküllerinin *in vitro* sitotoksosite özellikleri insan meme karsinomu (MCF-7) hücre hattı kullanılarak incelenmiştir. Kültürü yapılan hücreler için ortam FBS, penisilin-streptomisin ve L-glutaminin sırasıyla %10 (h/h), 50 U/ml–50 µg/ml ve 2 mM konsantrasyonlar elde edilecek şekilde DMEM’e eklenmesiyle hazırlanmıştır. Nanopartiküllerin sitotoksitesi MTT yöntemiyle değerlendirilmiştir (54). Bu amaçla MCF-7 hücreleri 5×10^3 hücre/kuyucuk yoğunluğunda 96 kuyucuklu plakalara ekilmiş ve inkübatörde (37 °C, %5 CO₂) 24 saat boyunca hücrelerin tutunması için bekletilmiştir. İnkübasyondan sonra ortam uzaklaştırılmış ve kültür ortamında 100 µl paklitaksel çözeltisi (10 nM, %1 DMSO içeren), paklitaksel nanopartikülleri süspansiyonu (10 nM paklitaksel içeren) ve plasebo nanopartikül süspansiyonu kuyucuklara eklenmiştir ($n = 5$). Örnekler 48 saat inkübatörde tutulduktan sonra 25 µl MTT çözeltisi (5 mg/ml) eklenmiştir. Canlı hücrelerin sarı renkli MTT’yi koyu mavi renkli formazan kristallerine çevirmesini sağlamak için örneklerin 4 saat inkübatörde tutulmasını takiben 80 µl, %23 SDS (a/h) içeren %45 DMF (h/h) çözeltisi kuyucuklara eklenmiştir. Plakalar inkübatörde gece boyu bekletilmiş ve her bir kuyucuktaki canlı hücre sayısı 490 nm dalga boyunda bir ELISA mikroparka okuyucu ile ölçülmüştür. Örnek eklenmemiş hücreleri içeren kuyucuklar referans olarak ve kültür ortamı kör olarak kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Risk Faktörlerinin Belirlenmesi: Ishikawa Diyagramı

Paklitaksel nanopartiküllerinin kritik kalite özellikleri olarak belirlenen ortalama partikül büyüklüğü, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliği üzerine formülasyon ve proses parametrelerinin potansiyel risklerini belirleyebilmek için bir Ishikawa diyagramı oluşturulmuştur. Bu kapsamda sekiz potansiyel risk faktörü belirlenmiş ve ileri deney tasarımlarında değerlendirmeye alınmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Nanopartikül özelliklerini etkileyebilecek formülasyon ve proses değişkenlerini gösteren bir Ishikawa diyagramı.

4.2. Risk Analizi: Plackett-Burman Deney Tasarımı

Kritik formülasyon ve proses değişkenlerini saptayabilmek ve etkilerini değerlendirebilmek için sekiz faktörlü, iki düzeyli, on iki deneyli bir Plackett-Burman istatistiksel deney tasarımı uygulanmıştır. Test edilen formülasyonlar ve cevap değişkenlerine ilişkin değerler Tablo 4.1’de verilmiştir.

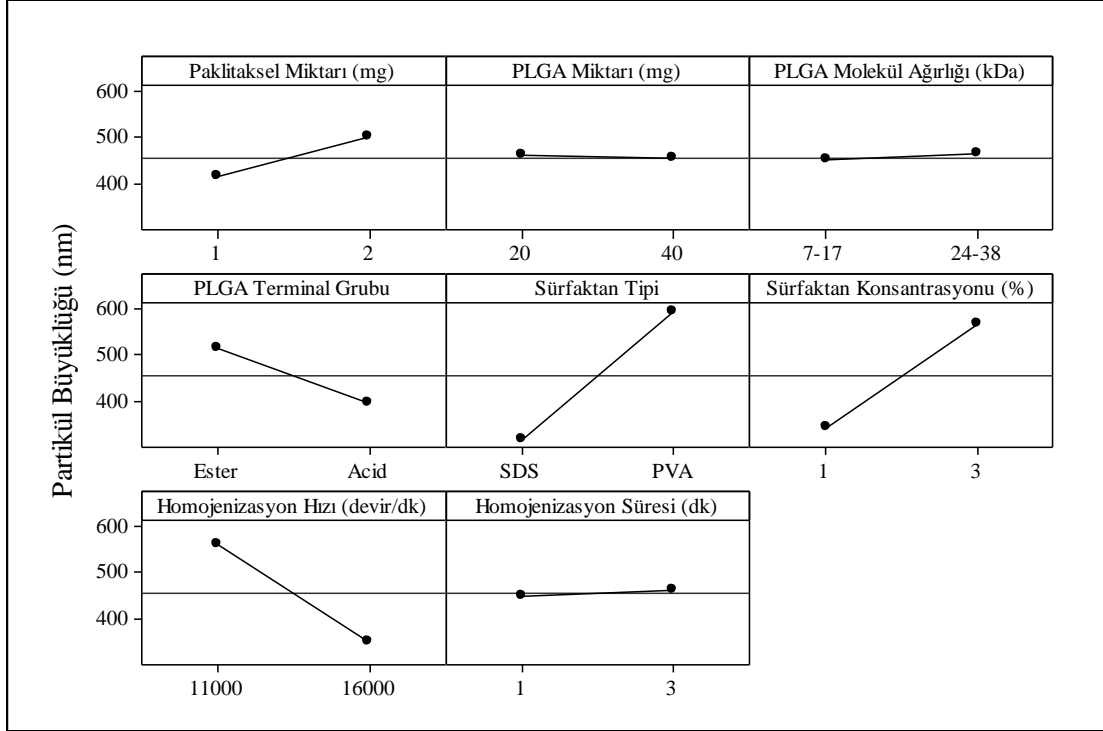
Tablo 4.1. Plackett-Burman deney tasarımı ile elde edilen bağımlı değişken değerleri.

Formülasyon kodu	Y_1 : Partikül büyüklüğü (nm)	Y_2 : Zeta potansiyeli (mV)	Y_3 : Enkapsülasyon etkinliği (%)
PBD01	245,5	-31,0	1,672
PBD02	297,0	-42,6	1,443
PBD03	552,3	-31,5	56,679
PBD04	443,2	-53,7	0,343
PBD05	340,1	-30,8	64,402
PBD06	969,3	-31,2	33,617
PBD07	297,8	-51,1	2,125
PBD08	268,7	-25,7	20,790
PBD09	736,3	-30,3	20,075
PBD10	702,3	-34,7	19,493
PBD11	260,1	-56,0	1,492
PBD12	364,8	-59,5	0,272

Partikül büyüklüğü (Y_1) sonuçları 245,5 nm'den (PBD01) 969,3 nm'ye (PBD06) kadar değişkenlik göstermiştir (Tablo 4.1) (Şekil 4.2). En anlamlı üç faktör sırasıyla sürfaktan tipi (X_5), sürfaktan konsantrasyonu (X_6) ve homojenizasyon hızı (X_7) olarak belirlenmiştir (Tablo 4.2). Partikül büyüklüğü üzerine faktörlerin etkilerini açıklayan doğrusal model aşağıdaki şekildedir (Formül 3.4):

$$Y_1 = 100,750 + 86,500X_1 - 0,358X_2 + 6,250X_3 - 59,250X_4 + 138,417X_5 + 111,750X_6 - 104,083X_7 + 6,416X_8 \quad (3.4)$$

R^2 değeri 0,9555 olarak bulunmuş ve test edilen modelin uyumunun anlamlı olduğunu göstermiştir. Pozitif değere sahip numerik faktörler cevap değişkeninde artışa neden olurken, negatif değere sahip numerik faktörler cevap değişkeninde azalmaya neden olmaktadır. Varyans analizinden elde edilen ana etkenlere ilişkin p değeri 0,057 olarak bulunmuş ve anlamlı olarak değerlendirilmiştir (Tablo 4.3).

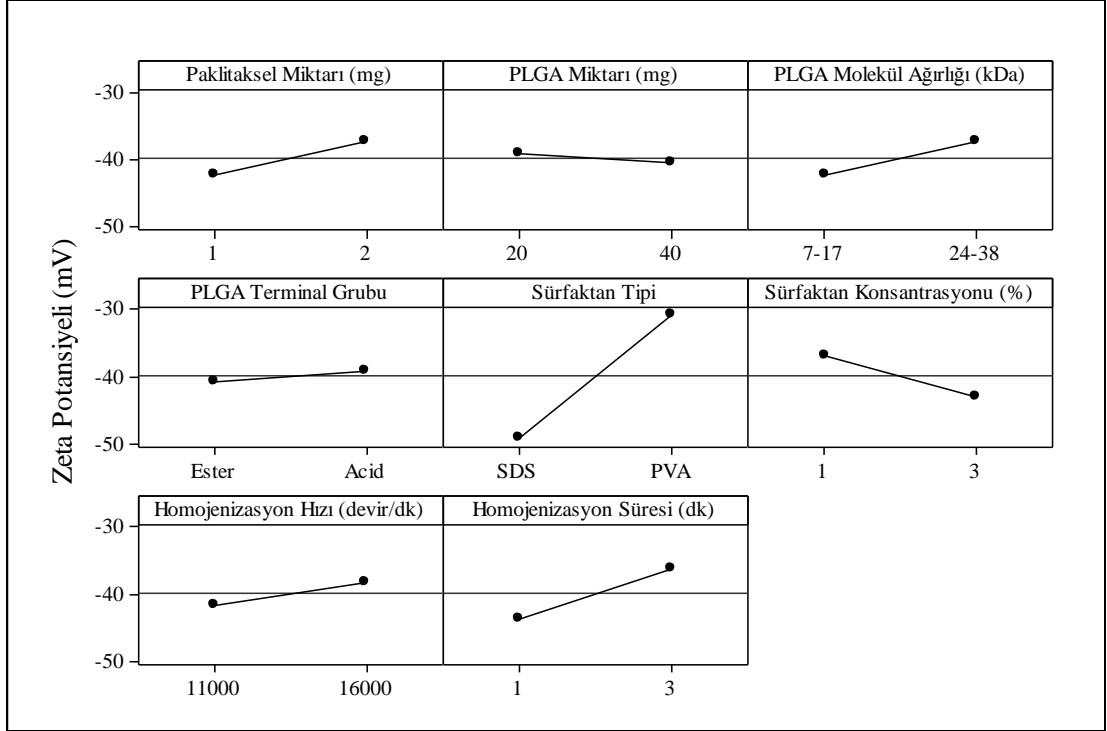


Şekil 4.2. Partikül büyüklüğü için ana etken grafikleri.

Zeta potansiyeli (Y_2) değerleri -59,5 mV (PBD12) ile -25,7 mV (PBD08) arasında değişmektedir (Tablo 4.1) (Şekil 4.3). İstatistiksel olarak en anlamlı üç faktör sırasıyla sümfaktan tipi (X_5), homojenizasyon süresi (X_8) ve sümfaktan konsantrasyonu (X_6) olarak belirlenmiştir (Tablo 4.2). Faktörlerin zeta potansiyeli üzerine etkilerini açıklayan doğrusal model aşağıdaki şekildedir (Formül 3.5):

$$Y_2 = -46,725 + 5,016X_1 - 0,069X_2 + 2,475X_3 + 0,808X_4 + 9,141X_5 - 2,991X_6 + 1,625X_7 + 3,708X_8 \quad (3.5)$$

Zeta potansiyeli için elde edilen doğrusal modelin R^2 değeri 0,9210 olarak elde edilmiş ve test edilen modelin uyumunun anlamlı olduğu görülmüştür. Bununla beraber, her ne kadar varyans analizinden elde edilen p değeri 0,126 olarak belirlense de istatistiksel olarak en anlamlı faktörler ileri analizlere dahil edilmiştir (Tablo 4.3).

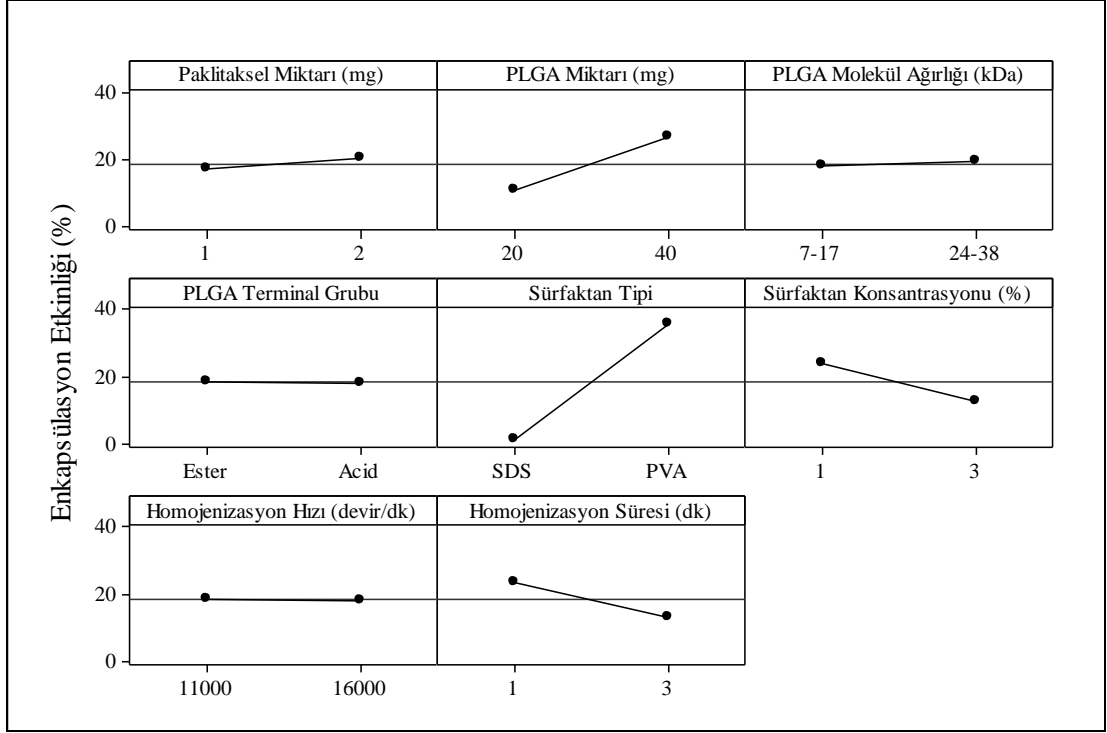


Şekil 4.3. Zeta potansiyeli için ana etken grafikleri.

Enkapsülasyon etkinliği (Y_3) sonuçları %0,272 (PBD12) ile %64,402 (PBD05) arasında bulunmuştur (Tablo 4.1) (Şekil 4.4). En önemli üç faktör olarak sırasıyla sümfaktan tipi (X_5), PLGA miktarı (X_2) ve sümfaktan konsantrasyonu (X_6) belirlenmiştir (Tablo 4.2). Faktörlerin enkapsülasyon etkinliği üzerine etkilerini açıklayan doğrusal model aşağıdaki şekildedir (Formül 3.6):

$$Y_3 = 11,427 + 3,256X_1 + 0,809X_2 + 0,670X_3 - 0,337X_4 + 17,309X_5 - 5,676X_6 - 0,204X_7 - 5,352X_8 \quad (3.6)$$

R^2 değeri 0,9205 olarak elde edilmiş ve modelin uyumunun anlamlı olduğu görülmüştür. Bununla beraber, her ne kadar varyans analizinden elde edilen p değeri 0,127 olarak belirlense de istatistiksel olarak en anlamlı faktörler Box-Behnken deney tasarımına dahil edilmiştir (Tablo 4.3).



Şekil 4.4. Enkapsülasyon etkinliği için ana etken grafikleri.

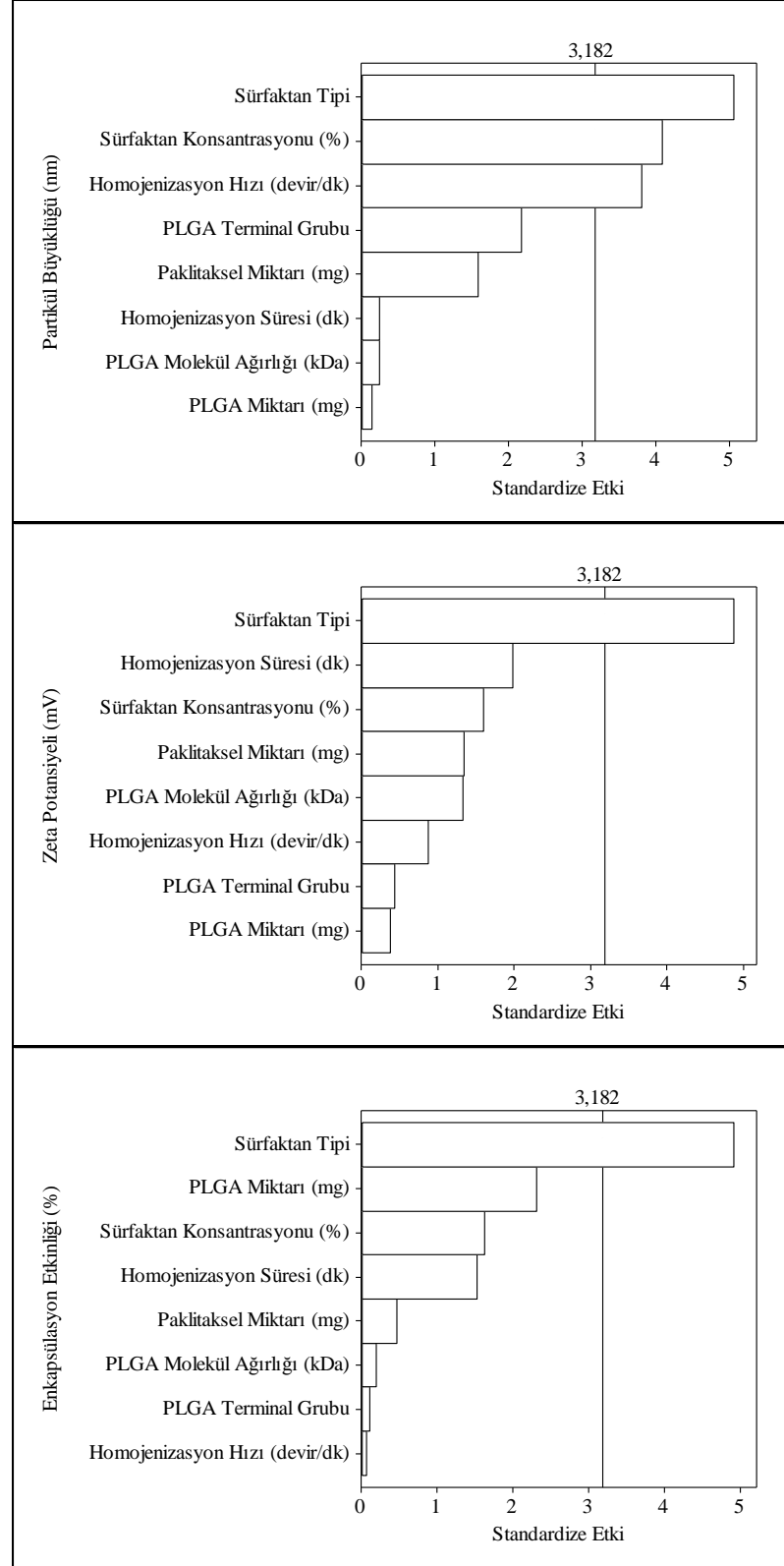
Tablo 4.2. Plackett-Burman deney tasarımı ile elde edilen bağımlı değişken değerlerinin istatistiksel analizi.

Faktörler	Y ₁ : Partikül büyüklüğü (nm)		Y ₂ : Zeta potansiyeli (mV)		Y ₃ : Enkapsülasyon etkinliği (%)	
	Katsayı	<i>p</i> değeri	Katsayı	<i>p</i> değeri	Katsayı	<i>p</i> değeri
β_0 : Sabit	100,750	<0,001	-46,725	<0,001	11,427	0,013
X ₁ : Paklitaksel miktarı (mg)	86,500	0,211	5,016	0,273	3,256	0,675
X ₂ : PLGA miktarı (mg)	-0,358	0,904	-0,069	0,736	0,809	0,105
X ₃ : PLGA molekül ağırlığı (kDa)	6,250	0,833	2,475	0,278	0,670	0,861
X ₄ : PLGA terminal grubu	-59,250	0,118	0,808	0,695	-0,337	0,930
X ₅ : Sürfaktan tipi	138,417	0,015	9,141	0,016	17,309	0,016
X ₆ : Sürfaktan konsantrasyonu (%)	111,750	0,026	-2,991	0,208	-5,676	0,205
X ₇ : Homojenizasyon hızı (devir/dk)	-	0,032	1,625	0,449	-0,204	0,957
X ₈ : Homojenizasyon süresi (dk)	104,083	0,829	3,708	0,142	-5,352	0,225

Tablo 4.3. Bağımlı değişkenler için varyans analizi sonuçları.

Cevap	Kaynak	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	<i>F</i> değeri	<i>p</i> değeri
Y_1	Ana etkiler	8	575457	71932	8,06	0,057
	Hata	3	26776	8925		
	Toplam	11	602233			
Y_2	Ana etkiler	8	1469,54	183,69	4,37	0,126
	Hata	3	126,07	42,02		
	Toplam	11	1595,61			
Y_3	Ana etkiler	8	5150,62	643,83	4,34	0,127
	Hata	3	444,73	148,24		
	Toplam	11	5595,35			

Faktörlerin etkilerini görselleştirmek için Pareto grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Partikül büyüklüğü, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliği için anlamlı formülasyon ve proses değişkenlerini gösteren Pareto grafikleri.

4.3. Paklitaksel Nanopartiküllerinin Optimizasyonu: Box-Behnken Deney Tasarımı

Plackett-Burman deney tasarımı ile kritik formülasyon ve proses parametrelerinin belirlenmesinin ardından üç faktörlü, üç düzeyli bir Box-Behnken deney tasarımı uygulanmıştır. Bu tasarım ile paklitaksel nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliği üzerine PLGA miktarı (X_1), sürfaktan konsantrasyonu (X_2) ve homojenizasyon hızının (X_3) etkilerinin kesin olarak açıklanması hedeflenmiştir. Deneylerin sonuçları Tablo 4.4'te verilmiştir.

Tablo 4.4. Box-Behnken deney tasarımı ile elde edilen bağımlı değişken değerleri.

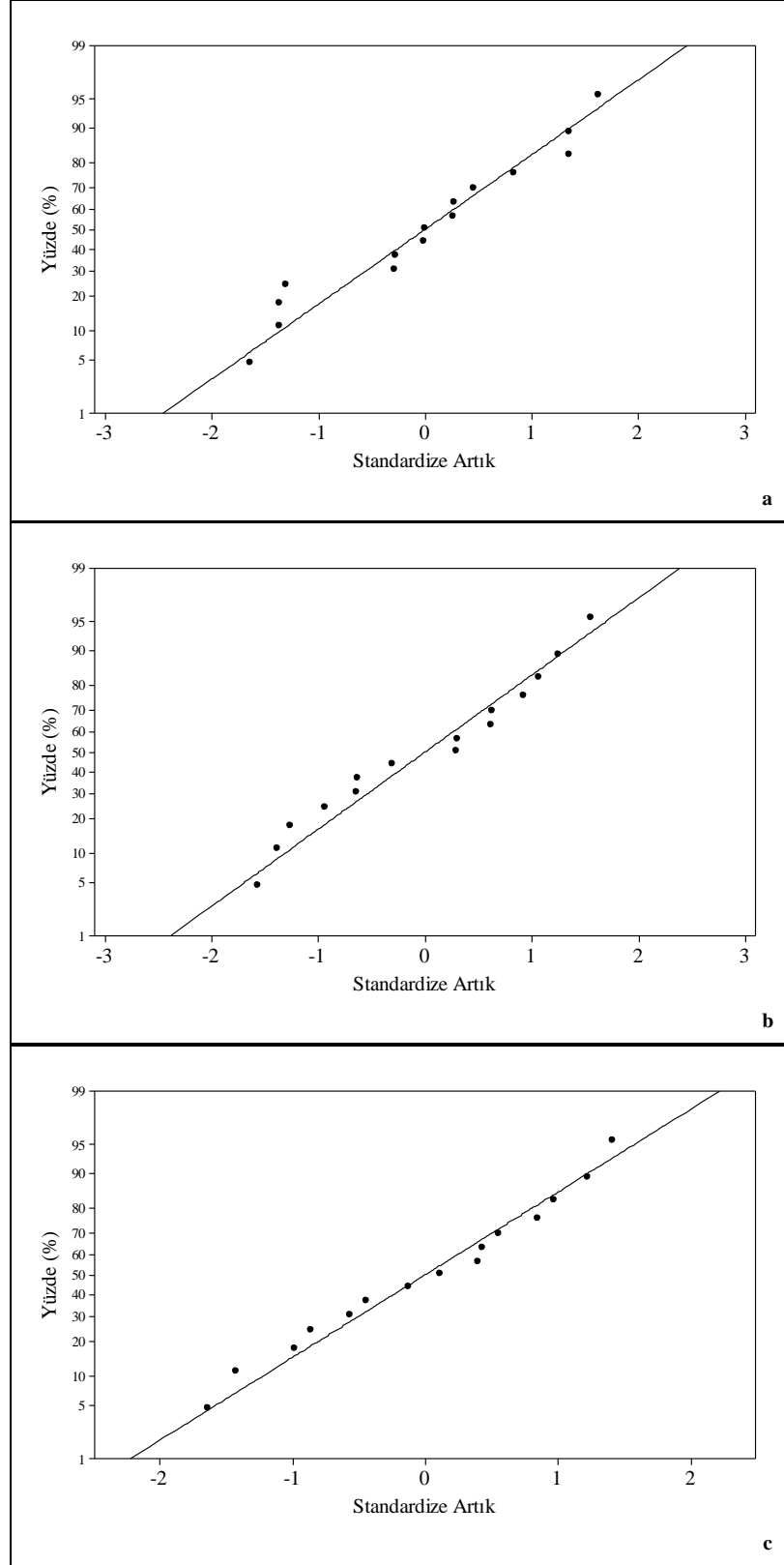
Formülasyon kodu	Y_1 : Partikül büyüklüğü (nm)	Y_2 : Zeta potansiyeli (mV)	Y_3 : Enkapsülasyon etkinliği (%)
BBD01	600,8	-15,5	27,29
BBD02	608,2	-15,4	55,23
BBD03	491,0	-22,4	36,56
BBD04	562,5	-21,3	51,85
BBD05	337,0	-24,5	38,61
BBD06	421,9	-30,0	66,12
BBD07	674,8	-19,2	28,52
BBD08	834,3	-22,8	41,94
BBD09	348,2	-23,0	48,83
BBD10	286,4	-22,8	54,22
BBD11	875,4	-24,0	41,91
BBD12	618,1	-12,9	35,31
BBD13	557,2	-20,3	46,75
BBD14	485,0	-16,9	42,20
BBD15	572,9	-27,9	48,60

Faktörlerin matematiksel ilişkisi ve katsayıları ile regresyon analizi yoluyla elde edilen cevap değişkenlerine ilişkin p değerleri Tablo 4.5'te sunulmuştur. p değerleri 0,05'ten küçük olan faktörler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Tablo 4.5. Faktörlerin kestirmlenen regresyon katsayıları ve ilgili p değerleri.

	Y_1 : Partikül büyüklüğü (nm)		Y_2 : Zeta potansiyeli (mV)		Y_3 : Enkapsülasyon etkinliği (%)	
	Katsayı	p değeri	Katsayı	p değeri	Katsayı	p değeri
β_0 : Sabit	336,472	<0,001	97,325	0,001	-124,578	<0,001
X_1 : PLGA miktarı (mg)	-27,012	0,072	-0,208	0,633	4,781	<0,001
X_2 : Sürfaktan konsantrasyonu (%)	419,046	<0,001	-4,565	0,227	18,672	0,001
X_3 : Homojenizasyon hızı (devir/dk)	0,012	0,021	-0,0166	0,927	0,010	0,573
X_1X_2	1,865	0,492	0,0475	0,870	-0,352	0,050
X_1X_3	0,0006	0,552	0,00001	0,931	-0,0001	0,069
X_2X_3	-0,019	0,110	0,0011	0,367	-0,0012	0,081
X_1^2	0,311	0,288	-0,002	0,947	-0,022	0,185
X_2^2	-2,483	0,928	-2,225	0,472	0,140	0,925
X_3^2	-6×10^{-7}	0,889	5×10^{-7}	0,307	-1×10^{-7}	0,548

Modelin uyumu R^2 değerleri ile değerlendirilmiştir. Partikül büyüklüğü ve enkapsülasyon etkinliği için R^2 değeri sırasıyla 0,9679 ve 0,9753 bulunmuştur ve modelin uyumunun anlamlı olduğunu göstermiştir (Şekil 4.6). Zeta potansiyeli için R^2 değeri 0,5118 olarak bulunmuş ve modelin uyumu anlamsız olarak nitelendirilmiştir. Regresyon analizine ek olarak, regresyon katsayılarının anlamlılık testi için varyans analizi de uygulanmış ve p değerleri partikül büyüklüğü için 0,003; enkapsülasyon etkinliği için 0,002 olarak bulunmuştur. Bu değerler ilgili cevap değişkenleri için kurulan matematiksel modelin anlamlılığını göstermektedir. Regresyon analizinde olduğu şekilde, varyans analizinde de kurulan model zeta potansiyeli için anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$). Dolayısıyla ileri değerlendirmelerde ve tasarım aralığının oluşturulmasında zeta potansiyeli kapsam dışında bırakılmıştır.



Şekil 4.6. Normal olasılık grafikleri: a) partikül büyüklüğü, b) zeta potansiyeli ve c) enkapsülasyon etkinliği.

Faktörlerin ana etkileri değerlendirildiğinde paklitaksel nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü üzerinde en anlamlı etkiye sahip faktörler sırasıyla sürfaktan konsantrasyonu, homojenizasyon hızı ve PLGA miktarı olmuştur. Artan sürfaktan konsantrasyonu ve PLGA miktarı partikül büyüklüğü üzerinde pozitif bir etkiye sahipken artan homojenizasyon hızı partikül büyüklüğünü azaltmıştır. Etkileşim etkileri ve ikinci dereceden etkiler anlamlı bulunmamıştır. Partikül büyüklüğü değerinin kestirimi amacıyla kurulan ikinci dereceden polinomial model aşağıdaki şekildedir (Formül 3.7):

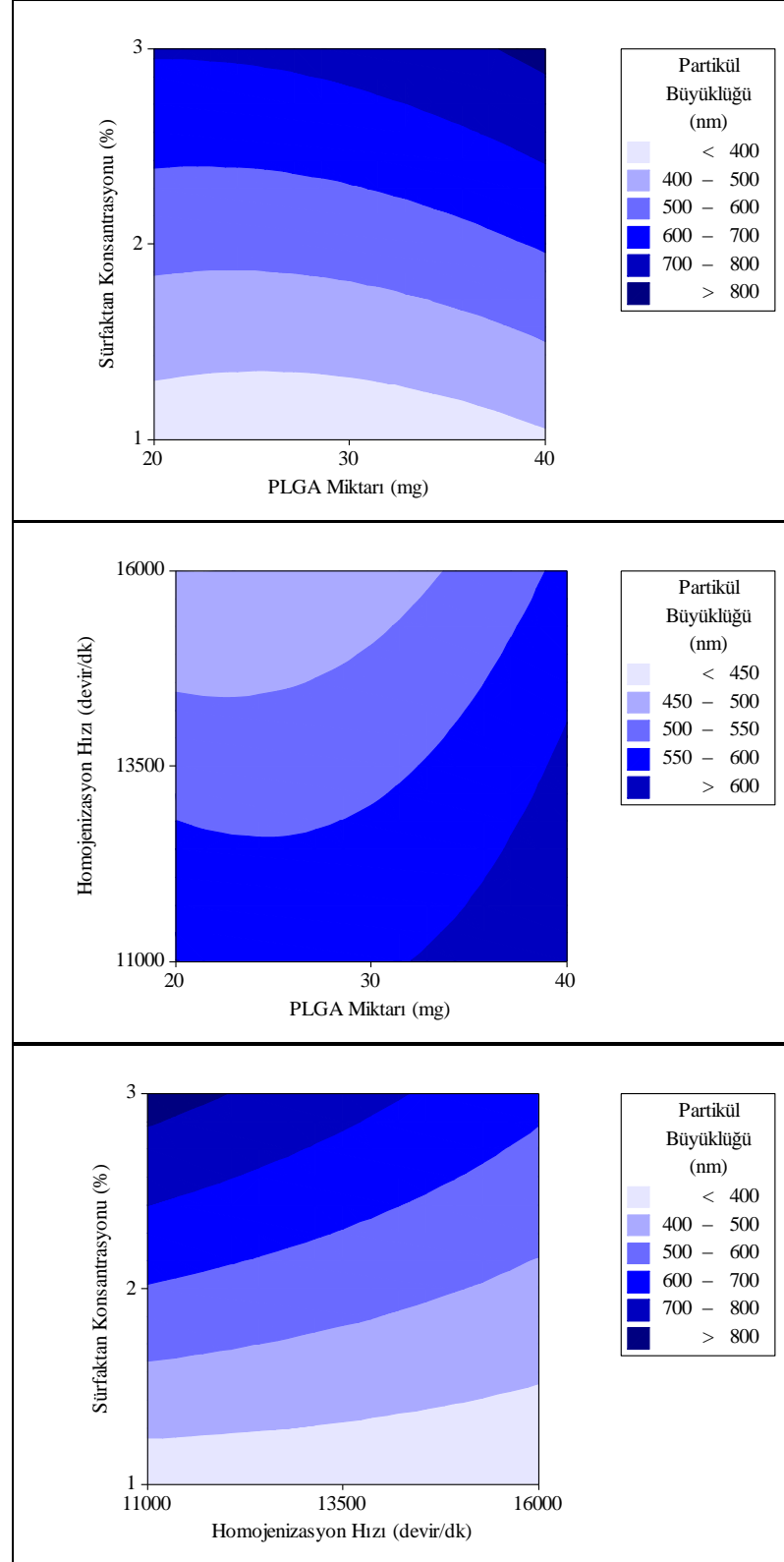
$$Y_1 = 336,472 - 27,012X_1 + 419,046X_2 + 0,012X_3 + 1,865X_1X_2 + 0,0006X_1X_3 - 0,019X_2X_3 + 0,311X_1^2 - 2,483X_2^2 - 0,0000006X_3^2 \quad (3.7)$$

Enkapsülasyon etkinliği değerlendirmesinde sırasıyla en etkili faktörler PLGA miktarı, sürfaktan konsantrasyonu ve PLGA miktarı-sürfaktan konsantrasyonu etkileşim etkisi olarak bulunmuştur. Artan PLGA miktarı enkapsülasyon etkinliğinde artışa neden olmuş, buna zıt olarak, artan sürfaktan konsantrasyonu enkapsülasyon etkinliğini azaltmıştır. Buna ek olarak, PLGA miktarı-hojenizasyon hızı ($p = 0,069$) ve sürfaktan konsantrasyonu-hojenizasyon hızı ($p = 0,081$) etkileşim etkileri neredeyse anlamlı bulunmuştur. Yüzey cevap grafiklerinde gözlenen eğrilik (*curvature*) etkileşim etkilerinin varlığını doğrulamaktadır. Paklitaksel nanopartiküllerinin enkapsülasyon etkinliği üzerinde ikinci dereceden etkiler gözlenmemiştir.

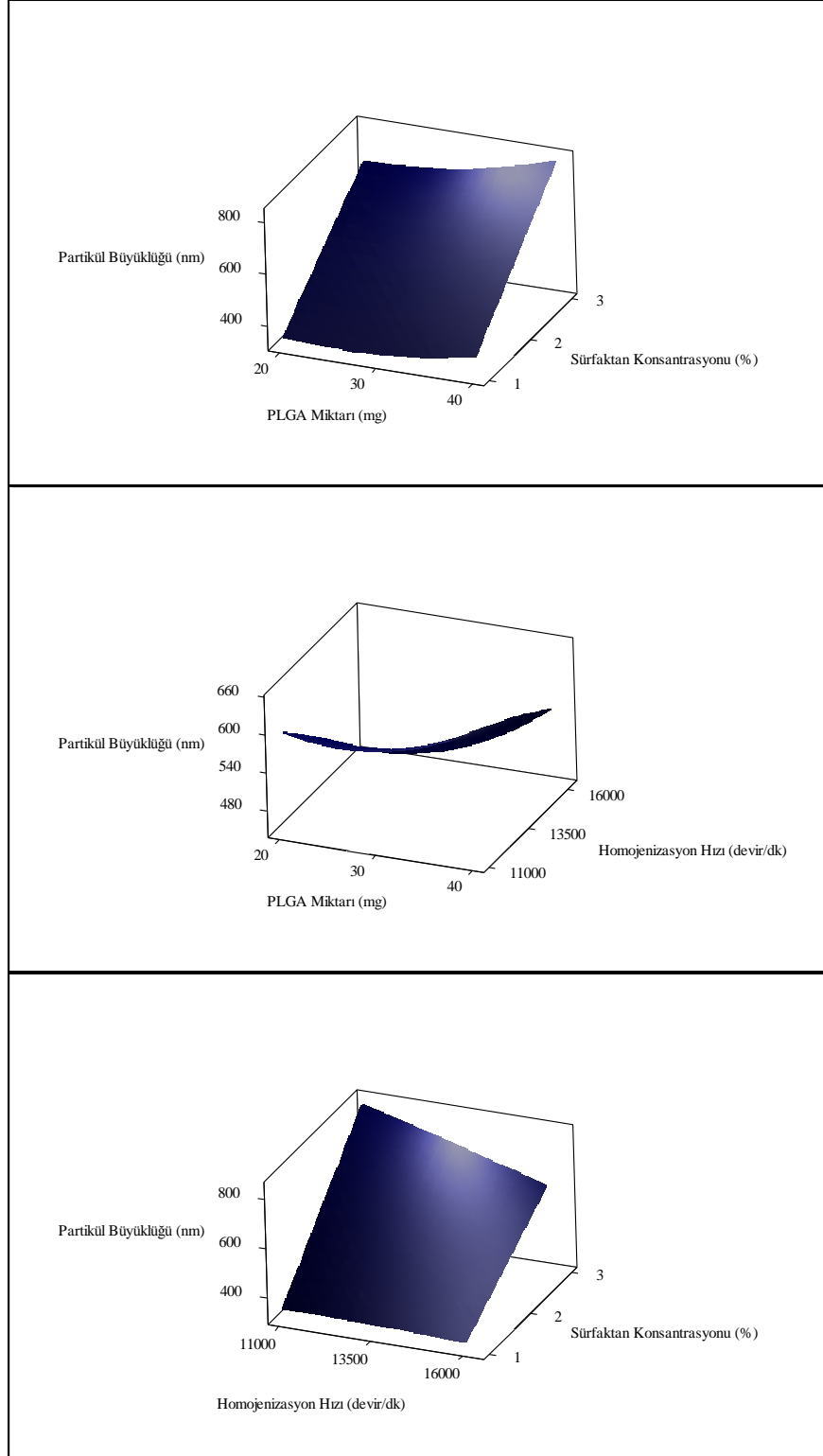
Enkapsülasyon etkinliğinin kestiriminde kullanılan ikinci dereceden polinomial model aşağıdaki şekildedir (Formül 3.8):

$$Y_3 = -124,578 + 4,781X_1 + 18,672X_2 + 0,01X_3 - 0,352X_1X_2 - 0,0001X_1X_3 - 0,0012X_2X_3 - 0,022X_1^2 + 0,14X_2^2 - 0,0000001X_3^2 \quad (3.8)$$

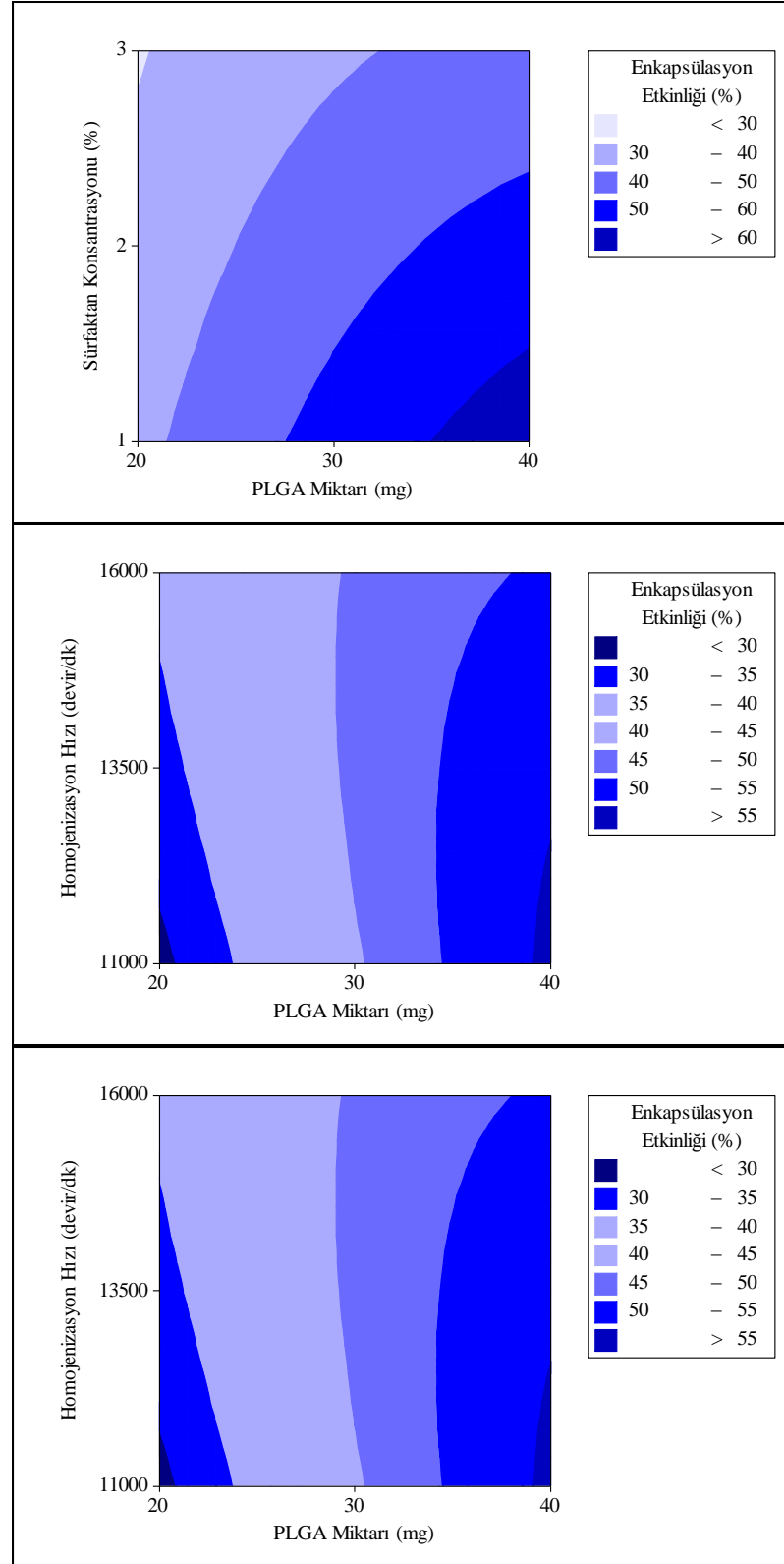
Faktörlerin etkilerinin daha detaylı değerlendirilmeleri için partikül büyüklüğü (Şekil 4.7 ve Şekil 4.8) ve enkapsülasyon etkinliği (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10) verileri kontur ve yüzey cevap grafikleri ile görselleştirilmiştir.



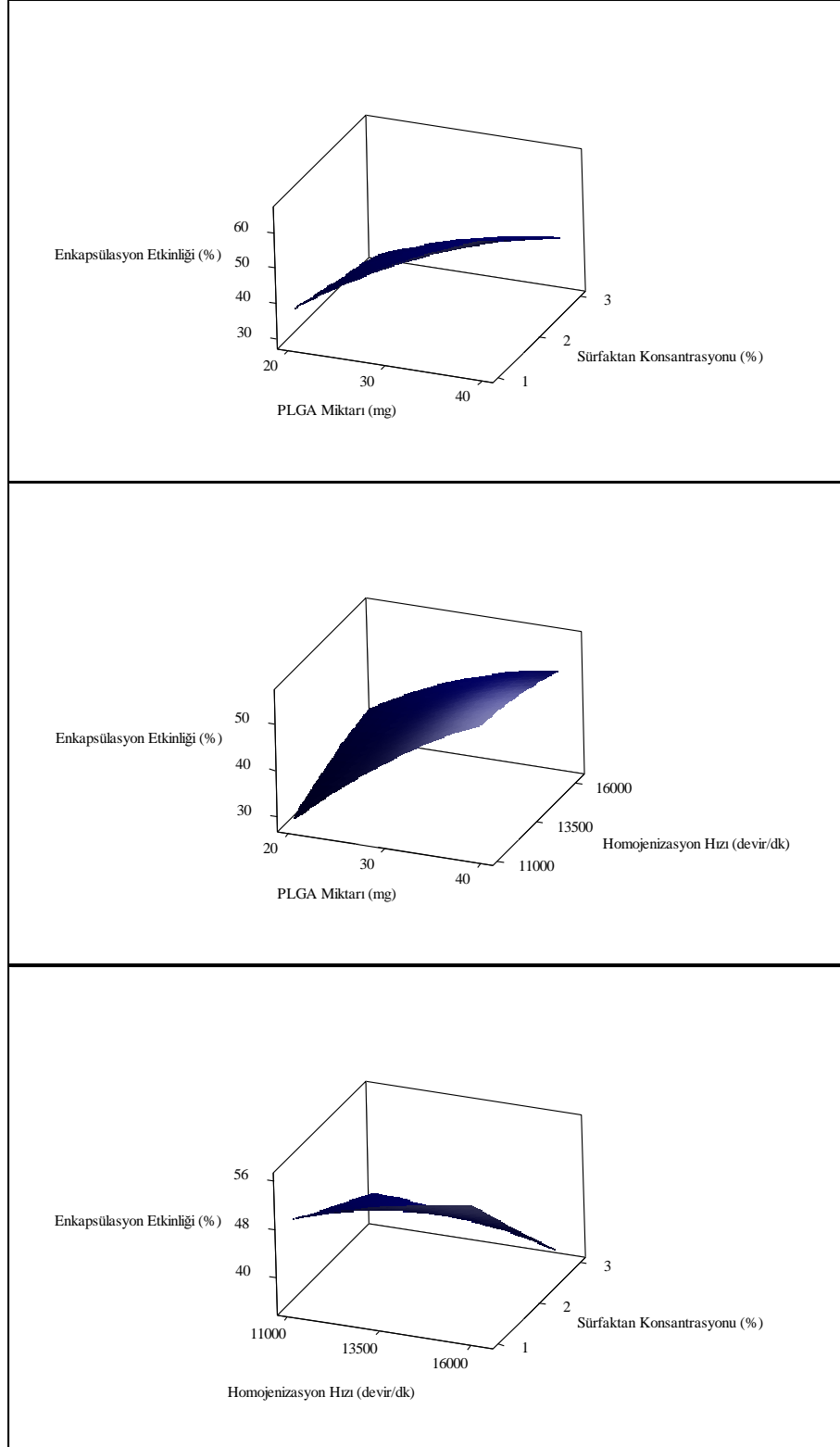
Şekil 4.7. Paklitaksel nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü üzerine PLGA miktarı, sürfactan konsantrasyonu ve homojenizasyon hızının etkisini gösteren kontur grafikleri.



Şekil 4.8. Paklitaksel nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü üzerine PLGA miktarı, sürfaktan konsantrasyonu ve homojenizasyon hızının etkisini gösteren yüzey cevap grafikleri.

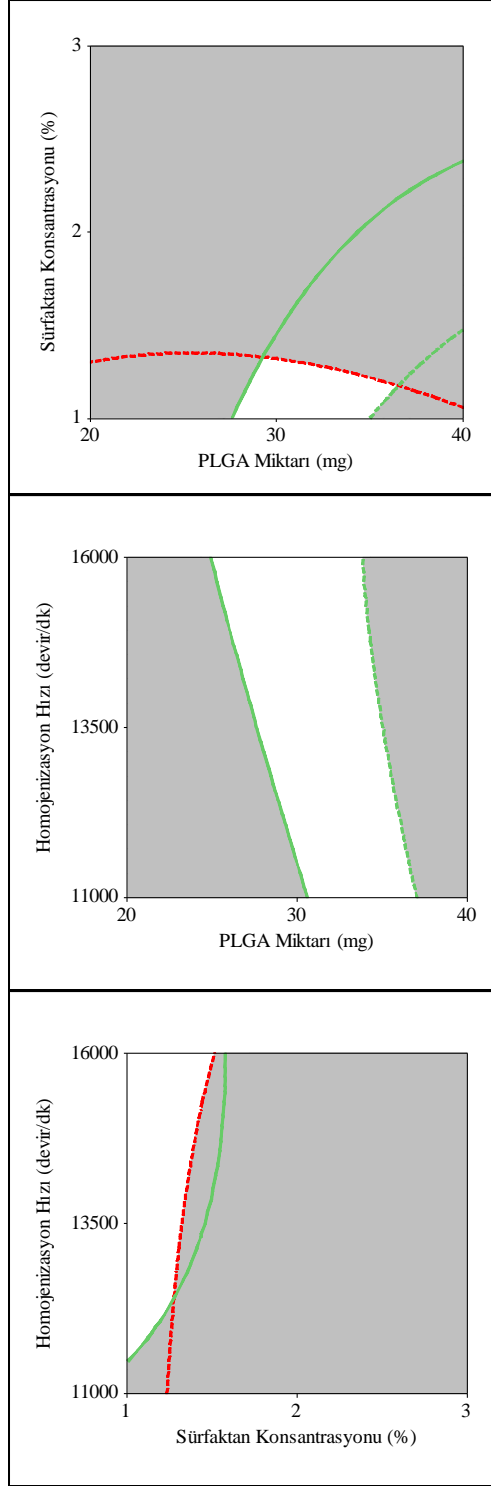


Şekil 4.9. Paklitaksel nanopartiküllerinin enkapsülasyon etkinliği üzerine PLGA miktarı, süpfaktan konsantrasyonu ve homojenizasyon hızının etkisini gösteren kontur grafikleri.



Şekil 4.10. Paklitaksel nanopartiküllerinin enkapsülasyon etkinliği üzerine PLGA miktarı, sümfaktan konsantrasyonu ve homojenizasyon hızının etkisini gösteren yüzey cevap grafikleri.

Faktörlerin cevap değişkenleri üzerine etkisini açıklayan matematiksel modeller kurulduktan sonra hedeflenen partikül büyüklüğü (< 400 nm) ve enkapsülasyon etkinliği ($> 50\%$) değerlerine ulaşmak için gerekli faktör kombinasyonlarını gösteren bir tasarım aralığı elde edilmiştir. Bu amaçla, partikül büyüklüğü ve enkapsülasyon etkinliği değerlerini aynı anda gösteren kontur grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Paklitaksel nanopartikülleri için tasarım aralığı. Beyaz bölgeler hedeflenen partikül büyüklüğü (< 400 nm) ve enkapsülasyon etkinliği ($> \%50$) için uygun faktör düzeylerini, kırmızı ve yeşil çizgiler ise sırasıyla partikül büyüklüğü (400 nm) ve enkapsülasyon etkinliği ($\%50$) için limit değerleri göstermektedir.

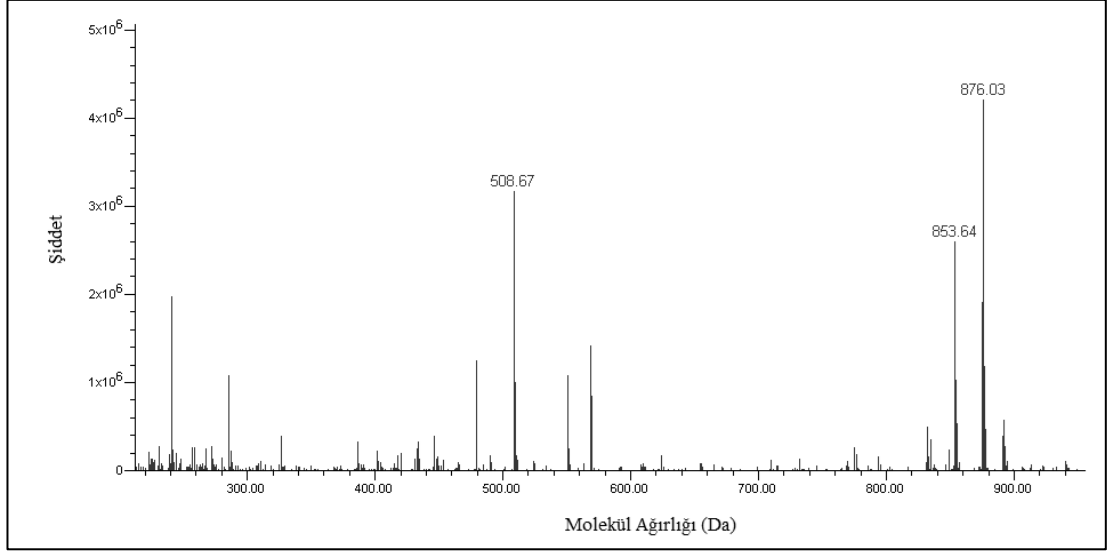
Tasarım aralığı oluşturulduktan sonra hedeflenen partikül büyüklüğü ve enkapsülasyon etkinliğine sahip olabileceği öngörülen bir optimum formülasyonun hazırlanması için arzulanabilirlik fonksiyonu (*desirability function, d*) yöntemi kullanılmıştır (28). Bire yakın *d* değeri arzu edilen cevap değişkenlerine yaklaşıldığını gösterirken sıfıra yakın *d* değeri, arzu edilen cevap değişkeninden uzaklaşıldığını göstermektedir. Bu amaçla, kısıtlayıcı (*constraint*) olarak minimum partikül büyüklüğü (< 400 nm) ve maksimum enkapsülasyon etkinliği (> 50%) belirlenmiştir. Tasarım aralığı oluşturulurken elde edilen bilgiler doğrultusunda hedeflenen değerlere ulaşmak için sürfaktan konsantrasyonu en düşük (%1), homojenizasyon hızı en yüksek (16000 devir/dk) ve PLGA miktarı orta düzeyde (30 mg) tutulmuştur. Bu konfigürasyon ile elde edilen *d* değeri 0,89'dur ve kestirmlenen değerler ile gözlenen değerlere ilişkin veriler Tablo 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4.6. Arzulanabilirlik fonksiyonu temel alınarak geliştirilen optimum paklitaksel nanopartikül formülasyonuna ilişkin deneysel ve kestirimsel değerler.

Cevap değişkeni	Gözlenen	Kestirmlenen	Artık	Hata (%)
Partikül büyüklüğü (nm)	286,4	320,4	-34,0	-10,61
Enkapsülasyon etkinliği (%)	54,22	56,16	-1,94	-3,454

4.4. Enkapsülasyon Etkinliği ve *In Vitro* İlaç Salımı Çalışmalarında Kullanılan Analitik Yöntemin Validasyonu

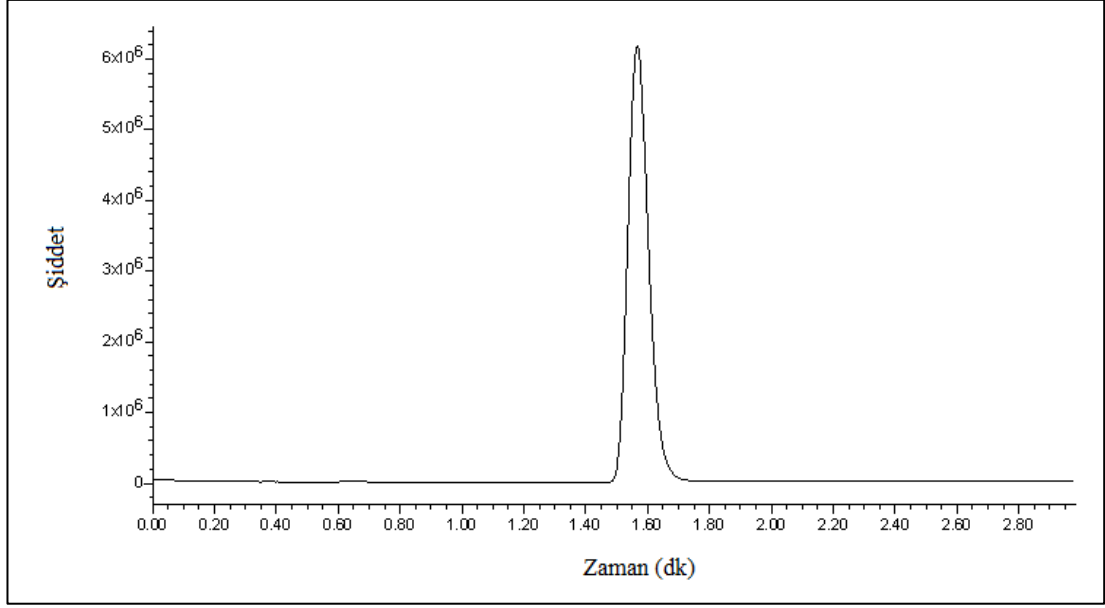
Paklitakselin nanopartiküllere yüklenen ve nanopartiküllerden salınan miktarının tayini için bir UPLC-MS analitik yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Sistem uygunluk testleri ve yöntem validasyonu çalışmaları sonuçlarına dayanarak paklitaksel analizi için optimum kromatografik şartlar belirlenmiştir. Özgün, doğru, kesin, doğrusal ve duyarlı bir yöntem elde etmek adına uygun hareketli faz akış hızı, enjeksiyon hacmi, kolon fırını sıcaklığı, kolon özellikleri ve kütle spektroskopisi şartları belirlenmiştir. Paklitakselin moleküler iyon pikini gösteren bir kütle spektrumu Şekil 4.12'de verilmiştir.



Şekil 4.12. Paklitakselin DMSO içerisindeki çözeltisine ilişkin kütle spektrumu.

4.4.1. Sistem Uygunluğu

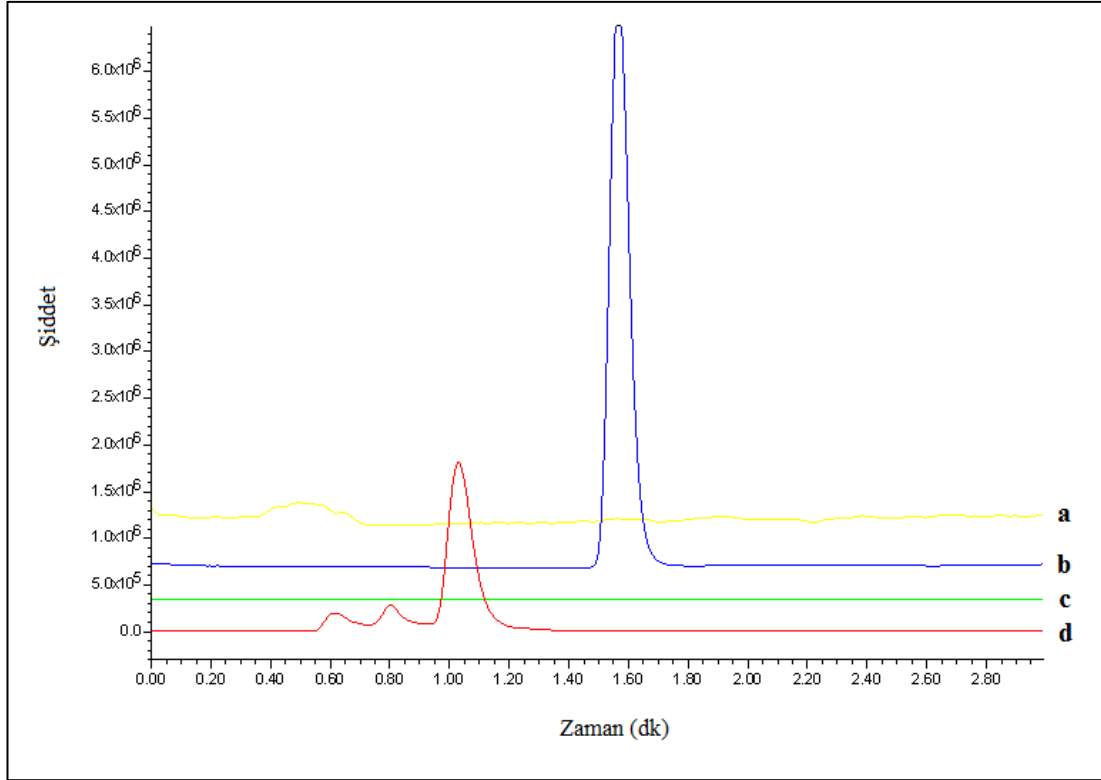
Paklitakselin DMSO içerisindeki 5 µg/ml konsantrasyondaki standart çözeltisi kullanılarak sistem uygunluk testi uygulanmıştır ($n = 6$). Kuyruklanma faktörü ($T < 2$), enjeksiyon tekrarlanabilirliği ($RSD < \%1$), kapasite faktörü ($k' > 2$) ve teorik tabaka sayısı ($N > 2000$) değerleri ilgili FDA kılavuzuna göre uygun bulunmuştur (55). Paklitakselin alıkonma süresi (t_R) 1,56 dakika ve toplam analiz süresi 3 dakikadır (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Paklitakselin DMSO içerisindeki 5 µg/ml konsantrasyondaki çözeltisine ilişkin örnek kromatogram.

4.4.2. Özgünlük

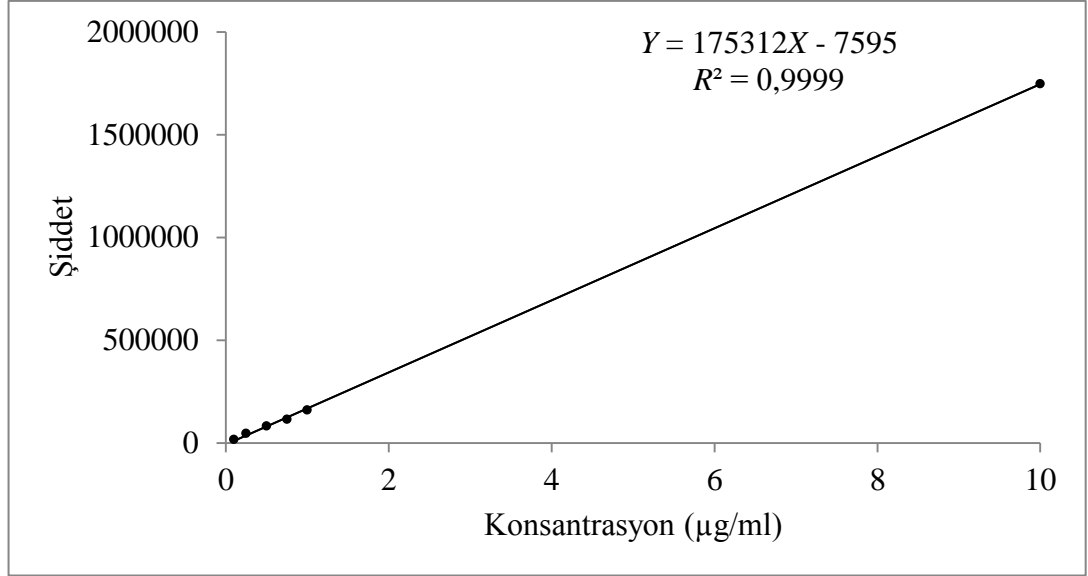
Geliştirilen analitik yöntemde paklitaksel ile matris arasında girişim olmadığını göstermek amacıyla yapılan özgünlük çalışmalarında DMSO, DMSO içerisinde çözündürülmüş plasebo nanopartiküller, *in vitro* salım ortamı ve paklitakselin DMSO içerisindeki çözeltisine ilişkin kromatogramlar elde edilmiş ve görsel olarak karşılaştırılmıştır. Kromatogramlarda paklitaksel piki ile girişim yapan herhangi bir pik gözlenmemiş ve yöntemin paklitaksel analizi için özgün olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. Örnek kromatogramlar: a) plasebo nanopartiküller, b) paklitakselin DMSO içerisindeki çözeltisi, c) DMSO, d) *in vitro* ilaç salım ortamı.

4.4.3. Doğrusallık ve Aralık

Geliştirilen analitik yöntemin doğrusallığı basit doğrusal regresyon analizi kullanılarak değerlendirilmiştir ve 0,10-10,0 µg/ml konsantrasyon aralığında paklitaksel için yöntem doğrusal olarak bulunmuştur. Regresyon doğrusunun tanımlayıcılık katsayısı (R^2) 0,9999; intersept -7595 ve eğim 175312 olarak bulunmuştur (Şekil 4.15). Yapılan t testi ile eğimin sıfırdan farklı, dolayısıyla anlamlı ($p < 0,05$) ve interseptin sıfırdan farksız, dolayısıyla anlamsız ($p > 0,05$) olduğu gösterilmiştir. Regresyon analizinden kalibrasyon eşitliği elde edilmiş ve analiz edilen paklitaksel örneklerinde hesaplamalar bu eşitliğe göre yapılmıştır.



Şekil 4.15. Paklitaksel analitik yöntemine ilişkin regresyon doğrusu. Y pik alanını ve X paklitaksel konsantrasyonunu göstermektedir.

4.4.4. Doğruluk ve Kesinlik

Analitik yöntemin doğruluğu ve kesinliği günüçi ve günlerarası olarak incelenmiş ve RSD değerleri %2'nin altında, geri kazanım değerleri ise %98-102 aralığında bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar ile yöntemin uygun doğrulukta ve kesinlikte olduğu gösterilmiştir (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. Paklitaksel analitik yöntemine ilişkin doğruluk ve kesinlik parametreleri sonuçları ($n = 3$).

Teorik konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)	Deneysel sonuçlar					
	Günüçi			Günlerarası		
	Ortalama ($\mu\text{g/ml}$)	Geri kazanım (%)	RSD (%)	Ortalama ($\mu\text{g/ml}$)	Geri kazanım (%)	RSD (%)
0,10	0,099	99,4	0,9	0,099	99,0	1,7
1,0	0,999	99,9	1,8	0,983	98,3	1,0
10,0	9,992	99,2	0,5	10,147	101,5	1,5

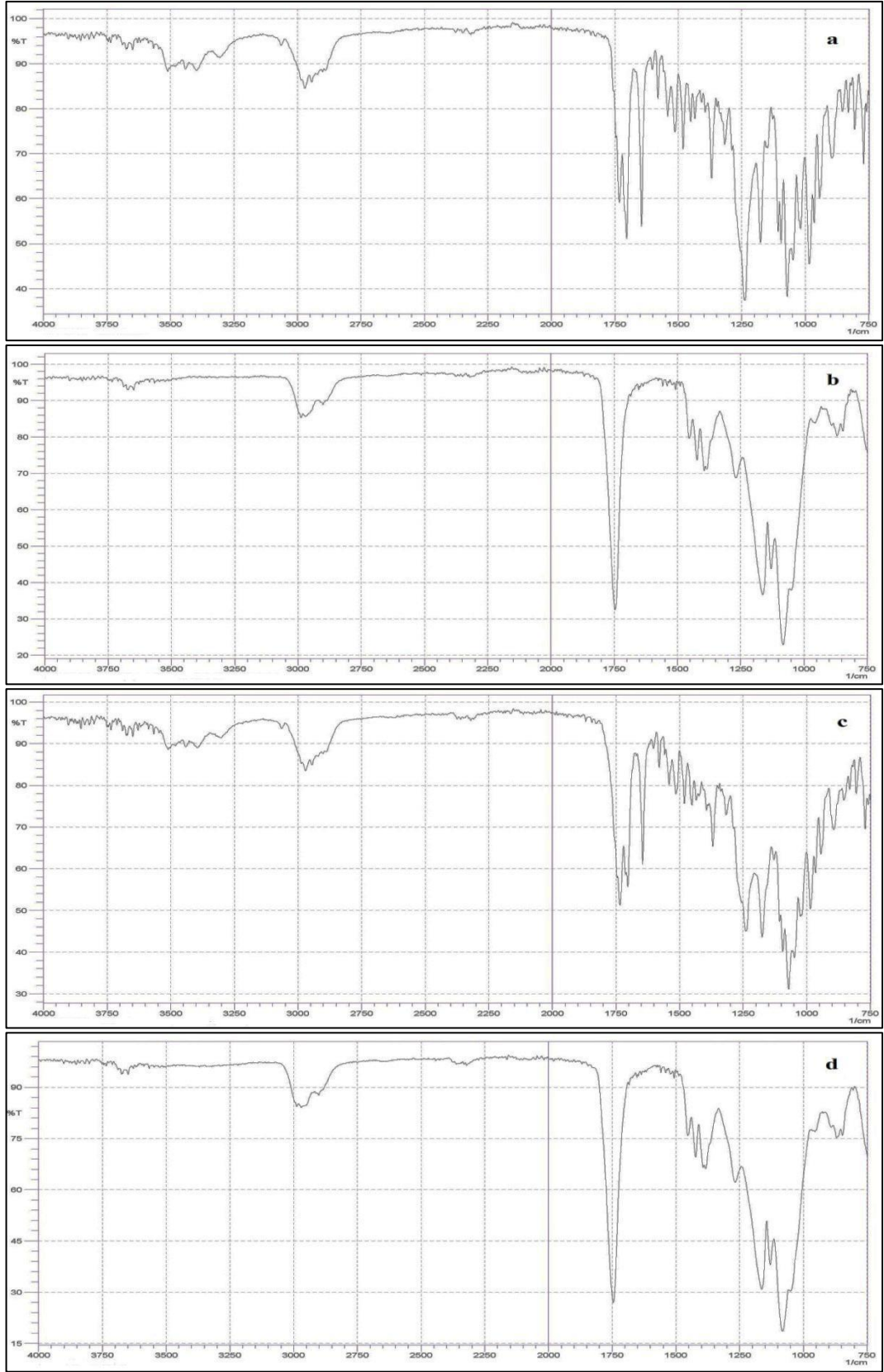
4.4.5. Saptama ve Tayin Sınırı

Paklitaksel için LOD 15 ng/ml ($S/N = 3:1$) ve LOQ 50 ng/ml ($S/N = 10:1$) olarak bulunmuştur. Geliştirilen analitik yöntemin duyarlılığı enkapsülasyon etkinliği ve *in vitro* ilaç salım çalışmalarında elde edilecek değerler için yeterli görülmüştür.

Paklitakselin nanopartikül formülasyonundan tayini için geliştirilen UPLC-MS yöntemi ilgili ICH kılavuzunda tavsiye edildiği şekliyle valide edilmiştir (51). Analitik yöntem özgünlük, doğrusalılık, doğruluk, kesinlik ve duyarlılık kriterlerini karşılamaktadır.

4.5. Fourier Dönüştümlü Kızılötesi Spektroskopisi

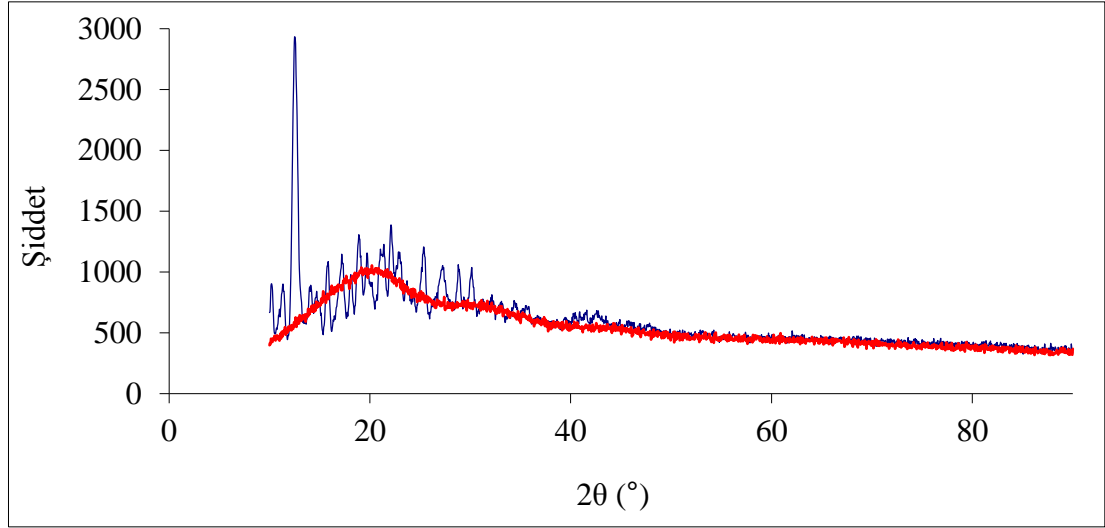
Paklitaksel ve PLGA arasındaki kimyasal etkileşimi incelemek için paklitaksel, PLGA, paklitaksel-PLGA fiziksel karışımı ve paklitaksel nanopartiküllerinin FTIR spektrumları alınmıştır (Şekil 4.16). Paklitaksel spektrumunda; N-H titreşim gerilimleri $3479-3305\text{ cm}^{-1}$ 'de, CH titreşim gerilimleri $2970-2889\text{ cm}^{-1}$ 'de, ester C=O titreşim gerilimleri $1732-1703\text{ cm}^{-1}$ 'de, amid gerilimi 1645 cm^{-1} 'de ve ester bağı titreşim gerilimleri 1238 cm^{-1} 'de gözlenmiştir ve bu pikler paklitaksele spesifiktir. Paklitaksele ilişkin bu pikler herhangi bir kayma olmaksızın paklitaksel-PLGA fiziksel karışımında da gözlenmiştir. Bununla beraber $3479-3305\text{ cm}^{-1}$ 'deki N-H titreşim gerilimleri, $1732-1703\text{ cm}^{-1}$ 'deki ester C=O titreşim gerilimleri, 1645 cm^{-1} 'deki amid gerilimi ve 1238 cm^{-1} 'deki ester bağı titreşim gerilimleri paklitaksel nanopartiküllerine ait spektrumda gözlenmemiştir ve bu durum paklitakselin nanopartiküllerin içine tamamen enkapsüle olabileceğine işaret eden bir durumdur (56). Buna ek olarak, paklitaksel ve PLGA spektrumlarında gözlenmemiş ancak nanopartiküllere ilişkin spektrumda gözlenen, dolayısıyla yeni bir fonksiyonel gruba ait olabilecek herhangi bir pik söz konusu olmadığından paklitaksel ve PLGA arasında kimyasal bir etkileşme olmadığı sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.16. FTIR spektrumları: a) paklitaksel, b) PLGA, c) paklitaksel-PLGA fiziksel karışımı ve d) paklitaksel nanopartikülleri.

4.6. X-Işını Difraktometresi

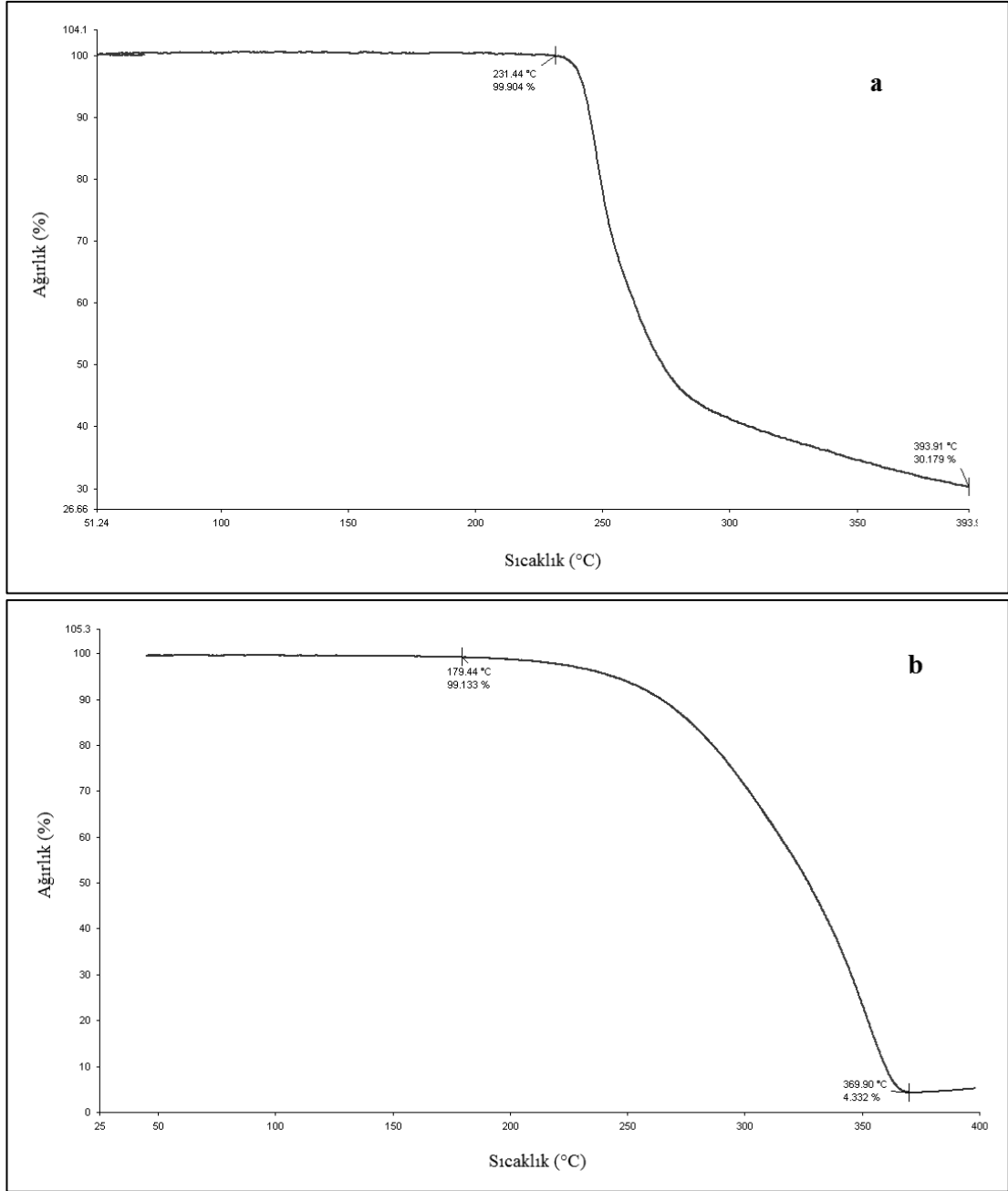
Paklitakselin nanopartiküllere yüklendikten sonra kristal veya amorf şeklinde olduğunun incelenmesi için paklitaksel ve paklitaksel nanopartiküllerinin XRD analizleri yapılmıştır. Paklitakselin difraktogramında $12,5^\circ$ 2θ değerinde keskin bir pik gözlenmesine rağmen paklitaksel nanopartiküllerine ait difraktogramda herhangi bir pik gözlenmemiştir (Şekil 4.17). Paklitaksel nanopartiküllerine ilişkin difraktogram literatürde verilen amorf yapıdaki paklitaksel difraktogramlarına benzerlik göstermektedir (53). Dolayısıyla, kristal halde bulunan paklitaksel nanopartiküllere yüklendikten sonra amorf hale geçmektedir.



Şekil 4.17. Paklitaksel ve paklitaksel nanopartiküllerine ilişkin X-ışını difraktogramları. Mavi desen paklitaksele, kırmızı desen ise paklitaksel nanopartiküllerine aittir.

4.7. Termogravimetrik Analiz

TGA termogramında paklitaksel 231°C 'de bozunmaya başlamakta ve 394°C 'ye geldiğinde paklitakselin yaklaşık olarak %70'i bozunmaktadır. PLGA ise 179°C 'de bozunmaya başlamakta ve 370°C 'ye ulaşıldığında PLGA'nın %96'sı bozunmaktadır (Şekil 4.18). Yapılan DSC analizlerinde sıcaklık tarama aralığı TGA sonuçlarına dayanarak belirlenmiştir.



Şekil 4.18. TGA termogramları: a) paklitaksel ve b) PLGA.

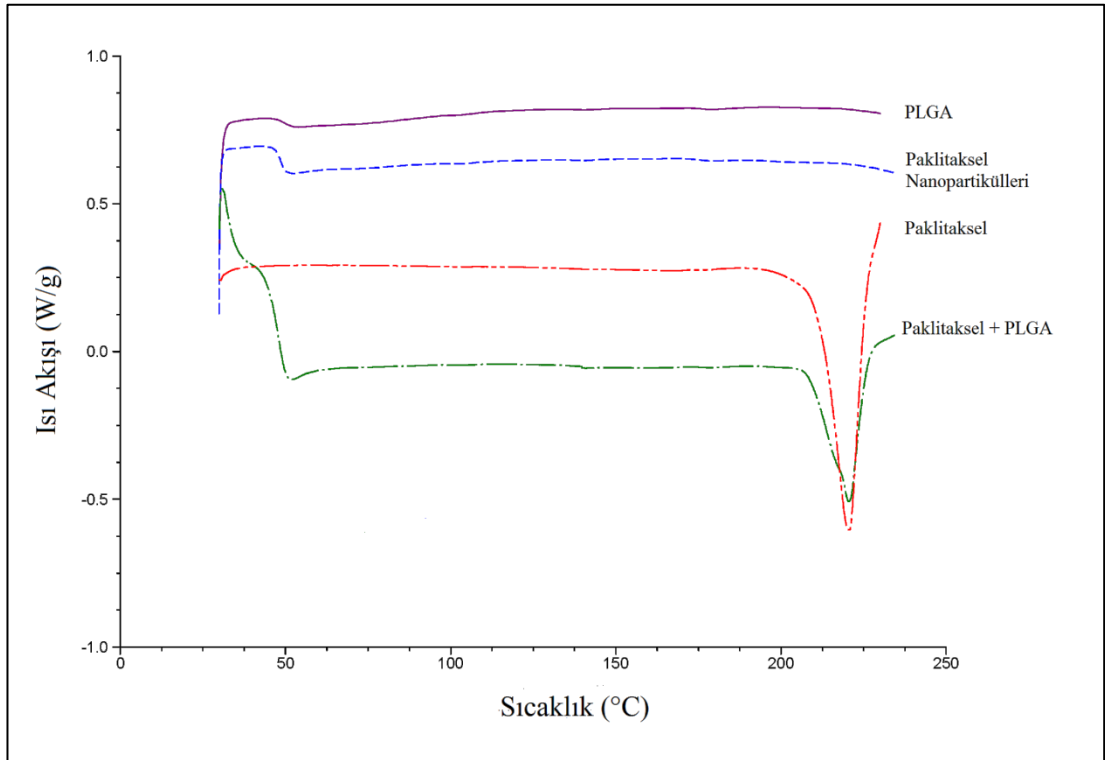
4.8. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre

Paklitakselin nanopartikül formülasyonundaki fiziksel halinin ve üretim prosesi esnasında oluşabilecek paklitaksel-PLGA etkileşimlerinin incelenmesi amacıyla DSC çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla paklitaksel, PLGA, paklitaksel-PLGA fiziksel karışımı ve paklitaksel nanopartiküllerinin DSC termogramları elde edilmiştir (Şekil 4.19). Paklitaksel termogramında absorplanan nem veya moleküler

su kaybına ve katı-katı geçişlerine ilişkin herhangi bir termal olay gözlenmemekle birlikte 220 °C’de paklitakselin erimesine ait endotermik bir pik ve bu piki takiben paklitakselin bozunmasına ilişkin ekzotermik bir eğri gözlenmiştir. Paklitaksel-PLGA fiziksel karışımında paklitaksele ait endotermik erime piki aynı sıcaklıkta gözlenmiştir ancak paklitaksel nanopartiküllerinde bu endotermik pik görülmemektedir. Bunun nedeninin kristal haldeki paklitakselin nanopartiküllere yüklendikten sonra amorf hale geçmesi ve tamamen enkapsüle olması olduğu düşünülmektedir.

PLGA’nın camsı geçiş sıcaklığı 52 °C olarak bulunmuş ve bu değer paklitaksel-PLGA fiziksel karışımı ile paklitaksel nanopartiküllerine ait termogramlarda değişmemiştir.

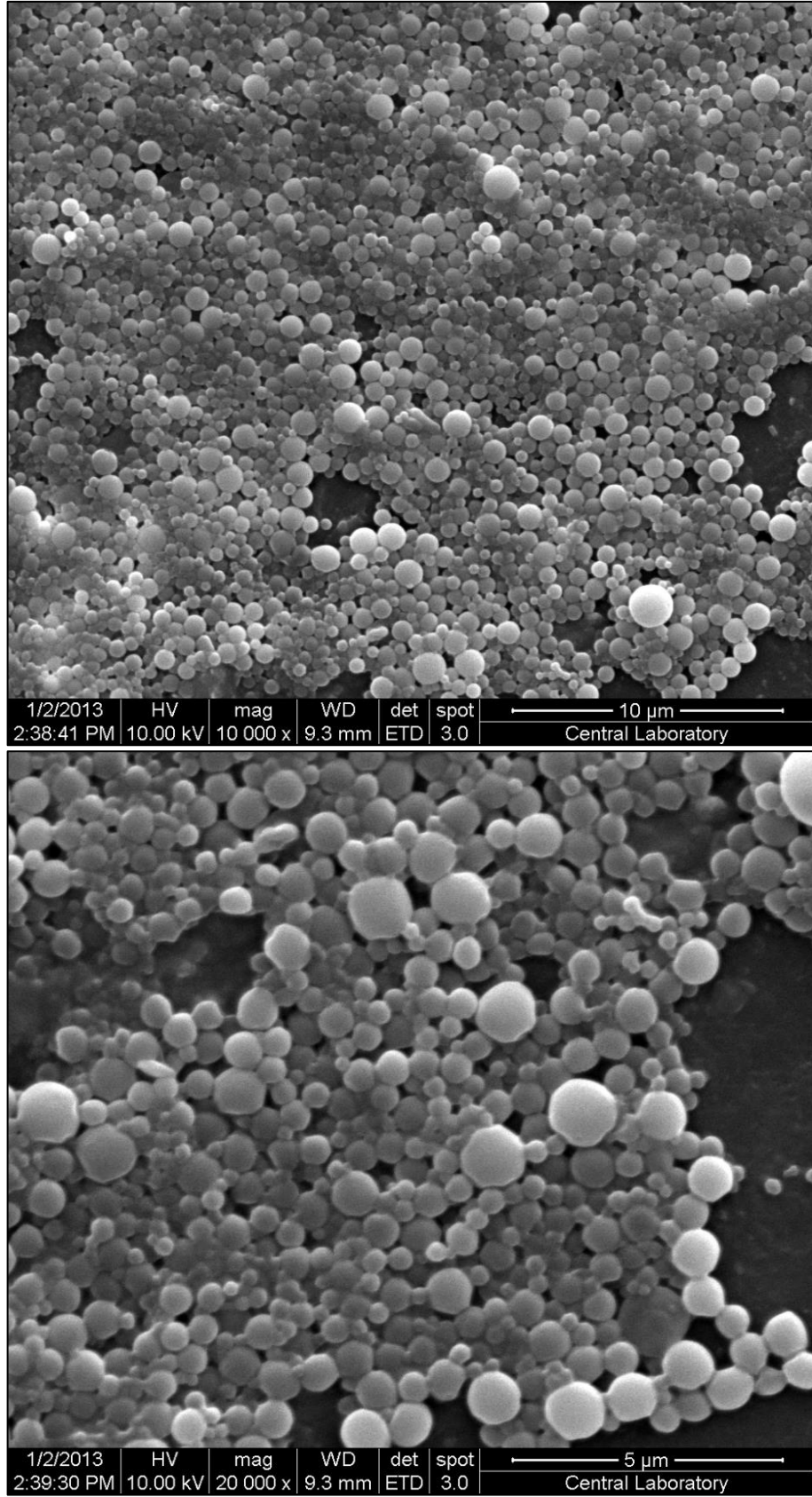
Elde edilen sonuçlar paklitaksel ve PLGA arasında bir geçimsizlik olmadığını göstermektedir.



Şekil 4.19. Paklitaksel, PLGA, paklitaksel-PLGA fiziksel karışımı ve paklitaksel nanopartiküllerine ilişkin DSC termogramları.

4.9. Taramalı Elektron Mikroskopisi

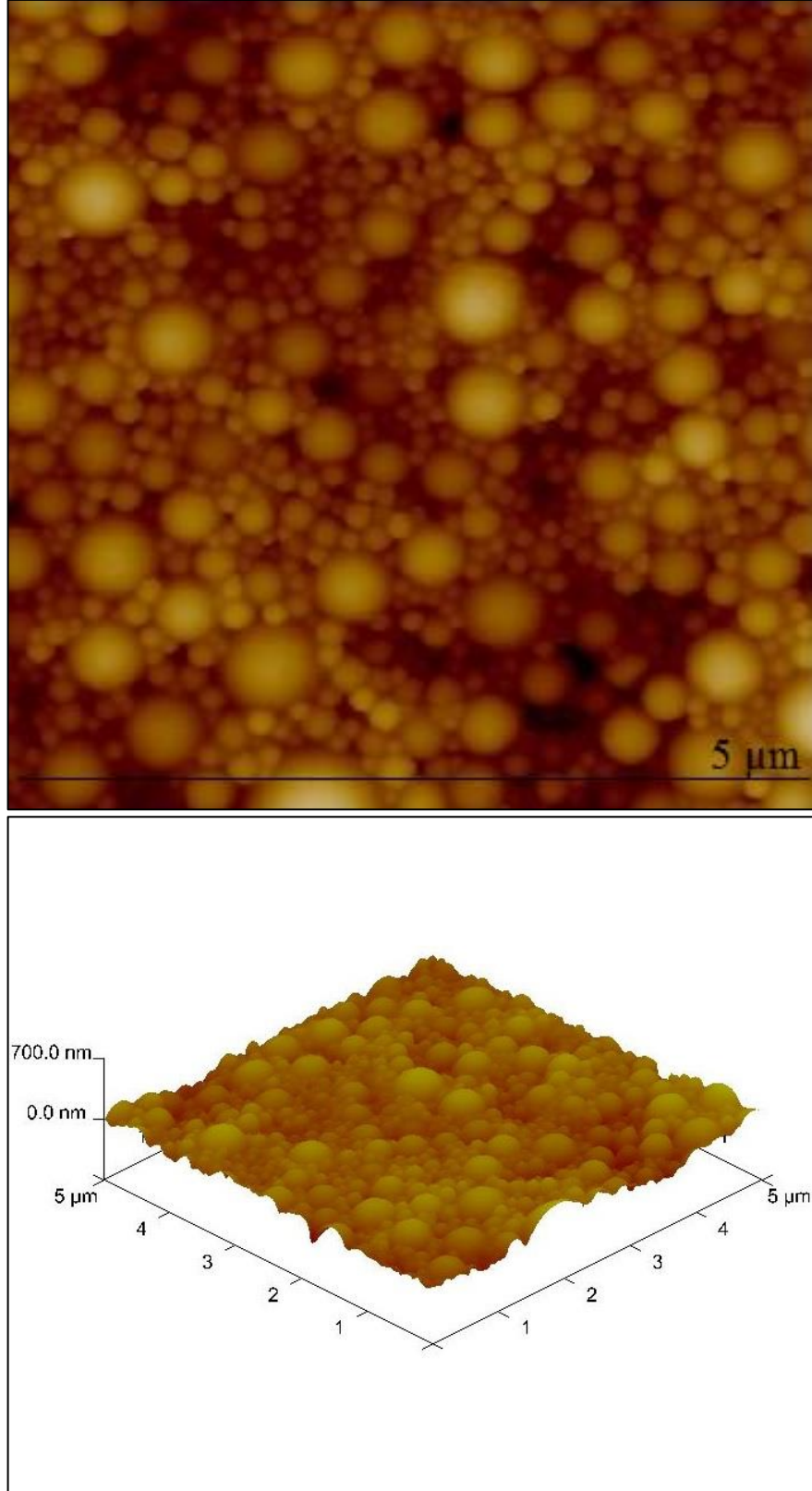
SEM alışmaları geliştirilen nanopartiküllerin homojen dağıldığını, agrege olmadıklarını, küresel yapıda ve düzgün yüzeyle olduklarını göstermektedir. SEM çalışmalarında ölçülen nanopartikül büyüklükleri lazer difraksiyon ve AFM alışmaları ile elde edilen sonuçlar ile uygunluk göstermektedir (şekil 4.20).



Şekil 4.20. Paklitaksel nanopartiküllerinin SEM görüntüleri.

4.10. Atomik Kuvvet Mikroskopisi

Geliştirilen nanopartiküllerin partikül şekli, boyutu ve dağılımlarının incelenmesi için SEM çalışmalarına ek olarak AFM çalışmaları yapılmıştır (Şekil 4.21). AFM görüntülerinden nanopartiküllerin küresel, gözeneksiz, düzgün yüzeyli ve homojen dağıldıkları görülmüştür. İki boyutlu ve üç boyutlu AFM görüntülerinden elde edilen partikül büyüklüğü sonuçları lazer difraksiyon ve SEM çalışmalarından elde edilen sonuçlarla benzerdir.



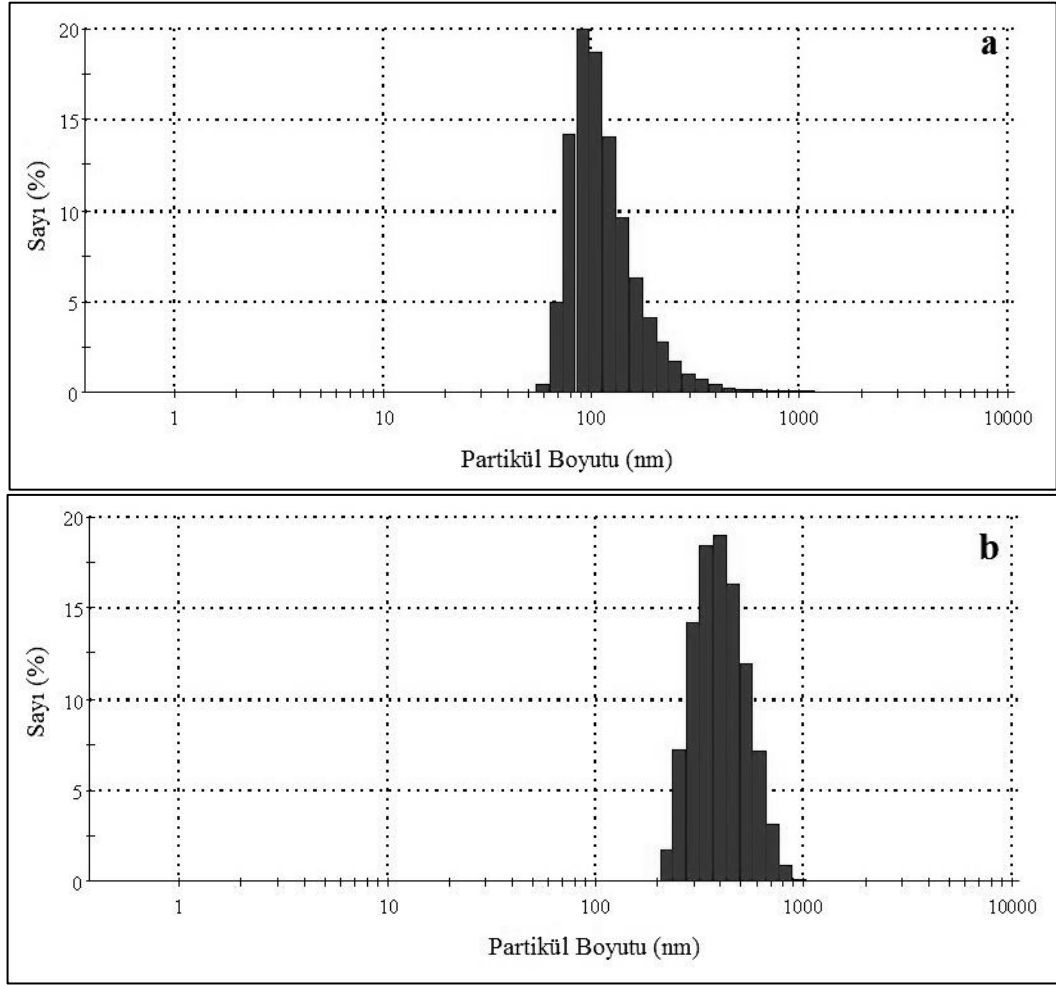
Şekil 4.21. Paklitaksel nanopartiküllerinin AFM görüntüleri.

4.11. Partikül Büyüklüğü Dağılımı

Plackett-Burman deney tasarımı kapsamında hazırlanan formülasyonların partikül büyüklüğü 245,5 nm ile 969,3 nm arasında bulunmuştur. Box-Behnken deney tasarımı ise partikül büyüklüğü sonuçları 286,4 nm ile 875,4 nm arasında bulunmuştur (Tablo 4.8). Her iki deney tasarımı kapsamında üretilen nanopartikül formülasyonlarının partikül büyüklükleri dar bir dağılım göstermiştir ($PDI < 0,50$). Plackett-Burman ve Box-Behnken deney tasarımı kapsamında hazırlanan nanopartikül formülasyonlarına ilişkin temsili histogramlar Şekil 4.22’de verilmiştir.

Tablo 4.8. Plackett-Burman ve Box-Behnken deney tasarımı kapsamında hazırlanan formülasyonların partikül büyüklüğü dağılımı verileri ($n = 3$, SS: standart sapma, CV: değişim katsayısı).

Formülasyon kodu	Partikül büyüklüğü (nm)	SS	CV (%)	PDI
PBD01	245,5	3,1	1,3	0,24
PBD02	297,0	1,5	0,5	0,28
PBD03	552,3	13,9	2,5	0,44
PBD04	443,2	14,6	3,3	0,71
PBD05	340,1	1,2	0,4	0,29
PBD06	969,3	13,7	1,4	0,23
PBD07	297,8	3,6	1,2	0,42
PBD08	268,7	2,0	0,7	0,39
PBD09	736,3	10,5	1,4	0,30
PBD10	702,3	19,3	2,7	0,26
PBD11	260,1	4,7	1,8	0,39
PBD12	364,8	7,1	1,9	0,31
BBD01	600,8	8,5	1,4	0,32
BBD02	608,2	34,6	5,7	0,29
BBD03	491,0	16,3	3,3	0,25
BBD04	562,5	4,8	0,9	0,22
BBD05	337,0	0,5	0,2	0,56
BBD06	421,2	16,5	3,9	0,29
BBD07	834,3	70,8	8,5	0,14
BBD08	348,2	6,3	1,8	0,30
BBD09	286,4	2,0	0,7	0,36
BBD10	875,4	11,6	1,3	0,22
BBD11	618,1	24,3	3,9	0,16
BBD12	557,2	9,8	1,8	0,24
BBD13	485,0	12,9	2,7	0,23
BBD14	572,9	15,9	2,8	0,26
BBD15	674,8	6,2	0,9	0,23



Şekil 4.22. Partikül büyüklüğü dağılımı histogramları: a) PBD11 ve b) BBD06.

4.12. Yüzey Yükü

Hazırlanan tüm formülasyonların yüzey yükü negatiftir ve zeta potansiyeli değerleri Plackett-Burman deney tasarımı formülasyonlarında -59,5 mV ile -25,7 mV arasında, Box-Behnken deney tasarımı formülasyonlarında ise -30,0 mV ile -12,9 mV arasında bulunmuştur (Tablo 4.9).

Tablo 4.9. Plackett-Burman ve Box-Behnken deney tasarımı kapsamındaki formülasyonlara ilişkin zeta potansiyeli değerleri ($n = 3$, SS: standart sapma, CV: değişim katsayısı).

Formülasyon kodu	Zeta potansiyeli (mV)	SS	CV (%)
PBD01	-31,0	1,0	3,2
PBD02	-42,6	1,1	2,6
PBD03	-31,5	0,6	1,9
PBD04	-53,7	1,1	2,0
PBD05	-30,8	0,9	2,9
PBD06	-31,2	1,2	3,8
PBD07	-51,1	0,7	1,4
PBD08	-25,7	0,2	0,8
PBD09	-30,3	0,3	1,0
PBD10	-34,7	0,7	2,0
PBD11	-56,0	2,0	3,6
PBD12	-59,5	0,5	0,8
BBD01	-15,5	0,4	2,6
BBD02	-15,4	0,8	5,2
BBD03	-22,4	0,8	3,6
BBD04	-21,3	1,3	6,1
BBD05	-24,5	0,1	0,4
BBD06	-30,0	0,6	2,0
BBD07	-19,2	1,0	5,2
BBD08	-22,8	0,4	1,8
BBD09	-23,0	0,8	3,5
BBD10	-22,8	0,5	2,2
BBD11	-24,0	1,1	4,6
BBD12	-12,9	3,2	24,8
BBD13	-20,3	1,0	4,9
BBD14	-16,9	0,1	0,6
BBD15	-27,9	0,6	2,2

4.13. Enkapsülasyon Etkinliği

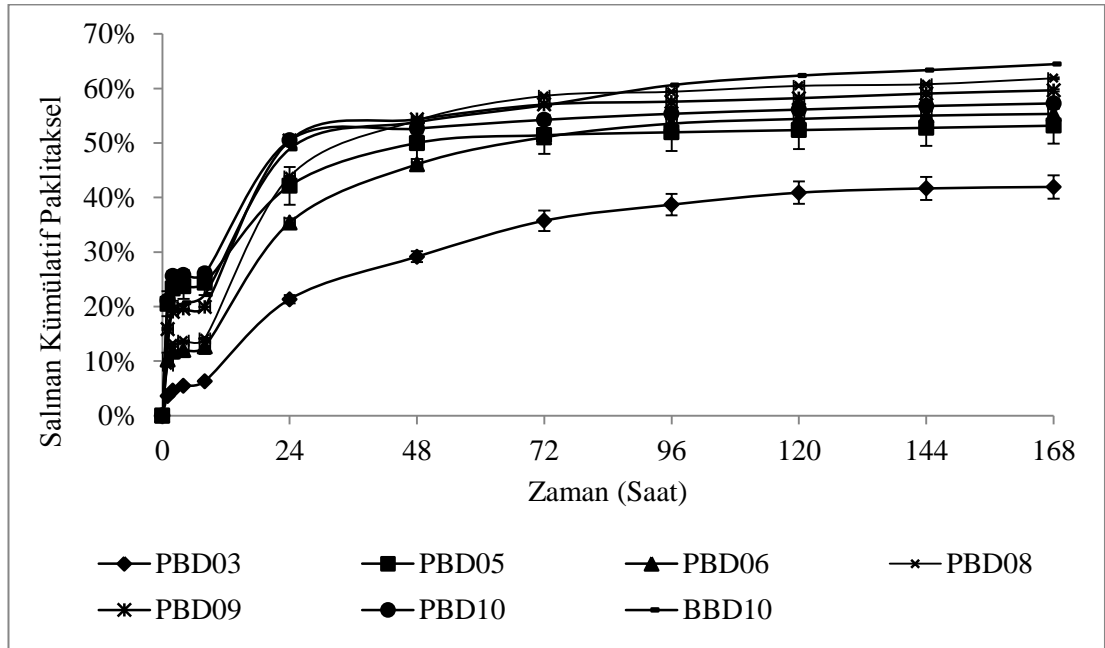
Paklitaksel nanopartiküllerinin enkapsülasyon etkinliği sonuçları Plackett-Burman deney tasarımı kapsamında hazırlanan formülasyonlar için %0,27 ile %64,40 arasında, Box-Behnken deney tasarımı kapsamında hazırlanan formülasyonlar için ise %27,29 ile %66,11 arasında bulunmuştur (Tablo 4.10).

Tablo 4.10. Plackett-Burman ve Box-Behnken deney tasarımı kapsamındaki formülasyonlara ilişkin enkapsülasyon etkinliği değerleri ($n = 3$, SS: standart sapma, CV: değişim katsayısı).

Formülasyon kodu	Enkapsülasyon etkinliği (%)	SS	CV (%)
PBD01	1,67	0,01	0,6
PBD02	1,44	0,01	0,7
PBD03	56,67	0,06	0,1
PBD04	0,34	0,01	2,9
PBD05	64,40	0,51	0,8
PBD06	33,61	0,02	0,1
PBD07	2,12	0,01	0,5
PBD08	20,79	0,07	0,3
PBD09	20,07	0,14	0,7
PBD10	19,49	0,07	0,4
PBD11	1,49	0,01	0,7
PBD12	0,27	0,01	3,7
BBD01	27,29	2,24	8,2
BBD02	55,23	0,06	0,1
BBD03	36,56	1,22	3,3
BBD04	51,85	0,62	1,2
BBD05	38,60	0,58	1,5
BBD06	66,11	0,14	0,2
BBD07	28,51	0,56	2,0
BBD08	41,93	0,59	1,4
BBD09	48,83	0,02	0,0
BBD10	54,21	1,52	2,8
BBD11	41,91	0,81	1,9
BBD12	35,31	0,53	1,5
BBD13	46,74	0,36	0,8
BBD14	42,19	0,79	1,9
BBD15	48,59	0,37	0,8

4.14. *In Vitro* İlaç Salımı

Plackett-Burman deney tasarımı kapsamında hazırlanan paklitaksel nanopartikülerine ilişkin *in vitro* ilaç salım profilleri ve BBD10 kodlu optimum formülasyonun salım profili Şekil 4.23'te verilmiştir. SDS kullanılarak hazırlanan formülasyonlarda enkapsülasyon gözlenmediği için bu formülasyonlar (PBD01, PBD02, PBD04, PBD07, PBD11 ve PBD12) *in vitro* ilaç salım çalışmalarına dahil edilmemiştir.



Şekil 4.23. Plackett-Burman deney tasarımı formülasyonlarının *in vitro* ilaç salımı profilleri ($n = 3$, hata çubukları standart sapmaları göstermektedir).

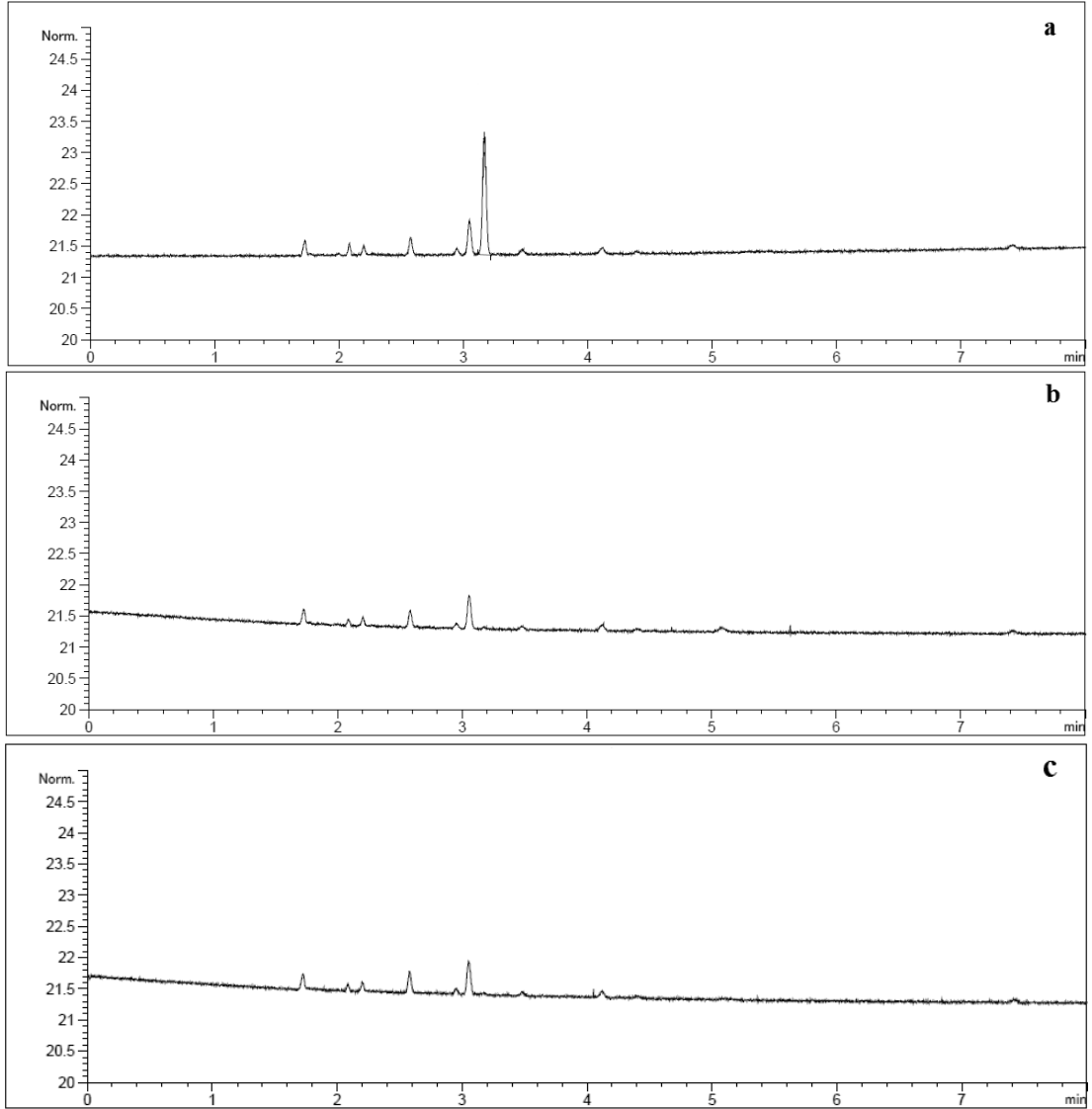
İlaç salım profilleri incelendiğinde PBD05, PBD09 ve PBD10 formülasyonlarında ilk sekiz saat içerisinde ani bir salım fazı ve bunu takiben yedi gün boyunca yavaş ve sürekli bir salım gözlenmiştir. Gözlenen ani salımın nedeninin nanopartiküllerin yüzeyine adsorbe olan paklitaksel fraksiyonu olduğu düşünülmektedir. PBD03, PBD06, PBD08 ve BBD10 formülasyonlarında ilk sekiz saat içerisinde ani salım gözlenmemiştir (kümülatif ilaç salımı < %15).

İlaç salım kinetiği konusunda literatürde çok sayıda tanımlanmış model bulunmaktadır. Hazırlanan paklitaksel nanopartikül formülasyonlarının salım profilleri tanımlanan bu modellerden sıfır derece, birinci derece, Higuchi ve

Langenbucher modellerine uyum yönünden incelenmiştir. Elde edilen sonuçların modele uyumunun göstergesi olan regresyon doğrusunun tanımlayıcılık katsayısı (R^2) değerleri incelendiğinde 0,9766 sonucu ile Weibull (57) tarafından tanımlanan ve Langenbucher (58) tarafından geliştirilen modelin en anlamlı uyumu gösterdiği görülmüştür.

4.15. Çözücü Kalıntısı

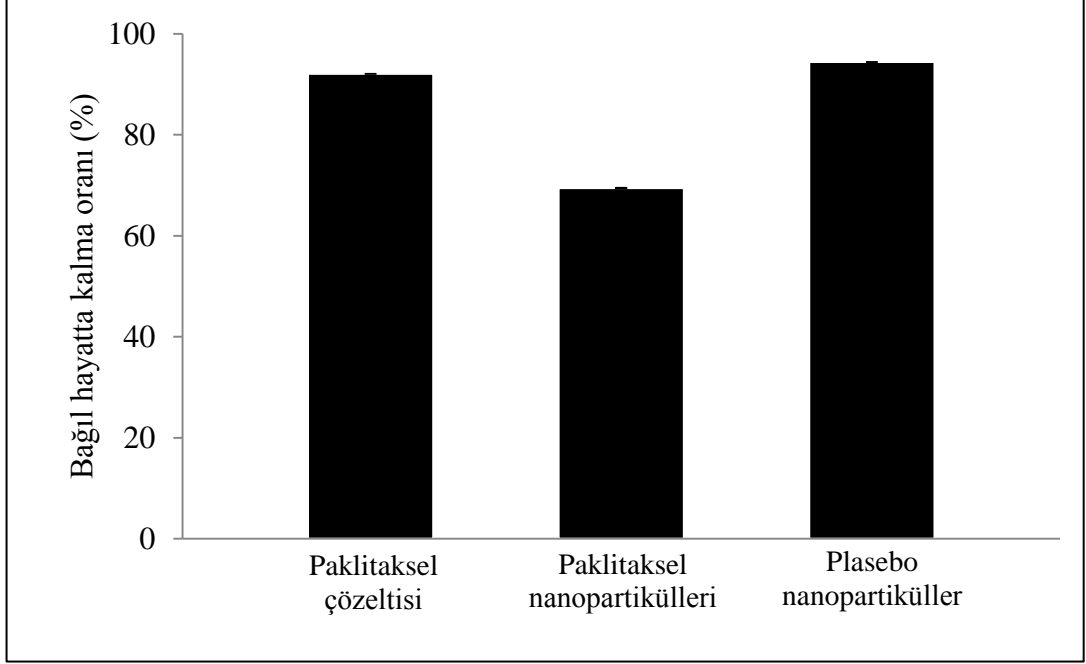
Paklitaksel nanopartikülleri içerisindeki diklorometan kalıntısı gaz kromatografisi yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Geliştirilen yöntemde diklorometanın alıkonma süresi 3,2 dakika ve LOQ değeri 11 ppm olarak bulunmuştur. Test edilen nanopartikül formülasyonunda 3,2 dakika alıkonma süresinde diklorometan piki gözlenmemiş ve nanopartiküllerde diklorometan kalıntısı olmadığı sonucuna varılmıştır (Şekil 4.24).



Şekil 4.24. Gaz kromatografisi kromatogramları: a) diklorometanın DMSO içerisindeki 20 ppm'lik çözeltisi, b) DMSO ve c) DMSO içerisinde çözündürülmüş paklitaksel nanopartikülleri.

4.16. *In Vitro* Sitotoksosite

Paklitaksel nanopartiküllerinin sitotoksitesisi *in vitro* olarak MCF-7 hücre hattı üzerinde araştırılmıştır (Şekil 4.25). Test grupları ile kontrol grupları arasındaki farkın anlamlılığını test etmek için *t* testi yapılmıştır. 48 saat inkübasyonun ardından paklitaksel nanopartiküllerinin plasebo nanopartiküllere ve paklitaksel çözeltisine göre daha sitotoksik olduğu gözlenmiştir ($p < 0,05$). Bununla beraber, paklitaksel çözeltisi de plasebo nanopartiküllere oranla daha sitotoksik bulunmuştur ($p < 0.05$).



Şekil 4.25. 48 saat inkübasyon sonrasında kontrol gruplarına karşı paklitaksel çözeltisi, paklitaksel nanopartikülleri ve plasebo nanopartiküllerin sitotoksosite sonuçları ($n = 5$, hata çubukları standart sapmayı göstermektedir).

5. TARTIŞMA

5.1. Paklitaksel Nanopartiküllerinin Kritik Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi

Yüksek enkapsülasyon etkinliği nanopartikül formülasyonuna yüklenen ilaç miktarını arttırdığından ve böylece dozlamayı kolaylaştırıp ilaç uygulama sıklığını azalttığından kritik bir kalite özelliği olarak kabul edilmiştir. Buna ek olarak, yüksek enkapsülasyon etkinliğinden dolayı birim formülde etkin madde dışındaki matris bileşenlerinin miktarı azaldığından yardımcı maddelerden ve çözücü kalıntılarında kaynaklanan toksisite de azalmaktadır (50). Dolayısıyla, bu çalışmada enkapsülasyon etkinliği optimum nanopartikül formülasyonu kriterlerinden birisi olarak deney tasarımları kapsamında incelenmiştir. Ayrıca, nanopartiküllerin partikül büyüklüklerinin bir fonksiyonu olarak (< 400 nm) katı tümör dokusunda toplanabilmeleri (EPR etkisi) nedeniyle partikül büyüklüğü de kritik kalite özelliği olarak değerlendirilmiş ve optimize edilmiştir. Zeta potansiyeli ise nanopartikül süspansiyonlarının stabilitesinin önemli bir göstergesi olarak kabul edildiği için paklitaksel nanopartiküllerinin kritik kalite özelliği olarak kabul edilmiştir.

5.2. Paklitaksel Nanopartiküllerin Üretim Yöntemi ile Formülasyon Bileşenlerinin Seçilmesi ve Risk Değerlendirmesi Kapsamında Kritik Formülasyon ve Proses Parametrelerinin Belirlenmesi

Bu tez çalışması kapsamında geliştirilen paklitaksel yüklü nanopartiküller, hidrofobik ilaçlar söz konusu olduğunda literatürde en sık tercih edilen yöntemlerden birisi olan Y/S emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanmıştır (59-61). Bu yöntemle paralel olarak ön deneyler ve literatür bilgisi esas alınarak çeşitli formülasyon bileşenleri de belirlenmiştir (62,63). Bu bileşenlerden PLGA kopolimeri taşıyıcı sistem olarak (64-66), diklorometan organik çözücü olarak, PVA ise emülsiyon oluşturmada kullanılan su fazını stabilize etmek amacıyla kullanılmıştır (67). Tercih edilen formülasyon bileşenleri ve üretim yöntemi parametreleri Ishikawa diyagramı kullanılarak değerlendirildiğinde paklitaksel yüklü nanopartiküllerin kritik kalite özelliklerini etkileyebileceği düşünülen dokuz parametre belirlenmiş ve bu parametrelerin sekizinin etkisi deney tasarımları ile incelenmiştir.

Konvansiyonel deney tasarımlarında her bir deneyde bir faktörü değiştirip diğer faktörleri sabit tutmak çok sayıda deney yapılmasına neden olmaktadır. Ayrıca, konvansiyonel tasarımlar ile faktörlerin etkileşim etkileri incelenememekte ve istatistiksel deney tasarımları konvansiyonel yaklaşıma göre daha az deney sayısı ile daha açıklayıcı sonuçlar elde edilmesini sağlamaktadır. Ek olarak, verilerin ekstrapolasyonu ve grafiklenebilmesi sayesinde deney tasarımı ile ürün ve prosesin optimizasyonu mümkündür (68). Literatürde, deney sayısının azaltılması ve daha kullanışlı veri elde edilmesini sağlayabilecek çok sayıda istatistiksel deney tasarımı tanımlanmıştır (69-71). Bir deney tasarımında amaç eğer çok sayıda değişkeni etki şiddetine göre sınıflandırmak ise Plackett-Burman gibi birinci dereceden tasarımlar tercih edilebilir (72). Ancak amaç bir cevap değişkeninin etkisini matematiksel olarak açıklamak veya bir süreci optimize etmek ise Box-Behnken tasarımı gibi ikinci dereceden modellerin tercih edilmesi gereklidir (73).

Bu tez çalışmasında, kullanılan ilk deney tasarımı Plackett-Burman deney tasarımıdır. Plackett-Burman deney tasarımı bağımsız değişkenlerin anlamlılık derecelerine göre elenmesini sağlayan etkili ve sık kullanılan bir deney tasarımıdır (74). Sadece faktörlerin ana etkileri değerlendirildiğinde Plackett-Burman deney tasarımı son derece etkin bir yaklaşımdır. Ancak ana etkenler ile iki faktör etkileşmelerinin etkisi üst üste geçtiğinden iki faktör etkileşmelerinin ihmal edilmesi gerekmektedir. Dolayısıyla bu tasarım genellikle faktörlerin etkili/etkisiz şeklinde sınıflandırıldığı başlangıç aşamalarındaki çalışmalarda tercih edilmektedir (75). Tüm serbestlik derecelerinin ana etkiler için ayrıldığı Plackett-Burman deney tasarımı Hadamard (ortogonal) matrisleri baz alınarak düzenlenmiştir ve veriler birinci dereceden polinomial model ile açıklanır (76). İki düzeyli deney tasarımlarında bağımsız değişkenlerin düzeylerini belirlemek çok önemli bir noktadır. Eğer düşük ve yüksek düzey arasındaki aralık çok dar ise aslında anlamlı bir faktör anlamsız olarak değerlendirilebilir veya tam tersi bir durumda, iki düzey arasındaki aralık çok geniş ise normal şartlar altında anlamsız bir faktör anlamlı olarak değerlendirilebilir ve diğer faktörlerin etkilerini maskeleyebilir (77).

Sunulan bu çalışmada kullanılan diğer deney tasarımı ise Box-Behnken deney tasarımıdır (64). Bu tasarım bir yüzey cevap metodolojisidir ve cevap değişkenlerinin

optimize edilmesi amacıyla az sayıda faktör söz konusu olduğunda tercih edilmektedir (78). Bu tasarım ikinci dereceden bir model olup deney kombinasyonları kübik modelin kenarları ve kenarların orta noktalarından oluşmaktadır. Faktör kombinasyonlarında aynı anda tüm faktörler uç değerler almadığı için deneylerin fiziksel olarak yapılması açısından Box-Behnken deney tasarımı literatürde tanımlanmış diğer tasarımlara göre avantajlıdır (79). Bu çalışmada Plackett-Burman deney tasarımı sonucunda belirlenen üç kritik formülasyon ve proses parametresi Box-Behnken deney tasarımında incelenmiştir. İlk deney tasarımında bu faktörlere ilişkin seçilen düşük ve yüksek düzeyler Box-Behnken tasarımında olduğu şekliyle kabul edilmiş ve ayrıca orta düzeyleri de kullanılmıştır.

Literatür örneklerinde de görüldüğü üzere deney tasarımının oluşturulmasında ve analizinde uygun yazılımların kullanılması çalışmadan elde edilecek verilerin niteliği yönünden çok önemlidir. Bu tez çalışmasında Minitab® 16 (Minitab Inc., ABD) yazılımı deney tasarımlarının oluşturulmasında, regresyon ve varyans analizlerinde ve grafiklerin oluşturulmasında kullanılmıştır (80).

5.3. Formülasyon ve Proses Parametrelerinin Paklitaksel Nanopartiküllerinin Kritik Kalite Özellikleri Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi

Plackett-Burman deney tasarımında görüldüğü üzere SDS ile hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının partikül büyüklüğü PVA ile hazırlanan nanopartiküllere göre daha küçüktür. SDS'nin 40 olan hidrofîl-lipofîl dengesi (*hydrophile-lipophile balance*, HLB) PVA'nın 18 olan HLB değerine oranla daha büyük olduğu için SDS'nin PVA'ya göre daha küçük nanopartikülleri stabilize ettiği düşünülmektedir (32). Plackett-Burman ve Box-Behnken deney tasarımları artan homojenizasyon hızının paklitaksel nanopartiküllerinin partikül büyüklüğünü düşürdüğünü göstermiştir. Bunun nedeni yüksek karıştırma hızının büyük emülsiyon damlacıklarını daha küçük damlacıklara ayırmada daha etkin olmasıdır (23). Artan sürfaktan konsantrasyonunun küçük emülsiyon damlacıklarının birleşip daha büyük damlacıklar oluşturmasını engellemesi beklense de bu çalışmada tam tersi bir sonuç gözlenmiş ve yüksek sürfaktan konsantrasyonlarında daha büyük nanopartiküller

elde edilmiştir. Bunun nedeninin yüksek PVA konsantrasyonunun köprüleme (*bridging*) etkisi dolayısıyla partiküllerin agrege olması olduğu düşünülmektedir (81). Ek olarak, yüksek PLGA miktarı paklitaksel nanopartiküllerinin partikül büyüklüğünü az da olsa arttırmıştır ancak varyans analizi sonuçlarına göre bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0,05$).

Nötral yükteki dispers faz ile nanopartiküllerin çeşitli iyonlar içeren yüzeyi arasındaki elektriksel potansiyel farkı zeta potansiyeli olarak adlandırılmaktadır (5). SDS negatif yüklü, anyonik bir sürfaktan; PVA ise yüksüz, noniyonik bir sürfaktan olduğundan SDS ile hazırlanan nanopartiküllerin zeta potansiyeli PVA ile hazırlananlara göre daha negatif bulunmuştur. Xu ve diğ. (32), SDS veya PVA içeren emülsiyonlarla yaptıkları çalışmada benzer sonuçlar bulmuşlardır. Serbest karboksilik asitten dolayı asidik terminal grup içeren PLGA ile hazırlanan nanopartiküller de ester terminal gruplu PLGA ile hazırlanan nanopartiküllere göre daha yüksek negatif sonuçlar vermiştir. Ayrıca, nanopartiküllerin hazırlama işlemleri esnasında sürfaktan kalıntılarını uzaklaştırmak için iki defa yıkanmasına rağmen sürfaktanların amfifilik yapısından dolayı PLGA polimerlerine güçlü bir şekilde bağlandığı ve nanopartikül yüzeyinden uzaklaştırılmadığı bildirilmiştir (32).

SDS ile hazırlanan nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliği çok düşük bulunmuştur. Xu ve diğ., (32) SDS veya PVA kullanarak emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi ile mikroküreler hazırladıkları çalışmada hem su-yağ-su (S/Y/S) hem de katı-yağ-su (K/Y/S) yöntemlerini kullanmışlardır. Anılan bu çalışmada S/Y/S yöntemi ile elde edilen enkapsülasyon etkinliği sonuçları (%4) K/Y/S yöntemine (%27-46) göre çok daha düşük bulunmuştur. Araştırmacılar, bu durumun paklitaksel ile SDS arasındaki elektrostatik etkileşimlerden dolayı paklitakselin iç fazdan dış faza çıkmasına bağlamaktadır. PLGA miktarının ise enkapsülasyon etkinliği üzerinde pozitif bir etkiye neden olduğu görülmüştür. PLGA miktarının artması ile organik yağ fazının viskozitesi de artmakta böylece katılma hızlanmakta ve paklitakselin iç fazdan dış faza difüzyonu engellenmektedir (23). Buna zıt olarak, artan sürfaktan konsantrasyonunun enkapsülasyon etkinliğini düşürdüğü gözlenmiştir. Çünkü, yüksek sürfaktan konsantrasyonu paklitakselin su

fazı içerisindeki çözünürlüğünü arttırmakta dolayısıyla iç fazdan dış faza difüzyon da artmaktadır (81).

5.4. Paklitaksel Nanopartiküllerinin Fizikokimyasal Özelliklerinin Değerlendirilmesi

Paklitaksel nanopartiküllerinin karakterizasyonu için FTIR, XRD, TGA ve DSC analizleri gerçekleştirilmiştir. DSC etkin maddelerin nanopartiküller içerisindeki fizikokimyasal durumu hakkında kullanışlı bilgiler sağlamaktadır. Eğer etkin madde matris içerisinde katı çözelti, moleküler dispersiyon ya da amorf formda ise termogramda erime endotermi gözlenmez. Amorf haldeki etkin maddeler kristal hallerine göre daha hızlı salım özellikleri gösterdiğinden etkin maddelerin nanopartiküllerdeki fiziksel durumları önemlidir (56). Bu çalışmada, paklitaksel, PLGA, paklitaksel-PLGA fiziksel karışımı ve paklitaksel nanopartikülleri ile DSC çalışmaları yapılmıştır. Paklitakसे ait erime endotermi paklitaksel ve paklitaksel-PLGA fiziksel karışımı termogramlarında gözlenmesine rağmen nanopartikül formülasyonunda bu pik gözlenmemiştir. Bu durum paklitakselin nanopartiküllere yüklenmesini takiben fiziksel halini değiştirmesinden ve/veya tamamen nanopartiküllere enkapsüle olmasından kaynaklanabilir. XRD ve FTIR analizleri bu hipotezi desteklemektedir. Paklitakselin difraktogramına bakıldığında $12,5^{\circ}$ 2θ değerinde kristal yapıya ilişkin keskin ve şiddetli bir pik görülmekte ancak nanopartiküllere ilişkin difraktogramda herhangi bir pik görülmemekte ve elde edilen desen amorf yapıya işaret etmektedir (53). Ayrıca, FTIR çalışmalarında, paklitakसे ait spesifik dalga sayılarında gözlenen pikler nanopartikül spektrumunda gözlenmemiş ve paklitakselin nanopartiküllere tamamen enkapsüle olması dolayısıyla bu piklerin şiddetlerinin azaldığı düşünülmüştür. Dolayısıyla, paklitakselin nanopartiküllere yüklenirken kristal halden amorf hale geçtiği ve nanopartiküllere tamamen enkapsüle olduğu tezi kuvvetlenmektedir (29). Bununla beraber, paklitaksel katı halindeki yapısını değiştirirken PLGA'nın termal özelliklerinde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. PLGA'nın camsı geçiş sıcaklığı hem saf haldeki polimerde, hem paklitaksel ile fiziksel karışımında hem de nanopartikül formülasyonunda 52°C olarak gözlenmiştir. TGA termogramlarına bakıldığında paklitakselin bozunmaya başladığı sıcaklık 231°C ve PLGA için 179

°C'dir. Bozunmanın başladığı bu sıcaklıklar DSC analizleri ile de doğrulanmıştır. Paklitaksele ait DSC termogramında erime endotermini takiben bir bozunma ekzotermi görülmektedir. Buna ek olarak, DSC çalışmaları esnasında paklitakselin erime sıcaklığının değişmediği ve tanımlanmamış pikler gözlenmediği için paklitaksel ile PLGA arasında herhangi fizikokimyasal bir geçimsizlik olmadığı sonucuna da varılabilir. Paklitaksel, PLGA, paklitaksel-PLGA fiziksel karışımı ve paklitaksel nanopartikülleri ile yapılan FTIR çalışmalarında da kimyasal geçimsizliğin bir göstergesi olabilecek yeni fonksiyonel gruplara ilişkin pikler gözlenmemiştir (56).

5.5. *In Vitro* İlaç Salımı

Literatürde paklitakselin etkin madde ve PLGA'nın polimer olarak kullanıldığı çalışmalara bakıldığında paklitaksel ile PLGA arasındaki hidrofobik etkileşimlerden dolayı salım hızlarının genelde yavaş ve kümülatif salınan miktarın da göreceli olarak düşük (%5-35) olduğu görülmektedir (82). DSC ve XRD analizlerinde paklitakselin nanopartiküllere yüklenirken kristal halinden amorf haline dönüştüğü görülmüştür ve bu çalışmada elde edilen göreceli olarak yüksek salım hızları paklitakselin amorf halde olmasıyla açıklanabilir (53). Asit terminal gruba sahip PLGA ile hazırlanan formülasyonlar (özellikle PBD08 ve PBD09) ester terminal gruplu PLGA ile hazırlanan formülasyonlara göre daha hızlı salım özellikleri sergilemiştir. Asit terminal gruba sahip PLGA serbest karboksilik asit grupları içerdiğinden polimerin su çekme ve şişme kapasitesi ester içeren PLGA'ya göre daha yüksektir. Dolayısıyla asit gruplu PLGA ester gruplu PLGA'ya göre daha hidrofilitir ve daha hızlı parçalanmaktadır (30). Buna ek olarak, düşük molekül ağırlıklı (7-17 kDa) PLGA ile hazırlanan PBD05 ve PBD09 formülasyonlardan paklitaksel salımı yüksek molekül ağırlıklı (24-38 kDa) PLGA'nın kullanıldığı formülasyonlara oranla daha hızlı gerçekleşmiştir. Çünkü düşük molekül ağırlığı polimeri daha hidrofilik yapmakta ve nanopartikül yüzeyinde porların oluşması, dolayısıyla salımın hızlanması mümkün olmaktadır. Bu bulgular ışığında ve paklitakselin sudaki çözünürlüğünün düşük olması da gözönünde bulundurulduğunda geliştirilen nanopartiküllerden salımın temel mekanizmasının difüzyon olmadığı ve matrisin erozyonu ile kontrol edildiği düşünülmektedir (66,83). Elde edilen salım

profillerinin literatürde tanımlanmış Weibull-Langenbucher kinetik modeli ile uyumu incelendiğinde bu hipotez kuvvetlenmektedir.

5.6. Çözücü Kalıntısı

ICH tarafından yayımlanan “Q3C (R4) Impurities: Guideline for Residual Solvents” kılavuzuna göre diklorometan Sınıf 2 çözücüdür (84). Kılavuza göre, bu çözücüler genotoksik olmayan karsinojenler veya nörotoksisite ve teratojeniteye neden olabilecek toksisiteye sahip ajanlardır. Diklorometanın ilaç ürünlerinde bulunma miktarı kılavuzlar ve yasal otoriteler tarafından en fazla 600 ppm olacak şekilde sınırlandırılmıştır. Bu çalışmada, emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemiyle nanopartiküller hazırlandığından ve oluşturulan emülsiyonun yağ fazında çözücü olarak diklorometan kullanıldığından çözücü buharlaştırma basamağının etkinliğinin değerlendirilebilmesi için nanopartiküllerdeki diklorometan kalıntısı gaz kromatografisi ile incelenmiştir. Analizler sonucunda nanopartiküllerde bulunan diklorometan miktarının yöntemin LOQ değerinin, 11 ppm’in, altında olduğu ve dolayısıyla ilgili ICH kılavuzuna göre uygun olduğu belirlenmiştir.

5.7. *In Vitro* Sitotoksisite

MCF-7 hücre hattı ile yapılan *in vitro* sitotoksisite çalışmalarında paklitaksel nanopartiküllerinin paklitaksel çözeltisine ve plasebo nanopartiküllere göre daha sitotoksik olduğu görülmüştür. Bu farkın paklitaksel nanopartiküllerinin hücre membranlarından geçişinin serbest paklitaksele göre daha etkin olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (85). Literatürdeki bazı çalışmalarda paklitakselin nanopartiküllere enkapsülasyonu sonucunda hücresel alım ve hücre içi konsantrasyonunun arttığı bildirilmiştir (86,87). 10 nM konsantrasyonda bile paklitakselin sitotoksik etkisi nanoenkapsülasyon sayesinde serbest paklitaksele oranla %25 daha fazladır ve bu sonuç PLGA ile hazırlanan nanopartiküllerin paklitaksel için etkili bir ilaç taşıyıcı sistem olduğunu göstermektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, paklitaksel nanopartikülleri geliştirilmiş ve geliştirilen nanopartiküllerin kritik kalite özellikleri olan partikül büyüklüğü, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliği üzerine formülasyon ve proses parametrelerinin etkisi Plackett-Burman ve Box-Behnken istatistiksel deney tasarımları kullanılarak QbD konseptinde değerlendirilmiştir.

Paklitaksel nanopartikülleri Y/S emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanmış ve liyofilize edilmiştir. Ishikawa diyagramı ile formülasyon ve üretim yöntemine ilişkin potansiyel risk faktörlerinin belirlenmesi amacıyla bir risk belirleme çalışması yapılmış ve yağ fazı içerisindeki paklitaksel miktarı, PLGA miktarı, PLGA molekül ağırlığı, PLGA terminal grubu, su fazındaki sürfaktan konsantrasyonu, sürfaktan tipi, homojenizasyon hızı ve homojenizasyon süresi parametreleri potansiyel risk faktörü olarak belirlenmiştir. Risk faktörlerinin belirlenmesinin ardından birinci dereceden bir istatistiksel deney tasarımı olan Plackett-Burman deney tasarımı kullanılarak belirlenen bu risk faktörlerinin nanopartiküllerin kritik kalite özellikleri üzerine etkisi istatistiksel olarak incelenmiştir. Bu deney tasarımı kapsamında yapılan regresyon ve varyans analizi sonucunda yağ fazında kullanılan PLGA miktarı, su fazındaki sürfaktan konsantrasyonu ve emülsiyonun homojenize edilme hızının paklitaksel nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliği özelliklerini etkilediği, dolayısıyla bu faktörlerin kritik formülasyon ve proses parametreleri olduğu görülmüştür. Kritik formülasyon ve proses parametrelerinin belirlenmesinin ardından bu parametrelerin nanopartiküllerin kritik kalite özellikleri üzerindeki etkisini matematiksel modellerle açıklamak ve bir tasarım aralığı elde etmek için ikinci dereceden bir istatistiksel deney tasarımı olan Box-Behnken deney tasarımı kullanılmıştır. Box-Behnken deney matrisindeki onbeş formülasyon hazırlanmış ve partikül büyüklüğü, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliği analizleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar regresyon ve varyans analizi ile değerlendirildiğinde kurulan matematiksel modellerin faktörlerin partikül büyüklüğü ve enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisini açıklayabildiği ancak zeta potansiyeli için kurulan modelin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. Bu veriler ışığında

paklitaksel nanopartiküllerinin optimizasyonu için minimum partikül büyüklüğü ve maksimum enkapsülasyon etkinliği değerleri hedef olarak belirlenerek bir tasarım aralığı oluşturulmuş ve arzulanabilirlik fonksiyonu kullanılarak optimum bir nanopartikül formülasyonu elde edilmiştir. Hazırlanan bu formülasyon incelendiğinde elde edilen pratik sonuçlar ile tasarım aralığından elde edilen kestirim sonuçlarının istatistiksel uyumunun anlamlı olduğu görülmüştür. Sonuç olarak geliştirilen paklitaksel nanopartiküllerinin kritik kalite özellikleri üzerine formülasyon ve proses parametrelerinin etkisini açıklayan matematiksel modeller kurulmuş ve başarılı bir tasarım aralığı elde edilmiştir.

Box-Behnken deney tasarımı sonucunda oluşturulan tasarım aralığı kullanılarak hazırlanan paklitaksel yüklü nanopartikül formülasyonu fizikokimyasal özellikleri yönünden karakterize edilmiştir. SEM ve AFM çalışmaları elde edilen nanopartiküllerin küresel şekilde, pürüzsüz yüzeyle olduklarını ve homojen dağıldıklarını göstermiştir. FTIR, XRD ve DSC çalışmalarında ise paklitaksel ile PLGA arasında herhangi bir geçimsizlik olmadığı, paklitakselin nanopartiküllere tamamen enkapsüle olduğu ve enkapsülasyon sırasında kristal halden amorf hale geçtiği görülmüştür. Formülasyonun hazırlanması sırasında kullanılan organik çözücü olan diklorometanın liyofilize nanopartiküllerde kalan miktarının tayini için gaz kromatografisi analizi yapılmış ve nanopartiküllerde diklorometan kalıntısı saptanmamıştır. Geliştirilen paklitaksel yüklü nanopartiküllerin *in vitro* sitotoksikite etkisi insan meme karsinomu hücre hattı üzerinde plasebo nanopartiküllere ve paklitaksel çözeltisine karşı incelenmiş ve paklitaksel nanopartikül formülasyonunun daha sitotoksik olduğu görülmüştür.

Paklitaksel yüklü nanopartiküllerin formülasyon ve proses parametrelerine ilişkin elde edilen veriler her ne kadar bu çalışmaya spesifik olsa da bu çalışmadan elde edilen temel bilgiler birçok nanopartiküler sistemin geliştirilmesinde kullanılabilir. Bu çalışmanın devamında formülasyon ve proses parametrelerinin üretim prosesi ve formülasyon üzerine etkilerini daha detaylı inceleyip anlayabilmek için yakın kızılötesi spektroskopisi (*near infrared spectroscopy*) kullanılarak PAT çalışmalarının yapılmasının gerekli olduğu düşünülmekte ve bu şekilde planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

1. FDA. (2004). *Guidance for Industry: PAT - A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance*.
2. ICH. (2009). *Q8(R2) Pharmaceutical Development*.
3. Lionberger, R. A., Lee, S. L., Lee, L., Raw, A. ve Yu, L. X. (2008). Quality by design: concepts for ANDAs. *AAPS Journal*, 10 (2), 268-276.
4. Shah, R. B., Zidan, A. S., Funck, T., Tawakkul, M. A., Nguyenpho, A. ve Khan, M. A. (2007). Quality by design: characterization of self-nano-emulsified drug delivery systems (SNEDDs) using ultrasonic resonator technology. *International Journal of Pharmaceutics*, 341 (1-2), 189-194.
5. Zidan, A. S., Sammour, O. A., Hammad, M. A., Megrab, N. A., Habib, M. J. ve Khan, M. A. (2007). Quality by design: understanding the product variability of a self-nanoemulsified drug delivery system of cyclosporine A. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96 (9), 2409-2423.
6. Xie, L., Wu, H., Shen, M., Augsburger, L. L., Lyon, R. C., Khan, M. A. ve diğeri. (2008). Quality-by-design (QbD): effects of testing parameters and formulation variables on the segregation tendency of pharmaceutical powder measured by the ASTM D 6940-04 segregation tester. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97 (10), 4485-4497.
7. Verma, S., Lan, Y., Gokhale, R. ve Burgess, D. J. (2009). Quality by design approach to understand the process of nanosuspension preparation. *International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, 377 (1-2), 185-198.
8. Wu, H. ve Khan, M. A. (2009). Quality-by-design (QbD): an integrated approach for evaluation of powder blending process kinetics and determination of powder blending end-point. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98 (8), 2784-2798.

9. Wu, H., Tawakkul, M., White, M. ve Khan, M. A. (2009). Quality-by-design (QbD): an integrated multivariate approach for the component quantification in powder blends. *International Journal of Pharmaceutics*, 372 (1-2), 39-48.
10. Wu, H. ve Khan, M. A. (2010). Quality-by-design (QbD): an integrated process analytical technology (PAT) approach for real-time monitoring and mapping the state of a pharmaceutical coprecipitation process. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99 (3), 1516-1534.
11. Mockus, L. N., Paul, T. W., Pease, N. A., Harper, N. J., Basu, P. K., Oslos, E. A. ve diğerleri. (2011). Quality by design in formulation and process development for a freeze-dried, small molecule parenteral product: a case study. *Pharmaceutical Development and Technology*, 16 (6), 549-576.
12. Aksu, B., Paradkar, A., de Matas, M., Ozer, O., Guneri, T. ve York, P. (2012). Quality by design approach: application of artificial intelligence techniques of tablets manufactured by direct compression. *AAPS PharmSciTech*, 13 (4), 1138-1146.
13. Aksu, B., Paradkar, A., de Matas, M., Ozer, O., Guneri, T. ve York, P. (2013). A quality by design approach using artificial intelligence techniques to control the critical quality attributes of ramipril tablets manufactured by wet granulation. *Pharmaceutical Development and Technology*, 18 (1), 236-245.
14. Xu, X., Costa, A. P., Khan, M. A. ve Burgess, D. J. (2012). Application of quality by design to formulation and processing of protein liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, 434 (1-2), 349-359.
15. Xu, X., Khan, M. A. ve Burgess, D. J. (2012). A quality by design (QbD) case study on liposomes containing hydrophilic API: II. Screening of critical variables, and establishment of design space at laboratory scale. *International Journal of Pharmaceutics*, 423 (2), 543-553.
16. Awotwe-Otoo, D., Agarabi, C., Faustino, P. J., Habib, M. J., Lee, S., Khan, M. A. ve diğerleri. (2012). Application of quality by design elements for the

development and optimization of an analytical method for protamine sulfate. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 62, 61-67.

17. Adam, S., Suzzi, D., Radeke, C. ve Khinast, J. G. (2011). An integrated duality by design (QbD) approach towards design space definition of a blending unit operation by discrete element method (DEM) simulation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 42 (1-2), 106-115.

18. Vanaja, K. ve Shobha Rani, R. H. (2007). Design of experiments: concept and applications of Plackett-Burman design. *Clinical Research and Regulatory Affairs*, 24 (1), 1-23.

19. Box, G. E. P. ve Behnken, D. W. (1960). Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*, 2 (4), 455-475.

20. Plackett, R. L. ve Burman, J. P. (1946). The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, 33 (4), 305-325.

21. Khan, M. A., Sastry, S. V., Vaithiyalingam, S. R., Agarwal, V., Nazzal, S. ve Reddy, I. K. (2000). Captopril gastrointestinal therapeutic system coated with cellulose acetate pseudolatex: evaluation of main effects of several formulation variables. *International Journal of Pharmaceutics*, 193 (2), 147-156.

22. Ahuja, S. K., Ferreira, G. M. ve Moreira, A. R. (2004). Application of Plackett-Burman design and response surface methodology to achieve exponential growth for aggregated shipworm bacterium. *Biotechnology and Bioengineering*, 85 (6), 666-675.

23. Rahman, Z., Zidan, A. S., Habib, M. J. ve Khan, M. A. (2010). Understanding the quality of protein loaded PLGA nanoparticles variability by Plackett-Burman design. *International Journal of Pharmaceutics*, 389 (1-2), 186-194.

24. Jin, S. J., Yoo, Y. H., Kim, M. S., Kim, J. S., Park, J. S. ve Hwang, S. J. (2008). Paroxetine hydrochloride controlled release POLYOX matrix tablets: screening of formulation variables using Plackett-Burman screening design. *Archives of Pharmacal Research*, 31 (3), 399-405.

25. Zidan, A. S., Sammour, O. A., Hammad, M. A., Megrab, N. A., Habib, M. J. ve Khan, M. A. (2007). Quality by design: understanding the formulation variables of a cyclosporine A self-nanoemulsified drug delivery systems by Box-Behnken design and desirability function. *International Journal of Pharmaceutics*, 332 (1-2), 55-63.
26. Lewis, G., Mathieu, D. ve Phan-Tan-Luu, R. (2008). *Pharmaceutical Experimental Design*. New York, USA: Informa Healthcare USA, Inc.
27. Ferreira, S. L. C., Bruns, R. E., Ferreira, H. S., Matos, G. D., David, J. M., Brandao, G. C. ve diğerleri. (2007). Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, 597 (2), 179-186.
28. Awotwe-Otoo, D., Agarabi, C., Wu, G. K., Casey, E., Read, E., Lute, S. ve diğerleri. (2012). Quality by design: impact of formulation variables and their interactions on quality attributes of a lyophilized monoclonal antibody. *International Journal of Pharmaceutics*, 438 (1-2), 167-175.
29. Wang, C., Wang, Y., Wang, Y., Fan, M., Luo, F. ve Qian, Z. (2011). Characterization, pharmacokinetics and disposition of novel nanoscale preparations of paclitaxel. *International Journal of Pharmaceutics*, 414 (1-2), 251-259.
30. Wischke, C. ve Schwendeman, S. P. (2008). Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 364 (2), 298-327.
31. Cun, D., Jensen, D. K., Maltesen, M. J., Bunker, M., Whiteside, P., Scurr, D. ve diğerleri. (2011). High loading efficiency and sustained release of siRNA encapsulated in PLGA nanoparticles: quality by design optimization and characterization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 77 (1), 26-35.
32. Xu, Q., Crossley, A. ve Czernuszka, J. (2009). Preparation and characterization of negatively charged poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98 (7), 2377-2389.

33. Singla, A. K., Garg, A. ve Aggarwal, D. (2002). Paclitaxel and its formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, 235 (1-2), 179-192.
34. Bhardwaj, V., Ankola, D. D., Gupta, S. C., Schneider, M., Lehr, C. M. ve Kumar, M. N. V. R. (2009). PLGA nanoparticles stabilized with cationic surfactant: safety studies and application in oral delivery of paclitaxel to treat chemical-induced breast cancer in rat. *Pharmaceutical Research*, 26 (11), 2495-2503.
35. Kollipara, S., Bende, G., Movva, S. ve Saha, R. (2010). Application of rotatable central composite design in the preparation and optimization of poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for controlled delivery of paclitaxel. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 36 (11), 1377-1387.
36. USP35-NF30. (2013). *Paclitaxel*. Rockville, USA: The United States Pharmacopeial Convention.
37. Weiss, R. B., Donehower, R. C., Wiernik, P. H., Ohnuma, T., Gralla, R. J., Trump, D. L. ve diğerleri. (1990). Hypersensitivity reactions from taxol. *Journal of Clinical Oncology*, 8 (7), 1263-1268.
38. Fonseca, C., Simoes, S. ve Gaspar, R. (2002). Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity. *Journal of Controlled Release*, 83 (2), 273-286.
39. Green, M. R., Manikhas, G. M., Orlov, S., Afanasyev, B., Makhson, A. M., Bhar, P. ve diğerleri. (2006). Abraxane, a novel Cremophor-free, albumin-bound particle form of paclitaxel for the treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *Annals of Oncology*, 17 (8), 1263-1268.
40. ClinicalTrials.gov. U.S. National Institutes of Health. (12.2012), <http://www.clinicaltrials.gov/>
41. Danhier, F., Lecouturier, N., Vroman, B., Jerome, C., Marchand-Brynaert, J., Feron, O. ve diğerleri. (2009). Paclitaxel-loaded PEGylated PLGA-based nanoparticles: in vitro and in vivo evaluation. *Journal of Controlled Release*, 133 (1), 11-17.

42. Danhier, F., Vroman, B., Lecouturier, N., Crockart, N., Pourcelle, V., Freichels, H. ve diğerleri. (2009). Targeting of tumor endothelium by RGD-grafted PLGA-nanoparticles loaded with paclitaxel. *Journal of Controlled Release*, 140 (2), 166-173.
43. Heslinga, M. J., Mastria, E. M. ve Eniola-Adefeso, O. (2009). Fabrication of biodegradable spheroidal microparticles for drug delivery applications. *Journal of Controlled Release*, 138 (3), 235-242.
44. Jin, C., Bai, L., Wu, H., Song, W., Guo, G. Z. ve Dou, K. F. (2009). Cytotoxicity of paclitaxel incorporated in PLGA nanoparticles on hypoxic human tumor cells. *Pharmaceutical Research*, 26 (7), 1776-1784.
45. Ong, B. Y. S., Ranganath, S. H., Lee, L. Y., Lu, F., Lee, H. S., Sahinidis, N. V. ve diğerleri. (2009). Paclitaxel delivery from PLGA foams for controlled release in post-surgical chemotherapy against glioblastoma multiforme. *Biomaterials*, 30 (18), 3189-3196.
46. Shavi, G. V., Kumar, A. R., Karthik, A., Naseer, M., Aravind, G., Praful, B. D. ve diğerleri. (2010). Novel paclitaxel nanoparticles: development, in vitro anti-tumor activity in BT-549 cells and in vivo evaluation. *Journal of Controlled Release*, 148 (1), E119-E121.
47. Reul, R., Renette, T., Bege, N. ve Kissel, T. (2011). Nanoparticles for paclitaxel delivery: a comparative study of different types of dendritic polyesters and their degradation behavior. *International Journal of Pharmaceutics*, 407 (1-2), 190-196.
48. Chakravarthi, S. S., De, S. J., Miller, D. W. ve Robinson, D. H. (2010). Comparison of anti-tumor efficacy of paclitaxel delivered in nano- and microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 383 (1-2), 37-44.
49. Bodmeier, R. ve McGinity, J. W. (1987). The preparation and evaluation of drug-containing poly(dl-lactide) microspheres formed by the solvent evaporation method. *Pharmaceutical Research*, 4 (6), 465-471.

50. Xu, X., Khan, M. A. ve Burgess, D. J. (2011). A quality by design (QbD) case study on liposomes containing hydrophilic API: I. Formulation, processing design and risk assessment. *International Journal of Pharmaceutics*, 419 (1-2), 52-59.
51. ICH. (2005). *Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*
52. Yang, T., Cui, F. D., Choi, M. K., Cho, J. W., Chung, S. J., Shim, C. K. ve diğerleri. (2007). Enhanced solubility and stability of PEGylated liposomal paclitaxel: in vitro and in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, 338 (1-2), 317-326.
53. Gao, C. L., Pan, J., Lu, W. Y., Zhang, M., Zhou, L. ve Tian, J. (2009). In-vitro evaluation of paclitaxel-loaded MPEG-PLGA nanoparticles on laryngeal cancer cells. *Anti-Cancer Drugs*, 20 (9), 807-814.
54. Sarisozen, C., Vural, I., Levchenko, T., Hincal, A. A. ve Torchilin, V. P. (2012). PEG-PE-based micelles co-loaded with paclitaxel and cyclosporine A or loaded with paclitaxel and targeted by anticancer antibody overcome drug resistance in cancer cells. *Drug Delivery*, 19 (4), 169-176.
55. FDA. (2000). *Analytical Procedures and Methods Validation, Draft Guidance for Industry*.
56. Alipour, S., Montaseri, H. ve Tafaghodi, M. (2010). Preparation and characterization of biodegradable paclitaxel loaded alginate microparticles for pulmonary delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 81 (2), 521-529.
57. Weibull, W. (1951). A statistical distribution function of wide applicability. *Journal of Applied Mechanics: Transactions of the ASME*, 18 (3), 293-297.
58. Langenbucher, F. (1972). Linearization of dissolution rate curves by the Weibull distribution. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 24 (12), 979-981.
59. Agnihotri, S. M. ve Vavia, P. R. (2009). Drug loaded poly[Lac(Glc-Leu)] microparticles: Formulation and release characteristics. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 74 (1), 336-339.

60. Chen, X. ve Ooi, C. P. (2008). Hydrolytic degradation and drug release properties of ganciclovir-loaded biodegradable microspheres. *Acta Biomaterialia*, 4 (4), 1046-1056.
61. Lai, M. K. ve Tsiang, R. C. C. (2004). Encapsulating acetaminophen into poly(L-lactide) microcapsules by solvent-evaporation technique in an O/W emulsion. *Journal of Microencapsulation*, 21 (3), 307-316.
62. Cirpanli, Y., Yerlikaya, F., Ozturk, K., Erdogor, N., Launay, M., Gegu, C. ve diğeri. (2010). Comparative evaluation of in vitro parameters of tamoxifen citrate loaded poly(lactide-co-glycolide), poly(epsilon-caprolactone) and chitosan nanoparticles. *Pharmazie*, 65 (12), 867-870.
63. Ozturk, K., Caban, S., Kozlu, S., Kadayifci, E., Yerlikaya, F. ve Capan, Y. (2010). The influence of technological parameters on the physicochemical properties of blank PLGA nanoparticles. *Pharmazie*, 65 (9), 665-669.
64. Achim, M., Tomuta, I., Vlase, L., Iuga, C., Moldovan, M. ve Leucuta, S. E. (2008). Paclitaxel-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres: preparation and in vitro evaluation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 18 (6), 410-416.
65. Feng, S. S., Mu, L., Win, K. Y. ve Huang, G. F. (2004). Nanoparticles of biodegradable polymers for clinical administration of paclitaxel. *Current Medicinal Chemistry*, 11 (4), 413-424.
66. Feng, S. S. ve Huang, G. F. (2001). Effects of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel (Taxol (R)) from nanospheres of biodegradable polymers. *Journal of Controlled Release*, 71 (1), 53-69.
67. Guo, K. ve Chu, C. C. (2009). Biodegradable and Injectable Paclitaxel-Loaded Poly(ester amide)s Microspheres: Fabrication and Characterization. *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials*, 89B (2), 491-500.
68. Fisher, J. W. ve Mayne, J. W. (1960). Some views on the statistical design of experiments. *Medical Services Journal, Canada*, 16, 397-414.

69. Cilurzo, F., Minghetti, P., Gennari, C. G., Casiraghi, A., Selmin, F. ve Montanari, L. (2013). Formulation study of a patch containing propranolol by design of experiments. *Drug Development and Industrial Pharmacy*.
70. Maltesen, M. J., van de Weert, M. ve Grohgan, H. (2012). Design of experiments-based monitoring of critical quality attributes for the spray-drying process of insulin by NIR spectroscopy. *AAPS PharmSciTech*, 13 (3), 747-755.
71. Fahmy, R., Kona, R., Dandu, R., Xie, W., Claycamp, G. ve Hoag, S. W. (2012). Quality by design I: Application of failure mode effect analysis (FMEA) and Plackett-Burman design of experiments in the identification of "main factors" in the formulation and process design space for roller-compacted ciprofloxacin hydrochloride immediate-release tablets. *AAPS PharmSciTech*, 13 (4), 1243-1254.
72. Alayoubi, A., Nazzal, M., Sylvester, P. W. ve Nazzal, S. (2013). "Vitamin E" fortified parenteral lipid emulsions: Plackett-Burman screening of primary process and composition parameters. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 39 (2), 363-373.
73. Maurya, D. P., Sultana, Y., Aqil, M. ve Ali, A. (2012). Formulation and optimization of rifampicin microparticles by Box-Behnken statistical design. *Pharmaceutical Development Technology*, 17 (6), 687-696.
74. Oita, I., Halewyck, H., Pieters, S., Dejaegher, B., Thys, B., Rombaut, B. ve diğerleri. (2009). Improving the capillary electrophoretic analysis of poliovirus using a Plackett-Burman design. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 50 (4), 655-663.
75. Dejaegher, B., Dumarey, M., Capron, X., Bloomfield, M. S. ve Vander Heyden, Y. (2007). Comparison of Plackett-Burman and supersaturated designs in robustness testing. *Analytica Chimica Acta*, 595 (1-2), 59-71.
76. Sastry, S. V. ve Khan, M. A. (1998). Aqueous based polymeric dispersion: Plackett-Burman design for screening of formulation variables of atenolol gastrointestinal therapeutic system. *Pharmaceutica Acta Helveticae*, 73 (2), 105-112.

77. Rahman, Z., Zidan, A. S., Habib, M. J. ve Khan, M. A. (2010). Understanding the quality of protein loaded PLGA nanoparticles variability by Plackett-Burman design. *International Journal of Pharmaceutics*, 389 (1-2), 186-194.
78. Ribeiro, A. F., de Oliveira Rezende, R. L., Cabral, L. M. ve de Sousa, V. P. (2013). Poly varepsilon-caprolactone nanoparticles loaded with *Uncaria tomentosa* extract: preparation, characterization, and optimization using the Box-Behnken design. *International Journal of Nanomedicine*, 8, 431-442.
79. Vittal, G. V., Deveswaran, R., Bharath, S., Basavaraj, B. ve Madhavan, V. (2012). Formulation and characterization of ketoprofen liquisolid compacts by Box-Behnken design. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 2 (3), 150-156.
80. Shah, D. ve Londhe, V. (2011). Optimization and characterization of levamisole-loaded chitosan nanoparticles by ionic gelation method using 2(3) factorial design by Minitab 15. *Therapeutic Delivery*, 2 (2), 171-179.
81. Yang, Q. ve Owusu-Ababio, G. (2000). Biodegradable progesterone microsphere delivery system for osteoporosis therapy. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 26 (1), 61-70.
82. Jackson, J. K., Hung, T., Letchford, K. ve Burt, H. M. (2007). The characterization of paclitaxel-loaded microspheres manufactured from blends of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and low molecular weight diblock copolymers. *International Journal of Pharmaceutics*, 342 (1-2), 6-17.
83. Costa, P., Manuel, J. ve Lobo, S. (2001). Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13 (2), 123-133.
84. ICH. (2009). *Q3C(R4) Impurities: Guideline for Residual Solvents*.
85. Zhao, D., Zhao, X., Zu, Y., Li, J., Zhang, Y., Jiang, R. ve diğerleri. (2010). Preparation, characterization, and in vitro targeted delivery of folate-decorated paclitaxel-loaded bovine serum albumin nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 5, 669-677.

86. Dong, X., Mattingly, C. A., Tseng, M. T., Cho, M. J., Liu, Y., Adams, V. R. ve diğeri. (2009). Doxorubicin and paclitaxel-loaded lipid-based nanoparticles overcome multidrug resistance by inhibiting P-glycoprotein and depleting ATP. *Cancer Research*, 69 (9), 3918-3926.

87. Shin, J. Y., Yang, Y., Heo, P., Lee, J. C., Kong, B., Cho, J. Y. ve diğeri. (2012). pH-responsive high-density lipoprotein-like nanoparticles to release paclitaxel at acidic pH in cancer chemotherapy. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 2805-2816.

