

**pH Cevaplayabilen PEG-Peptid Konjugatı Bazlı Antikanser
İlaç Taşıyıcı Sistemleri Geliştirilmesi**

Program Kodu: 3501

Proje No: 112S554

Proje Yürütücüsü:
Yrd. Doç. Dr. Ayben TOP

Danışmanlar:

Prof. Dr. Esmâ Volga BULMUŞ-ZAREİE

Prof. Dr. Hatice Yeşim KARASULU

Prof. Dr. Yusuf BARAN

Bursiyerler:

Beste BALCI

Nesligül YÜKSEL

ARALIK 2016
İZMİR

ÖNSÖZ

Nanoboyutta ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi son yıllarda artan bir önem kazanmıştır. Bu sistemlerin çoğu pasif ve aktif hedefleme stratejisi kullanarak ilacı seçimli bir şekilde taşımak için tasarlanmıştır. Geçtiğimiz yıllarda, bu seçimli sistemlere endozomal bölmelerde hızlı ilaç salma özelliği sağlamak amacıyla pH cevaplama birimleri eklenmiş ve bu sistemlerin pH cevaplamayan sistemlere göre terapötik etkisinin daha fazla olduğu deneysel olarak ispatlanmıştır. Ayrıca endozomal enzimlerle bozunma özelliğine sahip, peptid dizinlerinin ilaç taşıyıcı sisteme eklenmesinin ilaç salım hızını daha da arttırdığı gösterilmiştir. Bu bilgilerin ışığında, bu çalışma kapsamında mPEG-peptid ve model ilaç doksorubisinin (DOX) kimyasal bağla taşıyıcı sisteme bağlandığı iki grup ilaç taşıyıcı sistemi geliştirilmiştir. Birinci grupta model ilaç taşıyıcı sisteme asidik ortamda bozunur hidrazon bağıyla bağlanmıştır ve peptid pH'ya duyarlı histidin içermektedir. İkinci grupta ise ilaç taşıyıcı sisteme kararlı amid bağıyla bağlanmış ve içerikte bulunan peptide hem pH cevaplayabilen histidinler hem de lizozomal bir enzim olan katepsin B aktivitesiyle bozunabilir RRALAL dizini eklenmiştir. Ayrıca kontrol amaçlı olarak peptid içermeyen mPEG ve doksorubisin konjuge sistemleri de sentezlenmiştir. Taşıyıcı sistemlerin boyutları ve stabilitesi dinamik ışık saçılması, morfolojisi ve kümelenme eğilimi ise atomik kuvvet mikroskobu ile görüntülenmiştir. Birinci grup sistemlerin nötral pH ve pH 5'te ikinci grup sistemlerin ise nötral pH, pH 5, ve katepsin varlığında ve pH 5'te ilaç salım eğrileri çıkarılmıştır. Birinci grup sistemlerin in vitro sitotoksitesi A549 hücre hattı, ikinci grup sistemlerin sitotoksiteleri ise A549 ve PC3 hücre hattı kullanılarak değerlendirilmiştir. Temel olarak pH'ya duyarlı peptid içeren birinci grup taşıyıcı sistemleri sadece PEG ve DOX'tan oluşan kontrol sistemlere göre asidik ortamda ilacı daha hızlı saldığı ve daha fazla sitotoksik etki gösterdiği gözlenmiştir. Benzer şekilde ikinci grup peptid içeren taşıyıcı sistemler ise katepsin B varlığında kontrol sistemlere göre biraz daha hızlı DOX salımı ve daha fazla sitotoksik etki gerçekleştirmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada fonksiyonel grup içeren ve biyoaktif özellik eklenebilen peptid dizinlerinin ilaç taşıyıcı sistemlerine eklenmesiyle sistemin tıbbi etkilerini iyileştirdiği gösterilmiştir.

Literatüre önemli katkılar sunabilecek verilerin elde edildiği ve yeni nesil ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesine ışık tutacak olan bu projeye verdikleri destek için TÜBİTAK Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu'na teşekkür ederiz.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	1
İÇİNDEKİLER.....	2
ŞEKİL LİSTESİ.....	3
TABLO LİSTESİ.....	6
ÖZET.....	7
1. GİRİŞ.....	9
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	14
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	20
3.1 Gereçler.....	20
3.2 Yöntemler.....	21
3.2.1 Metoksi(polietilen glükol)-hidrazon–doksorubisin (mPEG-HYD-DOX) Konjugatlarının Sentezi.....	21
3.2.2 Metoksi(polietilen glükol)-peptid-hidrazon–doksorubisin (mPEG-AT1-DOX) Konjugatlarının Sentezi.....	23
3.2.3 Metoksi(polietilen glükol)–doksorubisin (mPEG-DOX) Konjugatının Sentezi.....	24
3.2.4 Enzimatik Bozunur Dizin İçeren Metoksi(polietilen glükol)-peptid-doksorubisin (mPEG-AT3-DOX) Konjugatının Sentezi.....	26
3.2.5 Taşıyıcı Sistemlerin Karakterizasyonları.....	26
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	34
4.1 Asidik ortamda bozunur PEG bazlı ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanması.....	34
4.2 Asidik ortamda bozunur PEG-peptid bazlı ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanması.....	39
4.3 Asidik ortamda bozunur PEG ve PEG-peptid bazlı ilaç taşıyıcı sistemlerine DOX konjugasyonu.....	42
4.4 Asidik ortamda bozunur DOX konjuge edilmiş taşıyıcı sistemlerinin karakterizasyonu.....	44
4.5 Kararlı amid bağıyla DOX konjugasyonu yapılan mPEG and mPEG-peptid bazlı taşıyıcı sistemlerin hazırlanması.....	52
4.6 Kararlı amid bağıyla DOX konjugasyonu yapılan mPEG and mPEG-peptid bazlı taşıyıcı sistemlerin karakterizasyonu.....	58
5. SONUÇLAR.....	71
6. EKLER.....	73

7. KAYNAKÇA.....	86
------------------	----

ŞEKİL LİSTE

Şekil 1. Gelişmiş geçirgenlik ve alıkonma etkisinin şematik gösterimi (Fang vd. 2007).....	11
Şekil 2. Değişik formülasyonlarda hazırlanan paklitakselin hücre canlılığına etkisi (Shenoy vd. 2005).....	15
Şekil 3. Paklitaksel içeren PEG-PBAE misel sisteminin değişik pH değerlerinde ölçülen paklitaksel salım kinetiği (Shen vd. 2009).....	15
Şekil 4. (a) PEG-poli(Asp-HYD-ADR) misellerinin hazırlanması ve asidik ortamda ilaç salım mekanizması, (b) PEG-poli(Asp-HYD-ADR) sisteminin değişik pH değerlerinde adriyaminin (doksorubisin) salım kinetiği (Bae vd. 2005b).....	17
Şekil 5. mPEG-HYD1-DOX hazırlama reaksiyonları.....	22
Şekil 6. mPEG-DOX konjugatı hazırlama reaksiyonu.....	25
Şekil 7. DOX'un asit hidroliz reaksiyonu.....	29
Şekil 8. mPEG-propiyonik asit, mPEG-HYD1 ve mPEG-HYD2 örneklerinin FTIR spektrumları..	35
Şekil 9. mPEG-propiyonik asit örneğinin D ₂ O içerisinde alınan 1H NMR spektrumu.....	36
Şekil 10. mPEG-HYD1 örneğinin D ₂ O içerisinde alınan 1H NMR spektrumu.....	36
Şekil 11. AADH ile iki kez reaksiyon sonucu elde edilmiş mPEG-HYD1 örneğinin D ₂ O içerisinde alınan 1H NMR spektrumu.....	38
Şekil 12. AT1 peptidinin ESI-MS spektrumu.....	40
Şekil 13 (a) AT1, (b) mPEG-MAL, (c) mPEG-AT1 örneklerinin HPLC eğrileri.....	40
Şekil 14. mPEG-AT1 örneğinin MALDI-TOF kütle spektrumu.....	41
Şekil 15 (a) AT1, (b) mPEG-MAL, (c) mPEG-AT1 örneklerinin FTIR spektrumları.....	42
Şekil 16. Farklı fonksiyonel gruba sahip mPEG örnekleri ve mPEG-AT1 konjugatının boyut dağılımı.....	45
Şekil 17. Yeni hazırlanmış DOX konjuge edilmiş ilaç taşıyıcı sistemlerinin boyut dağılımı.....	46
Şekil 18. DOX konjuge edilmiş ilaç taşıyıcı sistemlerinin hazırlandıktan 24 saat sonra elde edilen boyut dağılımı.....	46
Şekil 19. pH 5.0 ve 7.4'te mPEG-HYD1-DOX konjugatının DOX salım profili.....	48
Şekil 20. pH 5.0 ve 7.4'te mPEG-HYD2-DOX konjugatının DOX salım profili.....	48
Şekil 21. pH 5.0 ve 7.4'te mPEG-AT1-DOX konjugatının DOX salım profili.....	49
Şekil 22. mPEG-COOH, AADH, mPEG-HYD1 ve AT1 örneklerinin A549 hücre hattı kullanılarak 24 saatin sonunda elde edilen % canlılık değerleri.....	50

Şekil 23. Serbest DOX ve DOX'un asidik ortamda bozunur bağla konjuge edildiği taşıyıcı sistemlerin A549 hücre hattı kullanılarak 24 saatin sonunda elde edilen büyüme engelleme eğrisi	51
Şekil 24. AT3 peptidinin MALDI-TOF kütle spektrumu.....	53
Şekil 25. (a) AT3, (b) mPEG-MAL, (c) mPEG-AT3 örneklerinin HPLC eğrileri.....	54
Şekil 26. mPEG-AT3 örneğinin MALDI-TOF kütle spektrumu.....	54
Şekil 27. (a) AT3, (b) mPEG-MAL, (c) mPEG-AT3 örneklerinin FTIR spektrumları.....	55
Şekil 28. Serbest DOX'un 220 nm ve 480 nm'de kaydedilen HPLC eğrileri.....	57
Şekil 29. mPEG-AT3-DOX'un 220 nm ve 480 nm'de kaydedilen HPLC eğrileri.....	57
Şekil 30. (a) AT3 peptidi, (b) mPEG-maleimid ve (c) mPEG-AT3 konjugatının boyut dağılımı....	58
Şekil 31. mPEG-DOX'un (a) başlangıçta, (b) 24 saat ve (c) 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen boyut dağılımı.....	59
Şekil 32. mPEG-AT3-DOX'un (a) başlangıçta, (b) 24 saat ve (c) 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen boyut dağılımı.....	59
Şekil 33. PEG-DOX örneğinin AFM'den alınan (a) 2 boyutlu görüntüsü, (b) 3 boyutlu görüntüsü, (c) tanecik boyutu dağılımı, (d) mutlak yükseklik dağılımı.....	61
Şekil 34. PEG-AT3-DOX örneğinin (a) plaka üzerinde 5 kat seyreltilerek ve (b) 10 kat seyreltikten sonra plakaya eklenerek alınan 2 boyutlu AFM görüntüleri.....	62
Şekil 35. mPEG-DOX ve mPEG-AT3-DOX örneklerinin DOX salım profili.....	63
Şekil 36. AT3 peptidinin (a) katepsin B ile muamele edilmeden önce, (b) 3 saat boyunca katepsin B ile muamele edildikten sonra elde edilen HPLC eğrileri.....	64
Şekil 37. AT3 peptidi, mPEG-maleimid ve mPEG-AT3 örneklerinin PC3 hücre hattı kullanılarak 24 saatin sonunda elde edilen sitotoksosite değerleri (C = 1.5 mg/ml).....	65
Şekil 38. AT3 peptidi, mPEG-maleimid ve mPEG-AT3 örneklerinin PC3 hücre hattı kullanılarak 48 saatin sonunda elde edilen sitotoksosite değerleri (C = 1.5 mg/ml).....	65
Şekil 39. AT3 peptidi, mPEG-maleimid ve mPEG-AT3 örneklerinin A549 hücre hattı kullanılarak 24 saatin sonunda elde edilen sitotoksosite değerleri (C = 0.75 mg/ml).....	66
Şekil 40. AT3 peptidi, mPEG-maleimid ve mPEG-AT3 örneklerinin A549 hücre hattı kullanılarak 48 saatin sonunda elde edilen sitotoksosite değerleri (C = 0.75 mg/ml).....	66
Şekil 41. Serbest DOX ve DOX'un kararlı amid bağıyla konjuge edildiği taşıyıcı sistemlerin PC3 hücre hattı kullanılarak 24 saat sonunda elde edilen büyüme engelleme eğrisi.....	68
Şekil 42. Serbest DOX ve DOX'un kararlı amid bağıyla konjuge edildiği taşıyıcı sistemlerin PC3 hücre hattı kullanılarak 48 saat sonunda elde edilen büyüme engelleme eğrisi.....	68

Şekil 43. Serbest DOX ve DOX'un kararlı amid bağıyla konjuge edildiği taşıyıcı sistemlerin A549 hücre hattı kullanılarak 24 saat sonunda elde edilen büyüme engelleme eğrisi.....	69
Şekil 44. Serbest DOX ve DOX'un kararlı amid bağıyla konjuge edildiği taşıyıcı sistemlerin A549 hücre hattı kullanılarak 48 saat sonunda elde edilen büyüme engelleme eğrisi.....	69
Y	
Şekil A1. mPEG-HYD2-DOX hazırlama reaksiyonları.....	73
Şekil A2. mPEG-AT1 hazırlama reaksiyonu.....	74
Şekil A3. mPEG-AT1-DOX hazırlama reaksiyonları.....	76
Şekil A4. mPEG-AT3-DOX hazırlama reaksiyonları.....	76
Şekil A5. Adriyamisinonun 488 nm'de elde edilen kalibrasyon eğrisi.....	77
Şekil A6. DOX'un PBS içinde 590 nm'deki floresans şiddeti kullanılarak alınan kalibrasyon eğrisi (Cihaz: Perkin Elmer LS55).....	77
Şekil A7. DOX'un asetat tamponu içinde 590 nm'deki floresans şiddeti kullanılarak alınan kalibrasyon eğrisi (Cihaz: Perkin Elmer LS55).....	78
Şekil A8. MTT testi için A549 hücre sayısı optimizasyonu.....	78
Şekil A9. Adipik asit dihidrazit ve karbohidrazit örneklerinin FTIR spektrumları.....	79
Şekil A10. AADH örneğinin D ₂ O içerisinde alınan 1H NMR spektrumu.....	79
Şekil A11. EDC ve NHS kullanılarak gerçekleştirilen amid oluşum reaksiyonları (Sehgal ve Vijay 1994).....	81
Şekil A12. 10 ml kolon hacminde Sephadex LH-20 reçinesi içeren kolondan elde edilen fraksiyonlar.....	82
Şekil A13. DOX'un PBS içinde 590 nm'deki floresans şiddeti kullanılarak alınan kalibrasyon eğrisi (Cihaz: VarioSkan).....	82
Şekil A14. DOX'un pH 5.0 asetat tamponu içinde 590 nm'deki floresans şiddeti kullanılarak alınan kalibrasyon eğrisi (Cihaz: VarioSkan).....	83
Şekil A15. DOX'un 150 mM NaCl 1 mM EDTA ve 5mM L-sistein içeren pH 5.0 asetat tamponu içinde 590 nm'deki floresans şiddeti kullanılarak alınan kalibrasyon eğrisi (Cihaz: VarioSkan).....	83
Şekil A16. MTT testi için PC3 hücre sayısı optimizasyonu.....	84

TABLO LİSTE

Tablo 1. DOX konjugasyon deneyleri.....	22
Tablo 2. DOX konjugasyonu yapılan pH cevaplayan mPEG and mPEG-peptid bazlı taşıyıcı sistemler.....	34
Tablo 3. DOX konjugasyonun reaksiyonunun optimizasyon sonuçları.....	43
Tablo 4. Asidik ortamda bozunur ilaç taşıyıcı sistemlerin DOX konjugasyon verimi ve yüzdesi.	44
Tablo 5. Çeşitli ilaç taşıyıcı sistemlerin nötral ve asidik pH'ta % ilaç salımının karşılaştırılması.	49
Tablo 6. DOX ve DOX'un asidik ortamda bozunur bağla konjuge edildiği taşıyıcı sistemlerin mutlak IC ₅₀ değerleri.....	51
Tablo 7. Kararlı amid bağıyla DOX konjugasyonu yapılan mPEG and mPEG-peptid bazlı taşıyıcı sistemler.....	52
Tablo 8. DOX'un kararlı amid bağıyla konjuge edildiği taşıyıcı sistemlerin DOX konjugasyon verimi ve yüzdesi.....	56
Tablo 9. DOX ve DOX'un kararlı amid bağıyla konjuge edildiği taşıyıcı sistemlerin mutlak IC ₅₀ değerleri.....	70
Y	
Tablo A1. Teorik 1H NMR kimyasal kayma değerleri.....	80
Tablo A2. Serbest DOX ve DOX'un asidik ortamda bozunur bağla konjuge edildiği taşıyıcı sistemlerin mutlak IC ₅₀ değerlerinin ikili istatistiksel karşılaştırılması.....	85
Tablo A3. Serbest DOX ve DOX'un kararlı amid bağıyla konjuge edildiği taşıyıcı sistemlerin mutlak IC ₅₀ değerlerinin ikili istatistiksel karşılaştırılması.....	85

ÖZET

Bu projede kanser hücrelerinin çoklu ilaç direncine çözümüne yönelik hızlı ilaç salım kabiliyetine sahip ilaç taşıyıcı sistemlerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Taşıyıcı sistemler PEG veya PEG-peptid moleküllerine model antikanser ilaç olarak kullanılan doksorubisinin (DOX) kimyasal bağla konjugasyonu ile hazırlanmıştır. PEG, taşıyıcı sistemlerde ilacın kanda dolaşım süresini arttırmak için kullanılmıştır. Peptid dizinine pH cevaplama özelliği olan histidinler ve/veya enzimatik bozunur RRALAL dizini eklenmiştir. Birinci grup taşıyıcı sistemlerinde kullanılan peptid (AT1) sadece pH cevaplama özelliği taşımaktadır ve DOX taşıyıcı sisteme asidik ortamda bozunur hidrazon bağıyla konjuge edilmiştir. DOX'un taşıyıcı sisteme kararlı amid bağıyla bağlandığı ikinci grup sistemlerde kullanılan peptid AT3, hem pH cevaplayan gruplar hem de lizozomal enzimlerde bozunur dizin içermektedir. Ayrıca kontrol sistemler olarak peptid içermeyen DOX konjuge edilmiş PEG bazlı taşıyıcı sistemler de sentezlenmiştir. Çalışmada kullanılan peptidler katı faz peptid sentezi yöntemiyle sentezlenmiş, Michael ekleme reaksiyonuyla mEG-maleimide konjuge edilmiştir. DOX taşıyıcı sistemde bulunan COOH gruplarına amid veya hidrazon bağıyla bağlanmıştır. UV spektroskopisi kullanılarak asidik ortamda bozunur bağ içeren mPEG-AT1-DOX taşıyıcı sisteminde DOX konjugasyonu %35, buna karşın DOX'un kararlı amid bağı ile konjuge edildiği mPEG-AT3-DOX sisteminde konjuge edilmemiş DOX'un ayrılamaması dolayısıyla DOX:COOH oranı % 187 olarak elde edilmiştir. Işık saçılma yöntemi kullanılarak pH 7.4'te mPEG-AT1-DOX'un boyutu $\sim 12 \pm 2$ nm, mPEG-AT3-DOX'un boyutu ise 15 ve 30 nm'de ikili dağılım olarak ölçülmüştür. mPEG-AT1-DOX için nötral pH'ta $\% 14.5 \pm 2.5$ elde edilen $\% DOX$ salımı pH 5'te $\% 30 \pm 7$ 'ye yükselmiştir. Nötral pH'da $\% 10$ 'un altında gözlenen mPEG-AT3-DOX'un ilaç salımı pH 5 ve katepsin B varlığında $\% 17 \pm 2$ olarak elde edilmiştir. A549 hücre hattı kullanılarak yapılan sitotoksisite testi sonucu serbest DOX, mPEG-AT1-DOX ve mPEG-AT3-DOX'un mutlak IC_{50} değerleri sırasıyla 1.37 ± 0.05 , 5.55 ± 0.75 ve 1.33 ± 0.11 μg eşdeğer DOX/ml olarak bulunmuştur

Anahtar kelimeler: ilaç taşıyıcı sistemleri, doksorubisin, PEG, peptid

ABSTRACT

In this project, it was aimed to develop drug delivery systems with high drug release rate capable of overcoming multidrug resistance of cancer cells. Drug delivery systems were prepared via the conjugation reaction between PEG or PEG peptide molecules and a model anticancer drug doxorubicin (DOX). PEG was incorporated to the system to increase blood circulation time of the drug. Peptide domain is designed to have pH responsive histidines and/or enzymatically degradable RRALAL sequence. The peptide, AT1, used in the design of the first group of drug delivery systems only have pH responsive property and DOX was attached to these type of drug delivery systems via acid cleavable hydrazone bond. The peptide AT3 used in the second group of drug delivery systems where DOX is attached to the system using stable amide bond, contains both pH responsive and lysosomal enzyme cleavable domains. Additionally, for control purposes, drug delivery systems containing only PEG and DOX were also synthesized. The peptides used in this study were synthesized using solid phase peptide synthesis method and conjugated to mPEG-maleimide using Michael addition reaction. DOX is chemically attached to the COOH group of the carrier molecule via amide or hydrazone bond. DOX:COOH ratios of acid cleavable bond containing mPEG-AT1-DOX and mPEG-AT3-DOX with stable amide bond was obtained as % 35 and % 187 respectively using UV spectroscopy. The high DOX content of mPEG-AT3-DOX is due to the presence of unconjugated DOX molecules. Size of mPEG-AT1-DOX at neutral pH was measured via dynamic light scattering method as $\sim 12 \pm 2$ nm whereas mPEG-AT3-DOX exhibited bimodal hydrodynamic diameters centered at 15 and 30 nm. % DOX release of mPEG-AT1-DOX was measured as $\% 14.5 \pm 2.5$ and $\% 30 \pm 7$ for respective pH values of 7.4 and 5.0. For mPEG-AT3-DOX, %DOX release rate at neutral pH obtained below 10% increased to $\% 17 \pm 2$ at pH 5.0 and in the presence of cathepsin B. In the in vitro cytotoxicity tests against A549 cell line, respective IC_{50} values of free DOX, mPEG-AT1-DOX, mPEG-AT3 were obtained as 1.37 ± 0.05 , 5.55 ± 0.75 ve 1.33 ± 0.11 μg equivalent DOX/ml.

Keywords: drug delivery systems, doxorubicin, PEG, peptide

1. GİRİŞ

Günümüz kanser tedavisi kanserin evresine ve derecesine bağlı olarak hızlı bir şekilde çoğalan kanser hücrelerinin cerrahi radyoterapötik veya farmakolojik yöntemlerle bertaraf edilmesine dayanmaktadır (González vd. 2000; Brannon-Peppas ve Blanchette 2004; Sunderland vd. 2006). Her ne kadar cerrahi müdahale büyük kitle tümörlerinin alınmasında birincil yöntem olarak düşünülse de bu prosedürün metastatik kanseri tetikleme olasılığı vardır ve saptanamayan metastatik kanserler için uygun bir yöntem değildir. Bununla birlikte cerrahi ve radyasyon terapisinin kanserli hastaların yalnızca % 40'ını tedavi edebildiği geriye kalan %60'ının ise metastatik etkiden dolayı hayatını kaybettikleri raporlanmıştır. Kemoterapinin birçok kanser çeşidi için tedavi potansiyeli hala gelişimini sürdürmekte olsa da, kemoterapi tek başına üreme hücreleri tümörleri, hematolojik ve inatçı trofoblastik kanserlerin tedavisinde büyük etki yaratmış ve koryokarsinomlu kadın hastaların tedavi oranlarını arttırmıştır (Verweij ve De Jonge 2000; Feng ve Chien 2003; Ottevanger ve De Mulder 2005). Ayrıca cerrahi müdahale sonrası uygulanan kemoterapinin (adjuvan kemoterapi) meme kanseri hastalarının hayatta kalma oranını arttırdığı ve ışın tedavisi ile beraber uygulanan kemoterapinin (eş zamanlı kemoradyoterapi) oksijenlenme ve damarlanmayı geliştirerek olumlu etkileri olduğu belirtilmiştir (Vermund ve Gollin 1968; Verweij ve De Jonge 2000).

Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapide toksik ilaçlar kullanılarak kanser hücrelerini öldürmek hedeflense de bu toksik ilaçlar kanser hücrelerine karşı yeteri kadar yüksek seçicilik gösteremediği için başta sağlıklı hücrelerin de zarar görmesi olmak üzere saç dökülmesi, bulantı kusma, yorgunluk, kilo kaybı ve enfeksiyon riski gibi hastaların yaşam kalitesini düşüren yan etkiler ortaya çıkmaktadır. Bu sebepten kemoterapik ilaçların terapötik etkilerinin etkin bir şekilde kullanılmasını sağlayıp, kanserli hücrelere seçimli bir şekilde taşıyabilecek ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi büyük bir önem arz etmektedir (Chari 1998; Abou-Jawde vd. 2003; Liu vd. 2007; Wong vd. 2007).

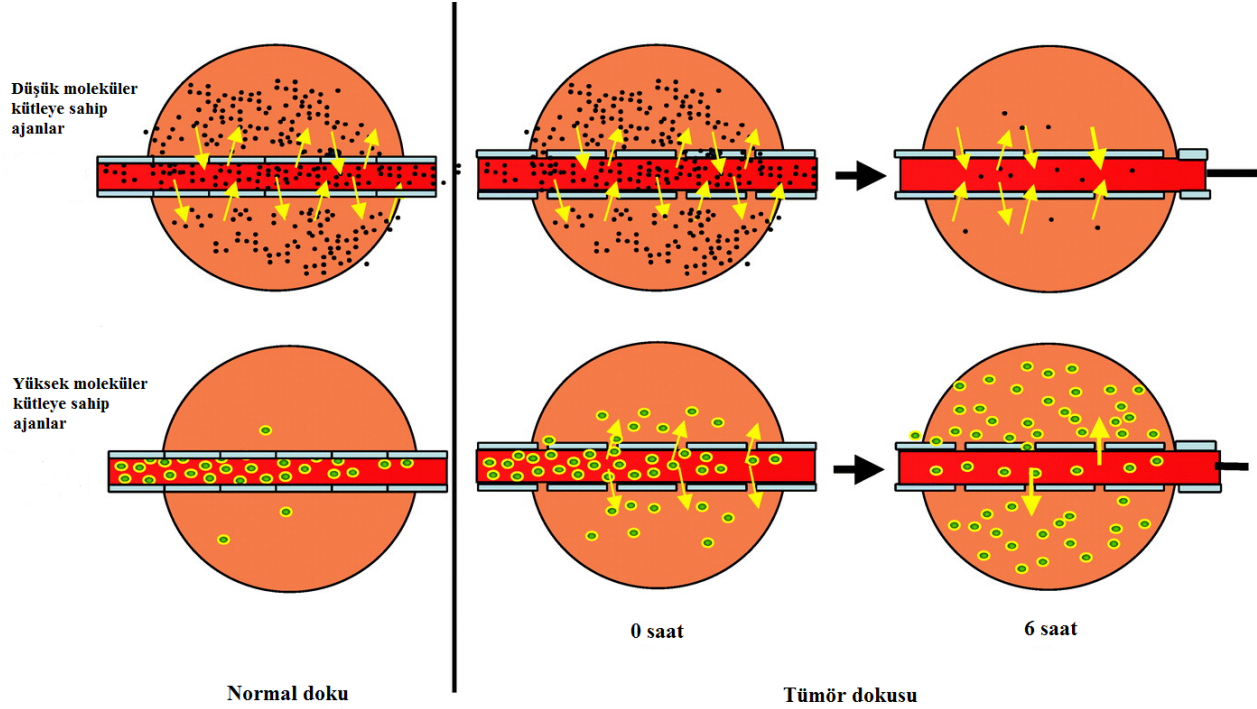
Kemoterapik ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde kullanılan stratejiler tümör fizyolojisindeki anormallikleri hedeflemektedir. Tümör hücreleri, kontrolsüz çoğalıp neoplazma (doku büyümesi) denen kitle oluşturan anormal hücreler olarak ayırt edilebilirler. Bu anormal hücreler bir kitle olarak bir arada kümeleniyorsa iyi huylu tümörler olarak adlandırılır. Buna karşın eğer tümör hücrelerinin etrafındaki dokulara sızma yetisi varsa kötü huylu tümörler veya kanser hücreleri olarak tanımlanır. Belirli bir kritik hacme (1-2 mm³) ulaştıktan sonra kan damarlarının oluşumunu (anjyogenez) tetiklerler. Yeni oluşan bu kan damarları, kanser

hücrelerinin gelişimi için gereken besinleri sağlamakla kalmayıp aynı zamanda kan dolaşımıyla taşınan birincil tümör hücrelerin istilasıyla vücudun diğer kısımlarında oluşan metastaz denen ikincil tümörlerin oluşumuna açılan kapı görevi de yapmaktadır (Stetler-Stevenson vd. 1993; Alberts 2002; Brannon-Peppas ve Blanchette 2004; Eichhorn vd. 2004; Isayeva vd. 2004; Shimizu ve Oku 2004; Eichhorn vd. 2007).

Folkman'ın 1970'li yıllarda işaret ettiği solid tümörlerin büyümesi ve anjiyogenezin birbiriyle ilişkili olduğu ve eğer anjiyogenez önlenemezse veya yeni oluşan vasküler endotel hücreleri hedeflenirse tümör hücrelerinin büyümesinin engellenebileceği öngörüsüne çeşitli kaynaklarda yer verilmiştir (Brown ve Giaccia 1998; Brannon-Peppas ve Blanchette 2004; Eichhorn vd. 2004; Eichhorn vd. 2007). Anjiyogenezi önlemeye yönelik çalışmaların çoğu vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) aktivitelerini durdurmaya yoğunlaşmıştır (Brown ve Giaccia 1998). Buna karşın kademenin sadece bir adımını bloke ederek anjiyogenezi önleme ve en nihayetinde tümör oluşumunu durdurma ihtimalinin zayıf olabileceği de bir gerçektir (Shimizu ve Oku 2004). Her ne kadar prelinik çalışmalarda umut verse de monoterapi olarak denenen anti-anjiyojenik tedavi rastgele klinik çalışmalarda başarısız olmuştur. Bir diğer taraftan hem tümör hücrelerini hem de vasküler bileşenleri hedef alarak anti-anjiyojenik ve kemoterapik ajanların birlikte kullanılması metastaz kolon kanseri tedavisinde umut vadetmiştir (Eichhorn vd. 2004; Eichhorn vd. 2007). Ancak anti-anjiyojenik ajanların geciken yan etkileri tedaviden sonra problem teşkil etmektedir. Örneğin, anti-anjiyojenik ajan (interferon $\alpha 2\beta$) uygulanarak yapılan tedavinin 1 yıl sonrasında bazı çocuklarda spaktik diploji belirtileri gözlenmiştir (Kerbel 2000).

Tümör hücrelerinde oluşan aşırı anjiyogenezin tümör damar düzenini normal dolaşım sisteminden farklı hale getirmesi tümör hücrelerini hedeflemek için bir diğer strateji olarak değerlendirilmektedir. Aşırı damarlanma, kusurlu vasküler yapı, çalışmayan lenfatik drenaj/boşaltım sistemi ve geçirgenlik ajanlarının (VEGF, bradikinin, nitrik oksit (NO), prostaglandinler (düzenleme enzimleri), kollajenazlar (matris metaloproteinler = MMP), peroksinitrit) normalden fazla üretilmesi geçirgen tümör kan damarlarına ve böbrek tasfiye sisteminden kaçabilecek kadar büyük makromoleküllerin (> 40-50 kDa) tümörlerde birikmesine neden olmaktadır. Bu olay 'gelişmiş geçirgenlik ve alıkonma' (enhanced permeability and retention ya da kısaca EPR) etkisi olarak tanımlanmıştır (Şekil 1) ve tümör hücreleri pasif olarak hedeflemeyi sağlamakla birlikte yeni nesil antikanser ilaç taşıyıcı sistemlerinin tasarımında altın standart haline gelmiştir (Noguchi vd. 1998; Maeda vd. 2000; Wu vd. 2001; Jang vd. 2003; Fang vd. 2007). İlaç taşıyıcı sistemin etkinliğinin aracın fizikokimyasal özelliklerine (boyut, difüzyon ve

hücrel makromoleküllerle etkileşimi) ve tümörün biyolojik özelliklerine (tümör damar düzeni, hücre yoğunluğu, doku yapısı, hücre dışı matris (ECM) bileşenleri ve kompozisyonu ve dokular



Şekil 1. Gelişmiş geçirgenlik ve alıkonma etkisinin şematik gösterimi (Fang vd. 2007).

arasındaki akışkan basıncı (IFP)) bağlı olduğu belirtilmiştir (Jang vd. 2003). Çapı birkaç mikron civarı veya daha fazla olan partiküllerin kılcal damarlar içinde sıkışmaları yüksek olasılıktır. Normal hücrelerde bulunan kan damarlarının gözenekleri yaklaşık 9 nm ve 50 nm çapında olmak üzere iki farklı boyut dağılımı göstermektedir. Ancak 50 nm boyutundaki gözeneklerin sayısı 9 nm'lik gözenek sayısından 100-1000 kat daha azdır. Tümör kan damarlarının gözenekleri ise 100 nm'lik partikülleri içine alabilecek boyuta sahip olup bazı tümör hücrelerinde bu boyutun 400-600 nm kadar yüksek olduğu belirtilmiştir (Yuan vd. 1995; Fukumori ve Ichikawa 2006). Ayrıca, 42 °C'de hipertemi uygulayarak gözenek geçirgenlik boyutunu 400 nm'ye çıkarmak mümkündür. Buna karşın 100 nm çapından büyük boyuta sahip partiküllerin seçimli bir şekilde retikuloendotelial sistem (RES) tarafından tutulduğu rapor edilmiştir. Bu sebepler dolayısıyla çapı 50 ile 100 nm arasında değişen partiküllerin tümör bölgesinde daha etkili bir şekilde birikme ihtimali yüksektir (Brannon-Peppas ve Blanchette 2004; Fukumori ve Ichikawa 2006). Partiküllerin yüzey özellikleri de vücut içindeki kaderlerini etkileyen faktörlerden biridir. Hidrofobik partiküller RES tarafından etkisiz hale getirilmektedir. Pozitif yüklü partiküllerin

hücrelere yapışma ihtimali yüksektir. Negatif yüklü parçacıklar ise çöpçü endotelial hücreler veya karaciğerde bulunan profesyonel pinositler tarafından hedeflenmektedir. Sonuç olarak, hidrofilik ve nötral/nötrale yakın yüke sahip partiküllerin bahsedilen savunma mekanizmalarından uzak kalarak kanda dolaşım süresinin yüksek olabileceği aşıkardır (Brannon-Peppas ve Blanchette 2004; Sunderland vd. 2006).

Çoklu ilaç direnci (MDR) kemoterapinin verimini büyük ölçüde düşüren ve kemoterapötik ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde son yıllarda göz önünde bulundurulmaya başlanan bir önemli bir sorundur. MDR bir P-glikoproteinlerin (P-gp) aktivitesi ile tetiklenen tümör hücrelerinin detoksifikasyon işlemidir. Hücre dışına taşıyıcı bu proteinler sebebiyle hücre içindeki ilaç dışarı atılıp ilaç derişimi terapötik limitin altına düşmektedir (Simon 1999; Lee vd. 2005; Xu vd. 2006; Devalapally vd. 2007). MDR etkisini kontrol edebilmek için önerilen ilk yaklaşım ilaç taşıyıcı sistemine antikanser ilaçla birlikte MDR düzenleyici ve engelleyiciler yükleyip P-gp aktivitesini bloke etmek olsa da bu yöntem antikanser ilacın toksisitesini çok fazla arttırmakta ve sağlıklı karaciğer ve böbrek hücrelerinde de P-gp aktivitesini engellediği için ilacın vücuttan atılma sürecini olumsuz etkilemektedir (Lee vd. 2005). Çok daha etkin bir yaklaşım ise antikanser ilacının tümör hücresi içerisinde hızlı salınımını sağlayıp ilacın sitotoksik etki gösterdiği derişimin üzerine çıkmasını garantilemekten geçmektedir. Endositik geçitteki pH değişimi nötral sitoplazmik pH 7.2 ile başlayıp endozomlarda 5.5-6'ya düşmekte ve lizozomlarda 4.5-5 civarına ulaşmaktadır. Dolayısıyla pH'ya duyarlı ilaç taşıyıcı sistemlerin bu organellerin asidik ortamında çözünerek veya stabilitesini kaybederek programlı bir şekilde ilacı hızlı bir şekilde salmasına imkân vermektedir (Xu vd. 2006). Endozomal bir proteaz enzimlerinden olan katepsin enzimlerinin aktiviteleri sistein proteaz inhibitörleriyle (CPI) kontrol edilmektedir. Normal hücrelerde katepsin ve CPI aktiviteleri dengeli bir şekilde devam ederken tümör hücrelerinde düşük CPI aktiviteleri sonucu katepsinler normal hücrelere oranla çok daha fazla üretilmektedir. Katepsinlerin aşırı miktarda üretilmesi ve salgılanması ise tümörlerin yayılmasını ve metastaz oluşumlarını tetiklemektedir (Yano vd. 2001; Nomura ve Katunuma 2005). Tümör hücrelerinde görülen bu anormalliği kullanarak ilaç salınımının endozomlardaki katepsin enzimlerin aktiviteleriyle programlanması da hızlı ilaç salımı için alternatif bir yöntem olarak çalışılmaktadır.

Bu bilgilerin ışığında ideal bir antikanser ilaç taşıyıcı sistemlerin tasarımında olması gereken ölçütler aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- Kanda yüksek dolaşım süresi
- Moleküler özbirleşme (self-assembly) sayesinde pasif hedefleme
- pH cevaplayabilme ve/veya enzimatik olarak bozunabilme

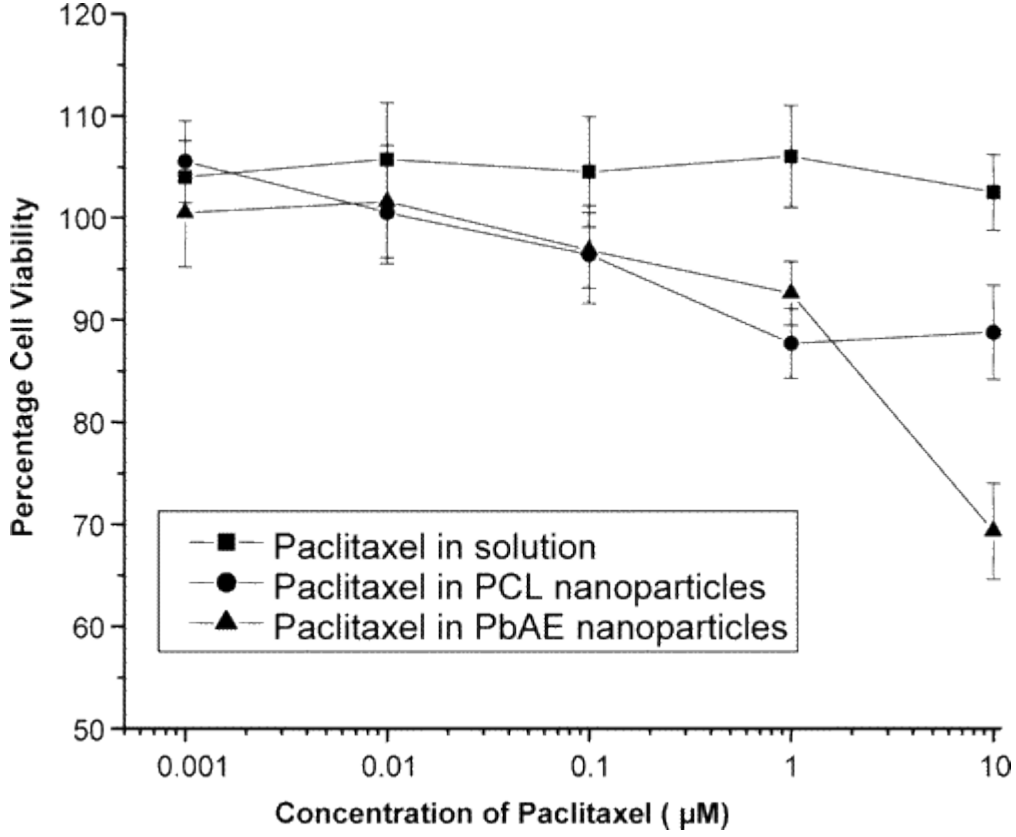
Bu çalışmanın amacı ideale yakın birinci nesil ilaç tasarımları geliştirmektir. Taşıyıcı sistemler metoksi polietilen glükol (mPEG) ve peptidin konjugasyonu ile hazırlanmıştır. Model bir antikanser ilaç olan doksorubisin (DOX) kimyasal bağla taşıyıcı sistemlere bağlanmıştır. Kontrol amaçlı olarak peptid içermeyen mPEG-DOX sistemleri de hazırlanmıştır. İlaç taşıyıcı sistemlerin sentezinde genellikle polimerizasyon yöntemi kullanılmaktadır. Her ne kadar reaksiyon verimi yüksek olsa da molekül ağırlığı ve kompozisyon kontrolü kolay değildir. Bu çalışmada daha önceden molekül ağırlığı ve kompozisyonu belli moleküllerin konjuge edilerek özelliklerinin birleştirilmesi sayesinde moleküler boyutta kontrol sağlanmıştır.

İlaç taşıyıcı sistemlerinin kanda yüksek dolaşım süresini sağlamak amacıyla FDA tarafından onaylı immunojenik ve antijenik etkisi olmayan hidrofilik ve formal yük taşımayan PEG molekülü seçilmiştir (Harris ve Chess 2003; Veronese ve Pasut 2005). pH'ya duyarlı ve/veya enzimatik bozunur dizin içeren peptidler aynı zamanda dizine eklenen fonksiyonel amino asitler sayesinde doksorubisin ve mPEG'in konjugasyonlarına da aracı olacaktır. İlaç taşıyıcı sisteme bağlamak için asidik ortamda bozunur hidrazon bağı veya stabil amid bağı kullanılmıştır. Dolayısıyla, birinci grup peptid içeren ilaç taşıyıcı sistemi hem pH'ya duyarlı fonksiyonel gruplar içermesi hem de ilaç ve taşıyıcı sistem arasındaki bağın da asidik ortamda bozunur olarak seçilmesi dolayısıyla literatürde geliştirilen sistemlerden farklı olarak tasarlanmıştır. İkinci grup peptid içeren ilaç taşıyıcı sistemi ise hem pH'ya duyarlı hem de enzimatik bozunur fonksiyonel gruplar içermektedir ve ilaç sisteme amid bağıyla bağlanmıştır. Taşıyıcı sistemin ve bileşenlerinin saflığı ve fonksiyonel grupları spektroskopik ve/veya kromatografik yöntemlerle tayin edilmiştir. İlaç taşıyıcı sistemlerin boyutları dinamik ışık saçılması metodu (her iki grup için) ve atomik kuvvet mikroskopi (sadece ikinci grup taşıyıcı sistemleri için) kullanılarak belirlenmiştir. Nötral, asidik pH değerinde ve endozomal enzim katepsin B içeren asidik tampon çözeltilerde ilaç salım kinetiği incelenmiştir. Son olarak sentezlerin örneklerin sitotoksisiteyi A549 (her iki grup için) ve PC3 (sadece ikinci grup taşıyıcı sistemleri için) hücre hattı kullanılarak yapılan MTT testi sonucu belirlenmiştir. Proje sonucu elde edilen veriler umut vaat edici olup ikinci nesil ilaç taşıyıcı sistemlerinin geliştirilmesine yönelik önemli katkılar sağlayacaktır.

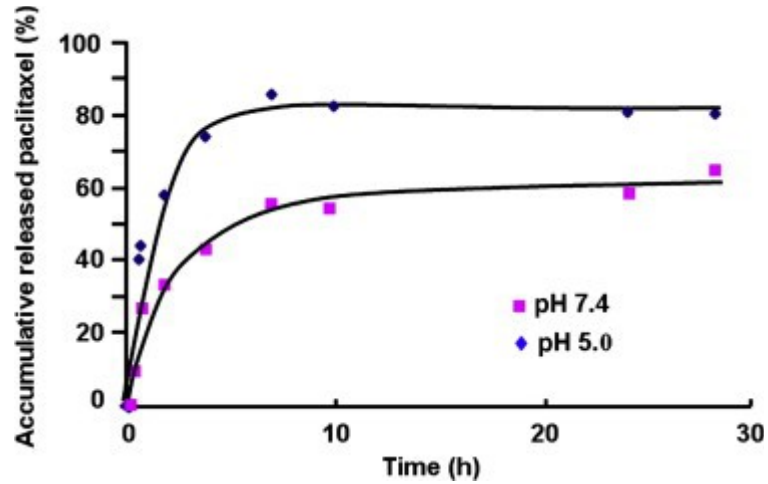
2. LİTERATÜR ÖZETİ

Gerek kanser ilaçlarının terapötik etkisini yan etkilerini azaltarak arttırmak, gerekse çoklu ilaç direnci gösteren tümör hücreleriyle mücadele amacıyla pH cevaplayabilen ilaç taşıyıcı sistemleri son yıllarda büyük bir önem kazanmıştır (Simon 1999; Xu vd. 2006). Çevreye hassas moleküllerin hazırlanmasında genellikle kimyasal sentez ve konjugasyon yöntemleri kullanılmaktadır. İlaç taşıyıcı sistemlere pH cevaplama özelliği ya sisteme pH'ya duyarlı moleküller yerleştirilmesiyle ya da ilaç ve taşıyıcı sistemi arasındaki kimyasal bağın pH'ya duyarlı olarak kurulmasıyla elde edilmiştir (Bae vd. 2005a; Gillies ve Fréchet 2005; Heffernan ve Murthy 2005; Lee vd. 2005; Shenoy vd. 2005; Xu vd. 2006). pH'ya duyarlı moleküller içeren taşıyıcı sistemlerin hazırlanması için genellikle pK_a değeri 6.5 değerinden küçük iyonlaşabilen moleküller kullanılmaktadır. Bu tip sistemler, nötral pH değerlerinde hidrofobik çekim kuvvetleri sayesinde agregatlar oluşturmakta ve hidrofobik ilaçlar agregatların öz kısmına bağlanmaktadır. pH değeri asidik pH değerlerine düşünce ise iyonlaşabilen moleküllerin artı yüklü duruma geçmesi dolayısıyla elektrostatik itme kuvvetleri ile hidrofobik çekme kuvvetlerinin farkına göre agregatlar tamamen çözünür hale gelmekte ya da stabilitesini kaybederek şekil değiştirmektedir (Oh vd. 2009). Sonuç olarak asidik pH değerlerinde ilacın taşıyıcı sistemden ortama çok daha hızlı bir şekilde salınması, dolayısıyla, ilacın terapötik etkisinin artması beklenmektedir. İlacın ortama hızlı salınması ile terapötik etkisi arasındaki ilişkiyi irdelleyen bir çalışmada serbest paklitaksel (paclitaxel) ve paklitaksel yüklenmiş iki ayrı misel sistemi (pH cevaplama özelliğine sahip poli- β -amino-ester (PBAE) ve pH'ya duyarlı olmayan polikaprolakton (PCL) içeren ploronik miseller) kullanılmış ve bu sistemlerin MDA-MB-231 insan meme kanseri hücresinin canlılığı üzerine etkisi incelenmiştir. Şekil 2'de verildiği üzere deneysel olarak da yüksek ilaç dozlarında pH cevaplayan PBAE içine yüklenen paklitakselin serbest ve PCL içindeki paklitakselden daha fazla anti-tümör etkisi gösterdiği ispatlanmıştır (Shenoy vd. 2005). PBAE bloğunun pH cevaplayan grup olarak kullanıldığı bir başka çalışmada ise hidrofilik blok olarak PEG kullanılmış ve oluşan misellere DOX yüklenmiştir. PBAE grubunun hidrofobisitesinin yeterli olmaması dolayısıyla kritik kümelenme derişimi bir hayli yüksek olarak gözlenmiş (6-9 mg/ml) ve değişik pH değerlerinde sistemin ilaç salım kinetiği belirlenmiştir (Şekil 3). Asidik pH değerinde ilaç salım hızının artmasına karşın (24 saatin sonunda başlangıçta yüklenen ilacın yaklaşık % 80'i) ilacın nötr pH değerinde de ortama hızlı ve azımsanamayacak miktarda

salınması (24 saatin sonunda başlangıçta yüklenen ilacın yaklaşık % 60'ı) bu sistemin pratikte kullanılmasını sınırlandırmıştır (Shen vd. 2009).



Şekil 2. Değişik formülasyonlarda hazırlanan paklitakselin hücre canlılığına etkisi (Shenoy vd. 2005)

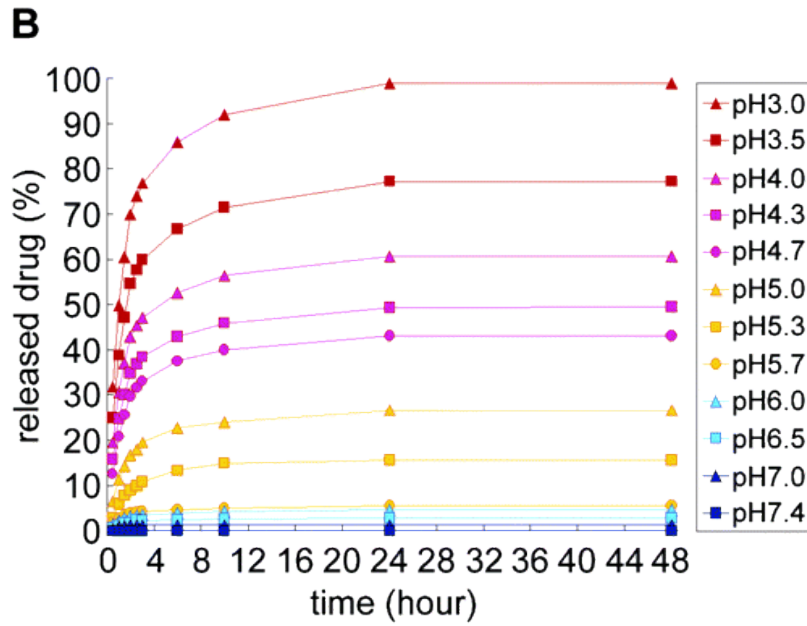
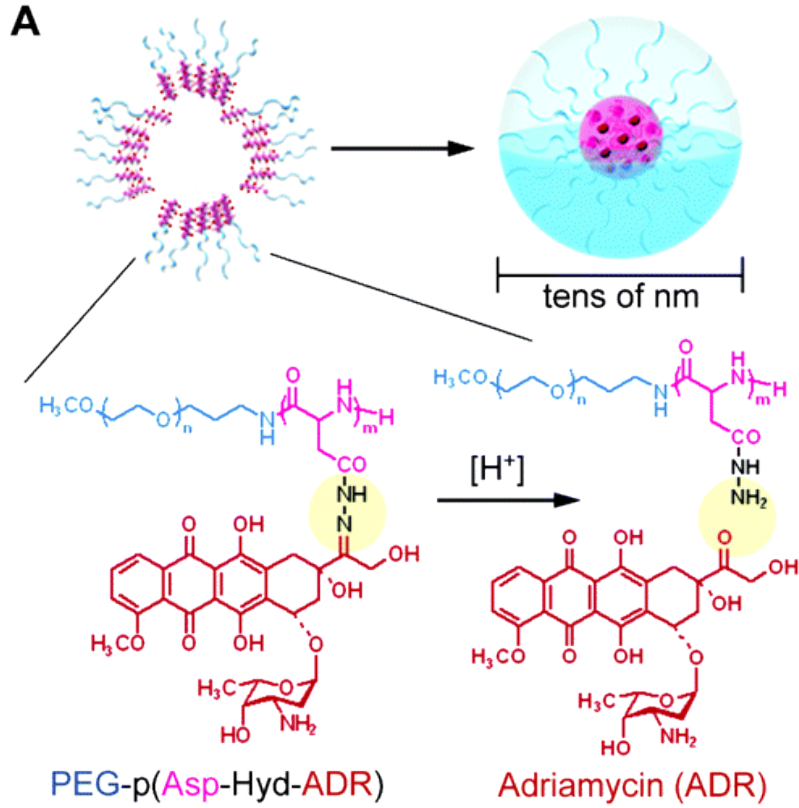


Şekil 3. Paklitaksel içeren PEG-PBAE misel sisteminin değişik pH değerlerinde ölçülen paklitaksel salım kinetiği (Shen vd. 2009)

PBAE içeren misellerin stabilitesini arttırmak amacıyla mPEG-PBEA sistemine hidrofobik deoksikolik asit (DOC) konjuge edilmiştir. Deoksikolik asit, misellerin stabilitesini artırırken pH cevaplama özelliğini belirli ölçüde perdelemiştir. Paklitaksel yüklü mPEG-PBAE misellerinde ilaç pH 7.4'te 20 saat, pH 6.5'ta ~ 15 dakika sonra çökerken, mPEG-PBAE-DOC miselleri için ilacın çökme süresi pH 7.4'de 80 saat, pH 6.5'da 50 saat olarak gözlenmiştir (Kim ve Lee 2010). PBEA bazlı kopolimerlere ilaveten histidin türevleri ve polihistidin içeren blok kopolimerler en çok çalışılan pH'ya duyarlı grup içeren taşıyıcı sistemlerdir. PEG-polihistidin sistemi PEG-PBAE sistemi gibi nötral pH'ta stabilite problemleri ortaya koymuştur (Lee vd. 2003). Bu problemi çözmek amacıyla polihistidin içeren blok kopolimerler daha hidrofobik kopolimerle karıştırıldıktan sonra (Lee vd. 2005) ya da farklı hidrofobik bloklar kimyasal olarak bağlanarak çoklu-blok hazırlandıktan sonra ilaç yükleme yoluna gidilmiştir (Lee vd. 2007). Her ne kadar stabilite sorunu çözülmüş olsa da nötral pH değerinde dahi ortama ilaç salımı (24 saat sonunda en az % 20) daha etkin ilaç taşıyıcı sistemlerinin gerekliliğini göstermiştir (Lee vd. 2007).

İlacın asidik ortamda bozunabilir kimyasal bağla taşıyıcı sisteme konjuge edilmesi, nötral pH değerlerinde taşıyıcı sistemden ortama salınım hızı ve miktarını azaltmak için alternatif bir strateji olarak kullanılmaktadır. Bu amaçla genellikle hidrazon bağı tercih edilmektedir ve en popüler polimerler ise PEG-poliaspartat ve N-(2-hidroksipropil)metakrilamid (HPMA) bazlı kopolimerlerdir (Etrych vd. 2001; Bae vd. 2005b; Bae vd. 2007; Chytil vd. 2008). Bae vd. (2005), α -metoksi- ω -amino PEG'i makro-başlatıcı olarak kullanarak halka açılması polimerizasyonu ile mPEG-polibenzilaspartat (PEG-PBLA) sentezlemiş ve benzil gruplarını hidrazid (HYD) formuna çevirmişlerdir. Daha sonra doksorubisini (adriyamisin) PEG-polipeptid-HYD molekülüne asidik ortamda bozunur hidrazon bağıyla konjuge ederek PEG-polipeptid-HYD-ADR taşıyıcı sistemini elde etmişlerdir (Şekil 4a). Bu sistem hidrazid formunda monomerik olmasına karşın, ilaç bağlandıktan sonra nanometre boyutunda (~65 nm çapında) agregatlar oluşturmuştur. Beklendiği üzere nötral pH değerinde başlangıçta yüklenen ilaç miktarına göre ilaç salım yüzdesi ihmal edilebilir değerde gözlenmiş, bununla paralel olarak 48 saatin sonunda pH 5'deki ilaç salınım yüzdesi ise yaklaşık % 20 olarak elde edilmiştir (Şekil 4b) (Bae vd. 2005b). Benzer şekilde DOX molekülü değişik hidrofobisitedeki kolesterol molekülü içeren HPMA kopolimerlerine hidrazon bağıyla bağlanmış ve hidrofobik grupların ilaç salım hızına etkisi incelenmiştir. Eklenen hidrofobik grup nötral pH değerindeki ilaç salım yüzdesini etkilememiş buna karşın hidrofobik gruba bağlı

olarak asidik pH değerindeki ilaç salım yüzdesi 24 saatin sonunda yaklaşık % 65-75 arasında olarak elde edilmiştir (Chytil vd. 2008). Bir diğer çalışmada



Şekil 4. (a) PEG-poli(Asp-HYD-ADR) misellerinin hazırlanması ve asidik ortamda ilaç salım mekanizması, (b) PEG-poli(Asp-HYD-ADR) sisteminin değişik pH değerlerinde adriyamisin (doksorubisin) salım kinetiği (Bae vd. 2005b).

DOX molekülü biyobozunur blok kopolimer olan metoksi-poli(etilen glikol-blok-poli(laktid-ko-2,2-dihidroksimetilpropilen karbonat) (mPEG-b-P(LA-co-DHP) molekülüne karbamat ve hidrazon bağıyla konjuge edilmiştir. İlaç salım hızı diğer sistemlere göre oldukça düşük olarak elde edilmiştir. 20 günün sonunda karbamat bağı içeren sistemde ilaç salımı pH 7.4'de % 20 ve pH 5'de ise % 85 olarak gözlenmiştir. Hidrazon içeren sistem ise karbamat bağına göre biraz daha iyi sonuçlar verse de ilacın salınım hızı diğer sistemlerin çok altında bulunmuştur (Hu vd. 2010). Benzer bir çalışmada Kale ve Torchilin (2007) çeşitli alifatik ve aromatik hidrazon bazlı polietilen glikolfosfatidiletanolamin (PEG-PE) konjugatlarının hidrolitik stabilitesini nötral ve asidik pH değerlerinde test etmişlerdir. Alifatik aldehit bazlı PEG-HZ-PE konjugatları fizyolojik pH değerinde yeterince stabil olmasına rağmen asidik pH değerinde karşı bir hayli hassas olduğu gözlenmiştir. Buna karşın aromatik aldehitlerden elde edilen hidrazon bağları hem nötr hem de asidik pH değerlerinde oldukça stabil olduğu belirlenmiştir (Kale ve Torchilin 2007). Bir diğer çalışmada lineer ve dallı değişik moleküler ağırlığa sahip PEG molekülleri DOX molekülüyle enzimatik ortamda bozunan peptid dizinleri kullanılarak konjuge edilmiştir. pH 5.5'da lizozomal enzimler içeren tampon çözeltide 5 saatin sonunda PEG'in yapısına ve molekül ağırlığına bağlı olarak ilaç salım hızının % 20 ile 60 arasında değiştiği gözlenmiş ve test edilen enzimatik bozunur peptid dizinleri içinde GLFG dizininde en etkin olarak belirlenmiştir. Ancak sitotoksitesite testinde GFLG içeren konjugatların GLFG içeren konjugatlardan çok daha toksik olduğu gözlenmiştir (Veronese vd. 2005). Benzer bir çalışmada GFLG içeren HPMA bazlı kopolimerlerde de lizozomal enzim katepsin B'nin varlığında DOX salınımının GFLG içermeyen sisteme göre daha hızlı olduğu bulunmuştur (Etrych vd. 2001). Albumin-ALAL-DOX konjugatlarıyla yapılan bir diğer çalışmada dördümlü peptid dizini RRALAL'nin de katepsin B varlığında biyobozunur özellik taşıdığı belirlenmiştir (Schmid vd. 2007). Ayrıca değişik molekül ağırlığında ve yapıdaki (lineer veya dallı) PEG-enzimatik bozunur dizin-DOX konjugatlarıyla yapılan çalışmada DOX salım hızının PEG molekül ağırlığı ve yapısıyla değişmesi, enzimatik bozunur dizinin aktivitesinde taşıyıcı makro molekülün özelliklerinin, bir başka deyişle enzimatik bozunur dizinin erişilebilirliğinin büyük bir etkisi olduğunu göstermektedir. Bu sonuçtan yola çıkarak bu 3 farklı çalışmada taşıyıcı sistemlerin farklı olması dolayısıyla GFLG ve RRALAL dizininin biyobozunma hızını karşılaştırmak mümkün değildir. Bu çalışmalar, taşıyıcı sistemlerin ilaç salım hızının polimerin hidrofobitesisi, hidrofilik bloğun yapısı ve uzunluğu, eklenen

enzimatik bozunur ve pH cevaplayan dizinler ve kimyasal bağın çeşidiyle kontrol edilebileceğini açıkça ortaya koymuştur. Her ne kadar ilacın konjuge edilmesi nötral pH değerindeki salım oranını makul bir seviyeye çekse de ilacın asidik pH değerlerindeki salım hızı ilacın fiziksel çekimle bağlandığı duruma göre daha yavaş olarak gözlenmiştir. Dolayısıyla ilaç taşıyıcı sistemine hem ilacı asidik ortamda bozunur bağla konjuge etmek hem de sisteme pH cevaplayabilen moleküller yerleştirmek, bu iki durumun dezavantajlarını azaltabilecektir. Hatta yukarıdaki çalışmalar ışığında aynı sisteme enzimatik ortamda bozunur dizinler eklemek endozomal ortamdaki bozunma hızını daha da arttıracaktır (Etrych vd. 2001; Bae vd. 2005b; Bae vd. 2007; Chytil vd. 2008). Özellikle polimerizasyon reaksiyonlarında moleköl ağırlığı ve kompozisyon kontrolü sorunu yaşanması olasıdır. Her ne kadar verimi polimerizasyon metoduna göre düşük olsa da, alternatif bir metot olan kimyasal konjugasyon tekniği çok fonksiyonlu moleküllerin sentezinde büyük bir öneme sahiptir. Kuşkusuz konjugasyon metodunun en büyük avantajı kompozisyonu ve moleküler ağırlığı daha önceden belirlenmiş moleküllerin birleştirilmesiyle moleküler düzeyde kontrol ve değişik özellikteki molekülleri (polimer, peptid, ilaç gibi) birleştirerek çok fonksiyonlu melez moleköl sentezini sağlamasıdır (Top ve Kiick 2010).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1 Gereçler

Metoksipolietilen glükol-propiyonik asit (Moleküler ağırlık: 5000 g/mol ve >80% COOH fonksiyonel gruba sahip), metoksipolietilen glükol maleimid (Moleküler ağırlık: 5000 g/mol ve >90% maleimid fonksiyonel gruba sahip), adipik asit dihidrazid (AADH) karbohidrazid (CHYD), dimetil sülfoksit (DMSO), dietil eter (DEE) ve asetonitril (HPLC saflığında) Sigma Aldrich'ten satın alınmıştır. N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimid hidroklorit (EDC.HCl) ve N-hidroksisüksinimid (NHS) sırasıyla P3 Biosystems ve Alfa Aesar firmalarından temin edilmiştir. İlaç konjugasyon reaksiyonlarında sentez kullanımına uygun saflıkta Merck-Millipore markalı trifloroasetik asit (TFA), Alfa Aesar markalı N-etildiisopropilamin (DIPEA), Sigma-Aldrich'ten satın alınan (benzotriazol-1-iloksi)tripirolidinofosonyum hekzaflorofosfat (PyBOP) ve Medkoo Biosciences markalı doksorubisin.HCl (DOX) kullanılmıştır.

Peptidler rink amid MBHA reçinesi, Fmoc-His-Trt-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Cys-Trt-OH, Fmoc-Glu-(OtBu)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Leu-OH (NovaBiochem), N,N,N',N'-tetrametil-O-(1H-benzotriazol-1-il)uronyum hekzaflorofosfat (HBTU), hidoksibenzotriazol (HOBt) (P3 Biosystems) dimetil formamid (DMF), diklorometan (DCM) 4-methylmorpholin (NMM) (Sigma-Aldrich), ve piperidin (Acros) kullanılarak sentezlenmiştir. Sentezlenen peptidin Reçineden ve fonksiyonel gruplarından ayrılma işlemi triisopropil silan (TIS), 1,3-dimetoksibenzen (DMB), ve sentez kullanımına uygun saflıkta TFA (Merck-Millipore) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Tampon çözelti hazırlanmasında sodyum fosfat monobazik, imidazol (Fluka) sodyum klorür, sodyum hidroksit, EDTA sodyum tuzu, L-sistein (Sigma Aldrich), susuz 4-morfolineetansülfonik asit (MES) (AppliChem), asetik asit and hidroklorik asit (Merck), kullanılmıştır. Çekim (affinity) kromatografisi His Pur Ni-NTA reçinesi (Thermo Scientific), jel geçirgenlik kromatografisi Sephadex LH-20 (GE Healthcare) reçinesi yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Diyaliz işlemlerinde ve ilaç salım deneylerinde Snake Skin (MWCO 3.5 kDa) diyaliz membranı (Thermo Scientific) kullanılmıştır. İlaç salım deneylerinde Merck firmasından satın alınan katepsin B (insan karaciğeri, C = 0.53 mg protein/ml, spesifik aktivite >10 U/mg protein) kullanılmıştır.

Sinapik asit (Sigma), D₂O (Merck) ile FTIR ölçütünde potasyum bromür (Sigma) sırasıyla MALDI-TOF, NMR ve FTIR spektroskopisi için örnek hazırlama işleminde kullanılmıştır.

Gentamisin sülfat, yeni doğmuş buzağı serumu (FBS), tripsin.EDTA çözeltisi ve 0.5% tripan mavisi çözeltisi Biological Industries firmasından temin edilmiştir. L-glutamin içeren RPMI-1640 ile 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-dfeniltetrazolyum bromür (MTT) sırasıyla Sigma-Aldrich ve Amresco firmalarından satın alınmıştır. Bütün kimyasal ve çözgenler herhangi bir saflaştırma işlemine tabi tutulmaksızın kullanılmıştır.

3.2 Yöntemler

3.2.1 Metoksi(polietilen glükol)-hidrazon–doksorubisin (mPEG-HYD-DOX) Konjugatlarının Sentezi

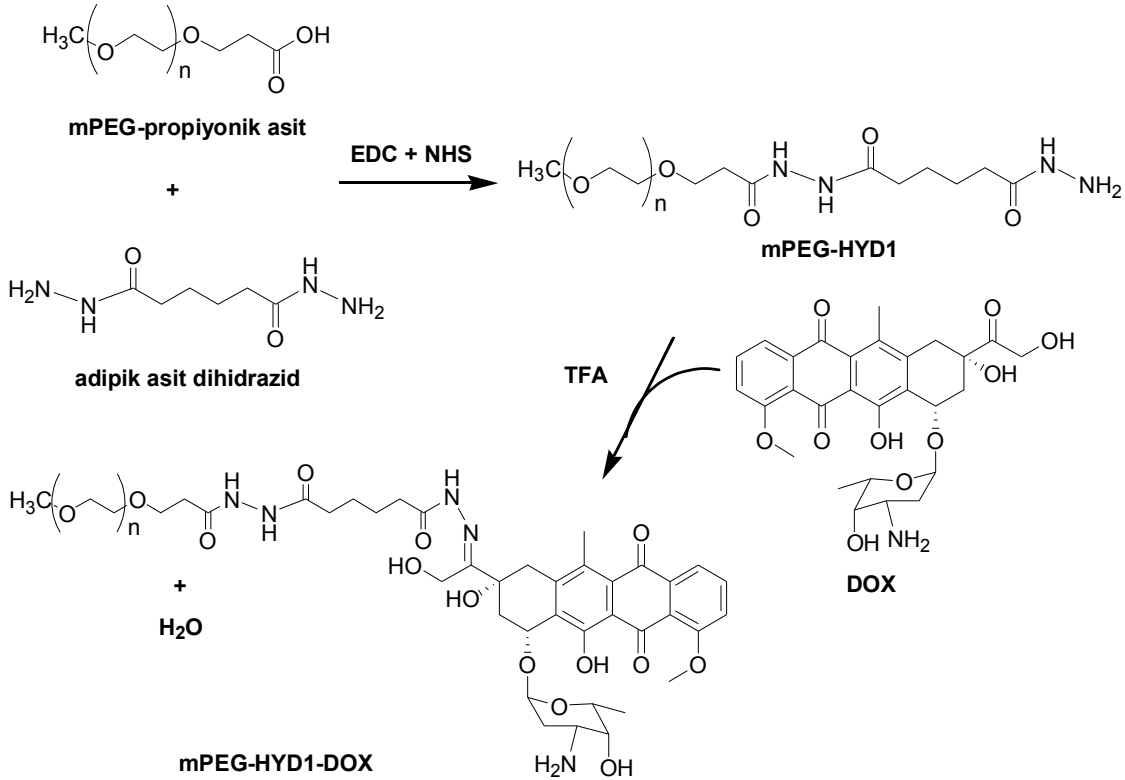
Model antikanser ilacı, doksorubisin taşıyıcı moleküle aşağıda verilen iki aşamada konjuge edilmiştir:

- mPEG karboksilik asit grubunun hidrazid fonksiyonel grubuna dönüşümü
- hidrazid formundaki mPEG molekülüne hidrazon bağıyla doksorubisinin bağlanması

mPEG-propiyonik asidin hidrazid formları of dihidrazid molekülleri (AADH veya CHYD) kullanılarak NHS varlığında gerçekleştirilen EDC eşleşme reaksiyonu ile hazırlanmıştır ([Sehgal ve Vijay 1994](#); Hermanson 1996). {Sehgal, 1994 #48;Hermanson, 1996 #49} Reaksiyon şemaları sırasıyla Şekil 5 ve Şekil A1'de verilmiştir. AADH ve CHYD kullanılarak sentezlenen mPEG-hidrazidler sırasıyla mPEG-HYD1 ve mPEG-HYD2 olarak gösterilmiştir. Bu reaksiyonlarda 3 mmol AADH veya CHYD (300 kat fazla mPEG-propiyonik asit COOH gruplarına göre) 10 mL pH 7.4'te PBS tampon çözeltisinde çözülmüştür (150 mM NaCl içeren 100 mM fosfat) (Çözelti 1). AADH reaksiyonunda, çözeltinin tamamen çözünmesini sağlamak için çözme işlemi 40-45°C'de ultrasonik banyoda gerçekleştirilmiştir. Ayrı bir şişe içinde, 50 mg (~0.01 mmol) mPEG-propiyonik asit, 1 mmol EDC.HCl, 0.4 mmol NHS 6 mL pH 6.0'da 150 mM NaCl içeren 25 mM MES tampon çözeltisinde çözülmüştür (Çözelti 2). Sonra çözelti 2 oda sıcaklığında yaklaşık 15 dakika karıştırılmış ve çözelti 1'in üzerine damla damla eklenmiştir. İki çözelti birleştirildikten sonra pH'ı 7.4'e ayarlanmış ve reaksiyon 30°C'de gece boyunca devam etmiştir. mPEG bileşiklerini izole etmek için reaksiyon karışımı önce nötral pH'ta 150 mM NaCl içeren 100 mM of fosfat tampon çözeltisine sonra deiyonize suya karşı diyaliz edilmiştir. Daha sonra çözelti liyofilize edilmiş ve elde edilen örnekler samples at -20°C saklanmıştır. Reaksiyon ve ayırma işlemleri sonucu son ürünün yüzdesi (karışım of mPEG-propiyonik asit and mPEG-

hidrazid) teorik değerin % 75 ± 5'i olarak elde edilmiştir. 1H NMR kullanılarak mPEG-HYD1'in hidrazid fonksiyonel grubu % 53 ± 1 olarak belirlenmiştir. DOX konjugasyonu öncesinde başka saflaştırma işlemi yapılmamıştır.

DOX'un keton grupları of taşıyıcı molekülün hidrazid gruplarına asit bozunur hidrazon bağıyla konjuge edilerek taşıyıcı molekülün son formu elde edilmiştir. Şekil 5 ve Şekil A1 sırasıyla DOX'un mPEG-HYD1 ve mPEG-HYD2'ye konjugasyon reaksiyonlarını göstermektedir.



Şekil 5. mPEG-HYD1-DOX hazırlama reaksiyonları

Tablo 1. DOX konjugasyon deneyleri

Örnek kodu	mPEG- HYD1 : DOX (mg/mg)	DOX ekleme	
		metodu	TFA (µl)
S1	2.5:1	bir kez	10
S2	2.5:1	bir kez	20
S3	2.5:2	bir kez	20
S4	2.5:2	iki kez	20

DOX konjugasyon reaksiyonları katalizör olarak TFA kullanılarak DMSO içerisinde 30°C sıcaklığında ve 3 gün süresince karanlıkta gerçekleştirilmiştir (Bae vd. 2003; Bae vd. 2007).

Reaksiyon şartları değiştirilerek en fazla DOX konjugasyon yüzdesini veren reaksiyon seçilmiştir (Tablo 1). Bu deneme reaksiyonlarında, 5 mg mPEG-HYD1 (0.001 mmol) ve 1 ml DMSO karıştırılmış, 2 veya 4 mg DOX.HCl (0.0034 veya 0.0068 mmol) ilave edilmiştir. Katalizör hacmi 10 veya 20 µl olarak kullanılmıştır. Buna ilaveten S4 için DOX.HCl miktarının yarısı reaksiyonun başında diğer yarısı ise bir gün sonra eklenmiştir. mPEG-HYD1-DOX ve mPEG-HYD-2 sistemlerinin hazırlanmasında en fazla DOX konjugasyon yüzdesi elde edilen reaksiyon şartları (mol bazında DOX: mPEG-hidrazid oranı 6.8:1, hacimce DMSO:TFA oranı 100:2) kullanılmıştır.

Reaksiyonlar tamamlandıktan sonra reaksiyon karışımı soğuk DEE (-20 °C'de bekletilmiş) üzerine çöktürülmüştür. mPEG-HYD-DOX içeren çökelti santrifüjlenerek ayrılmıştır. Sıvı fazın ise turuncu renginden anlaşıldığı üzere serbest DOX'un bir kısmını içerdiği görülmüştür. Konjugatlarda kalan DEE çeker ocakta birkaç saat kurutularak uzaklaştırılmış ve kurutulmuş konjugatlar jel geçirgenlik kromatografisi için DMSO içinde tekrar çözülmüştür. Konjugatların içerisinde kalan serbest DOX'u ayırmak için DMSO içinde dağıtılmış Sephadex LH-20 reçinesi ve taşıyıcı faz olarak DMSO kullanılarak jel geçirgenlik kromatografisi uygulanmıştır. İzole edilen konjugatlar (kırmızı renkli kolondan sıyrılan ilk faz) DMSO'yu uzaklaştırmak için soğuk DEE üzerine çöktürülmüştür. Örnekler çeker ocak içerisinde kurutulduktan sonra, deiyonize su içinde çözülmüş, liyofilize edilip -20°C'de saklanmıştır.

3.2.2 Metoksi(polietilen glükol)-peptid-hidrazon–doksorubisin (mPEG-AT1-DOX)

Konjugatlarının Sentezi

mPEG-peptid-HYD-DOX konjuge sistemi 4 aşamada sentezlenmiştir:

- Peptid sentezi
- mPEG ve peptid konjugasyonu
- mPEG-peptidin hidrazid formunun sentezi
- mPEG-peptid-hidrazid sistemine ilaç konjugasyonu

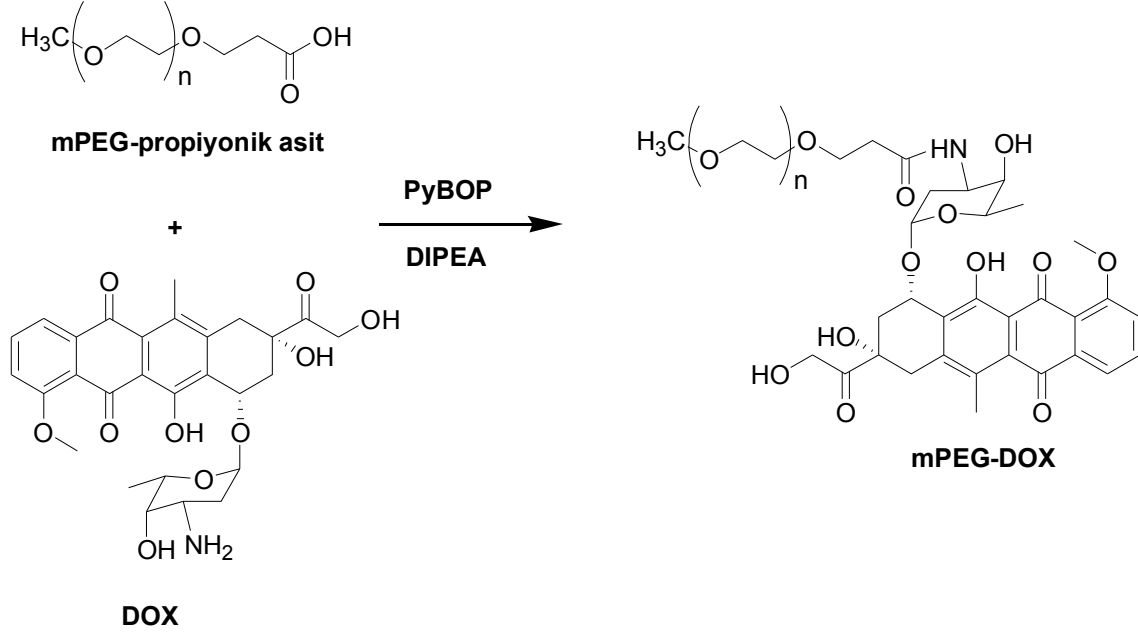
CGGGHHHHHGGGE dizinine sahip (teorik moleküler kütle = 1414 Da) ve AT1 ile gösterilen peptid, rink amid MBHA reçinesi (0.66 mmol/g fonksiyonel gruba sahip) üzerinde Fmoc stratejisi uygulanarak sentezlenmiştir. Katı faz peptid sentezi (SPPS) otomatik peptid sentez cihazı (AAPTEC Focus XI) kullanılarak AAPTEC firmasının önerdiği yöntemle gerçekleştirilmiştir. Koruyucu fonksiyonel gruplar, 15 dakika süreyle DMF içinde 20% piperidine maruz bırakılarak uzaklaştırılmış ve bu reaksiyon 3 defa tekrarlanmıştır. Karboksilik asit-amin eşleşme reaksiyonları aktivasyon ajanı olarak HBTU ve 0.4 M NMM kullanılarak 1 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Bu ajanlara ilaveten, His ve Cys'nin dizine eklenmesi sırasında rasemizasyonunu engellemek amacıyla HOBt kullanmıştır. Herbir amino asit için eşleşme

reaksiyonları iki kez tekrar edilmiştir. Sentez sonunda reçine DCM ile yıkanmış ve oda sıcaklığında N₂ gazı kullanılarak kurutulmuştur. Reçineden ve korucu gruplardan ayırmak için kurutulmuş reçine 92.5:5:2.5 TFA:DMB:TIS kokteyli ile oda sıcaklığında 2.5 saat muamele edilmiştir. Reçine polipropilen kolon kullanılarak filtre edilmiş, sıvı faz 1:10 kokteyl: DEE hacim oranı kullanılarak soğuk DEE üzerine çöktürülmüştür. Çökelti (ham peptid) santrifüjle ayrılmış, iki defa daha DEE ile yıkanmıştır. Ham peptidin içeriğindeki DEE'nin oda sıcaklığında N₂ akımıyla giderilmesinin ardından 1-2 ml % 1 asetik asit içeren deiyonize su içinde çözülmüş, liyofilize edilip -20°C'de saklanmıştır.

Ham peptidin PEG konjugasyonu mPEG-maleimid ve peptidin N-terminal grubundaki sistein arasında gerçekleşen Şekil A2'de verilen Michael katılma reaksiyonu ile yapılmıştır (Hermanson 1996). 50 ml'lik balon içinde yaklaşık, 20 mg peptid (0.014 mmol) sisteinlerin hava oksidasyonunu engellemek için azot gazı akışında 10 mL PBS tamponu (pH 7.2'de 150 mM NaCl içeren 100 mM fosfat) içinde çözülmüştür. 10 dakika azot gazı geçirildikten sonra, azot atmosferinde 75 mg (0.015 mmol) mPEG-maleimid (mPEG-MAL) eklenmiş ve balonun kapağı septum ile sıkıca kapatılarak reaksiyon oda sıcaklığında 4 saat boyunca devam etmiştir. Reaksiyona girmeyen mPEG-MAL, peptidin ve dolayısıyla mPEG-peptid konjugatının histidinlerine seçimli olarak bağlanan Ni-NTA reçinesi yardımıyla gerçekleştirilen çekim kromatografisi kullanılarak ayrılmıştır. Çekim kromatografisinde pH 8.0'de 50 mM sodyum fosfat ve 0.3 M NaCl bağlama ve yıkama tapon çözeltisi olarak kullanılmıştır. Reçineye bağlanmayan mPEG-MAL baryum iyodür ve PEG'in kompleks oluşumuna dayalı kolorimetrik metod kullanılarak belirlenemeyinceye kadar yıkanmıştır (Gong vd. 2007). Peptid ve mPEG-peptid, konjugatı ise pH 7.4'te 0.3 M NaCl ve 0.5 M imidazol içeren 50 mM fosfat tampon çözeltisi kullanılarak reçineden ayrılmıştır. mPEG-peptid konjugatını izole etmek için, peptid (moleküler kütle: ~1.4 kDa) MWCO boyutu 3.5 kDa olan SnakeSkin diyaliz membranı (Thermo Scientific) yardımıyla deiyonize suya karşılık diyaliz edilerek ayrılmıştır. Son olarak konjugat çözeltisi liyofilize edilmiş, elde edilen mPEG-AT1 konjugatı -20°C'de saklanmıştır. mPEG-AT1'in hidrazid formu peptidin C-terminalindeki glutamik asitte bulunan COOH grubuyla AADH reaksiyonu ile Bölüm 3.2.1'de anlatılan yöntemle hazırlanmıştır. Benzer şekilde, taşıyıcı sistem mPEG-AT1-DOX, mPEG-HYD-DOX konjugatlarının hazırlanmasında kullanılan deneysel prosedüre bağlı kalınarak sentezlenmiştir (Şekil A3).

3.2.3 Metoksi(polietilen glükol)—doksorubisin (mPEG-DOX) Konjugatının Sentezi

mPEG-DOX konjugatı enzimatik bozunur dizine sahip taşıyıcı sistem için kontrol taşıyıcı molekül olarak sentezlenmiştir. Doksorubisinin taşıyıcı molekül mPEG propiyonik aside kararlı bir bağ olan amid bağıyla konjuge edildiği bu sistem, DOX'un amin grubuyla mPEG propiyonik



Şekil 6. mPEG-DOX konjugatı hazırlama reaksiyonu

asidin COOH grubu reaksiyonu sonucu elde edilmiştir (Şekil 6). Reaksiyon yöntemi literatürde verilen karboksilik asit-amin reaksiyonu yöntemlerinden esinlenerek geliştirilmiştir (Lu ve Felix 1994; Veronose vd. 2005; Wang ve Kiick 2005). 20 mg mPEG (0.004 mmol) ve 14.4 mg PyBOP (0.028 mmol) 4 ml DMSO içerisinde çözülüp, 9.6 µl DIPEA (0.055 µmol) ve 8 mg DOX.HCl (0.0136 mmol) eklendikten sonra, reaksiyon 30 °C'de ışıktan korunarak 3 gün boyunca devam etmiştir. Reaksiyona girmeyen serbest DOX'un bir kısmı reaksiyon karışımındaki mPEG bileşiklerinin soğuk DEE üzerine çöktürülmesi sırasında DEE fazına geçerek ayrılmıştır. Elde edilen çökelti DEE ile çözelti fazındaki turuncu renk tamamen gidinceye kadar yıkanmış ve çeker ocağın içinde DEE buharlaştırılarak kurutulmuştur. Çökelti 2 ml DMSO içinde çözülüp içeriğindeki serbest DOX'u ayırmak amacıyla DMSO içerisinde dağıtılan Sephadex LH-20 kullanılarak jel geçirgenlik kromatografisine tabi tutulmuştur. Kolondan sıyrılan fraksiyonlara kolorimetrik PEG tayini testi uygulanmış, DMSO içerisindeki PEG içeren fraksiyonlar soğuk DEE üzerine çöktürülmüştür. Çeker ocağın içinde kurutulduktan sonra deiyonize su içinde çözülüp, liyofilize edilmiş ve -20°C'de saklanmıştır.

3.2.4 Enzimatik Bozunur Dizini İçeren Metoksi(polietilen glükol)-peptid-doksorubisin (mPEG-AT3-DOX) Konjugatının Sentezi

Enzimatik bozunur peptid dizini içeren mPEG-Peptid-DOX konjugate sistemi 3 aşamada sentezlenmiştir:

- Peptid sentezi
- mPEG ve peptid konjugasyonu
- mPEG-peptid konjugatına ilacın bağlanması

CGGGHHHHHRRALALGGGE dizinine sahip (teorik moleküler kütleye = 2095 Da) AT3 peptidinin Fmoc kimyası kullanılarak otomatik peptid sentez cihazında (AAPTEC Focus XI) gerçekleştirilen sentezi, reçineden ayırma ve koruyucu gruplardan ayırma işlemleri Bölüm 3.2.2'de verilen prosedürleri kullanarak gerçekleştirilmiştir.

Ham peptidin PEG konjugasyon işlemi Şekil A4'te gosterildiği üzere peptidin N-terminalindeki sisteinde bulunan tiol grubu ve mPEG-maleimidin maleimid grubunun Michael katılma reaksiyonu sonucu gerçekleştirilmiştir. AT3 peptidinin nötral pH'da çözünlüğünün az olması dolayısıyla Bölüm 3.2.2'de verilen yöntem değiştirilmiştir. Yaklaşık 40 mg peptid (0.019 mmol) bir balon içinde 5 ml % 0.1 asetik asit çözeltilisinde çözüldükten sonra 15 ml PBS tamponu (pH 7.2'de 150 mM NaCl içeren 100 mM fosfat) ve 100 mg mPEG-MAL (0.02 mmol) eklenmiştir. Sisteinlerin oksidasyonunu engellemek amacıyla ekleme işlemleri azot atmosferinde gerçekleştirilmiş, balon septum ile sıkıca kapatıldıktan sonra reaksiyon 4 saat devam etmiştir. mPEG-AT3 konjugatının izolasyonunda Bölüm 3.2.2'de verilen çekim kromatografisi ve diyaliz yöntemi kullanılmıştır. Doksorubisin mPEG-AT3 konjugatına mPEG-DOX sisteminde olduğu gibi kararlı amid bağıyla bağlanmıştır (Şekil A4). mPEG-AT3-DOX sistemi mPEG-AT3'ün C-terminalindeki glutamik asidin COOH grubuyla DOX'un amin grubunun reaksiyonu sonucu Bölüm 3.2.3'te verilen mPEG-DOX hazırlama ve izolasyon yöntemi kullanılarak elde edilmiştir.

3.2.5 Taşıyıcı Sistemlerin Karakterizasyonları

Fonksiyonel mPEG molekülleri ve sentezlenen peptidler ve mPEG-peptid konjugatlarındaki fonksiyonel gruplar Fourier Dönüşümlü Kızıl Ötesi (FTIR) Spektrofotometresi ile belirlenmiştir. FTIR analizlerinde KBr pellet tekniği kullanılmıştır. Analiz öncesi örneklerdeki nem oda sıcaklığında vakum etüvünde giderilmiştir. Pellet hazırlamak için yaklaşık 1 mg örnek 150 mg KBr içerisinde dağıtılmıştır. Spektrumlar 400-4000 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında Shimadzu IRPrestige-21 FTIR-8400S model spektrofotometre kullanılarak alınmıştır.

AADH kullanılarak gerçekleştirilen hidrazid konjugasyon reaksiyonu NMR spektroskopisi kullanılarak takip edilmiştir. 2.5 mg örnek 0.6 ml D₂O içerisinde çözülmüş ve ¹H NMR spektrumu Varian Vnmr 400 model spektrometre kullanılarak kaydedilmiştir. Teorik kimyasal kayma değerleri ChemDraw yazılımı kullanılarak elde edilmiştir. NMR verileri ACDLAB 12, 1D NMR Processor yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir.

Peptidlerin ve mPEG-peptid konjugatlarının saflığı Agilent 1100 Model HPLC sistemi kullanılarak ters faz yüksek basınç sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemiyle tayin edilmiştir. % 0.1 TFA içeren deiyonize su ve %0.08 TFA içeren asetonitril sırasıyla Çözgen A ve Çözgen B olarak kullanılmıştır. Çözgen A'da çözünen 1-2 mg örnek filtre edildikten sonra 100 µL enjeksiyon hacminde C18 analitik kolonuna (Inertsil WP-300, 5µm, 4.6 x 100 mm) verilmiştir. Bölüm 4.2'de verilen örnekler (AT1, mPEG-MAL ve mPEG-AT1) kolona enjekte edildikten sonra 5 dakika 95:5 oranında Çözgen A:Çözgen B kolondan geçirilmiş sonra Çözgen A:B oranı 50 dakikada 95:5'ten 40:60'a düşürülmüş kolondan sıyrılan örnekler UV detektörüyle 214 nm'de ölçüm yapılarak görüntülenmiştir. Bölüm 4.5'te verilen örneklerin (AT3, mPEG-MAL, ve mPEG-AT3) analizinde ise farklı olarak 95:5 oranında Çözgen A:Çözgen B 15 dakika kolondan geçirilmiş, daha sonra Çözgen A:B oranı 40 dakikada 95:5'ten 40:60'a düşürülmüştür. Bütün analizler 1ml/dak. çözgen akış hızında gerçekleştirilmiştir.

Örneklerin kütle spektrumları İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Kimya Bölümü'nde bulunan Biyolojik Kütle Spektrometresi ve Proteomik Laboratuvarı'nda alınmıştır. AT1 peptidinin moleküler kütlesi elektrosprey iyonizasyon kütle spektroskopisi (ESI-MS) kullanılarak belirlenmiştir. Deney elektrosprey iyonizasyon kaynağı içeren LTQ XL lineer iyon-tuzağı kütle spektrometresinde (Thermo Finnigan, San Jose, CA) gerçekleştirilmiştir. Örnek % 1 asetik asit içeren ultra-saf suda çözünüp eşit hacimde HPLC saflığında metanol ile karıştırıldıktan sonra kütle spektroskopisi cihazına verilmiştir. Daha büyük moleküler kütleye sahip AT3 peptidinin moleküler kütlesi ESI-MS kullanılarak belirlenememiştir. AT3 peptidi, mPEG-AT1 ve mPEG-AT3 peptidinin kütle spektrumları matris destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) yöntemiyle belirlenmiştir. Örnekler % 0.1 TFA içeren ultra saf suda çözülmüş matris olarak sinapik asit kullanılmıştır. Ölçümler Bruker Daltonics – Autoflex III Smartbeam MALDI TOF/TOF MS cihazında gerçekleştirilmiştir.

Asidik ortamda bozunur kimyasal bağa sahip mPEG-HYD1-DOX, mPEG-HYD2-DOX ve mPEG-AT1-DOX konjugatlarının DOX konjugasyon yüzdeleri Perkin Elmer Lambda-45 model UV-Vis spektroskopisi kullanılarak belirlenmiştir. Yaklaşık 0.5 mg örnek 700 µL deiyonize suda çözülmüş, örneklerin tam derişim değerleri hesaplamalar için kaydedilmiştir. Çözeltinin 488

nm'deki absorbands değeri belirlenmiş ve örneklerin DOX içerikleri serbest DOX'un 488 nm'deki molar absorpsiyon katsayısı, $11500 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, kullanılarak aşağıdaki denklemler yardımıyla belirlenmiştir (Etrych vd. 2002):

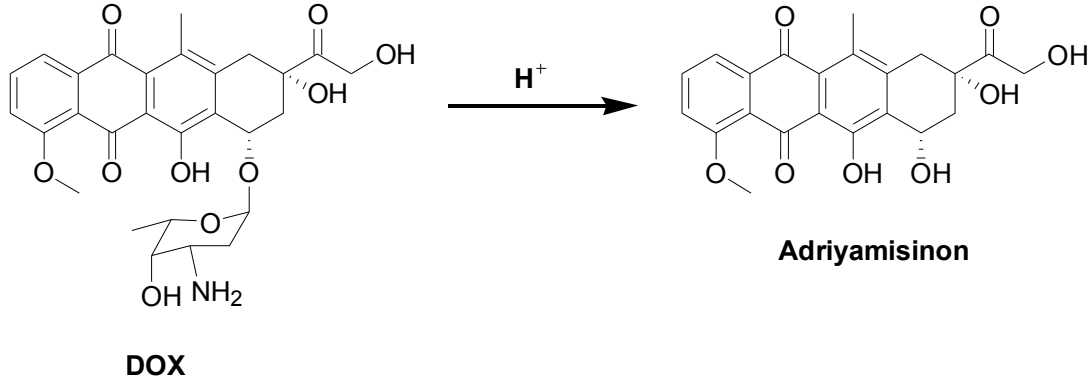
$$DOX \text{ konjugasyonu} = \frac{C \left(\text{Ölçülen } \frac{\text{mmol}}{\text{ml}} \text{ DOX değeri} \right)}{C \left(\text{Konjugatın } \frac{\text{mmol}}{\text{ml}} \text{ değeri} \right)} \times 100$$

$$C \left(\text{Ölçülen } \frac{\text{mmol}}{\text{ml}} \text{ DOX değeri} \right) = \frac{\text{Konjugatın } 488 \text{ nm}' \text{ de ölçülen absorbandsı}}{11500 \frac{\text{ml}}{\text{mmol cm}} \times 1 \text{ cm}}$$

$$C \left(\text{Konjugatın } \frac{\text{mmol}}{\text{ml}} \text{ değeri} \right) = \frac{\text{Konjugatın kütle derişimi} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right)}{\text{Konjugatın moleküler kütlesi} \left(\frac{\text{mmol}}{\text{mg}} \right)}$$

Kararlı amid bağıyla hazırlanan konjugatlardaki toplam DOX miktarı ise DOX'un asit hidrolizinden sonra tayin edilmiştir. Yüksek sıcaklıkta asit ile muamele edilen DOX'un aglikon (adriyamisinon) ve şeker (daunosamin) grubu arasındaki glikosidik bağı kırılmaktadır (Configliacchi vd. 1996). DOX'un asit hidroliz reaksiyonu Şekil 7'te verilmiştir. Yaklaşık 0.2 mg DOX 0.5 ml deiyonize suda çözünmüş, 8 kat seyreltme yaptıktan sonra UV-Vis spektrumu kullanılarak 488 nm'deki molar absorpsiyon katsayısı kullanılarak derişimi belirlenmiştir. Daha sonra bu çözeltiden 200 μL alınıp 200 μL 2N HCl ile 2 kat seyreltildikten sonra parafilmle sıkıca sarıldıktan sonra 50°C'de 2 saat inkübatörde bekletilerek asit hidrolizine maruz bırakılmıştır. Soğuduktan hemen sonra 1.2 ml DMSO eklenerek 4 kez daha seyreltme yapılmıştır. Elde edilen bu stok çözeltiden, seyreltmelerde 1:3 oranında 1 N HCl: DMSO çözeltisi kullanarak farklı derişimlerde standart çözeltiler hazırlanmış UV-Vis spektrofotometre cihazında 488 nm dalga boyuna karşılık gelen absorbands ölçülerek kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. 2 farklı stok çözeltiden hazırlanan örnekleri kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisinden adriyamisinonun molar absorbands katsayısı $15551 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ olarak belirlenmiştir (Şekil A5). mPEG-DOX ve mPEG-AT3-DOX sistemlerinin toplam DOX miktarını belirlemek amacıyla yaklaşık 0.25 mg örnek 250 μL 1N HCl'de çözülmüş (parafilmle sıkıca sarıldıktan sonra) 50°C'de 2 saat asit

hidrolizi sonrasında soğuduktan sonra 750 µL DMSO eklenerek 488 nm'de absorbansı ölçülmüştür. Kalibrasyon eğrisinden elde edilen molar absorbans katsayısı kullanarak toplam DOX miktarı



Şekil 7. DOX'un asit hidroliz reaksiyonu

belirlenmiştir. mPEG-AT3-DOX içerisindeki serbest DOX miktarını belirlemek amacıyla ters faz HPLC metodu kullanılmıştır. Analizler analitik C18 kolonunda (Vydac 218TP54, 5µm, 4.6 x 250 mm) ve 0.8 ml/dak akış hızında gerçekleştirilmiştir. Örnek kolona 100 µL hacminde enjekte edilmiştir. Başlangıçta 90:10 olan Çözgen A: Çözgen B oranı 40 dakika 20:80 olacak şekilde lineer bir şekilde değiştirilmiştir.

Konjugatların boyut dağılımları dinamik ışık saçılması yöntemiyle Malvern ZetaSizer Nano ZS model cihaz kullanılarak ölçülmüştür. Örneklerin difüzyon katsayıları CONTIN korelasyonunu uygulayarak belirlenmiş, daha sonra cihazın yazılımında bulunan Stoke-Einstein denklemi yardımıyla hidrodinamik çap değerleri belirlenmiştir. örnekler 3 mg/ml derişiminde deiyonize su içinde hazırlanmış pH 7.4'de 300 mM NaCl içeren 20 mM fosfat tampon çözeltisi veya pH 5.0'te 300 mM NaCl içeren 20 mM asetat tampon çözeltisi ile 2 kat seyreltilip filtrelenmiştir. Ölçümler örneklerin 25°C'de en az 5 dakika denge konumuna gelmesinden sonra yapılmış ve 3 defa tekrarlanmıştır. Örneklerin boyut dağılımları örnekler hazırlandıktan hemen sonra birkaç saat içerisinde, çözeltileri 1 gece (mPEG-HYD1-DOX, mPEG-HYD2-DOX, mPEG-AT1-DOX, mPEG-DOX ve mPEG-AT3-DOX) veya 2 gece (sadece mPEG-DOX ve mPEG-AT3-DOX örnekleri için) boyunca 37°C'de inkübatörde beklettikten sonra belirlenmiştir.

mPEG-DOX örneklerinin atomik kütle mikroskopi (AFM) görüntüleri Digital Instruments-MMSPM Nanoscope IV cihazı kullanılarak elde edilmiştir. Örneklerin görüntülenmesinde substrat olarak kullanılan mika plakaların birkaç katmanı kaldırıldıktan sonra UV ışınına maruz bırakılarak yüzeyleri temizlenmiştir. 1.5 mg/ml derişiminde deiyonize suda hazırlanan (mPEG-DOX ve

mPEG-AT3-DOX) örneği filtre edilmiş, 2 µL mika plakanın üzerine eklendikten birkaç dakika sonra plaka üzerine eklen 8 µL filtre edilmiş deiyonize su ile 1:5 oranında seyreltilmiştir. Bir diğer örnek hazırlama yönteminde 1 µL filtre edilmiş deiyonize su ile 1:10 oranında seyreltilen mPEG-AT3-DOX (1.5 mg/ml) direk olarak plakanın üzerine uygulanmıştır. Mika plakalar ışıktan korunarak oda sıcaklığında kurutulduktan sonra cihazın temassız (tapping) modunda silikon uç kullanılarak örneklerin görüntüleri alınmıştır. 2 boyutlu ve 3 boyutlu AFM görüntüleri, tanecik çapı ve mutlak yükseklik analizleri NanoScope Analysis yazılımı kullanılarak elde edilmiştir.

Asidik ortamda bozunur kimyasal bağa sahip mPEG-HYD1-DOX, mPEG-HYD2-DOX ve mPEG-AT1-DOX konjugatlarının ve kararlı amid bağına sahip DOX taşıyıcı sistemlerinin (mPEG-DOX, mPEG-AT3-DOX) ilaç salım profilleri diyaliz metodu kullanılarak belirlenmiştir. Asidik ortamda bozunur kimyasal bağa sahip taşıyıcı sistemlerinde 1.5 mg örnek 1 ml tampon çözelti (pH 7.4'de 150 mM NaCl içeren 10 mM fosfat tampon çözeltisi veya pH 5.0'te 150 mM NaCl içeren 10 mM asetat tampon çözeltisi) içinde çözünüp MWCO değeri 3.5 kDa olan diyaliz membranı içine yerleştirilmiştir. Membran içinde 25 ml tampon çözeltisi bulunan 50 ml'lik Falkon tüp içine konularak tüpün kapağı sıkıca kapatılmış, buharlaşmayı engellemek için parafilmle sarılmıştır. Daha sonra 150 rpm'de 37°C'de inkübatöre yerleştirilmiş, belirli zaman aralıklarında (1, 3, 6, 10, 24, 48, 56, ve 72 saat) 200 µL çözelti alınıp aynı miktarda tampon çözelti eklenmiştir. Salınan DOX miktarı 590 nm'de floresans emisyon şiddeti verileri kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrileri kullanılarak belirlenmiştir. Emisyon spektrumları 400-700 nm arasında eksitasyon dalga boyu olarak 480 nm seçilerek kaydedilmiştir. Ölçümler Perkin Elmer LS55 model floresans spektroskopisi kullanılarak gerçekleştirilmiş, eksitasyon ve emisyon slit genişliği sırasıyla 5 nm, ve 20 nm, tarama hızı 125 nm/dak. olarak ayarlanmıştır. Salınan DOX yüzdesi aşağıdaki denklemleri kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Salınan DOX yüzdesi} = \frac{C_t(\text{t anında salınan mmol DOX})}{C_i(\text{başlangıçta konjugatta bulunan mmol DOX})} \times 100$$

$$C_i = \frac{1.5 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \text{konjugat} \times 1 \text{ ml}}{\text{konjugatın molekül kütlesi} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mmol}} \right)} \times \frac{\text{DOX konjugasyon miktarı}}{100}$$

$$C_t = \frac{590 \text{ nm}'de \text{ ölçülen floresans şiddeti}}{\epsilon_{590} \left(\frac{ml}{\mu g \text{ cm}} \right) \left(\frac{1000 \mu g}{ml} \right) \times DOX' \text{ un molekül kütlesi} \left(\frac{mg}{mmol} \right) \times 1 \text{ cm}} \times 25 \text{ ml}$$

Yukarıdaki denklemde ϵ_{590} kalibrasyon eğrisinin eğimini göstermektedir, DOX'un PBS ve asetat tampon çözeltisi içinde elde edilen kalibrasyon eğrileri sırasıyla Şekil A6 ve Şekil A7'de gösterilmiştir. DOX'un kararlı amid bağıyla konjuge edildiği ilaç taşıyıcı sistemlerinde de aynı yöntem kullanılmıştır. Yalnızca diyaliz membranının içine yerleştirilen 1.5 mg/ml derişimindeki taşıyıcı sistemin hacmi 0.5 ml'ye membranın dışında kalan tampon çözeltinin hacmi ise oranlı olarak 12.5 ml'ye düşürülmüştür. mPEG-AT3-DOX örneğinin katepsin B varlığındaki ilaç salım profilini gerçekleştirmek için membranın içinde bulunan taşıyıcı sistem çözeltisine 5 μ L (0.53 mg/ml) katepsin B eklenmiştir. Tampon çözelti olarak ise pH 5.0'te 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5mM L-sistein içeren 50 mM sodyum asetat kullanılmıştır. Kararlı amid bağı içeren taşıyıcı sistemlerde ortama salınan DOX miktarı VarioSkan Flash Multimode Reader (Thermo Scientific) mikropilaka okuyucuda gerçekleştirilmiştir. Floresans ölçümlerinde eksitasyon dalga boyu olarak 480 nm kullanılmış, emisyon spektrumunda 590 nm'de elde edilen floresans şiddeti kullanılarak DOX kalibrasyon eğrileri (Şekil A13, Şekil A14 ve Şekil A15) oluşturulmuş ve ölçümler kaydedilmiştir. Bütün ilaç salım deneyleri 2 paralel olarak gerçekleştirilmiştir. Enzimin aktivitesini test etmek için ise 1.5 mg katepsin B bozunur dizine sahip AT3, 1 ml hacminde pH 5.0'te 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5mM L-sistein içeren 50 mM sodyum asetat tamponu içinde çözülüp filtre edildikten sonra 10 μ L hacmindeki (0.53 mg/ml) katepsin B üzerine eklenmiştir. Hazırlanan çözelti 37°C'de 3 saat inkübe edildikten sonra 100 μ L hacminde C18 analitik kolonuna (Inertsil WP-300, 5 μ m, 4.6 x 100 mm) enjekte edilmiştir. HPLC'de AT1 ve mPEG-AT1 örneklerinin analizinde kullanılan program uygulanmıştır. Kontrol olarak aynı şartlarda enzim içermeyen peptidin HPLC kromatogramı alınmıştır.

Örneklerin sitotoksikite testleri MTT yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Asidik ortamda bozunur ilaç taşıyıcı sistemleri ve bileşenleri için sitotoksikite testinde insan akciğer adenokarsinoma epitel hücre hattı (A549 hücreleri) kullanılmıştır. Hücreler %10 yeni doğmuş buzağı serumu ve 50 μ g/ml gentamisin içeren RPMI ortamında 37 °C ve 5% CO₂ ortamında çoğaltılmıştır. MTT testine başlamadan önce ilaç çözeltisi yerine steril PBS kullanarak hücre sayısı optimizasyonu yapılmış ve optimum hücre sayısı 5000 olarak bulunmuştur (Şekil A8). MTT testinde kullanılan yöntem 1'de 96 kuyucuklu mikropilakanın içine kuyucuk başına 90 μ L

besiyeri içinde 5000 hücre ekilmiştir. Hücreler 37 °C ve 5% CO₂ ortamında bir gün boyunca inkübe edildikten sonra 10 µL steril PBS içindeki örnekler (konjugatlar ve kontroller) kuyucuklara eklenmiştir. DOX içermeyen örnekler tek bir derişimde (15000 µg/ml = kuyucuğa eklenen derişim) test edilmiş, kuyucuğa eklenen DOX derişimleri 5-100 µg/ml, mPEG-HYD1-DOX mPEG-HYD2-DOX ve mPEG-AT1-DOX derişimleri ise 7.5-15000 µg/ml arasında değiştirilmiştir. Her bir örnek için 4 farklı ölçüm yapılmıştır. Örnekler eklendikten sonra hücreler 1 gün daha 37 °C ve 5% CO₂ ortamında bekletilmiştir. 24 saatin sonunda mikrolakalar oda sıcaklığında 1800 rpm ve 5 dakikada santrifüjlenmiş, besi yeri dökülüp yenisiyle değiştirilmiş (pipetle dikkatlice çekilmiş ve mikrolakalar ters çevrilip blotlanmıştır) hücreler MTT analizine başlamadan 1 gün daha 37 °C ve 5% CO₂ ortamında bekletilmiştir. MTT analizinde steril PBS'te hazırlanan 5 mg/ml MTT çözeltisinde 10 µL kuyucuklara eklenip, mikrolakalar 3 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra 1800 rpm ve oda sıcaklığında santrifüjledikten çözelti önce pipetle çekilmiş, mikrolaka ters çevrilip blotlandıktan sonra kuyucuklardan giderilmiştir. Her bir kuyucuğa 100 µL DMSO eklenmiş ve mikrolakalar 150 rpm'de 5 dakika boyunca çalkalanmıştır.

Enzimatik ortamda bozunur ilaç taşıyıcı sistemi ve bileşenleri için sitotoksitesite testi %10 yeni doğmuş buzağı serumu ve 50 µg/ml gentamisin içeren RPMI ortamında insan akciğer adenokarsinoma epitel (A549) hücre hattı ve insan prostat (PC3) hücre hattı kullanılarak yapılmıştır. Asidik ortamda bozunur ilaç taşıyıcı sistemlerinde uygulanan MTT testinde hücrelerin örneklerle maruz kaldıktan sonra ortamın taze besiyeri ile değiştirilip 1 gün inkübasyondan sonra MTT testine geçilmesi kısmı atlanıp örnekler döküldükten sonra direk MTT testine geçilmiştir. Örneklerin sitotoksitesitesi belirlenmeden önce PC3 hücre hattı için optimum hücre sayısı 10000 hücre/kuyucuk olarak bulunmuştur (Şekil A16). A549 hücre hattı için ise daha önceden uygulandığı üzere her bir kuyucuğa 5000 hücre ekimi yapılarak testler gerçekleştirilmiştir. Örneklerin sitotoksitesitesi 24 saate ilaveten 48 saat sonunda da belirlenmiştir. DOX içermeyen örnekler tek bir derişimde (PC3 için 15000 µg/ml = kuyucuğa eklenen derişim, A549 için 7500 µg/ml = kuyucuğa eklenen derişim) test edilmiştir. Kuyucuğa eklenen DOX derişimleri PC3 için 10-1000 µg/ml, A549 için 1-1000 µg/ml arasında değiştirilmiştir. mPEG-DOX ve mPEG-AT3-DOX ise PC3 ve A549 için sırasıyla 15-7500 µg/ml ve 7.5-7500 µg/ml derişimleri arasında kuyucuklara eklenmiştir. Her bir örnek için 5 farklı ölçüm yapılmıştır.

MTT testinin son aşamasında referans dalga boyu olarak 690 nm seçerek, 570 veya 590 nm'de absorbans değerleri VarioSkan Flash Multimode Reader (Thermo Scientific) cihazında ölçülmüştür. % canlılık değerleri aşağıdaki denklem kullanılarak belirlenmiştir.

$$canlilik = \frac{\text{Örneğin } 570 \text{ veya } 590 \text{ nm de ölçülen absorbanısı}}{\text{PBS kontrolünün } 570 \text{ veya } 590 \text{ nm de ölçülen absorbanısı}} \times 100$$

Örneklerin mutlak IC₅₀ değerleri 50% hücre canlılığına karşılık gelen derişim olarak Mathematica yazılımı kullanılarak deneysel verilere kübik yaklaşım interpolasyon metodu uygulanarak belirlenmiştir. Son olarak konjugatların DOX eşdeğeri IC₅₀ değerleri aşağıdaki formülden hesaplanmıştır:

$$DOX \text{ eşdeğeri } IC_{50} \text{ değeri} = \frac{\text{Konjugatın } IC_{50} \text{ değeri} \left(\frac{\mu g \text{ konjugat}}{ml} \right) \times MW_{DOX} \left(\frac{g}{mol} \right) \times \%DOX \text{ konjugasyon değeri}}{MW_{konjugat} \left(\frac{g}{mol} \right)}$$

İlaç taşıyıcı sistemlerin sitotoksisite test sonuçlarının istatistiksel analizi bağımsız 2 örnekle t-test metoduyla Minitab yazılımı kullanılarak yapılmıştır. p-değeri < 0.05 istatistiksel olarak anlamlı fark olarak kabul edilmiştir.

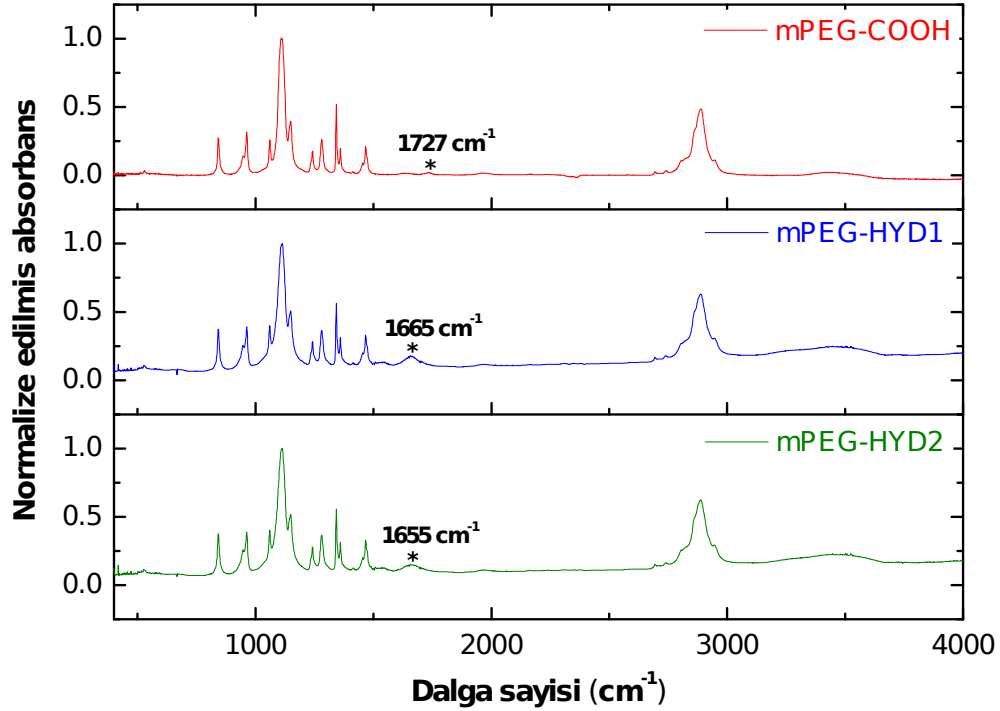
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Asidik ortamda bozunur PEG bazlı ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanması

Doksorubisinin asidik ortamda bozunur hidrazon bağı ile konjuge edildiği EDC ve NHS aktive edilmiş karboksilik asit-hidrazid eşleşme reaksiyonuyla hazırlanmış olan hidrazid fonksiyonel grubuna sahip taşıyıcı moleküllerin özellikleri Tablo 2 Hata: Başvuru kaynağı bulunamadı'de verilmiştir. mPEG-propiyonik asitin karboksilik asit grubunu hidrazid fonksiyonel grubuna dönüştürme reaksiyonları kalitatif olarak FTIR spektroskopisi kullanılarak takip edilmiştir. mPEG-propiyonik asit, mPEG-HYD1 ve mPEG-HYD2 örneklerinin FTIR spektrumları Şekil 8'de verilmiştir. Karşılaştırma amaçlı olarak alınan AADH and CHYD örneklerinin FTIR spektrumlarında $1630-1640\text{ cm}^{-1}$ bölgesinde N-H eğilme titreşimleri gözlenmiştir (Şekil A9). mPEG-propiyonik asitin FTIR spektrumunda 1110 cm^{-1} dalga sayısında gözlenen pik eter omurgasının karakteristik C-O gerilme bandına karşılık gelmektedir. 1465 ve 2885 cm^{-1} bantları ise C-H gruplarının sırasıyla eğilme ve gerilme titreşimlerini göstermektedir. 1727 cm^{-1} 'de görülen zayıf pik karbonil grubunun varlığını göstermektedir. Ancak hidrazid fonksiyonel grubu içeren örneklerde (mPEG-HYD1 ve mPEG-HYD2) bu bant kaybolmuştur. mPEG-HYD1 ve mPEG-HYD2 örneklerinde mPEG-propiyonik asitte görülen C-O gerilme ve C-H eğilme ve gerilme titreşimlerine ilaveten $1655-1665\text{ cm}^{-1}$ bölgesinde N-H eğilme titreşimlerini gösteren yeni bir bant oluşmuştur ve bu bant amid-karboksilik asit reaksiyonunun başarılı olduğunu önermektedir.

Tablo 2. DOX konjugasyonu yapılan pH cevaplayan mPEG and mPEG-peptid bazlı taşıyıcı sistemler

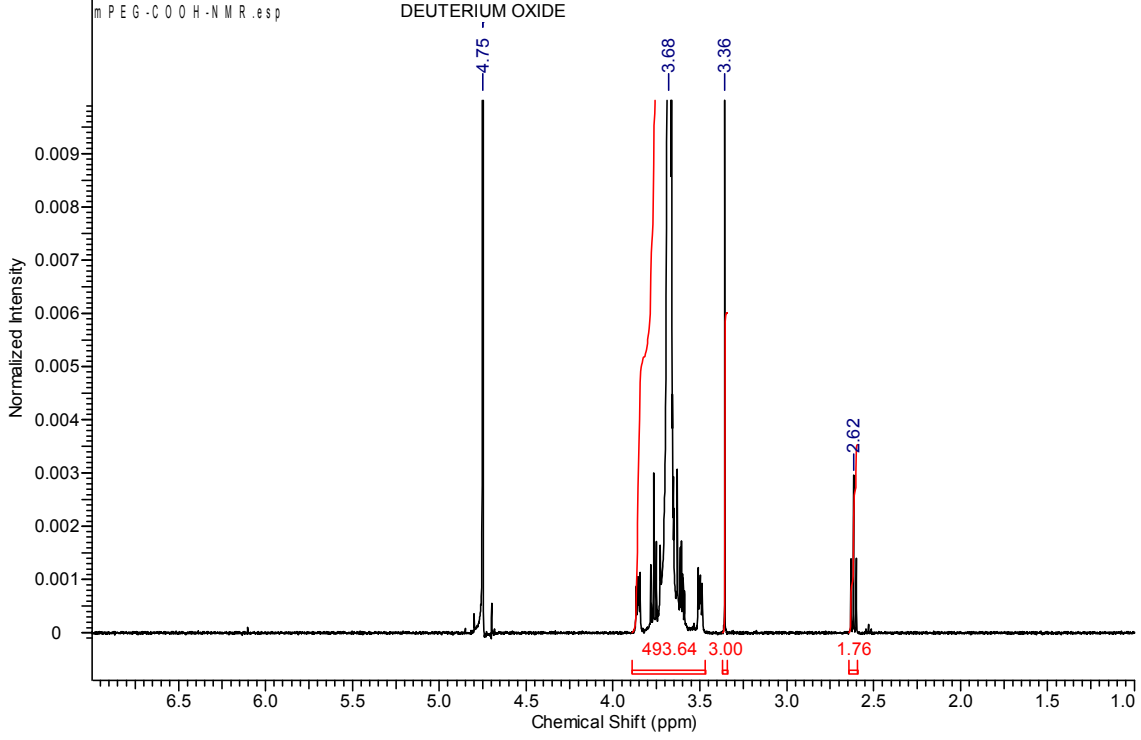
Örnek kodu	Bileşenler	Teorik moleküler kütle (Da)	Özellik(ler)
mPEG-HYD1	mPEG-adipik asit hidrazid	~ 5000	Asidik ortamda bozunur bağı
mPEG-HYD2	mPEG-karbohidrazid	~ 5000	Asidik ortamda bozunur bağı
mPEG-AT1-HYD	mPEG-CGGGHHHHHHGGGE-adipik asit hidrazid	6414.5	Asidik ortamda bozunur bağı ve pH cevaplayan



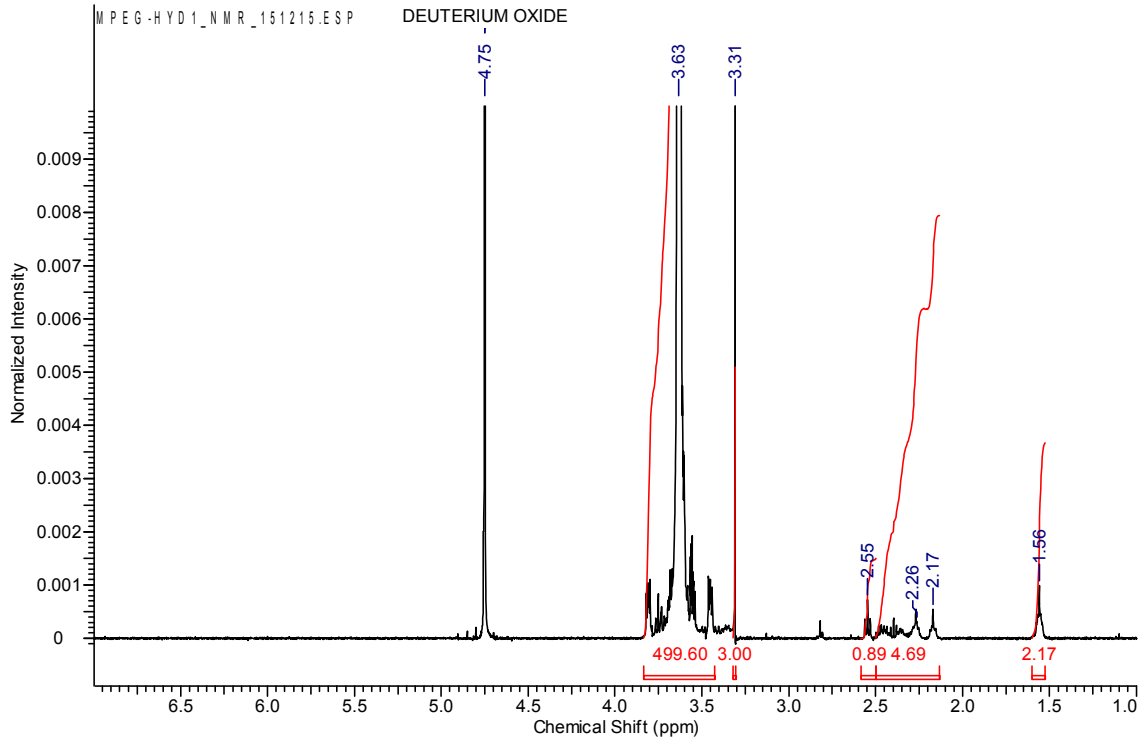
Şekil 8. mPEG-propiyonik asit, mPEG-HYD1 ve mPEG-HYD2 örneklerinin FTIR spektrumları

Hidrazid konjugasyonu reaksiyonunu kantitatif olarak takip etmek için ^1H NMR spektroskopisi kullanılmıştır. AADH, mPEG-propiyonik asit ve mPEG-HYD1 örneklerinin D_2O içerisinde alınan NMR spektrumları sırasıyla Şekil A10, Şekil 9 ve Şekil 10'da gösterilmiştir. Reaktant ve ürünlerin teorik kimyasal kaymaları ise Ek'te Tablo A1'de verilmiştir. AADH'nin NMR spektrumunda 1.53 and 2.17 ppm' de gözlenen kimyasal kaymalar CH_2 gruplarını göstermektedir ve teorik kimyasal kayma değerleri ile örtüşmektedir. 4 protona karşılık gelen pik alanları birbiriyle orantılı ve uyumludur (Şekil A10). mPEG propiyonik asidin NMR spektrumunda 3.31 ppm'de $\text{CH}_3\text{-O}$ (metoksi) grubunun 3 protonu dolayısıyla bir singlet gözlenmiş ve kantitatif analiz yapmak için alanı 3 olarak ayarlanmıştır. 3.64 ppm'de elde edilen geniş pik ise eter omurga protonlarını ($\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$) göstermektedir ve bu pike ait proton sayısı PEG'in polimerleşme derecesinin 4 katına eşittir. Bu protonların alanını kullanarak mPEG propiyonik

asidin sayı ortalamalı moleküler ağırlığı (M_n) yaklaşık 5400 Da (teorik değer = 5000 Da) olarak bulunmuştur. 2.62 ppm'de görülen kimyasal kayma ise karboksilik asit grubunun hemen



Şekil 9. mPEG-propiyonik asit örneğinin D₂O içerisinde alınan 1H NMR spektrumu

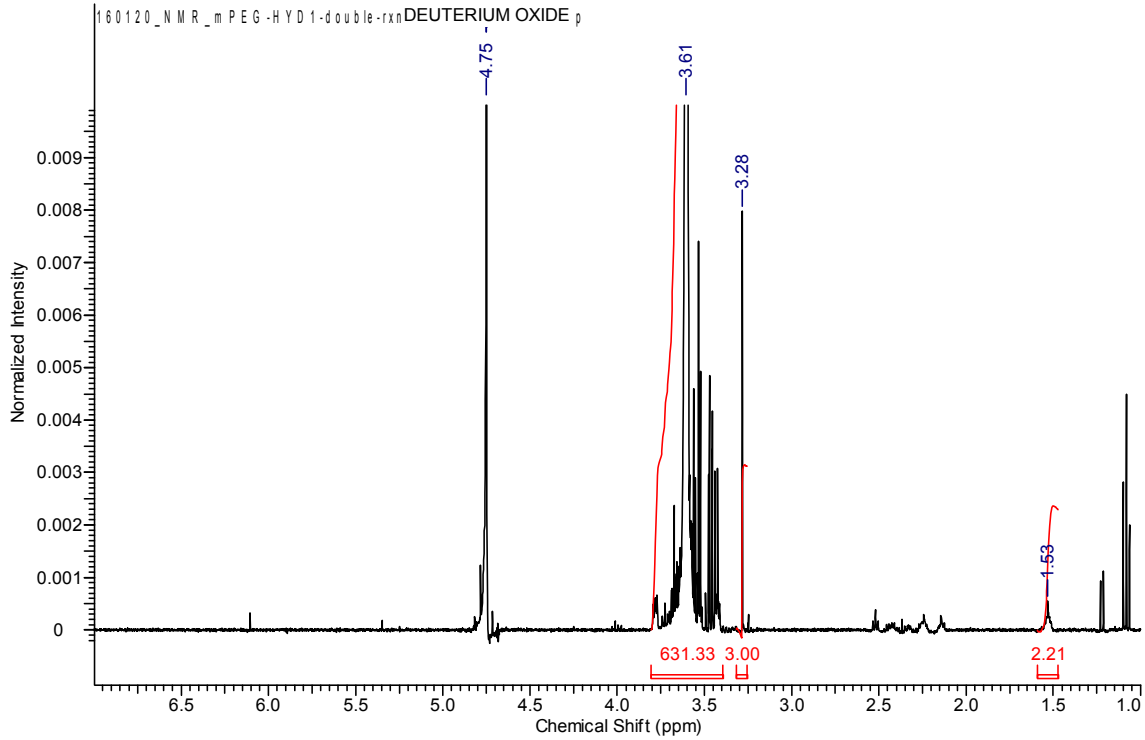


Şekil 10. mPEG-HYD1 örneğinin D₂O içerisinde alınan 1H NMR spektrumu

yanındaki 2 proton sebebiyledir ve bu pikin alanı kullanılarak COOH fonksiyonel grup yüzdesi yaklaşık % 88 (spekt değeri > % 80) olarak elde edilmiştir (Şekil 9). Sentezlenen mPEG-HYD1 örneğinin NMR spektrumunda AADH spektrumunda 1.56 ppm'de gözlenen CH₂ protonlarının kimyasal kayması Şekil 10'da görüldüğü gibi 1.53 ppm'de gözlenmiştir. 2.2 ppm civarı beklenen CH₂ protonlarının kimyasal kayması mPEG-COOH molekülünden gelen 2.62 ppm'deki kimyasal kayma ile birleştiği için bu bölge kantitatif analiz için kullanılamamıştır. Bu nedenle sadece 1.56 ppm'deki kimyasal kayma hidrazid fonksiyonel grubu yüzdesinin belirlenmesinde kullanılmıştır. mPEG-COOH'in kantitatif analizine benzer şekilde 3.3 ppm'deki pikin alanı 3'e ayarlanmış ve 3.63 ppm'deki protonların alanıyla karşılaştırılarak mPEG-HYD1'in M_n değeri mPEG-COOH'in moleküler kütesine çok yakın bir değer olarak yaklaşık 5500 Da olarak belirlenmiştir. Bu bulgu karboksilik asit hidrazid reaksiyonu ve saflaştırma sırasında polimerin moleküler kütesini değiştirmediğini göstermiştir. 1.56 ppm'deki 4 protona karşılık gelen kimyasal kaymanın alanını kullanılarak hidrazid konjugasyonu yaklaşık % 54 olarak bulunmuştur. Reaksiyonun tekrarlanabilirliğini kontrol etmek için sentez tekrar edilmiş ve yeni mPEG-HYD1 örneğinin hidrazid konjugasyonu da % 53 elde edilmiştir. Dolayısıyla, uygulanan protokolün tekrarlanabilirliği teyit edilmiştir. mPEG-propiyonik asitin COOH fonksiyonel grubu yüzdesi (% 80-90) göz önüne alındığında bütün COOH gruplarının hidrazid gruplarıyla yer değiştirmedeği

aşikârdır. Bu sebeple % 54 hidrazid fonksiyonel grubuna sahip polimer aynı reaksiyon şartlarında AADH ile bir kez daha reaksiyona tabi tutulmuş ve elde edilen mPEG-HYD1 örneğinin ¹H NMR spektrumu Şekil 11’de verilmiştir. Spektrumun analizi hidrazid konjugasyonunda (% 55) çok fazla bir değişiklik olmadığını göstermiştir. Buna ilaveten, diyaliz sırasında küçük moleküler kütlede sahip PEG moleküllerinin ayrılması sonucu polimer moleküler kütleleri 6900 Da değerine yükselmiştir. Sonuç olarak, ikinci reaksiyonun gereksiz olduğu yargısına varılmıştır. Karbohidrazid kullanılan reaksiyonları NMR ile görüntülemek mümkün olmadığı için mPEG-HYD2 taşıyıcı sisteminin sentezinde mPEG-HYD1 sentezinde kullanılan protokol uygulanmıştır.

Hidrazid fonksiyonel grubuna sahip taşıyıcı moleküllerin sentezlenmesinde farklı yöntemler uygulanmıştır. Örneğin, Etrych vd. (2001) hidrazid formundaki N-(2-hidroksipropil) metakrilamid (HPMA)-metakrilolglisil-glisin 4-nitrofenil ester (Ma-Gly-Gly-ONp) rastgele (random) kopolimerlerini metanol içerisinde gerçekleştirilen 4-nitrofenoksi (ONp) grubu ve hidrazin monohidrat reaksiyonunu kullanarak sentezlemişlerdir. Bir diğer çalışmada, hidrazid grupları mPEG-poli-aspartat blok kopolimerlerinin tersiyer-butiloksikarbonil (BOC) grubu korumalı aspartat gruplarına N-metilmorfolin (NMM), isobutil kloroformat (IBCF), karbazik asit



Şekil 11. AADH ile iki kez reaksiyon sonucu elde edilmiş mPEG-HYD1 örneğinin D₂O içerisinde alınan ¹H NMR spektrumu

tersiyer-butil ester (Cat-BE) ve dimetil asetamid (DMAc) kullanılarak asit anhidrid reaksiyonuyla bağlanmıştır. Koruyucu BOC grubu daha sonra TFA kullanılarak kaldırılmış ve hidrazid formunda blok kolpolimerler elde edilmiştir (Bae vd. 2003). Hidrazid fonksiyonel grubuna sahip allil grupları içeren PEG kopolimerleri ise THF içinde gerçekleştirilen AIBN varlığında metil merkptoasetat reaksiyonunu takiben hidrazin hidrat reaksiyonuyla hazırlanmıştır (Zhou vd. 2011).

Bu çalışma kapsamında sulu çözeltide gerçekleştirilen çok daha basit bir yöntem modifiye edilerek hidrazid formunda taşıyıcı sistemleri sentezlenmiştir (Hermanson 1996). Ticari mPEG-hidrazid kullanmak mümkün olsa da uzun dönemde peptid veya polipeptid içeren taşıyıcı sistemler için hidrazid modifikasyonu gerekli olacaktır. Peptid/polipeptid sistemlerindeki glutamik asit gruplarının hidrazid fonksiyonel grubuna dönüştürülme reaksiyonunun bir provasası olarak çalışmalara mPEG-propiyonik asit (mPEG-COOH) kullanılarak başlanmıştır. Öngörülen bu reaksiyonda, mPEG-COOH molekülünün karboksil grubunu dihidrazidin birincil amin grubuna bağlamak için gerekli amin gruplarıyla reaksiyona girebilen bir ara ürün O-asilisoüre oluşturabilen EDC.HCl sıfır-uzunlukta çapraz bağlayıcı olarak seçilmiştir. Ancak O-asilisoürenin hidroliz hızının çok çabuk ($2-3 \text{ s}^{-1}$) olması nedeniyle sulu ortamda sadece EDC.HCl kullanılarak amid bağı oluşturma veriminin düşük olabileceği belirtilmiştir (Hoare ve Koshland 1967). Bu sebepten sulu ortamda gerçekleştirilen modifiye edilmiş prosedürde amin grubuyla reaksiyona girebilen hidrolizi daha yavaş NHS-ester oluşturduğu için EDC'ye ilaveten NHS kullanılması uygun görülmüştür (Sehgal ve Vijay 1994; Conde vd. 2014). EDC ve NHS reaksiyonlarının detayları Şekil A11' de verilmiştir (Sehgal ve Vijay 1994). Ancak verimi yükseltmeye yönelik reaksiyon optimizasyon yapılmasına rağmen sulu ortamda gerçekleştirilen hidrazid fonksiyonel grubuna dönüşme verimi ($\sim \% 54$), yukarıda bahsedilen organik çözgenlerde gerçekleştirilen reaksiyonlardan (verim $> 75\%$) biraz daha düşük olarak elde edilmiştir (Etrych vd. 2001; Bae vd. 2003; Zhou vd. 2011).

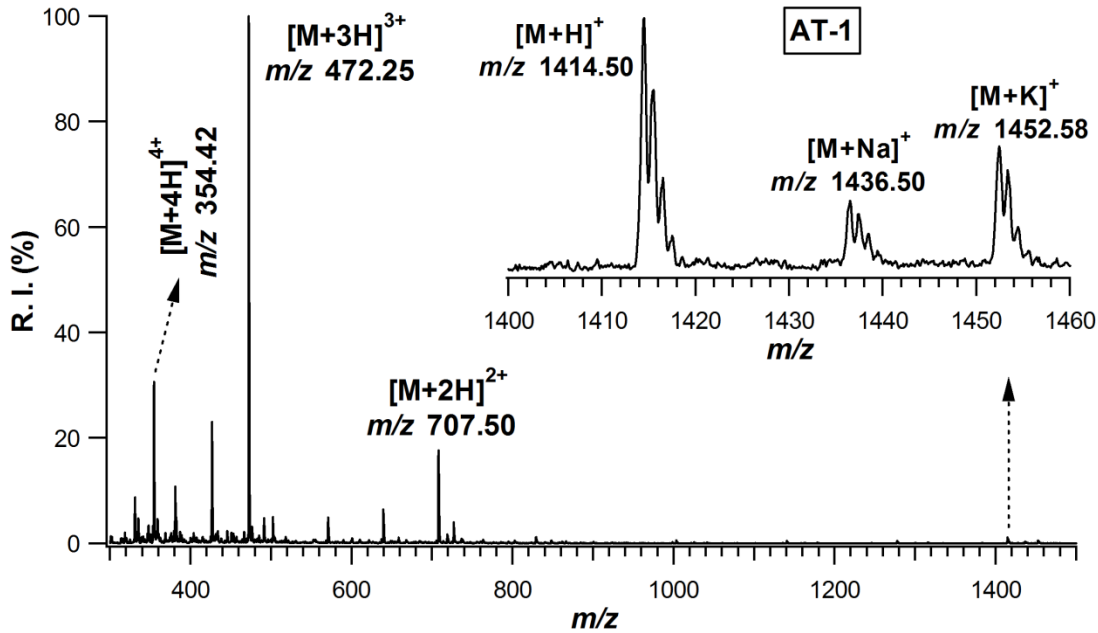
4.2 Asidik ortamda bozunur PEG-peptid bazlı ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanması

Bu çalışmada öngörülen AT1 peptidi aminoasit yan zincirlerinin iyonlaşma ve reaktif özelliklerini kullanabilmek için tasarlanmıştır. Şekil A2 ve Tablo 2'de verildiği üzere AT1 peptidi dizininde sistein (C), glisin (G), histidin (H) ve glutamik asit (E) amino asitleri yer almaktadır. Peptidin N-terminalinde bulunan tiol fonksiyonel grubuna sahip C, mPEG molekülünü konjuge etmek için dizine eklenmiştir (Şekil A2). pK_a değeri yaklaşık 6.0 civarı olan histidinlerin peptide pH cevaplama özelliği sağlayabileceği öngörülmüştür. C-terminalinde bulunan karboksilik asit

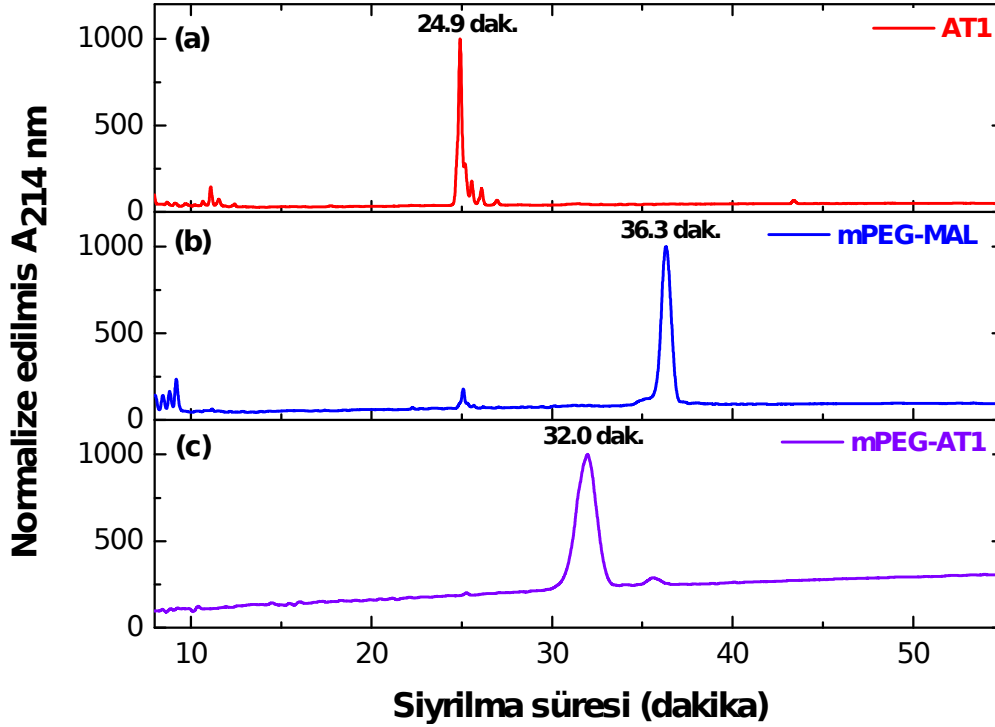
fonksiyonel grubuna sahip glutamik asit ise DOX konjugasyonu için kullanılmıştır (Şekil A3). Yan zincirinde hidrojen atomu bulunan en küçük amino asit olan glisinler konjugasyon sırasında sterik etkileri azaltmak için sistein ve glutamik asidin hemen yanına yerleştirilmiştir.

AT1 peptidinin ESI-MS ve HPLC verileri sırasıyla Şekil 12 ve Şekil 13'te sunulmuştur. Peptidin teorik mol kütlesi (1414 Da) kütle spektrumunda elde edilen tek ve daha fazla yüklü peptid m/z değerlerine karşılık gelen piklerle teyit edilmiştir. Peptidin HPLC sıyrılma eğrisinde 24.9. dakikada büyük bir pik ve hemen yanında çok küçük pikler görünmüştür (Şekil 13a). HPLC eğrisinde elde edilen oldukça saf fraksiyon ve kütle spektrumundan elde edilen deneysel molar kütle ve teorik molar kütlelerin tutarlılığı peptidin yüksek saflıkta sentezlendiğini açıkça göstermektedir.

Peptidin PEG konjugasyonu N-terminalindeki sisteinde bulunan tiol grubuyla mPEG'in maleimid formu kullanılarak ($M_n = 5000$ Da) gerçekleştirilmiştir (Şekil A2). İzole edilen mPEG-AT1 konjugatının saflığı HPLC ve MALDI-MS tekniklerini kullanılarak tayin edilmiştir. Şekil 13'te artan hidrofobik özelliğe bağlı olarak sırasıyla 24.9, 32.0 ve 36.3. dakikalarda sıyrılan AT1, mPEG-AT1 ve mPEG-maleimidin kromatogramları verilmiştir. mPEG-AT1'in sıyrılma eğrisinde



Şekil 12. AT1 peptidinin ESI-MS spektrumu



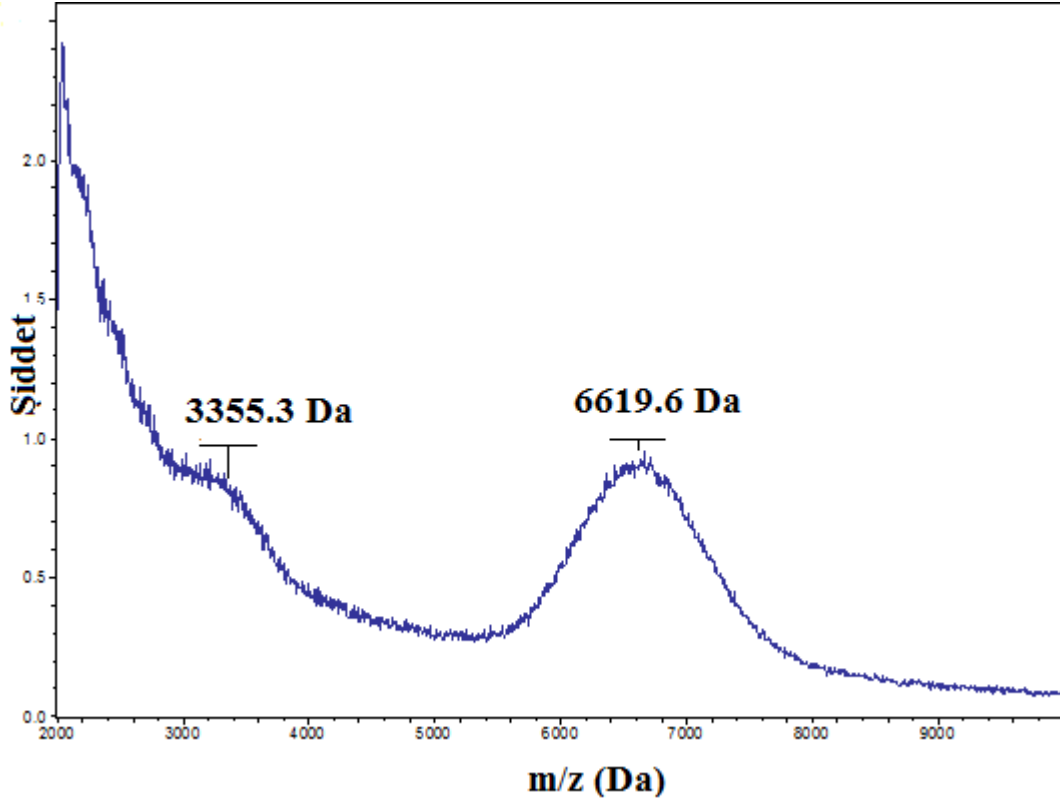
Şekil 13 (a) AT1, (b) mPEG-MAL, (c) mPEG-AT1 örneklerinin HPLC eğrileri

peptide veya mPEG-MAL molekülüne ait belirgin fraksiyonların gözlenmemesi mPEG-AT1 konjugatının yüksek saflıkta (> % 95) elde edildiğini göstermektedir.

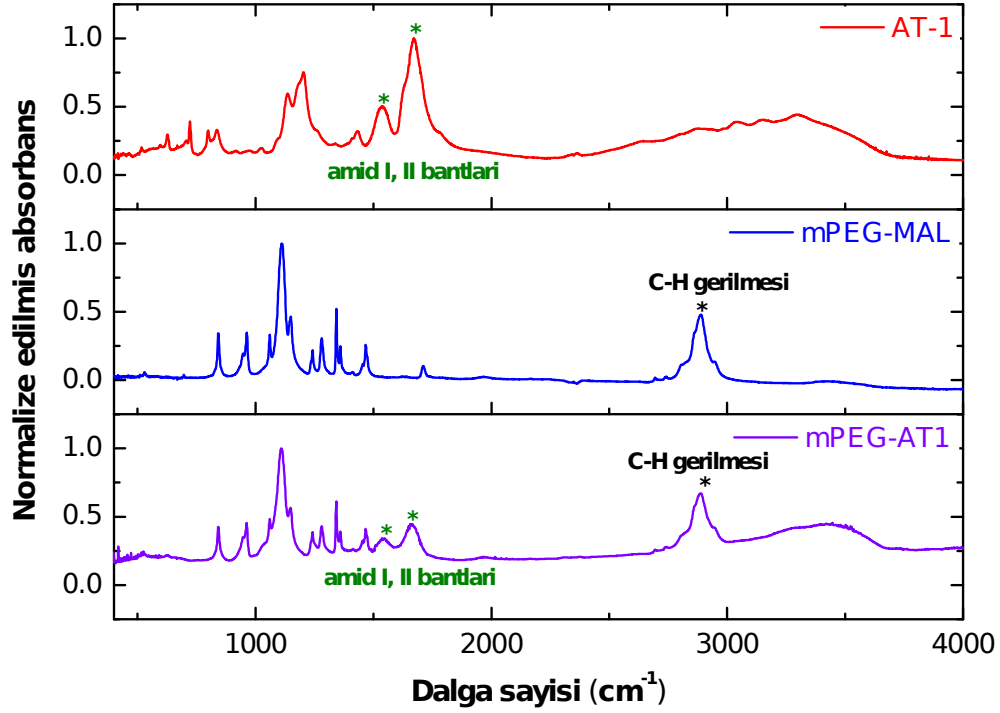
mPEG-AT1 konjugatının molar kütlelerini belirlemek amacıyla MALDI-TOF tekniği kullanılmıştır. Konjugatın kütle spektrumunda ~ 6600 Da civarında bir pik gözlenmiştir. Deneysel değer ~6415 Da'na ($M_{\text{peptid}}=1415 \text{ Da} + M_{\text{PEG}}=5000 \text{ Da}$) karşılık gelen teorik molar kütleyle yakın olması konjugasyon reaksiyonunun ve saflaştırma işleminin başarıyla gerçekleştirildiğini belirtmektedir.

Peptidin PEG konjugasyonuna bir diğer kanıt peptidin, Şekil 15'te verildiği üzere mPEG-MAL'in ve konjugatın FTIR spektrumlarındaki parmak izlerini karşılaştırılarak sunulmuştur. FTIR spektrumlarında konjugatın her iki ana molekülden de izler taşıdığı açıkça görülmektedir. Örneğin, PEG omurgasındaki C-H gerilme titreşimlerine ait 2900 cm^{-1} civarındaki bant mPEG-MAL ve mPEG-AT1'in spektrumlarında görülmüştür. Benzer şekilde, $1500-1700 \text{ cm}^{-1}$ bölgesinde gözlenen peptidin amid I ve amid II bantları konjugatın spektrumunda da bulunmaktadır.

Böylece, bu üç farklı karakterizasyon metodunun sonuçları yüksek saflıkta mPEG-AT1 konjugatının izole edildiğini teyit etmiştir.



Şekil 14. mPEG-AT1 örneğinin MALDI-TOF kütle spektrumu



Şekil 15 (a) AT1, (b) mPEG-MAL, (c) mPEG-AT1 örneklerinin FTIR spektrumları

PEG-peptid bazlı ilaç taşıyıcı sisteminin sentezinde mPEG-AT1 AADH kullanılarak hidrazid formuna dönüştürülmüştür (Şekil A3). Ancak NMR spektrumunda örtüşen kimyasal kaymalar dolayısıyla taşıyıcı sistemin hidrazid grubu yüzdesi belirlenememiştir.

4.3 Asidik ortamda bozunur PEG ve PEG-peptid bazlı ilaç taşıyıcı sistemlerine DOX konjugasyonu

Tekrarlanabilir hidrazid konjugasyonunu sağladıktan sonra maksimum DOX konjugasyonuna ulaşmak için mPEG-HYD1 kullanılarak birkaç reaksiyon şartı test edilmiştir. Bu amaçla katalizör (TFA), DOX miktarı ve ekleme metodu değiştirilmiş ve DOX konjugasyon yüzdesi serbest DOX'un 488 nm'deki molar absorban değeri kullanılarak belirlenmiştir. Tablo 3'te gösterildiği üzere en yüksek DOX konjugasyon yüzdesi %2 katalizör, ağırlıkça 2.5:2 mPEG-HYD1:DOX oranı kullanarak ve DOX'u tek seferde ekleyerek (3. metod) elde edilmiştir. Bazı reaksiyonlarda DOX konjugasyon yüzdesi ~ % 56-63 arasında hidrazid fonksiyonel grubunun yüzdesinden (~ % 54) biraz daha fazla elde edilmiştir. Bunun sebebi mPEG-HYD1-DOX

Tablo 3. DOX konjugasyonun reaksiyonunun optimizasyon sonuçları

mPEG-HYD1 :					
Örnek kodu	DOX oranı (mg/mg)	DOX ekleme metodu	TFA miktarı (µl)	DOX %	% Ürün Verimi *
S1	2.5:1	bir kez	10	41	33.8
S2	2.5:1	bir kez	20	45	46
S3	2.5:2	bir kez	20	63	35
S4	2.5:2	iki kez	20	56	39

*Ürün verimi: Ürünün başlangıçtaki mPEG-HYD1 miktarına oranı

konjugatıyla beraber kolondan sıyrılan serbest DOX moleküllerinin ayrılabilmesi ya da DOX belirlemede kullanılan ölçümden gelen hatadan kaynaklanabilir. DOX konjuge edilen taşıyıcı sistemlerin saflaştırılmasında kullanılan jel geçirgenlik kromatografisinde sıyrılan fraksiyonlar arasında belirgin renk farklılıklarının göze çarpması (konjugat = kırmızı, serbest DOX = turuncu) serbest DOX'un büyük bir kısmının ayrıldığını göstermektedir (Şekil A12). Böylece, serbest DOX ve konjuge edilmiş DOX'un molar absorpsiyon katsayısı arasındaki küçük fark dolayısıyla % DOX miktarı biraz fazla tahmin edilmiş olma olasılığı yüksektir. Ancak yüksek ilaç derişimi gerektiren HPLC yöntemi uygulanamadığı için (floresans detektörü olmaması sebebiyle) çok daha basit olması ve daha az miktarda örnek kullanıldığı için mecburen UV-Vis spektroskopisi tekniği ile konjuge edilen ilaç miktarı belirlenmiştir.

Büyük ölçekli deneylerde mPEG ve mPEG-peptid bazlı taşıyıcı sistemlere DOX konjugasyonu Tablo 3'de verilen 3. metod kullanılarak gerçekleştirilmiştir. DOX konjugasyon reaksiyonu sonuçları Tablo 4'te gösterilmiştir. Bu deneylerde verim ve DOX konjugasyon yüzdesine ait standart sapmaların düşük olması reaksiyonların tekrarlanabilir olduğunu işaret etmektedir. Özellikle mPEG-HYD1 örneği için DOX konjugasyon yüzdesi hem küçük ölçekli hem de büyük ölçekli deneylerde tutarlı olarak elde edilmiştir. Büyük ölçekli yapılan deneylerde beklendiği üzere daha fazla verim alınmıştır. mPEG bazlı ilaç taşıyıcı sistemlerinin DOX konjugasyon yüzdesi (~% 60), mPEG-AT1 sisteminden daha fazla olarak bulunmuştur. PEG-peptid taşıyıcı sisteminde ilacın konjuge edileceği bölgenin daha kalabalık bir moleküler çevreye sahip olması sebebiyle ortaya çıkan sterik etki düşük DOX konjugasyonunun başlıca nedeni olarak gösterilebilir.

Tablo 4. Asidik ortamda bozunur ilaç taşıyıcı sistemlerin DOX konjugasyon verimi ve yüzdesi

Örnek Kodu	% Verim	% DOX konjugasyonu
mPEG-HYD1-DOX	65 ± 3	62 ± 7
mPEG-HYD2-DOX	68 ± 3	60 ± 3
mPEG-AT1-DOX	43 ± 3	35 ± 3

4.4 Asidik ortamda bozunur DOX konjuge edilmiş taşıyıcı sistemlerinin karakterizasyonu

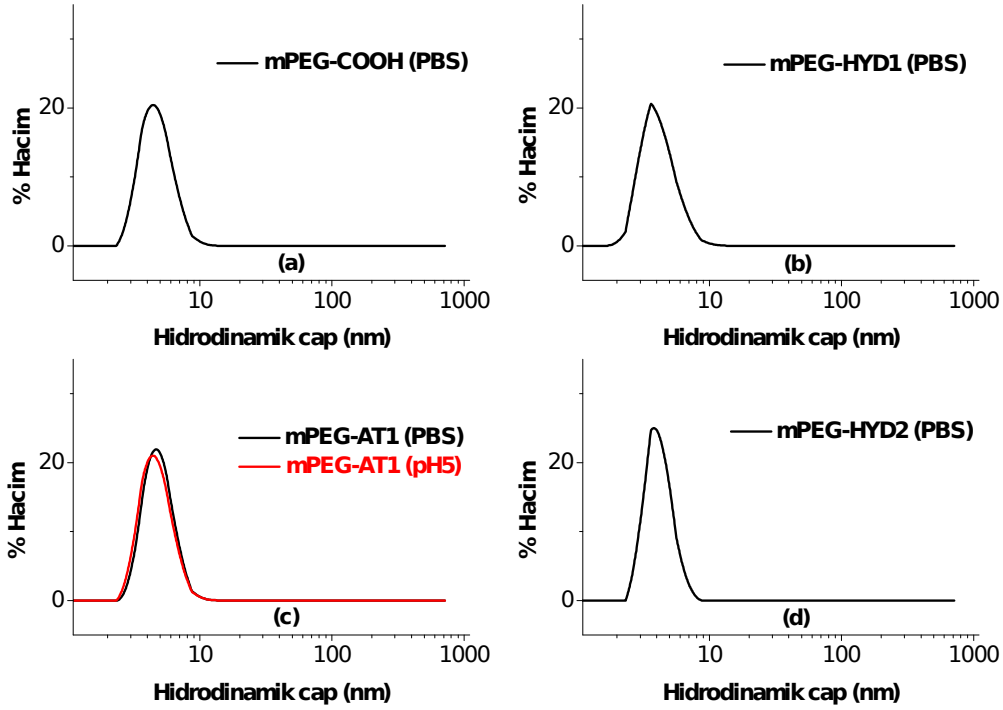
İlaç taşıyıcı sistemlerinin kümelenme durumunu ve stabilitesini belirlemek için dinamik ışık saçılma yöntemi kullanılmıştır. Şekil 16, mPEG-propiyonik asit, mPEG-HYD1, ve mPEG-HYD2 örneklerinin PBS tampon çözeltisi (pH 7.4) içinde mPEG-AT1 örneğinin ise hem pH 7.4'deki PBS tampon hem de pH 5.0'te asetat tampon çözeltisi içerisindeki boyut (hidrodinamik çap) dağılımını göstermektedir. Bütün örneklerin ortalama boyutu benzer şekilde yaklaşık 4 ± 0.5 nm olarak ölçülmüştür. Ayrıca pH'nın mPEG-AT1 örneğinin boyutunu etkilemediği gözlenmiştir.

PEG'in hidrodinamik çapını (D_H) molar kütesinin (M_n) fonksiyonu olarak aşağıdaki korelasyonu kullanarak belirlemek mümkündür (Fee ve Van Alstine 2006):

$$D_H (\text{Å}) = 0.3824 M_n^{0.559}$$

Yukarıdaki denklem sonucu olarak deneysel değerle uyumlu bir şekilde molar kütesi 5000 Da olan PEG'in boyutu 4.4 nm olarak elde edilmiştir. Sonuç olarak ne fonksiyonel mPEG örneklerinin ne de mPEG-AT1 örneğinin kümelenme eğilimi olmadığı aşikârdır.

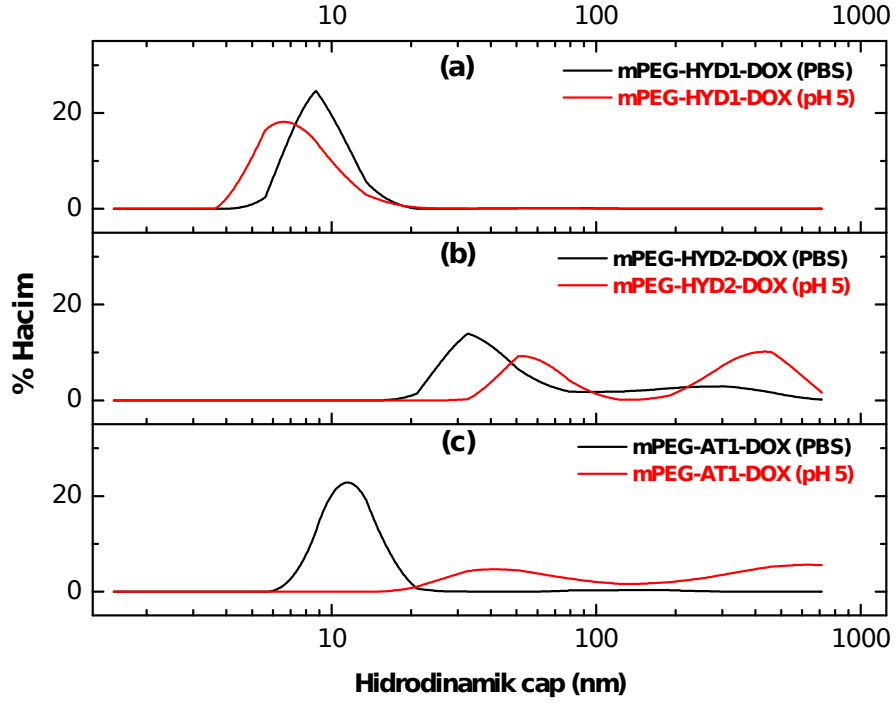
Bir diğer taraftan, DOX konjuge edilmiş ilaç taşıyıcı sistemleri oldukça farklı bir trend izlemiştir. Boyut dağılımı ölçümleri konjugatların uygun tampon çözeltide çözüldükten yaklaşık birkaç saat içinde ve 37°C'de bir gün boyunca inkübe edildikten sonra yapılmıştır. Hemen ve 24 saat sonrası yapılan ölçümlerin sonuçları sırasıyla Şekil 17 ve Şekil 18'de verilmiştir. mPEG-HYD1-DOX örneğinin ortalama boyutu pH 7.4'de 9 ± 0.5 nm pH 5.0'te ise 7 ± 0.5 nm olarak elde edilmiştir. 24 saat inkübasyon sonucu olarak her iki pH değerinde de ortalama boyut 6.5 ± 0.5 nm civarına düşmüştür. mPEG-HYD1-DOX konjugatının ortalama boyutu mPEG-HYD1 örneğinin yaklaşık iki katı olarak belirlenmiştir. Böylece, mPEG-HYD1 örneğine DOX konjuge edildiği zaman moleküler özbirleşmenin tetiklendiği yani DOX konjuge edilmiş taşıyıcı sistemin ilaç moleküllerinin içeride mPEG moleküllerinin ise yüzeyde bulunduğu misel sistemler oluşturduğu yargısına varılmıştır. 24 saat sonunda mPEG-HYD1-DOX örneğinin ortalama boyutunun yaklaşık birkaç nm düşmesi ise ilaç moleküllerinin misel yapıdan ayrılması sonucu monomerik (kümelenmeyen) türlerin popülasyonunun artmasına bağlanabilir.



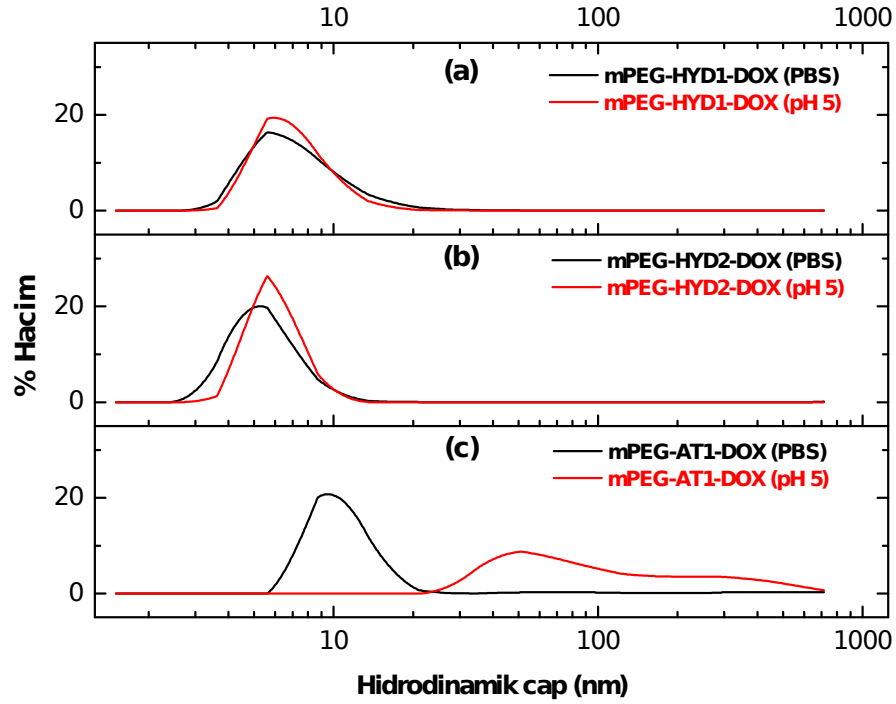
Şekil 16. Farklı fonksiyonel gruba sahip mPEG örnekleri ve mPEG-AT1 konjugatının boyut dağılımı

Diğer mPEG bazlı taşıyıcı sistemi olan mPEG-HYD2-DOX ise başlangıçta pH'dan bağımsız olarak ~20-100 nm arasında boyut dağılımı gösterilmiştir. Her iki pH değerinde de 24 saatin sonunda kümelenmiş yapıların boyutu $\sim 6 \pm 1$ nm değerine düşmüştür. Boyuttaki azalma kimyasal bağın kararsız yapısından dolayı ilacın hızlı salımını müteakiben kümelenmiş yapıların zamanla tekrar düzenlenmesi şeklinde açıklanabilir. Yüksek sıcaklıkta inkübasyonuyla gerçekleşen moleküllerin artan hareketliliği sonucu büyük boyuttaki kümelenmiş yapıların daha küçük boyuttaki agregatlara dönüşümü muhtemeldir.

mPEG-peptid bazlı ilaç taşıyıcı sistemi olan mPEG-AT1-DOX ve peptid içermeyen mPEG-HYD1-DOX sistemine DOX benzer bir kimyasal bağla konjuge edilmiştir. Buna karşın sadece mPEG içeren taşıyıcı sistemden farklı olarak mPEG-AT1-DOX pH cevaplayabilen peptid dizini de içermektedir. Dolayısıyla, mPEG-HYD1 ve mPEG-AT1-DOX örneklerinin boyut dağılım verileri karşılaştırılarak peptidin rolü hakkında bir fikir sahibi olunabilir. pH 7.4'de mPEG-AT1-DOX örneğinin ortalama boyutu peptidin yapıya eklenmesi sonucu mPEG-HYD1-DOX'tan biraz daha fazla olarak yaklaşık 12 ± 2 nm elde edilmiştir. mPEG-AT1-DOX örneğinin boyutunun mPEG-AT1 örneğinin boyutunun iki katından biraz daha fazla olduğu göz önüne alınırsa,



Şekil 17. Yeni hazırlanmış DOX konjuge edilmiş ilaç taşıyıcı sistemlerinin boyut dağılımı

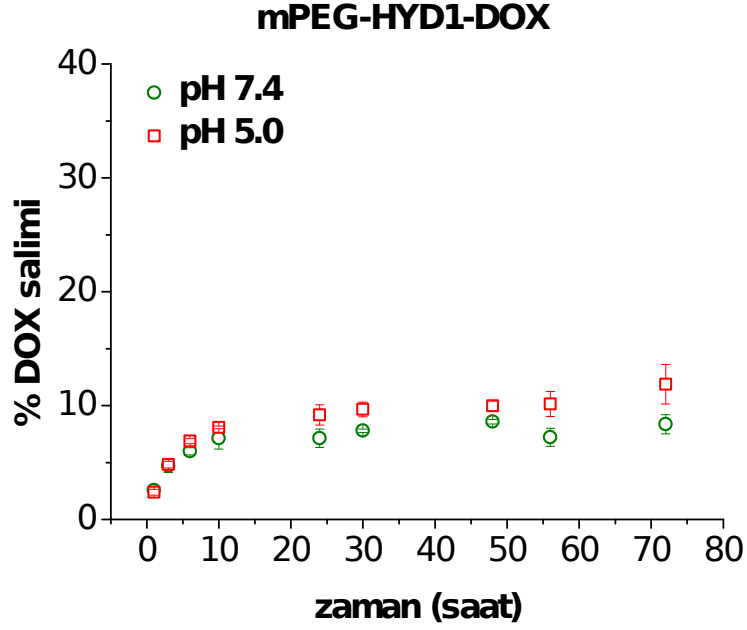


Şekil 18. DOX konjuge edilmiş ilaç taşıyıcı sistemlerinin hazırlandıktan 24 saat sonra elde edilen boyut dağılımı

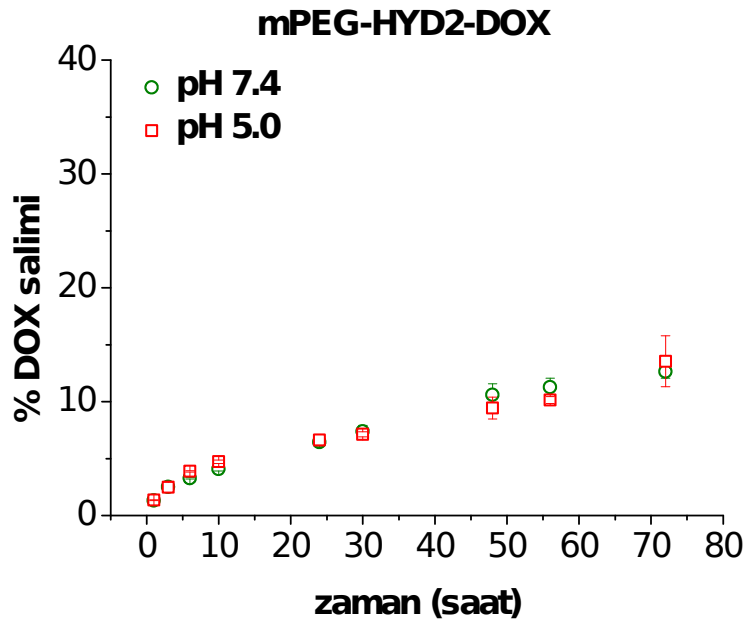
mPEG-AT1-DOX kümelenmiş yapılarının şeklinin küresellikten biraz saptığı sonucuna varılabilir. mPEG-HYD1-DOX örneğinin davranışına paralel olarak pH 7.4'de bir gün inkübasyonun peptid içeren taşıyıcı sistemin boyutlarını belirgin bir şekilde değiştirmedeği gözlenmiştir. Bir diğer taraftan pH 5.0 tampon çözeltisinde mPEG-AT1-DOX örneğinin boyut dağılımı yaklaşık 20-100 nm arasında elde edilmiştir. Bu dağılım mPEG-HYD2-DOX örneğinin aynı pH değerinde oluşturduğu kümelenmiş yapıların boyutlarıyla benzerlik göstermektedir. Ancak mPEG-AT1-DOX agregatları 24 saat sonra bile boyutlarının değiştirmeyerek daha stabil bir yapıda olduklarını ortaya koymuşlardır. Muhtemelen pH 5.0 değerinde histidinler arasındaki itme kuvvetleri moleküllerin birbirine yakın bir şekilde küresel olarak bir araya gelmesini önleyip taşıyıcı sistemin küresel yapılardan daha büyük boyutta, daha gevşek ve silindirik yapılar şeklinde kümelenmesine neden olmuşlardır.

mPEG-HYD1-DOX, mPEG-HYD2-DOX ve mPEG-AT1-HYD1-DOX konjugatlarının pH 7.4 ve pH 5.0 elde edilen DOX salım profilleri sırasıyla Şekil 19, Şekil 20 ve Şekil 21'de verilmiştir. Bu çalışmada geliştirilen konjugatların ve asit bozunur hidrazon bağı içeren diğer ilaç taşıyıcı sistemlerin 72 saatin sonunda gözlenen % DOX salım değerleri ise Tablo 5'te özetlenmiştir. Şekil 19'da gösterildiği gibi mPEG-HYD1-DOX belli belirsiz bir pH cevaplayabilen ilaç salım davranışı ortaya koymuştur. mPEG-HYD2-DOX'un asidik ve nötral pH'ta sunduğu ilaç salım profili arasında kayda değer bir fark gözlenmemiştir. Buna karşın PEG-peptid bazlı ilaç taşıyıcı sistemi olan mPEG-AT1-DOX sadece mPEG içeren konjugatlarla karşılaştırıldığı zaman daha hızlı ve pH programlı bir ilaç salım profili göstermiştir. Diğer ilaç taşıyıcı sistemlerle karşılaştırıldığı zaman mPEG-HYD1-DOX'un ilaç salım davranışı DOX'un kümelenme eğilimi gösteren amfifilik mPEG-PLLA sistemine hidrazon bağıyla bağlandığı sistemin davranışıyla benzerlik göstermektedir (Yoo vd. 2002). Multivalent mPEG-poliaspartat-HYD-DOX konjugatlarında pH cevaplama özelliği daha belirgin olarak elde edilmiştir. Kompakt agregat yapısına bağlı olarak nötral pH'de neredeyse hiç ilaç salımı gözlenmemiştir (Bae vd. 2003). Kümelenme eğilimi olmayan PEO-g-HYD-DOX sisteminde DOX salım hızı agregatlar oluşturan taşıyıcı sistemlerden daha fazla olarak belirlenmiştir (Zhou vd. 2011). Bu çalışmada tasarladığımız DOX konjuge edilmiş ilaç taşıyıcı sistemlerinin boyutları düşünüldüğünde pH 5'de mPEG-AT1-DOX'un (boyut dağılımı = 20-100 nm) sadece PEG içeren sistemlere ilacı göre daha yavaş hızla salımı beklenebilirdi. Ancak pH 5'te artı yüklü haline gelen histidinler kümelenmiş moleküller arasındaki çekimi azaltıp asidik çözeltinin pH cevaplayan hidrazon bağıyla temasını kolaylaştırmış dolayısıyla ilacın daha hızlı salımına olumlu bir etki yapmıştır. mPEG-AT3-DOX

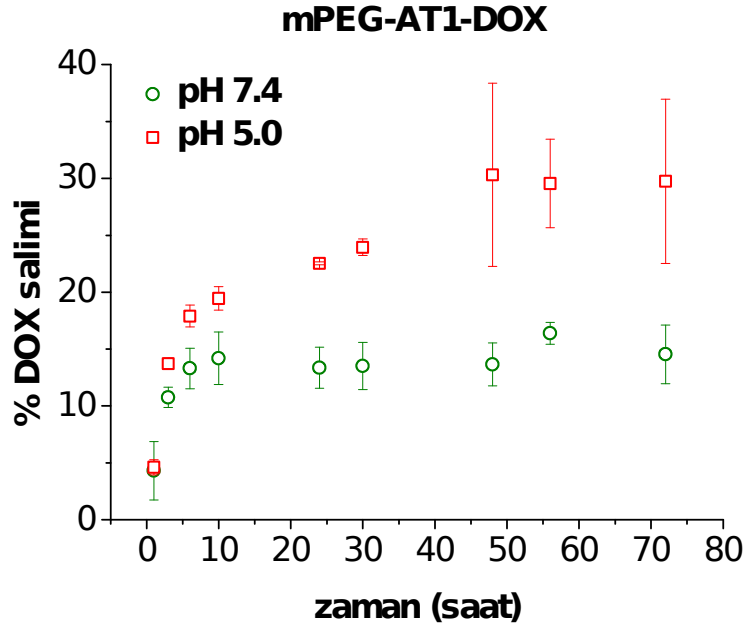
konjugatının pH 5'te ölçülen boyutu göz önüne alındığında histidin sayısının kümelenmeyi tamamen engelleyemediği aşıkardır. Dolayısıyla, yapıya daha



Şekil 19. pH 5.0 ve 7.4'te mPEG-HYD1-DOX konjugatının DOX salım profili



Şekil 20. pH 5.0 ve 7.4'te mPEG-HYD2-DOX konjugatının DOX salım profili

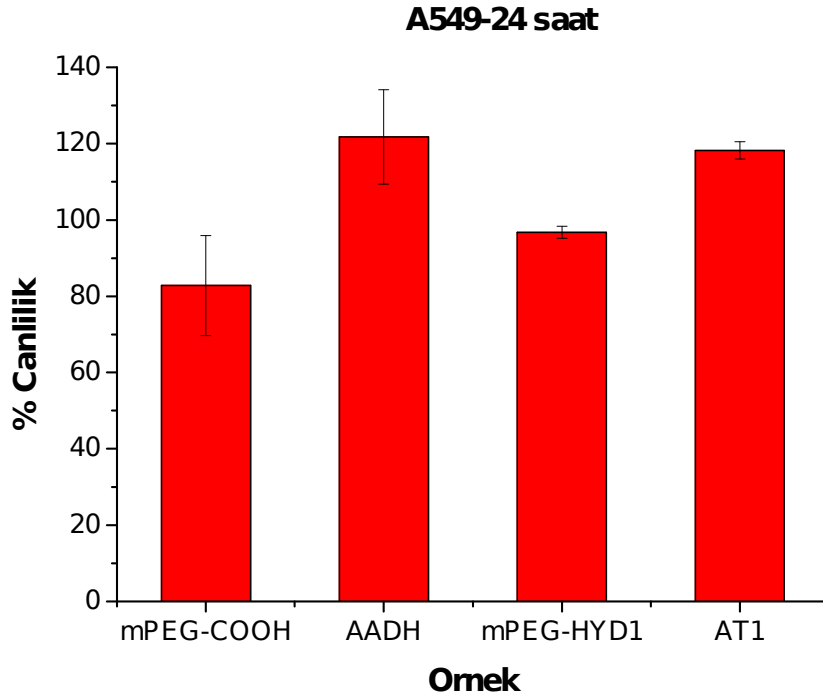


Şekil 21. pH 5.0 ve 7.4'te mPEG-AT1-DOX konjugatının DOX salım profili

Tablo 5. Çeşitli ilaç taşıyıcı sistemlerin nötral ve asidik pH'ta % ilaç salımının karşılaştırılması

Referans	İlaç taşıyıcı sistemi	pH 7-7.5'ta Boyut (nm)	pH 5.0'te % DOX salımı	pH 7-7.5'ta % DOX salımı
Bu çalışma	mPEG-HYD1-DOX	9	12 ± 2	8 ± 1
Bu çalışma	mPEG-HYD2-DOX	20-100	13.5 ± 2.5	12.5 ± 0.5
Bu çalışma	mPEG-AT1-DOX	12	30 ± 7	14.5 ± 2.5
Bae vd. (2003)	mPEG-polyaspartate-HYD-DOX	65	28	0
Zhou vd. (2011)	PEO-g-HYD-DOX	9-11	90	20
Yoo vd. (2002)	mPEG-PLLA-HYD-DOX*	90 ± 12	24	20

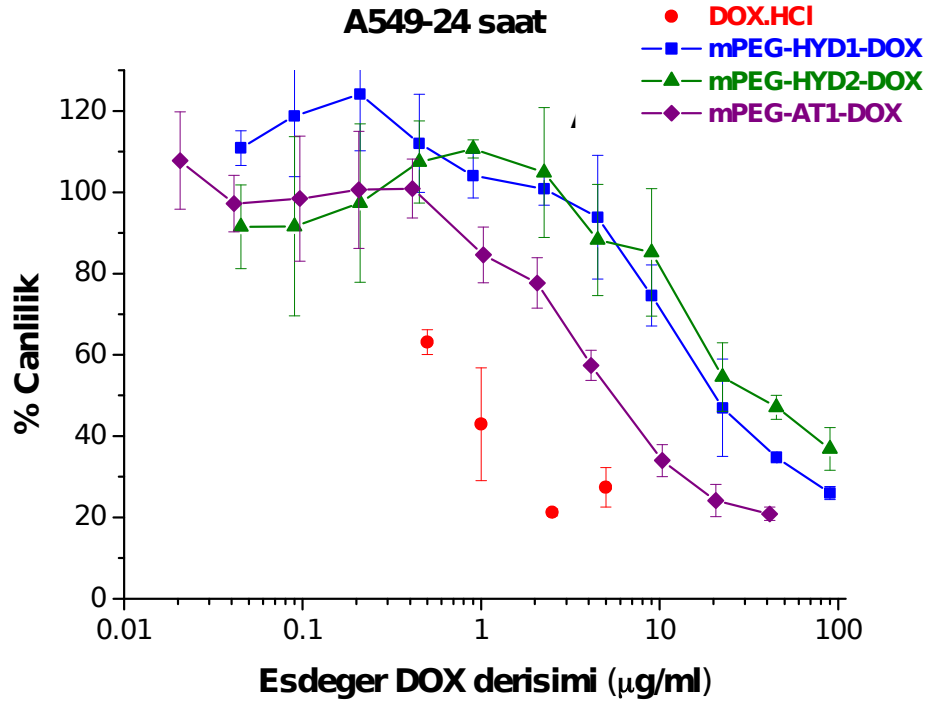
* % ilaç salımı 25 saat sonunda belirlenmiştir. Diğer ilaç taşıyıcı sistemler için 72 saat sonunda elde edilen değerler gösterilmiştir.



Şekil 22. mPEG-COOH, AADH, mPEG-HYD1 ve AT1 örneklerinin A549 hücre hattı kullanılarak 24 saatin sonunda elde edilen % canlılık değerleri

fazla histidin eklendiği takdirde hazırlanan taşıyıcı sistemin daha hızlı DOX salım hızına ve daha fazla pH hassasiyetine sahip olabileceği beklenebilir.

1.5 mg/ml derişimindeki mPEG-propiyonik asit, AADH, mPEG-HYD1 ve AT1 peptidinin sitotoksosite sonuçları Şekil 22'de verilmiştir. Bu örneklerin belirgin bir sitotoksositeye sahip olmadıkları belirlenmiştir. Serbest DOX ve DOX konjuge edilmiş taşıyıcı sistemlerin büyüme önleme eğrileri Şekil 23'te elde edilen IC_{50} değerleri ise Tablo 6'da gösterilmiştir. Örneklerin istatistiksel analizi sonucu mPEG-HYD1-DOX ve mPEG-HYD2-DOX taşıyıcı sistemlerinin sitotoksitesi arasında anlamlı bir fark elde edilmemiştir (p -değeri > 0.05). Diğer örnek çiftlerinin sitotoksosite değerlerinin karşılaştırılması sonucu elde edilen p -değeri < 0.05 bu örneklerin sitotoksitelere arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermiştir (Tablo A2). DOX-konjuge edilmiş taşıyıcı sistemin IC_{50} değerleri beklenildiği üzere serbest DOX'tan daha fazla olarak elde edilmiştir. Bu konjugatlar içinde en yüksek sitotoksiteyi mPEG-AT1-DOX göstermiştir. AT1 ve mPEG'in sitotoksite göstermediği göz önüne alınırsa mPEG-AT1-DOX taşıyıcı sistemin sadece mPEG içeren taşıyıcı konjugatlara göre daha yüksek olan sitotoksik aktivitesi daha belirgin pH cevaplama özelliğine bağlanabilir.



Şekil 23. Serbest DOX ve DOX'un asidik ortamda bozunur bağla konjuge edildiği taşıyıcı sistemlerin A549 hücre hattı kullanılarak 24 saatin sonunda elde edilen büyüme engelleme eğrisi

Tablo 6. DOX ve DOX'un asidik ortamda bozunur bağla konjuge edildiği taşıyıcı sistemlerin mutlak IC₅₀ değerleri

Örnek	DOX eşdeğer IC ₅₀ değeri (µg/ml)	Bağlı indis*
Serbest DOX	0.96 ± 0.51	1.0
mPEG-HYD1-DOX	21.9 ± 5.9	22.8
mPEG-HYD2-DOX	32.1 ± 10.3	33.4
mPEG-AT1-DOX	5.55 ± 0.75	5.8

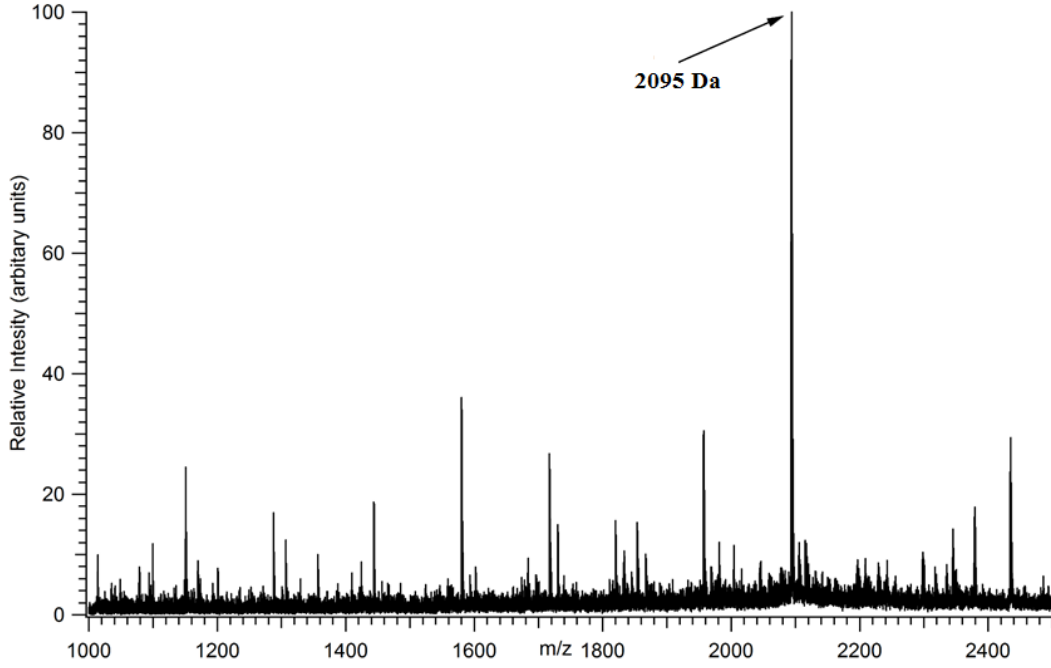
* Taşıyıcı sistem ve DOX'un IC₅₀ değerlerinin oranı

4.5 Kararlı amid bağıyla DOX konjugasyonu yapılan mPEG and mPEG-peptid bazlı taşıyıcı sistemlerin hazırlanması

İkinci grup ilaç taşıyıcı sistemlerinde DOX taşıyıcı sisteme kararlı amid bağıyla konjuge edilmiştir. Bu gruptaki taşıyıcı moleküllerin özellikleri Tablo 7’de verilmiştir. Kontrol amaçlı olarak sentezlenen mPEG-DOX sistemi mPEG-propiyonik asitle DOX’un amin grubu arasında gerçekleşen Şekil 6’da verilen eşleşme reaksiyonu ile elde edilmiştir. İkinci sistem ise mPEG ve peptidten oluşmaktadır. Her iki sistemde de mPEG ilacın kanda dolaşım hızını arttırmak amacıyla kullanılmıştır. İkinci sistemde yer alan AT3 peptidi aynen AT1 peptidi gibi amino asit yan zincirlerinin iyonlaşma ve reaktif özelliklerinden faydalanmak için tasarlanmıştır. AT1’den farklı olarak AT3 peptidine enzimatik bozunur grup eklenerek peptidlerin biyofonksiyonel özellikleri de kullanılmıştır. Tablo 7 ve Şekil A4’de verildiği üzere AT3 peptidi N-terminalinde sistein içermektedir ve sisteinin içerdiği tiol grubuyla mPEG-maleimid reaksiyonu ile mPEG-peptid konjugasyonu sağlanmıştır (Şekil A4). Peptidin C-terminalinde bulunan glutamik asit ise DOX’u bağlamak için dizine eklenmiştir (Şekil A4). Dizinde bulunan pK_a değeri 6 civarı olan histidinlerin ise taşıyıcı sisteme pH cevaplama özelliği ekleyebileceği öngörülmüştür. Dizinde bulunan glisinler ise konjugasyon sırasında sterik etkileri azaltmak amacıyla sistein ve glutamik asidin hemen yanına yerleştirilmiştir. AT1 peptidinden farklı olarak ise RRALAL grubu lizozomal enzimlerden katepsin B tarafından spesifik olarak parçalandığı için dizine eklenmiştir (Schmid vd. 2007). Dolayısıyla taşıyıcı sisteme enzimatik bozunur ilaç salma özelliği kazandırmıştır. Literatürde yapılan çalışmalarda GFLG grubunun da enzimatik bozunur özellik sağladığı gösterilmiştir (Etrych vd. 2001; Veronese vd. 2005). Ancak AT3 peptidindeki ALAL grubunu GFLG ile değiştirerek tasarladığımız AT2 peptidinin hidrofobik özelliğinin fazla olması sebebiyle

Tablo 7. Kararlı amid bağıyla DOX konjugasyonu yapılan mPEG and mPEG-peptid bazlı taşıyıcı sistemler

Örnek kodu	DOX konjugasyonu yapılan taşıyıcı molekül	Teorik moleküler kütle (Da)	Özellik(ler)
mPEG-COOH	mPEG-propiyonik asit	~ 5000	kararlı amid bağı
mPEG-AT3	mPEG- CGGGHHHHHRRALAL GGGE	~ 7095	enzimatik ortamda bozunur ve pH cevaplayan gruplar, kararlı amid bağı

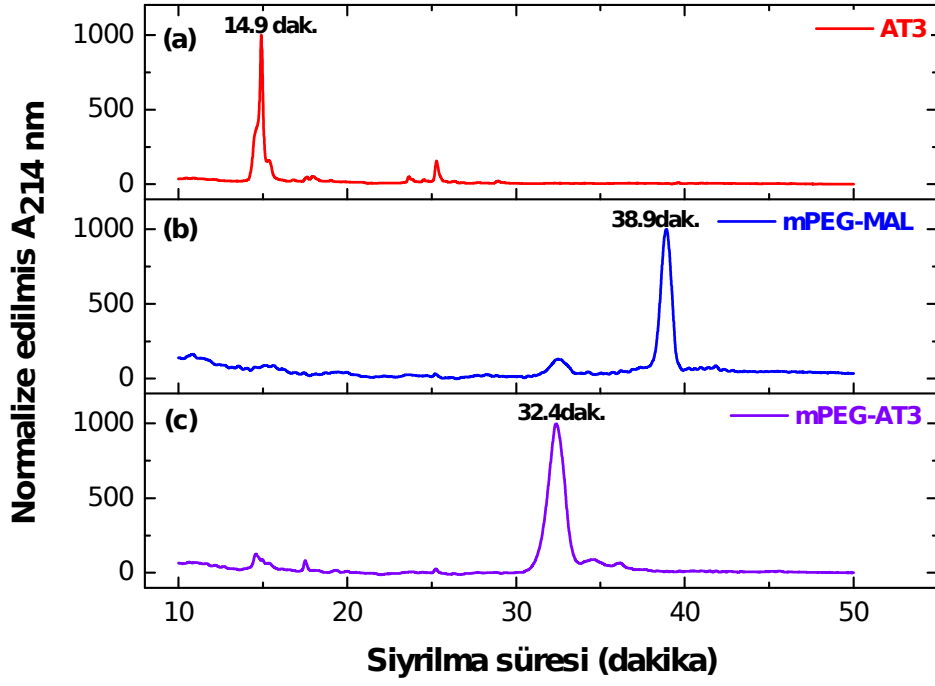


Şekil 24. AT3 peptidinin MALDI-TOF kütle spektrumu

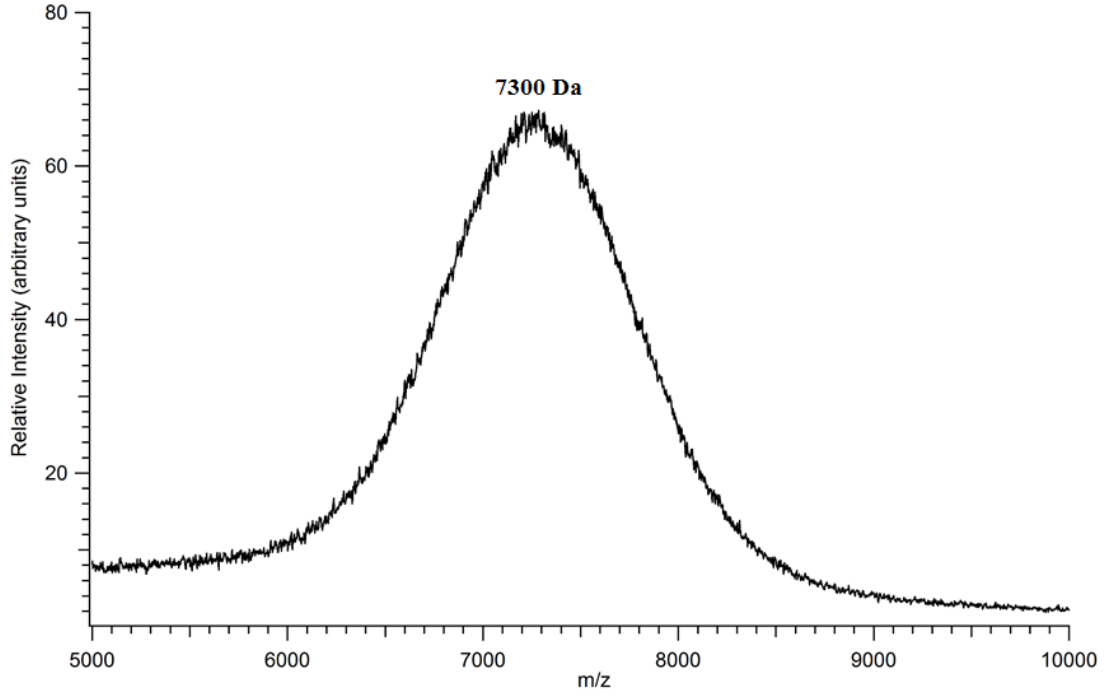
sulu çözeltide gerçekleştirdiğimiz PEG konjugasyonu reaksiyonu çok düşük verimle gerçekleştiği için DOX konjugasyonundan vazgeçilmiştir.

mPEG-AT3-DOX sisteminin ilk aşamasında AT3 peptidi sentezlenmiş, daha sonra mPEG ile konjuge edilmiştir. AT3 peptidi ve mPEG-AT3 taşıyıcı sisteminin saflıkları ve fonksiyonel grupları HPLC, MALDI ve FTIR spektroskopi teknikleriyle tayin edilmiştir. AT3 peptidinin MALDI-TOF kütle spektrumu ve HPLC eğrisi sırasıyla Şekil 24 ve (a)'da gösterilmiştir. MALDI-TOF kütle spektrumunda 2095 Da'da gözlenen en yüksek şiddete sahip pik AT3 peptidinin teorik molar kütleyle örtüşmektedir. Bunun dışında çok daha düşük şiddete sahip pikler sentez sırasında bazı amino asitlerin dizine verimli olarak eklenememesi sonucu oluşan kısa peptid fragmanlarını göstermektedir. Ancak HPLC eğrisi göz önüne alındığında 14.9. dakikada elde edilen büyük pik, peptidin en az % 80 saflıkta elde edildiğini göstermektedir. AT3 peptidi AT1'e göre daha uzun dizine sahip olduğu için saflığının AT1'e göre daha düşük olması beklenen bir durumdur. Bu sonuçların ışığında AT3 peptidi yeterince hiçbir saflaştırmaya tabi tutulmadan mPEG ile konjuge edilmiştir. Elde edilen mPEG-AT3 konjugatının HPLC eğrisi ve MALDI-TOF spektrumu sırasıyla (c) ve Şekil 26'da verilmiştir. mPEG-AT3 konjugatı mPEG-

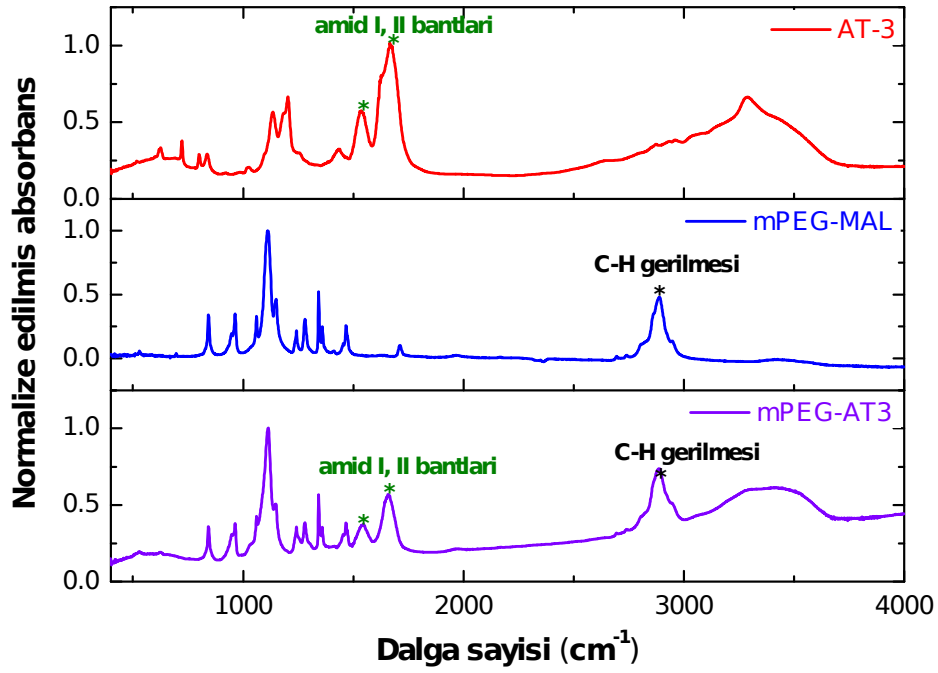
AT1'in davranışına benzer şekilde mPEG-MAL'den daha erken kolondan sıyrılmıştır ve



Şekil 25. (a) AT3, (b) mPEG-MAL, (c) mPEG-AT3 örneklerinin HPLC eğrileri



Şekil 26. mPEG-AT3 örneğinin MALDI-TOF kütle spektrumu



Şekil 27. (a) AT3, (b) mPEG-MAL, (c) mPEG-AT3 örneklerinin FTIR spektrumları

elde edilen HPLC eğrisinde mPEG-MAL'e ait pik tamamen kaybolmuştur. Şekil 13(b) ve Şekil 25(b)'de mPEG-MAL'in farklı zamanlarda sıyırılması HPLC analizlerinde farklı program kullanılmasından kaynaklanmaktadır. mPEG-AT3'ün HPLC eğrisinde AT3 peptidinin sıyırılma süresine karşılık gelen yerde çok küçük bir pik gözlenmiştir. HPLC ile örtüşür bir şekilde mPEG-AT3 konjugatının MALDI-TOF kütle spektrumunda ~7300 Da civarında pik gözlenmiştir (Şekil 26). Bu değer teorik molar kütleye (~7100 Da) oldukça yakındır. Yaklaşık 200 Da'lık fark mPEG-AT1 konjugatında da gözlenmiştir. Polimerin polidispersitesi ve/veya saflaştırma yöntemi olarak uyguladığımız diyaliz sırasında küçük moleküler kütleye sahip polimerlerin ayrılması dolayısıyla moleküler kütle ortalamasının biraz daha artmasından kaynaklanmaktadır. Bu sonuçlar mPEG-AT3'ün içinde çok az miktarda AT3 olmakla birlikte saflığının en az %90 mertebesinde olduğunu öngörmektedir.

Son olarak AT3 peptidi mPEG-MAL ve mPEG-AT3 konjugatındaki fonksiyonel gruplar Şekil 27'de verilen FTIR spektrumlarıyla gösterilmiştir. mPEG-AT1 konjugatının spektrumuna benzer şekilde mPEG-AT3'ün spektrumunda mPEG omurgasındaki C-H gruplarının eğilmelerinden kaynaklı ~2900 cm⁻¹ civarında ve 1500-1700 cm⁻¹ bölgesinde AT3 peptidinden gelen amid I ve amid II bantları açıkça görülmektedir. Dolayısıyla FTIR spektrumu da Tablo 8. DOX'un kararlı amid bağıyla konjuge edildiği taşıyıcı sistemlerin DOX konjugasyon verimi ve yüzdesi

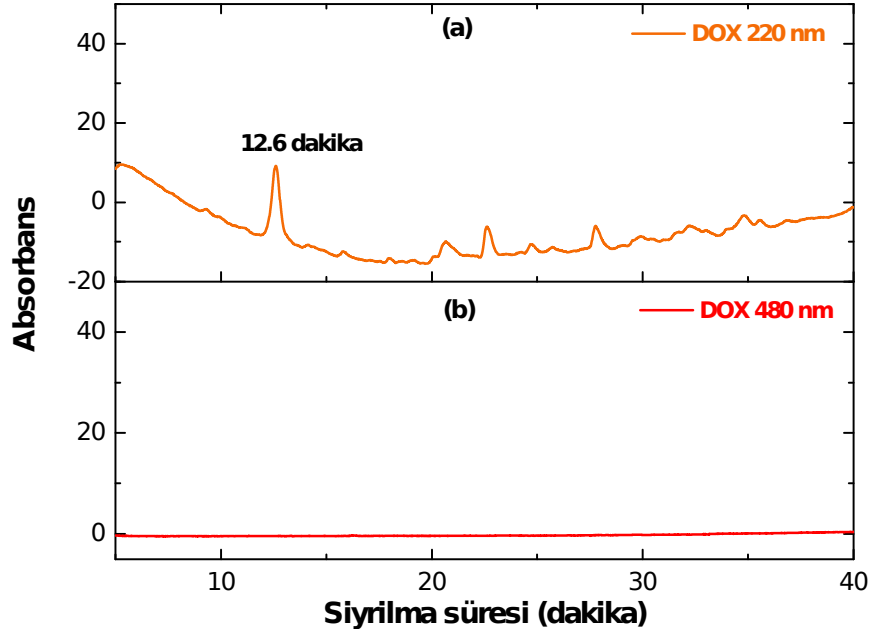
Örnek Kodu	% Verim	% DOX miktarı*
mPEG--DOX	72 ± 19	109 ± 5
mPEG-AT3-DOX	76 ± 5	187 ± 8

* DOX'un molü/COOH fonksiyonel grubu molü x 100%

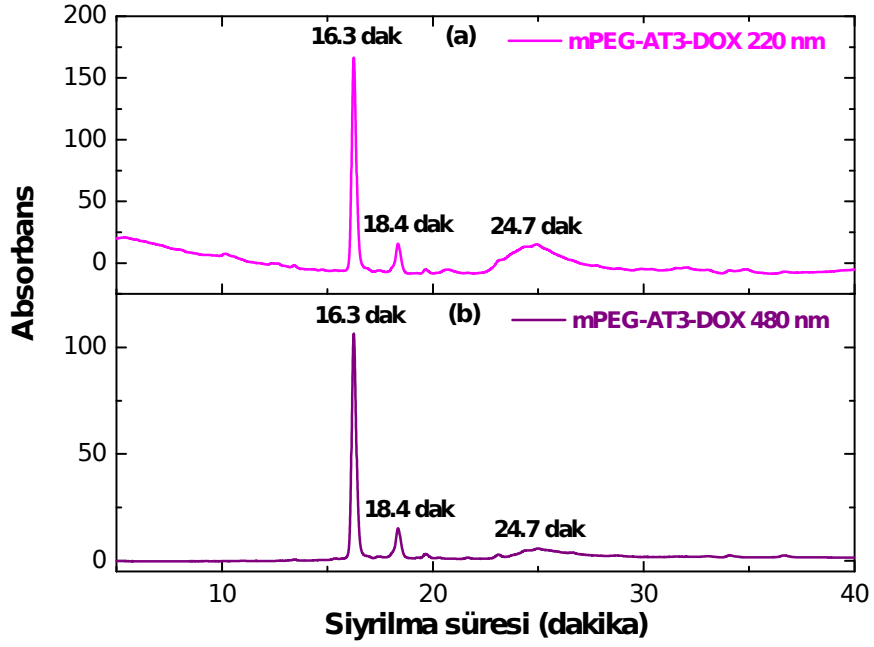
konjugatının başarıyla sentezlediğini teyit etmektedir.

mPEG-propiyonik aside ve mPEG-AT3'e DOX konjugasyonu yapıldıktan sonra DOX konjugasyon miktarı tayini yapılmıştır. Tablo 8'den görülebileceği üzere her iki taşıyıcı sistemin de DOX içeriği %100'ün üzerinde çıkmıştır. Bu da izole edilen taşıyıcı sistemlerin içinde serbest DOX olduğunu göstermektedir. mPEG-DOX ve mPEG-AT3-DOX'un serbest DOX'tan ayrılması için asidik ortamda bozunur ilaç taşıyıcı sistemleriyle aynı yöntem ve şartlar kullanılmıştır. mPEG-HYD1-DOX, mPEG-HYD2-DOX ve mPEG-AT1-DOX kırmızı renkte, hemen arkasından gelen serbest DOX ise turuncu bir renkte Sephadex LH kolonundan sıyırılmıştır. Kararlı amid bağı içeren mPEG-DOX ve mPEG-AT3-DOX konjugatlarında kolonda kırmızı renkli bir fraksiyon

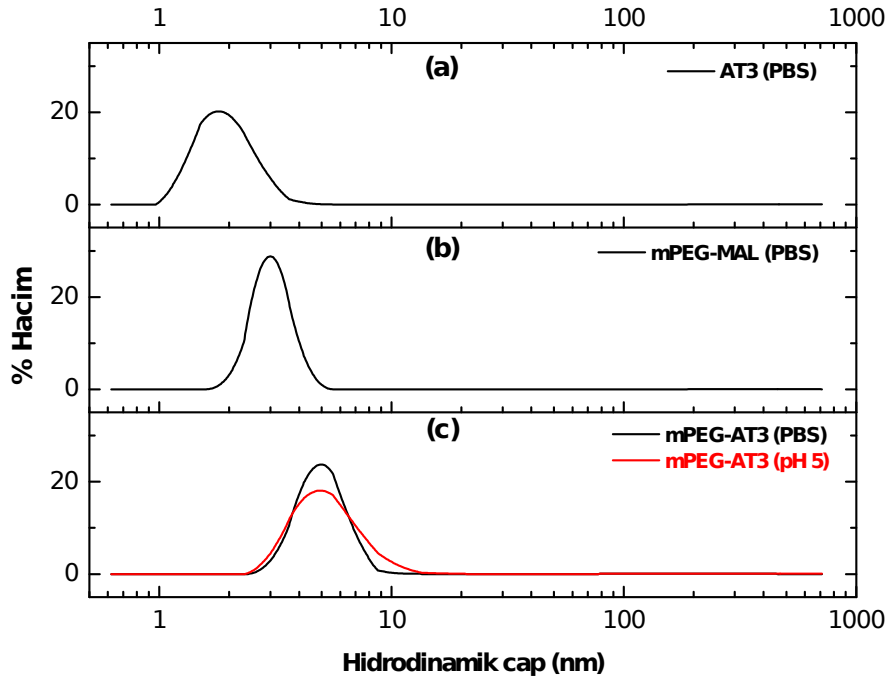
gözlenmemiş, bütün fraksiyonlar kırmızıya yakın turuncu tonlarında elde edilmiştir. Bu konjugatlardaki DOX içeriğini tayin edebilmek amacıyla serbest DOX 100 µg/ml derişiminde serbest DOX içeriği fazla olan mPEG 1.5 mg/ml derişiminde (DOX miktarı = ~ 200 µg/ml) HPLC kolonuna verilir 220 nm ve 480 nm'de örneklerin sıyırılma eğrileri alınmıştır. Şekil 28'de görüleceği üzere serbest DOX görünür bölgede algılanamamış ancak 220 nm'de 12.6 dakikada küçük bir pik vermiştir. Şekil 29'da verilen mPEG-AT3-DOX'un HPLC eğrilerinde ise hem 220 nm'de hem de 480 nm'de 16.7'de büyük bir pik, 18.4'de küçük bir pik ve 24.7'de geniş bir pik gözlenmiştir. Hem 220 nm'de hem de 480 nm'de görülen bu pikler bu 3 fraksiyonun da DOX içerdiğini işaret etmektedir. 220 nm'de başka bir pik görülmemesi mPEG-AT3'ün neredeyse tamamına DOX konjugasyonunun yapıldığını ve aynı zamanda serbest DOX miktarının cihazın algılama limitinin altında olduğunu göstermektedir. 16.7. dakikada görülen pik mPEG-AT3-DOX fraksiyonuna ait gibi gözükmemektedir. Diğer iki pik ise yan reaksiyonlar sonucu oluşabilecek farklı bileşenlere karşılık gelmektedir. Nitekim PyBOP'un karboksilik asit ve alkol grupları arasında gerçekleşen esterifikasyon reaksiyonlarında da katalizör görevi üstlendiği rapor edilmiştir (Coste ve Campagne 1995). Dolayısıyla PEG-AT3 konjugatında bulunan COOH ile



Şekil 28. Serbest DOX'un 220 nm ve 480 nm'de kaydedilen HPLC eğrileri



Şekil 29. mPEG-AT3-DOX'un 220 nm ve 480 nm'de kaydedilen HPLC eğrileri

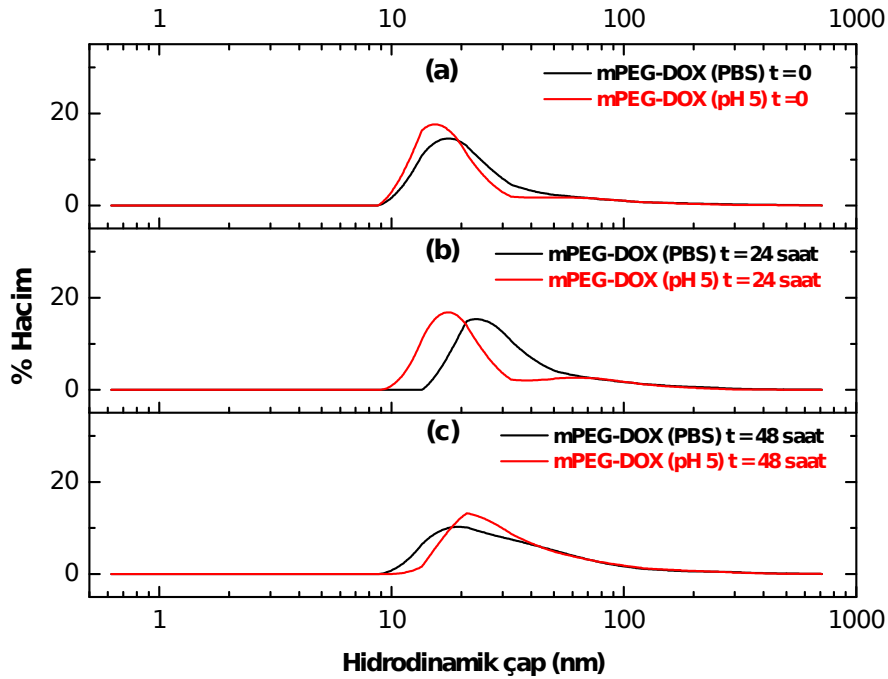


Şekil 30. (a) AT3 peptidi, (b) mPEG-maleimid ve (c) mPEG-AT3 konjugatının boyut dağılımı

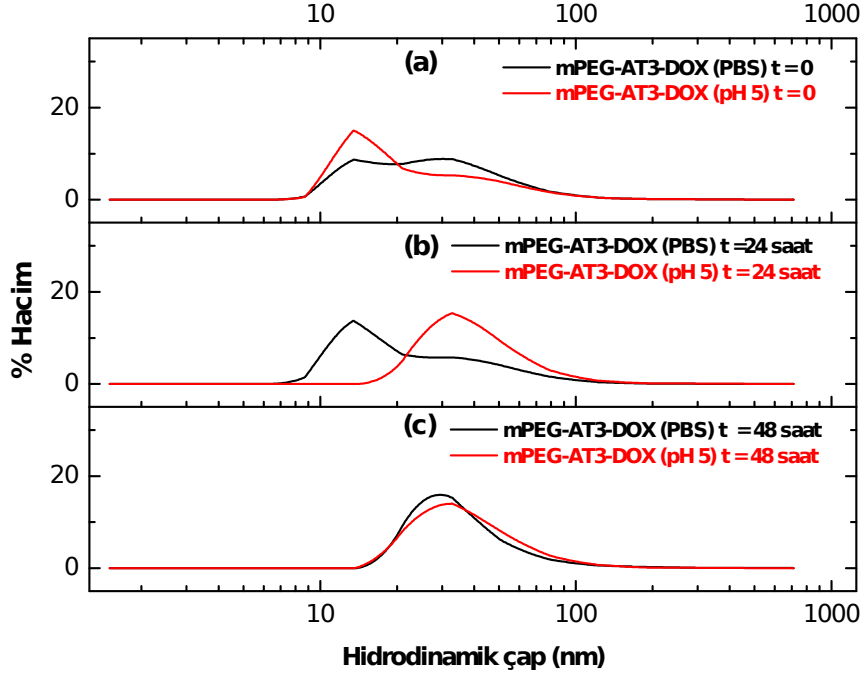
grubunun DOX'ta bulunan OH grubu arasında gerçekleşmesi muhtemel reaksiyon sonucu DOX'un mPEG-AT3'e ester bağıyla konjuge edilmesi de mümkün olabilir. Bu yan reaksiyonlar sebebiyle oluşan safsızlıkların kompozisyonlarının belirlenmesi bu proje kapsamı dışında olduğu için daha sonraki çalışmalara bırakılmıştır. Ancak ilginç sonuçlar ortaya çıkaracağı için üzerinde durulması gerekmektedir.

4.6 Kararlı amid bağıyla DOX konjugasyonu yapılan mPEG and mPEG-peptid bazlı taşıyıcı sistemlerin karakterizasyonu

mPEG-DOX ve mPEG-AT3-DOX taşıyıcı sistemlerinin boyut dağılımı ve 37 °C'deki stabilitesi dinamik ışık saçılma yöntemiyle belirlenmiştir. DOX konjuge edilmiş taşıyıcı sistemlerinin kümelenme durumuna açıklık getirebilmek amacıyla AT3 peptidi, mPEG-MAL ve mPEG-AT3 konjugatının boyut ölçümleri de yapılmıştır. Şekil 30'da verildiği üzere AT3, mPEG-MAL ve mPEG-AT3'ün boyutları sırasıyla 1.7 ± 0.4 nm, 2.9 ± 0.2 nm ve 5.2 ± 0.4 nm olarak ölçülmüştür. mPEG-MAL'in boyutu mPEG-COOH ve teorik değerden (4.4 nm) yaklaşık 1 nm daha az olarak elde edilmiştir. mPEG-AT3'ün boyutu pH'dan bağımsız olarak mPEG ve peptidin boyutları toplamına ve mPEG-AT1'in boyutuna çok yakın olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlar mPEG-AT3'ün kümelenme eğilimi ve pH cevaplama özelliğinin olmadığını göstermiştir.



Şekil 31. mPEG-DOX'un (a) başlangıçta, (b) 24 saat ve (c) 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen boyut dağılımı



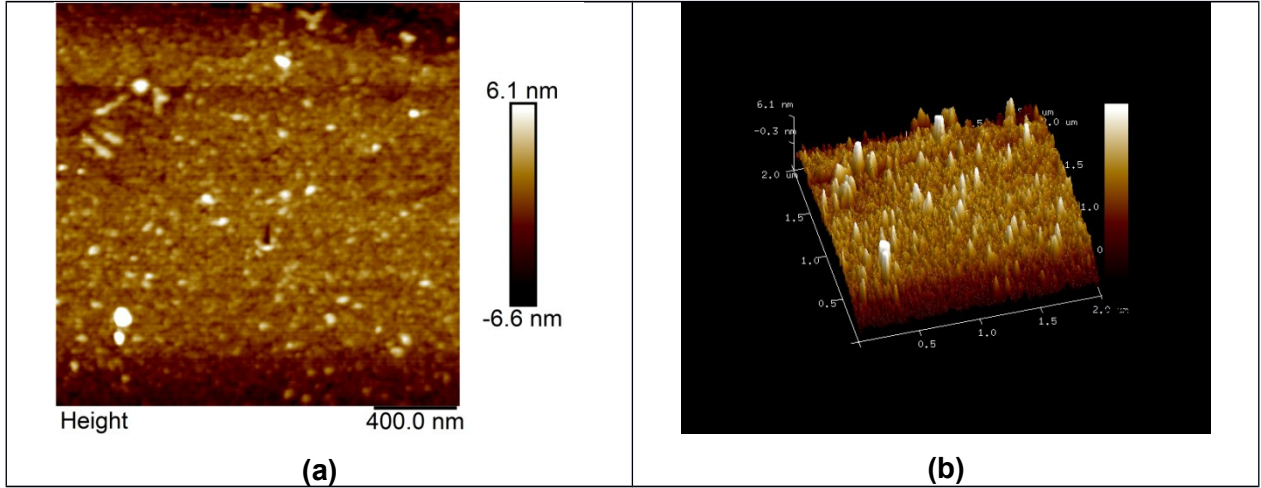
Şekil 32. mPEG-AT3-DOX'un (a) başlangıçta, (b) 24 saat ve (c) 48 saat inkübasyonu sonucu elde edilen boyut dağılımı

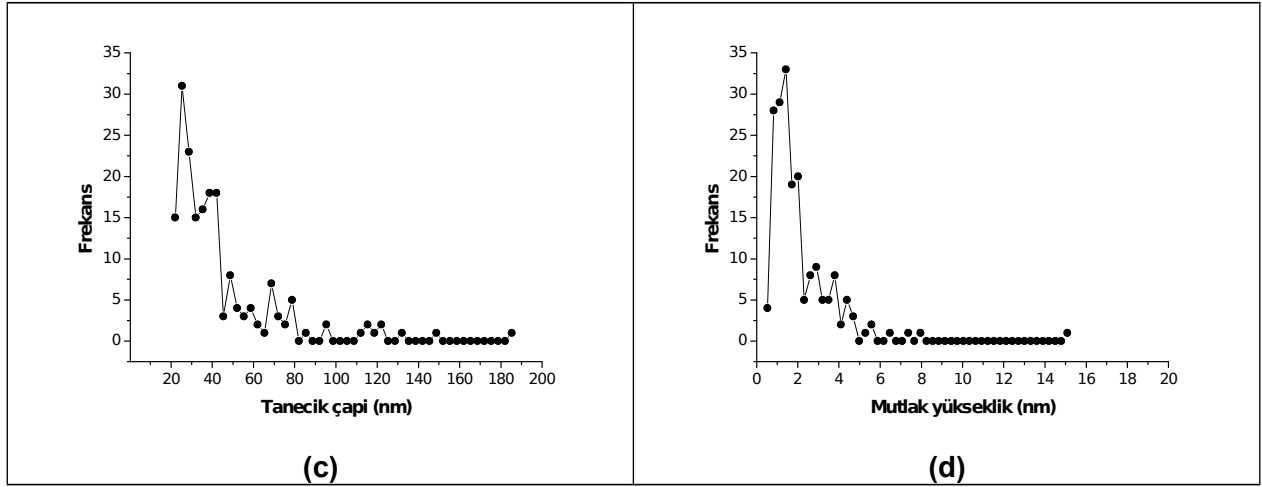
mPEG-DOX'un ortalama hidrodinamik çapı pH 5 ve 7.4'de sırasıyla 15 ± 3 nm ve 19 ± 2 nm olarak belirlenmiştir. Bu değer mPEG'in boyutunun 2 katından fazla olduğu için ilaç taşıyıcı sistemi kümelenme eğilimi göstermektedir. DOX'un PEG-PCL-PEG misel sisteminin hidrofobik polikaprolaktam bloğu içine hapsolabilmesi DOX'un hidrofobik karakterde olduğunu göstermektedir (Cuong vd. 2011). Dolayısıyla taşıyıcı sistemin hidrofobik karakterdeki DOX ve hidrofilik mPEG'den oluştuğu göz önüne alındığında içerde DOX ve yüzeyde PEG moleküllerinden oluşan agregatlar oluşturduğu öngörülebilir. Başlangıçta 24 saat ve 48 saat sonunda yapılan her iki pH değerinde yapılan ölçümler standart sapmalar dahilinde elde edildiği için mPEG-DOX agregatları kararlı bir yapıya sahiptir.

mPEG-AT3-DOX ise başlangıçta pH'tan bağımsız olarak ~ 15 ve 30 nm'de en yüksek hacim yüzdesine sahip iki farklı boyut dağılımı göstermiştir. Her iki pH'da da 48 saatin sonunda ortalama boyut 30 nm'ye kaymıştır. Dolayısıyla yapıdaki histidin sayısı taşıyıcı sisteme pH cevaplama özelliği kazandırmak için yeterli gözükmemektedir. pH 7.4'de yaklaşık 12 ± 2 nm'lik stabil agregatlar oluşturan mPEG-AT1-DOX'un ve mPEG-DOX'un davranışından farklı olarak gözlenen bu zamanla kümelenmenin artması eğilimi mPEG-AT3-DOX sistemindeki

bağlanmamış DOX miktarının fazla olmasına bağlanabilir. Misel sistemlerini oluşturan komponentler tekli zincir takası veya füzyon/fisyon gibi mekanizmalarla sürekli farklı miseller arasında geçiş yapmaktadır. Bu değişim kinetiği çok hızlı olduğu için ancak sıcaklık veya basınç farkları yaratarak algılanabilmektedir (Lund vd. 2013). Dolayısıyla mPEG-AT3-DOX sisteminin zamanla boyutunun artması sıcaklığın 37°C'ye getirilmesiyle moleküllerin hareketliliğinin ve en nihayetinde de misellerin füzyon hızının artmasıyla açıklanabilir. mPEG-AT3-DOX agregatlarının içinde bulunan mPEG-AT3 sistemine konjuge edilmemiş DOX moleküllerinin boyutları polimer zincirlerine göre çok daha küçük olduğu için sıcaklığın oda sıcaklığından 37°C'ye yükseltilmesi bağlanmamış DOX moleküllerinin hareketliliğini polimer zincirlerine göre çok daha fazla arttırdığı için serbest DOX miktarı mPEG-AT3-DOX'a göre çok daha az olan mPEG-DOX ve pH 7.4'deki mPEG-AT1-DOX agregatları çok daha stabil bir davranış göstermişlerdir.

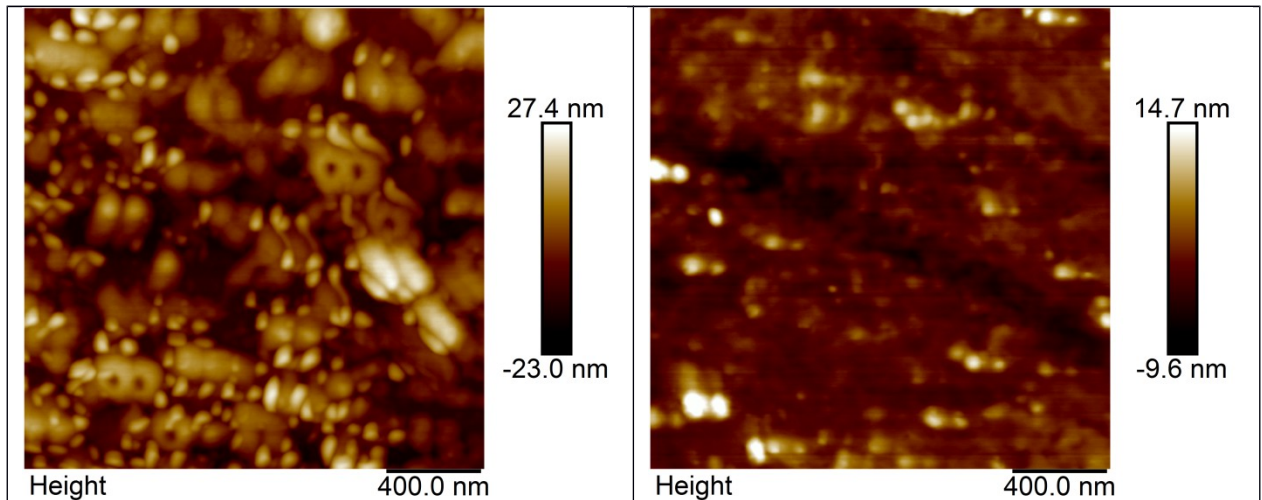
mPEG-DOX ve mPEG-AT3'ün AFM görüntüleri sırasıyla Şekil 32(a-b), ve Şekil 33 (a-b)'de verilmiştir. Ayrıca mPEG-DOX'un AFM görüntülerinden elde edilen parçacık boyutu ve mutlak yükseklik dağılımı Şekil 33(c-d)'de gösterilmiştir. mPEG-DOX'un 2 boyutlu AFM görüntüsü agregatların dairesel veya elips şeklinde olduğunu göstermiştir. Tanecik boyutu dağılımında çoğunlukla agregat popülasyonunun büyük bir kısmının 25 ve 40 nm'ye sahip olduğu elde edilmiştir. Dinamik ışık saçılımı sonuçlarına göre biraz daha büyük elde edilen bu





Şekil 33. PEG-DOX örneğinin AFM'den alınan (a) 2 boyutlu görüntüsü, (b) 3 boyutlu görüntüsü, (c) tanecik boyutu dağılımı, (d) mutlak yükseklik dağılımı

değerler örnek hazırlama sırasında mika substratın üzerinde buharlaşmayla artan derişim sonucu agregatların füzyonuyla ve/veya PEG zincirlerinin mikayla etkileşimi sonucu yüzeye yayılmasıyla açıklanabilir. Nitekim yaklaşık beklenenden oldukça düşük olarak 1.4-5.5 nm arasında ölçülen mutlak yükseklik değerleri PEG zincirinin yüzeye yayılma hipotezini desteklemektedir. Benzer bir olay PEO-PBLA-piren sistemi için gözlenmiştir. Dinamik ışık saçılma sonucu agregat boyutu 48 nm olarak elde edilmiş, AFM görüntüleri bizim çalışmamızda gözlenen yapılar gibi yuvarlak kesite sahip ve 56 nm boyutunda agregatlar vermiştir. AFM kullanılarak bu agregatların ortalama yüksekliği 6 nm olarak elde edilmiştir. Açıklama olarak agregatların ölçüm sırasında cantilever tarafından sıkıştırıldığı için veya hidrofilik PEO'nun hidrofilik mika ile etkileşim sonucu



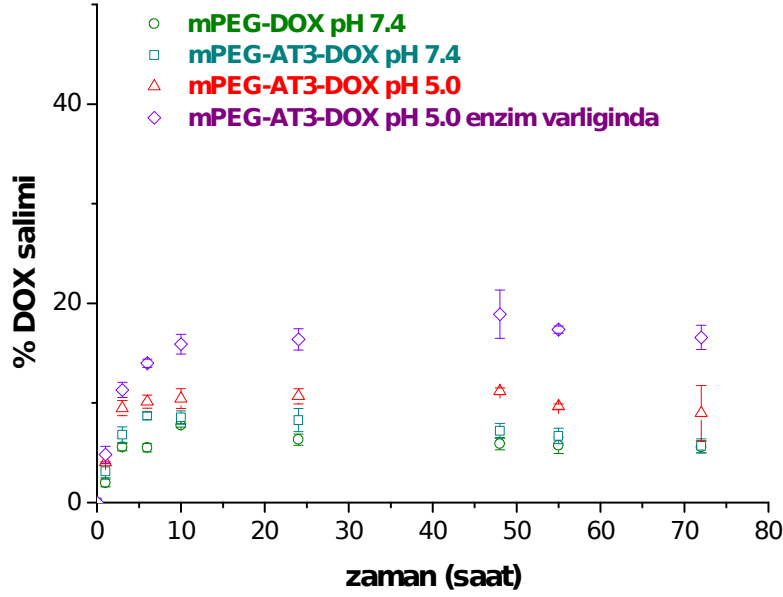
(a)	(b)
------------	------------

Şekil 34. PEG-AT3-DOX örneğinin (a) plaka üzerinde 5 kat seyreltilerek ve (b) 10 kat seyreltildikten sonra plakaya eklenerek alınan 2 boyutlu AFM görüntüleri

yüze yayıldığı için yüksekliklerin beklenenden az olarak ölçüldüğü iddia edilmiştir (Liaw vd. 1998).

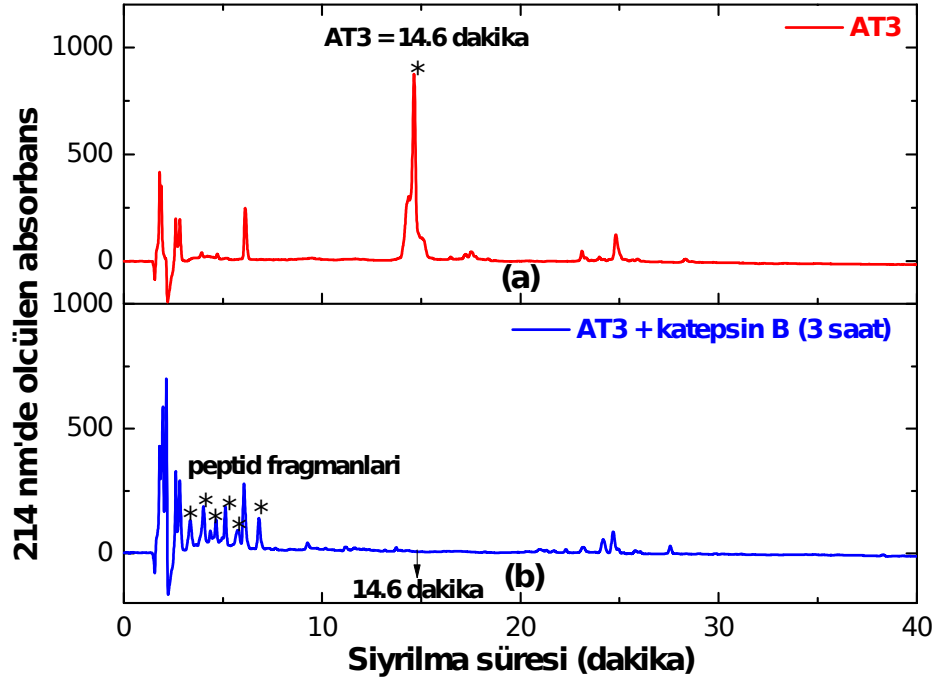
DLS sonuçlarına paralel olarak kararsız bir eğilim gösteren mPEG-AT3-DOX agregatları örnek hazırlama sırasında kümelenme eğilimi göstermiştir. mPEG-AT3-DOX'un AFM görüntülerini almak için önce mPEG-DOX örneğinin hazırlandığı yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemde DLS'de ölçüm yapılan derişimin (1.5 mg/ml) mika plaka üzerinde 5 kat seyreltilmiştir. Şekil 34(a)'da verildiği üzere örneğin AFM görüntüsünde boyutları 100-400 nm arasında yapılar elde edilmiştir. Daha sonra 1.5 mg/ml derişiminde hazırlanan örnek 10 kat seyreltildikten sonra mika yüzeyine eklenmiştir. Bu yöntemde kümelenme eğilimi çok daha az gözlenirse de DLS sonuçlarının çok daha üzerinde ~ 100 nm boyutunda yapılar elde edilmiştir.

Taşıyıcı sistemlerin DOX salım eğrileri Şekil 35'te verilmiştir. Asidik ortamda bozunur ilaç taşıyıcı sistemlerinin pH 7.4 'de gösterdiği davranışa paralel olarak kararlı amid bağı içeren konjugatların maksimum ilaç salımları enzim kullanılmadığında çok büyük farklılıklar göstermeyerek 8.5 ± 3 olarak elde edilmiştir. Enzimatik bozunur dizine sahip mPEG-AT3-DOX'un enzim varlığında ise yaklaşık 17 ± 2 'lik bir DOX salımı göstermiştir. Doksorubisinin albümine RRALAL içeren dizinle bağlandığı sistemde katepsin B varlığında 24 saatin sonunda DOX'un neredeyse tamamı salınmıştır (Schmid vd. 2007). Benzer şekilde bir diğer enzimatik



Şekil 35. mPEG-DOX ve mPEG-AT3-DOX örneklerinin DOX salım profili

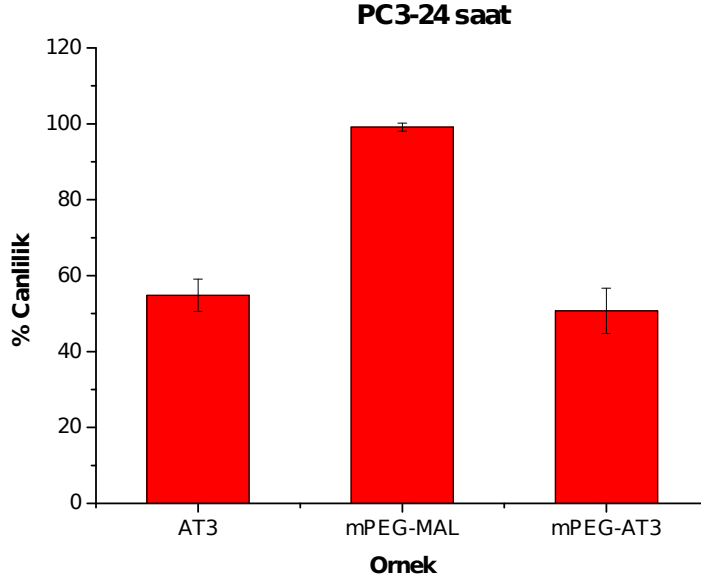
bozunur dizin olan GFLG grubu içeren HPMA kopolimerleri-DOX konjugatlarından DOX salımı katepsin B varlığında % 15-30 oranında artmıştır (Etrych vd. 2001; Etrych vd. 2002). Albumin-DOX ve HPMA-DOX konjugatlarının kümelenme davranışına dair herhangi bir sonuç gösterilmese de mPEG-AT3-DOX kümelenme eğilimi dolayısıyla yüzeyi mPEG molekülleriyle sarılan enzimatik bozunur dizinin katepsin B enzimiyle temasının düşük olması sebebiyle enzimin ilaç salımını beklenenden daha az arttırdığı düşünülmüştür. Bu amaçla AT3 peptidi katepsin B enzimiyle 3 saat boyunca muamele edildikten sonra HPLC analizi yapılmıştır. Şekil 36'da verildiği üzere AT3 peptidine ait 14.6'da elde edilen pik enzimle muamele sonucu tamamen kaybolmuş yerine 3. ve 7. dakika aralığında yeni pikler oluşmuştur. Bu sonuç enzimin 3 saat içinde bile etkin bir şekilde aktivite gösterdiğini doğrulamaktadır. 0.5 ml'de gerçekleştirilen ilaç salım deneyleri için toplamda 2.65 µg, 1 ml AT3 çözeltisinin katepsin B ile muamele edildiği çalışmada ise oranlı olarak 5.3 µg katepsin B kullanılmıştır. Üstelik her iki deneyde kullanılan enzimatik dizinin derişimleri karşılaştırıldığında, peptid + katepsin B deneyinde ilaç salım deneyine göre yaklaşık 3.75 kat daha fazla enzimatik bozunur dizin grubu kullanılmıştır. Dolayısıyla HPLC analizi mPEG-AT3-DOX'un kümelenme eğilimi dolayısıyla katepsin B'nin DOX salımına etkisinin perdelendiğini göstermektedir. Buna karşın agregatlar oluşturan GFGL veya



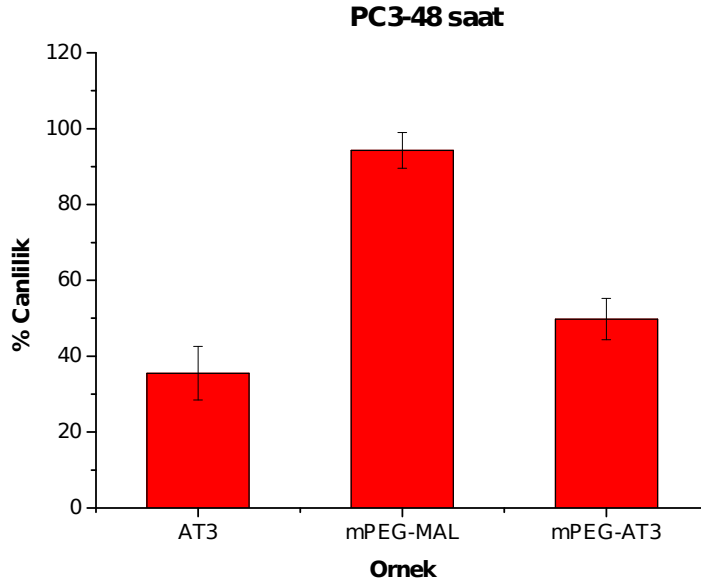
Şekil 36. AT3 peptidinin (a) katepsin B ile muamele edilmeden önce, (b) 3 saat boyunca katepsin B ile muamele edildikten sonra elde edilen HPLC eğrileri

GLFG dizini içeren mPEG-peptid-DOX konjugatlarında ise lizozomal enzim kokteyli (tritozomlar) 5 saat sonunda ~ % 30-60, 24 saat sonunda ise ~ % 50-80 DOX salımı gerçekleştirilmiştir. Ancak bu çalışmada kullanılan tritozom miktarı bir hayli yüksektir (384 μg / 1 ml inkübasyon çözeltisi) (Veronese vd. 2005). Dolayısıyla kümelenme eğilimi gösteren taşıyıcı sistemlerde enzim aktivitesi belirgin bir şekilde yalnızca yüksek enzim derişimlerinde gözlenebilmektedir.

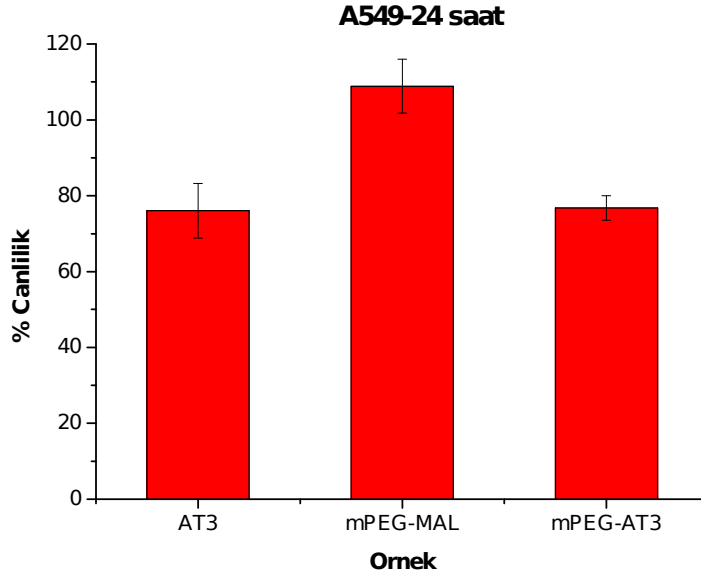
AT3 peptidi, mPEG-MAL ve mPEG-AT3 konjugatının in vitro sitotoksiteleri A549 ve PC3 hücre hattında test edilmiştir. 24 saat ve 48 saatin sonunda elde edilen % canlılık değerleri Şekil 37, Şekil 38, Şekil 39 ve Şekil 40'ta verilmiştir. mPEG-MAL, mPEG-COOH'a benzer şekilde sitotoksik bir etki göstermemiştir. Ancak 1.5 mg/ml derişiminde kullanılan AT3 peptidi ve mPEG-AT3, PC3 hücresinde belirgin bir sitotoksikite göstermiştir. AT3 ve mPEG-AT3 A549 hücresinde daha düşük derişimde (0.75 mg/ml) kullanıldığı için sitotoksik etkileri ancak 48. saatin sonunda açık bir şekilde gözlenmiştir. AT3 peptidi sitotoksik etkisi bulunmayan AT1 peptidinden farklı olarak enzimatik bozunur dizin (RRALAL) içermektedir. Yüksek moleküler



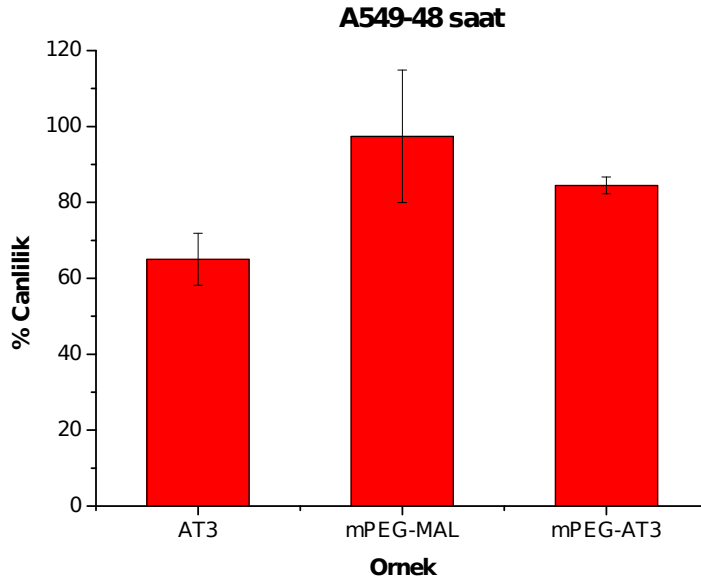
Şekil 37. AT3 peptidi, mPEG-maleimid ve mPEG-AT3 örneklerinin PC3 hücre hattı kullanılarak 24 saatin sonunda elde edilen sitotoksisite değerleri (C = 1.5 mg/ml)



Şekil 38. AT3 peptidi, mPEG-maleimid ve mPEG-AT3 örneklerinin PC3 hücre hattı kullanılarak 48 saatin sonunda elde edilen sitotoksisite değerleri (C = 1.5 mg/ml)



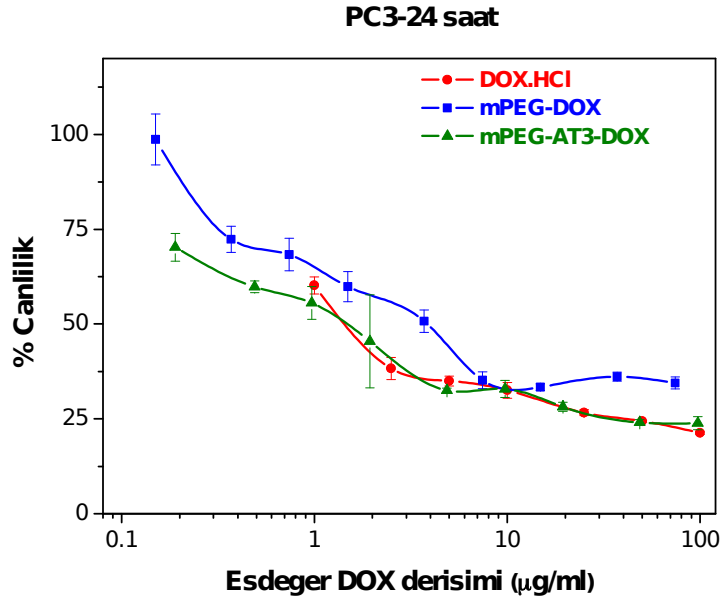
Şekil 39. AT3 peptidi, mPEG-maleimid ve mPEG-AT3 örneklerinin A549 hücre hattı kullanılarak 24 saatin sonunda elde edilen sitotoksosite değerleri (C = 0.75 mg/ml)



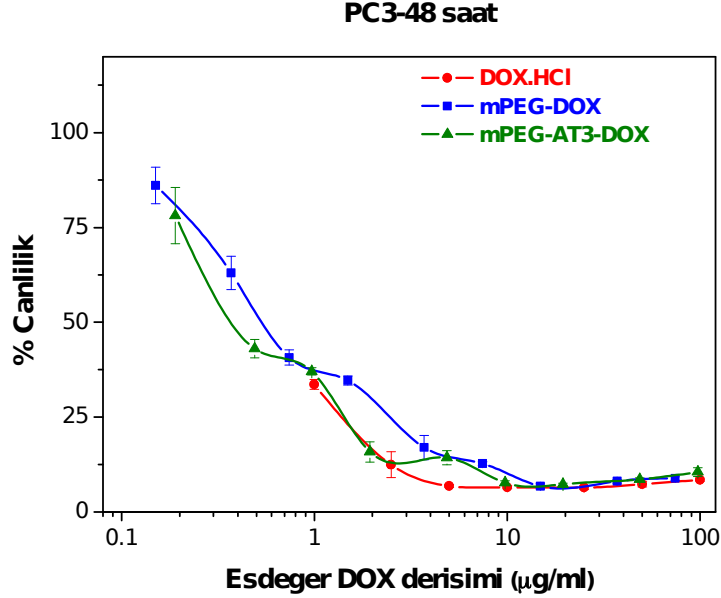
Şekil 40. AT3 peptidi, mPEG-maleimid ve mPEG-AT3 örneklerinin A549 hücre hattı kullanılarak 48 saatin sonunda elde edilen sitotoksosite değerleri (C = 0.75 mg/ml)

ağırlığa sahip poliarjininin (41 kDa) HEK 293 hücre hattına karşı IC_{50} değeri 100 μ g/ml olarak belirlenmiştir (Koo vd. 2009). Ayrıca birçok sitotoksik peptidin artı yüklü lizin ve arginin içerdiği belirtilmiştir (Kourie ve Shorthouse 2000). Dolayısıyla AT3 peptidinin ve mPEG-AT3'ün sitotoksitesi büyük bir ihtimalle dizinde bulunan arjinin gruplarından kaynaklanmaktadır.

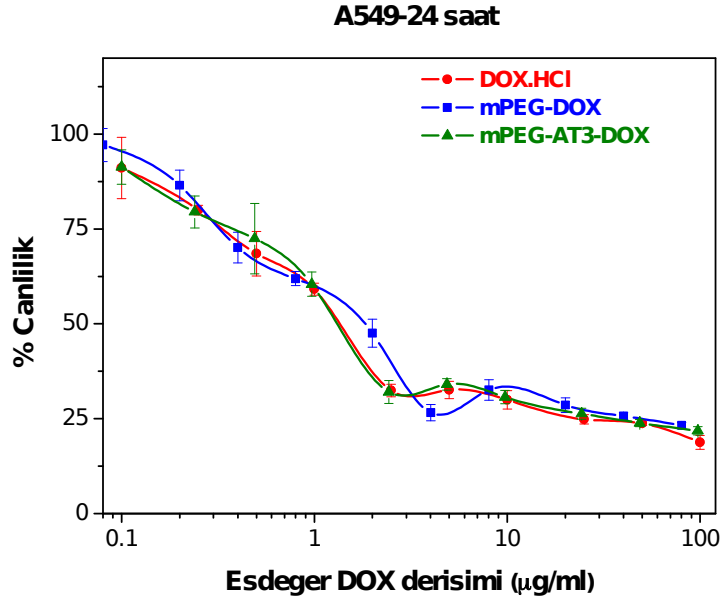
Serbest DOX, mPEG-DOX ve mPEG-AT3-DOX örneklerinin 24 saat ve 48 saat sonunda elde edilen büyüme engelleme eğrileri PC3 için Şekil 41 ve Şekil 42 A549 için ise Şekil 43 ve Şekil 44'te verilmiştir. Serbest DOX ve taşıyıcı sistemlerin mutlak IC_{50} değerleri Tablo 9, ikili istatistiksel karşılaştırma sonucu elde edilen p-değerleri Tablo A3'te özetlenmiştir. İstatiksel olarak serbest DOX ve mPEG-AT3-DOX'un PC3 ve A549 için 24 saat sonunda elde edilen IC_{50} değerleri ile mPEG-DOX ve mPEG-AT3-DOX'un PC3 hücre hattıyla yapılan testlerde 48 saat sonunda gösterdiği IC_{50} değerleri anlamsız bir fark olarak gösterilmiştir (p-değeri > 0.05). DOX'un PC3 hücre hattı için 48 saat sonunda IC_{50} değeri elde edilemediği için herhangi bir karşılaştırma yapılamamıştır. Buna ilaveten mPEG-DOX'un 24 saatin sonundaki IC_{50} değerleri DOX ve mPEG-AT3-DOX verileri ile karşılaştırıldığı zaman hem A549 hem de PC3 hücre hattı için istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir (p-değeri < 0.05). IC_{50} değerlerinin genel trendi göz önüne alındığında örneklerin sitotoksite sıralaması serbest DOX \geq mPEG-DOX-AT3 \geq mPEG-DOX şeklinde ifade edilebilir. Farklı peptid dizini içeren mPEG-DOX konjugatlarda DOX salım hızıyla in vitro sitotoksik etkisi arasında herhangi bir korelasyon bulunamamış ve yapıda düşük miktarda bulunmasına rağmen serbest DOX'un sitotoksite üzerine etkisi olabileceği belirtilmiştir (Veronese vd. 2005). Dolayısıyla mPEG-AT3-DOX'un mPEG-AT1-DOX örneğine göre A549 hücre hattında daha fazla hatta serbest DOX kadar sitotoksite göstermesi kompozisyondaki serbest DOX'tan kaynaklanabilir. Ayrıca AT3 peptidinin AT1'e göre sitotoksik olması da sonucu az da olsa etkileyebilir.



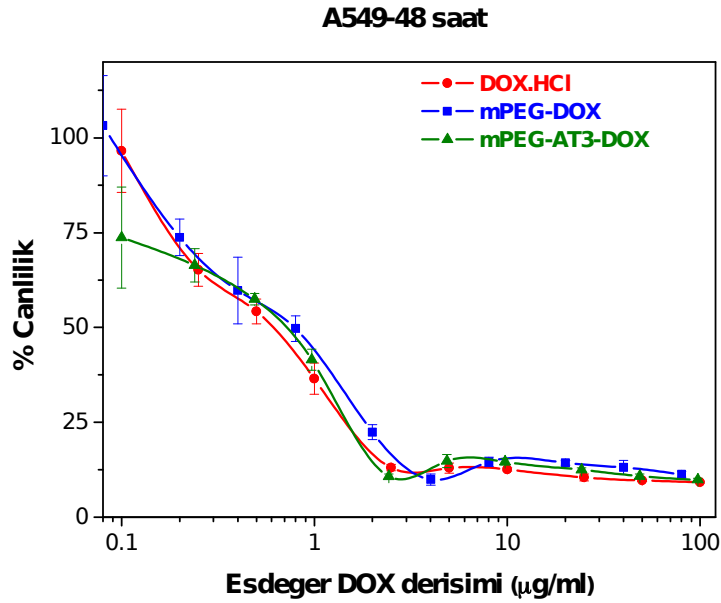
Şekil 41. Serbest DOX ve DOX'un kararlı amid bağıyla konjuge edildiği taşıyıcı sistemlerin PC3 hücre hattı kullanılarak 24 saat sonunda elde edilen büyüme engelleme eğrisi



Şekil 42. Serbest DOX ve DOX'un kararlı amid bağıyla konjuge edildiği taşıyıcı sistemlerin PC3 hücre hattı kullanılarak 48 saat sonunda elde edilen büyüme engelleme eğrisi



Şekil 43. Serbest DOX ve DOX'un kararlı amid bağıyla konjuge edildiği taşıyıcı sistemlerin A549 hücre hattı kullanılarak 24 saat sonunda elde edilen büyüme engelleme eğrisi



Şekil 44. Serbest DOX ve DOX'un kararlı amid bağıyla konjuge edildiği taşıyıcı sistemlerin A549 hücre hattı kullanılarak 48 saat sonunda elde edilen büyüme engelleme eğrisi

Tablo 9. DOX ve DOX'un kararlı amid bağıyla konjuge edildiği taşıyıcı sistemlerin mutlak IC50 değerleri

Örnek	DOX eşdeğer IC ₅₀ değeri (µg/ml)			
	A549		PC3	
	24 saat	48 saat	24 saat	48 saat
Serbest DOX	1.37 ± 0.05	0.60 ± 0.06	1.51 ± 0.07	<1
mPEG-DOX	1.87 ± 0.27	0.80 ± 0.13	3.81 ± 0.72	0.54 ± 0.04
mPEG-AT3-DOX	1.33 ± 0.11	0.72 ± 0.07	1.63 ± 0.80	0.39 ± 0.03

5. SONUÇLAR

Bu çalışmanın ilk kısmında asidik ortamda bozunur bağ içeren ilaç taşıyıcı sistemleri hazırlanmıştır. Model ilaç olarak seçilen DOX, mPEG ve mPEG-peptid sistemine asidik ortamda bozunur hidrazon bağıyla konjuge edilmiştir. Sadece mPEG ve DOX içeren sistemlerde mPEG-propiyonik asitte DOX'un bağlanabileceği fonksiyonel grubu oluşturmak için adipik acid dihidrazid (AADH) ve karbohidrazid (CH) kullanılmıştır. pH2ya duyarlı histidin bulunduran AT1 peptid dizinine sahip mPEG-AT1-DOX taşıyıcı sistemlerine DOX konjugasyonu AADH kullanılarak yapılmıştır. mPEG-propiyonik asit ve AADH kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyonda karboksilik asitlerin % 53'ü hidrazid grubuna dönüştürülmüştür. Hidrazid yüzdesinden biraz daha fazla elde edilen DOX konjugasyon yüzdesi (% 63) DOX ölçümündeki belirsizlikten ya da kompozisyonda serbest DOX'un bulunmasından kaynaklanabilir.

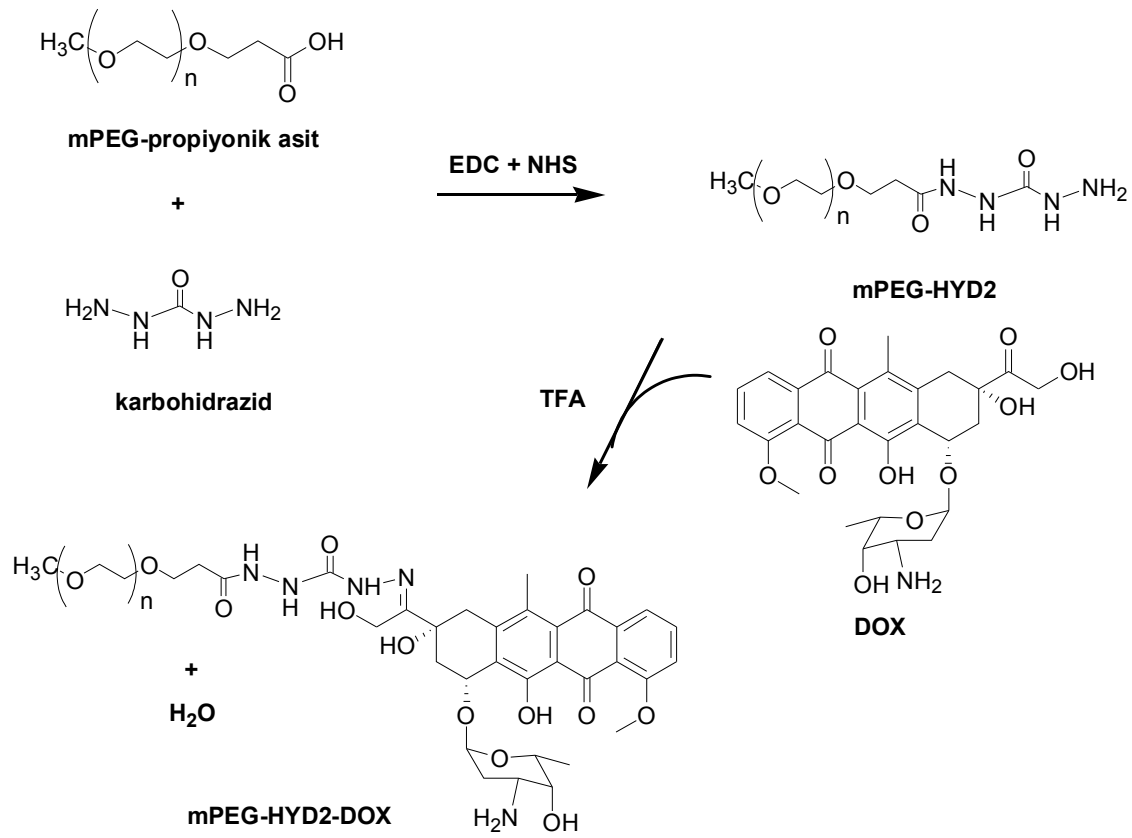
Peptid içeren konjugat, mPEG-AT1-DOX sterik etkiler dolayısıyla daha düşük DOX konjugasyon yüzdesine (~ % 35) sahip olmasına rağmen, pH 5 ve pH 7.4'te elde edilen ilaç salım profillerinden görülebileceği üzerine daha belirgin bir pH cevaplama özelliği sunmuştur. mPEG-HYD-DOX sistemlerine göre mPEG-AT1-DOX'un çok daha fazla DOX salımı ve sitotoksite göstermesi hem pH fonksiyonel gruplar hem de pH programlı kimyasal bağlar içeren ilaç taşıyıcı sistemlerin umut vaat edici olduğunu göstermektedir. Ancak kümelenme eğilimi gösterse de mPEG-AT1-DOX'un pH 7.4'te ölçülen $\sim 12 \pm 2$ nm'lik boyutu EPR etkisinden faydalanabilmek için gereken boyutların biraz altındadır. Mevcut mPEG-AT1-DOX sisteminde hidrofilik mPEG bloğunun moleküler ağırlığı azaltılarak, ya da çoklu ilaç moleküllerinin bağlanabileceği polipeptid bloğu içeren mPEG-polipeptid ilaç taşıyıcı sistemi geliştirilerek EPR etkisi için uygun boyutlar elde edilebilir. Buna ilaveten peptid/polipeptid bloğundaki histidin sayısı artırılarak taşıyıcı sisteminin daha belirgin bir pH cevaplama özelliği kazanması sağlanabilir.

Bu çalışmanın ikinci kısmında ise kararlı amid bağı içeren ilaç taşıyıcı sistemleri geliştirilmiştir. mPEG-AT3-DOX sisteminde bulunan AT3 peptidine enzimatik bozunur dizin ve pH cevaplayabilen histidin grupları eklenmiştir. mPEG-DOX konjugatı ise peptidin etkisini belirlemek için kontrol taşıyıcı sistemi olarak sentezlenmiştir. Sentezlenen konjugatlarda bağlanmamış DOX'un tamamen uzaklaştırılmaması dolayısıyla COOH gruplarına göre DOX yüzdesi mPEG-DOX için ~ 110 % ve ~ 190 % olarak elde edilmiştir. mPEG-DOX ve mPEG-AT3-DOX kümelenme eğilimi göstermiştir. mPEG-DOX'un hidrodinamik çapı $\sim 15-20$ nm olarak ölçülmüştür. mPEG-AT3-DOX ise ~ 15 ve 30 nm'de iki farklı boyut dağılımı göstermiştir. 48 saatin sonunda mPEG-DOX'un boyut dağılımında bir değişiklik gözlenmemiş, mPEG-AT3-DOX'un ortalama boyutu ~ 30 nm'ye yükselmiştir. mPEG-DOX'un pH 7.4'te, mPEG-AT3-DOX'un

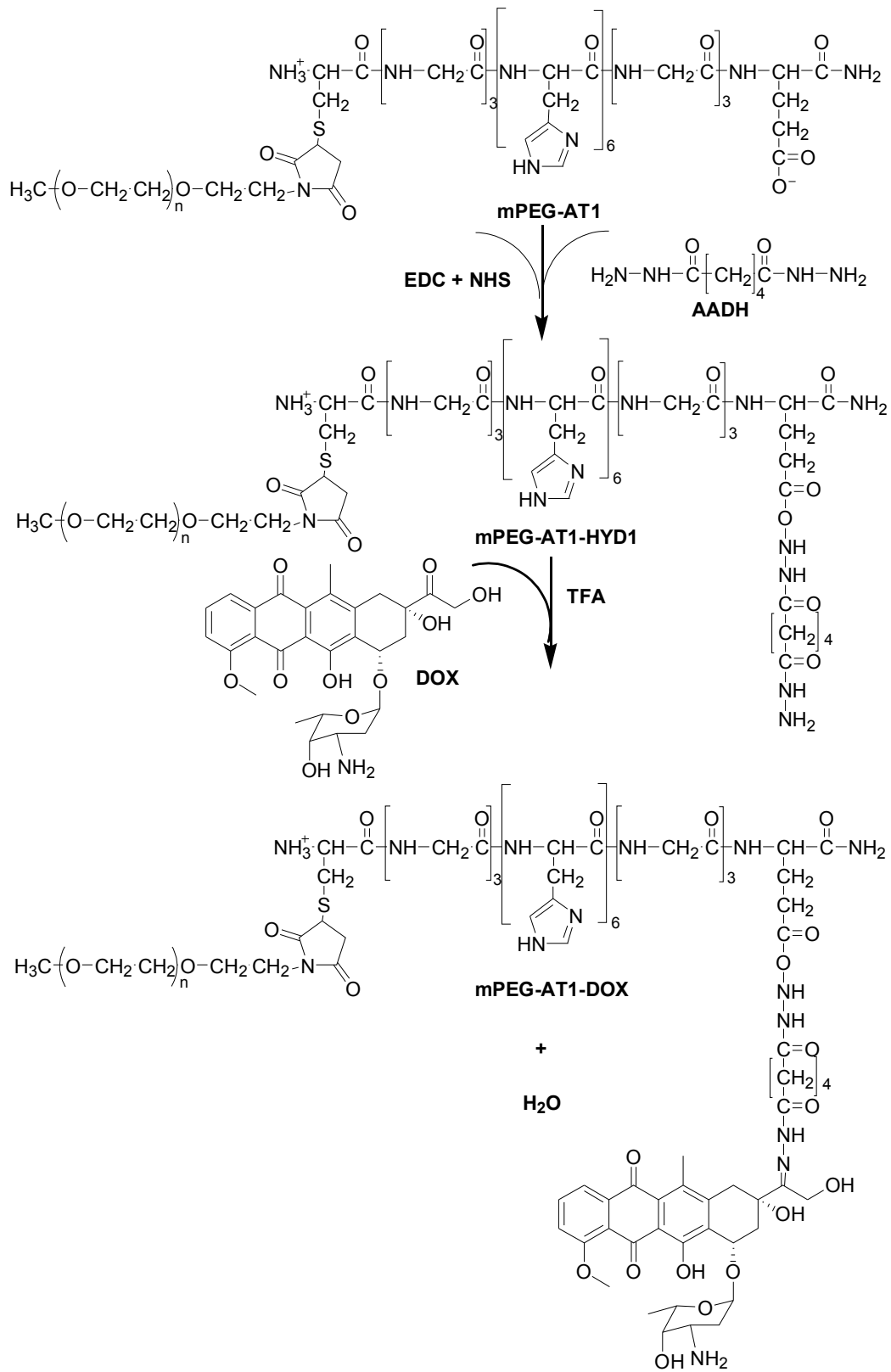
pH 7.4 ve enzim eklenmeden pH 5.0'te elde edilen DOX salım eğrilerinde % DOX salım miktarı % 10'un altında elde edilmiştir. mPEG-AT3-DOX'un katepsin B varlığında pH 5.0'te ise % DOX salımı % 17 ± 2 'ye çıkmıştır. Enzimatik bozunur dizin içeren diğer taşıyıcı sistemlerle karşılaştırıldığında bu artış biraz düşüktür. HPLC analizi katepsin B ile muamele edilen AT3 peptidinin tamamen parçalandığını göstermiştir. Dolayısıyla beklenenden az elde edilen DOX salım yüzdesi mPEG-AT3-DOX'un kümelenme eğilimi dolayısıyla katepsin B-RRALAL dizini etkileşiminin düşük olmasına bağlanabilir. Daha sonraki aşamalarda peptid dizinine daha fazla histidin eklenerek enzimin aktivite gösterdiği pH 5'te taşıyıcı sistemin kümelenme eğilimi azaltılırsa katepsin B etkisinin ilaç salımındaki etkisi çok daha belirgin hale getirilebilir. Yapılan sitotoksitate testleri mPEG-AT3-DOX konjugatının asidik bozunur bağ içeren mPEG-AT1-DOX taşıyıcı sisteminden çok daha fazla neredeyse serbest DOX kadar toksik olduğunu göstermiştir. Bu gözlem sitotoksik özellik taşıyan AT3 peptidi ve mPEG-AT3-DOX'un kompozisyonunda bulunan konjuge edilmemiş DOX moleküllerinin mPEG-AT3-DOX konjugatının sitotoksik etkinliğine katkısı olabileceğini göstermiştir.

Daha sonraki çalışmalarda taşıyıcı sistemlerin pH cevaplama özelliğinin geliştirilmesi ve boyutlarının EPR etkisinden faydalanabilmek için uygun hale getirilmesine öncelik verilecektir. Daha önce belirtildiği üzere, dizindeki histidin sayısı artırılarak taşıyıcı sistemlerin pH 5'te gözlenen kümelenme eğilimi azaltılabilir. Mevcut taşıyıcı sistemlerde mPEG bloğunun boyutu küçültülerek ya da peptid yerine daha uzun polipeptid bloğu kullanıp çoklu ilaç bağlayarak taşıyıcı sistemin uygun boyuta gelmesi sağlanabilir. Ayrıca çoklu ilaç direncini yenmek için peptid dizinine artı yüklü arjinin veya lizin eklenerek P-gp/MDR1 ve MRP1 genlerini bastırabilen siRNA moleküllerinin elektrostatik çekme kuvvetleriyle taşıyıcı sisteme eklenmesi sağlanabilir. Çalışmanın bu yönünde çoklu ilaç direnci taşıyan hücrelerin kullanılması gerekmektedir. Dirençli hücreler kullanıldığı takdirde taşıyıcı sistemin hızlı ilaç salma özellikleriyle sitotoksitesisi arasında bir korelasyon elde edilebilir. Bu projede yürütücünün memeli hücre hattıyla fazla tecrübesi olmaması ve taşıyıcı sistemlerin sentezinin zaman alınması sebebiyle in vitro hücre testleri sadece MTT sitotoksitate testiyle sınırlı kalmıştır. Müteakiben yapılan çalışmalarda MTT'ye ilaveten LDH sitotoksitate testi yapılabilir. Uygun boya seçilerek konfokal mikroskopu altında taşıyıcı sistemlerin biriktiği organeller görüntülenip akış sitometresi kullanılarak hücre ölümü nedeni belirlenebilir. Bunlara ilaveten, in vitro testlerde başarılı görülen taşıyıcı sistemlerin in vivo farmakokinetik ve metabolizma çalışmalarıyla literatüre çok önemli katkılarda bulunulabilir. Yürütücü bu çalışmaları gerçekleştirmek için ilgili araştırma gruplarıyla işbirlikleri başlatacaktır.

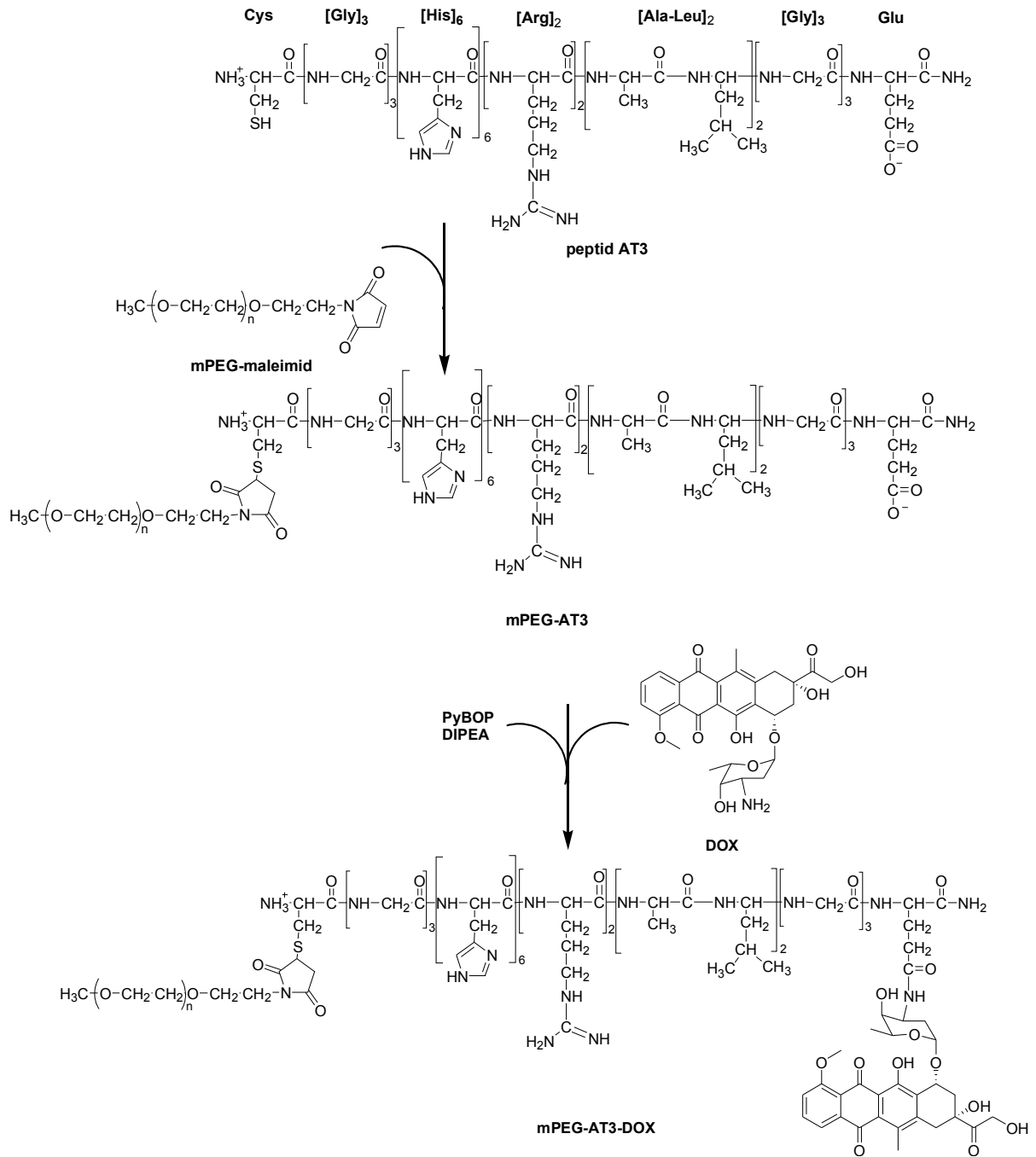
6. EKLER



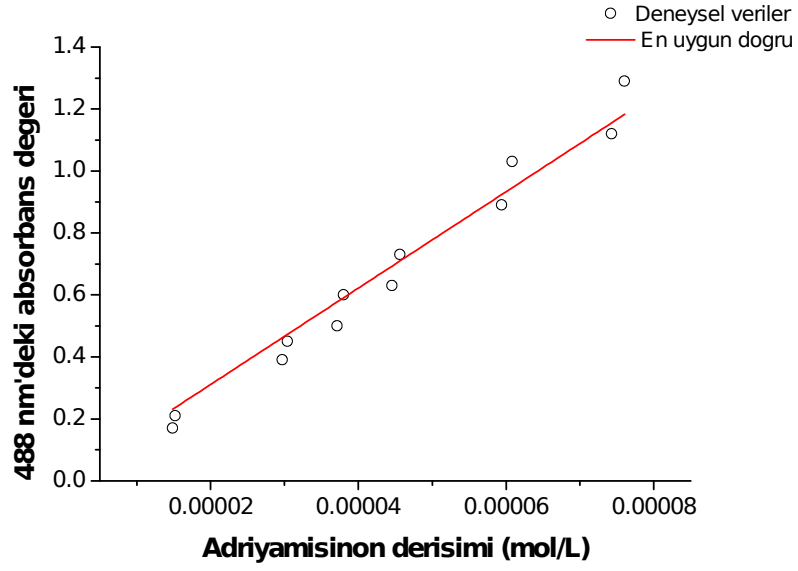
Şekil A1. mPEG-HYD2-DOX hazırlama reaksiyonları



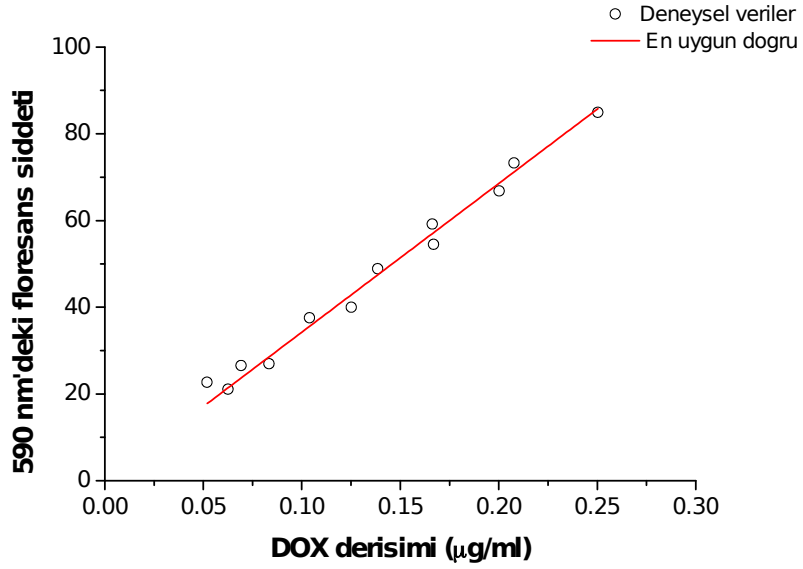
Şekil A3. mPEG-AT1-DOX hazırlama reaksiyonları



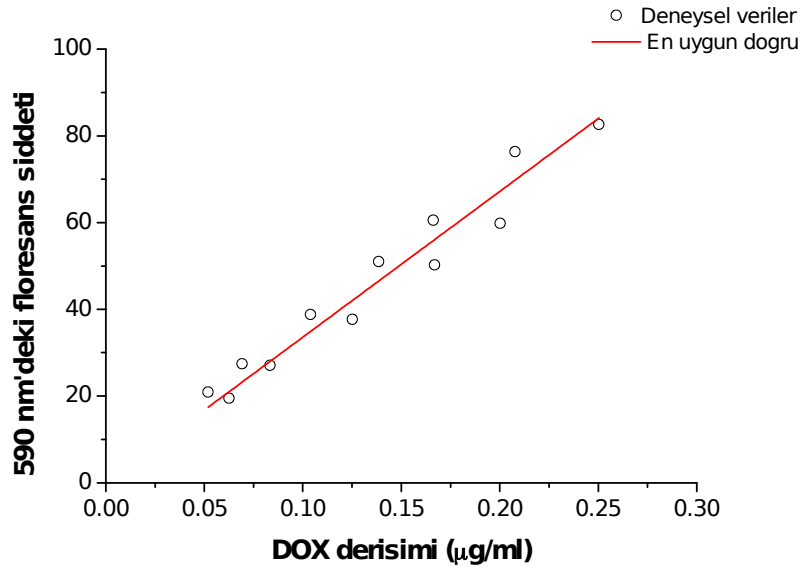
Şekil A4. mPEG-AT3-DOX hazırlama reaksiyonları



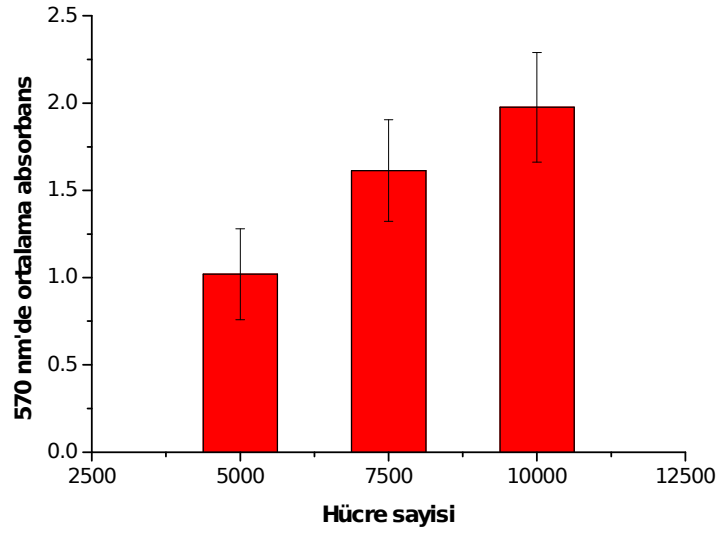
Şekil A5. Adriyaminonun 488 nm'de elde edilen kalibrasyon eğrisi



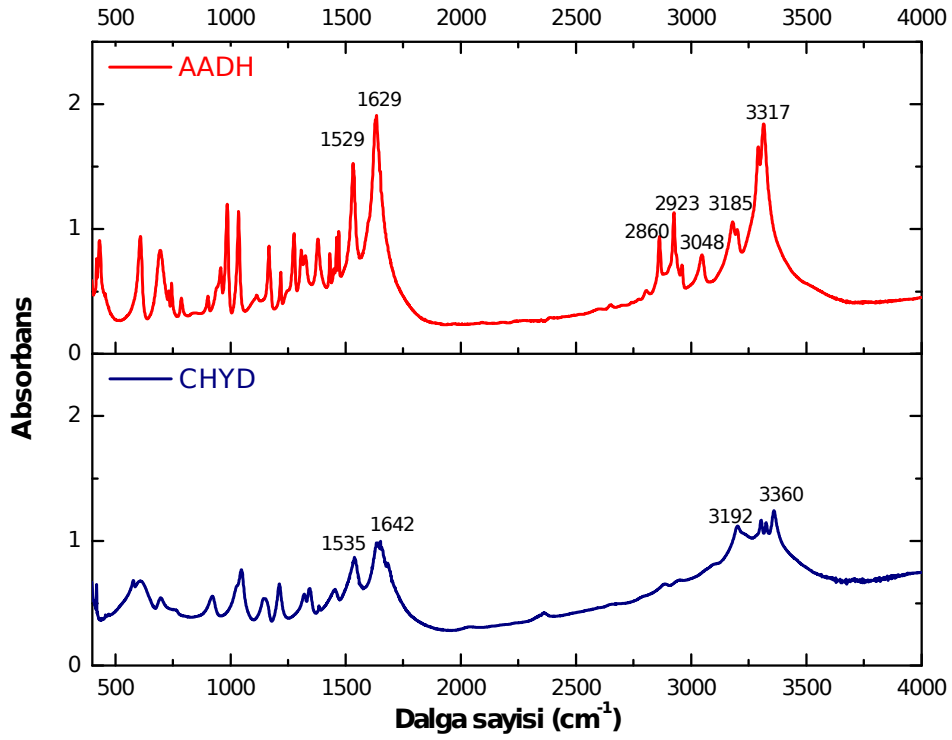
Şekil A6. DOX'un PBS içinde 590 nm'deki floresans şiddeti kullanılarak alınan kalibrasyon eğrisi (Cihaz: Perkin Elmer LS55)



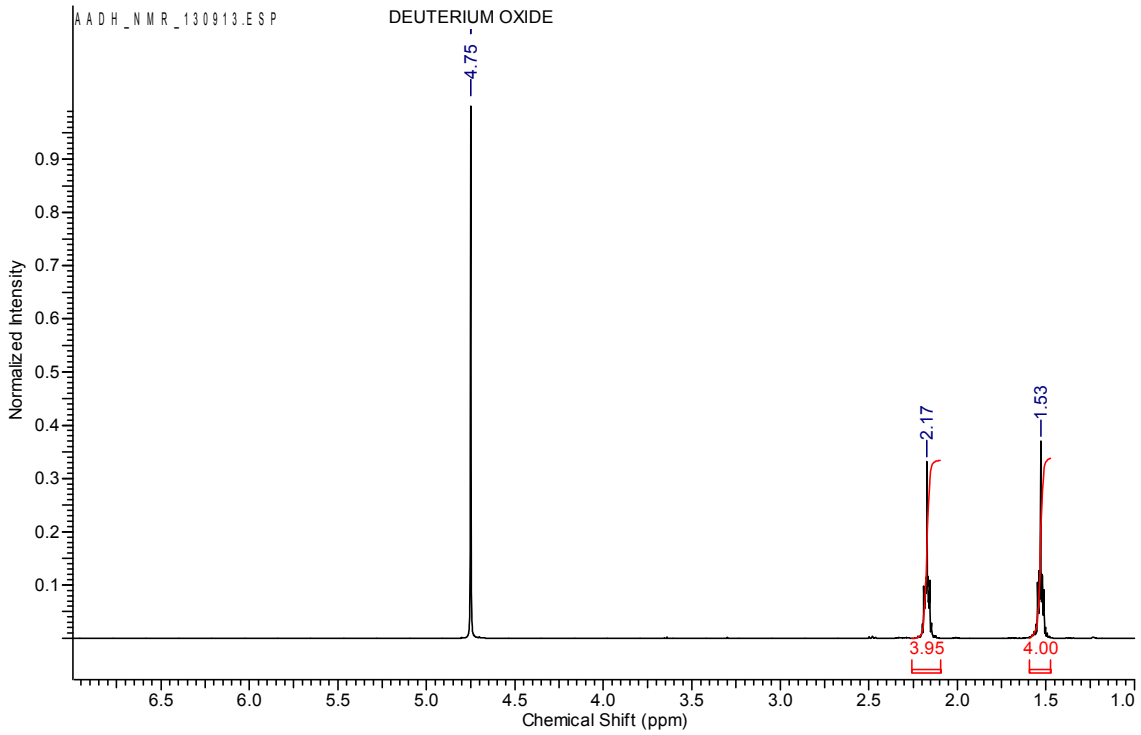
Şekil A7. DOX'un asetat tamponu içinde 590 nm'deki floresans şiddeti kullanılarak alınan kalibrasyon eğrisi (Cihaz: Perkin Elmer LS55)



Şekil A8. MTT testi için A549 hücre sayısı optimizasyonu

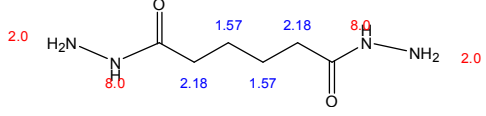
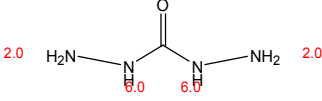
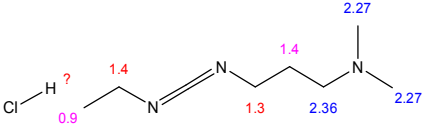
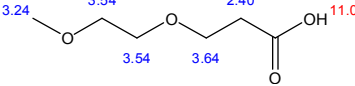
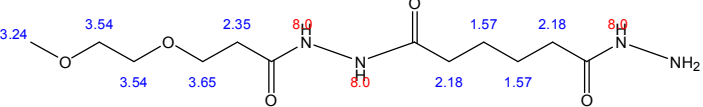
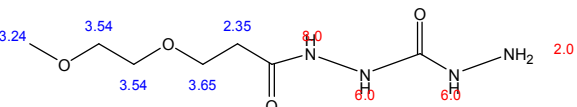


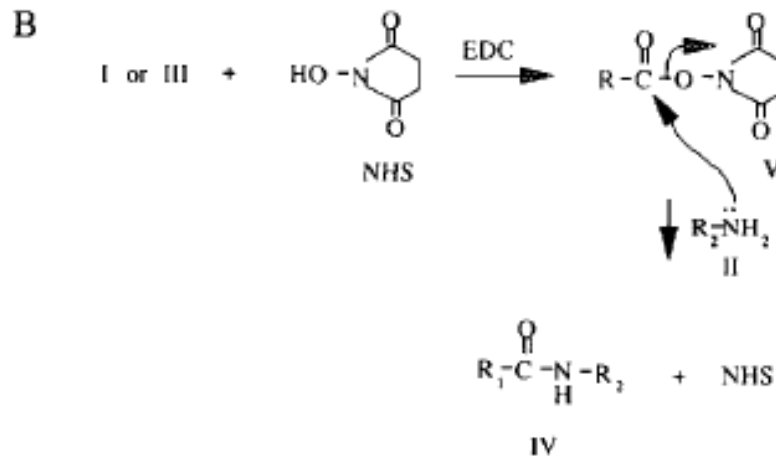
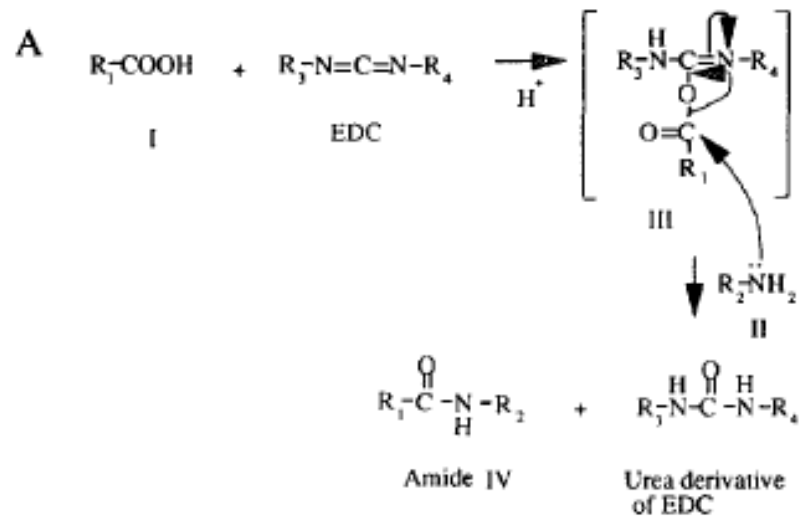
Şekil A9. Adipik asit dihidrazit ve karbohidrazit örneklerinin FTIR spektrumları



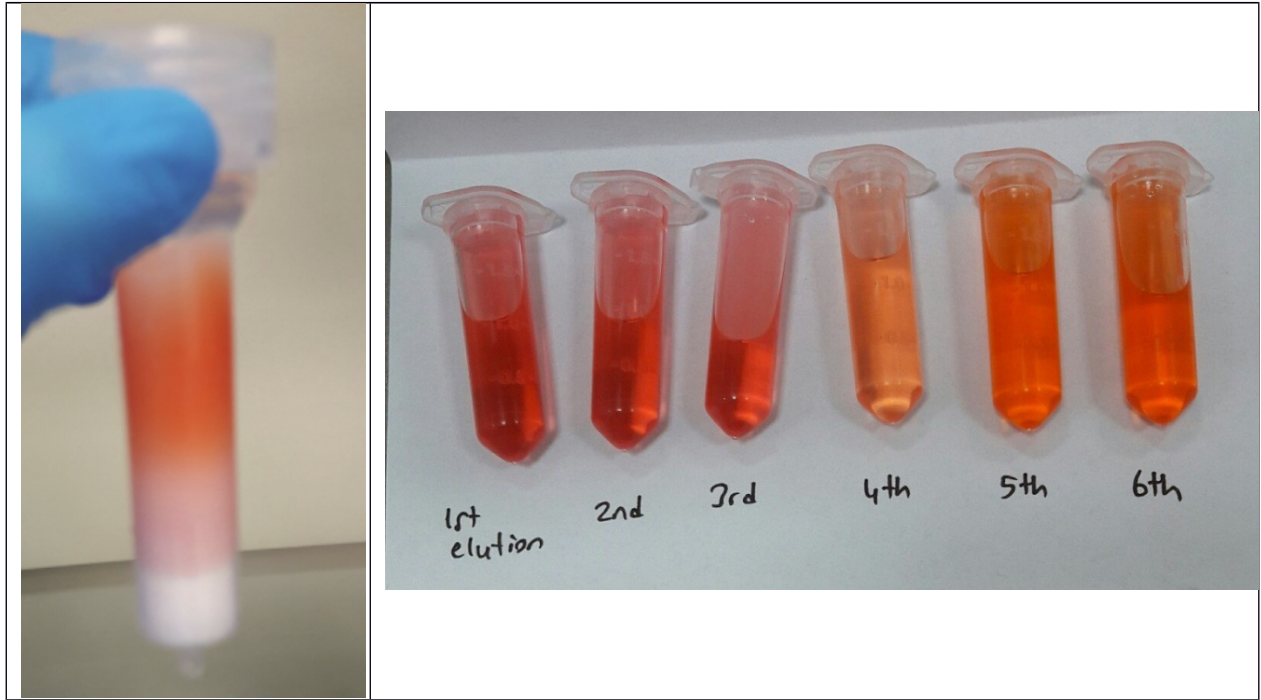
Şekil A10. AADH örneğinin D₂O içerisinde alınan 1H NMR spektrumu

Tablo A1. Teorik 1H NMR kimyasal kayma değerleri

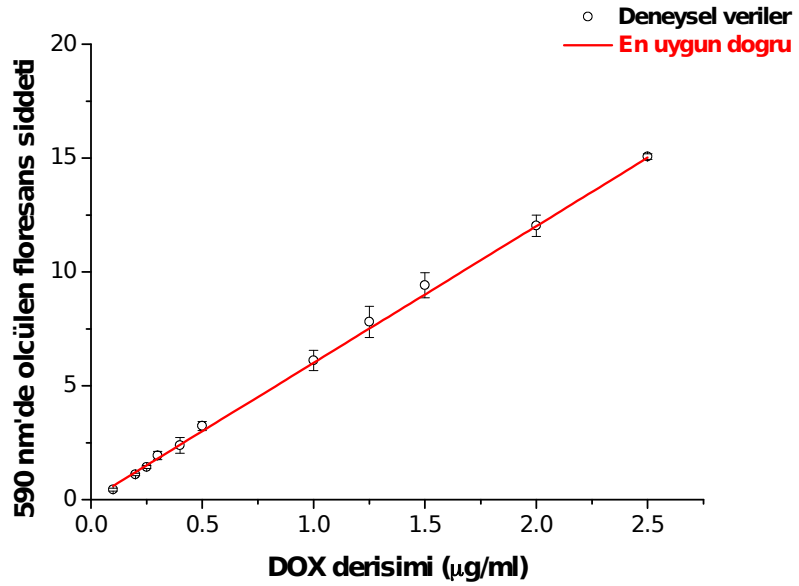
Kısaltma	Molekölün adı	Kimyasal yapı and teorik 1H NMR kimyasal kaymalar
AADH	Adipik asit dihidrazid	
CHYD	Karbohidrazid	
EDC	N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-ethylkarbodiimid hidroklorit	
mPEG-COOH	Metoksi polietilen glükol propiyonik asit	
mPEG-HYD1	Metoksi polietilen glükol adipik asit hidrazid	
mPEG-HYD2	Metoksi polietilen glükol karbohidrazid	



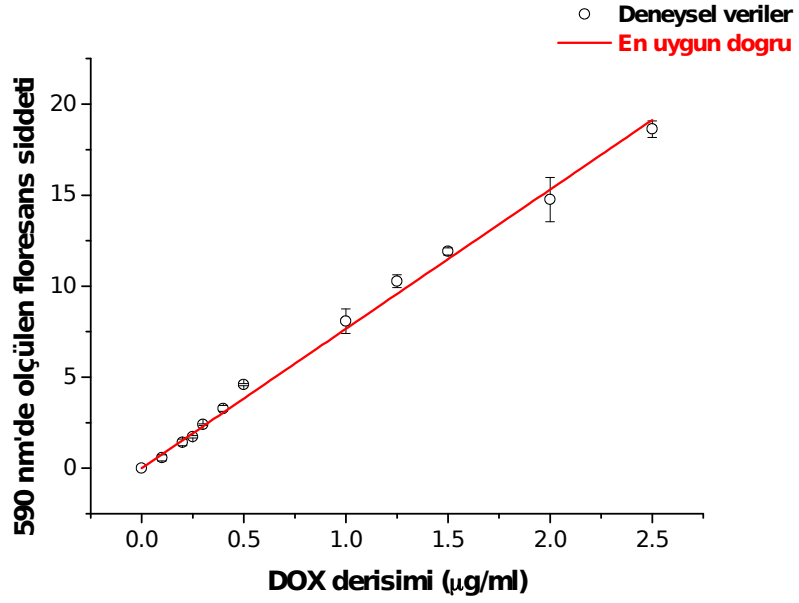
Şekil A11. EDC ve NHS kullanılarak gerçekleştirilen amid oluşum reaksiyonları (Sehgal ve Vijay 1994)



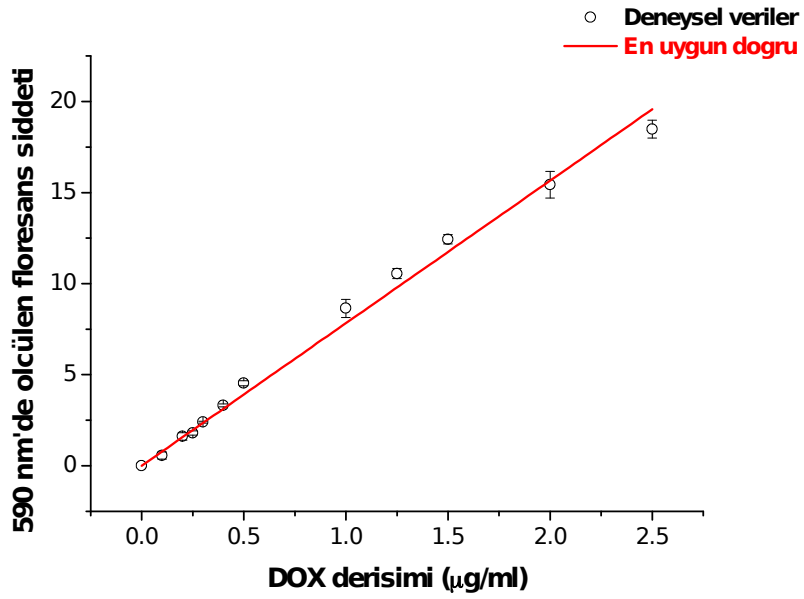
Şekil A12. 10 ml kolon hacminde Sephadex LH-20 reçinesi içeren kolondan elde edilen fraksiyonlar



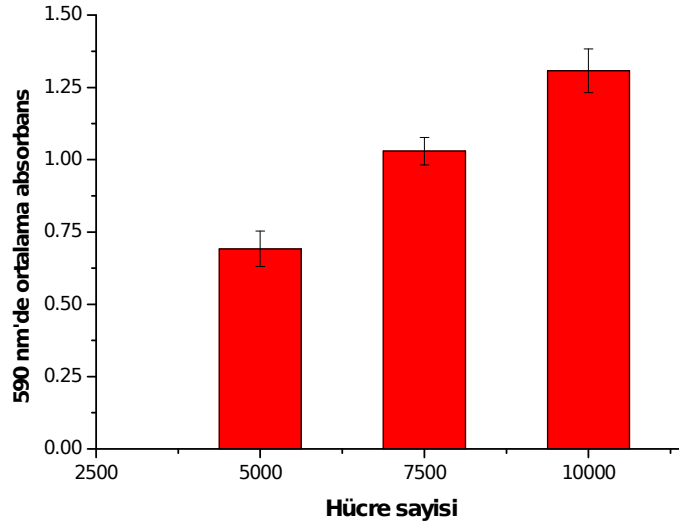
Şekil A13. DOX'un PBS içinde 590 nm'deki floresans şiddeti kullanılarak alınan kalibrasyon eğrisi (Cihaz: VarioSkan)



Şekil A14. DOX'un pH 5.0 asetat tamponu içinde 590 nm'deki floresans şiddeti kullanılarak alınan kalibrasyon eğrisi (Cihaz: VarioSkan)



Şekil A15. DOX'un 150 mM NaCl 1 mM EDTA ve 5mM L-sistein içeren pH 5.0 asetat tamponu içinde 590 nm'deki floresans şiddeti kullanılarak alınan kalibrasyon eğrisi (Cihaz: VarioSkan)



Şekil A16. MTT testi için PC3 hücre sayısı optimizasyonu

Tablo A2. Serbest DOX ve DOX'un asidik ortamda bozunur bağla konjuge edildiği taşıyıcı sistemlerin mutlak IC₅₀ değerlerinin ikili istatistiksel karşılaştırılması

Örnek çifti	p-değeri
DOX ve mPEG-HYD1-DOX	0.006
DOX ve mPEG-HYD2-DOX	0.009
DOX ve mPEG-AT1-DOX	0
mPEG-HYD1-DOX ve mPEG-HYD2-DOX	0.161
mPEG-HYD1-DOX-mPEG-AT1-DOX	0.012
mPEG-HYD2-DOX-mPEG-AT1-DOX	0.014

Tablo A3. Serbest DOX ve DOX'un kararlı amid bağıyla konjuge edildiği taşıyıcı sistemlerin mutlak IC₅₀ değerlerinin ikili istatistiksel karşılaştırılması

Örnek çifti	p-değeri			
	A549		PC3	
	24 saat	48 saat	24 saat	48 saat
DOX ve mPEG-DOX	0.023	0.025	0.002	NA*
DOX ve mPEG-AT3-DOX	0.453	0.023	0.747	NA*
mPEG-DOX ve mPEG-AT3-DOX	0.014	0.242	0.003	0

NA* belirlenememiştir

7. KAYNAKÇA

Abou-Jawde, R., Choueiri, T., Alemany, C., Mekhail, T. 2003. "An overview of targeted treatments in cancer", *Clinical therapeutics*, 25, 2121-2137.

Alberts, B. (2002). *Molecular Biology of the Cell* New York, Garland Science.

Bae, Y., Fukushima, S., Harada, A., Kataoka, K. 2003. "Design of environment-sensitive supramolecular assemblies for intracellular drug delivery: Polymeric micelles that are responsive to intracellular pH change", *Angewandte Chemie*, 115, 4788-4791.

Bae, Y., Jang, W.-D., Nishiyama, N., Fukushima, S., Kataoka, K. 2005a. "Multifunctional polymeric micelles with folate-mediated cancer cell targeting and pH-triggered drug releasing properties for active intracellular drug delivery", *Molecular BioSystems*, 1, 242-250.

Bae, Y., Nishiyama, N., Fukushima, S., Koyama, H., Yasuhiro, M., Kataoka, K. 2005b. "Preparation and biological characterization of polymeric micelle drug carriers with intracellular pH-triggered drug release property: tumor permeability, controlled subcellular drug distribution, and enhanced in vivo antitumor efficacy", *Bioconjugate Chemistry*, 16, 122-130.

Bae, Y., Nishiyama, N., Kataoka, K. 2007. "In vivo antitumor activity of the folate-conjugated pH-sensitive polymeric micelle selectively releasing adriamycin in the intracellular acidic compartments", *Bioconjugate Chemistry*, 18, 1131-1139.

Brannon-Peppas, L., Blanchette, J. O. 2004. "Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56, 1649-1659.

Brown, J. M., Giaccia, A. J. 1998. "The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy", *Cancer research*, 58, 1408-1416.

Chari, R. V. 1998. "Targeted delivery of chemotherapeutics: tumor-activated prodrug therapy", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 31, 89-104.

Chytil, P., Etrych, T., Koňák, Č., Šírová, M., Mrkvan, T., Bouček, J., Říhová, B., Ulbrich, K. 2008. "New HPMA copolymer-based drug carriers with covalently bound hydrophobic substituents for solid tumour targeting", *Journal of Controlled Release*, 127, 121-130.

Conde, J., Dias, J. T., Grazú, V., Moros, M., Baptista, P. V., de la Fuente, J. M. 2014. "Revisiting 30 years of biofunctionalization and surface chemistry of inorganic nanoparticles for nanomedicine", *Frontiers in chemistry*, 2, 48.

Configliacchi, E., Razzano, G., Rizzo, V., Vigevani, A. 1996. "HPLC methods for the determination of bound and free doxorubicin, and of bound and free galactosamine, in methacrylamide polymer-drug conjugates", *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 15, 123-129.

Coste, J., Campagne, J.-M. 1995. "A propos de l'estérification des acides carboxyliques par le BOP ou le PyBOP", *Tetrahedron letters*, 36, 4253-4256.

Cuong, N.-V., Jiang, J.-L., Li, Y.-L., Chen, J.-R., Jwo, S.-C., Hsieh, M.-F. 2011. "Doxorubicin-Loaded PEG-PCL-PEG Micelle Using Xenograft Model of Nude Mice: Effect of Multiple Administration of Micelle on the Suppression of Human Breast Cancer", *Cancers*, 3, 61.

Devalapally, H., Shenoy, D., Little, S., Langer, R., Amiji, M. 2007. "Poly (ethylene oxide)-modified poly (beta-amino ester) nanoparticles as a pH-sensitive system for tumor-targeted delivery of

hydrophobic drugs: part 3. Therapeutic efficacy and safety studies in ovarian cancer xenograft model", *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 59, 477-484.

Eichhorn, M., Kleespies, A., Angele, M., Jauch, K.-W., Bruns, C. 2007. "Angiogenesis in cancer: molecular mechanisms, clinical impact", *Langenbeck's Archives of Surgery*, 392, 371-379.

Eichhorn, M. E., Strieth, S., Dellian, M. 2004. "Anti-vascular tumor therapy: recent advances, pitfalls and clinical perspectives", *Drug resistance updates*, 7, 125-138.

Etrych, T., Chytil, P., Jelínková, M., Říhová, B., Ulbrich, K. 2002. "Synthesis of HPMA copolymers containing doxorubicin bound via a hydrazone linkage. Effect of spacer on drug release and in vitro cytotoxicity", *Macromolecular Bioscience*, 2, 43-52.

Etrych, T., Jelínková, M., Říhová, B., Ulbrich, K. 2001. "New HPMA copolymers containing doxorubicin bound via pH-sensitive linkage: synthesis and preliminary in vitro and in vivo biological properties", *Journal of Controlled Release*, 73, 89-102.

Fang, J., Nakamura, H., Iyer, A. 2007. "Tumor-targeted induction of oxystress for cancer therapy", *Journal of Drug Targeting*, 15, 475-486.

Fee, C. J., Van Alstine, J. M. 2006. "PEG-proteins: reaction engineering and separation issues", *Chemical Engineering Science*, 61, 924-939.

Feng, S.-S., Chien, S. 2003. "Chemotherapeutic engineering: application and further development of chemical engineering principles for chemotherapy of cancer and other diseases", *Chemical Engineering Science*, 58, 4087-4114.

Fukumori, Y., Ichikawa, H. 2006. "Nanoparticles for cancer therapy and diagnosis", *Advanced Powder Technology*, 17, 1-28.

Gillies, E. R., Fréchet, J. M. 2005. "pH-responsive copolymer assemblies for controlled release of doxorubicin", *Bioconjugate Chemistry*, 16, 361-368.

Gong, X. W., Wei, D. Z., He, M. L., Xiong, Y. C. 2007. "Discarded free PEG-based assay for obtaining the modification extent of pegylated proteins", *Talanta*, 71, 381-384.

González, I. D., Saez, R. S., Rodilla, E. M., Yges, E., Toledano, F. 2000. "Hypersensitivity reactions to chemotherapy drugs", *Alergologia e Inmunologia Clinica*, 15, 161-181.

Harris, J. M., Chess, R. B. 2003. "Effect of pegylation on pharmaceuticals", *Nature Reviews Drug Discovery*, 2, 214-221.

Heffernan, M. J., Murthy, N. 2005. "Polyketal nanoparticles: a new pH-sensitive biodegradable drug delivery vehicle", *Bioconjugate Chemistry*, 16, 1340-1342.

Hermanson, G. T. (1996). Bioconjugate Techniques. San Diego, Academic Press

Hoare, D. t., Koshland, D. 1967. "A method for the quantitative modification and estimation of carboxylic acid groups in proteins", *Journal of Biological Chemistry*, 242, 2447-2453.

Hu, X., Liu, S., Huang, Y., Chen, X.,Jing, X. 2010. "Biodegradable block copolymer-doxorubicin conjugates via different linkages: preparation, characterization, and in vitro evaluation", *Biomacromolecules*, 11, 2094-2102.

Isayeva, T., Kumar, S.,Ponnazhagan, S. 2004. "Anti-angiogenic gene therapy for cancer (Review)", *International journal of oncology*, 25, 335-344.

Jang, S. H., Wientjes, M. G., Lu, D.,Au, J. L.-S. 2003. "Drug delivery and transport to solid tumors", *Pharmaceutical Research*, 20, 1337-1350.

Kale, A. A.,Torchilin, V. P. 2007. "Design, synthesis, and characterization of pH-sensitive PEG-PE conjugates for stimuli-sensitive pharmaceutical nanocarriers: the effect of substitutes at the hydrazone linkage on the ph stability of PEG-PE conjugates", *Bioconjugate Chemistry*, 18, 363-370.

Kerbel, R. S. 2000. "Tumor angiogenesis: past, present and the near future", *Carcinogenesis*, 21, 505-515.

Kim, M. S.,Lee, D. S. 2010. "In vitro degradability and stability of hydrophobically modified pH-sensitive micelles using MPEG-grafted poly (β -amino ester) for efficient encapsulation of paclitaxel", *Journal of Applied Polymer Science*, 118, 3431-3438.

Koo, H., Kang, H.,Lee, Y. 2009. "Analysis of the relationship between the molecular weight and transfection efficiency/cytotoxicity of Poly-L-arginine on a mammalian cell line", *Bull Korean Chem Soc*, 30, 927.

Kourie, J.,Shorthouse, A. 2000. "Properties of cytotoxic peptide-formed ion channels", *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 278, C1063-C1087.

Lee, E. S., Na, K.,Bae, Y. H. 2005. "Doxorubicin loaded pH-sensitive polymeric micelles for reversal of resistant MCF-7 tumor", *Journal of Controlled Release*, 103, 405-418.

Lee, E. S., Oh, K. T., Kim, D., Youn, Y. S.,Bae, Y. H. 2007. "Tumor pH-responsive flower-like micelles of poly (L-lactic acid)-b-poly (ethylene glycol)-b-poly (L-histidine)", *Journal of Controlled Release*, 123, 19-26.

Lee, E. S., Shin, H. J., Na, K.,Bae, Y. H. 2003. "Poly (L-histidine)-PEG block copolymer micelles and pH-induced destabilization", *Journal of Controlled Release*, 90, 363-374.

Liaw, J., Aoyagi, T., Kataoka, K., Sakurai, Y.,Okano, T. 1998. "Visualization of PEO-PBLA-pyrene polymeric micelles by atomic force microscopy", *Pharmaceutical Research*, 15, 1721-1726.

Liu, Y., Miyoshi, H.,Nakamura, M. 2007. "Nanomedicine for drug delivery and imaging: a promising avenue for cancer therapy and diagnosis using targeted functional nanoparticles", *International Journal of Cancer*, 120, 2527-2537.

Lu, Y. A., Felix, A. M. 1994. "Pegylated peptides III. Solid-phase synthesis with pegylating reagents of varying molecular weight: synthesis of multiply pegylated peptides", *Reactive Polymers*, 22, 221-229.

- Lund, R., Willner, L., Richter, D. (2013). Kinetics of Block Copolymer Micelles Studied by Small-Angle Scattering Methods. Controlled Polymerization and Polymeric Structures, Springer: 51-158.
- Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y., Hori, K. 2000. "Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review", *Journal of Controlled Release*, 65, 271-284.
- Noguchi, Y., Wu, J., Duncan, R., Strohal, J., Ulbrich, K., Akaike, T., Maeda, H. 1998. "Early phase tumor accumulation of macromolecules: a great difference in clearance rate between tumor and normal tissues", *Japanese Journal of Cancer Research*, 89, 307-314.
- Nomura, T., Katunuma, N. 2005. "Involvement of cathepsins in the invasion, metastasis and proliferation of cancer cells", *The journal of medical investigation*, 52, 1-9.
- Oh, K. T., Oh, Y. T., Oh, N.-M., Kim, K., Lee, D. H., Lee, E. S. 2009. "A smart flower-like polymeric micelle for pH-triggered anticancer drug release", *International Journal of Pharmaceutics*, 375, 163-169.
- Ottevanger, P., De Mulder, P. 2005. "The quality of chemotherapy and its quality assurance", *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*, 31, 656-666.
- Schmid, B., Chung, D.-E., Warnecke, A., Fichtner, I., Kratz, F. 2007. "Albumin-binding prodrugs of camptothecin and doxorubicin with an Ala-Leu-Ala-Leu-linker that are cleaved by cathepsin B: synthesis and antitumor efficacy", *Bioconjugate Chemistry*, 18, 702-716.
- Sehgal, D., Vijay, I. K. 1994. "A method for the high efficiency of water-soluble carbodiimide-mediated amidation", *Analytical biochemistry*, 218, 87-91.
- Shen, Y., Tang, H., Zhan, Y., Van Kirk, E. A., Murdoch, W. J. 2009. "Degradable poly (β -amino ester) nanoparticles for cancer cytoplasmic drug delivery", *Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine*, 5, 192-201.
- Shenoy, D., Little, S., Langer, R., Amiji, M. 2005. "Poly (ethylene oxide)-modified poly (β -amino ester) nanoparticles as a pH-sensitive system for tumor-targeted delivery of hydrophobic drugs. 1. In vitro evaluations", *Molecular Pharmaceutics*, 2, 357-366.
- Shimizu, K., Oku, N. 2004. "Cancer anti-angiogenic therapy", *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27, 599-605.
- Simon, S. M. 1999. "Role of organelle pH in tumor cell biology and drug resistance", *Drug discovery today*, 4, 32-38.
- Stetler-Stevenson, W. G., Liotta, L. A., Kleiner, D. 1993. "Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis", *The FASEB Journal*, 7, 1434-1441.
- Sunderland, C. J., Steiert, M., Talmadge, J. E., Derfus, A. M., Barry, S. E. 2006. "Targeted nanoparticles for detecting and treating cancer", *Drug Development Research*, 67, 70-93.

Top, A., Kiick, K. L. 2010. "Multivalent protein polymers with controlled chemical and physical properties", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62, 1530-1540.

Vermund, H., Gollin, F. 1968. "Mechanisms of action of radiotherapy and chemotherapeutic adjuvants: a review", *Cancer*, 21, 58-76.

Veronese, F. M., Pasut, G. 2005. "PEGylation, successful approach to drug delivery", *Drug discovery today*, 10, 1451-1458.

Veronese, F. M., Schiavon, O., Pasut, G., Mendichi, R., Andersson, L., Tsirk, A., Ford, J., Wu, G., Kneller, S., Davies, J. 2005. "PEG-doxorubicin conjugates: influence of polymer structure on drug release, in vitro cytotoxicity, biodistribution, and antitumor activity", *Bioconjugate Chemistry*, 16, 775-784.

Wang, Y., Kiick, K. L. 2005. "Monodisperse protein-based glycopolymers via a combined biosynthetic and chemical approach", *Journal of the American Chemical Society*, 127, 16392-16393.

Verweij, J., De Jonge, M. 2000. "Achievements and future of chemotherapy", *European Journal of Cancer*, 36, 1479-1487.

Wong, H. L., Bendayan, R., Rauth, A. M., Li, Y., Wu, X. Y. 2007. "Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 491-504.

Wu, J., Akaike, T., Hayashida, K., Okamoto, T., Okuyama, A., Maeda, H. 2001. "Enhanced vascular permeability in solid tumor involving peroxynitrite and matrix metalloproteinases", *Japanese Journal of Cancer Research*, 92, 439-451.

Xu, P., Van Kirk, E. A., Murdoch, W. J., Zhan, Y., Isaak, D. D., Radosz, M., Shen, Y. 2006. "Anticancer efficacies of cisplatin-releasing pH-responsive nanoparticles", *Biomacromolecules*, 7, 829-835.

Yano, M., Hirai, K., Naito, Z., Yokoyama, M., Ishiwata, T., Shiraki, Y., Inokuchi, M., Asano, G. 2001. "Expression of cathepsin B and cystatin C in human breast cancer", *Surgery today*, 31, 385-389.

Yoo, H. S., Lee, E. A., Park, T. G. 2002. "Doxorubicin-conjugated biodegradable polymeric micelles having acid-cleavable linkages", *Journal of Controlled Release*, 82, 17-27.

Yuan, F., Dellian, M., Fukumura, D., Leunig, M., Berk, D. A., Torchilin, V. P., Jain, R. K. 1995. "Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size", *Cancer research*, 55, 3752-3756.

Zhou, L., Cheng, R., Tao, H., Ma, S., Guo, W., Meng, F., Liu, H., Liu, Z., Zhong, Z. 2011. "Endosomal pH-activatable poly (ethylene oxide)-graft-doxorubicin prodrugs: synthesis, drug release, and biodistribution in tumor-bearing mice", *Biomacromolecules*, 12, 1460-1467.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Yrd. Doç. Dr. AYBEN TOP
Proje No:	112S554
Proje Başlığı:	Ph Cevaplayabilen Peg-Peptid Konjugatı Bazlı Antikanser İlaç Taşıyıcı Sistemleri Geliştirilmesi
Proje Türü:	3501 - Kariyer
Proje Süresi:	36
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	ESMA VOLGA BULMUŞ ZAREİE, YUSUF BARAN, HATİCE YEŞİM KARASULU
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	İZMİR YÜKSEK TEKNOLOJİ ENS. MÜHENDİSLİK F. KİMYA MÜHENDİSLİĞİ B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	15/04/2013 - 15/10/2016
Onaylanan Bütçe:	287750.0
Harcanan Bütçe:	251768.28
Öz:	<p>Bu projede kanser hücrelerinin çoklu ilaç direncine çözümüne yönelik hızlı ilaç salım kabiliyetine sahip ilaç taşıyıcı sistemlerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Taşıyıcı sistemler PEG veya PEG-peptid moleküllerine model antikanser ilaç olarak kullanılan doksorubisin kimyasal bağla konjugasyonu ile hazırlanmıştır. PEG, taşıyıcı sistemlerde ilacın kanda dolaşım süresini arttırmak için kullanılmıştır. Peptid dizinine pH cevaplama özelliği olan histidinler ve/veya enzimatik bozunur RRALAL dizini eklenmiştir. Birinci grup taşıyıcı sistemlerinde kullanılan peptid (AT1) sadece pH cevaplama özelliği taşımaktadır ve DOX taşıyıcı sisteme asidik ortamda bozunur hidrazon bağıyla konjuge edilmiştir. DOX'un taşıyıcı sisteme kararlı amid bağıyla bağlandığı ikinci grup sistemlerde kullanılan peptid AT3, hem pH cevaplayan gruplar hem de lizozomal enzimlerde bozunur dizin içermektedir. Ayrıca kontrol sistemler olarak peptid içermeyen DOX konjuge edilmiş PEG bazlı taşıyıcı sistemler de sentezlenmiştir. Çalışmada kullanılan peptidler katı faz peptid sentezi yöntemiyle sentezlenmiş, Michael ekleme reaksiyonuyla mEG-maleimide konjuge edilmiştir. DOX taşıyıcı sistemde bulunan COOH gruplarına amid veya hidrazon bağıyla bağlanmıştır. UV spektroskopisi kullanılarak asidik ortamda bozunur bağ içeren mPEG-AT1-DOX taşıyıcı sisteminde DOX konjugasyonu %35, buna karşın DOX'un kararlı amid bağı ile konjuge edildiği mPEG-AT3-DOX sisteminde konjuge edilmemiş DOX'un ayrılabilmesi dolayısıyla DOX:COOH oranı % 187 olarak elde edilmiştir. Işık saçılma yöntemi kullanılarak pH 7.4'te mPEG-AT1-DOX'un boyutu yaklaşık 12 +- 2 nm, mPEG-AT3-DOX'un boyutu ise 15 ve 30 nm'de ikili dağılım olarak ölçülmüştür. mPEG-AT1-DOX için nötral pH'ta % 14.5 +- 2.5 elde edilen % DOX salımı pH 5'te % 30 +- 7'ye yükselmiştir. Nötral pH'da % 10'un altında gözlenen mPEG-AT3-DOX'un ilaç salımı pH 5 ve katapsin B varlığında % 17 +- 2 olarak elde edilmiştir. A549 hücre hattı kullanılarak yapılan sitotoksitesite testi sonucu serbest DOX, mPEG-AT1-DOX ve mPEG-AT3-DOX'un mutlak IC50 değerleri sırasıyla 1.37 +- 0.05, 5.55 +- 0.75 ve 1.33 +- 0.11 ug eşdeğer DOX/ml olarak bulunmuştur</p>
Anahtar Kelimeler:	ilaç taşıyıcı sistemleri, doksorubisin, PEG, peptid
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır