

T.C. HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KANSER TEDAVİSİNDE SOLİD TÜMÖRLERE LENFATİK HEDEFLENDİRME
AMACIYLA LYP-1 PEPTİDİNİ İÇEREN İLAÇ TAŞIYICI NANOSİSTEMLERİN
TASARIMI VE *İN VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ecz. Özge ÇEVİK

Farmasötik Teknoloji Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA

2012

T.C. HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KANSER TEDAVİSİNDE SOLİD TÜMÖRLERE LENFATİK HEDEFLENDİRME
AMACIYLA LYP-1 PEPTİDİNİ İÇEREN İLAÇ TAŞIYICI NANOSİSTEMLERİN
TASARIMI VE *İN VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ecz. Özge ÇEVİK

Farmasötik Teknoloji Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı:

Doç. Dr. R. Neslihan GÜRSOY

ANKARA

2012

Anabilim Dalı: Farmasötik Teknoloji

Program: Farmasötik Teknoloji

Tez Başlığı: Kanser Tedavisinde Solid Tümörlere Lenfatik Hedeflendirme

Amacıyla LyP-1 Peptidini İçeren İlaç Taşıyıcı Nanosistemlerin

Tasarımı ve *In Vitro* Değerlendirilmesi

Öğrenci Adı-Soyadı: Özge Çevik

Savunma Sınavı Tarihi: 05.01.2012

Bu çalışma jürimiz tarafından yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. Nurşen ÜNLÜ



Hacettepe Üniversitesi

Tez danışmanı:

Doç. Dr. R. Neslihan GÜRSOY



Hacettepe Üniversitesi

Üye:

Prof. Dr. Süeda HEKİMOĞLU



Hacettepe Üniversitesi

Üye:

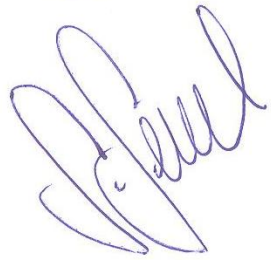
Prof. Dr. Sevim DALKARA



Hacettepe Üniversitesi

Üye:

Prof. Dr. Sevdâ ŞENEL



Hacettepe Üniversitesi

ONAY

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

Prof. Dr. S. Hakan Örer

Müdür (v.)

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca, her türlü yardım ve desteğini benden esirgemeyen, bana yol gösteren, yalnızca bilimsel açıdan değil tüm hayatım boyunca bana yardımcı olacak engin bilgi birikimi ve deneyimlerini benimle paylaşan danışman hocam Sayın Doç. Dr. R. Neslihan Gürsoy'a sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Hücre kültürü çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım sevgili hocam Sayın Doç. Dr. İmran Vural'a ve Ecz. (B.U.) Can Sarısözen'e yardımları için çok teşekkür ederim.

TÜBİTAK-GRİD bünyesinde gerçekleştirilen moleküler modelleme çalışmalarının yürütülmesindeki yardımlarından ötürü Dr. Cenk Andaç'a teşekkür ederim.

Hücre kültürü deneylerime olan katkılarından dolayı Doç. Dr. Güneş Esendağlı ve H.Ü. Tıp Fakültesi Temel Onkoloji A.D.'na teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım süresince daima yanımda olan, sevgi ve anlayışlarıyla bana destek olan dostlarım; Ecz. (B.U.) Tuğba Gülsün İnal, Ecz. (B.U.) Gülnur Kübra Özser, Ecz. (B.U.) Esra Bayraktar, Kim. (B.U.) Selva Burçin Hizmetli başta olmak üzere, Kim. Müh. (B.U.) Feride Hande Kural, Bio. (B.U.) Raif Eren Ayata, Bio. (B.U.) Gözde Aygöl, Ecz. Merve Cansız, Ecz. Elif Sarıgöl, Ecz. Hasan Demir ve Ecz. Selin Seda Doğan'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez sürem boyunca benden destek ve yardımlarını esirgemeyen H.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji A.D.'nın değerli hocaları ve çalışanlarına teşekkür ederim.

Son olarak; sevgi ve desteklerini hep arkamda hissettiğim, varlıkları ile bana güç veren sevgili annem, babam ve kardeşime gösterdikleri anlayış ve fedakarlıkları için sonsuz minnet ve sevgilerimi sunarım.

Bu tez, Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu 1001 projesi (Proje No: 109S341) kapsamında, TÜBİTAK tarafından ve hızlı destek projesi kapsamında HÜBAB tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

Özge, Ç. Kanser tedavisinde solid tümörlere lenfatik hedeflendirme amacıyla LyP-1 peptidini içeren ilaç taşıyıcı nanosistemlerin tasarımı ve *in vitro* değerlendirilmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Teknoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, ANKARA, 2011. Kanser tedavisinde tedaviyi kısıtlayan en önemli faktörlerden biri kemoterapötik ajanların kanserli dokuya özgün olmamasıdır. Bu nedenle kanser hücrelerine özgün monoklonal antikörler kullanılarak hazırlanan nanopartiküler sistemler günümüzde kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Son yıllarda faj sunumu tekniği ile elde edilen çeşitli peptitler, küçük olmaları ve kolay üretilmeleri gibi sebeplerle monoklonal antikörlere alternatif olarak hedeflendirme amacı ile kullanılabilmektedirler. Bu çalışmada, meme kanseri ksenograftlarından elde edilen ve tümör lenfatik damarlarına özgü dokuz amino asitli bir peptit olan LyP-1 (CGNKRTRGC)'e ait lipid bazlı formülasyonlar hazırlanmış ve lenfatik hedeflendirme amaçlanmıştır. Peptit-protein yapılı bileşiklerin gastrointestinal kanaldan zayıf absorpsiyon göstermesi ve stabilite sorunları, oral formülasyonlarının geliştirilmesini sınırlayıcı etkenlerdir. Yağ bazlı ilaç taşıyıcı sistemler, bu tip ilaçları, gastrik enzimlerden korumak ve biyoyararlanımlarını artırmak için kullanılmaktadırlar. Bu nedenle kolay hazırlanmaları, etkin maddenin çözünürlüğünü, dayanıklılığını ve lenfatik emilimi artırmaları, son ürünün yumuşak jelatin kapsüller içerisinde uygulanma potansiyeli açısından üstünlük gösteren kendiliğinden emülsifiye olabilen ilaç taşıyıcı sistemler (SEDSS, Self-emulsifying drug delivery systems) seçilmiştir. Bu amaçla, üçgen faz diyagramları kullanılarak damlacık büyüklüğü 20 nm altında olan kendiliğinden mikroemülsifiye olabilen ilaç taşıyıcı sistemler (SMEDDS) formülasyonları elde edilmiş, uygun bulunan formülasyonlar fiziksel inceleme, damlacık büyüklüğü, zeta potansiyel ve pH ölçümü ve stabilite açısından incelenmiş, DSC çalışmaları yürütülmüştür. LyP-1 peptidine ait miktar tayini amacıyla yeni bir HPLC metodu geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Peptidin parçalanma profilinin belirlenmesi amacı ile 12 farklı pH'da stabilite çalışmaları yürütülmüş ve parçalanma hız sabitleri belirlenmiş, Arrhenius doğruları çizilmiştir. Peptidin ve peptide ait katı dispersiyonun seçilen pH'da formülasyon içinde stabilitesi incelenmiş ve katı dispersiyon ile peptidin stabilitesi artırılmıştır. Boş ve etkin madde içeren formülasyonların Caco-2 hücreleri kullanılarak sitotoksikite ve MDA-MB 231 hücreleri kullanılarak biyoaktivite çalışmaları yapılmıştır. Peptidin reseptörü ile etkileşiminin incelenmesi amacıyla moleküler modelleme çalışmaları yürütülmüş, olası ligant-reseptör etkileşimleri incelenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda LyP-1 peptidi içeren SMEDDS formülasyonlarının solid tümörlere lenfatik hedeflendirme amacıyla kullanılabilecek uygun sistemler olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: LyP-1 peptidi, solid tümör, kanser tedavisi, lenfatik hedeflendirme, SEDSS (kendiliğinden emülsifiye olabilen ilaç taşıyıcı sistemler), hücre kültürü

TÜBİTAK (Proje Numarası: 109S341) ve HÜBAP (Proje Numarası: 011D07301001) tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Özge, Ç. Design and *in vitro* evaluation of Lyp-1-containing drug carrying nanosystems for the lymphatic targeting of solid tumors in cancer therapy. Hacettepe University Institute of Health Sciences, Master Thesis in Pharmaceutical Technology, ANKARA, 2011. The major factor that limits success in cancer therapy is the nonselectivity of the anticancer agents towards tumor cells and tissues. Because of that, specific monoclonal antibodies are used to targeting special tumors, and there are several such pharmaceutic formulations currently approved and in use for the treatment of several cancer types. However, there are several factors that limit the efficient use of targeted antibody therapy. In recent years, tumor homing peptides which are obtained from cancer xenografts by phage display technique, could be used as alternatives to monoclonal antibodies because of their small size and relatively easy production. In this study, lipid based formulations have been developed and characterized for lymphatic targeting using a nine amino acid, cyclic peptide, LyP-1 (CGNKRTRGC), which has been shown to exhibit specificity to the breast cancer tumor lymphatics. Oral administration of peptide–protein drugs is limited due to low permeability and fast enzymatic degradation in the gastrointestinal tract. Thus, lipid-based formulations are used for increasing the permeability and lymphatic absorption and protecting the drug from harsh gastrointestinal environment. SMEDDS have been chosen because of the capability of these systems to improve the solubility and stability of the active ingredient, to be prepared easily; and moreover the final product could be filled into soft gelatin capsules. SMEDDS formulations under 20 nm have been developed by ternary phase diagrams and characterized in terms of droplet size, zeta potential, pH and stability, and also DSC studies have been carried out. An HPLC method has been developed and validated for the quantitative analysis of LyP-1. In order to determine the pH–rate profile of the peptide, kinetic studies have been carried out at 12 different pH conditions and Arrhenius curves have been plotted. Stability of the formulations containing LyP-1 and the solid dispersion of the peptide have been analyzed at the pH value which the peptide was most stable. Cytotoxicity and bioactivity assays have been carried out with Caco-2 and MDA-MB 231 cell lines for blank formulations and formulations containing LyP-1 and the solid dispersion of the peptide. Molecular modelling studies have been performed to investigate potential ligand–receptor interactions. As a result of this study, LyP-1 containing SMEDDS formulations could be considered as a promising drug delivery system for the lymphatic targeting of solid tumors.

Keywords: LyP-1 peptide, solid tumor, cancer therapy, lymphatic targeting, SEDDS (Self-emulsifying drug delivery systems), cell culture

Supported by TÜBİTAK (SBAG-1001 Project, Project Number: 109S341) and Hacettepe University, Scientific Research and Development Office (Support Project, Project Number: 011D07301001).

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
TABLolar DİZİNİ	xviii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kanserde Nanoteknoloji	4
2.2. Tümöre Hedeflendirme	7
2.3. Kanserde Lenfatik Hedeflendirme	12
2.4. İlaç Taşıyıcı Nanosistemler ve Lenfatik Hedeflendirme	15
2.5. Peptit Yapılı Biyoaktif Moleküllerin Lenfatik Hedeflendirilmesi	18
2.6. Kendiliğinden Emülsifiye Olabilen Sistemler (SEDDS, self-emulsifying drug delivery systems)	19
2.6.1. SEDDS'lerin Tanım ve Üstünlükleri	19
2.6.2. SEDDS'lerde Kullanılan Yardımcı Maddeler	20
2.6.3. SEDDS'lerin Hazırlanması	22
2.6.4. SEDDS'lerin Oluşum Mekanizması	23
2.6.5. SEDDS'lerin Karakterizasyonu	25
2.6.6. Katı SEDDS	26

2.6.7. SEDDS'ler Üzerine Yapılan Güncel Çalışmalar	28
2.7. Etkin Madde Hakkında Bilgi	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM	34
3.1. Kullanılan Kimyasal Madde, Malzeme ve Aletler	34
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler	34
3.1.2. Kullanılan Aletler	35
3.2. Önformülasyon Çalışmaları	36
3.2.1. Üçgen Faz Diyagramları	36
3.2.2. Formülasyonların Hazırlanması	38
3.2.3. Makroskopik Özellikler	39
3.2.4. Mikroskopik Özellikler	39
3.2.5. pH Tayini	39
3.2.6. Damlacık Büyüklüğü Tayini	39
3.2.7. Zeta Potansiyel Tayini	39
3.3. Formülasyon Çalışmaları	40
3.3.1. Üçgen Faz Diyagramları	40
3.3.2. Formülasyonların Hazırlanması	41
3.3.3. Makroskopik Özellikler	42
3.3.4. Mikroskopik Özellikler	42
3.3.5. pH Tayini	42
3.3.6. Damlacık Büyüklüğü Tayini	42
3.3.7. Zeta Potansiyel Tayini	42
3.3.8. DSC Çalışmaları	42
3.4. HPLC Metot Geliştirme ve Validasyon	42

3.4.1. Doğrusallık	43
3.4.2. Doğruluk	43
3.4.3. Kesinlik	44
3.4.4. Özgünlük	44
3.4.5. Duyarlılık	45
3.4.6. Sistem Uygunluk Parametreleri	45
3.5. Stabilite Deneyleri	47
3.5.1. Etkin Madde Stabilitesi	47
3.5.2. Formülasyon Stabilitesi	48
3.6. Hücre Kültürü Çalışmaları	49
3.6.1. Sitotoksosite Çalışmaları	49
3.6.2. Biyoaktivite Çalışmaları	50
3.7. Moleküler Dinamik ve Termodinamik Çalışmaları	50
3.7.1. Sistem Kurulumu ve Başlangıç Yapıları	50
3.7.2. Moleküler Dinamik Hesaplamaları	52
3.7.3. MM-PBSA (Molecular Mechanics, Poisson Boltzmann/Surface Area) Hesaplamaları	53
3.7.4. Docking Deneyleri	54
3.7.5. Trajektöri Analizi	54
3.8. Bulguların İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	54
4. BULGULAR	55
4.1. Önformülasyon Çalışmaları	55
4.1.1. Makroskopik Özellikler	55
4.1.2. Mikroskopik Özellikler	56
4.1.3. pH Tayini	57

4.1.4. Damlacık Büyüklüğü Ve Zeta Potansiyel Tayini	58
4.2. Formülasyon Çalışmaları	61
4.2.1. Makroskopik Özellikler	63
4.2.2. Mikroskopik Özellikler	64
4.2.3. pH Tayini	64
4.2.4. Damlacık Büyüklüğü Tayini	65
4.2.5. Zeta Potansiyel Tayini	69
4.2.6. DSC Çalışmaları	70
4.3. HPLC Metot Geliştirme ve Validasyon	74
4.3.1. Doğrusallık	74
4.3.2. Doğruluk	75
4.3.3. Kesinlik (Tekrarlanabilirlik, Tekrar elde edilebilirlik)	76
4.3.4. Özgünlük	77
4.3.5. Duyarlılık	79
4.3.6. Sistem Uygunluk Parametreleri	79
4.4. Stabilité Deneyleri	79
4.4.1. Etkin Madde Stabilitesi	79
4.4.2. LyP-1 İçeren Formülasyonların Stabilitesi	88
4.5. Hücre Kültürü Çalışmaları	90
4.5.1. Etkin Madde İçermeyen Formülasyonlara ait Sitotoksisite Çalışmaları	90
4.5.2. Etkin Madde İçeren Formülasyonlara ait Biyoaktivite Çalışmaları	93
4.6. Moleküler Dinamik ve Termodinamik Çalışmaları	95
4.6.1. P32 Proteinini ile Yapılan Moleküler Dinamik Çalışmaları	95
4.6.2. LyP-1'e ait Moleküler Dinamik Çalışmaları	97

4.6.3. Docking ve Bağlanma Afinitesi Hesaplamaları	98
5. TARTIŞMA	104
6. SONUÇ	116
KAYNAKLAR	118
EKLER	134

EK 1: *“FIP Pharmaceutical Sciences World Congress 2010 in association with the AAPS Annual Meeting and Exposition, New Orleans, LA, USA, 12–18 Kasım 2010” ve “8th GPEN Meeting (Global Pharmaceutic Education Network), University of North Carolina, Chapel Hill, NC, USA, 10–12 Kasım 2010” tarihli toplantılarda sunulan poster özeti (Poster No:W5282).*

EK 2: *“AAPS Annual Meeting and Exposition, Washington D.C., ABD, 23–27 Ekim 2011” tarihli toplantıda sunulan poster özeti.*

EK 3: Özgeçmiş

SİMGELER VE KISALTMALAR

ζ	Zeta potansiyel (mV)
aa	Amino asit
ACN	Asetonitril
D.B.	Damlacık büyüklüğü
DLS	Dinamik ışık saçılımı
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimetilsülfoksit
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetri
EPR	Artırılmış geçirgenlik ve alıkonma etkisi
FBS	Fetal bovin serumu
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
k_{obs}	Parçalanma hız sabiti
LOD	Teşhis edilebilirlik limiti
LOQ	Tayin edilebilirlik limiti
mAu	Mili absorbance unit
MM-PBSA	Molecular mechanics–poisson boltzman surface area
MTT	3-[4, 5-Dimetiltiyazol-2-y1]-2, 5-difenil tetrazolyum bromür
Na-DOC	Sodyum deoksikolat
PBS	pH 7, 4 fosfat tamponu
PCS	Foton korelasyon spektroskopisi
PDB	Protein data bank
PDI	Polidispersite indeksi
PEG	Polietilen glikol
PLGA	Poli (laktik-ko-glikolik asit)
QELS	Kuasi-elastik ışık saçılımı
RES	Retikoendotelial sistem
RMSD	Kök ortalama kare sapması (Root-Mean-Square-Deviation)

SAXS	Küçük açılı X-ışını saçılımı spektroskopisi
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SEDDS	Kendiliğinden emülsifiye olabilen ilaç taşıyıcı sistemler
SMEDDS	Kendiliğinden mikro emülsifiye olabilen ilaç taşıyıcı sistemler
SNEDDS	Kendiliğinden nano emülsifiye olabilen ilaç taşıyıcı sistemler
Soy-PC	Soya fosfatidil kolini
SS	Standart sapma
$t_{1/2}$	Yarılanma ömrü
TFA	Trifloro asetik asit
VK	Varyasyon katsayısı
X_{ort}	Aritmetik ortalama

ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1. Türkiye’de 2006 yılında kadınlarda ve erkeklerde en sık görülen kanserlerin % bağıl sıklık ve veri havuzundaki olgu sayıları	4
2.2. Kanser tedavisinde kullanılmak üzere tasarlanmış bazı nanotaşıyıcı sistemler	6
2.3. Tümöre aktif ve pasif hedeflendirme	8
2.4. Gastrointestinal kanaldan kan ve lenf dolaşımına geçiş	13
2.5. Klasik bir üçgen faz diyagramı ve bölgeleri	22
2.6. Lyp-1 peptidinin düz zincir (Cys-Gly-Arg-Thr-Arg-Lys-Asn-Gly-Cys) ve sıklık yapısı	30
3.1. Önformülasyon çalışmalarında her bir üçgen faz diyagramında belirlenen noktalar	37
3.2. 17 ve 18. serilerde çalışılması belirlenen alanlar	37
3.3. Seri 17 için F1 ve F6 , Seri 18 için F1 ve F2 formülasyonları etrafında belirlenen noktalar	38
3.4. Labrasol/Gelucire 4:1 oranında üçgen faz diyagramında hazırlanan noktalar	40
3.5. Labrasol/Gelucire 1:2 oranında üçgen faz diyagramında hazırlanan noktalar	41
3.6. Labrasol/Gelucire 2:1 oranında üçgen faz diyagramında hazırlanan noktalar	41
3.7. k' ve N hesaplanmasında kullanılan kromotogram parametrelerinin şematik olarak gösterimi	46
3.8. T_f hesaplanmasında kullanılan pik ölçülerinin şematik olarak gösterimi	46
3.9. P32 reseptörünün kristal yapısının (PDB Kodu: 1P32) amino asit dizilimi	51
4.1. Stabilité çalışması için belirlenen formülasyon kombinasyonları	56
4.2. Seri 17 ve Seri 18 F1 formülasyonlarına ait damlacık büyüklüğü	59

dağılım grafikleri	
4.3. Formülasyon çalışmalarında kullanılan üçgen faz diyagramları ve belirlenen bölgeler	62
4.4. Labrasol/Gelucire oranı 4:1 olan üçgen faz diyagramında incelen 10 formülasyona ait 0. gün verilerinin karşılaştırılması ile elde edilen grafik	66
4.5. Labrasol/Gelucire oranı 2:1 olan üçgen faz diyagramında incelen 10 formülasyona ait 0. gün verilerinin karşılaştırılması ile elde edilen grafik	67
4.6. Labrasol/Gelucire oranı 1:2 olan üçgen faz diyagramında incelen 10 formülasyona ait 0. gün verilerinin karşılaştırılması ile elde edilen grafik	67
4.7. Labrasol/Gelucire oranı 1:2 olan üçgen faz diyagramında incelenen 10 formülasyona ait 14. gün verilerinin karşılaştırılması ile elde edilen grafik	68
4.8. Labrasol/Gelucire oranı 1:2 olan üçgen faz diyagramında seçilen 18 no'lu formülasyona ait 0, 3, 7, 10 ve 14. gün verilerinin karşılaştırılması ile elde edilen grafik	68
4.9. Dayanıklı formülasyonlara ait 2 haftalık damlacık büyüklüğü (A) ve poli dispersite indeksleri (B) verileri	69
4.10. Örnek SMEDDS formülasyonuna ait yardımcı maddelerin tek başına, dilüsyon öncesi ve dilüsyon sonrası DSC termogramları	72
4.11. SMEDDS formülasyonuna ait dilüsyon öncesi ve dilüsyon sonrası DSC termogramları	73
4.12. Lyp-1'in % 95 su : % 5 ACN (% 0, 1 TFA) mobil faz sisteminde elde edilen kalibrasyon doğrusu	74
4.13. LyP-1 peptidine ait % 95 su : % 5 ACN (% 0.1 TFA) mobil faz sisteminde 204 nm dalga boyunda elde edilen kromatogramlar	75
4.14. Yardımcı madde, etkin madde içermeyen SMEDDS (1:10 dilüsyon) ve LyP-1'e ait HPLC kromatogramları	78
4.15. Konsantrasyon(M)– $k_{obs}(s^{-1})$ grafikleri	81
4.16 pH 1'de yapılan stabilite çalışmasına ait kromatogramlar	82
4.17. pH 1 (A) ve pH 2 (B)'de yapılan stabilite çalışmalarında oluşan	82

parçalanma pikleri	
4.18. pH 2’de yapılan stabilite çalışmasına ait parçalanma pikleri	83
4.19. pH 3 (0, 05 M) tamponunda 37 °C’de gerçekleştirilen stabilite çalışmasına ait 2, 12 ve 24. saat parçalanma pikleri	84
4.20. pH 7 (0, 05 M)’deki parçalanma pikleri	84
4.21. Lyp-1 peptidine ait pH–Log k_0 grafiği	85
4.22. pH 1 için Arrhenius grafiği	86
4.23. pH 2 için Arrhenius grafiği	87
4.24. pH 3 için Arrhenius grafiği	87
4.25. 2 mg Lyp-1 peptidi içeren SMEDDS formülasyonuna ait kromatogramlar	88
4.26. 3, 2 mg Lyp-1-Soy PC katı dispersiyonu içeren SMEDDS formülasyonuna ait kromatogramlar.	89
4.27. pH 7.4 fosfat tamponu ile dilüsyon sonrası etkin madde içermeyen formülasyonlara ait Caco-% hücre canlılığı değerleri	90
4.28. pH 7.4 fosfat tamponu ile dilüsyon sonrası etkin madde içermeyen formülasyonlara ait Caco-2 % hücre canlılığı değerleri	91
4.29. pH 4 ve 5 asetat tamponu ile dilüsyon sonrası etkin madde içermeyen formülasyonlara ait Caco-2 % hücre canlılığı değerleri	92
4.30. pH 7.4 fosfat tamponu ile dilüsyon sonrası etkin madde içeren formülasyonlara ait Caco-2 % hücre canlılığı değerleri	93
4.31. pH 5 asetat tamponu ile dilüsyon sonrası etkin madde içeren formülasyonlara ait MDA-MB 231 % hücre canlılığı değerleri	94
4.32. p32 proteininin A (siyah), B (kırmızı), C (yeşil) zincirleri ve protein’in tamamı (mavi) için 13 ns (13000 ps) MD hesaplaması için R.M.S.D eğrileri	95
4.33. p32 nin X-ışını kristal (mavi) ve 13 ns MD (yeşil) yapılarının üst üste karşılaştırılması	96
4.34. p32 nin A-zincirinin X-ışını kristal (mavi) ve 10 ns MD (yeşil) yapılarının üst üste karşılaştırılması	97

4.35.	Lineer LyP-1 (A) ve siklik LyP-1 (B)'in sırasıyla 10 ns implicit ve explicit su MD boyunca RMSD grafikleri	98
4.36.	p32 ve lineer peptide ait docking görüntüleri A: Ön bölge (p32'nin eksik amino asit bölgesi) B: Arka bölge	99
4.37.	p32 ve siklik peptide ait docking görüntüleri A: Ön bölge (p32'nin eksik amino asit bölgesi) B: Arka bölge	99
4.38.	Docking ile tespit edilmiş siklik Lyp-1'in, p32'nin C zincirine bağlanma konformasyonları, konformasyon 1 (A) ve 10 (B)	100
4.39.	LyP-1'in 1. docking konformasyonunun p32 ile sulu ortamda 3.5 ns boyunca etkileşmesinin RMSD grafiği	101
4.40.	3.5 ns MD sonunda LyP-1.p32 kompleksinin çözelti yapısı. A. P32'nin yüzey yapısı ve LyP-1'in C-zincir'indeki konumu. B. LyP-1 peptit halkasının p32 C-zinciri (halka yapısı) ile oluşturduğu hidrojen bağları (yeşil çizgiler)	102
5.1.	Asparajin amino asidinin parçalanma yolları	108
5.2.	Lineer LyP-1 (A) ve siklik LyP-1 (B) küme yapılarının üst üste çakıştırılmış kurdale (ribbon) görüntüleri	113

TABLolar

	Sayfa
3.1. Önformülasyon çalışmaları sırasında hazırlanan üçgen faz diyagramı bileşenleri	36
3.2. Seçilen 3 esas üçgen faz diyagramı bileşenleri	40
3.3. Stabilité çalışmasında kullanılan tamponlar	47
4.1. Seri 17 ve 18'de çalışılmak üzere belirlenen noktalara ait formülasyon içerikleri (%)	55
4.2. Seri 17 ve Seri 18'de hazırlanan formülasyonlara ait pH değerleri	57
4.3. Tablo Seri 17 ve 18'e ait formülasyonların bimodal dağılım gösteren damlacık çapı büyüklüğü değerleri	58
4.4. F1 çevresinde çalışılan 4 formülasyona ait formülasyon içerikleri ve damlacık büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değerleri (n=3, Ort±SS).	60
4.5. İki haftalık stabilité çalışması sonucu 4 dayanıklı formülasyonun damlacık büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değerleri	61
4.6. Stabil mikroemülsiyonların içerikleri (%).	63
4.7. Formülasyon çalışmaları kapsamında belirlenen pH değerleri	64
4.8. Dayanıklı formülasyonlara ait 2 haftalık stabilité verileri	66
4.9. İki haftalık stabilité çalışması sonucu incelen formülasyonlara ait zeta potansiyel değerleri	70
4.10. Yardımcı madde ve örnek formülasyona ait DSC analizi sonuçları	70
4.11. Lyp-1'in üç farklı konsantrasyonuna ait doğruluk verileri	75
4.12. Tekrarlanabilirlik değerleri	76
4.13. Tekrar elde edilebilirlik verileri	77
4.14. Sistem uygunluk parametreleri	79
4.15. Farklı pH'larda hesaplanan k_{obs} ve yarılanma ömürleri	80
4.16. pH 1, 2 ve 3 ortamlarında gerçekleştirilen kinetik çalışmalar sonucu elde edilen k_{obs} ve $t_{1/2}$ değerleri	86
4.17. Sıklık LyP-1'in 1. ve 10. dock konformasyonları için MM-PBSA bağlanma entalpi enerjileri (kcal/mol)	101
4.18. Sıklık LyP-1.p32 kompleks sisteminde ortalama MM-PBSA bağlanma enerjisi (kcal/mol)	103

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Nanoteknoloji, maddeler üzerinde 100 nanometre ölçeğinden küçük boyutlarda gerçekleştirilen işleme, ölçüm, modelleme ve düzenleme gibi çalışmaların genel tanımıdır. Nanoteknoloji uygulamaları, ilaç taşıyıcı sistemler olarak polimerik nanopartiküller, seramik nanopartiküller, polimerik miseller, dendrimerler ve lipozomlar olarak sayılabilir. Görüntülemeye ise, manyetik nanopartiküller, ferroakışkanlar ve kuantum nokta teknolojilerinde uygulanmaktadır.

Nanoteknoloji, özellikle kanser terapisi ve nörolojik bozuklukların tedavisi alanlarında ilaç geliştirilmesine katkıda bulunmaktadır. Nanoteknoloji ile proteinlerden biraz daha büyük ve biyolojik bariyerleri (kan-beyin engeli, tümör gözenekleri vb.) geçebilecek nanoboyutlarda ilaçların üretilmesi mümkündür. Artmış yüzey alanlarından ve biyolojik aktivitelerinden dolayı nanoboyuttaki ilaçlar/ilaç taşıyıcı sistemler, çok düşük konsantrasyonlarda etkin madde kullanıma olanak sağlar, böylece meydana gelebilecek potansiyel yan etkilerin riski azaltılmış olur.

Kanser, kısaca, hücrelerin kontrolsüz çoğalmaları demektir ve çeşitli yollarla vücuttaki diğer doku ve organlara yayılabilmektedir. Kanser görülme sıklığının ve kanser nedenli ölüm oranlarının artması, kanseri önemli bir halk sağlığı sorunu haline getirmektedir. Kanser tedavisinde kemoterapi, cerrahi tedavi, radyoterapi, immünoterapi gibi çeşitli yöntemler tek başlarına veya kombine halde kullanılmaktadır. Ancak, kemoterapötik ajanların sağlıklı doku ve organlara da toksik etki göstermesi ve yan etkilerinin fazla olması nedeni ile kanser tedavisinde hedeflendirme ve nanoteknoloji önem kazanmıştır.

Pasif ve aktif hedeflendirme amacıyla monoklonal antikorlar ve nanoteknolojik ürünler üzerine çalışmalar sürmekte olup, piyasada bulunan ürünleri klinikte tedavi amacıyla kullanılmaktadırlar. Bu yolla, kemoterapötik ajanların yan etkilerinin en aza indirilmesi amaçlanmaktadır. Ancak, monoklonal antikorların büyük boyutlu olmaları ve tümör içerisine zayıf geçirgenlik göstermeleri gibi sakıncaları bulunmaktadır. Bu nedenle daha küçük moleküller olan peptitler kolay

üretim ve dayanıklılık gibi özellikleri ile hedeflendirmede diğer bir seçenek olarak kullanılabilir.

Solid tümörlerde yapısal değişiklikler nedeni ile büyüme faktörleri artmakta, tümörün beslenmesi ve büyümesine neden olan anjiogenez ve lenfanjiogenez tetiklenmektedir. Bu durum, tümörün başka doku ve organlara taşınma riskini de artırmaktadır. Özellikle lenfatik sistemin tümör metastazında önemli yollardan biri olduğu bilinmektedir.

Bu tez çalışmasında, ilk olarak faj sunumu çalışmaları ile MDA-MB 435 meme kanseri hücre ksenograftlarından elde edilen ve antikanser etkinliği tespit edilmiş olan LyP-1 peptidi kullanılmıştır. Bu peptit çeşitli kanser türlerinde, solid tümörlerin lenfatik damarlarına özgünlük gösteren 9 amino asitli bir peptittir. Bu peptidin aynı zamanda tümör hücresi içine girebildiği ve hücrede apoptozu (programlanmış hücre ölümü) tetiklediği bilinmektedir. LyP-1 peptidinin lenf damarlarına özgü bir peptit olması nedeni ile lenf sistemi aracılı metastazın önlenmesi mümkün olabilecektir.

Tez çalışmasında, peptidin, yağ bazlı SEDDS formülasyonları tasarlanmıştır. Bu sistemler belirli oranlarda yüzey etkin madde, yağ ve yardımcı çözücü/yardımcı yüzey etkin maddenin karışımı olup vücut içerisinde 300 nm'nin altında damlacıklar oluşturmaktadır. Yağ bazlı ilaç taşıyıcı sistemlerin çözünürlük sorunu olan ilaçların formüle edilmesinde ve lenfatik hedeflendirme amacı ile sıklıkla kullanıldığı bilinmektedir. Partisyon katsayısı (logP) 5'den büyük olan maddelerin ince bağırsaktan emilim sırasında lenfatik sistemi tercih ettikleri bilinmektedir. Peptidin yağ bazlı sistemler içerisinde verilmesi ile hem bozunmadan korunması hem de lenfatik sistem aracılığı ile taşınarak karaciğerde ilk geçiş etkisinden kurtulması mümkün olabilecektir.

Bu amaçlar doğrultusunda SEDDS formülasyonlarının tasarımı ve optimizasyonu, LyP-1 peptidine ait HPLC miktar tayini metodu geliştirilmesi ve validasyonu, uygun formülasyonlara ve peptide ait stabilite çalışmaları yapılmıştır. Peptide ait parçalanma hız profili belirlenmiştir. Ayrıca peptidin yağ fazında kalışını sağlamak ve stabilitesini artırmak amacıyla uygun bir lipid kullanılarak katı

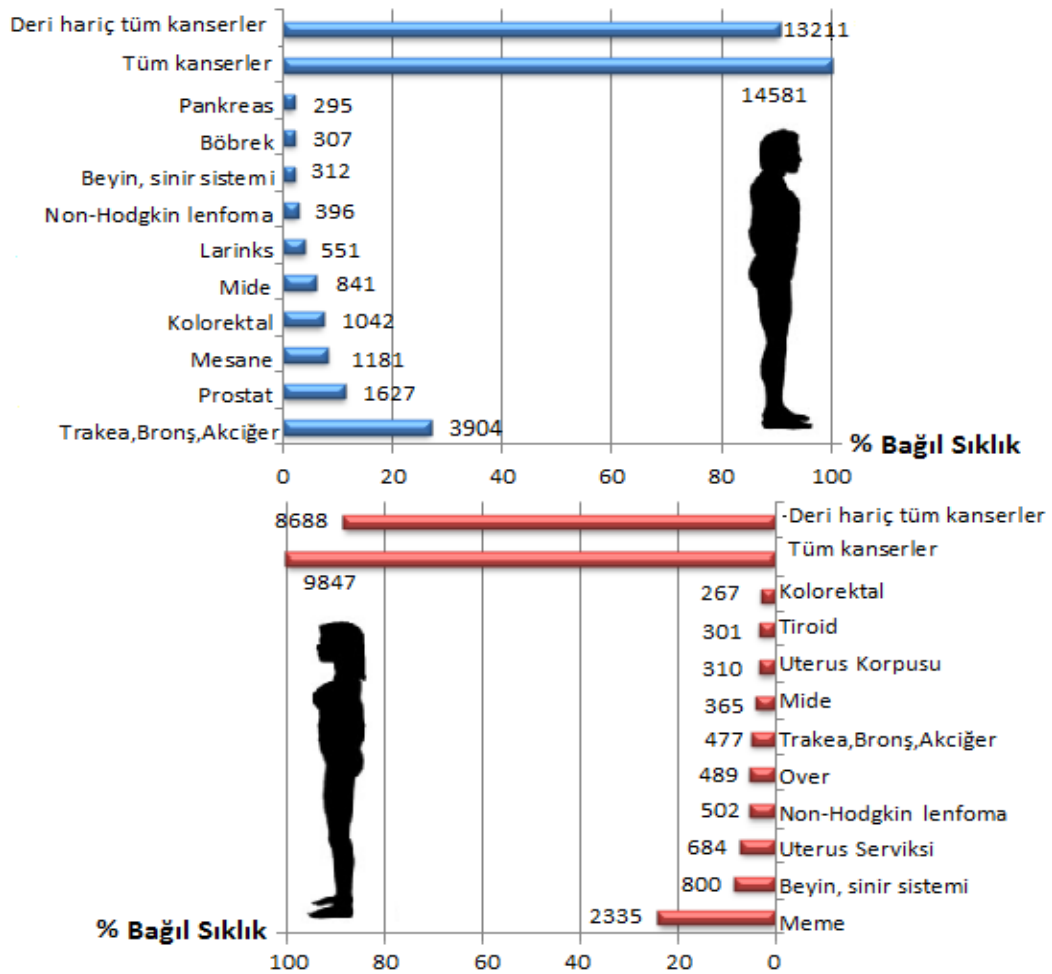
dispersiyonları hazırlanmıştır. Etkin madde içermeyen ve hazırlanan katı dispersiyonu ve peptidi içeren formülasyonlara ait sitotoksisitenin, etkin madde içeren formülasyonlara ait biyoaktivitenin belirlenmesi için hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Peptidin reseptör ile etkileşiminin incelenmesi amacıyla moleküler dinamik çalışmaları yürütülmüştür.

Yapılan literatür ve patent taramaları göz önüne alındığında, bu tezde LyP-1 ile gerçekleştirilen çalışmalarla ilgili literatürde çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma bilindidiği kadarıyla bu konudaki ilk çalışmadır.

2. GENEL BİLGİ

2.1. Kanserde Nanoteknoloji

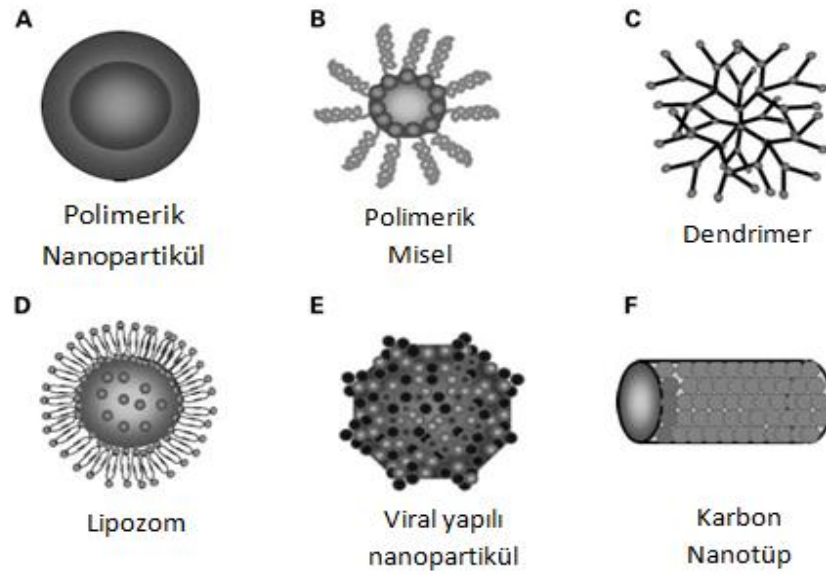
Kanser en kısa tanımıyla, hücrelerin kontrolsüz şekilde çoğalmaları demektir. Anormal şekilde çoğalmaya başlayan bu hücreler bulundukları yerdeki ve hatta uzaklarında bulunan doku ve organları işgal eder ve bu bölgelerde işlevsel bozukluklara yol açarlar. Kanserde ölüm oranlarının yüksek olması konunun önemini daha da artırmaktadır (1). T.C. Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı tarafından yayımlanan 2004–2006 Türkiye Kanser istatistiklerine göre kadın ve erkeklerde 2006 yılına ait en çok görülen kanser türleri ve olgu sayıları Şekil 2.1’de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Türkiye’de 2006 yılında kadınlarda ve erkeklerde en sık görülen kanserlerin % bağıl sıklık ve veri havuzundaki olgu sayıları.

Erkeklerde deri hariç tüm kanserler için kaba hız yüz binde 222.6'dır. En sık görülen kanserler akciğer, prostat, mesane, kolorektal ve mide kanserleri olarak sıralanmaktadır. En sık görülen beş kanserin sıralaması üç yılda da değişmemiştir. Kadınlarda, 2004–2006 yıllarında tüm kanserler için kaba hız yüz binde 164.4; deri hariç tüm kanserlerde ise kaba hız yüz binde 145.4'tür. İlk beş sırada meme, kolorektal, tiroit, uterus korpusu ve akciğer kanserleri yer almaktadır. 2004, 2005 ve 2006 yıllarında en sık görülen ilk üç kanser türü meme, kolorektal ve tiroit olarak sıralanmaktadır. Akciğer kanseri, 2006 yılında en sık görülen ilk beş kanser içinde yer almazken, 2005 yılında dördüncü, 2004 yılında ise beşinci sıraya yerleşmiştir (2).

Gelişen nanoteknolojinin tıp alanında uygulaması olan nanotıp, klinik alanda yarar sağlamak, tanı alanında günümüzdeki kısıtlamalara çözüm getirmenin yanında hastalıkların tedavisi ve düzenlenmesinde yararlı olması açısından önemli bir potansiyele sahiptir. İdeal nanoboyutlu ilaç taşıyıcı sistemler, konjuge veya bağlı ilaç ve taşıyıcı kompleksinin tercihen hedeflenen bölgeye ulaşmasını ve etki göstermesini sağlar (3). Nanoboyutlu ilaç taşıyıcı sistemler bu özellikleri dolayısıyla kanser tedavisinde kullanılmak üzere tasarlanmaktadır. Konvansiyonel kemoterapötik ajanlar, vücuda verildiklerinde hem kanser hem de normal hücreleri etkileyen bir dağılım göstermeleri sebebiyle tümörde ulaşılacak dozun kısıtlanmasına ve aşırı toksisite nedeniyle de ideal tedavinin gerçekleştirilememesine sebep olurlar (4). Nanoteknoloji, özellikle kanser terapisi ve nörolojik bozuklukların tedavisi alanlarında ilaç geliştirilmesine katkıda bulunmaktadır. Nanoteknoloji ile proteinlerden biraz daha büyük ve biyolojik bariyerleri (kan–beyin engeli, tümör gözenekleri vb.) geçebilecek nanoboyutlarda ilaçların üretilmesi mümkündür. Artmış yüzey alanlarından ve biyolojik aktivitelerinden dolayı nanoboyuttaki ilaçlar/ilaç taşıyıcı sistemler, çok düşük konsantrasyonlarda etkin madde kullanımına olanak sağlar, böylece meydana gelebilecek potansiyel yan etkilerin riski azaltılmış olur (5). Kanser tedavisinde kullanılmak üzere tasarlanmış bazı nanotaşıyıcı sistemler Şekil 2.2'de şematik olarak görülmektedir.



Şekil 2.2. Kanser tedavisinde kullanılmak üzere tasarlanmış bazı nanotaşıyıcı sistemler (6).

Polimer yapılı nanotaşıyıcılar arasında polimerik nanopartiküller (polimer–ilaç konjugatları), polimerik miseller ve dendrimerler sıralanabilir (3). Polimer yapılı nanotaşıyıcılar arasında önemli bir yere sahip olan nanopartiküller, aktif ve pasif hedeflendirme stratejilerinin kullanılmasıyla, kanser hücrelerinde ilaç konsantrasyonunu artırarak normal hücrelerde sitotoksiteyi azaltabilmektedirler (7, 8).

Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA)’nin onayını almış birtakım taşıyıcı sistemler halihazırda piyasada bulunmaktadır. İlk olarak, lipozomal formülasyonlar (Doxil®, Daunoxome®) 1995 yılında onay almıştır. Doxil® partikül boyutu 100 nm’den küçük lipozomal keseciklerden oluşur. İlacın opsonizasyonunu engellemek için pegilasyon yapılmıştır. Bu işlem ayrıca sterik stabilizasyon sağlayarak plazma yarı ömrünü uzatır. Lipozomal formülasyon içerisinde verilen ilaç, tümörlü bölgede normal verilise göre 10 kat daha fazla ölçülmüştür. İnfüzyon yoluyla verilen doksorubisinle karşılaştırıldığında, Doxil®’in kardiyotoksite, kemik iliği baskılanması, saç dökülmesi, bulantı ve kusma gibi yan etkilere daha az neden olduğu görülmüştür (9). Kansere hedeflendirme alanında diğer bir yeni ilaç taşıyıcı

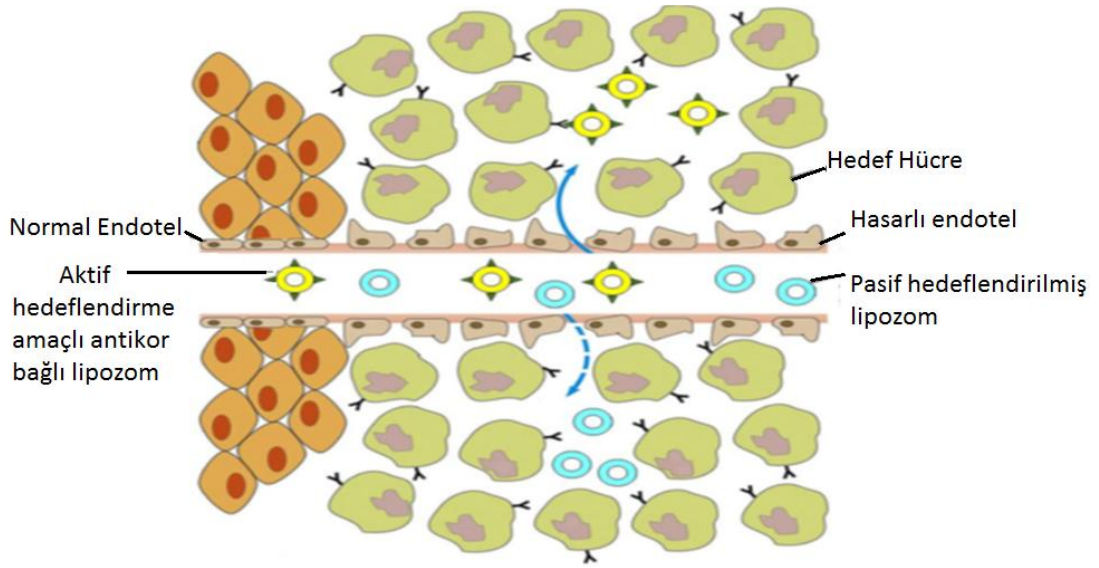
sistem ise 130 nm boyutunda paklitaksel bağı albümin nanopartikülleri formülasyonu olan Abraxane®'dir. Abraxane® insanda kullanım için FDA onayı alan (2005) ilk nanopartikül formülasyondur ve metastatik meme kanseri tedavisinde kullanılmaktadır (3). Abraxane® ile, paklitaksel etkin maddesini çözünürleştirmede kullanılan Cremophor® yüzey etkin maddenin kullanımı ortadan kaldırılmakta ve böylece uzun süreli tedavide kombine steroid ve antihistaminik tedavisine gerek kalmamaktadır. Ayrıca, bu şekilde hastaya daha yüksek dozda ilaç uygulanabilmektedir (10).

2.2. Tümöre Hedeflendirme

Kanser tedavisinde başarıyı kısıtlayan en önemli faktör konvansiyonel antikanser ajanların tümörlü hücre ve dokulara seçici olmamasıdır. Neredeyse tüm kemoterapötik ajanların normal doku ve organlara yan etki gösterdiği bilinmektedir (11).

Kanser tedavisinin asıl amacı normal dokuları etkilemeden kanser hücrelerini yok etmektir. Bu durum ise, kanser hücrelerinin selektif olarak hedeflendirilmesi ile mümkündür. Tümöre hedeflendirmedeki ideal özellikler; ilacın tümördeki yerleşiminin aktif veya pasif hedeflendirilme ile artırılması, hedeflenmemiş hücrelerdeki yerleşiminin azaltılması, ilacın hedef bölgeye taşınma esnasında sızıntısının en aza indirilmesi, ilacın parçalanmadan korunması, ilacın hedeflenen bölgede istenilen süre boyunca kalabilmesi, hücre içine alımın kolaylaştırılması ve taşıyıcı sistem bileşenlerinin biyoyumlu ve biyoparçalanabilir olması şeklinde sıralanabilir (12).

İlaçların hedeflendirilmesi iki şekilde sağlanır; bunlardan biri pasif hedeflendirme, diğeri de aktif hedeflendirmedir. Pasif hedeflendirme; intravenöz enjeksiyondan sonra taşıyıcının doğal olarak hedeflenmesi; organ, doku ve hücreye yerleşmesidir. Aktif hedeflendirme; manyetik hedeflendirme, ultrasonik hedeflendirme ve ligant–reseptör aracılı hedeflendirme olmak üzere 3 ana başlık altında incelenebilir (13). Şekil 2.3'de aktif ve pasif hedeflendirme şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 2.3. Tümöre aktif ve pasif hedeflendirme (3).

Manyetik hedeflendirme, dışarıdan manyetik alan uygulanmasıyla istenilen bölgeye etkin maddenin taşınmasıdır. Ultrasonik hedeflendirmede, ultrasonik dalga kontrollü sistemlerde biyolojik olarak aşınan veya aşınmayan polimerler ilaç taşıyıcısı olarak kullanılır ve hedeflendirilirler. Ligant–reseptör aracılı hedeflendirmede, farklı yapıda ligantlar kullanılmaktadır. Burada, taşıyıcı sistemler hücre yüzeyindeki spesifik reseptörlere yönlendirilerek hücre içine alınma (internalizasyon) ligandın ve reseptörün yapısına bağlı olarak reseptör aracılı endositoz veya transitoz ile gerçekleşmektedir. Ligant–reseptör aracılı hedeflendirmede kullanılan ligantlar arasında monoklonal antikorlar, vitaminler, peptid yapıdaki büyüme faktörleri, sitokinler, glikoproteinler sayılabilir (13). Etkin madde, hedef hücrenin yüzeyindeki reseptöre bağlanabilen liganda (hormon, peptid gibi) konjuge edilir. Böylece etkin madde spesifik olarak hedef hücreye yönlendirilmiş olur (14).

Hedeflendirme amacı ile kullanılan yeni ilaç taşıyıcı sistemlerden bazıları; lipozomlar, miseller, nanopartiküller, dendrimerler ve nanokapsüllerdir. Spesifik olmayan taşıyıcılardan dekstran, albumin, DNA, poliamino asitler ve diğer polimerler gibi makromoleküller kullanılarak hazırlanan nanopartikül, mikrokapsül, mikroküre ve lipozom gibi sistemler, tümör çevresinde lenfatik drenajın az olmasından

kaynaklanan artırılmış tutulma etkisi ve tümör boyutu gibi çevresel özelliklerden dolayı tümörde toplanırlar. Ayrıca kullanılan makromolekülün molekül ağırlığı ve yükü gibi fizikokimyasal özellikleri de tümörde toplanmada etkilidir (15). Bu sistemler pasif hedeflendirme ile tümörlere yönlendirilebileceği gibi, antikör, ligant, peptit gibi moleküllerle kombine edilerek aktif hedeflendirme amacı ile de kullanılabilirler (16–18).

Normal kılcal damarlar arteriol, kapiler ve venüllerden oluşan düzenli ve fonksiyonel bir yapıya sahiptir (19). Tümör damarları ise genel olarak sıralı olmayan, hasar görmüş ve geniş açıklıklara sahip endotel hücrelerden oluşur (Şekil 2.3). Bu damarlar düz kas ve sinir içermezler. Oldukça geniş lümene ve özellikle vazoaaktif mediatörlerden AT (Anjiyotensin II)’e karşı bozulmuş reseptör fonksiyonuna sahiptirler (20, 21). Buna ek olarak bradikinin, nitrik oksit, büyüme faktörleri ve prostoglandinler gibi vasküler permeabilite artırıcı faktörlerin üretiminin artması nedeniyle makromoleküllü ilaçların normal dokuya göre tümörlü dokuya geçişleri kolaylaşmaktadır (22). Tümör dokusunda bulunan endotel hücreler arasındaki boşluk 100–600 nm arasında değişebilmektedir (21). Tüm bu faktörler tümör kapilerlerinden geçişi artırmakla beraber, özellikle nanoboyuttaki makromoleküler ilaçların tümörlü dokulara selektif olarak gönderilmesini mümkün kılar (23, 24). Ayrıca, tümörlü dokuda lenfatik sıvı akışının az olması, ilacın tümörlü dokuda kalış etkisini artırarak uzatılmış etki sağlar. Bu etkiye; artırılmış geçiş ve alıkonma etkisi (EPR etkisi, enhanced permeability and retention effect) denir (25). Tümör çevresine özgü bu özellikten faydalanmak için nanopartiküler sistemler kullanılmaktadır (26). Keza, PLGA (Poli laktik-ko-glikolik asit) nanopartikülleri hazırlanarak deksametazon (27) ve paklitaksel (28, 29) gibi antikanser ajanlarla yapılan çalışmalarda EPR etkisi ile etki artırılmaya çalışılmıştır.

Tümöre hedeflendirme ve görüntüleme amacı ile kullanılan diğer bir sistem viral nanopartiküllerdir. Virüsler, kimyasal veya genetik yollarla yüzeylerinde biyolojik olarak aktif formlarında bulunan hedeflendirme ajanları, ligantlar, antikörler veya peptitler gibi çeşitli molekülleri sergileyebilmektedir (30). Bunların yanında köpek parvovirüsü gibi bazı virüsler, birçok tümörde sentezi artan

transferrin reseptörü gibi reseptörlere doğal olarak seçicilik gösterirler ve bu açıdan da kanserde hedeflendirme amacı ile çalışmalarda kullanılmaktadırlar (31).

Nanopartiküler sistemlere diğer bir örnek ise dendrimerik polimerler ile hazırlanan nanopartiküllerdir. Kukowska ve diğ. (16) yaptığı çalışmada poliamidoamin dendritik polimerleri ile hazırlanan 5 nm çapındaki nanopartiküllere hedeflendirici ajan olarak folik asit konjuge edilmiş, ayrıca antikanser etkili etkin madde ve floresan madde bağlanmıştır. Farelere iv uygulamadan 4 gün sonra nanopartiküllerin tümör ve çevresinde yoğun şekilde toplandığı görülmüştür. Böylece, etkin madde olan metotreksatin serbest haline göre antitümör aktivitesinde artış ve toksisitesinde azalma sağlanmıştır.

Lipozomlarda hedeflemeyi sağlamak amacıyla da immunoglobulinler kullanılmaktadır. Lipozomların özgün bir antikora konjuge edilerek (immünolipozom) verildiklerinde hedeflenmeyi sağladıkları gösterilmiştir (32, 33). Diğer bir sistem olan miseller, partikül büyüklüğü 5–100 nm arasında olan, yapılarında hidrofobik ve hidrofilik kısımları içeren moleküllerin oluşturduğu kolloidal dağılımlardır. Miseller kullanılarak aktif hedeflendirme çalışmaları yürütülmüştür (34). Doksorubisin yüklü pH'ya duyarlı miseller, hücre içine girişi, hücre çekirdeğinde lokalizasyonu ve hücre içinde etkin madde salımını artırarak, metastatik kanser hücrelerine karşı sitotoksitede artış sağlamışlardır. Aktif hedeflendirmede antikorlar, küçük organik moleküller (vitaminler), aptamerler ve karbonhidratlar görev alabilir. Örnek olarak; folik asit reseptörü ovaryum ve akciğer gibi birçok kanser türünde aşırı çoğalmaya neden olan bir proteindir (18, 35, 36). Bu reseptörün, normal bir dokuya oranla tümörlü dokuda yaklaşık 100–300 kat daha fazla çoğalabildiği gözlenmiştir (35). Folik asit reseptörünü hedef alan doksorubisin yüklü miseller kullanılarak yapılan *in vivo* çalışmalarda hedeflenmiş misellerin hedeflenmemiş olan misellere göre tümör büyüme hızını iki kat azalttığı görülmüştür (37). Aktif hedeflendirmede kullanılan ligantlardan biri de antikorlardır. Yapılan bir araştırmada, GRGDS-modifiye misellerin (GRGDS; çeşitli metastatik kanser hücrelerinde aşırı çoğalmaya uğrayan $\alpha\beta 3$ -integrine özgü bir peptit)

hedeflenmemiş yapılara oranla B16F10 metastatik melanoma hücrelerine karşı daha sitotoksik olduğu kanıtlanmıştır (34).

Günümüzde, özgün monoklonal antikorlar ile tümöre hedeflendirme çalışmaları yapılmakta olup (17), anti-VEGF (anti-vasküler endotelial büyüme faktörü) ve anti-EGFR (anti-epidermal büyüme faktörü reseptörü) monoklonal antikorlarının ilerlemiş kolorektal kanserli hastalarda kemoterapinin etkinliğini artırdığı gösterilmiştir (38). Bu antikorlar, FDA onayını almış olup, Avastin® (Bevacizumab) ve Erbitux® (Cetuximab) ticari isimleri ile kolorektal kanser tedavisinde kullanılmaktadırlar. Ayrıca, antianjiojenik tedavide kullanılan Panitumumab (Vectibix®) ve Trastuzumab (Herceptin®) gibi onaylı monoklonal antikorlar FDA onayı almış olup klinikte kullanılmaktadırlar (39). Öte yandan, hedeflendirilmiş antikor tedavisini kısıtlayan birtakım faktörler bulunmaktadır. Antikorların büyük boyutlu olmaları ve bu moleküllerin hedef bölgede düşük penetrasyon ve hücre içine alımı ile karaciğer ve RES (Retiküloendotelial Sistem) tarafından özgün olmayan alımları, bu tip moleküllere ilişkin en önemli sakıncalardır (40). Bunun sonucunda, tümöre zayıf penetrasyon ile karaciğer ve kemik iliğinde dozun sınırlanmasına yol açan toksisite görülebilir. Antikorların; radyonüklit, sitotoksik ilaç ve toksinlerin tümör bölgesine taşınması için kullanımında bu kısıtlayıcı faktörler etkili olabilir (39). Antikor hedeflendirilmesinde çıkan sorunları azaltmak açısından, peptitler tümöre hedeflendirmede mükemmel alternatifler olarak düşünülmektedir (39, 41, 42). Peptitlerin antikora göre küçük boyutlu olmaları, kimyasal olarak dayanıklı ve türevlendirmeye uygun olmaları ile genel olarak RES'e yakalanmamaları gibi üstünlükleri bulunmaktadır (39). Ayrıca, kanser hücrelerine özgü amino asit dizilimine sahip peptitler ile kanserde hedeflendirme mümkün olabilmektedir (40, 43, 44). Faj sunumu tekniği kullanılarak elde edilen amino asit dizilimleri ile belirlenen peptitlerin, çeşitli ilaç veya ilaç taşıyıcı sistemler ile kombine edilerek kanser hücrelerine seçici olarak hedeflendirilebildiği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (40, 43, 45, 46).

Kullanılan monoklonal antikorların reseptöre seçiciliği yüksek olmasına rağmen molekül ağırlıklarının yüksek olması bir sakıncadır. Dolayısıyla bu

moleküllerin *in vivo* kullanımında ilacın dokuya geçişi ve hücreler tarafından alımı düşük düzeydedir (39). Tümör hücrelerini tanıyan küçük peptit molekülleri bu sorunun üstesinden gelebilir. Ancak, tedavide peptitlerin kullanımı kısa yarı ömürleri nedeniyle kısıtlanmıştır (47). Ayrıca, bu peptitlerin doku ve organlardaki biyoyararlanımı da düşük düzeydedir. Dolayısıyla, peptidin hedef bölgeye ulaşmadan atılma oranını en aza indirmek gerekir. Bu yapıların ilaç olarak kullanılabilmesi için kimyasal modifikasyonlar gerekebilir. Bu bağlamda; D-amino asitler, psödo-amino asitler ve siklizasyon peptitlerin stabilizasyonlarını artırmada en yaygın kullanılan yöntemlerdir (48). Diğer yandan, peptitlerin uzun ve yeterli bir etki oluşturabilmesi için bazı doku ve organlarda bulunan endopeptidaz ve aminopeptidaz gibi proteolitik enzimlere karşı da koruyucu önlemler almak gerekir. Nanotaşıyıcı sistemler genellikle bunun üstesinden gelebilir; peptitlerin lenf dolaşımında daha uzun süre kalmasını ve dolayısıyla biyoyararlanımının artmasını sağlayabilirler (49, 50).

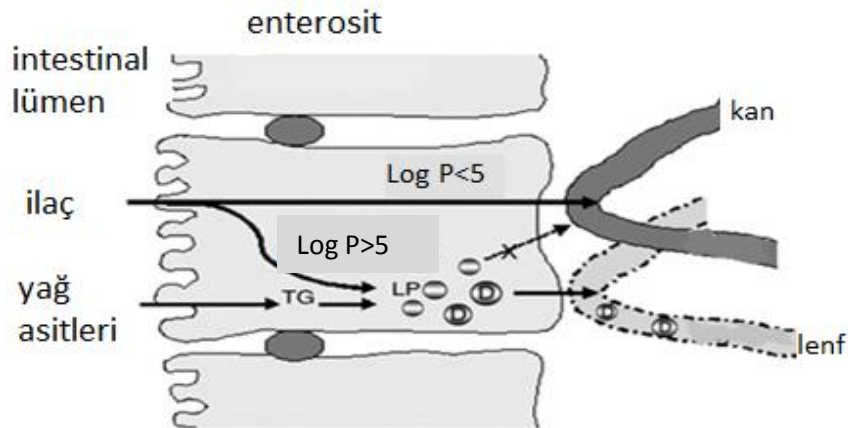
Peptitlerle kanserin hedeflendirilmesi ile ilgili literatürde çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (51–53). Faj sunum tekniği ile elde edilen peptit kütüphanelerinde bulunan tümör kan veya lenf damarlarına özgü peptitlerle (tumor homing peptides) kanserde hedeflendirme çalışmaları yapılmaktadır (43). Bu tip peptitler, kanser hücrelerine gen transferi amacı ile de kullanılmış ve viral zarfın modifikasyonu sonucu virüslerin yüzeye yerleştirilen peptitlerle oldukça umut vaadedici sonuçlar alınmıştır (54, 55).

2.3. Kanserde Lenfatik Hedeflendirme

Lenfatik sistem, lenf damarları, lenf kanalları, dalak, timus bezi ve lenf nodları gibi lenfatik organlardan oluşur. Lenf ve kan damarlarının her ikisi de endotel hücrelerle kaplı olsa da temelde bu iki sistem belirgin farklılıklar gösterir. Kan damarı sistemi, kalbin pompaladığı kanın kapalı bir sistem içinde taşınmasını sağlar. Lenf sistemi ise, dokulararası sıvının dokudan kana tek yönlü taşındığı açık uçlu yapılardan oluşur. Lenf sisteminin birinci görevi; periferik dokulardan dokulararası sıvıyı toplayıp tekrar kan dolaşımına kazandırmaktır. Bir diğer görevi de; diyetle alınan yağların, yağda çözünen vitaminlerin ve bağışıklık sisteminde görevli bazı

moleküllerin (A, D, E, K vitaminleri, trigliseritler, lipoproteinler) taşınmasını sağlamaktır (56). Bağırsakta lenf damarları ve kan damarları yan yana bulunur. Portal kan akışının lenf sistemine göre yaklaşık 500 kat fazla olması sebebiyle emilimi gerçekleşen maddelerin çoğu portal kandan sistemik dolaşıma katılır. Ancak, yüksek molekül ağırlıklı maddeler ve kolloidal yapılar lenfatik kapiller yapının daha geçirgen olması sebebiyle lenf dolaşımına katılırlar. Lenfatik sistemin fizyolojik yapısı nedeni ile seçici biyodağılım sağlaması, lipozom, aktif karbon partikülleri, emülsiyonlar, lipidler ve polimerik partiküller gibi kolloidal materyallerin lenfatik ilaç taşınımı için kullanılmasına olanak sağlamıştır (57). Ayrıca, lipofilitesi fazla olan ($\log P > 5$, lipit çözünürlük > 50 mg/g) ilaçlar da intestinal lenf aracılığıyla dolaşıma katılır (Şekil 2.4) (58).

Partiküllerin ya da damlacıkların büyüklüğü, lenfatik alımda ve lenf nodlarındaki kalış açısından en belirleyici etkindir. Lenfatik alım için optimum büyüklük 10–100 nm arasında iken, 10 nm'den küçük olan moleküller kan kapillerlerine doğru tercihi olarak tekrardan absorplanırlar. Daha büyük moleküllerin ya da partiküllerin lenfatik sistem tarafından alımı daha selektif fakat daha yavaştır. Örneğin 30–60 nm arasındaki lipozomlar, büyüklükleri 400 nm olanlara göre daha hızlı alınırlar. Daha küçük olanları ise, kan dolaşımında yüksek seviyelerde bulunur. Lenfatik alım için partiküllere ait üst limit henüz belirtilmemiştir (59).



Şekil 2.4. Gastrointestinal kanaldan kan ve lenf dolaşımına geçiş (TG: Trigliserit, LP: Lipoprotein, D: ilaç molekülü) (58).

İlaç taşıyıcı sistemin bileşimi de lenfatik alım açısından bir diğer önemli faktördür. Bu bağlamda, kolloidler ve yağlar yüksek alım etkinliğine sahip olarak görünmektedir. 200 nm boyutundaki karbon partiküllerine adsorbe olan antikanser ilaçlar, çözelti formunda olanlarına göre önemli derecede artmış miktarlarda lenf nodlarında görülmüşlerdir (59).

Lenf damarları insanlarda kanserin yayılım yapmasına neden olan önemli bir yolaktır. Birçok solid tümörde, metastazın vasküler sistem yerine lenfatik sistemi tercih ettiği bilinmektedir (60). Lenfatik damarlanma da kanserlerin metastazı için önemli bir yoldur (61). Kanserli doku veya yakınında oluşan lenfanjiogenezin; baş ve boyun kanseri (62) ile kutanöz melanoma (63) gibi tümör tiplerinin lenf nodlarına metastazı ile ilişkili olduğu görülmüştür. Meme kanserinde ise meme çevresinde ve koltuk altında lenf nodlarının çok sayıda bulunması kanserin bölgesel metastazına neden olan ve tedaviyi etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Cerrahi işlem sonrası oluşan lenf nodu metastazı da ciddi bir sorun yaratmaktadır (64). Öte yandan, antikanser ajanların konvansiyonel yollarla sistemik dolaşıma verilmesi ile, diğer sistemleri etkilemeden, etkin bir şekilde lenfatik sisteme hedeflendirme sağlanamamıştır. Bunun sebebi kan-lenf engelidir (65). Bu engeli aşmak için bazı tümörlerde lenfatik damarlar üzerinde bulunan reseptörler hedef olarak kullanılabilir (66). Yapılan deneysel ve klinik/patolojik çalışmalar sonucunda, lenfe hedefleme yapılmak üzere tasarlanmış terapötiklerin, kanser metastazını önlemede yararlı olabileceği öngörülmüştür (61).

Son yıllarda yapılan araştırmalar, kanserde lenfanjiyogenezin rolünün ve lenf damarlarının gelişiminin altında yatan moleküler mekanizmaların anlaşılmasını sağlamıştır. Bu çalışmalarda, VEGF-C ve VEGF-D (damar endotel büyüme faktörleri) ile bunların reseptörü olan VEGFR-3'ün keşfedilmesi temel basamak olmuştur. Hayvanlar üzerinde yapılan deneysel çalışmalar sonucunda VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3 arasındaki sinyal iletimine bağlı olarak tümörlü bölgede yeni damarların oluştuğu (lenfanjiyogenez) belirlenmiştir (67).

Günümüze kadar lenf endotelinde yapılan reseptör hedefleme çalışmaları genellikle VEGFR-3 üzerinedir. Antikor yardımıyla VEGFR-3'ün hedeflenmesi

lenfanjiyogenezi engeller (68–70). VEGFR-3 reseptörü lenf endotelinde olduğu gibi kan damarlarında da aşırı çoğalma gösterebilir. Dolayısıyla VEGFR-3'ü hedef alan antikolar normal anjiyogenezi ve birincil tümör oluşumunu da engellerler (70, 71). VEGF-C; VEGFR-3'ün yanı sıra VEGFR-2'nin de uyarılması sonucu anjiyogeneze sebep olur. DC101 antikoru yardımıyla VEGFR-2'nin hedeflenmesi VEGF-C'e bağlı anjiyogenezi engeller (72). Bu iki reseptörü hedef alan yöntemler karşılaştırıldığında, VEGFR-3'ün hedef alındığı durumda, tümör hücresinin bölgesel ve uzak bölgelere yayılımının, VEGFR-2'nin hedef alındığı durumda ise, tümör gelişiminin ve anjiyogenezin daha etkin bir şekilde engellenebildiği görülmüştür (70).

2.4. İlaç Taşıyıcı Nanosistemler ve Lenfatik Hedeflendirme

İlaç taşıyıcı olarak geliştirilen nanosistemler, antikanser tedavide lenfatik hedeflendirme amacıyla da kullanılabilir. Bunlara örnek olarak mikro/nanoemülsiyonlar, nanoküreler, emülsiyonlar, lipozomlar ve nanokapsüller gösterilebilir (73). Ayrıca, proteinler ve dekstranlar (74) gibi makromoleküller, kolloidler, karışık miseller ve (Self micro-emulsifying drug delivery systems) SMEDDS'ler (75) de lenfotropik ilaç taşıyıcılar olarak kullanılmaktadır (76).

Lipozomlar, lenfatik alımı takiben lenf damarlarını geçerek bir veya daha fazla lenf noduna girerler ve orada kalırlar. Kolloidal partiküllerin lenf nodlarına alımında en önemli mekanizmanın makrofajlar tarafından yapılan fagositoz olduğu düşünülmektedir (77). Hedeflendirme işlevini geliştirmek için immünilipozomlar ve polietilen glikol (PEG) kaplı lipozomlar gibi yüzeyi modifiye edilmiş lipozomlar da kullanılmıştır (78). Biyoparçalanır polimerik nanopartiküler sistemler, lenfatik sisteme hedeflendirmeyi geliştirici veya diğer kolloidal taşıyıcılara ilaç yükleme kapasitesini artırmak için, fizikokimyasal stabiliteyi düzenleyici olarak kullanılırlar (79, 80). Yağ bazlı nanokürelerin lenfatik hedeflendirme için alternatif kolloidal taşıyıcılar olduğu belirtilmiştir. Katı-sıvı nanopartiküller, intraduodenal olarak sıçanlara uygulanmış ve lenfatik alım geliştirilmiştir (81).

Manyetik karbon nanotüpler (MNT) lenfatik bölgeye etkili bir şekilde ilaç taşınmasında kullanılan sistemlerdendir (82). İlaçların manyetik olarak hedeflendirildiği sistemler bir manyetik alan yardımıyla ilaçların etki bölgesine

taşındığı umut verici sistemlerdir. Bu manyetik alan ilacı RES'den uzak bir bölgeye sabitler. Hedeflendirmenin derecesi, kanın akış hızı ve manyetik alanın şiddetine bağlıdır. Dolayısıyla, kan akış hızının daha az olduğu dokularda ilaç birikimi daha fazladır. Kitosan, poliglikolitler, polialkilakrilosiyanatlar gibi biyolojik olarak parçalanabilen polimerlerle ilaç ve manyetik partiküller çeşitli teknikler kullanılarak birleştirilmişlerdir. Bu polimerler sayesinde ilaçlar RES'e yakalanmadan uzun süre kanda kalabilirler (83). Lenfatik hedeflendirmede ise, 5-flurourasil ve sisplatin gibi maddeler iç yüzeyinde Fe_3O_4 gibi manyetik partiküller bulunan nanotüplerin gözeneklerine dahil edilerek nanoteknolojik yöntemlerle üretim yapılmıştır (82). Bu sistemden yararlanmak için fosfolipitler, PEG ve folik asit kovalan olmayan bir yolla MNT'lere bağlanır. MNT'lerin lenf hücreleri tarafından kolayca alındığı ve seçici olarak kanser hücrelerini tahrip ettikleri gösterilmiştir (82).

Teşhis ve tedavi amacıyla ilaçları lenfatik sisteme hedeflendirmede kullanılan taşıyıcılardan bir diğeri lipozomlardır ve bu amaçla subkütan (s.c) uygulamaları üzerinde çalışılmaktadır (84). Lipozomun subkütan uygulamayı takiben lenfatik emilimini ve lenf nodları tarafından alımını etkileyen belirleyici faktörlerin lipozom boyutu ve uygulama bölgesi olduğu belirlenmiştir. Lipit bileşimi ve PEG kaplamanın s.c. uygulamayı takiben emilimi etkilemediği gösterilmiştir. Öte yandan, lipozom boyutu 0.1 μm 'den küçük olduğunda, emilim miktarının uygulanan dozun % 70'ine kadar çıkabildiği tespit edilmiştir.

Diğer bir yaklaşım ise, poli-laktit-ko-glikolik asit-paklitaksel (PLGA-PTX)'le jelatin sünger matrisin birleştirilmesi ile oluşmuş sistemlerle ilgilidir (65). Bu kombine sistem, jelatin matrisin yapısal üstünlüğü sayesinde sürekli salım sağlar. Tedavi edici ve koruyucu olarak lenfatik bölgeye doğrudan yerleştirilebilir (implantasyon). PLGA mikroküreleri püskürterek kurutma yöntemi kullanılarak hazırlanır. Partikül boyutları intraperitoneal ve intraplevral olarak lenfatik hedeflendirilmeye uygun olacak şekilde 1–8 μm aralığında hazırlanmıştır. PTX salımı PLGA parçalanmasına bağlı olarak kontrol edilir.

Bir başka çalışmada ise farklı PEG (200, 570, 2000 Da) türevleri ve 4-benzen sülfonat ile modifiye edilen polilizin dendrimerlerin lenfatik emilimi ve taşınımı

karşılaştırılmıştır (85). PEG 200'le hazırlanan dendrimerin s.c. uygulanmasını takiben hızlı bir şekilde ve tamamına yakını kan dolaşımına geçmiştir. Yalnız % 3 kadarı 30 saat içinde torasik lenfe geçmiştir. PEG zinciri artırılarak kana geçiş azaltılmış, lenfe geçiş ise 30 saat içinde % 29'a çıkartılmıştır. 4-benzen sülfonatlı dendrimerin ise kandan ve lenften iyi emilmediği görülmüştür. Ayrıca, pegile edilmiş polilizin dendrimerlerin s.c. enjeksiyon bölgesinden iyi emilim gösterdiği görülmüştür. Bu çalışmanın sonucunda, PEG boyutunun artmasıyla lenfatik emilimin arttığı ortaya konulmuştur.

Mitomisin C'nin intramuskuler ve intraperitoneal verilen su/yağ (s/y) ve yağ/su (y/s) emülsiyonlarının lenfatik taşınması kanıtlanmıştır (84). Bölgesel enjeksiyonu takiben emülsiyonların y/s > s/y > sulu çözelti olacak şekilde lenflere ulaştığı rapor edilmiştir. Buna bağlı olarak mide kanserinde kullanılmak üzere bir antikanser ilacı, pirarubisin (Lipiodol®), içeren emülsiyon formülasyonu geliştirilmiştir. Bu formülasyon içinde ilacın lenf nodunda ve enjeksiyon bölgesinde yaklaşık 7 gün kalabildiği gösterilmiştir (73).

Yağ bazlı formülasyonlar, ilacın absorpsiyonunu düzenlediği gibi, terapötik indeksi düşük olan ilaçlar için de yararlıdırlar. Bu formülasyonlar ilaçların absorpsiyonunu artırır, ilacın sistemik dolaşıma katılıp ilk geçiş etkisine uğramadan lenfatik taşınımını sağlarlar ve kolaylaştırırlar (86). SEDDS'ler, ilaç, yağ, yüzey etkin madde ve/veya yardımcı yüzey etkin madde ve yardımcı çözücülerin birleşerek emülsiyon damlacıkları meydana getirmesiyle oluşurlar, bu damlacıkların büyüklükleri 10–300 nm arasında olup, kendiliğinden mikro-emülsifiye olabilen ilaç taşıyıcı sistemler (SMEDDS) için ise fizyolojik sıvılarla dilüsyon sonucunda 50 nm'den az olabilmektedir (87). SEDDS'in, lipofilik yapıdaki ilaçların biyoyararlanımını belirgin bir şekilde artırdığı belirtilmiştir (88).

SEDDS'lerin potansiyel lenfotropik ilaç taşıyıcı sistemler olarak incelenmesi konusunda da çalışmalar yapılmaktadır (75, 89). Lenfatik geçiş, biyoyararlanımın artırılmasında etkili bir mekanizma olarak görülmektedir (58, 90). Bu konuda yapılan bir çalışmada; ontozoplast etkin maddesi çeşitli lipid bazlı sistemler ile formüle edilmiş ve formülasyonların ontozolasta ait oral biyoyararlanım ve lenfatik geçişe

etkisi incelenmiştir. Soya yağı ile hazırlanan yağ/su emülsiyonu, Gelucire 44/14 ve Peceol içeren 2 farklı SEDDS formülasyonu ve etkin maddenin Peceol'deki çözeltisinin incelenmesi sonucunda, tüm formülasyonların ontozola ait biyoyararlanımı kontrol süspansiyonuna göre artırdığı, SEDDS formülasyonunun ise daha hızlı bir absorpsiyon gösterdiği görülmüştür. Bu sonuçlar ışığında SEDDS'lerin ilaç emilimi sırasında enterositlerde yüksek ilaç konsantrasyonu sağlayabileceği ve lenfatik geçişi konsantrasyona bağlı olarak artırabileceği düşünülmektedir (91).

2.5. Peptit Yapılı Biyoaktif Moleküllerin Lenfatik Hedeflendirilmesi

Peptit-protein yapılı bileşiklerin gastrointestinal kanaldan zayıf absorpsiyon göstermesi ve stabilite sorunları oral formülasyonlarının geliştirilmesini sınırlayıcı etkenlerdir. Bu tip ilaçların absorpsiyonunun iyileştirilmesi için absorpsiyon artırıcı etki gösteren doymamış yağ asitleri ve gastrointestinal membranlara daha az zararlı özellikler taşıması nedeniyle doğal yağların kullanımı uygun olmaktadır. Ayrıca, intestinal lenfatiklere spesifik olarak hedeflenmiş ilaç sistemleri geliştirilmiştir. Antikanser bir ajan olan bleomisin absorpsiyonunun artırılması için dekstran sülfat ile iyon çifti oluşturulmuş ve bu şekilde lenfte yüksek konsantrasyona ulaşılmıştır (76). Bu amaçla uygulanan başka bir yol ise farmakolojik aktivitenin korunması koşuluyla, yağ asitleri kullanılarak peptitlerin lipofilik türevlerinin hazırlanmasıdır. Bu yolla tirotropin salgılayıcı hormon, tetragastrin, enkefalin, kalsitonin ve insülin gibi peptid yapılı moleküllerin türevleri hazırlanmıştır. Uygun karbon sayısına sahip yağ asitleri ile açılasyon sonucu peptitlerin permeabilite, lenfatik geçiş ve stabilitelerinde artış görülmüştür (74).

Peptit ve proteinlerin lenfatik taşınması üzerine yapılan çalışmalarda, d-1, 3, 4-H₂α-tokoferil nikotinat, alfa, beta ve gama tokotrienoller ve α-tokoferollerin orijinal dozlarının % 30'undan fazlasının lenfatik sisteme absorpsiyonu görülmüştür (74). Peptit yapılı ligantların hedeflendirilmesi için çeşitli nano boyutlu ilaç taşıyıcı sistemler hazırlanmıştır. Fosfolipit miseller (92), lipozomlar (93), kuantum noktaları (q-dots, quantum dots) (94), nanopartiküller (95) bunlardan bazılarıdır. İnsülinin kendine özgü reseptörüne hedeflendirilmesi için manyetik nanopartiküllerden yararlanılmıştır (96).

2.6. Kendiliğinden Emülsifiye Olabilen İlaç Taşıyıcı Sistemler (SEDDS, Self-Emulsifying Drug Delivery Systems)

Bu bölümde tez çalışmamızda kullanılan formülasyon sistemi hakkında bilgi verilmiştir. Bu kısımda, SEDDS'lerin tanımı, hazırlanışı, karakterizasyonu ve bu sistemlere ait literatür çalışmalarından örneklere yer verilmiştir.

2.6.1. SEDDS'lerin Tanım ve Üstünlükleri

SEDDS; yağ, yüzey etkin madde, yardımcı çözücü/yardımcı yüzey etkin madde ve ilaç bileşenlerinden oluşan, su ile düşük hızda karıştırıldıklarında yağ/su mikro/nanoemülsiyonu oluşturabilen izotropik ve termodinamik açıdan dayanıklı sistemlerdir. *In vivo* ortamda ise gastrointestinal sıvılar gibi sulu ortamlarda seyreltilmeleri sonucunda, gastrointestinal ortamın hareketinin sağladığı hafif çalkalanma ile mikroemülsiyon damlacıkları oluşmaktadır. Bu formülasyonlar damlacık boyutlarına göre iki grup altında toplanabilirler: 50–300 nm aralığında damlacık boyutuna sahip olan SEDDS'ler kendiliğinden nano emülsifiye olabilen ilaç taşıyıcı sistemler (SNEDDS), 50 nm ve altında şeffaf görünümlü sistemler ise kendiliğinden mikro emülsifiye olabilen ilaç taşıyıcı sistemler (SMEDDS) olarak tanımlanmaktadır. Nano boyutlu damlacık büyüklüğüne sahip emülsiyonlar için literatürde submikron emülsiyonlar, nano-emülsiyonlar, miniemülsiyonlar gibi terimlerin kullanıldığı görülmektedir. Bununla beraber kısa ve öz olması, ayrıca termodinamik olarak stabil sistemler olan mikroemülsiyonlar ile kavram kargaşasını önlemek amacıyla, ortalama 50–300 nm aralığında damlacık boyutuna sahip, kinetik olarak stabil emülsiyonlar için nanoemülsiyon terimi tercih edilmektedir (97–99). Bu sistemler (SEDDS), oluşturdukları küçük boyutlu damlacıklar ve gastrointestinal kanalda lipoliz sonucu oluşturdukları karışık miseller ile geniş yüzey alanı sağlamaları, ilaç difüzyonunu artırmaları, yüzey etkin madde varlığı nedeniyle mukozal geçirgenlikte artış sağlamaları ve içeriklerinde bulunan uzun zincirli yağlara bağlı olarak lenfatik emilimi artırmaları nedeniyle yüksek etkinlik göstermektedirler (87). Yağ bazlı sistemler oldukları için suda çözünürlük sorunu olan (Class II, IV) ilaçların formüle edilmesinde kullanılmaktadırlar. Son yıllarda, suda az çözünen ilaçların yavaş ve tam olmayan çözünmeleri nedeniyle kısıtlanan emilimlerini

sindirim kanalında mikroemülsiyon oluşumu ile düzenlemek için yağ bazlı formülasyonlardan olan SMEDDS'ler üzerinde çalışmalar yoğunlaşmıştır (100–103). Bu formülasyonların üstünlükleri arasında etkin madde çözünürlüğünün artması ve etkin maddenin vücut içerisinde parçalanmaya karşı dayanıklılığının artması, kolay üretim ve son ürünün yumuşak jelatin kapsüller içerisinde uygulanma potansiyeli sayılabilir (104). Yumuşak kapsüle dolum ile, sıvı formülasyonlara ait taşınma, saklanma ve stabilite gibi sorunların çözümü ile hasta uyuncu artmaktadır.

Lipitlerin ve lipofilik yardımcı maddelerin, suda az çözünen/hiç çözünmeyen ilaçların absorpsiyonunun ve oral biyoyararlanımının artırılmasında oldukça önemli ve yararlı etkileri vardır. Lipitlerin ve lipofilik yardımcı maddelerin oral verilmiş sonrasında ilacın absorpsiyonunu, biyoyararlanımını ve dağılımını etkilemelerinde 3 temel mekanizma etkilidir. Bunlar; intestinal ortamın içeriği ve özellikleri, lenfatik ilaç geçişinin katkısı ve enterosit bağımlı geçiş ile etkileşimdir (105). SEDDS'ler özellikle suda çözünürlük sorunu olan veya peptit-protein yapılı ilaçların oral biyoyararlanımlarını artırma amacı ile üzerinde sıkça çalışılan sistemlerdendir (104, 106–110).

Yağ bazlı sistemlerden olan SEDDS'ler ile formülasyon, lenfatik ilaç geçişini artırmak için kullanılan yollardan birisidir. İntestinal lenfatikler, diyetle alınan yağların, yağda çözünebilen vitaminlerin ve lipofilik ilaçların sistemik dolaşıma geçişini sağlamak üzere özelleşmiştir (111). Bu nedenle, lenfatik sistem lipofilik ilaçların sistemik alımını artırmak için kullanılabilecek, yüksek ilaç geçiş kapasitesine sahip önemli bir yoldur. Formülasyon içeriğinde uzun zincirli yağ asitlerinin kullanılması ile lipoprotein sentezinin ve buna bağlı olarak lenfatik absorpsiyonun artacağı bilinmektedir. Ayrıca ilacın lenfatik sistem tarafından alınması, hepatik ilk geçiş etkisini düşüreceği için ilacın biyoyararlanımının artmasına da yardımcı olur (105).

2.6.2. SEDDS'lerde Kullanılan Yardımcı Maddeler

Bu sistemler, maddelerin belli oranlarda, belirli sıcaklıklarda karışımları sonucu oluşurlar. Bu tip sistemler için özel yardımcı maddeler (yağ, yüzey etkin madde yardımcı çözücü/yüzey etkin madde) kullanılmaktadır. Firmaların çeşitli

piyasa isimleri ile çıkardıkları yağlardan bazıları; Capmul MCM® (Gliseril monokaprilokaprat) (112), Labrafil M1944CS® (Oleil polioksilgliserit) (113), Labrafil M2125CS® (Linoleil polioksilgliserit) (113), Maisine 35-1™ (Gliseril monolinoleat) (114), Myvacet 9-45® (iki –OH grubundan asetile edilmiş monogliserit) (115), Peceol™ (Gliseril monooleat)'dür (91). Bu yüzden HLB değerleri 3–5 arasında değişmektedir. Yüzey etkin maddeler arasında ise; Tween 80® (Polioksietilen 20 Oleat) (112), Gelucire 44/14® (Lauroil polioksilgliserit) (116), Labrasol® (Kaprilokaproil polioksilgliserit) (117, 118), Cremophor EL® (Polioksietilengliseroltririsinoleat 35), Cremophor RH 40® (olioksietilengliseroltririsinoleat) sayılabilir (108, 112). Yüzey etkin maddelerin HLB değerleri 12–16 arasında değişmektedir.

Lipid bazlı yardımcı maddelerin öncelikli kullanım alanları; çözünürlüğün artırılarak biyoyararlanımın artırılması, lenfatik hedeflendirme ve enterosit bağımlı geçişin ayarlanmasıdır (119). Bağırsaklardan yağların emilimi, yağların pankreatik enzimlerle parçalanmasını takiben çeşitli safra tuzları ile misel oluşturmaları yolu ile gerçekleşir. İlaçların lipid bazlı sistemler ile vücuda verilmesini takiben bu yolla ilaçların da enterosit bağımlı geçişi sağlanabilir. Yağ olarak değişik doygunluk derecelerine sahip uzun ve orta zincirli trigliseritler, soya yağı (103), mısır yağı (120), zeytin yağı (121), DL-alfa tokoferol (Vitamin E) (122), etil oleat (123) gibi çeşitli yağlar kullanılmaktadır. Doğal yağlara nazaran doymuş veya hidrolize edilmiş yarı sentetik türevler daha iyi çözünürlük göstermeleri açısından tercih edilmektedir (87).

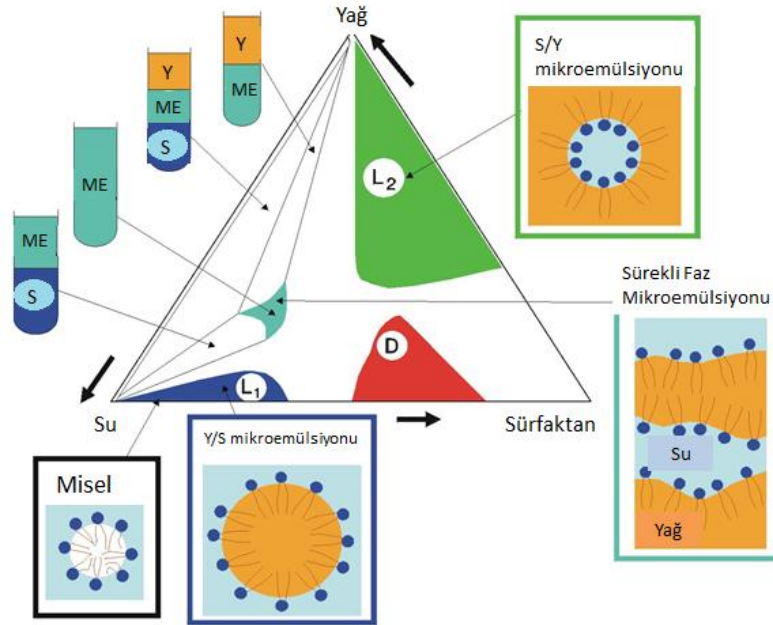
Yüzey etkin madde olarak yüksek HLB değerine sahip yarı katı veya sıvı yüzey etkin maddeler kullanılmaktadır. SEDDS'lerde yüzey etkin madde oranı genel olarak % 30–60 arasında değişmektedir (87). Yüzey etkin madde oranının yüksek olması nedeniyle yüzey etkin maddenin güvenilirliği büyük önem taşımaktadır. Doğal yüzey etkin maddeler bu açıdan daha uygun olmalarına rağmen, emülsifikasyon kapasitesi açısından sentetik yüzey etkin maddeler daha fazla üstünlük sağlamaktadırlar. Ayrıca kullanılan yüzey etkin maddenin yükü de önemli bir faktördür. Bu açıdan da iyonik olmayan yüzey etkin maddeler toksisite yönünden

tercih edilmektedirler. Günümüzde oral kullanımı onaylanmış birçok sentetik yüzey etkin madde bulunmaktadır.

Yardımcı çözücü/yardımcı yüzey etkin madde olarak etanol, propilen glikol (112) gibi organik solvanlar, gliserol ve poli etilen glikol türevleri (103), poligliseril 6-dioleat (Plurol Oleique®) (124), oral veriliş için uygun bazı yardımcı çözücü/yardımcı yüzey etkin maddelere örnek olarak verilebilir. Öte yandan, alkol türevleri gibi uçucu maddelerin, SEDDS'lerin içine konulduğu jelatin kapsüllerden buharlaşması ile ilacın çökmesi söz konusu olabilir(87).

2.6.3. SEDDS'lerin Hazırlanması

SEDDS'lerin tasarımında üçgen faz diyagramlarından yararlanılır (Şekil 2.5). Çalışılan bölgeler içerisinde teknolojik açıdan uygun olanlar belirlenerek bu bölgelerden seçilen formülasyonlar damlacık büyüklüğü ve dağılımı, zeta potansiyel (ζ), fiziksel görünüş ve mikroskopik açılarından değerlendirilir.



Şekil 2.5. Klasik bir üçgen faz diyagramı ve bölgeleri, S: Su, Y: Yağ, ME: Mikroemülsiyon (125).

Şekil 2.5'de klasik bir üçgen faz diyagramını ve diyagram üzerinde belirlenmiş bölgelere ait şekil görülmektedir. Üçgen faz diyagramları üzerinde emülsiyonun

içerdiği yağ, su ve yüzey etkin madde içeriklerine göre değişen mikroemülsiyon, nanoemülsiyon gibi bölgeler belirlenir. Ayrıca şekilde gri ile gösterilen bölgede faz ayrımı olduğu görülmektedir.

Bu tip sistemlerin tasarımı yoğun işgücü, malzeme ve zaman gerektirmektedir. Bunun nedenleri arasında; yardımcı maddelerin birden fazla ve çok çeşitli olması nedeniyle oluşan yüzlerce formülasyon, bu formülasyonların el ile hazırlanması, dinamik ışık saçılımı ve fiziksel inceleme gibi analiz yöntemlerinin düşük verimli olması, önemli bir kısmı viskoz ve yarı katı yapıda olan yardımcı maddelerin küçük miktarlarda tartımının zor olması nedeniyle küçük ölçekte üretilmemesi ve bu yüzden etkin maddelerin de küçük miktarlarda kullanılamaması sayılabilir. Bu sebeple, formülasyon seçimi amacıyla yeni teknolojik yöntemler geliştirilmektedir. Günümüzde yapılan bir çalışmada “High Throughput Screening System” (Yüksek Verimli Tarama Sistemi) adı verilen bir yöntem ile uygun SEDDS formülasyonları hızlı ve etkin bir şekilde belirlenmiştir (126). Bu yöntemde formülasyonlar, çok sayıda yardımcı madde kullanılarak robotik sıvı karıştırıcısıyla mikrolitre düzeyinde hazırlanmış, hızlı bir türbidite analizi ile faz stabilitesi ve mikroemülsiyon görüntüleri incelenmiş ve uygun formülasyonlar seçilmiştir. Türbidite analizinde formülasyonların bulanıklık şiddetleri ölçülmekte ve bu durum fiziksel stabilite hakkında bilgi vermektedir.

2.6.4. SEDDS’lerin Oluşum Mekanizması

Kendiliğinden emülsifikasyon dışarıdan enerji desteği olmadan, birbiri ile karışmayan iki sıvının temas halinde emülsiyon oluşturması esasına dayanan süreçtir. Bu süreç ancak belirli koşullar altında gerçekleşirken bazı durumlarda nano boyutlu damlacıkların oluşumu ile sonuçlanmaktadır (127).

Kendiliğinden emülsifikasyon ilk defa 1878 yılında Johannes Gad tarafından ortaya atılmıştır (128). Uzun süre önce ortaya çıkmış olmasına rağmen mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Kendiliğinden emülsifikasyon mekanizmaları üzerine çeşitli görüşler mevcuttur. Bunlardan bazıları yüzeylerarası türbülans, negatif yüzeylerarası gerilim, difüzyon ve bükülme teorileridir (129). Yüzeylerarası

türbülans teorisinde, yüzey etkin madde moleküllerinin yüzeyde ya da yüzeye yakın bölgelerdeki tekdüze olmayan dağılımlarına bağlı olarak yüzeylerarasındaki gerilimdeki azalma nedeniyle stabilite bozulur ve damla oluşumu gözlenir. Negatif yüzeylerarası gerilim teorisinde ise yüzey etkin madde veya yardımcı yüzey etkin madde moleküllerinin arayüzeyde tutunması nedeniyle yüzeylerarası gerilim oldukça azalır (<1 mN/m) ve sonrasında bir anlığına sıfırın altına düşer. Bu sebeple arayüzey artar ve herhangi bir dalgalanma arayüzeyi bozabilir. Bahsedilen iki teoride de mekanik bir dayanıksızlık durumu mevcuttur. Difüzyon ve bükülme teorisinde ise emülsifikasyon kimyasal bir temele dayanır ve oldukça yüksek yüzey geriliminde bile gerçekleşebilir. Bu teoride iki fazda da çözülebilen bir yardımcı yüzey etkin madde varlığı ile bir fazın diğerine difüzyonu gerçekleşir. Bu durumda yardımcı yüzey etkin maddeyi daha fazla çözen faz difüze olan fazla doymun hale gelir. Kendiliğinden emülsifikasyon performansı damlacık büyüklüğü açısından incelendiğinde, düşük damlacık büyüklüklerinde daha etkin emülsifikasyon görülmüştür. Sistemin kendiliğinden emülsifikasyon yeteneği yağ ve yüzey etkin maddenin cinsine bağlıdır. Araştırmacılar emülsifikasyon etkinliğinin yüzey etkin madde konsantrasyonu, yağ/yüzey etkin madde oranı, emülsiyonun polaritesi, damlacık büyüklüğü ve yükü gibi formülasyon parametrelerine bağlı olduğunu düşünmektedirler (130). Reiss'e göre (131) sistemin entropisi dispersiyonun yüzey alanını artırma yönünde değiştiği anda kendiliğinden emülsifikasyon gerçekleşmektedir. Ayrıca kendiliğinden emülsifikasyonun gerçekleştiği sistemlerde yüzey ayırma (surface shearing) karşı direnç olmamalı ve sistemin serbest enerji ihtiyacı düşük olmalıdır (120, 132).

Yüzey etkin madde konsantrasyonu ve yapısı da emülsiyon damlacıklarının oluşumu ve büyüklüklerini etkileyen diğer bir etkidir. Henry ve diğ. (133) yaptıkları bir çalışmada, yüzey etkin madde yapısı ve yüzey etkin madde konsantrasyonunun damlacıkların ayrılması ve birleşmesi üzerine etkisini incelemişlerdir. Yüksek basınçlı homojenizatörde hazırlanan dekan/su nanoemülsiyonları üzerinde yapılan bu çalışmada, incelenen 6 yüzey etkin maddeden herbiri için yüzey etkin madde konsantrasyonu arttıkça damlacık büyüklüğü azalmıştır. Yüzey etkin maddeler arasında kullanılan 3 sükroz monoesteri

birbirlerine yakın damlacık boyutu gösterirken, Tween® 20, Tween® 80 ve Brij® 96v'de daha farklı damlacık boyutları elde edilmiştir. Bunda yüzey etkin madde yapısının, emülsifikasyon sürecinde damlacıkların ayrılması ve birleşmesi üzerine olan etkilerinin neden olduğu söylenmiştir.

2.6.5. SEDDS'lerin Karakterizasyonu

SEDDS'lerde öncelikli olarak fiziksel incelemeler yapılır. Türbidimetrik yöntemler kullanılarak emülsiyon oluşma hızı ve tekrarlanabilirliği saptanabilir (112). 50 nm civarında damlacık büyüklüğüne sahip SMEDDS'ler berrak görünüme sahipken damlacık büyüklüğü arttıkça bulanıklık artmaktadır. Ayrıca seyreltme faktörü formülasyonun fiziksel görünüşünde değişikliklere neden olabilir. Formülasyonlar berrak görünümde iken, seyreltme arttıkça bulanık görünümünden faz ayırımına kadar değişen görünüme sahip olabilirler (115, 134).

Formülasyonların morfolojik açıdan görüntülenmesinde geçirimli elektron mikroskobu (Transmission Electron Microscope, TEM) kullanılabilir (107, 114, 135). Wasan ve diğ.'nin (136) yaptıkları bir çalışmada ise atomik güç mikroskobu (Atomic Force Microscopy, AFM) formülasyon stabilitesinin ve nano boyutta faz ayırımının gözlenmesi için kullanılmıştır.

Diğer önemli bir faktör ise damlacık büyüklüğü ve dağılımıdır. Damlacık büyüklüğü ve dağılımı ilaç emilimini etkileyen bir faktördür. Küçük damlacık büyüklüğüne sahip sistemler daha geniş yüzey alanı sağlamaları nedeni ile ilaç absorpsiyonunda da artış sağlarlar (123). Damlacık büyüklüğünün ölçülmesinde kullanılan en yaygın yöntemlerden biri foton korelasyon spektroskopisi (Photon Correlation Spectroscopy, PCS)'dir (109, 118). Kuasi-elastik ışık saçılımı (Quasi-Elastic Light Scattering , QELS) veya dinamik ışık saçılımı (Dynamic Light Scattering, DLS) olarak da bilinen bu yöntem, koloidal partiküllerin sıvı içerisindeki rastgele hareketleri yani "Brown Hareketleri" yardımı ile partikül/damlacık büyüklüğünün ölçümü esasına dayanır. Bu ölçümlerde, sıvı içinde difüze olan partikül/damlacıklardan yansıyan lazer ışığının yoğunluğundaki değişim partikül/damlacıkların büyüklükleri hakkında bilgi verir.

Damlacıklara ait diğer bir özellik ise damlacıkların yüküdür. Zeta potansiyel değerleri formülasyonda kullanılan yüzey etkin madde ve yağların yüküne bağlıdır. Damlacık yükü ilaç yüklemeye ve stabilitede etkili olmaktadır. Zeta potansiyelin yani damlacıklar arası itici kuvvetlerin artması, damlacıkların birleşmesini engelleyerek daha stabil emülsiyon oluşumunu sağlarken, düşük zeta potansiyele sahip formülasyonlarda faz ayrımı görülmektedir (134).

SEDDS formülasyonlarında, yüksek yüzey etkin madde konsantrasyonları nedeniyle su ile seyreltilmelerini takiben liyotropik sıvı kristal yapılar (lamellar, hekzagonal, kübik) da oluşabilir. Su ile seyreltme oranına bağlı olarak sıvı kristal fazların incelenmesi ve bunun ilaç salımı ve çözünürlüğüne etkisi küçük açılı x-ışını saçılımı (Small-Angle X-ray Scattering, SAXS) ile incelenmiştir (137). Bu tip sistemlerden salım üzerine etkili faktörlerden bazıları sıvı kristal fazın tipi, şişme ve ilaç yükleme kapasitesi, ilaçlar arasındaki elektrostatik etkileşimler ve lipid çift tabakalarıdır (138).

2.6.6. Katı SEDDS

Sıvı formülasyonlar olarak hazırlanan SEDDS'lerin, sonsuz fiziksel dayanıklılığa sahip sistemler olmalarının yanında taşıma kolaylığı sağlanması ve mikrobiyolojik dayanıklılıklarının artırılması amacıyla katı dozaj formu şekline getirilmeleri için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Katı SEDDS formülasyonları ile yüksek dayanıklılık, tekrarlanabilirlik ve hasta uyuncunun artması gibi üstünlükler sağlanabilmektedir.

Kapsüle dolum teknolojisi, sıvı veya yarı katı sistemlerin enkapsüle edilerek oral yolla uygulanmasında kullanılan en kolay ve yaygın teknolojidir. Fakat yüksek maliyet ve kapsül deformasyonu gibi sakıncaları bulunmaktadır. Bu teknikte dikkat edilmesi gereken noktalardan en önemlisi; yardımcı maddelerin kapsül materyali ile geçimli olmasıdır. Diğer bir önemli parametre ise dolum sıcaklığıdır. Yarı katı veya katı yağ bazlı yardımcı maddelerin kullanıldığı durumlarda dolumun yapılacağı kapsüller de formülasyonun eridiği sıcaklığa ısıtılmalı, etkin maddenin disperse olduğu durumlarda faz ayrımı ve çökme olmayacak şekilde çalkalama altında dolum

yapılmalıdır (139). Li ve diğ. yaptıkları çalışmada (140), lipid ve yüzey etkin madde karışımını içeren mikroemülsiyon formülasyonu, katı PEG matriksi kullanılarak sert jelatin kapsüllere doldurulmuş ve soğumaya bırakılmıştır. Sonuçta 150 nm'den küçük damlacık boyutlarına sahip mikroemülsiyon formülasyonu oluşumu ile, suda çözünürlük sorunu olan ilacın salımında artış gözlenmiştir. Bunun yanında PEG'in emülsifikasyon ve salım sürecinde negatif bir etkisi olmadığı gösterilmiştir.

SEDDS'lerin, sıvı halde sert ve yumuşak kapsüllere doldurulmasının yanında çeşitli yöntemlerle pellet veya toz haline getirildiği görülmektedir (141). Sıvı veya yarı katı sistemleri katı dozaj formuna dönüştürme tekniklerinden bazıları püskürterek kurutma (142), dondurarak kurutma (143), katı taşıyıcılara adsorpsiyon (144), yaş granülasyon (145) ve yaş ekstrüzyon (146) 'dur.

SEDDS'lere uygulanan katılaştırma yöntemlerinden biri olan püskürterek kurutma tekniği, katı taşıyıcı içeren sıvı formülasyonun püskürtücüden geçirilerek atomize damlalar haline getirilmesi, kurutma odasına gönderilerek kontrollü sıcaklık ve hava akımında formülasyon içindeki suyun uzaklaştırılması ve kuru partiküllerin oluşması esasına dayanmaktadır (147). Bu partiküller, daha sonra tablet halinde veya kapsüllere doldurularak da formüle edilebilmektedir. Püskürterek kurutma tekniği ile yapılan bir çalışmada Labrasol, Cremophor, Etil Oleat ve Nimodipin'den oluşan sıvı sistem ve katı taşıyıcı olarak dekstran kullanılmıştır (135). Bu çalışmada, konvansiyonel tablet ile karşılaştırıldığında sıvı SMEDDS'in 2.6, katı SMEDDS'in ise 6.6 kat daha fazla oral biyoyararlanım gösterdiği bulunmuştur.

Katı taşıyıcı üzerine adsorpsiyon tekniği ile de serbest akışlı toz elde edilmesi mümkündür. Bu basit teknik, katı adsorban üzerine eklenen sıvı formülasyonun karıştırılması esasına dayanır. Bu teknikle tekdüze içeriğe sahip toz eldesi ve yüksek verimle adsorpsiyon (% 70'in üstünde) sağlanabilmektedir (148). Katı taşıyıcı olarak silika ve silikatlar (149), magnezyum trisilikat, magnezyum hidroksit, talk, krospovidon, çapraz bağlı sodyum karboksi metil selüloz ve çapraz bağlı polimetil metakrilat kullanılabilir (150). Wang ve diğ. (151) ekstrüzyon/sferonizasyon tekniği kullanarak nitrendipin içeren katı SEDDS formülasyonları hazırlamışlar, *in vitro* salım ve *in vivo* biyoyararlanımı değerlendirmişlerdir. Katı adsorban olarak silikon dioksit

ve krospovidon kullanılan bu çalışmada tekdüze büyüklükte pelletler elde edilmiştir. Pellet, sıvı SEDDS ve konvansiyonel tabletler üzerinde yapılan oral biyoyararlanım çalışmasında sıvı ve pellet SEDDS'ler arasında fark bulunmazken, tablet ve pellet karşılaştırıldığında pelletlerde 1.6 kat daha fazla biyoyararlanım elde edilmiştir.

Bu tekniklerin yanında; kendiliğinden emülsifiye olabilen katı dispersiyonlar, boncuklar (152), mikroküreler (153) ve nanopartiküller (154, 155) gibi kontrollü salım yapabilen yeni ilaç taşıyıcı sistemler de çalışılan katı dozaj formlarındandır. Ayrıca yağ bazlı formülasyonların gastrointestinal emilimi artırmasının yanısıra rektal/vajinal emilimi de artırması düşüncesi ile kendiliğinden emülsifiye olabilen supozituarlar da hazırlanmıştır (156). Diğer bir yaklaşım ise beyin tümörlerinde kullanılan ve kısa yarılanma ömrüne sahip BCNU etkin maddesinin SEDDS formülasyonunun, PLGA implantları ile beraber hazırlanmasıdır (157). Bu şekilde, etkin maddenin *in vitro* yarılanma ömrünün 45 dakikadan 130 dakikaya çıkarıldığı görülmüştür.

2.6.7. SEDDS'ler Üzerine Yapılan Güncel Çalışmalar

SEDDS'ler ile yapılan çalışmalarda antihipertansif, analjezik-antienflamatuar, antiviral, antikanser, antiepileptik, bakteriyostatik etkili çeşitli etkin maddeler kullanılmıştır (100-103, 112, 117, 134). SEDDS'ler kullanılarak yapılan çalışmalarda kullanılan ilaçlara örnek olarak kandesartan (134), valsartan (100), daidzein (102), paklitaksel (101), karbamazepin (103), fenitoin (117) ve lasidipin (112) verilebilir.

Değişik ticari isimlerle piyasada bulunan yağ, yüzey etkin madde ve yardımcı çözücü/yüzey etkin maddelerin kombinasyonları ile hazırlanan bu formülasyonlarla birçok etkin maddenin çözünürlük, emilim ve biyoyararlanımında artış sağlanmıştır.

Nekkanti ve diğ.'nin (134) yaptıkları bir çalışmada kandesartan sileksetil kullanılarak SMEDDS formülasyonları hazırlanmış ve bunlar sert jelatin kapsüllere doldurularak analiz edilmiştir. Sonuçta SMEDDS formülasyonlarının suda az çözünen etkin maddenin çözünürlük ve dissolüsyonunu artırdığı ve buna bağlı olarak terapötik etkinliği de artırabileceği gösterilmiştir. Dixit ve diğ. (100), tavşanlar

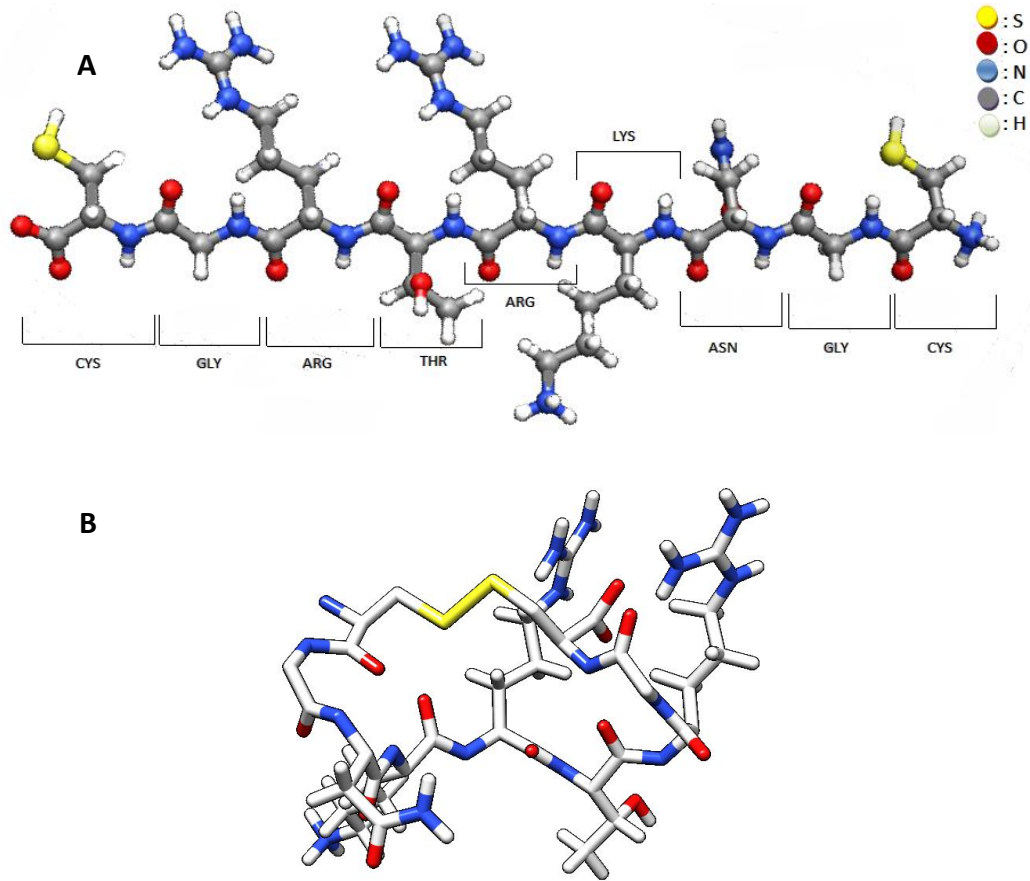
üzerinde yaptıkları oral biyoyararlanım çalışmalarında, hazırladıkları SMEDDS formülasyonları ile piyasadaki kapsül formülasyonuna göre valsartan emiliminde 1. 78 kat artış gözlemişlerdir.

Wei ve diğ. (158) yaptığı bir çalışmada karvedilol içeren SEDDS'in ozmotik tablet şekline getirilmesiyle hem biyoyararlanımda artış, hem de etkin maddenin plazma konsantrasyonunun sabit tutulması amaçlanmıştır. bu çalışmada etkin maddenin bağıl biyoyararlanımı % 156.78 bulunurken, kan konsantrasyonunun normal piyasa tabletine göre daha uzun süre sabit kaldığı gösterilmiştir.

SEDDS ile peptit/protein yapısındaki ilaçların formüle edilmesine ilişkin çalışmalar da bulunmaktadır (106, 107, 141, 159). Ayrıca, bu konuda patentler alındığı görülmektedir (160, 161). Proteinlerin makromoleküler olması nedeniyle geçirgenliklerinin düşük olması, ayrıca gastrointestinal kanalda enzimler varlığında kısa sürede parçalanmaları ve düşük absorpsiyon göstermeleri oral kullanımlarını kısıtlamaktadır. Mikroemülsiyon damlacıkları içerisine hapsedilen bu yapıdaki ilaçların ortam koşullarından korunabilmesi ve lipidik bir yapı içinde hücre membranlarından daha kolay geçebilmesi amaçlanmaktadır. Rao ve Shao (108) model protein olarak floresan işaretli β -laktamaz kullanmış ve katı dispersiyon tekniği ile etkin maddeyi SNEDDS formülasyonları içine yüklemişlerdir. 4 °C'de 12 hafta boyunca yapılan stabilite çalışmalarında enzim aktivitesinde yalnızca % 10'luk bir düşüş gözlenmiştir. Ayrıca organ transplantasyonunda immün baskılayıcı olarak kullanılan ve suda çok az çözünürlüğe sahip siklik peptit yapısındaki siklosporin A'nın artırılmış oral biyoyararlanım sağlayan mikroemülsiyon formülasyonu Neoral® (Novartis, www.novartis.com.tr), yumuşak jelatin kapsül ve oral çözelti olarak piyasada bulunmaktadır. Neoral® oral çözeltisi içinde siklosporin A zeytin yağı içinde çözünmüştür; formülasyonda ayrıca kosolvan olarak alkol ve yüzey etkin madde olarak Labrafil®M 1944 CS bulunmaktadır. Piyasada bulunan diğer SEDDS preparatlarına bakıldığında peptit yapıda olmayan antiviral ajanlar görülmektedir. Ritonavir içeren Norvir® (Abbott, www.abbott.com.tr) ve sakonavir içeren Fortovase® (Roche, www.roche.com.tr) bunlara örnek olarak verilebilir

2.7. Etkin Madde Hakkında Bilgi

Kanser hücreleri, membranları üzerinde spesifik reseptörler taşırlar. Bu da kanser hücrelerinin moleküler hücre yüzey markerları (spesifik membran ligantları) ile hedeflendirilmesine olanak sağlar (46). Faj sunumu (phage display) tekniği kullanılarak elde edilen ve yüzey immunglobulini, kanser hücre yüzeyi ve birçok tümörün damar yapısındaki spesifik bölgelere bağlanabilen peptit yapıları ligantlar bu amaçla kullanılabilir (46, 51, 66, 162, 163). Tümör dokusunda bulunan kan ve lenf damarları genellikle anjiogenezle ilgili ve bazı tümör tiplerine spesifik reseptörler taşırlar (66). Faj sunumu tekniği ile MDA-MB-435 meme kanseri ksenograftlarından, sadece tümör lenf damarlarına spesifisite gösteren 9 amino asitli siklik bir peptit olan LyP-1 (CGNKRTRGC) teşhis edilmiştir (51). Molekül ağırlığı 995.2 g/mol olan bu peptidin lineer ve siklik yapısı Şekil 2.6'da görülmektedir.



Şekil 2.6. Lyp-1 peptidinin (A) düz zincir (Cys-Gly-Arg-Thr-Arg-Lys-Asn-Gly-Cys) ve (B) siklik yapısı.

LyP-1, tümör ve endotel hücrelerine özgü bir marker olmakla beraber diğer vasküler peptitlerden farklı olmak üzere sadece tümör lenf damarlarına spesifisite göstermektedir (163). Keza, LyP-1 peptidinin intravenöz injeksiyon sonrası tümör ve metastatik bölgelerde yoğun bir şekilde toplandığı görülmüştür. Tümöre ait lenfatik endotel hücrelerine yerleşme ve internalizasyon özelliğinin yanında, bağlandığı hücrede apoptozu indüklemesi, LyP-1 peptidini diğer tümör spesifik peptitler arasında eşsiz kılmaktadır. Tümör geliştirilen farelerde LyP-1'in sistemik uygulanması sonucu tümör büyümesini inhibe ettiği görülmüştür (164). Bu etkinin, peptidin sitotoksik aktivitesine bağlı olduğu sanılmaktadır. LyP-1'in tümör lenfatik damarlarına spesifik olarak bağlanması, bu damarların normal lenfatik damarlardan farklılık gösterdiğinin anlaşılmasını sağlamıştır. Daha sonra Zhang ve diğ. (163) tarafından yapılan çalışmalarda tümör lenfatik damarlarına özgü peptit panelleri tanımlanmıştır. Bu çalışma ile tümör gelişimi sırasında öncelikle kan damarlarında olmak üzere lenfatik damarlarda da organ ve bölgeye spesifik değişimler olduğu gösterilmiştir. LyP-1 ile yapılan diğer bir çalışma ise, floresan bağlı peptidin görüntüleme amacıyla kullanılmasıdır. LyP-1'in hedef hücre çekirdeğine internalizasyonu ve toplanması sonucu artan floresan konsantrasyonu ile tümörün başarıyla görüntülenmesi sağlanmıştır (51). Ayrıca intravasküler görüntüleme ve ilaç taşınma potansiyeli ile ilgi çeken inorganik q-dot partiküllerinin, vasküler yerleşme özelliği olan F3 ve LyP-1 peptitleri ile kaplanması ve intravenöz uygulanması ile hedeflendirme amaçlanmıştır (45). F3 bağlı partiküllerin kan damarlarında, LyP-1 bağlı partiküllerin ise aynı tümörde lenf damarlarında yerleştiği görülmüştür. Peptitlerin tümör dokusuna yerleşme ve internalizasyon özellikleri kullanılarak çeşitli terapötik moleküllerle konjugatları hazırlanmıştır. Sık kullanılan bir antikanser ajan olan Doksorubisin ile RGD ve NGR peptidlerinin konjugatları meme kanseri üzerinde araştırılmıştır. Peptit konjugatı kullanıldığında daha uzun yaşam süresi ve daha az akciğer metastazına rastlanmıştır (162).

LyP-1, CGKRK ve F3 peptitleri kullanılarak yapılan bir çalışmada virüs aracılı gen transferi artırılmaya çalışılmıştır. Viral zarfın modifikasyonu ile yüzeye yerleştirilen peptitler MDA-MB 435 meme kanseri ve HepG2 hepatokarsinoma

hücre hatlarında bağlanma deneyleri yapılarak incelenmiştir. Sonuçta, virüsün hücre içine internalizasyonu ve gen transferi, meme ve hepatokarsinoma hücrelerinde sırasıyla 7 ve 24 kat artmıştır. LyP-1 peptidi insan meme kanser hücre hattında modifiye virüse ait viral bağlanmayı , diğer peptitlere göre daha fazla özgünlük göstererek büyük ölçüde inhibe etmiştir (55).

Alınan sonuçlar doğrultusunda yapılan *in vivo* çalışmalarda, modifiye virüs, MDA-MB 453 ve MDA-MB 231 tümörü geliştirilen farelere iv enjeksiyon ile uygulanmıştır. Enjeksiyon sonrası modifiye virüsün tümörde daha çok toplandığı görülmekle beraber diğer organlarda daha az dağılım göstermiştir. Peptidi sunan virüs ile yapılan çalışmalarda sitotoksik etki gözlenmemiştir (54).

Virüsle yapılan çalışmalarda peptidin pozitif yüklü olduğu ve hücre yüzeyi ile etkileşiminin arttığı söylenmektedir. Ayrıca LyP-1 peptidinin hücre yüzeyinde bağlanma bölgesinin henüz bilinmediği ve hücre yüzey moleküllerinden heparan sülfat ve fosfatidil serinle olabilecek olası etkileşimlerle bağlantılı olabileceği söylenmektedir (55).

Fogal ve diğ. (165) 'nin yaptığı çalışmada bu peptidin mitokondriyal ve hücre yüzey proteinlerinden p32/gC1qR'ye bağlandığı bulunmuştur. P32 halka şeklinde trimer bir proteindir (166) ve öncelikli olarak mitokondride yerleşmiştir (167). Ancak, hücre yüzeyinde ve çekirdekte de bulunduğu rapor edilmiştir (168). Birçok hücre dışı ve hücre içi proteinin bağlandığı p32 reseptörünün çok fonksiyonlu bir şaperon protein olabileceği düşünülmektedir. P32'nin hücrede oksidatif fosforilasyonun düzenlenmesinde rol aldığı ve buna bağlı olarak hücre içi dejenere organellerin sindirilmesinde (otofaji) etkili olduğu varsayılmaktadır (167). P32 ekspresyonunun kanserli hücrelerde artmış olduğu da gösterilmiştir (169). LyP-1 yapısında küçük, bağlanma afinitesi yüksek ve internalizasyon yeteneğine sahip bir ligandın bağlandığı bu reseptörün tümör hücrelerinde olası hedeflendirme noktalarından biri olabileceği düşünülmektedir.

LyP-1 peptidi ile çalışılan diğer nanosistemlerden biri de nanopartiküllerdir. Maleimid-PEG-PLGA kopolimerinin maleimid ucundan sülfidril grupları aracılığı ile polimere bağlanan peptit ile konjugasyonu gerçekleştirilmiştir. Böylece konjuge

polimer ile hazırlanan nanopartikülün yüzeyinde sergilenen peptitler hedeflendirme bölgeleri olarak kullanılmıştır. Bu yolla hazırlanan 6-kumarin yüklü nanopartiküller ile insan pankreatik kanser hücrelerinde yapılan (BxPC-3) *in vitro* hücre içine alım çalışmalarında 4 kat, *in vivo*  alışmalarda ise biyoyararlanımın 8 kat arttığı görülmüştür (170).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Madde, Malzeme ve Aletler

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Asetik Asit (% 100)	Merck, Almanya
Caco-2 hücre Hattı	ŞAP Enstitüsü, Türkiye
Cremophor EL	Sigma, Almanya
Deoksikolik Asit Sodyum Tuzu	Fluka, Almanya
DMEM	Hyclone, ABD
DMSO	Sigma, Almanya
Etil Oleat	Fluka, Almanya
FBS	Hyclone, ABD
Fosforik Asit	Emboy, Türkiye
Gelucire 44/14	Gattefossé, Fransa
Gliserol	Sigma, Almanya
Hidroklorik Asit	Riedel-de Haën, Almanya
Labrasol	Gattefossé, Fransa
Lipoid S100	Lipoid, Almanya
LyP-1 Peptit	Anaspec, ABD
Maisine	Gattefossé, Fransa
MDA-MB 231 Hücre Hattı	H.Ü. Tıp Fak. Temel Onkoloji A.D.
MTT	Sigma, Almanya
Peceol	Gattefossé, Fransa
Pen-Strep (10000 U/10000 µg/mL)	Hyclone, ABD
Poli Etilen Glikol 300	Merck, Almanya
Poli Etilen Glikol 3000	Fluka, Almanya
Poli Etilen Glikol 6000	J.T. Baker, ABD
Potasyum Dihidrojen Fosfat	Riedel-de Haën, Almanya
Propilen Glikol	Fluka, Almanya
Sıvı Parafin	Birpa, Türkiye
Sodyum Asetat Trihidrat	PRS-Panreac, İspanya
Sodyum Dihidrojen Fosfat	Riedel-de Haën, Almanya
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Fluka, Almanya
Sodyum Klorür	Riedel-de Haën, Almanya
Soya Yağı	Sigma, Almanya
Tripsin EDTA	Hyclone, ABD
Triton X-100	Sigma Aldrich, Almanya
Tyloxapol	Sigma Ultra, Almanya

3.1.2. Kullanılan Aletler

Çok Noktalı Karıştırıcı	Variomag, ABD
Deiyonize Su Cihazı	Millipore milli Di, ABD
Differansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC)	TA Instruments, Q 100, ABD
HPLC	Agilent 1200 Series, ABD
HPLC Degazer	Agilent G1322A, ABD
HPLC Otosampler	Agilent G1329A, ABD
HPLC Pompa	Agilent G1311A, ABD
HPLC Termostatlı kolon bölmesi	Agilent G1316A, ABD
HPLC UV Dedektör	Agilent G1314B, ABD
Isıticılı Manyetik Karıştırıcı	Falc F60, İtalya
İnkübatör	Sanyo, Japonya
Koni Plak Viskometre	Brookfield DV-II+, ABD
Laminar Kabin	BHG 2000 S/D Faster, İtalya
Liyofilizatör	Heto PowerDry PL 3000, Danimarka
Nanosizer ZS 2000	Malvern, İngiltere
PH metre	Sartorius PP-20, Almanya
Polarize Işık Mikroskobu	Leica DM EP, Almanya
Saf su cihazı	Millipore Simplicity 185, ABD
Su Banyosu	Memmert, Almanya
Terazi	Shimadzu AX 200, Japonya
Versamax Mikroplaka Okuyucu	Molecular Devices, ABD
Vortex	FinePCR 4S, Kore
XTerra Kolon, 4.6x250 mm, RP18, 5µm	Waters, ABD
XTerra, Koruyucu Kolon, RP18, 5µm, 3.9x20 mm	Waters, ABD

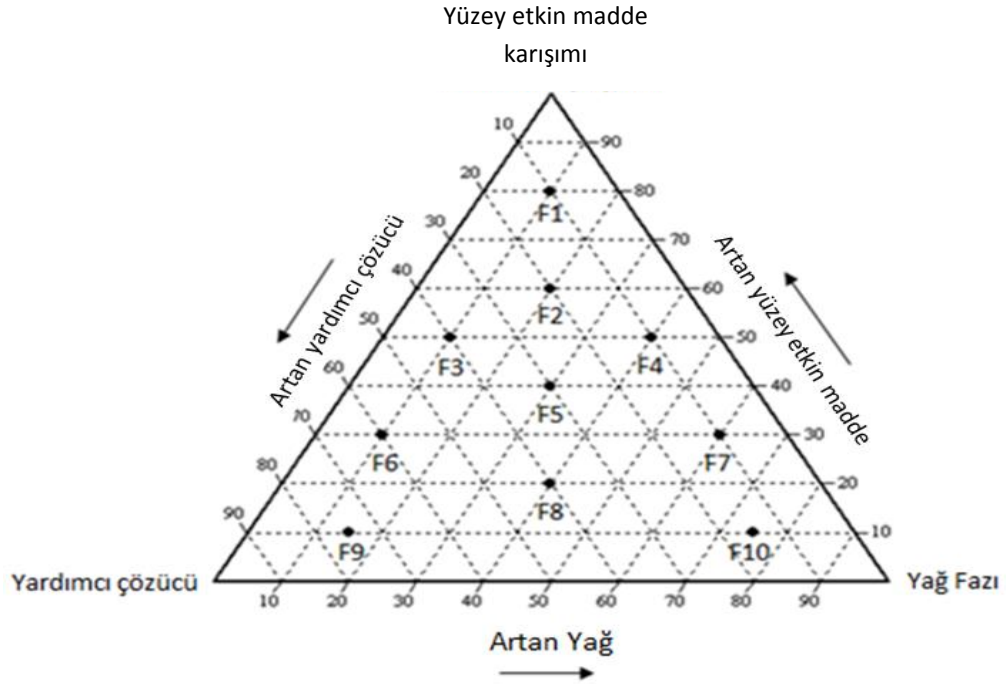
3.2. Önformülasyon Çalışmaları

3.2.1. Üçgen Faz Diyagramları

Kendiliğinden emülsifiye olabilen ilaç taşıyıcı sistemlere ait önformülasyon çalışmalarında toplam 18 üçgen faz diyagramı çalışılmıştır (Tablo 3.1). Üçgen faz diyagramlarında ilk basamak olarak 10 nokta belirlenmiştir (Şekil 3.1).

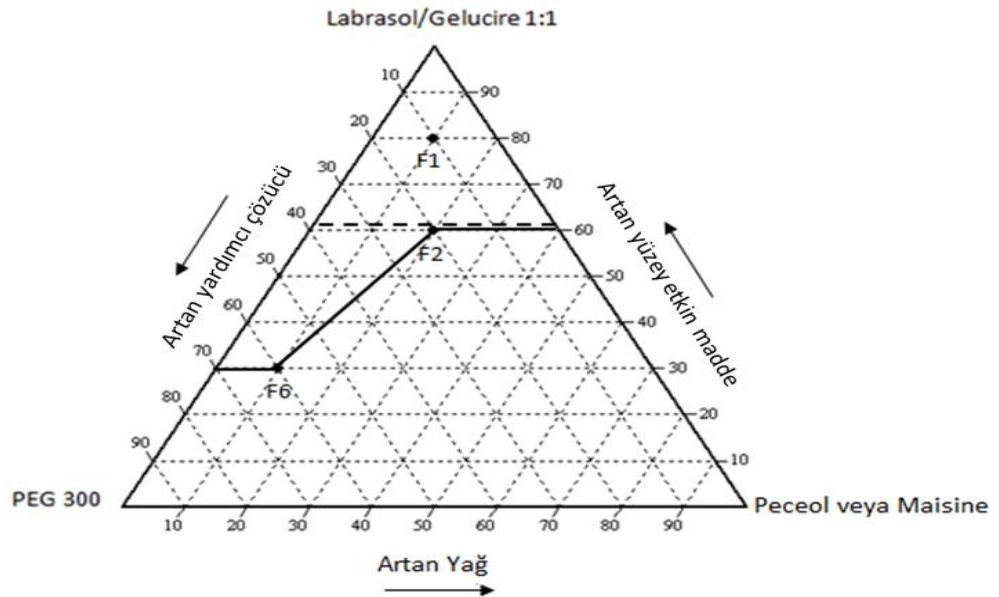
Tablo 3.1. Önformülasyon çalışmaları sırasında hazırlanan üçgen faz diyagramı bileşenleri.

Seri No	Yüzey Etkin Madde Karışımı	Yağ Fazı	Yardımcı Çözücü
1	Triton X-100:Na-DOC (2:1)	Soya Yağı	Gliserin
2	Cremophor:Na-DOC (2:1)	Soya Yağı	Gliserin
3	Triton X-100:Na-DOC (2:1)	Soya Yağı	PEG 300
4	Triton X-100:Na-DOC (2:1)	Soya Yağı	PEG 3000
5	Triton X-100:Na-DOC (2:1)	Sıvı Parafin	PEG 300
6	Triton X-100:Na-DOC(2:1)	Etil Oleat	PEG 300
7	Tyloxapol:Na-DOC (2:1)	Sıvı Parafin	PEG 300
8	Tyloxapol:Na-DOC (1:1)	Etil Oleat	PEG 300
9	Tyloxapol:Na-DOC (4:1)	Sıvı Parafin	PEG 300
10	Tyloxapol:Na-DOC (3:1)	Sıvı Parafin	PEG 300
11	Labrasol: Na-DOC (4:1)	Sıvı Parafin	PEG 300
12	Gelucire: Na-DOC (4:1)	Sıvı Parafin	PEG 300
13	Labrasol:Tyloxapol (4:1)	Sıvı Parafin	PEG 300
14	Gelucire:Tyloxapol (4:1)	Sıvı Parafin	PEG 300
15	Labrasol:Tyloxapol (1:1)	Soya Yağı	Propilen Glikol
16	Gelucire:Tyloxapol (1:1)	Soya Yağı	Propilen Glikol
17	Labrasol:Gelucire (1:1)	Maisine	PEG 300
18	Labrasol:Gelucire (1:1)	Peceol	PEG 300

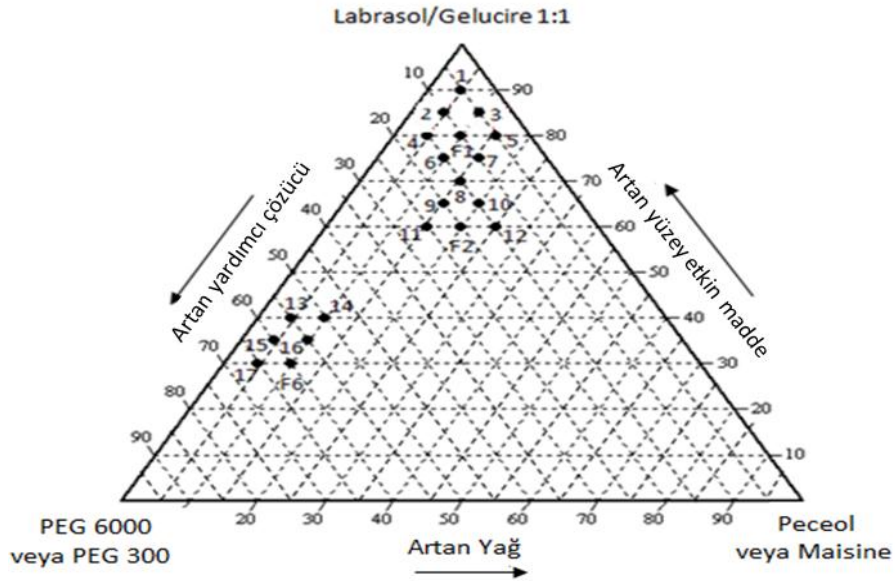


Şekil 3.1. Önformülasyon çalışmalarında her bir üçgen faz diyagramında belirlenen noktalar (Tablo 3.1’de verilen toplam 18 üçgen faz diyagramı için).

Sonrasında seçilen 2 üçgen faz diyagramı (17 ve 18 no’lu diyagramlar) üzerinde çalışılacak bölgeler belirlenmiştir (Şekil 3.2) Şekil 3.3’de ise Seri 17 için F1 ve F6 , Seri 18 için F1 ve F2 çevresinde seçilen noktalar gösterilmiştir.



Şekil 3.2. 17 ve 18. serilerde çalışılması belirlenen alanlar.



Şekil 3.3. Seri 17 için F1 ve F6, Seri 18 için F1 ve F2 formülasyonları etrafında belirlenen noktalar.

3.2.2. Formülasyonların Hazırlanması

SMEDDS formülasyonlarının hazırlanması: İlk olarak yüzey etkin maddeler tartılmış ve 40 °C'lik su banyosunda baget yardımı ile homojen olarak karışmaları sağlanmıştır. Ardından sırasıyla kosolvan ve yağ fazı tartılarak su banyosunda ısıtılarak karıştırılmıştır. Homojen karışım sağlandıktan sonra formülasyonlar pH 7.4 tamponu ile 1:10 oranında dilüe edilmişlerdir.

Katı dispersiyonun hazırlanması: Bu yöntem Rao ve Shao (108) tarafından hidrofilik yapıdaki proteinlerin yağlı faza hapsedilmesi için uygulanmış bir yöntemdir. Yöntemde yağsı yapı olarak soya fosfatidil kolini (Lipoid S100) kullanılmıştır. Katı dispersiyonun hazırlanması için pH 1 içerisinde soya fosfotidilkolini:peptidin 4:1 (a/a) oranında disperse edilmiş ve 24 saat liyofilize edilmiştir (108).

Stabilite testi için formülasyonların hazırlanması: Sırasıyla tartılan Gelucire 44/14, Labrasol, PEG 300 ve Peceol 40 °C'lik su banyosunda eritilerek homojen olarak karıştırılmıştır. Katı dispersiyon veya peptit yağ fazına eklenerek iyice karıştırılmıştır. Ardından peptidin en stabil olduğu pH 1 çözeltisi ile 1:5 oranında dilüe edilmiştir.

3.2.3. Makroskopik Özellikler

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

3.2.4. Mikroskopik Özellikler

Polarize ışık mikroskobu (Leica DM EP, Almanya) kullanılarak formülasyonlar morfolojik açıdan incelenmiş ve olası sıvı kristal varlığı açısından da değerlendirilmiştir. Örnekler, bir damla formülasyonun lam üzerine damlatılması ve lamel ile kapatılması ile hazırlanmıştır. Örnekler 4x, 10x ve 40x'lık büyütme altında incelenmiştir.

3.2.5. pH Tayini

Formülasyonların pH'ları pH metre (Sartorius PP-20, Almanya) kullanılarak tespit edilmiştir. PH metre her kullanımdan önce pH 4, 7 ve 10 tamponları ile kalibre edilmiştir.

3.2.6. Damlacık Büyüklüğü Tayini

Malvern Nanosizer ZS 2000 (İngiltere) kullanılarak uygun bulunan formülasyonların damlacık büyüklükleri tayin edilmiştir. Bunun için formülasyon bileşenlerinin refraktif indeksleri ve dış faz viskoziteleri esas alınarak SOP'ler (Standard Operating Procedures) oluşturulmuştur. Damlacık büyüklüğü tayini için kapiller hücreler kullanılmıştır. Her ölçüm 3 kez tekrarlanmıştır.

3.2.7. Zeta Potansiyel Tayini

Uygun bulunan formülasyonların zeta potansiyel değerleri Malvern Zetasizer ile ölçülmüştür. Bunun için formülasyon bileşenlerinin refraktif indeksleri ve dış faz viskoziteleri esas alınarak SOP'ler (Standart operation procedures, Standard operasyon prosedürleri) oluşturulmuştur. Zeta potansiyel tayini için kapiller hücreler kullanılmıştır. Her ölçüm 3 kez tekrarlanmıştır.

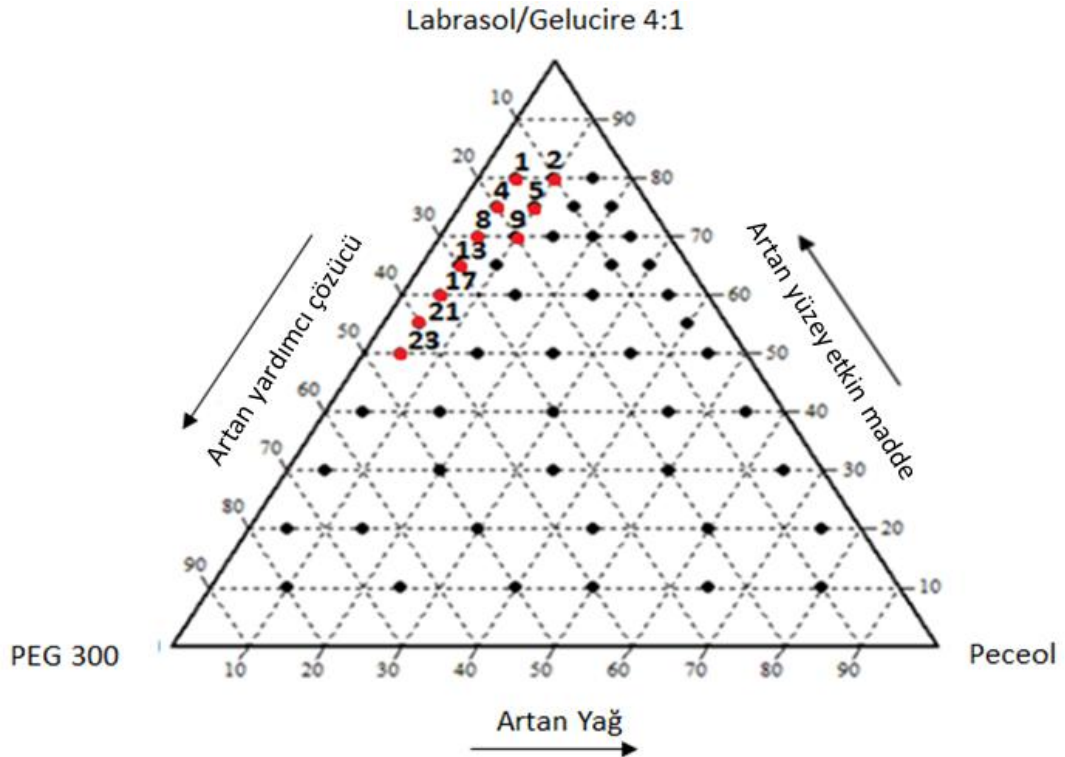
3.3. Formülasyon Çalışmaları

3.3.1. Üçgen Faz Diyagramları

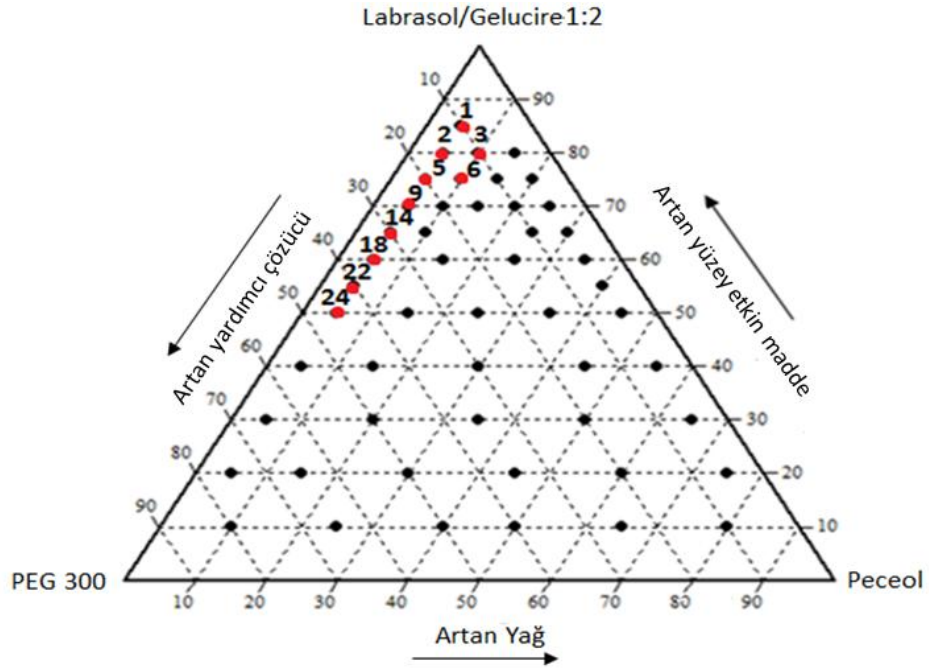
SMEDDS'lere ait önformülasyon çalışmaları kapsamında Tablo 3.2'de görülen bileşenler kullanılarak 3 esas üçgen faz diyagramı oluşturulmuş ve toplam 148 formülasyon çalışılmıştır. Çalışmalar için oluşturulan üçgen faz diyagramları Şekil 3.4, 3.5 ve 3.6 'da görülmektedir.

Tablo 3.2. Seçilen 3 esas üçgen faz diyagramı bileşenleri.

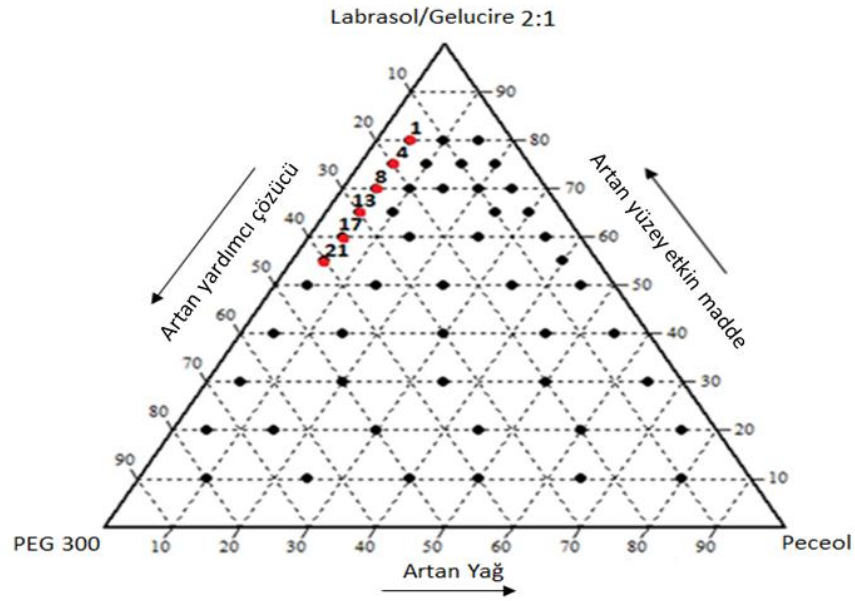
Formülasyon Bileşenleri	Yüzey Etkin Madde Oranı (Labrasol/Gelucire 44/14)		
	4:1	2:1	1:2
Yardımcı Çözücü	PEG 300	PEG 300	PEG 300
Yağ Fazı	Peceol	Peceol	Peceol



Şekil 3.4. Labrasol/Gelucire 4:1 oranında üçgen faz diyagramında hazırlanan noktalar. Numaralandırılan noktalarda 10 adet fiziksel açıdan dayanıklı formülasyon belirlenmiştir.



Şekil 3.5. Labrasol/Gelucire 1:2 oranında üçgen faz diyagramında hazırlanan noktalar. Numaralandırılan noktalarda 10 adet dayanıklı formülasyon belirlenmiştir.



Şekil 3.6. Labrasol/Gelucire 2:1 oranında üçgen faz diyagramında hazırlanan noktalar. Numaralandırılan noktalarda 6 adet dayanıklı formülasyon belirlenmiştir.

3.3.2. Formülasyonların Hazırlanması

Formülasyonlar Bölüm 3.2.2’de verildiği şekilde hazırlanmıştır.

3.3.3. Makroskopik Özellikler

Makroskopik özellikler Bölüm 3.2.3’de verildiği gibi incelenmiştir.

3.3.4. Mikroskopik Özellikler

Mikroskopik özellikler Bölüm 3.2.4’de verildiği gibi incelenmiştir.

3.3.5. pH Tayini

Formülasyonların pH ölçümleri Bölüm 3.2.5’de verildiği gibi gerçekleştirilmiştir.

3.3.6. Damlacık Büyüklüğü Tayini

Formülasyonların damlacık büyüklükleri ölçüm yöntemi Bölüm 3.2.6’da verildiği gibidir.

3.3.7. Zeta Potansiyel Tayini

Formülasyonların damlacık büyüklükleri ölçüm yöntemi Bölüm 3.2.7’de verildiği gibidir.

3.3.8. DSC Çalışmaları

Seçilen formülasyon ve yardımcı maddelere ait DSC çalışmaları, DSC Q 100 (TA Instruments, ABD) model diferansiyel taramalı kalorimetre kullanılarak yapılmıştır. Alüminyum hermetik panlar içerisine yerleştirilen örneklerin (5–20 mg) 10 °C/dk hızda –25 °C ile 75 °C sıcaklık aralığında azot atmosferi altında (50 mL/dk) DSC termogramları çekilmiştir. Boş ve kapalı hermetik pan referans olarak kullanılmıştır. DSC cihazının kalibrasyonu indiyum standart kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.4. HPLC Metot Geliştirme ve Analitik Yöntem Validasyonu

LyP-1’e ait miktar tayini HPLC cihazı ile UV dedektör kullanılarak yapılmıştır. Tayin için C18 ters faz kolon (4.6x250 mm, 5µm) kullanılmıştır. Yöntemde hareketli faz olarak % 0.1 TFA (Trifloroasetik asit) içeren su:asetonitril (95:5, h/h) karışımı kullanılmıştır. Akış hızı 1 mL/dk, enjeksiyon hacmi ise 35 µl olarak ayarlanmış, UV

dedektörün dalga boyu, HPLC’de farklı dalga boylarında yapılan denemeler sonucunda en yüksek absorbansı gösteren 204 nm olarak belirlenmiştir.

HPLC yönteminin validasyonu “*ICH Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)*” stabilite kılavuzu esas alınarak gerçekleştirilmiş (171), aşağıda verilen validasyon parametreleri incelenmiştir.

- Doğrusallık
- Doğruluk
- Kesinlik
 - Tekrarlanabilirlik
 - Tekrar elde edilebilirlik
- Özgünlük
- Duyarlılık
 - Saptanabilirlik sınırı (LOD, Limit of Detection)
 - Tayin edilebilirlik sınırı (LOQ, Limit of Quantitation)

3.4.1. Doğrusallık (Linearity)

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

3.4.2. Doğruluk (Accuracy)

Analitik yöntemin doğruluğu, yöntemle elde edilen değerin gerçek değere ne kadar yakın olduğunun bir göstergesidir. Doğruluğun tayini için seçilen düşük, orta ve yüksek derişimli üç konsantrasyona ait örnekler üç kez analiz edilerek % geri kazanımları ve % Bias değerleri hesaplanmıştır (Eşitlik 2.1 ve 2.2).

$$\% \text{ Geri Kazanım} = (\text{Tayin Edilen Derişim} / \text{Eklenen Derişim}) \times 100 \quad (2.1)$$

$$\% \text{ Bias} = (\text{Eklenen Derişim} - \text{Tayin Edilen Derişim}) / \text{Eklenen Derişim} \times 100 \quad (2.2)$$

3.4.3. Kesinlik (Precision)

Kesinlik, sözkonusu yöntemle yapılan ardarda ölçümlerin birbirlerine yakınlığını ifade etmektedir. Bir yöntemin kesinliği istatistiksel açıdan yeterli değerlendirmenin yapılabileceği sayıda aynı derişimde örneğin birbirini izleyen tayinlerinin ortalama (X_{ort}), standart sapma (SS) ve varyasyon katsayılarının (VK) hesaplanması ile gösterilir.

Tekrarlanabilirlik (Repeatability)

Tekrarlanabilirlik, aynı deney koşullarında kısa bir zaman aralığı içerisinde yapılan ölçümler arasındaki kesinliği belirtir. Tek derişimdeki aynı peptit çözeltisinden ardarda 6 ölçüm yapılması ile bu ölçümlerde bulunan pik alanlarından elde edilen derişim değerlerinin birbiri ile yakınlığı X_{ort} , SS ve VK hesaplanarak bulunur. Tekrarlanabilirlik için ölçümler arası varyasyon katsayısının % 2'den küçük olması gerekmektedir. Tekrarlanabilirlik için 200 µg/mL konsantrasyonda örneğin ardarda yapılan 6 enjeksiyonu sonucu pik alanlarına karşılık gelen konsantrasyonlar bulunmuş, ortalama (X_{ort}), standart sapma (SS) ve varyasyon katsayıları (VK) hesaplanmıştır.

Tekrar elde edilebilirlik (Reproducibility)

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

3.4.4. Özgünlük (Specificity)

Bir analitik yöntemin özgünlüğü ortamda bulunan diğer maddeler (yardımcı madde, parçalanma ürünü, safsızlık vb.) varlığında istenilen maddenin, girişim

olmaksızın tayin edilebilmesidir. Bu nedenle aynı koşullarda etkin madde dışındaki (kör numune) formülasyon içeriğinin tayini yapılmıştır.

3.4.5. Duyarlılık (Sensitivity)

Duyarlılık kapsamında geliştirilen yöntem ile en fazla ne kadar madde saptanabileceği ve miktar tayini yapılabileceği belirlenmiştir. Genel olarak saptama sınırı (LOD) sinyal:gürültü oranının 3:1, tayin edilebilirlik sınırı (LOQ) ise sinyal:gürültü oranının 10:1 olduğu konsantrasyon olarak tanımlanmaktadır. Saptama sınırı ve tayin edilebilirlik sınırını saptamak için çeşitli yöntemler bulunmasına rağmen bu çalışmada kalibrasyon doğrusunun eğimi ve y-kesişim değerlerine ait standart sapma değeri (σ) kullanılarak 2.3 ve 2.4’de verilen denklemlerden faydalanılmıştır.

$$\text{LOD} = 3.3 (\sigma/\text{Eğim}) \quad (2.3)$$

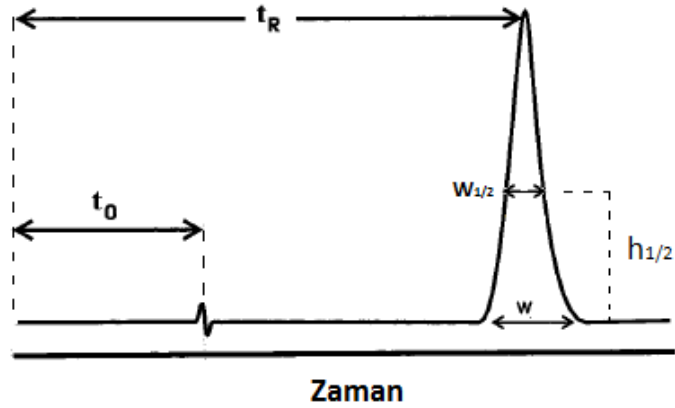
$$\text{LOQ} = 10 (\sigma/\text{Eğim}) \quad (2.4)$$

3.4.6. Sistem Uygunluk Parametreleri

USP (Amerikan Farmakopesi) esas alınarak kuyruklanma faktörü (T_f), teorik tabaka sayısı (N), kapasite faktörü (k') gibi sistem parametreleri hesaplanmıştır (172, 173). Kapasite faktörü alıkonma faktörü olarak da bilinmektedir ve izokratik ayırmda kolon tarafından numune molekülünün ne kadar alıkonduğunu ifade eder (Şekil 3.7). Bu değer 1–5 arasında olması istenir ve 2.5’deki formülle hesaplanır. N faktörü kolonun ve HPLC sisteminin etkinliğini belirtir (Formül 2.6). Bu değer yüksek olması istenir. Kuyruklanma faktörü pikin asimetrisinin bir ölçüsüdür (Şekil 3.8). Bu faktörün 1 olması pikin tam olarak simetrik olduğunu göstermektedir. Değer 1’den büyük ise kuyruklanma olduğu söylenir. Bu değer 1–1.5 arasında olması önerilir. 2.7’de verilen formülle hesaplanmıştır. Bu formülde $W_{0.05}$, $0.05 \times \text{pik yüksekliği}$ ’ndeki pik genişliğini göstermektedir. $W_{0.05}$ ’in pikin tepe noktasından çizilen çizginin böldüğü iki parçadan sağdaki (I_{AB})’nin iki katına bölünmesi ile elde edilen değer kuyruklanma faktörünü vermektedir.

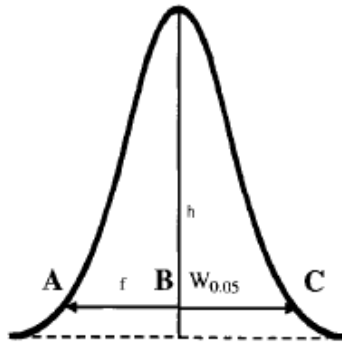
$$k' = (t_R - t_0) / (t_0) \quad (2.5)$$

$$N = 5.54 (t_R / W_{1/2}) \quad (2.6)$$



Şekil 3.7. k' ve N hesaplanmasında kullanılan kromotogram parametrelerinin şematik olarak gösterimi. t_R : alıkonma süresi, t_0 : alıkonmamış retensiyon süresi, $W_{1/2}$: pik yüksekliğinin yarısındaki pik genişliği (173).

$$T_f = W_{0.05} / 2f = IACI / 2 IABI \quad (2.7)$$



Şekil 3.8. T_f hesaplanmasında kullanılan pik ölçülerinin şematik olarak gösterimi.

$W_{0.05}$: 0.05 x pik yüksekliği'ndeki pik genişliği (173).

3.5. Stabilité Deneyleri

3.5.1. Etkin Madde Stabilitesi

LyP-1 peptidinin parçalanma kinetiğinin ve pH-hız profilinin bulunması amacıyla 12 farklı pH'daki stabilitesi incelenmiştir. pH 1 ve pH 2 için 0.1 M ve 0.01 M HCl çözeltileri kullanılmış, pH 12 için ise 0.1 N NaOH çözeltisi kullanılmıştır. Tamponlar için gerekli miktarda tampon tuzu tartılmış ve suda çözülmüştür. Uygun asit veya bazlarla pH ayarlanmasını takiben belirlenen hacme su ile tamamlanmıştır. Diğer konsantrasyonlar için su ile dilüsyon yapılmıştır. İyonik şiddetin 0.15'e ayarlanması için gerekli miktarda NaCl eklenmiştir. Tampon türleri ve derişimleri Tablo 3.3'de verilmiştir. Lyp-1 peptit uygun tampon çözeltisi ile 100 µg/mL konsantrasyonda hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti uygun sıcaklıklarda (25 °C, 37 °C ve 50 °C) bekletilerek belirlenen zamanlarda alınan örnekler -100 °C'de saklanmıştır. Stabilité çalışmaları etkin maddenin % 15'i kalana dek sürdürülmüştür.

Tablo 3.3. Stabilité çalışmasında kullanılan tamponlar.

pH	Tampon Türü	Tampon Derişimi (mM)
1	HCl	100
2	HCl	10
3	Fosfat	100
3	Fosfat	50
3	Fosfat	25
4	Asetat	30
4	Asetat	15
4	Asetat	7.5
5	Asetat	100
5	Asetat	50
5	Asetat	25
6	Fosfat	20
6	Fosfat	10
6	Fosfat	5
7	Fosfat	50
7	Fosfat	25
7	Fosfat	12.5
12	NaOH	10

Farklı pH'larda yürütülen stabilite çalışmalarında zamana bağlı olarak değişen peptit konsantrasyonları Eşitlik 2.8'de ve 2.9'da verilen denklemlerde yerine koyularak parçalanma hız sabitleri ve yarılanma ömürleri hesaplanmıştır. Üç farklı tampon konsantrasyonunda çalışılan pH 3, 4, 5, 6 ve 7 için k_0 değerleri hesaplanmıştır. Bu değer tampon katalizinin olmadığı durumdaki parçalanma hız sabitidir. Bunun için 3 farklı tampon konsantrasyonundaki " k_{obs} " değerleri bulunmuştur. Tampon konsantrasyonu arttıkça tampon katalizi nedeni ile parçalanma hızı da artmaktadır. Buna göre tampon konsantrasyonuna karşı k_{obs} değerleri grafiğe geçirildiğinde elde edilen doğrunun y-eksenini kestiği değer k_0 değerini vermektedir.

$$\log \% C = \log \% C_0 - (k_{obs}/2.303)t \quad (2.8)$$

$$t_{1/2} = 0.693/k_{obs} \quad (2.9)$$

Reaksiyon hızının sıcaklığa etkisi Arrhenius tarafından açıklanmıştır. Arrhenius deneysel sonuçlardan yola çıkarak, reaksiyon hız sabitinin mutlak sıcaklıkla üssel olarak değiştiğini belirlemiştir. Bu sebeple; elde edilen sonuçlar gözönüne alınarak peptidin pH 1, pH 2 ve pH 3'ün 3 farklı konsantrasyonunda (100, 50, 25 mM) 25 °C ve 50 °C'de de stabilite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Peptide ait aktivasyon enerjilerinin bulunması için eşitlik 2.10'da verilen Arrhenius denklemi kullanılmıştır.

$$\ln k = \ln A - (E_a/R) \times (1/T) \quad (2.10)$$

3.5.2. Formülasyon Stabilitesi

Etkin madde içermeyen formülasyonlara ait stabilite çalışmalarında Şekil 3.4, 3.5 ve 3.6'da belirlenen toplam 26 formülasyonun stabilitesi incelenmiştir. Bu formülasyonların stabilitesi oda sıcaklığında (25 °C) 2 hafta boyunca 0, 3, 5, 7, 10 ve 14. günlerde damlacık büyüklüğü, zeta potansiyel, pH ölçümleri, mikroskopla ve fiziksel inceleme ile takip edilmiştir.

Formülasyon içerisinde etkin madde ve katı dispersiyonuna ait stabilite çalışmaları 37 °C’de gerçekleştirilmiştir. SMEDDS formülasyonu için uygun bulunan formülasyonlar içerisinde Labrasol/Gelucire 44/14 oranı 1:2 olan üçgende 18 no’lu formülasyon seçilmiştir. Formülasyonun hazırlanmasında Tablo 3.2’de verilen yardımcı maddeler kullanılmıştır.

3.6. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.6.1. Sitotoksosite Çalışmaları

Etkin madde içermeyen formülasyonlara ait sitotoksosite çalışmalarında bağırsak hücrelerini iyi bir şekilde taklit eden kolon kanseri hücre hattı olan Caco-2 hücreleri kullanılmıştır. Caco-2 hücrelerinin literatürde pek çok çalışmada sitotoksosite deneyleri için kullanıldıkları görülmektedir (101, 118, 123). Caco-2 hücreleri 25 cm²’lik flasklara ekilmiştir. Hücre kültürü ortamı olarak 4mM L- Glutamin ve Sodyum Pirüvat, % 10 FBS, % 0.5 Penisilin (10.000 ünite) ve streptomisin sülfat (10.000 µg/mL) karışımı içeren DMEM besiyeri kullanılmıştır. Hücreler 37 °C’de, % 5 CO₂ içeren ortamda inkübasyona bırakılmış ve çoğaltılmışlardır. Çoğaltılan hücreler tripan mavisi ile boyanarak hemasitometre ile sayılmış ve 100 µl hücre süspansiyonu 5x10³ hücre/kuyucuk olacak şekilde 96’lık plaklara ekilmiştir. Ekilen hücreler formülasyonlar uygulanmadan önce yukarıda tarif edilen besiyeri ortamı ile 24 saat bekletilmişlerdir. Hücre canlılığının saptanması için MTT yöntemi (3-[4, 5-dimetiltiyazol-2-y1]-2, 5-difenil tetrazolyum bromür) kullanılmıştır.

pH 7.4 fosfat tamponu ile dilüe edilen etkin madde içermeyen formülasyonlar 100 µl olacak şekilde çeşitli dilüsyonlarla hücrelere uygulanmıştır. Negatif kontrol olarak PBS çözeltisi, pozitif kontrol olarak ise % 0.1 lik SDS çözeltisi kullanılmıştır. Etkin madde içermeyen formülasyon 24 ve 48. saat sonunda kuyucuklara 20 µl % 0.5’lik MTT çözeltisi eklenmiş ve 3 saat beklenmiştir. 3 saat sonunda oluşan mor renkli formazan kristallerini çözmek için plakadaki besiyerleri boşaltılarak her bir kuyucuğa 200 µl DMSO konulmuştur. Oluşan mor rengin absorbansı 570 nm’de Elisa plaka okuyucu ile ölçülmüştür.

LyP-1 peptidini içeren formülasyonların sitotoksitesini incelemek için ise peptidin daha stabil olduğu pH 5 tamponunda peptide ve katı dispersiyonuna ait formülasyonlar hazırlanmış ve 3 farklı dilüsyonda uygulanmıştır. Etkin madde miktarı 180 nM konsantrasyonda sabit tutulmuştur.

3.6.2. Biyoaktivite Çalışmaları

LyP-1 peptidi ve katı dispersiyonunu içeren formülasyonların normal hücrelere değil meme kanseri hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterdiği ve bu etkinin formülasyondan değil peptidin aktivitesinden kaynaklandığının belirlenmesi amacı ile peptidi içeren ve içermeyen formülasyonların biyoaktivite çalışmaları yapılmıştır. Biyoaktivite çalışmalarında MDA-MB 231 meme kanser hücre hattı kullanılmıştır. Hücre kültürü ortamı olarak 4mM L-glutamin ve sodyum pirüvat, % 10 FBS, % 0.5 penisilin (10.000 ünite) ve streptomisin sülfat (10.000 µg/mL) karışımı içeren DMEM besiyeri kullanılmıştır. Hücreler 37 °C’de, % 5 CO₂ içeren ortamda inkübasyona bırakılmış ve çoğaltılmışlardır. Çoğaltılan hücreler tripan mavisi ile boyanarak hemasitometre ile sayılmış ve 100 µl hücre süspansiyonu 5x10⁴ hücre/kuyucuk olacak şekilde 96’lık plaklara ekilmiştir. Ekilen hücreler formülasyonlar uygulanmadan önce yukarıda tarif edilen besiyeri ortamı ile 24 saat bekletilmişlerdir. Hücre canlılığının saptanması için MTT yöntemi kullanılmıştır.

3.7. Moleküler Dinamik ve Termodinamik Çalışmaları

3.7.1. Sistem Kurulumu ve Başlangıç Yapıları

İnsan p32 (gC1q-BP) mitokondrial matriks proteininin X-ışını koordinatları Protein Veri Bankası’ndan indirilmiştir (PDB Kodu: 1P32). P32 proteinin X-ışını analizi ile belirlenen yapısında, proteindeki A, B ve C homolog zincirleri trimer olarak kristallendirilmiş ve yapısı aydınlatılmıştır (166). Ancak trimer yapıdaki p32 proteininde bulunan zincirlerde, Şekil 3.9’da altı çizili amino asit dizilimlerinin kristal yapı koordinatları mevcut değildir. Bu eksik bölgeler A zincirinde aa141–aa161 (Pro-Thr-Phe-Asp-Gly-Glu-Glu-Glu-Pro-Ser-Gln-Gly-Gln-Lys-Val-Glu-Glu-Gln-Glu-Pro-Glu) ve aa191–aa196 (Asp-Glu-Val-Gly-Gln-Glu), B zincirinde aa139–aa163 (Ile-Pro-Pro-Thr-Phe-Asp-Gly-Glu-Glu-Glu-Pro-Ser-Gln-Gly-Gln-Lys-Val-Glu-Glu-Gln-Glu-Pro-Glu-

Leu-Thr) ile aa189–aa201 (Pro-Glu-Asp-Glu-Val-Gly-Gln-Glu-Asp-Glu-Ala-Glu-Ser) ve C zincirinde aa140–aa160 (Pro-Pro-Thr-Phe-Asp-Gly-Glu-Glu-Glu-Pro-Ser-Gln-Gly-Gln-Lys-Val-Glu-Glu-Gln-Glu-Pro) ile aa190–aa201 (Glu-Aps-Glu-Val-Gly-Gln-Glu-Asp-Glu-Ala-Glu-Ser) bölgeleridir. Eksik amino asitler Discovery Studio Client v3.0 (trial version) [Accelrys Software, Inc., San Diego, CA USA] programında inşa edilmiş ve bu yeni aa dizilimleri program içerisinde kabaca minimize edilmiştir. Elde edilen p32 proteininin protonları silinmiş ve PDB formatında kaydedilmiştir. Lineer ve siklik LyP-1 (Bkz. Şekil 2.6) peptitleri Discovery Studio Client v3.0 (trial version) programında inşa edilmiş, düşük enerjili hale getirmek için minimize edilmiş ve protonsuz olarak PDB formatında kaydedilmiştir.

```

p32-Zincir A 74 MHTDGDKAFVDFLSDEIKEERKI QKHKTLPKMSGGW ELELN GT EAKLVRK
p32-Zincir A 124 VAGEKITVTFN I NNS I PPTFDGEEEPSQGQKVEEQEPELTSTPN FVVEVI
p32-Zincir A 174 KNDDGKKALVLDCH Y PEDEVGQEDEAESD I F SIREVSFQS TGESEWKDTN
p32-Zincir A 224 Y TLN TDS LD WALYDHLMDFLADR GVD NTFADELVELSTALEHQEYITFLE
p32-Zincir A 274 DLKSFVK SQ
p32-Zincir B 74 MHTDGDKAFVDFLSDEIKEERKI QKHKTLPKMSGGW ELELN GT EAKLVRK
p32-Zincir B 124 VAGEKITVTFN I NNS I PPTFDGEEEPSQGQKVEEQEPELTSTPN FVVEVI
p32-Zincir B 174 KNDDGKKALVLDCH Y PEDEVGQEDEAESD I F SIREVSFQS TGESEWKDTN
p32-Zincir B 224 Y TLN TDS LD WALYDHLMDFLADR GVD NTFADELVELSTALEHQEYITFLE
p32-Zincir B 274 DLKSFVK SQ
p32-Zincir C 74 MHTDGDKAFVDFLSDEIKEERKI QKHKTLPKMSGGW ELELN GT EAKLVRK
p32-Zincir C 124 VAGEKITVTFN I NNS I PPTFDGEEEPSQGQKVEEQEPELTSTPN FVVEVI
p32-Zincir C 174 KNDDGKKALVLDCH Y PEDEVGQEDEAESD I F SIREVSFQS TGESEWKDTN
p32-Zincir C 224 Y TLN TDS LD WALYDHLMDFLADR GVD NTFADELVELSTALEHQEYITFLE
p32-Zincir C 274 DLKSFVK SQ

```

Şekil 3.9. P32 reseptörünün kristal yapısının (PDB Kodu: 1P32) amino asit dizilimi.

Altı çizili bölgelere karşılık gelen peptit kısımlarının koordinatları kristal yapısında belirtilmemiştir.

Moleküler dinamik (MD) ve MM-PBSA (Molecular Mechanics–Poisson Boltzman Surface Area) termodinamik hesaplamaları için lisansı TÜBİTAK-ULAKBİM TR-GRID Yüksek Performanslı 64-bit Paralel Bilgisayar Ağı Sistemi’nde bulunan AMBER v.11 program paketi kullanılmıştır (174).

İmplicit su¹ (implicit water) MD hesaplamaları için AMBER1999SBildn (force field) parametreleri kullanılmıştır (175). Eksplicit su² (explicit water) MD hesaplamaları için AMBER1999SB (force field) (176) parametreleri kullanılmıştır. Moleküllerin protonları AMBER v.11'in Leap (177) programı aracılığıyla eklenmiştir.

3.7.2. Moleküler Dinamik Hesaplamaları

İmplicit ve explicit su ortamında sıcaklık dengelenmesi ve moleküler dinamik hesaplamaları AMBER v.11'in *pmemd* (Particle Mesh Ewald Molecular Dynamics) *programı* ile gerçekleştirilmiştir (174). İmplicit su hesaplamaları için Onufriev ve diğ.'nin (178) genelleştirilmiş Born su modeli kullanılmıştır. Moleküllerdeki atomik çakışmalar 1000 basamaklık minimizasyon boyunca rahatlatılmıştır (relaxation). Daha sonra rahatlatılmış protein sistemlerinin sıcaklıkları 300 Kelvin'de 2 femto saniye zaman aralıklarıyla 5000 basamak (toplam 10 piko saniye) boyunca sabit hacim altında moleküler dinamik hesaplamaları ile dengelenmiştir. Sistemin sıcaklığını 300 K'de dengelemek için çarpışma sıklığı 10 ps ve hız limiti 10 sıcaklık birimi olan Langevin algoritmi kullanılmıştır (179). 10 ps sıcaklık dengelenmesinden sonra, 1 bar (≈ 1 atm) sabit basınç ve 300 K sabit sıcaklık altında 2 fs zaman aralıkları ile 5 milyon basamak boyunca (toplam 10 ns) MD üretim hesaplamaları yürütülmüştür. MD hesaplamalarında hetero atomlara bağlı protonlara ait bağ uzunluklarını sabit tutmak için ise SHAKE yöntemi uygulanmıştır (180). İmplicit hesaplamalarda ortamın dielektrik sabiti su için 80 Debye olarak kullanılmıştır. Elektrostatik etkileşimler Particle Mesh Ewald yöntemi (178) ile implicit su ortamında 999 Å ve explicit su ortamında ise 16 Å sınır uzaklıkları kullanılarak hesaplanmıştır. MD hesaplamalarında koordinatlar her 5000 basamakta trajektörü olarak kaydedilmiştir.

¹ İmplicit su: Su molekülleri kullanmadan ortamın dielektrik sabitini $\epsilon=80$ Debye olarak yürütülen MD.

² Eksplicit su: Sanal su molekülleri kullanılarak yürütülen MD.

3.7.3. MM-PBSA (Molecular Mechanics, Poisson Boltzmann Surface Area) Hesaplamaları

MM-PBSA bağlanma enerji hesaplamaları AMBER v.11'in *mm_pbsa programı* ile yürütülmüştür (181). Genel olarak, bir kompleksin oluşumu Eşitlik 2.11'de gösterilmiştir.



Serbest enerji hesaplamaları kompleks, reseptör ve ligant için ayrı ayrı yapılmıştır. Kompleks sisteminin, reseptör ve ligandın mutlak serbest enerjisi (G) sistem sıcaklığı (T) 300 K sıcaklık sabit tutularak Eşitlik 2.12'de verilen denklem ile hesaplanmıştır. Eşitlik 2.12'de görülen entropi enerjisi (S) her bir katı faz türü için, AMBER v.11 *nmode programı* içindeki normal mod analizi ile hesaplanmıştır (182, 183).

$$G = H - T \cdot S \quad (2.12)$$

Kompleks sisteminin bağlanma serbest enerjileri (ΔG) Eşitlik 2.13'de verilen denklem kullanılarak hesaplanmıştır. Bu denklemde G_{comp} kompleksin, G_{rec} reseptörün, G_{lig} ise ligandın mutlak serbest enerjisidir.

$$\Delta G = G_{\text{comp}} - [G_{\text{rec}} + G_{\text{lig}}] \quad (2.13)$$

MM-PBSA hesaplamaları için trajektörün 9. ve 10. ns arasında kompleks, reseptör ve ligant için 50 adet koordinat ekstrakte edilmiştir. MM-PBSA enerjileri her bir türün koordinatları için hesaplanmış ve ortalamaları alınarak ortalama bağlanma serbest enerjileri (ΔG) elde edilmiştir. Eşitlik 2.14'de görülen entalpi terimi Eşitlik 4'de verildiği gibi alt enerji birimlerine ayrılmıştır.

$$H_{\text{tot}} = H_{\text{gas}} + G_{\text{solv}} \quad (2.14)$$

H_{gas} , Van der Waals (E_{vdw}), elektrostatik (E_{el}) and içsel (E_{int}) enerjilerin toplamı ile elde edilen gaz fazı içindeki katının potansiyel enerjisidir (184). G_{solv} ise elektrostatik (G_{el}) ve elektrostatik olmayan (hidrofobik) etkilerin (G_{nonel}) toplamıdır ve katının vakumdan solvana geçişi için gerekli çözünme serbest enerjisine eşittir (Eşitlik 2.15).

$$G_{\text{solv}} = G_{\text{el}} + G_{\text{nonel}} \quad (2.15)$$

G_{el} , AMBER v.11'in pbsa programındaki Poisson Boltzmann denklemleri kullanılarak 0.15 M tuz konsantrasyonunda hesaplanmıştır (181, 185). G_{nonel} , AMBER v.11'in *molsurf programı* ile hesaplanmıştır (185).

3.7.4. Docking Deneyleri

LyP-1 düz zincirli ve siklik yapılarının p32 proteinine (PDB ID: 1P32) dock edilmesi Autodock_vina v.1.1.2 (186) programı ile gerçekleştirilmiş ve bağlanma bölgesinde her bir peptit için (lineer LyP-1, siklik LyP-1) en olası iki konformasyon seçilmiştir.

3.7.5. Trajektöri (trajectory) Analizi

Moleküler dinamik hesaplamalarında 10 ps aralıklarla kaydedilen koordinatlar trajektöri dosyalarında arşivlenmiştir. AMBER v.11 *ptraj programı* kullanılarak trajektörilerde hidrojen bağları oluşum, kök ortalama kare sapması (Root-Mean-Square-Deviation, RMSD) ve küme (cluster) analizleri yapılmıştır.

3.8. Bulguların İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Deney bulguları verilirken, yapılan en az 3 ölçümün ortalama ve standart sapmaları ile verilmiştir. Bulguların istatistiksel olarak karşılaştırılması SPSS 16.0 programı kullanılarak yapılmıştır. Doğrusallık tayini için doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü uygulanmıştır. Birden çok grubun karşılaştırılacağı durumlarda non-parametrik testlerden Kruskal Wallis tek yönlü varyans analizi, iki grubun karşılaştırılacağı durumlarda ise Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Tüm testlerde güven aralığı % 95 olarak belirlenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Önformülasyon Çalışmaları

4.1.1. Makroskobik Özellikler

1–16 no’lu (Bkz. Tablo 3.1) üçgen faz diyagramlarına ait fiziksel inceleme sonuçlarında, çalışılan formülasyonlarda faz ayrımı, kremalaşma, yüzeyde yağ damlacıkları, bulanıklaşma ve parçacık oluşumu, dipte çökelti oluşumu gibi fiziksel stabilite sorunları gözlemlenmiştir. Seri 17’de F1 ve F6, Seri 18’de ise F1 ve F2 formülasyonlarının fiziksel inceleme ve damlacık büyüklüğü sonuçlarından yola çıkılarak bu formülasyonlar çevresinde çeşitli noktalar belirlenmiş (Şekil 3.2 ve 3.3) ve farklı kombinasyonlarda formülasyonlar hazırlanmıştır (Tablo 4.1).

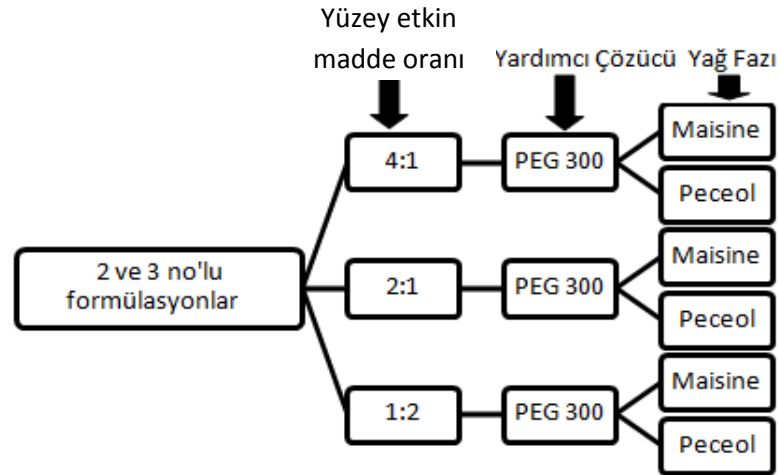
Tablo 4.1. Seri 17 ve 18’de çalışılmak üzere belirlenen noktalara ait formülasyon içerikleri (%).

Form. No	Labrasol	Gelucire 44/14	Yardımcı çözücü*	Yağ fazı**
1	45	45	5	5
2	42.5	42.5	10	5
3	42.5	42.5	5	10
4	40	40	15	5
5	40	40	5	15
6	37.5	37.5	15	10
7	37.5	37.5	10	15
8	35	35	15	15
9	32.5	32.5	20	15
10	32.5	32.5	15	20
11	30	30	25	15
12	30	30	15	25
13	20	20	55	5
14	20	20	50	10
15	17.5	17.5	60	5
16	17.5	17.5	55	10
17	15	15	65	5

*Yardımcı Çözücü olarak Seri 17 ’de PEG 300 ve PEG 6000, Seri 18’de sadece PEG 300 kullanılmıştır.

**Yağ fazı olarak Seri 17 Maisine, Seri 18 Peceol içermektedir.

Hazırlanan formülasyonlar arasında her iki seride de F1 formülasyonu etrafında çalışılan 21 formülasyon içinde 1–4 no'lu formülasyonlarda berrak görünümlü SMEDDS oluşumları sağlanmıştır. Hazırlanan formülasyonlardan alınan sonuçlara göre 1–4 no'lu formülasyonlar damlacık büyüklüğü ve fiziksel görünüm açısından diğer formülasyonlara göre daha uygun bulunmuştur. Fakat fiziksel stabilitelerini koruyamamaları nedeni ile yüzey etkin madde oranında değişim yapılarak 25 °C'de 2 hafta boyunca incelenmelerine karar verilmiştir. Bunun için fiziksel açıdan daha dayanıklı bulunan 2 ve 3 no'lu formülasyonlar seçilmiştir. Stabilitate çalışması için 3 yüzey etkin madde oranında 2 farklı yağ fazı ile toplam 12 formülasyon çalışılmıştır. Yardımcı çözücü olarak ise PEG 6000 ile hazırlanan formülasyonlarda görülen bulanıklaşma ve parçacık oluşumu nedeni ile PEG 300'e karar verilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Stabilitate çalışması için belirlenen formülasyon kombinasyonları.

Stabilitate çalışması sonucunda yağ fazı olarak Maisine kullanılan formülasyonlarda görülen stabilite sorunları nedeni ile yağ fazı olarak Peceol seçilmiş ve formülasyon çalışmalarına geçilmiştir.

4.1.2. Mikroskopik Özellikler

Dayanıklı formülasyonlardan alınan örnekler polarizan mikroskop altında sıvı kristal yapı olup oluşmadığının görülmesi amacıyla incelenmişlerdir. Yüksek yüzey

etkin madde oranındaki emülsiyonlarda anizotropik yapıda ve polarize ışık altında kendilerine özgü şekil ve renklerde görülebilen sıvı kristal yapılar oluşabilmektedir. Yapılan incelemeler sonucunda elde edilen formülasyonlarda sıvı kristal yapıya rastlanmamıştır.

4.1.3. pH Tayini

Seri 17 ve 18'e ait pH ölçümleri sonucunda formülasyon pH'larının 2.8–4.3 arasında bulunduğu görülmüştür. Bu nedenle bundan sonraki deney planında pH 7.4 tamponu ile de tamamlama yapılmıştır. Sonraki çalışma aşamasında belirlenen deney planı: Seri 17 F1 ve F6 formülasyonları ve Seri 18 F1 ve F2 formülasyonları PEG 300 ve PEG 6000 kullanılarak, hem su hem tamponla dilüe edilerek hazırlanmıştır. Seri 17 ve Seri 18'de seçilen F1, F2 ve F6 formülasyonlarının su ile dilüsyonları sonucu pH değerleri 3.00–3.61 olarak ölçülmüştür. pH 7.4 tamponu ile dilüsyon sonrası pH değerleri 6.68–7.28 arasına çıkarılmıştır (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Seri 17 ve Seri 18'de hazırlanan formülasyonlara ait pH değerleri.

Formülasyon No				
Seri 17	Formülasyon sayısı	pH	Yardımcı Çözücü	Yağ Fazı
F1 çevresi	7 formülasyon (1–7)	6.79–6.98	PEG 300	Maisine
F1 çevresi	7 formülasyon (1–7)	6.68–6.78	PEG 6000	
F6 çevresi	5 formülasyon (13–17)	7.17–7.22	PEG 300	
F6 çevresi	5 formülasyon (13–17)	7.17–7.23	PEG 6000	
Seri 18				
F1 çevresi	7 formülasyon (1–7)	6.79–6.91	PEG 300	Peceol
F2 çevresi	5 formülasyon (8–12)	7.01–7.09	PEG 300	

pH tayini çalışmaları sonucunda, tampon ile tamamlama sonucunda formülasyon pH'ları asidik pH değerlerinden fizyolojik pH değerine yaklaştırılmıştır. pH'ların düşük olmasının nedeni alınan ultrasaf su pH'sının düşük olmasıdır. 2 haftalık incelemeler sonucunda formülasyon pH'larında 0.2–0.4 birimlik azalmalar görülmüştür.

4.1.4. Damlacık Büyüklüğü ve Zeta Potansiyel Tayini

Önformülasyon çalışmaları kapsamında hazırlanan 18 üçgen faz diyagramında yer alan formülasyonlardan ilk 16 üçgen faz diyagramındaki formülasyonlarda görülen stabilite sorunları nedeniyle damlacık büyüklüğü ölçümü yapılmamıştır.

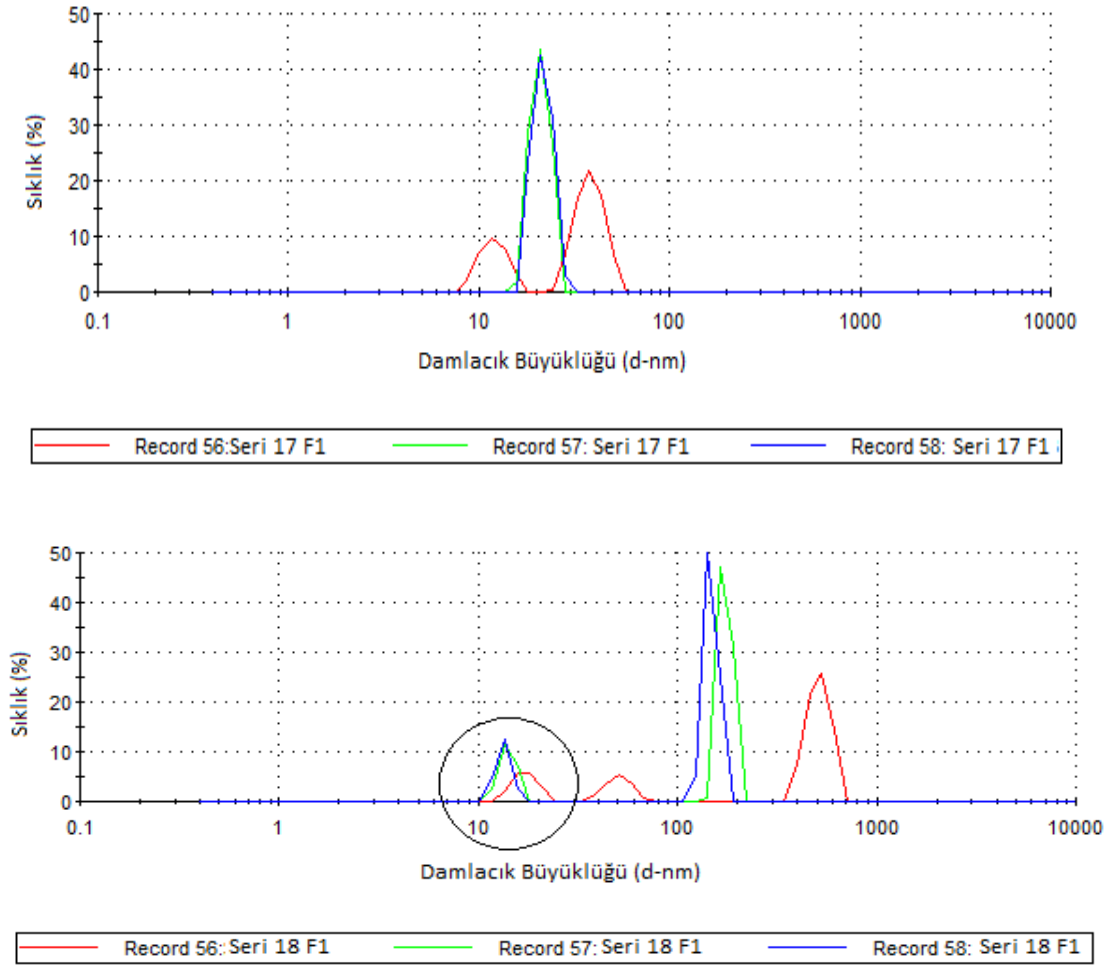
Seri 17 ve 18’de ise bazı formülasyonlarda sonuca yaklaşıldığı görülmüş ve damlacık büyüklüğü tayini yapılmasına karar verilmiştir. Yapılan değerlendirmelere göre içlerinden etrafında çalışılması uygun bulunan formülasyonlar belirlenmiştir.

Ortalama damlacık büyüklüğü değerleri ve fiziksel inceleme sonuçları göze alındığında Seri 17’de bulunan formülasyonlar bimodal dağılım göstermektedirler. F1 formülasyonunun berrak görünümde olduğu ve damlacıkların % 99’unun 30 nm altında olduğu görülmektedir. F6 formülasyonunun ise damlacık büyüklüğü ve PDI değerinin diğer formülasyonlara göre daha küçük olduğu görülmüştür. Seri 18’de ise F1 formülasyonunda trimodal dağılım görülmesine rağmen 2 ve 3 no’lu popülasyon piklerinde 20 nm altında damlacıklar elde edilmiştir (Tablo 4.3, kalın harflerle gösterilmiştir). Şekil 4.2’de bu formülasyonlara ait % sıklığa karşılık damlacık büyüklüğü değer grafikleri görülmektedir.

Tablo 4.3. Seri 17 ve 18’e ait formülasyonların bimodal dağılım gösteren damlacık çapı büyüklüğü değerleri (n=3, Ort±SS).

Parametre	Formülasyon			
	Seri 17 F1	Seri 17 F6	Seri 18 F1	Seri 18 F2
D.B. (d-nm)	1139±433.2	683.00±15.27	3975±535.8	1423±156.00
PDI*	0.90±0.16	0, 70±0, 12	0.95±0.09	0.99±0.01
Pik 1 (d-nm)	26.99±9.85	390.40±41.51	277.60±202.50	672,60±138.10
Pik 2 (d-nm)	4.00±6.93	54.83±15.21	14.88±2.04	102, 6±40.37
Pik 3 (d-nm)			17.02±29.49	0
Pik 1 %	90.00±17.3	89.30±1.20	75.70±5.90	83.70±3.20
Pik 2 %	9.70±16.70	9.70±1.20	18.70±2.50	15.30±3.20
Pik 3 %			4.70±8.10	0

*PDI: poli dispersite indeksi



Şekil 4.2. Seri 17 ve Seri 18 F1 formülasyonlarına ait damlacık büyüklüğü dağılım grafikleri.

Bu nedenlerle Seri 17 ve Seri 18 üçgen faz diyagramlarından 2'şer formülasyon belirlenmiş ve bu formülasyonlar etrafında çalışılmıştır. Belirlenen formülasyonlarda PEG 300 ve PEG 6000 olmak üzere iki yardımcı çözücü kullanılmasına karar verilmiştir.

Tablo 4.2'de görülen 6 grup içinde F1 çevresinde çalışılan 7 formülasyonda PEG 300 kullanılarak hazırlanan formülasyonlardan 1-4 no'luların damlacık büyüklüğü değerleri 20 nm civarında, PDI değerleri ise 0.2 civarında bulunmuştur (Tablo 4.4). Zeta Potansiyel değerleri ise 0 civarındadır. Bunun nedeni formülasyonlarda iyonik olmayan yüzey etkin maddelerin kullanılmasıdır. Fiziksel olarak incelendiklerinde 2 ve 3 no'lu formülasyonların berraklıklarını daha uzun süre

korudukları, diğer formülasyonlarda beyaz parçacıkların oluşumu ve tüp dibinde beyaz şeffaf tabaka oluşumları görülmüştür.

Tablo 4.4. F1 çevresinde çalışılan 4 formülasyona ait formülasyon içerikleri ve damlacık büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değerleri (n=3, Ort±SS).

Formülasyon İçeriği (%)							
	D.B. (d-nm)	PDI	ζ (mV)	Labrasol	Gelucire 44/14	PEG 300	Maisine
1	17.56±0.21	0.22±0.02	0.27±1.94	45	45	5	5
2	18.05±0.42	0.24±0.01	0.00±1.21	42.5	42.5	10	5
3	17.79±0.26	0.21±0.01	0.13±0.59	42.5	42.5	5	10
4	20.00±0.14	0.21±0.01	0.38±1.04	40	40	15	5

Formülasyon İçeriği (%)							
	D.B. (d-nm)	PDI	ζ (mV)	Labrasol	Gelucire 44/14	PEG 300	Peceol
1	19.46±0.61	0.23±0.02	-0.26±1.26	45	45	5	5
2	19.14±0.34	0.29±0.01	1.22±0.63	42.5	42.5	10	5
3	18.50±0.05	0.19±0.01	-0.1±2.59	42.5	42.5	5	10
4	20.10±0.22	0.23±0.01	-0.15±0.52	40	40	15	5

2 ve 3 no'lu formülasyonların Şekil 4.1'de görüldüğü üzere değişik yağ fazları ve değişik yüzey etkin madde oranları ile hazırlanması sonucu elde edilen 12 formülasyona ait iki haftalık stabilite çalışması sonrasında toplam 4 formülasyonun 14 gün boyunca damlacık büyüklükleri ölçülmüştür. Bu formülasyonların tümünde yağ fazı olarak Peceol kullanılmıştır. Üç yüzey etkin madde oranında uygun damlacık büyüklüğüne sahip formülasyonlar bulunmaktadır. 14. gün sonuçlarına bakıldığında formülasyonların uygun damlacık büyüklüğü ve PDI değerlerine sahip olduğu görülmektedir (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. İki haftalık stabilite çalışması sonucu 4 dayanıklı formülasyonun damlacık büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değerleri (n=3, Ort±SS).

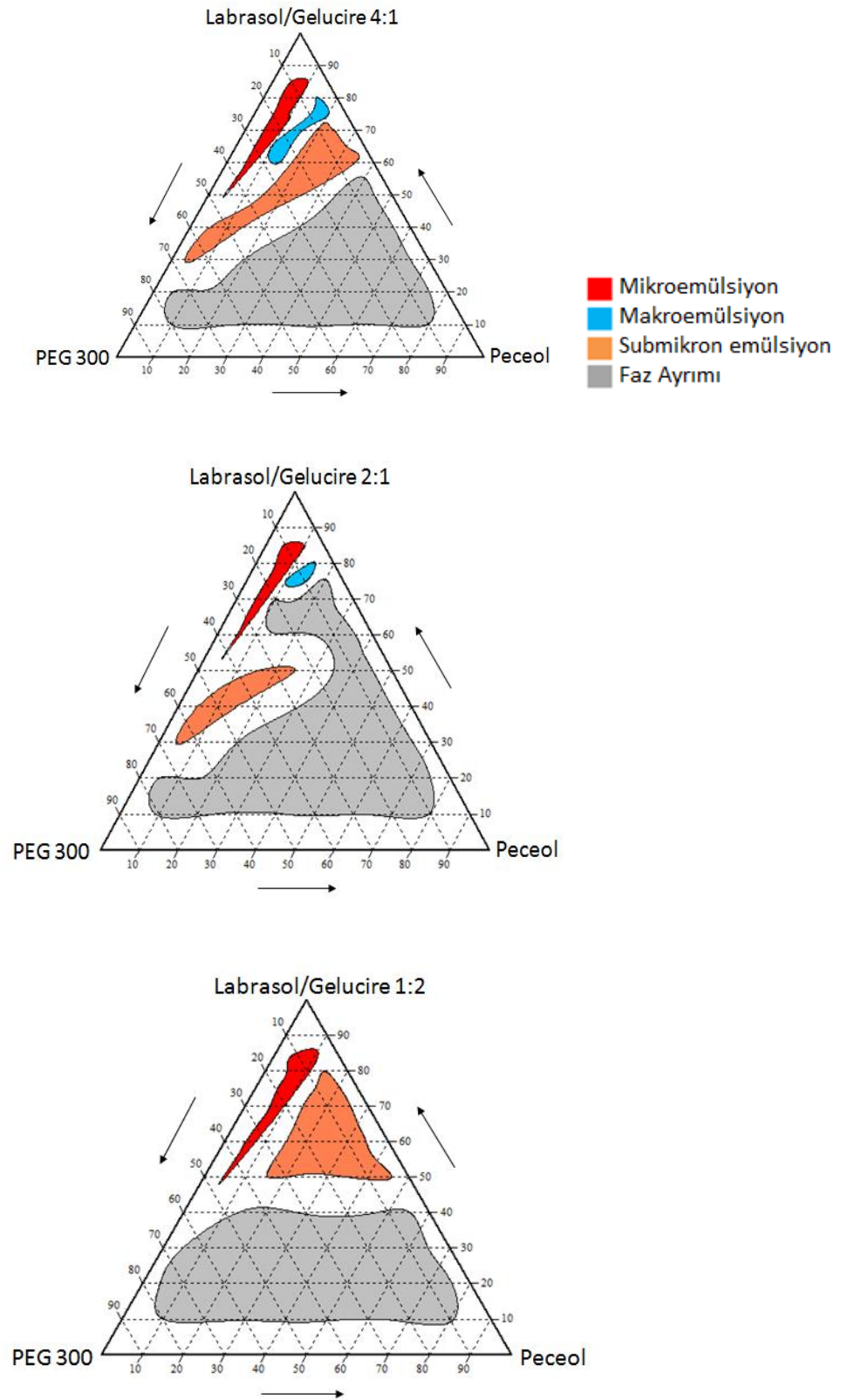
		0. gün	3. gün	7. gün	10. gün	14. gün
*	**	D.B. (d-nm)				
4:1	2	68.33±76.7	22.62±0.31	23.52±0.64	23.86±0.64	32.39±2.81
2:1	3	32.40±12.39	24.01±1.39	26.40±0.76	23.07±0.48	24.26±1.07
4:1	3	77.39±47.25	32.31±3.44	52.20±31.63	75.57±43.1	30.07±0.71
1:2	3	17.62±0.26	22.10±8.47	20.42±1.62	18.04±0.24	19.47±0.91
		PDI				
4:1	2	0.23±0.06	0, 22±0.01	0.24±0.03	0.23±0.02	0.32±0.02
2:1	3	0.24±0.14	0.28±0.04	0.36±0.01	0.24±0.02	0.26±0.01
4:1	3	0.17±0.08	0.32±0.08	0.27±0.13	0.18±0.06	0.24±0.01
1:2	3	0.22±0.02	0.18±0.09	0.29±0.06	0.22±0.03	0.29±0.02
		ζ (mV)				
4:1	2	0.59±1.11	-0.41±2.62	-2.26±1.21	0, 01±0.55	-1.42±2.27
2:1	3	-0.33±2.74	-2.99±1.75	-1.34±1.44	-0.42±1.32	-2.96±0.77
4:1	3	3.31±1.96	1.33±2.03	0.34±0.78	0.58±0.89	-2.41±1.42
1:2	3	-0.84±0.95	-1.69±1.75	0.69±1.13	-0.34±1.44	-0.95±2.29

*Yüzey Etkin Madde Oranı (Labrasol:Gelucire 44/14), **Formülasyon No

2 haftalık stabilite çalışmaları sonucunda elde edilen değerler göz önüne alındığında, her 3 Labrasol/Gelucire oranında Peceol ve PEG 300 kullanılarak hazırlanan formülasyonlarda istenilen damlacık büyüklüklerine ulaşılmıştır. Sabit değerler elde edilmesi için üçgen faz diyagramları üzerinde ayrıntılı çalışmalar yapılması planlanmıştır ve formülasyon çalışmalarına geçilmiştir.

4.2. Formülasyon Çalışmaları

SMEDDS formülasyonlarına ait formülasyon çalışmaları kapsamında 3 farklı üçgen faz diyagramında (Şekil 4.3) toplam 148 formülasyon çalışılmıştır. 3 üçgen faz diyagramında toplam 26 adet SMEDDS formülasyonu geliştirilmiştir.



Şekil 4.3. Formülasyon çalışmalarında kullanılan üçgen faz diyagramları ve belirlenen bölgeler.

26 adet stabil mikroemülsiyon formülasyonunun içerikleri Tablo 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4.6. Stabil mikroemülsiyonların içerikleri (%).

Sürfaktan Oranı*	Form. No	Labrasol	Gelucire 44/14	PEG 300	Peceol
4:1	1	64	16	15	5
	2	64	16	10	10
	4	60	15	20	5
	5	60	15	15	10
	8	56	14	25	5
	9	56	14	20	10
	13	52	13	30	5
	17	48	12	35	5
	21	44	11	40	5
	23	40	10	35	15
1:2	1	28.3	56.7	10	5
	2	26.7	53.3	15	5
	3	26.7	53.3	10	10
	5	25	50	15	10
	6	25	50	15	10
	9	23.3	46.7	25	5
	14	21.7	43.3	10	25
	18	20	40	35	5
	22	18.3	36.7	5	40
	24	16.7	33.3	35	15
2:1	1	53.3	26.7	15	5
	4	50	25	20	5
	8	46.7	23.3	25	5
	13	43.3	21.7	30	5
	17	40	20	35	5
	21	36.7	18.3	40	5

*Labrasol:Gelucire 44/14

4.2.1. Makroskopik Özellikler

Formülasyon çalışmaları sırasında hazırlanan 3 üçgen faz diyagramında numaralandırılan formülasyonlar (Şekil 3.4, 3.5 ve 3.6) berrak, şeffaf ve izotropik görünümde bulunmuştur. Bu formülasyonların stabilitesi 2 hafta boyunca incelenmiş ve 14. gün sonunda da formülasyonların berrak ve şeffaf görünümünü korudukları gözlemlenmiştir.

Üçgen faz diyagramlarının SMEDDS oluşan bölgeleri dışındaki üst bölgelerinde bulanık formülasyonlar ve zamanla kremalaşma, parçacık oluşumu gibi stabilite sorunları gözlenmiştir. Üçgen faz diyagramlarının alt bölgelerinde yani yüzey etkin madde oranının düşmesi, yağ fazı oranının artması ile birlikte, formülasyonlarda ilk hazırlandıkları anda faz ayrımları görülmüştür.

4.2.2. Mikroskopik Özellikler

Dayanıklı formülasyonlardan alınan örnekler polarizan mikroskop altında sıvı kristal yapı oluşup oluşmadığının görülmesi amacıyla incelenmişlerdir. Yüksek yüzey etkin madde oranındaki emülsiyonlarda anizotropik yapıda ve polarize ışık altında kendilerine özgü şekil ve renklerde görülebilen sıvı kristal yapılar oluşabilmektedir. Yapılan incelemeler sonucunda elde edilen formülasyonlarda sıvı kristal yapıya rastlanmamıştır.

4.2.3. pH Tayini

Üç üçgen faz diyagramında dayanıklı bulunan 26 formülasyonun pH değerleri 2 hafta boyunca incelenmiştir. Sonuçlar aşağıda verilmiştir (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. Formülasyon çalışmaları kapsamında belirlenen pH değerleri.

Labrasol/Gelucire (2:1), PEG 300, Peceol					
GÜN					
F	0.	3.	7.	10.	14.
1	7.20	7.06	6.97	6.91	6.82
4	7.21	6.97	6.90	6.85	6.77
8	7.27	7.01	6.91	6.83	6.75
13	7.35	7.01	6.93	6.85	6.76
17	7.33	7.31	7.22	7.16	7.05
21	7.32	7.27	7.15	7.08	6.96

Labrasol/Gelucire (4:1), PEG 300, Peceol						Labrasol/Gelucire (1:2), PEG 300, Peceol					
GÜN						GÜN					
F	0.	3.	7.	10.	14.	F	0.	3.	7.	10.	14.
1	7.20	7.12	6.97	6.91	6.86	1	7.18	7.08	6.87	6.78	6.72
2	7.19	7.10	7.00	6.88	6.81	2	7.15	7.07	6.88	6.78	6.64
4	7.17	7.10	7.03	6.97	6.92	3	7.16	7.05	6.92	6.81	6.65
5	7.18	7.11	7.05	7.00	6.90	5	7.18	7.09	6.97	6.85	6.77
8	7.20	7.12	7.03	6.97	6.87	6	7.14	7.06	6.98	6.87	6.76
9	7.19	7.12	7.05	6.94	6.83	9	7.18	7.08	6.97	6.88	6.78
13	7.12	7.02	6.96	6.89	6.80	14	7.25	7.16	7.01	6.91	6.77
17	7.15	7.04	6.94	6.86	6.78	18	7.29	7.20	7.07	6.97	6.89
21	7.19	7.12	7.03	6.97	6.87	22	7.25	7.14	7.01	6.89	6.78
23	7.04	7.01	6.89	6.80	6.70	24	7.28	7.18	7.04	6.99	6.90

4.2.4. Damlacık Büyüklüğü Tayini

Dayanıklı formülasyonlara ait damlacık büyüklüğü ve zeta potansiyel değerleri 0, 3, 7, 10 ve 14. günlerde tayin edilmiştir. Üç farklı üçgen faz diyagramına ait dayanıklı formülasyonların 2 hafta incelenmesi sonucu elde edilen veriler Tablo 4.8'de verilmiştir.

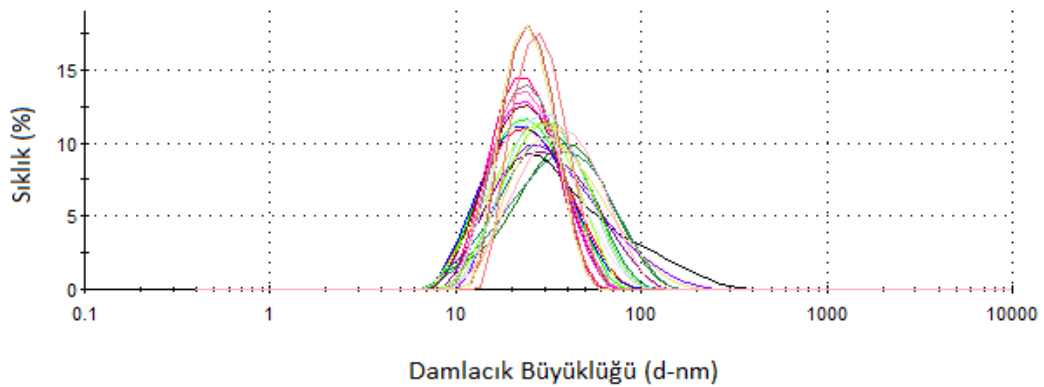
Şekil 4.4, 4.5 ve 4.6'da bu üçgenler üzerinde çalışılan formülasyonlara ait 0.gün damlacık büyüklüğü değerlerinin ortalamalarının karşılaştırılması ile elde edilen % Sıklık–Damlacık çapı büyüklüğü değerleri'ne ait grafikler verilmiştir. Grafiklerde ortalama damlacık büyüklükleri 16 ila 31 nm arasında değişirken, 4:1 üçgenine ait Şekil 4.4'de daha düzensiz bir dağılım olduğu görülmüş ve bu durum PDI değerlerini artırmıştır. En küçük PDI değerleri ise Şekil 4.6'dan da görüleceği gibi 1:2 üçgenine aittir. Bu üçgene ait Şekil 4.7'de görülen grafikte ise 14. gün verileri sonunda elde edilen sonuçlar verilmiştir. Formülasyonun stabilitesini 2 hafta boyunca koruduğu görülmektedir. Son olarak, 1:2 üçgeninden seçilen 18 no'lu formülasyona ait 0, 3, 7, 10 ve 14. gün verilerine ait grafikten de görüleceği gibi damlacıkların oldukça düzgün dağıldıkları ve damlacık büyüklüğünün neredeyse değişmediği görülmüştür (Şekil 4.8). Şekil 4.9'da üç üçgene ait 2 haftalık stabilite verileri (damlacık çapı ve PDI

değerleri) tek bir grafikte gösterilmiştir. Burada da en az değişimin 1:2 yüzey etkin madde oranına sahip üçgende olduğu görülmektedir.

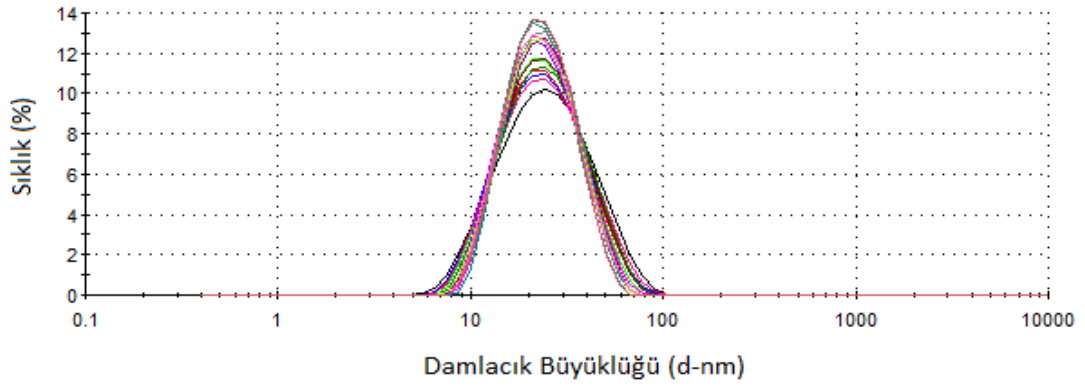
Tablo 4.8. Dayanıklı formülasyonlara ait 2 haftalık stabilite verileri (n=3, Ort±SS).

Yüzey Etkin Madde Oranı	Zaman (Gün)	D.B. (d-nm)	PDI	pH
4:1 (n=10)*	0	26.38±4.10	0.20±0.04	7.16±0.05
	3	26.11±3.85	0.21±0.03	7.09±0.04
	7	27.17±4.69	0.22±0.04	7.00±0.05
	10	31.26±4.46	0.27±0.04	6.92±0.06
	14	28.48±3.67	0.24±3.67	6.83±0.06
2:1 (n=6)	0	21.17±0.46	0.17±0.03	7.20±0.05
	3	21.54±0.64	0.19±0.04	7.10±0.05
	7	21.73±0.74	0.19±0.03	6.96±0.06
	10	21.64±0.67	0.19±0.02	6.86±0.06
	14	21.49±0.71	0.18±0.01	6.75±0.07
1:2 (n=10)	0	16.53±0.38	0.16±0.02	7.28±0.06
	3	16.47±0.44	0.16±0.03	7.11±0.13
	7	16.74±1.44	0.16±0.04	7.01±0.12
	10	17.16±0.69	0.21±0.03	6.94±0.12
	14	17.76±0.93	0.24±0.04	6.85±0.11

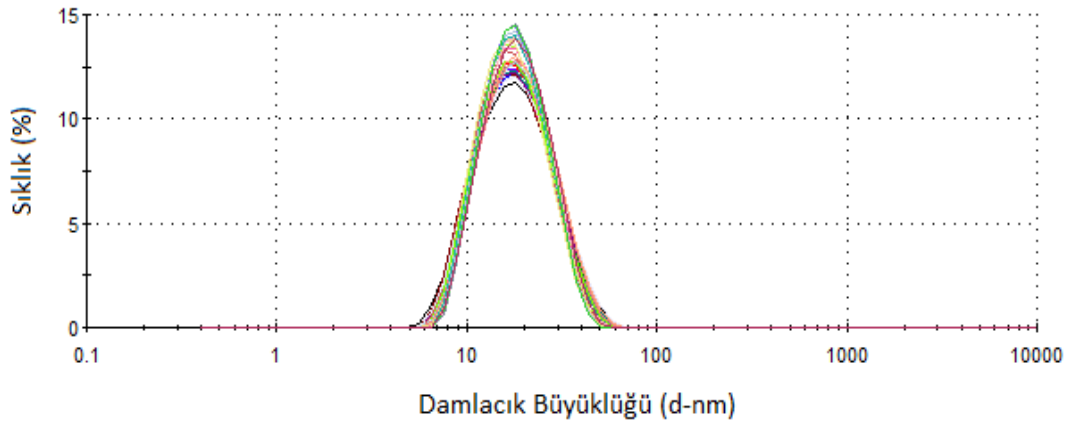
*n: formülasyon sayısı



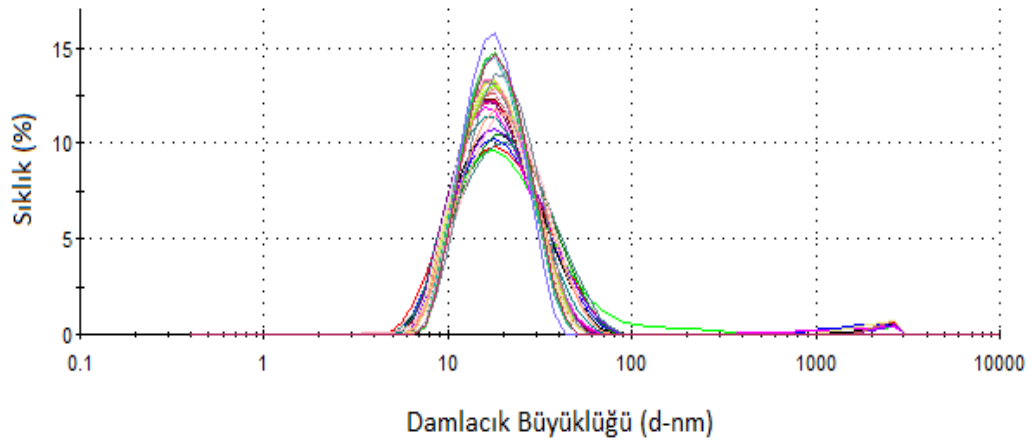
Şekil 4.4. Labrasol/Gelucire oranı 4:1 olan üçgen faz diyagramında incelen 10 formülasyona ait 0. gün verilerinin karşılaştırılması ile elde edilen grafik (her bir formülasyon için n=3).



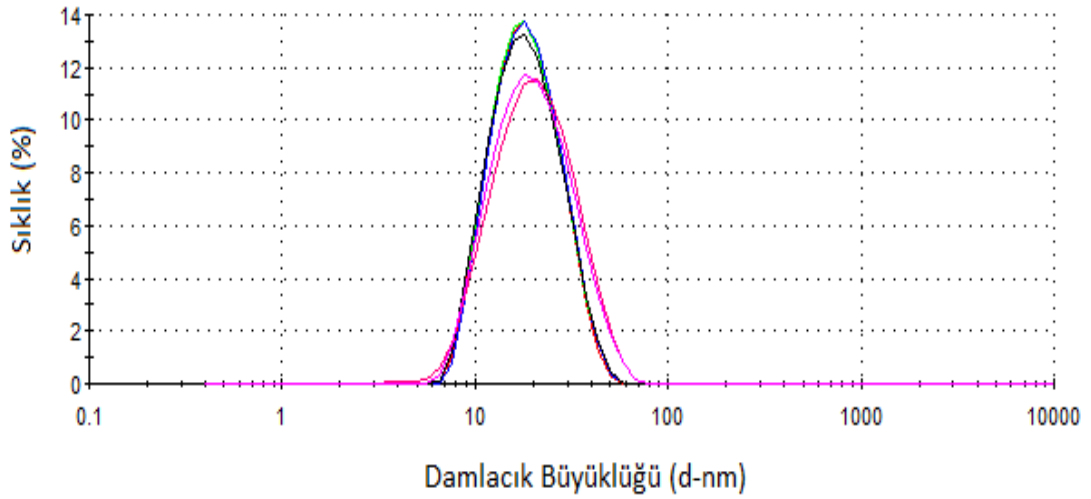
Şekil 4.5. Labrasol/Gelucire oranı 2:1 olan üçgen faz diyagramında incelen 10 formülasyona ait 0. gün verilerinin karşılaştırılması ile elde edilen grafik (her bir formülasyon için $n=3$).



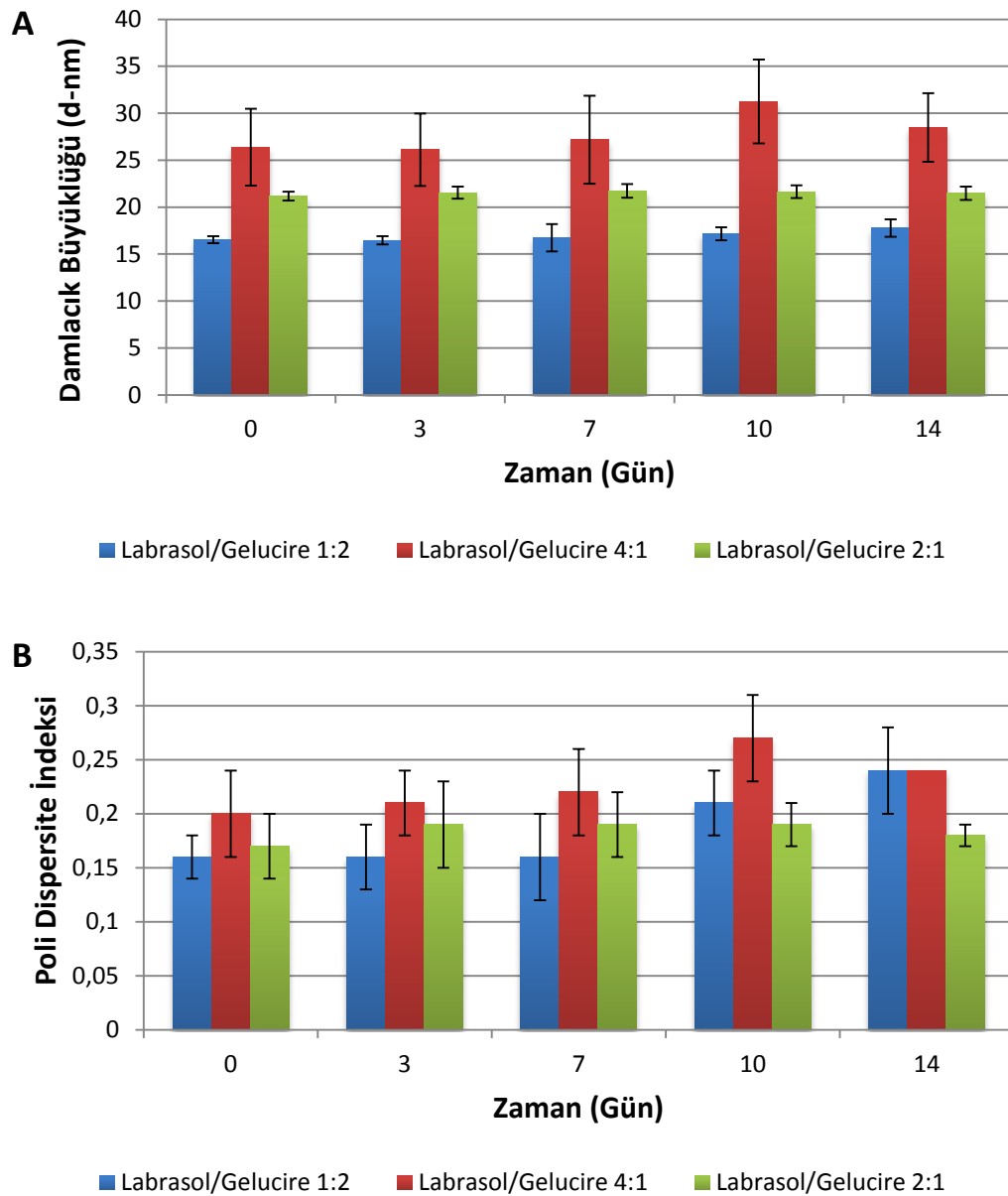
Şekil 4.6. Labrasol/Gelucire oranı 1:2 olan üçgen faz diyagramında incelen 10 formülasyona ait 0. gün verilerinin karşılaştırılması ile elde edilen grafik (her bir formülasyon için $n=3$).



Şekil 4.7. Labrasol/Gelucire oranı 1:2 olan üçgen faz diyagramında incelenen 10 formülasyona ait 14. gün verilerinin karşılaştırılması ile elde edilen grafik (her bir formülasyon için n=3).



Şekil 4.8. Labrasol/Gelucire oranı 1:2 olan üçgen faz diyagramında seçilen 18 no'lu formülasyona ait 0, 3, 7, 10 ve 14. gün verilerinin karşılaştırılması ile elde edilen grafik (her gün için n=3).



Şekil 4.9. Dayanıklı formülasyonlara ait 2 haftalık damlacık büyüklüğü (A) ve poli dispersite indeksleri (B) verileri.

4.2.5. Zeta Potansiyel Tayini

İki haftalık stabilite çalışması sonucu uygun bulunan 26 formülasyona ait zeta potansiyel değerleri Tablo 4.9'da verilmiştir. Tablodan da görüleceği gibi, zeta potansiyel değerlerinin "0" civarında olduğu ve 2 hafta boyunca bu değerlerde anlamlı bir değişim olmadığı görülmüştür.

Tablo 4.9. İki haftalık stabilite çalışması sonucu incelen formülasyonlara ait zeta potansiyel değerleri (n=3, Ort±SS).

	Gün	Yüzey Etkin Madde Oranı		
		4:1 (n=10)*	2:1 (n=6)	1:2 (n=10)
ζ (mV)	0	0.57±2.51	0.71±3.98	-0.98±2.54
	3	-0.24±1.75	-0.58±1.17	-2.48±2.79
	7	-1.13±1.62	-2.16±1.6	-1.90±1.94
	10	-0.73±2.31	-2.04±1.99	-1.21±1.38
	14	-1.77±1.85	-3.18±2.03	-1.34±2.36

*n: formülasyon sayısı

4.2.6. DSC Çalışmaları

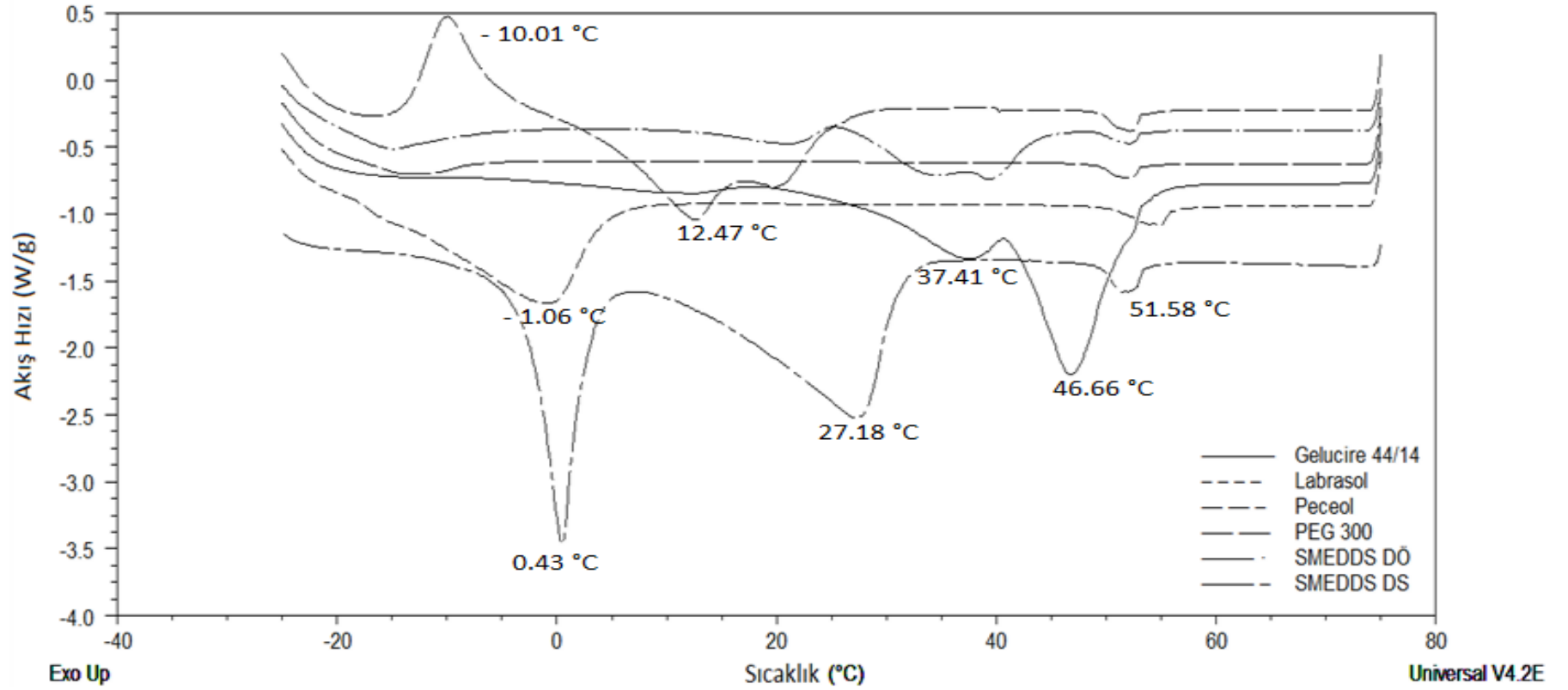
Formülasyonların karakterizasyonu kapsamında DSC çalışmaları yürütülmüştür. Bu bağlamda, yardımcı maddelerin tek başına, dilüsyon öncesi ve dilüsyon sonrası örnek formülasyona ait DSC endoterm ve ekzoterm pikleri Tablo 4.10'da görülmektedir. (1:2 üçgeni 18 no'lu formülasyon, Şekil 3.5) Ayrıca, elde edilen termogramlar Şekil 4.10'de görülmektedir. Sadece SMEDDS formülasyonunun dilüsyon öncesi ve sonrasına ait DSC termogramları ise Şekil 4.11'de görülmektedir.

Tablo 4.10. Yardımcı madde ve örnek formülasyona ait DSC analizi sonuçları.

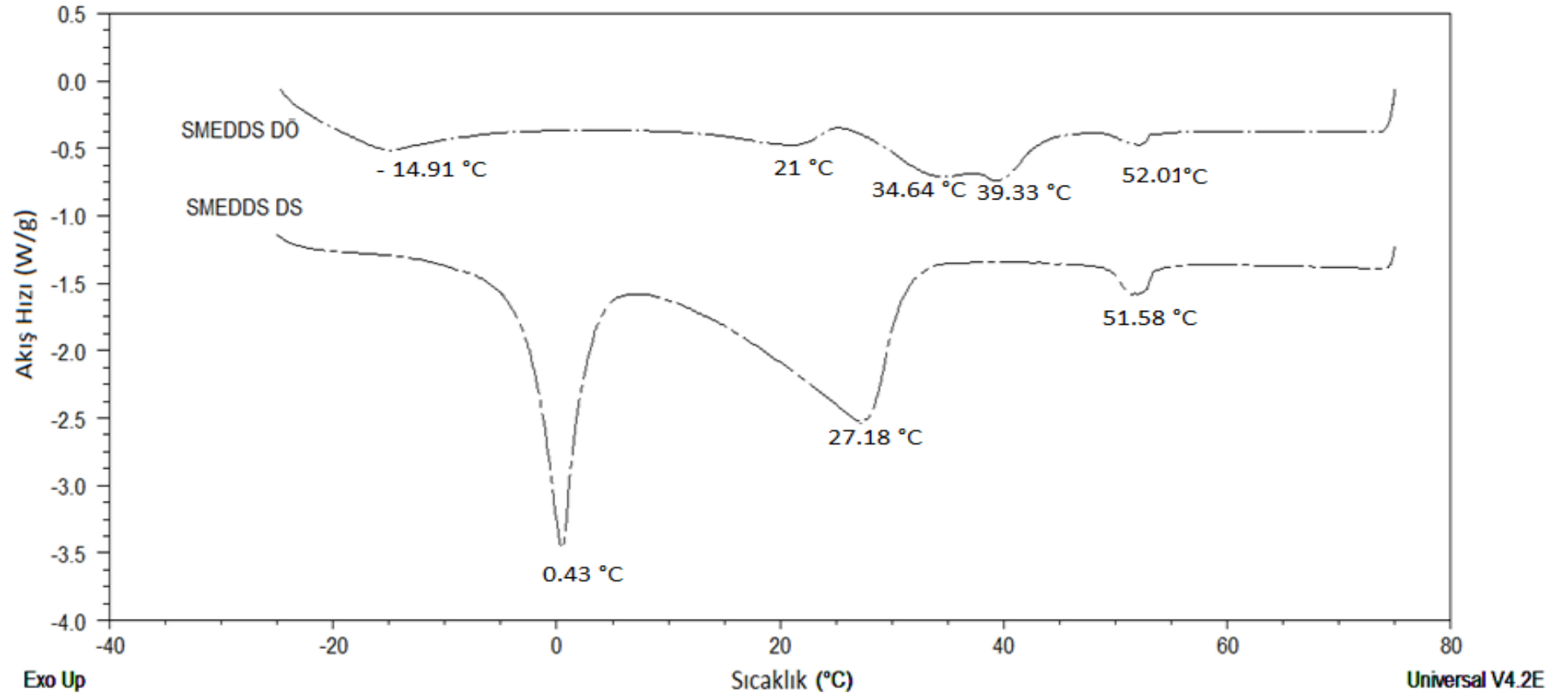
Örnek adı	Endoterm piki (°C)					Ekzoterm piki (°C)
	1	2	3	4	5	
Peceol	-16.51	12.47	20.04	52.01		-10.01
PEG 300	-13.42	51.9				
Labrasol	-1.06	54.89				
Gelucire 44/14	37.41	46.66				
SMEDDS D.Ö.*	-14.91	21.00	34.64	39.33	52.01	
SMEDDS D.S.**	0.43	27.18	51.58			

*D.Ö.: dilüsyon öncesi; **D.S.: dilüsyon sonrası

Yardımcı madde ve formülasyonlara ait DSC termogramları karşılaştırıldığında, yardımcı maddelere ait termogramlarda görülen bazı piklerin formülasyon termogramında da görüldüğü bazılarının ise kaybolduğu belirlenmiştir (Tablo 4.10). Buna göre; PEG 300'e ait -13.42 °C'de görülen endoterminin dilüsyon öncesi SMEDDS formülasyonunda -14.91 °C'ye kaydığı, dilüsyon sonrası SMEDDS formülasyonunda kaybolduğu görülmektedir. Ayrıca Peceol'e ait 20.04 °C'de görülen endotermin dilüsyon öncesi SMEDDS formülasyonunda bir derece arttığı görülmektedir. Dilüsyon sonrası SMEDDS formülasyonunda ise 27.18 °C'de görülen pike karşılık gelebilir. Diğer yandan, Peceol'e ait termogramda -10.01 °C ve 12, 47°C'de görülen pikler, dilüsyon öncesi ve sonrası formülasyonlarda kaybolmuştur. Gelucire 44/14'e ait 37.41 °C ve 46.66 °C'de görülen pikler dilüsyon öncesi SMEDDS formülasyonlarında daha alt derecelere kayarken (sırasıyla 34.63 °C ve 39.33 °C) dilüsyon sonrası formülasyonlarda kaybolmaktadır. Labrasol'e ait -1.06 °C'de görülen termogram, dilüsyon öncesi formülasyonlarda görülmezken, dilüsyon sonrası formülasyonda 0.43 °C'ye kaydığı görülmektedir. Dilüsyon öncesi ve sonrası formülasyonlara ait termogramlarda 52.01 °C ve 51.58 °C'de görülen piklerin Peceol, Labrasol ve PEG 300'den kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 4.10. Örnek SMEDDS formülasyonuna ait yardımcı maddelerin tek başına, dilüsyon öncesi (DÖ) ve dilüsyon sonrası (DS) DSC termogramları

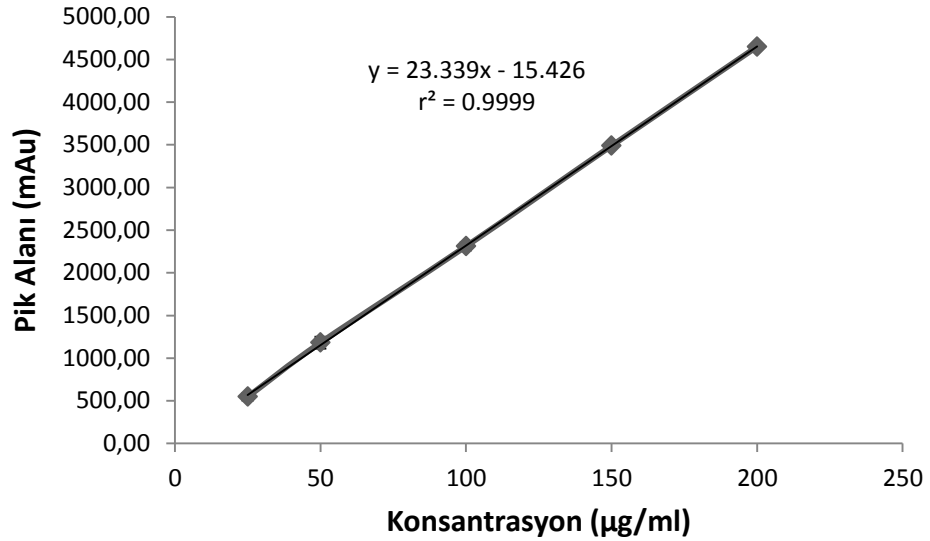


Şekil 4.11. SMEDDS formülasyonuna ait dilüsyon öncesi ve dilüsyon sonrası DSC termogramları

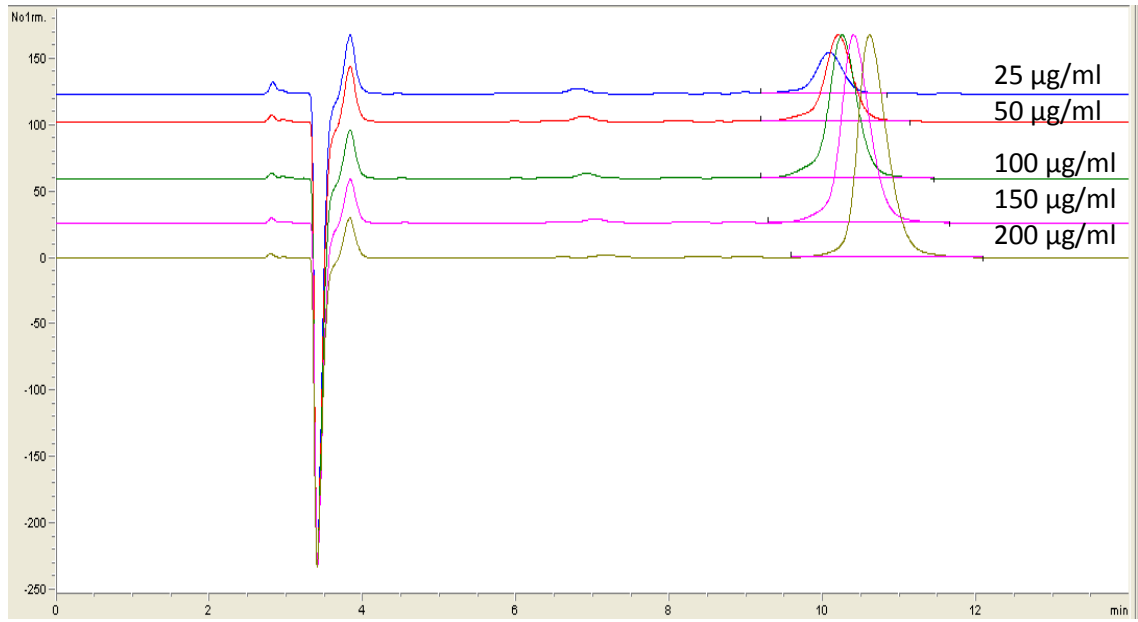
4.3. HPLC Metot Geliştirme ve Validasyon

4.3.1. Doğrusallık

Bölüm 3.4.1’de açıklandığı gibi hazırlanan 5 farklı derişimdeki LyP-1 sulu çözeltisi kullanılarak kalibrasyon doğruları çizilmiş ve regresyon analizi yapılarak doğru denklemleri elde edilmiştir. 6 seri yapılan ölçüm sonucu hesaplanan kalibrasyon doğrusu denkleminin doğrusallığının kontrol edilmesi için “r” (regresyon katsayısı) değerinin hesaplanmasının yanında, doğrusallıktan ayrılışın önem kontrolü yapılmıştır. Yapılan kontrol sonucu hesaplanan F istatistiği, tablodan bulunan F değeri ile karşılaştırılmış ve % 95 güven aralığında $F_{hesap} > F_{tablo}$ ($23747.17 > 10.13$ $\alpha=0.05$) bulunmuştur. Bu durumda H_0 hipotezi reddedilerek ilişkinin doğrusal olduğu söylenebilir. Şekil 4.12’de Lyp-1’e ait kalibrasyon doğrusu görülmektedir. Peptidin % 95 su : % 5 Asetonitril (ACN) (% 0.1 TFA) mobil faz sisteminde 204 nm dalga boyunda elde edilen kromotogramları ise Şekil 4.13’de verilmiştir.



Şekil 4.12. Lyp-1'in % 95 su : % 5 ACN (% 0.1 TFA) mobil faz sisteminde elde edilen kalibrasyon doğrusu (n=6).



Şekil 4.13. LyP-1 peptidine ait % 95 su : % 5 ACN (% 0.1 TFA) mobil faz sisteminde 204 nm dalga boyunda elde edilen kromatogramlar ($t_R = 10.6$ dk.).

4.3.2. Doğruluk

Yöntem doğruluğunun saptanabilmesi için düşük, orta ve yüksek konsantrasyonda (25, 100, 200 µl) 3 örneğin ardarda yapılan 3 enjeksiyonu sonrası % geri kazanımları ve % Bias değerleri Bölüm 3.4.2’de verildiği gibi hesaplanmıştır (Tablo 4.11).

Tablo 4.11. Lyp-1’in üç farklı konsantrasyonuna ait doğruluk verileri (n=3).

Eklenen Derişim (µg/mL)			Hesaplanan Derişim (µg/mL)			% Geri Kazanım		
25	100	200	24.79	100.26	199.43	99.18	100.26	99.71
25	100	200	24.84	99.93	199.17	99.37	99.26	99.59
25	100	200	22.42	99.97	199.72	89.66	99.97	99.86
X_{ort}			24.02	100.05	199.44	96.07	100.05	99.72
% Bias						3.93	0.03	0.14

4.3.3. Kesinlik

Tekrarlanabilirlik

Bölüm 3.4.3’de belirtildiği gibi ölçümler arasındaki kesinliği belirlemek için 200 µg/mL derişimdeki peptit çözeltisinden 6 kez enjeksiyon yapılmış ve pik alanlarına karşılık gelen derişimler için Ortalama, SS ve VK değerleri hesaplanmıştır. VK’nın % 2’nin altında bulunması yöntemin tekrarlanabilir olduğunu göstermektedir (Tablo 4.12).

Tablo 4.12. Tekrarlanabilirlik değerleri (n=6).

Enjeksiyon tekrarlanabilirliği değerleri			Yöntem tekrarlanabilirliği değerleri	
Eklenen Derişim (µg/mL)	Pik Alanı (mAu)	Hesaplanan Derişim (µg/mL)	Pik Alanı (mAu)	Hesaplanan Derişim (µg/mL)
200	5027.68	214.76	4658.7	198.95
	4997.38	213.46	4631.3	197.77
	4981.31	212.77	4669.9	199.43
	4961.84	211.94	4663.9	199.17
	4944.09	211.18	4676.6	199.72
	4925.01	210.36	4595.6	196.25
	X_{ort}	212.41	X_{ort}	198.55
	SS	1.59	SS	1.31
	VK	0.75	VK	0.66

Tekrar elde edilebilirlik

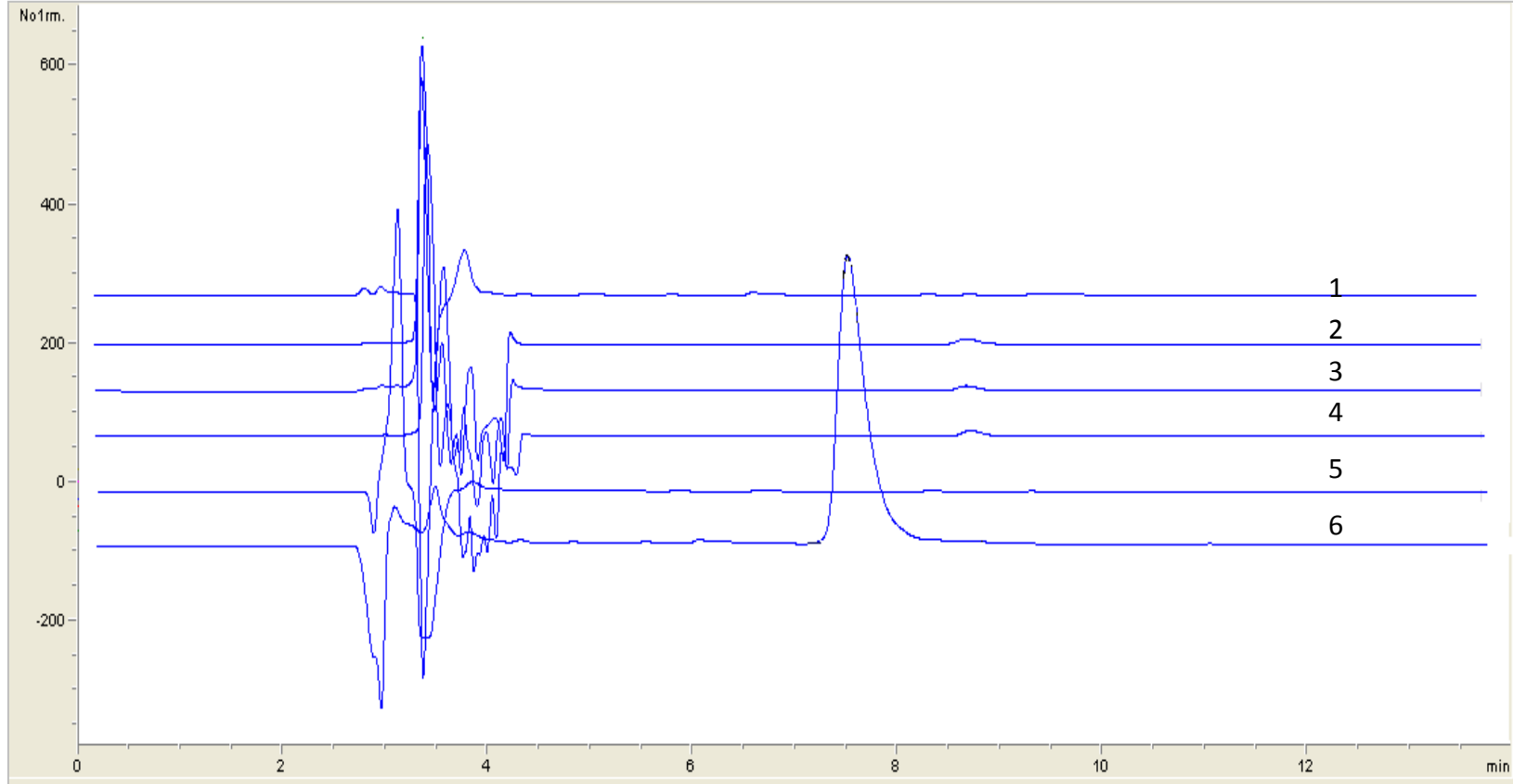
Bölüm 3.4.4’de açıklandığı gibi farklı deney zamanlarında yapılan enjeksiyonlar arasında fark olmadığının belirlenmesi için 6 farklı peptit sulu çözeltisinden yapılan enjeksiyonlar sonucu bulunan pik alanlarına karşılık gelen derişimlerin Ortalama, SS ve VK değerleri hesaplanmıştır. VK’nın % 2’nin altında bulunması yöntemin tekrar elde edilebilirliğini göstermektedir (Tablo 4.13).

Tablo 4.13. Tekrar elde edilebilirlik verileri (n=6).

Enjeksiyon Sayısı	1. Gün	2. Gün			
1	4129.79	5027.68			
2	4868.06	4997.38			
3	4876.09	4981.31			
4	4922.40	4961.84			
5	4943.11	4944.09			
6	4982.01	4925.01			
Alan (mAu)	4786.91	4972.88	X_{ort}	SS	VK
Teorik Derişim ($\mu\text{g/mL}$)	205.75	213.72	209.74	3.98	1.90

4.3.4. Özgünlük

Özgünlük için formülasyona giren yardımcı maddeler olan Labrasol, Gelucire 44/14, Peceol ve PEG 300 ile seçilen formülasyon F18 (Labrasol/Gelucire 44/14 1:2) boş olarak analiz edilmiş ve etkin madde ile aynı yerde pik vermedikleri gösterilmiştir. Şekil 4.14’de peptide ve formülasyon bileşenlerine ait kromotogramlar görülmektedir.



Şekil 4.14. Yardımcı madde, etkin madde içermeyen SMEDDS (1:10 dilüsyon) ve LyP-1'e ait HPLC kromatogramları ;
1) PEG 300, 2) Peceol, 3) Gelucire 44/14, 4) Labrasol, 5) SMEDDS, 6) Lyp-1.

4.3.5. Duyarlılık

Analiz yönteminin duyarlılığının belirlenmesine yönelik olarak teşhis ve tayin edilebilirlik sınırları Bölüm 3.4.5’de verildiği gibi hesaplanmıştır.

Teşhis Sınırı (LOD): 7.75 µg/mL

Tayin Sınırı (LOQ): 23.50 µg/mL

4.3.6. Sistem Uygunluk Parametreleri

Yöntemin etkinliği ve uygunluğunun incelenmesi için sistem uygunluk parametreleri Bölüm 3.4.6’da açıklandığı gibi hesaplanmıştır. Tablo 4.14’de hesaplanan değerler görülmektedir. Hesaplanan verilere göre, geliştirilen yöntemin etkin ve uygun olduğu söylenebilir.

Tablo 4.14. Sistem uygunluk parametreleri.

Parametre	Sonuç
Kuyruklanma Faktörü (T_f)	1.33
Kapasite Faktörü (k')	2.02
Teorik Tabaka Sayısı (N)	2722.96

4.4. Stabilite Deneyleri

4.4.1. Etkin Madde Stabilesi

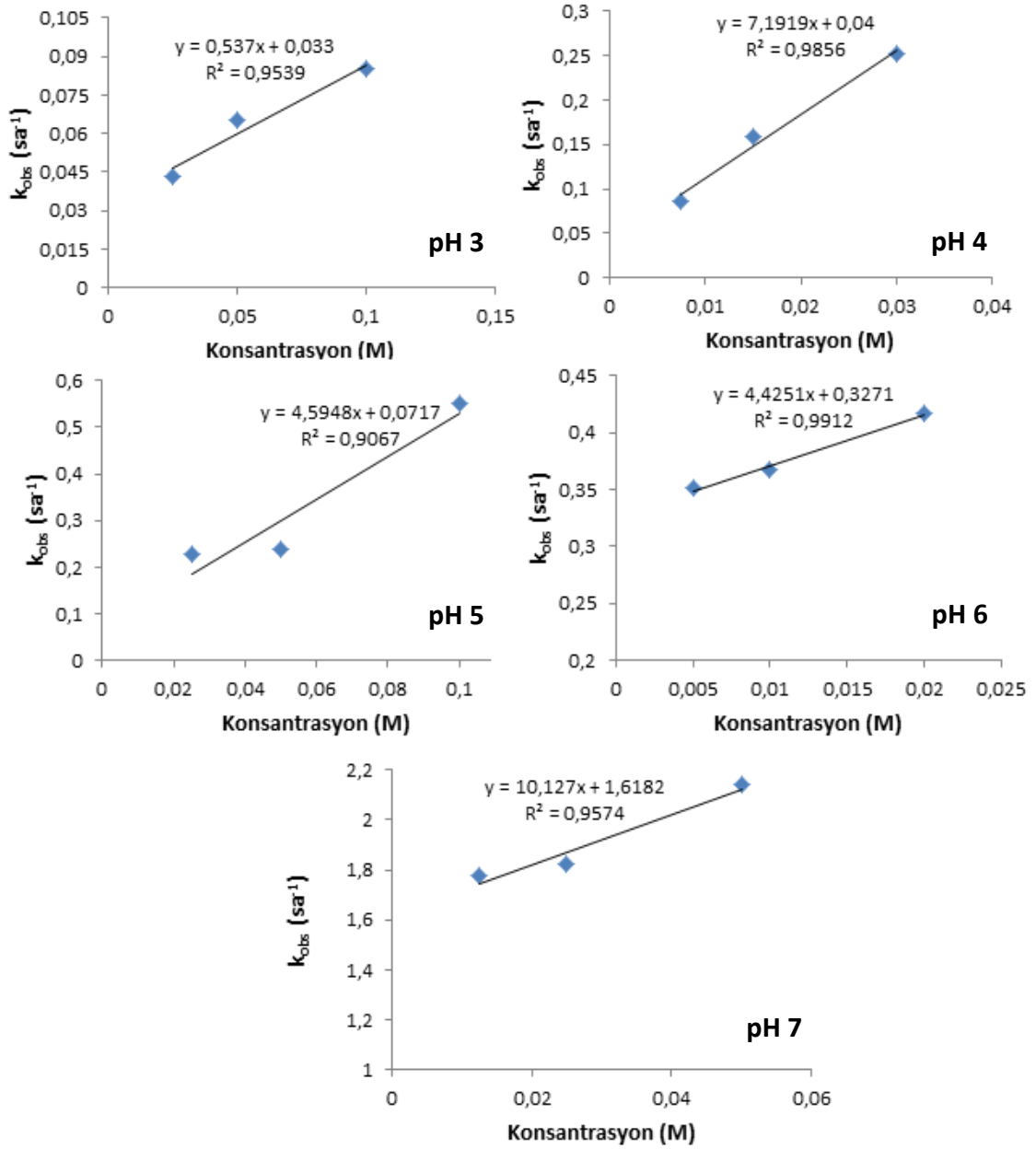
Farklı pH’larda yürütülen stabilite çalışmalarında zamana bağlı olarak değişen peptit konsantrasyonları Eşitlik 2.8 ve 2.9’da verilen denklemlerde yerine koyularak parçalanma hız sabitleri ve yarılanma ömürleri hesaplanmıştır (Tablo 4.15).

Tablo 4.15. Farklı pH'larda hesaplanan k_{obs} ve yarılanma ömürleri (37 °C)*

pH	Tampon Türü ve Derişimi (mM)		$k_{obs} (sa^{-1})^*$	$t_{1/2} (sa)$
1	HCl	100	2.14×10^{-3}	304.72
2	HCl	10	1.45×10^{-2}	47.76
3	Fosfat	100	8.50×10^{-2}	8.15
3	Fosfat	50	6.49×10^{-2}	10.67
3	Fosfat	25	4.30×10^{-2}	16.12
3	Fosfat	0	3.05×10^{-2}	22.72
4	Asetat	30	2.53×10^{-1}	2.75
4	Asetat	15	1.59×10^{-1}	4.35
4	Asetat	7.5	8.64×10^{-2}	8.02
4	Asetat	0	4.00×10^{-2}	17.32
5	Asetat	100	5.52×10^{-1}	1.25
5	Asetat	50	2.38×10^{-1}	2.92
5	Asetat	25	2.29×10^{-1}	3.02
5	Asetat	0	7.17×10^{-2}	9.66
6	Fosfat	20	4.17×10^{-1}	1.66
6	Fosfat	10	3.68×10^{-1}	1.88
6	Fosfat	5	3.52×10^{-1}	1.97
6	Fosfat	0	3.27×10^{-1}	2.12
7	Fosfat	50	2.14	0.32
7	Fosfat	25	1.82	0.38
7	Fosfat	12.5	1.78	0.39
7	Fosfat	0	1.62	0.43
12	NaOH	10	3.75×10^{-1}	1.85

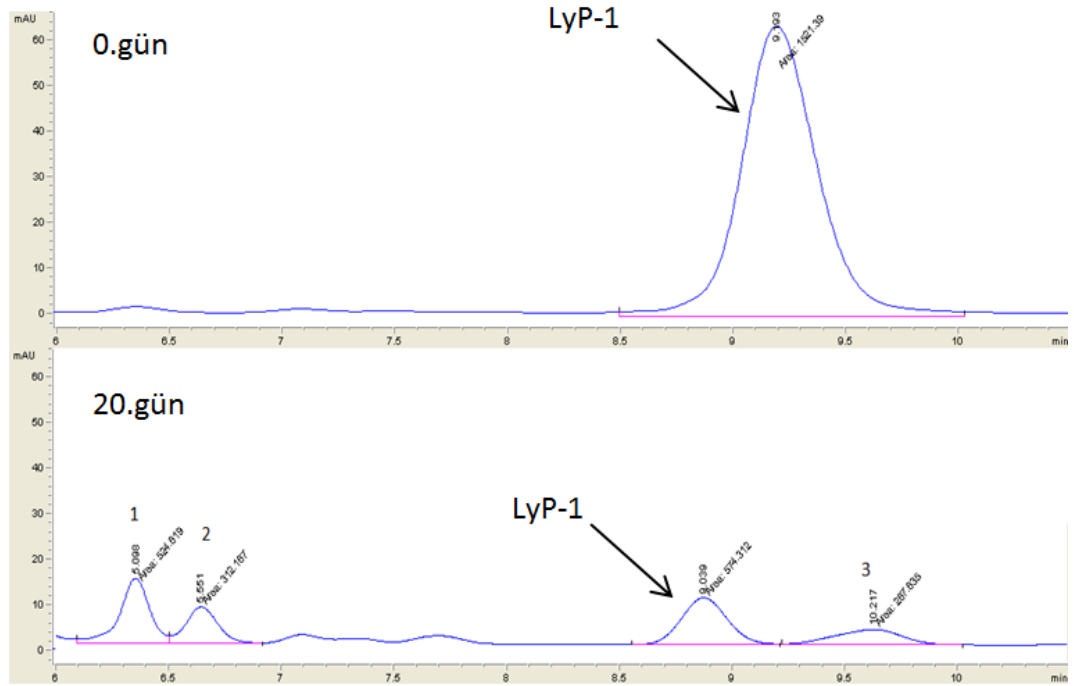
*pH 8, 9, 10 ve 11'de peptit çok hızlı bir şekilde parçalandığı (birkaç dakika içinde) için parçalanma hız sabitleri tespit edilememiştir.

Üç farklı tampon konsantrasyonunda çalışılan pH 3, 4, 5, 6 ve 7 için k_0 değerleri hesaplanmıştır (Şekil 4.15). Bu değer tampon katalizinin olmadığı durumdaki parçalanma hız sabitidir. Bunun için 3 farklı tampon konsantrasyonundaki " k_{obs} " değerleri bulunmuştur. Tampon konsantrasyonu arttıkça tampon katalizi nedeni ile parçalanma hızı da artmaktadır. Buna göre tampon konsantrasyonuna karşı k_{obs} değerleri grafiğe geçirildiğinde elde edilen doğrunun y-eksenini kestiği değer k_0 değerini vermektedir.

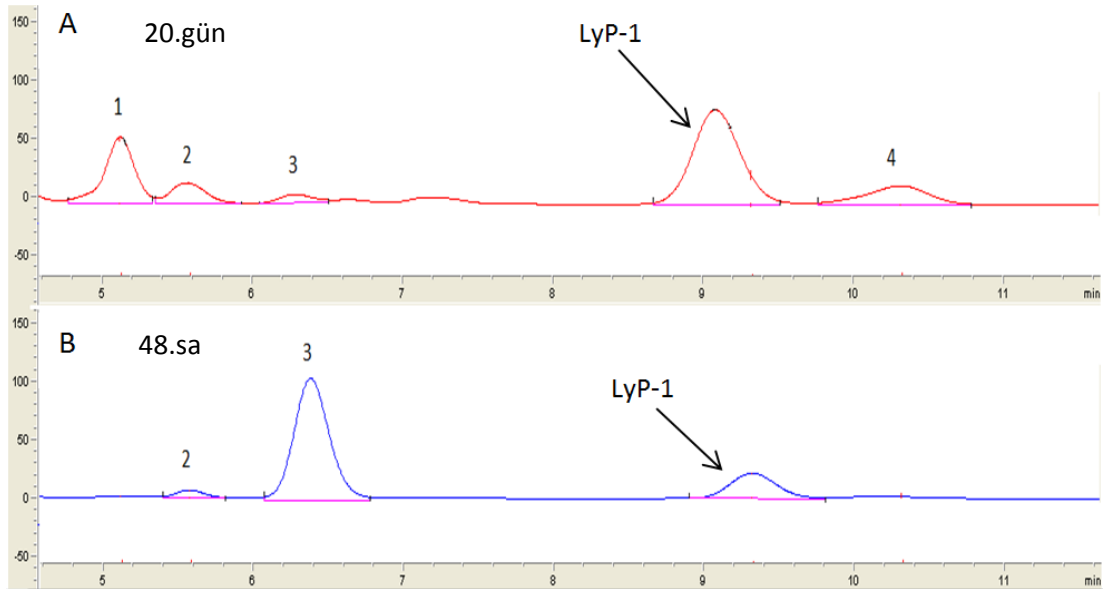


Şekil 4.15. Konsantrasyon (M)– k_{obs} (s^{-1}) grafikleri.

Stabilite çalışmaları sonucunda Lyp-1 peptidinin asidik pH'larda çok daha dayanıklı olduğu görülmektedir. Şekil 4.16'da pH 1'de 37 °C'de gerçekleştirilen stabilite çalışmasında 0. ve 20. güne ait kromatogramlar görülmektedir. 20. gün sonunda Lyp-1 peptidinin % 65'inin parçalandığı görülmektedir. Yapılan çalışmada, pH 1 içerisinde farklı parçalanma pikleri görülürken diğer pH'larda 2 ana parçalanma pikine rastlanmaktadır (Şekil 4.17 A–B).

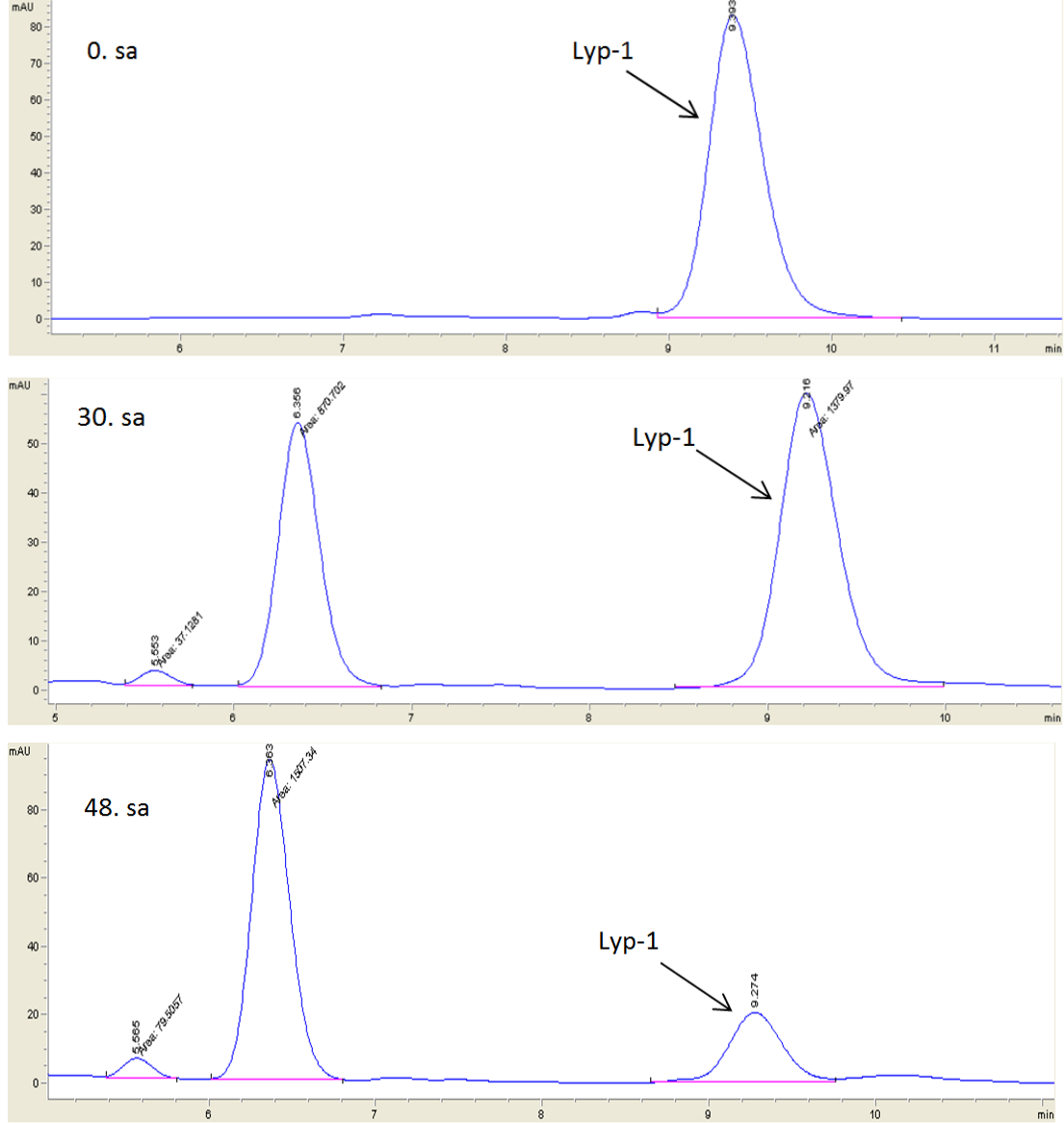


Şekil 4.16 . pH 1’de yapılan stabilite çalışmasına ait kromatogramlar (37 °C).



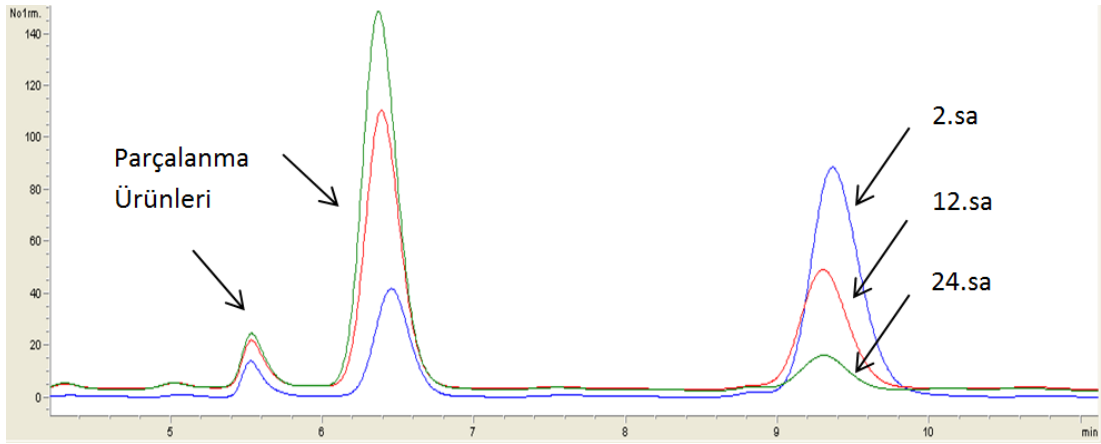
Şekil 4.17. pH 1 (A) ve pH 2 (B)’de yapılan stabilite çalışmalarında oluşan parçalanma pikleri (37 °C).

Şekil 4.18’de ise pH 2’ye ait parçalanma pikleri görülmektedir. pH 2’de pH 1’e göre çok daha hızlı bir parçalanma gerçekleşmekte olup, 48. saatin sonunda peptidin % 47’si parçalanmaktadır.



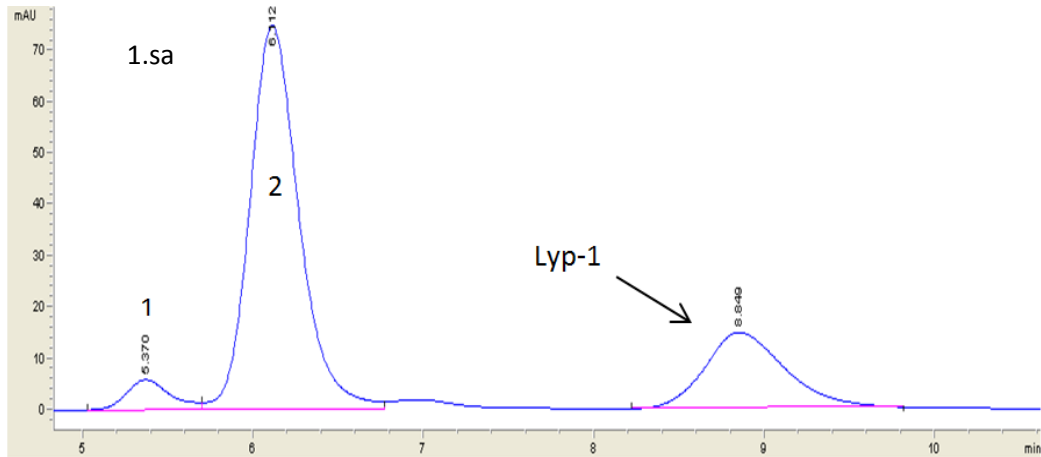
Şekil 4.18. pH 2’de yapılan stabilite çalışmasına ait parçalanma pikleri (37°C).

pH 3’de yürütülen çalışmalarda, 24 saat sonunda peptidin sadece % 19’unun kaldığı görülmektedir (Şekil 4.19). Şekil 4.19’da ayrıca zamanla artan parçalanma ürünlerine karşılık Lyp-1 peptidine ait pikin gittikçe küçüldüğü görülmektedir.



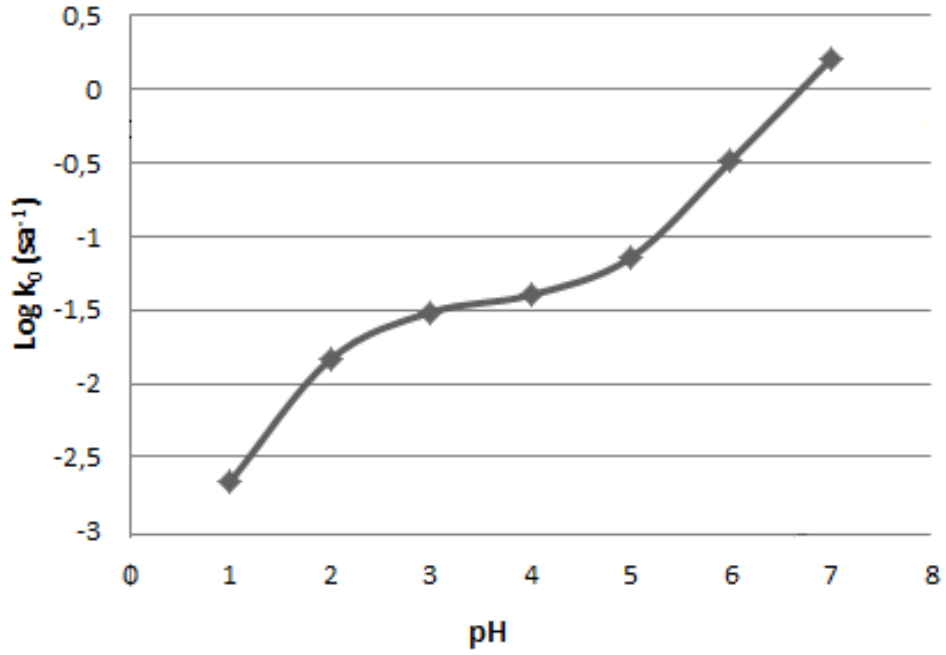
Şekil 4.19. pH 3 (0.05 M) tamponunda 37 °C’de gerçekleştirilen stabilite çalışmasına ait 2, 12 ve 24. saat parçalanma pikleri.

Görüldüğü gibi pH arttıkça peptidin parçalanma hızı da artmaktadır. pH 4, 5 ve 6’da da iki ana parçalanma pikine rastlanmıştır. pH 7 tamponunda peptidin yarılanma ömrünün 19.2 ila 23.4 dakika arasında değiştiği belirlenmiştir. Şekil 4.20’de pH 7’ye ait parçalanma piklerinin de asidik pH’lar ile benzer olduğu görülmektedir. Bazik pH’larda ise peptidin dakikalar içinde parçalandığı görülmüştür.



Şekil 4.20. pH 7 (0.05 M)’deki parçalanma pikleri (37 °C).

Elde edilen verilere göre oluşturulan peptide ait parçalanma hız profilinde de görüleceği gibi Lyp-1 peptidi pH 1’de en stabil konumdadır (Şekil 4.21). pH1 ve pH 5 sonrası parçalanma hızı daha dik bir şekilde artmaktadır. Bulunan hız profili literatürde bulunan benzer çalışmalarla büyük oranda benzerlik göstermektedir (187, 188).



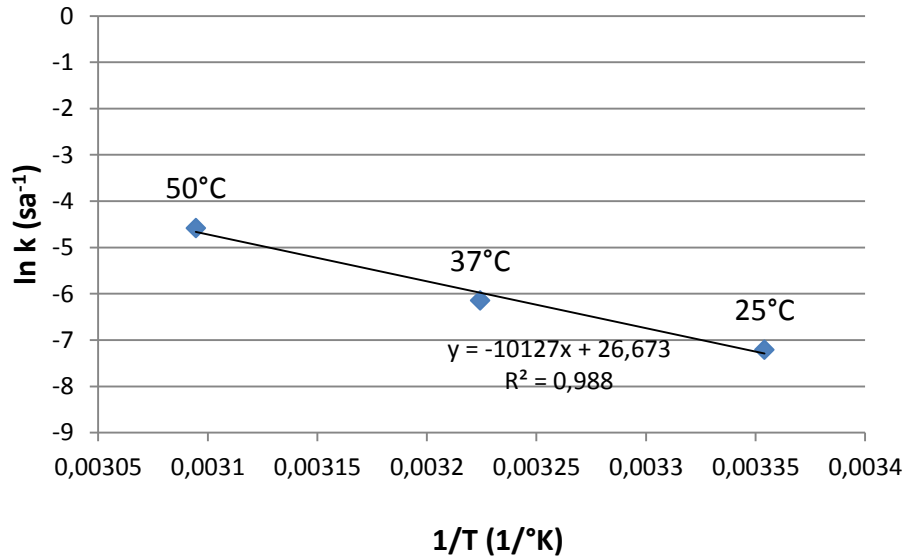
Şekil 4.21. Lyp-1 peptidine ait pH-Log k_0 grafiği.

Reaksiyon hızının sıcaklığa etkisi Arrhenius tarafından açıklanmıştır. Arrhenius deneysel sonuçlardan yola çıkarak, reaksiyon hız sabitinin mutlak sıcaklıkla üssel olarak değiştiğini belirlemiştir. Bu sebeple; elde edilen sonuçlar gözönüne alınarak peptidin pH 1, pH 2 ve pH 3’ün 3 farklı konsantrasyonunda 25 °C ve 50 °C’de de stabilite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalara ait sonuçlar Tablo 4.16’da verilmiştir.

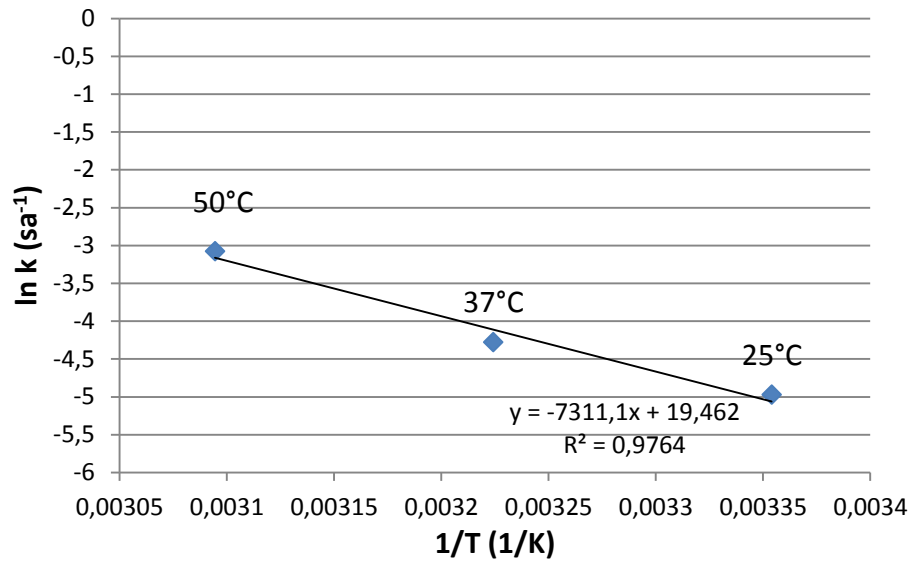
Peptide ait aktivasyon enerjilerinin hesaplanması için eşitlik 2.10'da verilen Arrhenius denklemi kullanılmıştır. pH 1, 2 ve 3 için Arrhenius grafikleri sırasıyla Şekil 4.22–24'de görülmektedir.

Tablo 4.16. pH 1, 2 ve 3 ortamlarında gerçekleştirilen kinetik çalışmalar sonucu elde edilen k_{obs} ve $t_{1/2}$ değerleri.

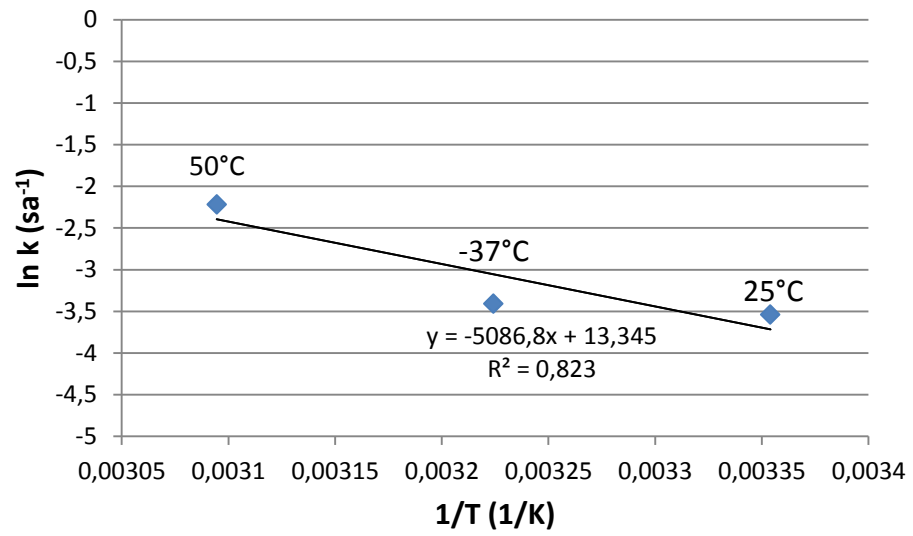
	Sıcaklık					
	50 °C		37 °C		25 °C	
pH	k_{obs} (sa ⁻¹)	$t_{1/2}$ (sa)	k_{obs} (sa ⁻¹)	$t_{1/2}$ (sa)	k_{obs} (sa ⁻¹)	$t_{1/2}$ (sa)
1	1.09×10^{-2}	63.35	2.14×10^{-3}	304.72	7.39×10^{-4}	937.91
2	4.61×10^{-2}	15.05	1.45×10^{-2}	47.76	6.91×10^{-3}	100.30
3 (100 mM)	1.89×10^{-1}	3.67	8.50×10^{-2}	8.15	5.48×10^{-2}	12.64
3 (50 mM)	1.43×10^{-1}	4.85	6.49×10^{-2}	10.67	4.35×10^{-2}	15.92
3 (25 mM)	1.31×10^{-1}	5.28	4.30×10^{-2}	16.12	3.64×10^{-2}	19.04
E_a (kcal/mol)	20.12		15.05		10.11	



Şekil 4.22. pH 1 'de değişen sıcaklığa bağlı olarak LyP-1 parçalanma hız sabiti değerleri.



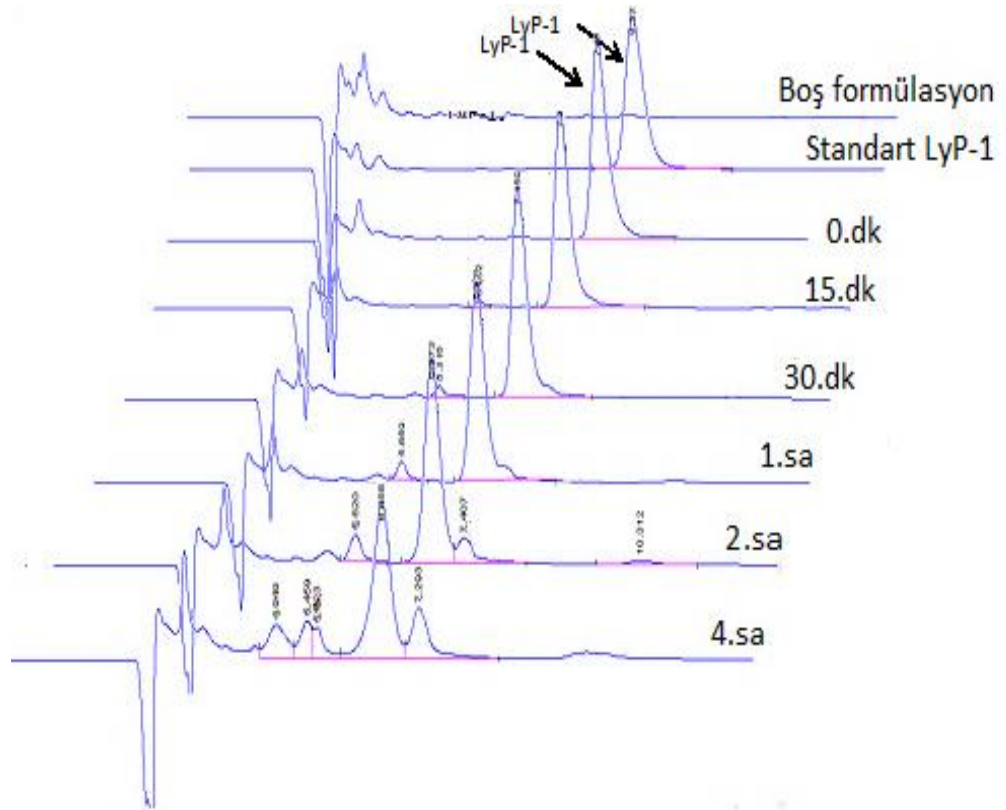
Şekil 4.23. pH 2’de değişen sıcaklığa bağlı olarak LyP-1 parçalanma hız sabiti değerleri.



Şekil 4.24. pH 3’de değişen sıcaklığa bağlı olarak LyP-1 parçalanma hız sabiti değerleri.

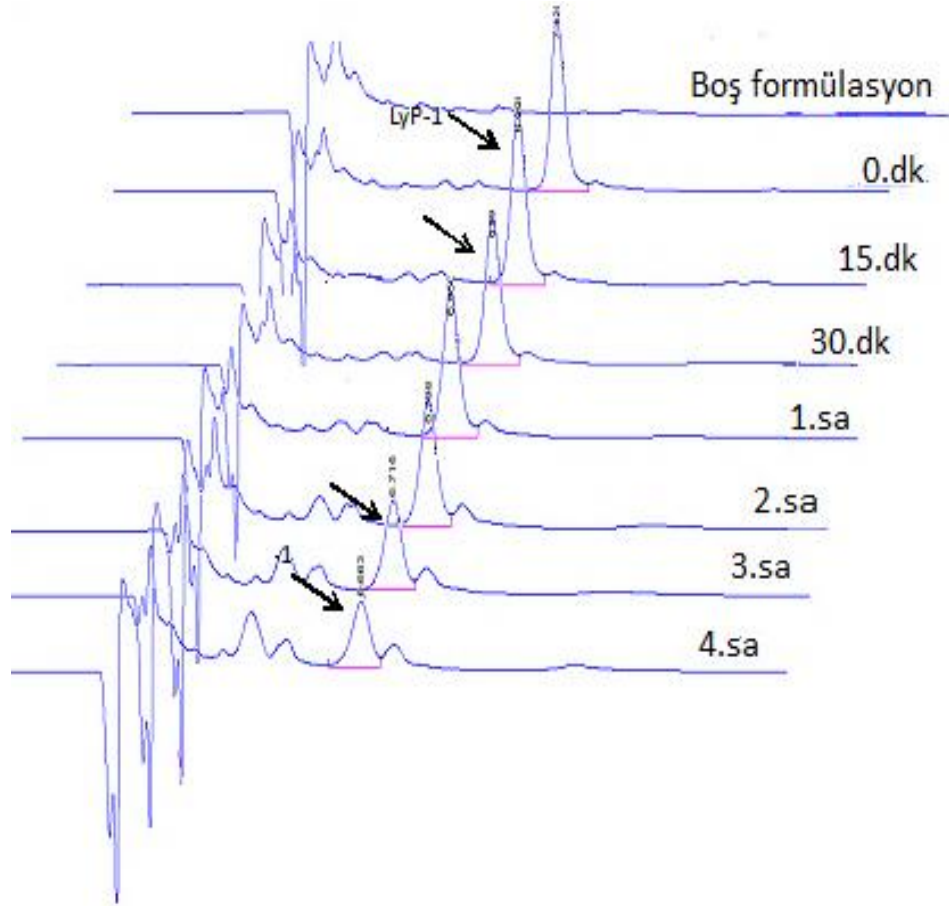
4.4.2. LyP-1 İçeren Formülasyonların Stabilitesi

Formülasyon çalışmaları için peptidin en stabil olduğu pH olan pH 1 ile dilüe edilen SMEDDS formülasyonları hazırlanarak etkin maddenin stabilitesi incelenmiştir (Şekil 4.25). Ayrıca, katı dispersiyonun hazırlanması ile peptidin SMEDDS içinde yağ fazına geçirilmesi ve korunması amaçlanmıştır.



Şekil 4.25. 2 mg LyP-1 peptidi içeren SMEDDS formülasyonuna ait kromatogramlar (37 °C). (Lyp-1 peptidine ait pik okla gösterilmiştir).

Şekil 4.26'de görüldüğü üzere katı dispersiyon haline getirilen peptidin SMEDDS içinde yağ fazına hapsedilmesi ile stabilitede artış görülmektedir. 2. saatin sonuna kadar peptit korunmaktadır. 2. saatten sonra ise parçalanma pikleri belirginleşmektedir.



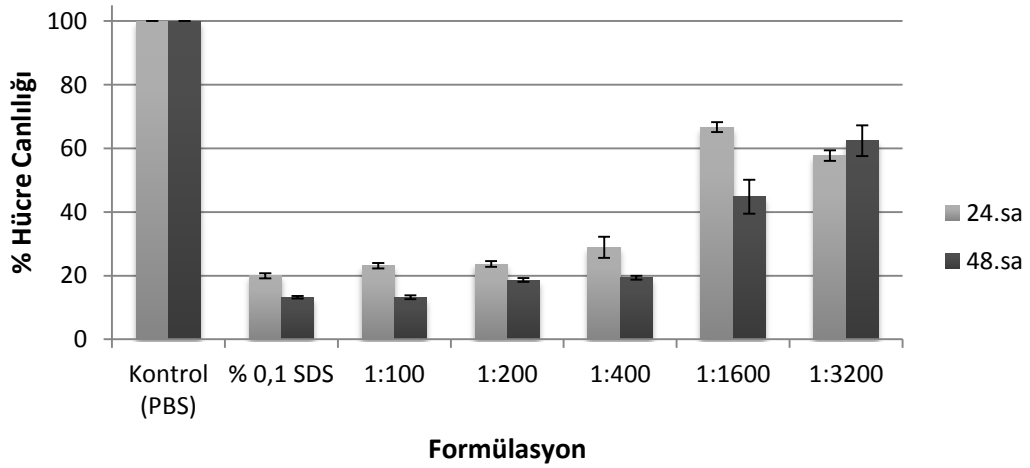
Şekil 4.26. 3, 2 mg Lyp-1-Soy PC katı dispersiyonu içeren SMEDDS formülasyonuna ait kromatogramlar (37 °C). (Lyp-1 peptidine ait pik okla gösterilmiştir).

4.5. Hücre Kültürü Çalışmaları

4.5.1. Etkin madde içermeyen formülasyonların sitotoksitesisi

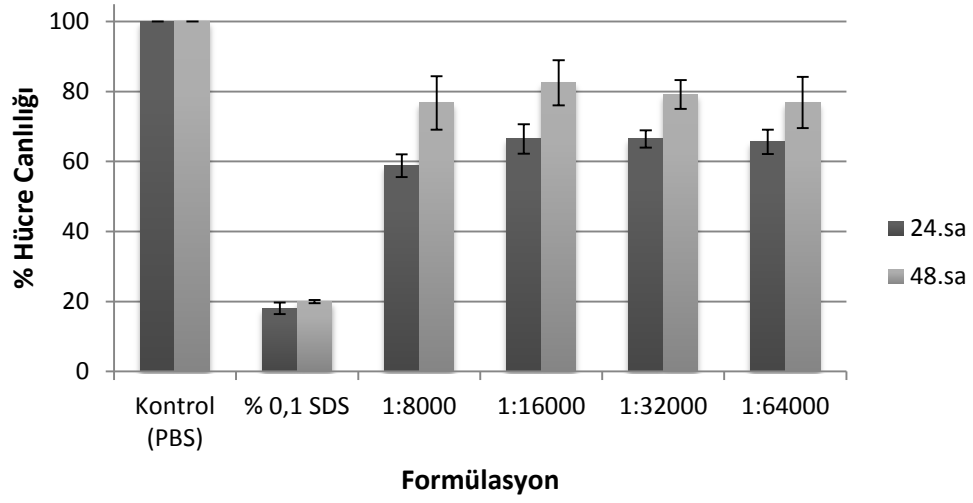
Yapılan deneyler sonucunda, etkin madde içermeyen formülasyonun pH 7.4 fosfat tamponu ile seyreltilerek hazırlanan örneklerin uygulandığı hücreler, 24 ve 48. saatlerde MTT testi ile analiz edilmiştir.

Bu örnekler içerisinde 1:100–1:400 dilüsyona sahip olan gruplarda hücre canlılığında ortalama % 21'e, 1:1600 ve 1:3200 olan gruplarda ise ortalama % 58'e kadar düşüş gözlemlenmiştir (Şekil 4.27).



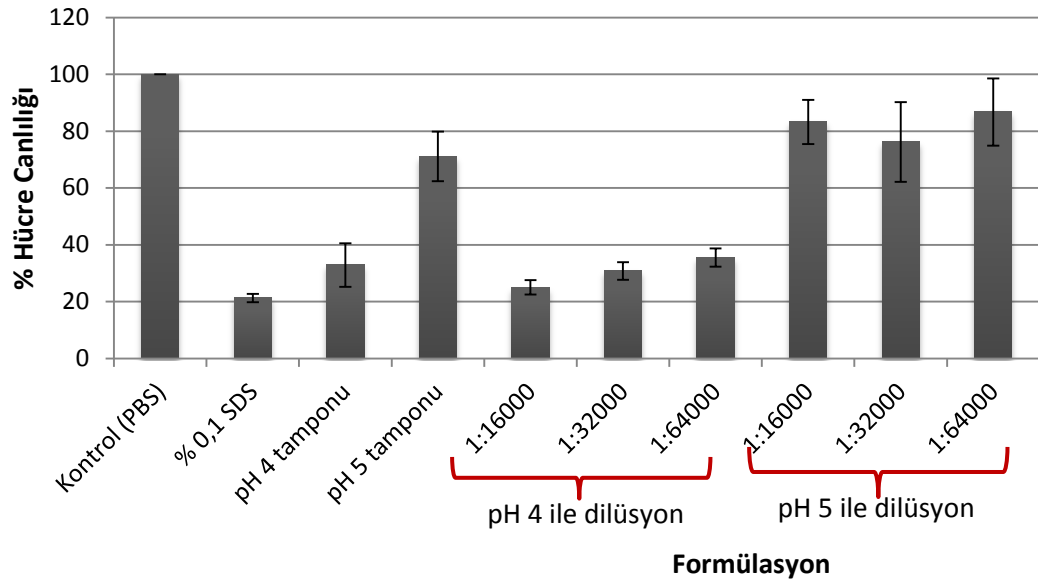
Şekil 4.27. pH 7.4 fosfat tamponu ile dilüsyon sonrası etkin madde içermeyen formülasyonlara ait Caco-% hücre canlılığı değerleri (n=5).

Bunun üzerine, formülasyonun dilüsyon oranı artırılmış ve 1:8000 ile 1:64000 arasında dilüsyonlar yapılarak aynı şekilde Caco-2 hücrelerine 48 saat boyunca uygulanmışlardır. Deneyler sonucunda 48. saat sonunda canlılık yaklaşık % 80 oranında korunmuştur (Şekil 4.28). % 0.1'lik SDS çözeltisinde ise hücre canlılığının aynı şekilde % 20'nin altına düştüğü görülmektedir. Dilüsyonlar arası yapılan karşılaştırmalarda 24 saat sonunda elde edilen sonuçlar göz önüne alındığında sadece 1:16000 ve 1:32000 dilüsyon gruplarında fark bulunmazken ($p>0.05$) diğer gruplar arasında fark anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). 48 saat sonunda ise farklı dilüsyonlar arasında fark bulunmamıştır ($p>0.05$).



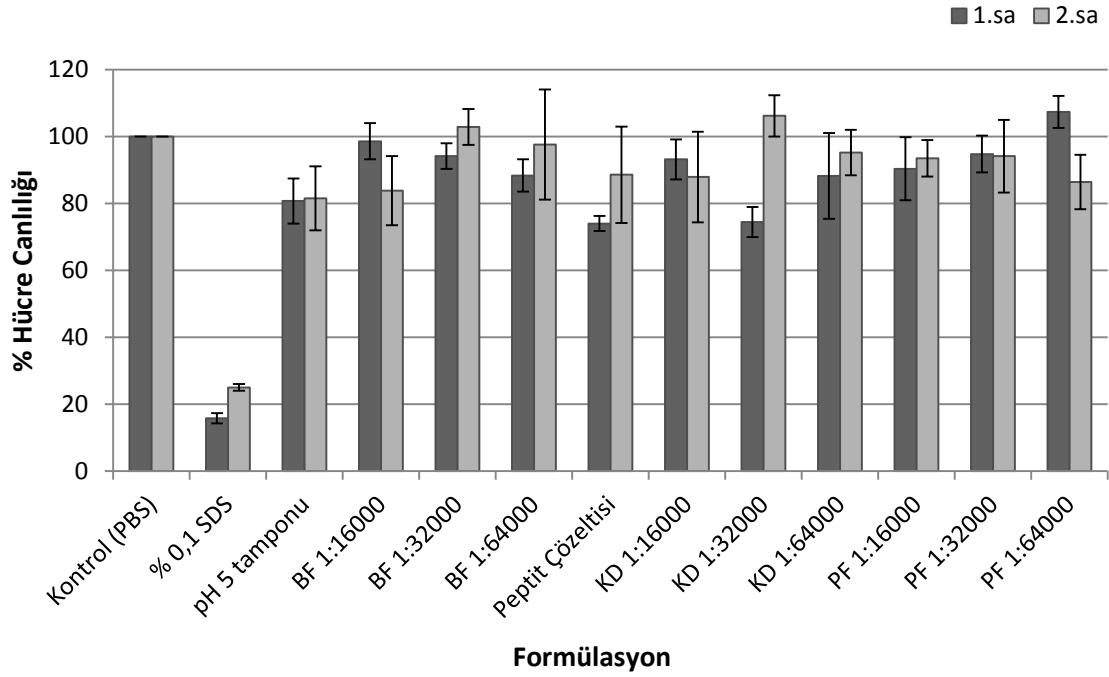
Şekil 4.28. pH 7.4 fosfat tamponu ile dilüsyon sonrası etkin madde içermeyen formülasyonlara ait Caco-2 % hücre canlılığı değerleri (n=6).

Peptit düşük pH'larda stabil olduğu için, biyoaktivite çalışmaları için pH 4 ve pH 5 asetat tamponları ile bunlarla dilüe edilmiş etkin madde içermeyen formülasyonlar Caco-2 hücrelerine uygulanmış ve hücre canlılığı tayin edilmiştir. pH 4 tamponu ile hücre canlılığı % 30'ın altına düşerken, pH 5 tamponu ve pH 5 ile dilüe edilen formülasyonlarda 2 saat sonunda ortalama % 82 oranında korunmuştur (Şekil 4.29). Bu nedenle, etkin madde içeren formülasyonlara ait çalışmaların pH 5 ile dilüe edilerek 2 saat boyunca yapılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.29. pH 4 ve 5 asetat tamponu ile dilüsyon sonrası etkin madde içermeyen formülasyonlara ait Caco-2 % hücre canlılığı değerleri (n=5).

Etkin madde içeren formülasyonlara ait çalışmalarda öncelikle Caco-2 hücreleri üzerinde toksisite incelenmiştir. Uygulanan tüm formülasyonlarda peptit konsantrasyonu sabit tutulmuştur (180 nM). Elde edilen sonuçlara göre, sadece peptit çözeltisi uygulanan grupta etkin madde içermeyen formülasyonlara göre anlamlı bir fark bulunmuştur ($p < 0.05$). KD ve PF gruplarının (KD: Peptidin katı dispersiyonunu içeren SMEDDS formülasyonu, PF: Peptidi içeren SMEDDS formülasyonu) kendi içlerinde farklı dilüsyonlarının karşılaştırılması sonucu fark bulunmamış olup, etkin madde içeren formülasyon gruplarının pH 5 tamponu ile karşılaştırılması sonucunda da gruplar arasında fark bulunmamıştır ($p > 0.05$). Bu durumda etkin madde içeren formülasyonların boş tampon ile aynı etkiyi gösterdiği ve Caco-2 hücrelerine toksik olmadığı söylenebilir (Şekil 4.30).



Şekil 4.30. pH 7.4 fosfat tamponu ile dilüsyon sonrası etkin madde içeren formülasyonlara ait Caco-2 % hücre canlılığı değerleri (n=5).

*BF: Boş SMEDDS formülasyonu, KD: Peptidin katı dispersiyonunu içeren SMEDDS formülasyonu, PF: Peptidi içeren SMEDDS formülasyonu.

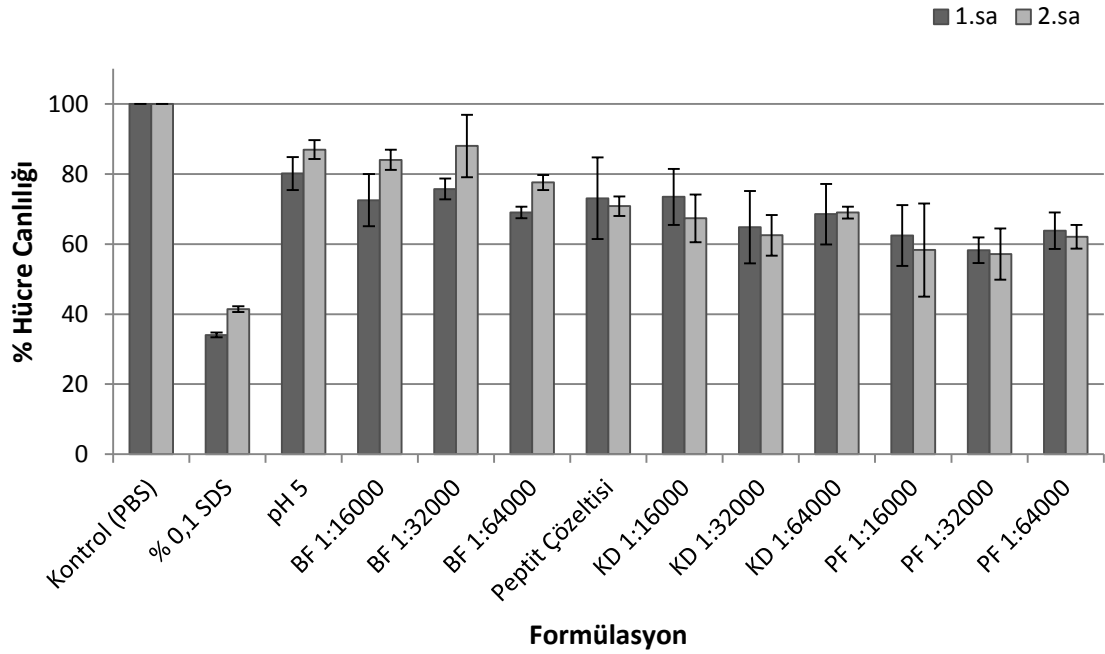
4.5.2. Etkin Madde İçeren Formülasyonlara ait Biyoaktivite Çalışmaları

Biyoaktivite çalışmalarında, katı dispersiyonu ve peptidi içeren formülasyon grupları 3 farklı dilüsyonda MDA-MB 231 hücre hattına uygulanmıştır. Formülasyon gruplarında ve çözeltide, peptit konsantrasyonu aynı tutulmuştur.

Elde edilen sonuçlara ait % hücre canlılığı grafiği Şekil 4.31’de görülmektedir. Peptit çözeltisinin bu hücre hattında da boş tampona göre etkili olduğu görülmüştür ($p < 0.05$). Formülasyon gruplarında ise peptit çözeltisine göre hücre canlılığında daha fazla düşüşe neden oldukları görülmektedir.

1. saat sonunda KD grubu formülasyonlar ile peptit çözeltisi arasında fark bulunmazken, PF grubu formülasyonlar ile peptit çözeltisi arasında fark anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Peptidi tek başına içeren formülasyonların (PF 1:16000–1:32000), katı dispersiyon ile karşılaştırıldığında (KD 1:16000–1:32000) hücre

canlılığını yaklaşık % 10 daha fazla düşürdükleri görülmüştür. Fakat fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ($p=0.052$). Öte yandan, KD ve PF gruplarının 1:16000 dilüsyonları karşılaştırıldığında farkın anlamlı olduğu görülmektedir ($p<0.05$). Her iki formülasyon grubunda kendi içlerinde dilüsyonlar arası fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Etkin madde içeren formülasyonların her bir dilüsyonu etkin madde içermeyen formülasyonları ile karşılaştırıldığında tüm gruplarda fark bulunmuştur ($p<0.05$).



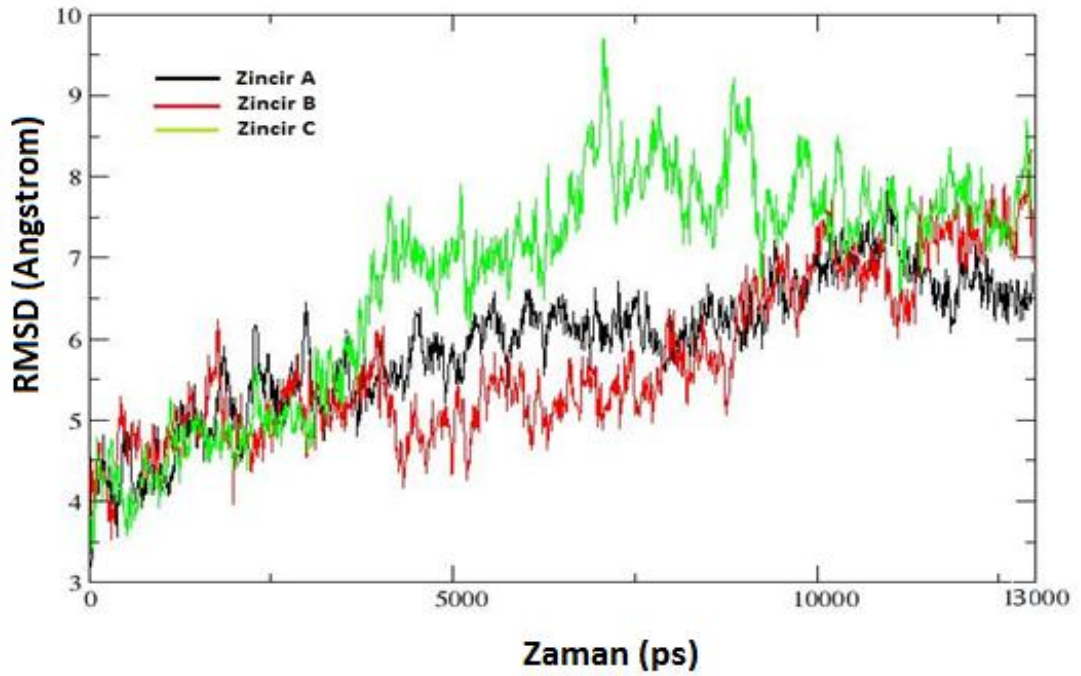
Şekil 4.31. pH 5 asetat tamponu ile dilüsyon sonrası etkin madde içeren formülasyonlara ait MDA-MB 231 % hücre canlılığı değerleri (n=5).

*BF: Boş SMEDDS formülasyonu, KD: Peptidin katı dispersiyonunu içeren SMEDDS formülasyonu, PF: Peptidi içeren SMEDDS formülasyonu.

4.6. Moleküler Dinamik (MD) Çalışmaları

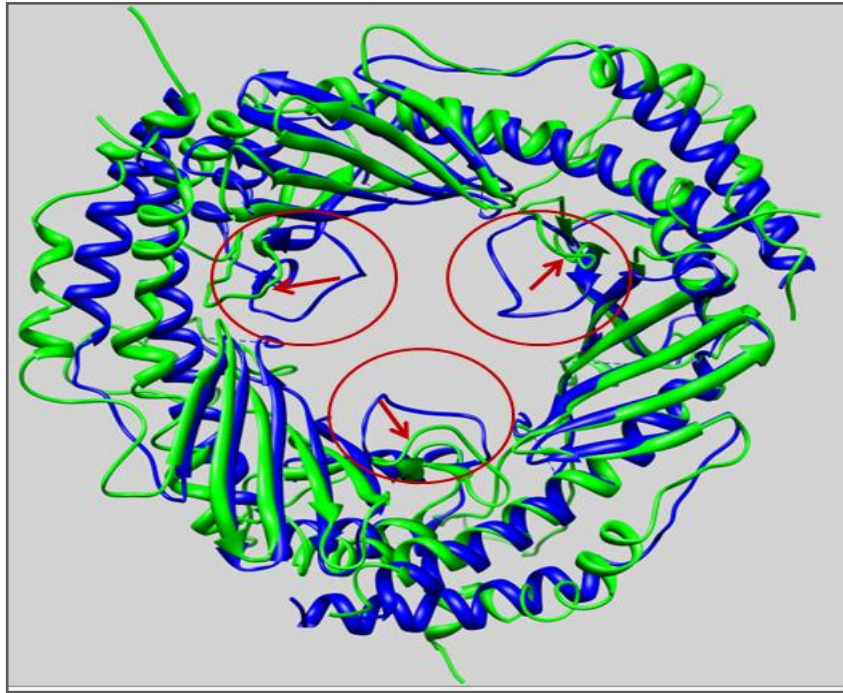
4.6.1. P32 Proteinine ait Moleküler Dinamik Çalışmaları

Peptidin reseptöre bağlanmasının incelenmesi için öncelikle p32 proteininin kristal yapısı ve MD yapısının tanınması ve karşılaştırılması amacı ile p32 proteinine ait moleküler dinamik çalışmaları yürütülmüştür. P32 için 13 ns implisit su MD hesaplamalarında elde edilen RMSD eğrileri Şekil 4.32’de gösterilmektedir. Bu RMSD eğrilerine göre P32 proteinin A (siyah), B (kırmızı) ve C (yeşil) zincirlerinin 9 ns (9000 ps)’den sonra bir dengeye ve kararlılığa ulaştığı görülmüştür.



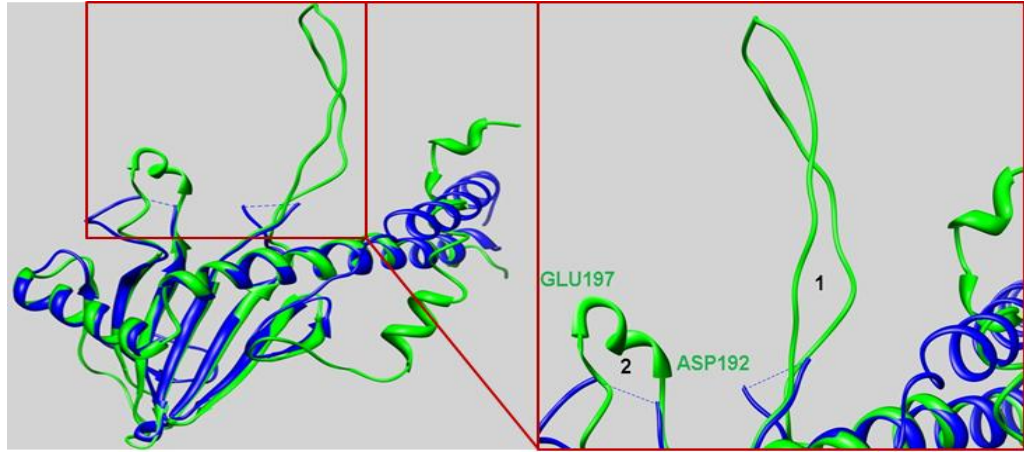
Şekil 4.32. p32 proteininin A (siyah), B (kırmızı), C (yeşil) zincirleri için 13 ns (13000 ps) RMSD eğrileri. RMSD grafikleri için X-ışını koordinatları referans alınmıştır.

Şekil 4.33’de p32’nin X-ışını kristal (mavi) ve 13 ns implisit su MD (yeşil) yapıları üst üste çakıştırılarak kurdele (ribbon) formunda gösterilmiştir. Bu yapılara göre, genel itibarı ile proteinin iskelet yapısında fazla bir sapma tespit edilmemiştir. Ancak p32 X-ışını yapısındaki (mavi) halkanın iç yüzeyinde sarkan belli amino asitlerin (A-zincirinde: PHE211 ve LEU226 arası, B-zincirinde: GLU212 ve SER366 arası, C-zincirinde: GLU212 ve TYR 224 arası) sulu ortamda (yeşil) proteinin iç yüzeyine doğru çekildiği görülmektedir.



Şekil 4.33. p32’nin X-ışını kristal (mavi) ve 13 ns MD (yeşil) yapılarının üst üste çakıştırılması. Basit olması için sadece kurdele (ribbon) yapısında gösterilmektedir.

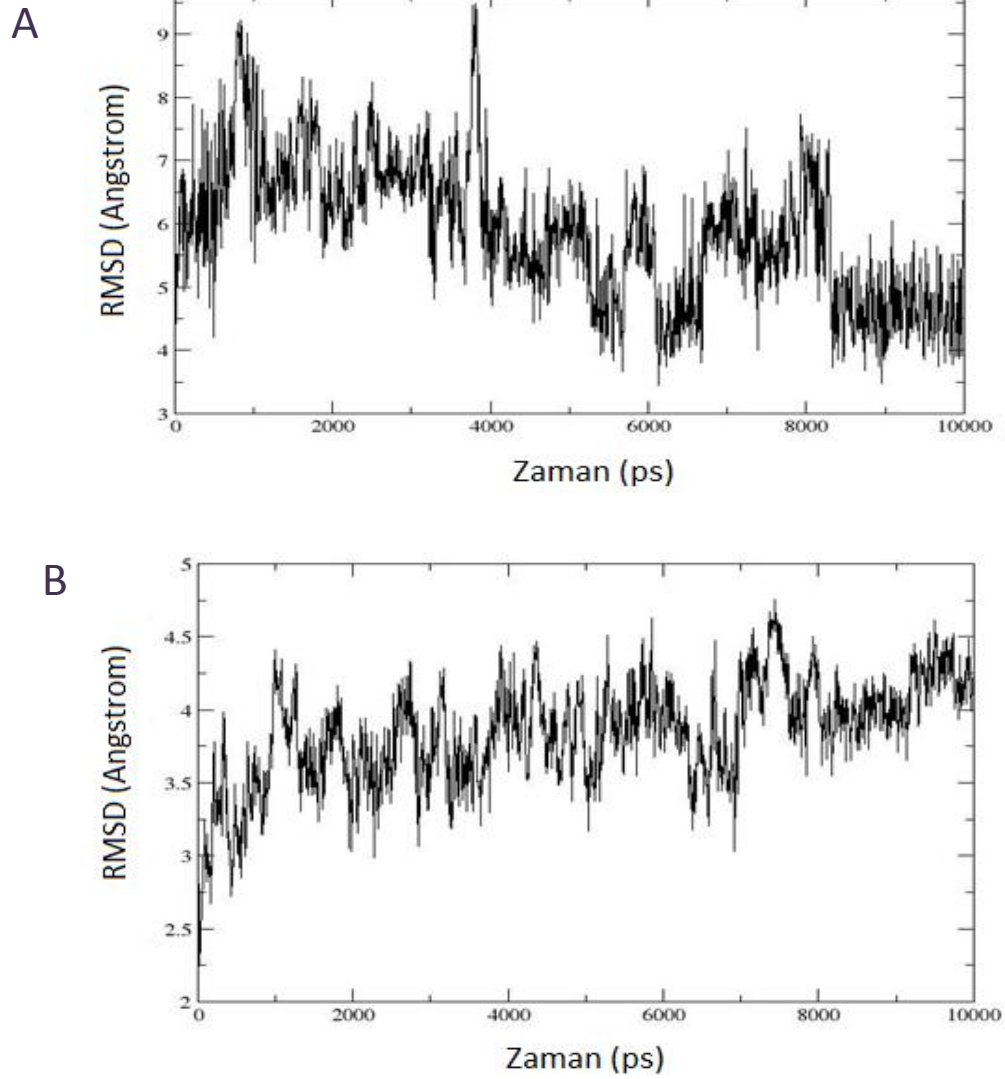
Şekil 4.34’de üst üste çakıştırılan p32’nin A-zincirinde bulunan ve X-ışını koordinatlarında belirtilmeyen eksik amino asitleri p32’nin MD yapısında tamamlanmış olup bölge 1 ve 2 olarak işaretlenmiştir. 13 ns MD hesaplamaları sonunda oluşan yapılanmada bölge 2 de ASP192 ile GLU197 arasında alfa heliks yapısı oluştuğu görülmektedir. Bölge 1’deki amino asit zincirinde böyle bir yapılanma gözlenmemiştir. Bölge 2’deki alfa heliks yapısının benzeri B ve C zincirlerinde de 6 ve 13 ns MD boyunca zaman zaman görülmüştür.



Şekil 4.34. p32’nin A zincirinin X-ışını kristal (mavi) ve 10 ns MD (yeşil) yapılarının üst üste çakıştırılması. Basit olması için sadece kurdele (ribbon) yapısında gösterilmektedir. X-ışını kristal yapısında koordinatları belli olmayan amino asitler (Şekil 3.9, altı çizili bölgeler) MD yapısında görülmektedir (bölge 1 ve 2).

4.6.2. LyP-1’e ait Moleküler Dinamik Çalışmaları

Peptidin lineer ve siklik haldeki yapılarının sulu ortamda konformasyonlarının belirlenmesi ve en düşük enerjili konformasyonun bulunması için LyP-1’e ait moleküler dinamik çalışmaları yürütülmüştür. Lineer LyP-1 ve siklik LyP-1’in sırasıyla 10 ns implisit su ve 10 ns eksplisit su MD hesaplamaları boyunca RMSD eğrileri Şekil 4.35 A ve B’de sırasıyla gösterilmiştir. Bu grafiklerde, her iki peptit konformasyonunun da 6 ns’den (6000 ps) sonra dengeye ulaştığı görülmüştür.

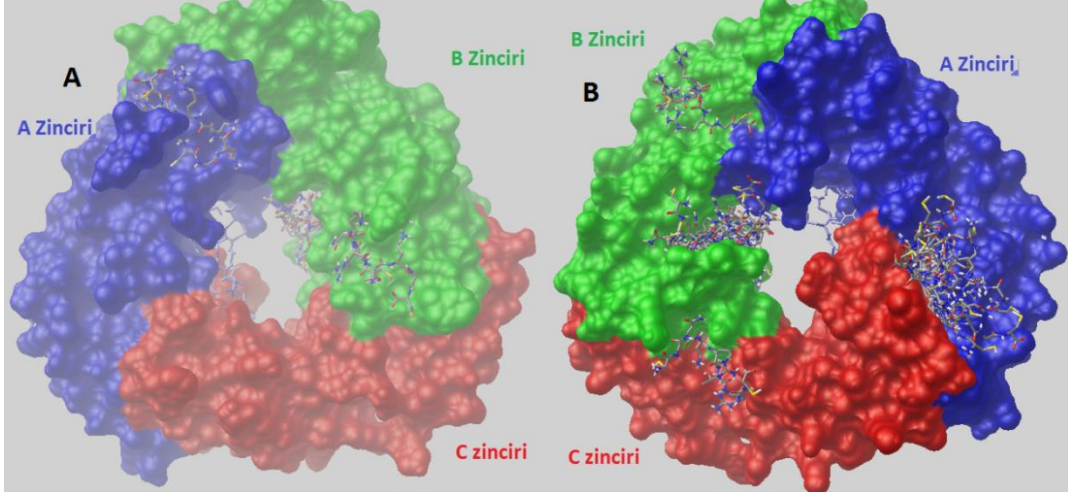


Şekil 4.35. Linear LyP-1 (A) ve siklik LyP-1 (B)'in sırasıyla 10 ns implisit ve eksplisit su MD boyunca RMSD grafikleri. Grafiklerde peptitlerin başlangıç koordinatları referans alınmıştır.

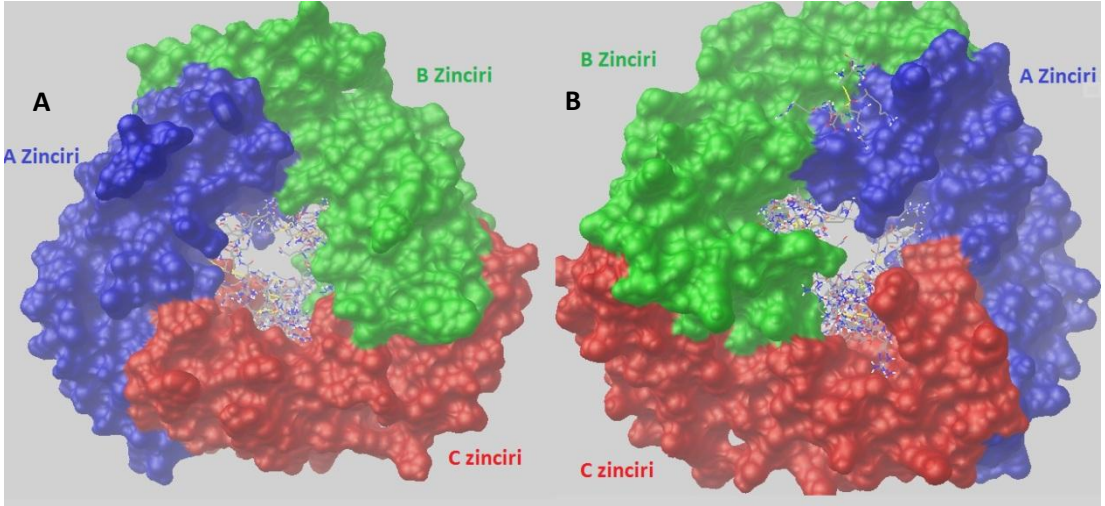
4.6.3. Docking ve Bağlanma Afinitesi Hesaplamaları

Ligant-reseptör etkileşiminin incelenmesi amacı ile docking ve bağlanma afinitesi hesapları yapılmıştır. LyP-1'in düz zincirli ve siklik yapılarının p32 proteinine (PDB ID: 1P32) Autodock_vina ile dock edilmiş görüntüleri sırasıyla Şekil 4.36 A–B ve Şekil 4.37 A– B'de gösterilmiştir. Docking deneyleri sonucunda lineer LyP-1'in p32'nin değişik bölgelerine konuşlanabileceği tespit edilmiş iken siklik LyP-1'in daha çok p32'nin iç halka bölgesindeki C zincirine konuşlandığı belirlenmiştir. Docking

deneylerinde, p32 kristal yapısının dış yüzeyinde koordinatları tanımlanmamış amino asit bölgelerine (Şekil 4.34) bağlanan LyP-1 konformasyonları şekil 4.36 ve 4.37’de dahil edilmemiştir.

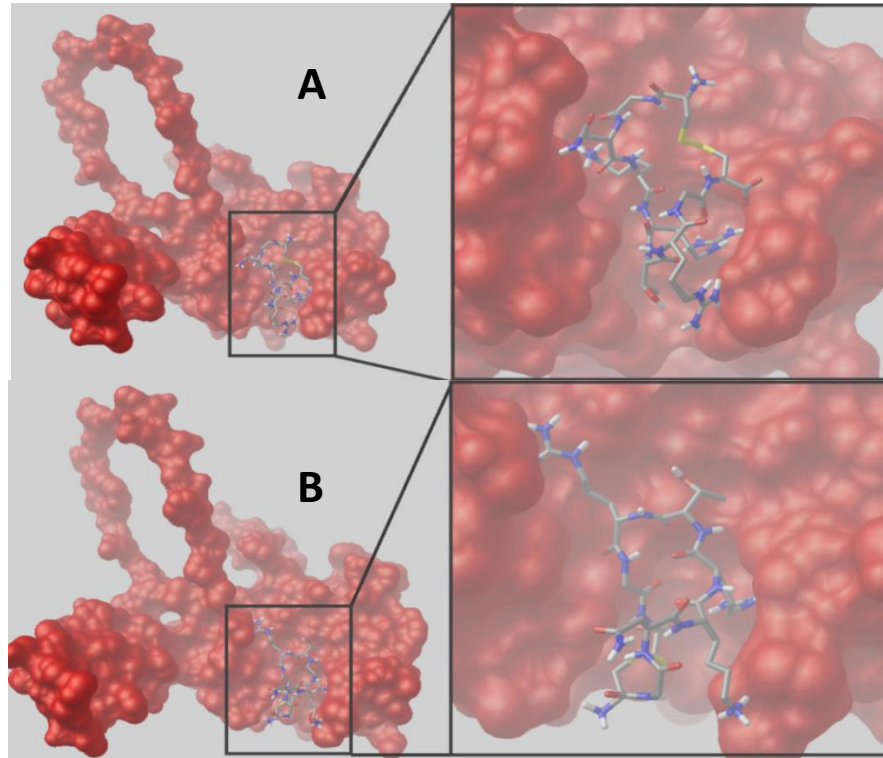


Şekil 4.36. p32 ve lineer LyP-1’e ait docking görüntüleri A: Ön bölge (p32’nin eksik amino asit bölgesi) B: Arka bölge.



Şekil 4.37. p32 ve siklik LyP-1’e ait docking görüntüleri A: Ön bölge (p32’nin eksik amino asit bölgesi) B: Arka bölge.

Siklik LyP-1’in sulu ortamda p32’ye bağlanma afinitesini belirlemek için siklik LyP-1’in p32 C zincirinin iç halka yüzeyine docking ile tespit edilmiş iki farklı konformasyonu (Konformasyon 1 ve Konformasyon 10) seçilmiştir (Şekil 4.38).



Şekil 4.38. Docking ile tespit edilmiş siklik Lyp-1'in, p32'nin C zincirine bağlanma konformasyonları, konformasyon 1 (A) ve 10 (B).

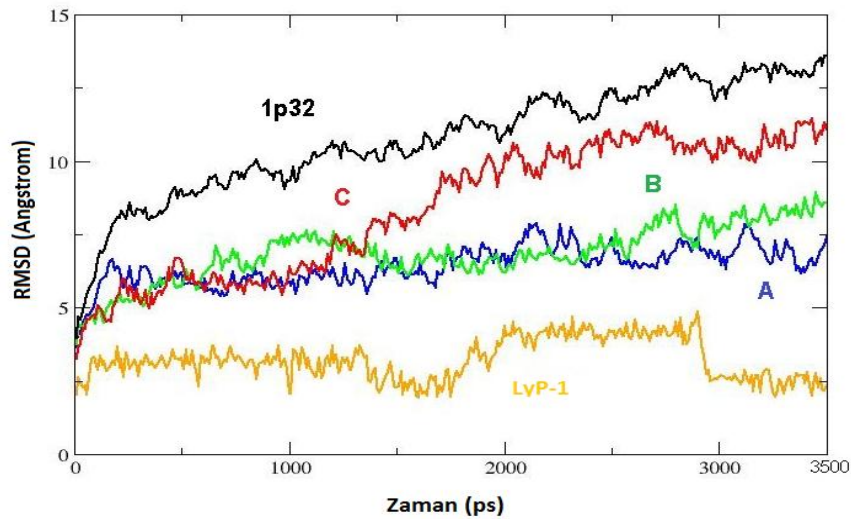
Siklik LyP-1'in hangi dock konformasyonunun sulu ortamda (25 °C, 1 atm) daha yüksek afinite ile bağlandığını tespit etmek için Konformasyon 1 ve Konformasyon 10'un p32'nin C zinciri ile olan kompleksleri için ayrı ayrı 1000 ps (1 ns) implicit su MD hesaplamaları yürütülmüştür. Trajektörlerin 900 ps ve 1000 ps kısımlarındaki MD koordinatları kullanılarak MM-PBSA termodinamik hesaplamaları yapılmıştır ve bunların sonuçları Tablo 4.17'da verilmiştir. Peptit ve protein yapılarının aynı olmasından, her iki konformasyonun da aynı bağlanma entropileri sonucunu vereceklerinden ve MM-PBSA entropi hesaplamalarının çok zaman almasından dolayı, bağlanma enerjisine entropi katkıları dahil edilmemiştir. Dolayısı ile bağlanma afiniteleri için bu tezde sadece bağlanma entalpileri göreceli olarak karşılaştırılmıştır. MM-PBSA sonuçlarına göre LyP-1'in 1. docking konformasyonunun ($\Delta H = 72.90$ kcal/mol) 10. docking konformasyonundan ($\Delta H =$

91.32 kcal/mol) yaklaşık -18 kcal/mol daha yüksek afinite ile bağlandığı hesaplamalı olarak tespit edilmiştir.

Tablo 4.17. Siklik LyP-1'in 1. ve 10. docking konformasyonları için MM-PBSA bağlanma entalpi enerjileri (kcal/mol).

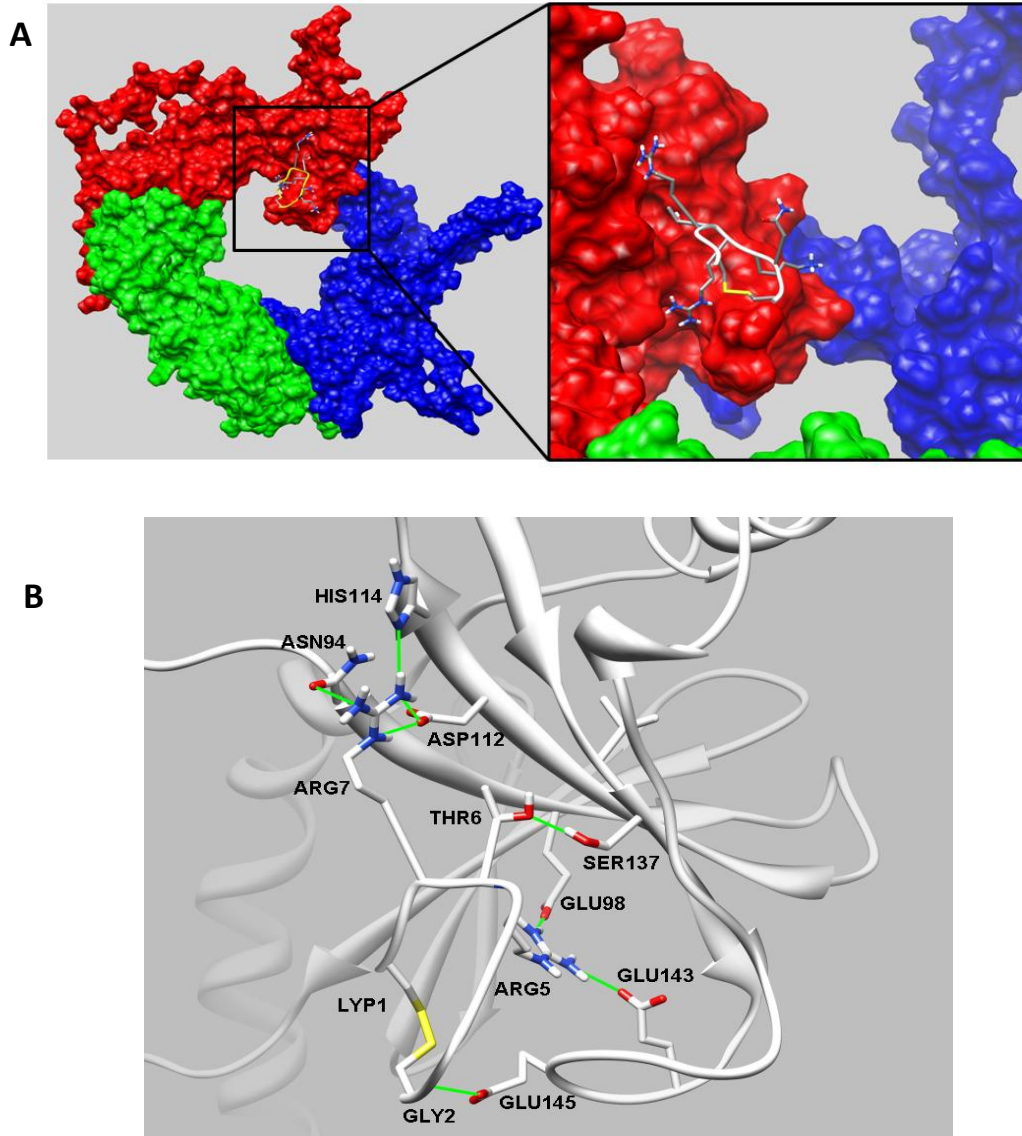
Enerji Parametreleri	Konformasyon 1	Konformasyon 10
ΔE_{el}	-1374.51	-1653.06
ΔE_{VDW}	-29.75	-36.19
ΔE_{INT}	159.65	148.87
ΔG_{none1}	-7.14	-7.07
ΔG_{el}	1324.65	1638.78
ΔH	72.90	91.32
$\Delta H = \Delta E_{el} + \Delta E_{VDW} + \Delta E_{INT} + \Delta G_{none1} + \Delta_{gel}$		

MM-PBSA enerjisine göre daha yüksek afinite gösteren siklik LyP-1'in 1. docking konformasyonunun p32 ile kompleksinin sulu ortamda (25 °C, 1 atm) nasıl etkileştiğini incelemek için 3.5 ns'lik implisit su MD hesaplaması yürütülmüştür ve bunun RMSD grafiği Şekil 4.39'da gösterilmiştir. Burada hem siklik LyP-1'in hem de p32'nin 2 ns MD sonrasında dengeye ulaştığı ve kararlı hale geçtiği gözlenmektedir.



Şekil 4.39. LyP-1'in 1. docking konformasyonunun p32 ile sulu ortamda 3.5 ns boyunca etkileşmesinin RMSD grafiği.

Peptidin ARG5 grubu, C zincirinin GLN212 ve GLU218 grupları ile, ARG82 grubu ise, C zincirinin ASN167 ve HIS187 grupları ile etkileştiği görülmüştür (Şekil 4.40).



Şekil 4.40. 3.5 ns MD sonunda LyP-1.p32 kompleksinin çözelti yapısı. **A.** P32'nin yüzey yapısı ve LyP-1'in C-zincir'indeki konumu. **B.** LyP-1 peptit halkasının p32 C-zinciri (kurdele yapısı) ile oluşturduğu hidrojen bağları (yeşil çizgiler).

3.5 ns MD sonunda LyP-1 peptit halkasının P32 C-zinciri (Şekil 4.40-A) ile spesifik hidrojen bağları oluşturduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.40-B). Başlıca hidrojen bağları LyP-1-GLY2 amit grubu ile p32 C-zinciri-GLU218 γ -karboksilat grubu arasında; LyP-1-ARG5 guanidinyum grubu ile p32-C-zinciri-(GLU171 ve GLU216) γ -karboksilat grupları arasında; LyP-1-THR6 hidroksil grubu ile p32 C-zinciri-SER210 hidroksil grubu arasında ve LyP-1-ARG7 guanidinyum grubu ile p32 C-zinciri-(ASN167 β -amit, ASP185 β -karboksilat ve HIS187 imidazol) grupları arasında oluşmuştur (Şekil 4.40-B).

Siklik LyP-1.p32 kompleks sisteminde ortalama MM-PBSA bağlanma enerjisi 3 ve 3.5 ns arasında 50 adet koordinat kullanılarak hesaplandı ve bu hesaplamaların sonuçları Tablo 4.18’de verilmektedir. MM-PBSA sonuçlarına göre LyP-1 p32’ye yüksek bir afinite ile bağlandığı hesaplamalı olarak tespit edilmiştir ($\Delta G^\circ = -24.69$ kcal/mol).

Tablo 4.18. Siklik LyP-1.P32 kompleks sisteminde ortalama MM-PBSA bağlanma enerjisi (kcal/mol).

Enerji Parametreleri	LyP-1
ΔE_{el}	-1293.46
ΔE_{VDW}	-36.99
ΔE_{INT}	0.00
ΔG_{none1}	-6.81
ΔG_{el}	1281.27
ΔH°	-55.99
$T.\Delta S^\circ$	-31.30
ΔG°	-24.69
$\Delta H^\circ = \Delta E_{el} + \Delta E_{VDW} + \Delta E_{INT} + \Delta G_{none1} + \Delta G_{el}$	
$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T.\Delta S^\circ$	
$T=300K$	

5. TARTIŞMA

Bu bölümde, tez çalışması sonucunda elde edilen bulgular ışığında, yapılan deneysel çalışmaların sonuçları değerlendirilmiş ve tartışılmıştır. Bu amaçla, teknolojik olarak uygun olan formülasyonların elde edilmesi için gerçekleştirilen önformülasyon ve formülasyon çalışmaları, etkin madde içermeyen formülasyonlara ait stabilite çalışmaları, etkin maddenin miktar tayini için geliştirilen HPLC yöntemi ve analitik yöntemin validasyonu, etkin maddeye ait stabilite ve parçalanma kinetiği çalışmaları, etkin madde içeren formülasyona ait stabilite çalışmaları ve hücre kültürü deneyleri kapsamında gerçekleştirilen sitotoksikite ve biyoaktivite deneylerine ait sonuçlar değerlendirilmiştir. Son olarak; moleküler modelleme çalışmaları kapsamında ligant–reseptör arasındaki olası etkileşimler incelenmiştir. Peptidin (LyP-1) ve reseptörün (p32) kristal yapısı ve MD sonrası elde edilen yapıları karşılaştırılarak, docking çalışmaları yürütülmüş ve bağlanma enerjileri hesaplanmıştır.

Bu tez çalışmasında amaç; etkin madde olarak seçilen LyP-1 peptidine ait SMEDDS formülasyonları geliştirilmesidir. Tümör lenfatik damarlarına özgü ve antikanser etki gösteren bu peptidin yağ bazlı formülasyonlardan olan SMEDDS’ler ile oral uygulama sonrası lenfatik yolla taşınması, parçalanmadan korunması ve etki yerinde toplanması amaçlanmaktadır. Bilindiği üzere peptit ve protein yapısındaki ilaçların yarılanma ömürleri ve vücuttaki dayanıklılıkları oldukça düşüktür. Taşınmanın lenfatik sistem aracılığı ile olması ve kanda kalış süresinin azaltılması ile ilaca ait stabilitenin artırılabilceği düşünülmektedir. Peptidin tümör lenfatik damarlarına özgü olması ile de aktif hedeflendirmenin sağlanması, sağlıklı dokularda birikimin ve muhtemel yan etkilerin azaltılması amaçlanmaktadır.

Teknolojik açıdan uygun ve dayanıklı formülasyonların geliştirilmesi için ilk olarak önformülasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar kapsamında 18 adet üçgen faz diyagramı ve her bir diyagramdan seçilen 10 nokta çalışılmıştır (Bkz. Şekil 3.1). Elde edilen veriler sonucunda belirlenen noktalar çevresinde çalışmalar yoğunlaştırılmıştır. En uygun formülasyon bileşenlerinin belirlenmesinden sonra yüzey etkin madde karışımının oranı değiştirilerek istenilen özelliklere sahip üç adet

üçgen faz diyagramı elde edilmiştir. SEDDS'ler ancak belli yardımcı maddelerin özgün oranlarda karıştırılması ile elde edilen formülasyonlardır. Kullanılan yardımcı maddeler bu tip formülasyonlarda sıklıkla kullanılan, oral ve topikal kullanım için onaylanmış ve önerilen yağ bazlı maddelerdir (109, 113, 115, 118, 189, 190).

Şekil 4.3'de görüldüğü gibi dayanıklı formülasyonlar tahmin edildiği gibi üçgenlerin üst bölgelerinde yani yüzey etkin madde içeriğinin arttığı bölgelerde görülmüştür. SEDDS formülasyonlarında, yüksek yüzey etkin madde konsantrasyonları nedeniyle su ile seyreltilmelerini takiben liyotropik sıvı kristal yapılar da (lamellar, hekzagonal, kübik) oluşabilir. Ancak yapılan mikroskop çalışmaları sonucunda formülasyonlarda sıvı kristal yapısına rastlanmamıştır. Yüzey etkin maddeler yağ/su arayüzeyinde tutunarak sistemin serbest enerjisini düşürür ve damlacıkların stabilizasyonunu sağlarlar. Yüzey etkin madde oranının fazla olması Gİ sistem duvarlarında iritasyona neden olabileceği için istenmeyen bir durumdur. Ancak formülasyonun uygulanma hacmi ve uygulama sonrası Gİ kanalda meydana gelecek sonsuz dilüsyon ile bu etki en aza indirilmekte, öte yandan yüzey etkin maddelerin bağırsak lümeninden etkin madde geçişini kolaylaştırma etkisi göstereceği düşünülmektedir. Elde edilen formülasyonlarla 2 hafta boyunca stabilite sorunları gözlenmemiş, formülasyonlar berrak fiziksel görünümünü korumuşlardır. Ortalama damlacık büyüklüğü (çapı) 20 nm civarında bulunan formülasyonların zeta potansiyel değerleri ise 0'a yakın bulunmuştur. Bunun nedeninin formülasyon içeriğinde iyonik olmayan yüzey etkin maddelerin kullanılması olduğu düşünülmektedir. Zeta potansiyel değeri bize partiküler formülasyonların stabilitesi hakkında bilgi vermektedir ve negatif veya pozitif yönde yüksek değerlere (30–50 mV) sahip olması sistemin stabilitesini artırmaktadır (134). Ancak bu sistemler sonsuz fiziksel stabiliteye sahip sistemler olarak bilinmektedir ve yapılan çalışmalarda su ile dilüsyonlarını takiben 2 hafta boyunca stabilite sorunlarına rastlanmamıştır. Labrasol, Gelucire 44/14, PEG 300 ve Peceol kullanılarak yapılan formülasyon çalışmaları sonucunda 26 adet stabil formülasyon elde edilmiştir. En yüksek damlacık boyutu (25 nm üzeri) Labrasol /Gelucire oranı 4:1 olan formülasyonlarda elde edilmiştir. Bunların içinde en küçük damlacık büyüklüğüne

sahip formülasyonlar ise (20 nm altı) Labrasol/Gelucire oranı 1:2 olan formülasyonlardır. Bu durumda, Gelucire oranının artması ile damlacık boyutunun azaldığı görülmektedir. Model formülasyon olarak, L/G oranı 1:2 olan faz diyagramında yüzey etkin madde oranının düşük olduğu bölgede bulunan ve iki hafta boyunca incelenen parametreler açısından en az değişkenlik gösteren 18 numaralı formülasyon seçilmiştir. Bu formülasyon % 60 yüzey etkin madde, % 35 yardımcı çözücü (PEG 300) ve % 5 yağ fazı (Peceol) içermektedir.

Formülasyon içerisindeki yardımcı maddelerin etkileşimlerinin, dilüsyon öncesi ve sonrası farklılıkların incelenmesi amacıyla DSC çalışmaları yürütülmüştür. Elde edilen verilere göre, yardımcı madde ve formülasyonlara ait DSC termogramları karşılaştırıldığında, yardımcı maddelere ait termogramlarda görülen bazı piklerin formülasyon termogramında da görüldüğü bazılarının ise kaybolduğu belirlenmiş ve bulgular kısmında belirtilmiştir (Bkz. Şekil 4.10 ve 4.11). Mikroemülsiyon sisteminde varolan su, sistemin durumuna göre bağlı veya serbest halde olabilir. Serbest suyun fizikokimyasal özellikleri saf suya benzerken, bağlı su formülasyondaki yüzey etkin madde varlığından SMEDDS ve suyun birleşmesi sonucu, suyun donma noktası, erime noktası ve entalpi gibi termodinamik özellikleri, formülasyonda yer alan yüzey etkin maddelerden güçlü bir şekilde etkilenir ve yanındaki yüzey etkin madde türüne göre değişebilir (191, 192). Dilüsyon sonrası SMEDDS’de ise 0 °C’de suya ait erime piki görülmektedir. Bu bize yağ/su mikroemülsiyon formülasyonumuz içindeki serbest suyun varlığını göstermektedir. Dilüsyon öncesi SMEDDS formülasyonunda 35 °C civarında görülen omuzun Gelucire’den kaynaklandığı düşünülmektedir. Aynı şekilde dilüsyon sonrası 27 °C’de görülen pikin de Gelucire’e ait olduğu düşünülmekte ve dilüsyon sonrasında kaydığı görülmektedir. DSC verilerine göre SMEDDS ve suyun birleşmesi, formülasyonda yer alan yüzey etkin maddeler ve kosolvanın yağ/su arayüzeyindeki üç boyutlu konumlanmalarında değişikliğe neden olduğu söylenebilir.

Peptide ait miktar tayini yöntemi geliştirilmesi kapsamında HPLC çalışmaları yürütülmüş ve geliştirilen yöntem valide edilmiştir. Ayrım yöntemi olarak ters faz sıvı kromatografisi seçilmiştir. Peptit-protein yapısında maddelerin miktar tayini için

sıklıkla kullanılan bu yöntemin seçilme amacı, hızlı ve etkin bir şekilde maddenin analizini sağlamak ve etkin maddeye ait parçalanma ürünlerini tespit edebilmektir. Sistemin mobil fazı, peptitlerin analizinde mobil fazlara sıklıkla eklenen TFA içermektedir. TFA'nın düşük konsantrasyonlardaki sulu çözeltileri kullanılarak peptitlerin ayrımı güçlendirilmekte, pik şekilleri daha düzgün olmaktadır. TFA'nın kullanımı ile ters yüklü gruplarla iyon çifti oluşturarak ters fazda alıkonmasının artırılması veya silanol grupları ile peptitlerin istenmeyen iyonik etkileşimlerinin engellenmesi sağlanmaktadır. Yöntemin validasyonu "*ICH Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)*" stabilite kılavuzu esas alınarak gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizler sonucu yöntemi doğrusalılık, doğruluk, kesinlik, özgünlük ve sistem uygunluk parametreleri açısından valide edilmiştir.

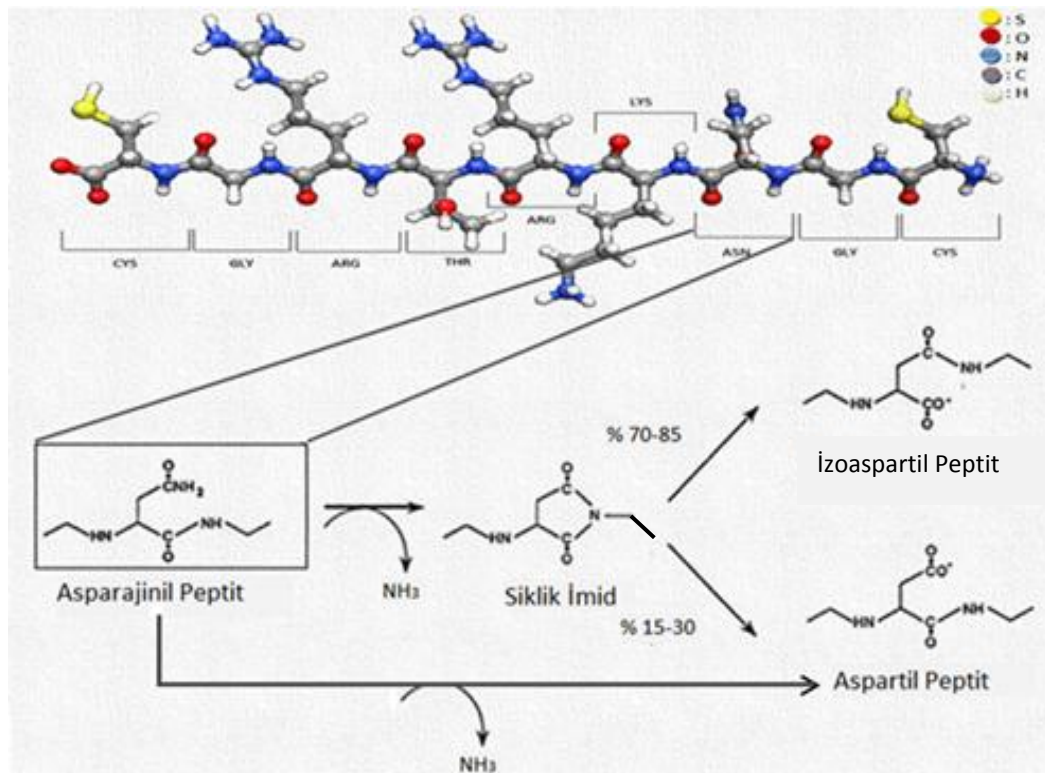
Stabilite çalışmaları sonucunda Lyp-1 peptidinin asidik pH'larda çok daha dayanıklı olduğu görülmektedir. Peptide ait parçalanma hız profilinde de görüldüğü gibi pH arttıkça peptidin parçalanma hızı da artmaktadır (Bkz. Şekil 4.21). Lyp-1 peptidi pH 1'de en stabil konumdadır, pH 1 ve pH 5 sonrası parçalanma hızı daha dik bir şekilde artmaktadır.

Lyp-1 peptidindeki asparajin (Asn) amino asidinin deamidasyonu, peptit ve proteinlerin kimyasal parçalanmasındaki en önemli kimyasal yollardandır. Asparajin amino asidinin deamidasyonu sonucu siklik imid oluşumunu takiben iki ana parçalanma ürünü, izoaspartil ve aspartil peptit oluşumu görülmektedir (Şekil 5.1). Bu ürünlerden izoaspartil peptit oluşumu daha baskındır (188).

Bulunan kimyasal parçalanma hız profili literatürde bulunan benzer çalışmalarla büyük oranda benzerlik göstermektedir. Patel ve Borchardt'a (187, 188) ait ve hekzapeptit ile yapılan bir kinetik çalışmada, deamidasyonun hızı pH arttıkça artmaktadır. Asidik ve alkali pH'larda farklı parçalanma yollarının yürüdüğü gösterilmiştir. Literatürde asidik pH'larda asparajinil peptidinin direkt hidroliz ile aspartil peptidi oluşturduğu, bazik pH'larda ise önce siklik imid oluşumu ardından iki parçalanma ürünü oluşumu görüldüğü belirtilmektedir (Şekil 5.1). Çalışmada, peptidin en stabil olduğu pH'nın pH 3 ila 4 aralığında olduğu bulunmuştur. Bizim çalışmamızda ise, Lyp-1 peptidinin pH 1'de en stabil konumunda olduğu

gözlemlenmiştir. Peptidin deamidasyonu pH, sıcaklık ve tampon konsantrasyonuna göre değişebilmekle beraber asparajin amino asidinin C ve N terminallerinde bulunan amino aside göre de değişiklik gösterebilmektedir. Peptidin sistein amino asitlerinden disülfür bağları ile siklik yapı oluşturmaları sonucu peptidin stabilitesinde artış görülebilir (43, 170). Bizim çalışmamızda da iki ana parçalanma ürününe rastlanmış bunlardan birisinin ise daha çok miktarda oluştuğu görülmektedir. Bu ürünün yaklaşık % 70–85 oranla oluşan izoaspartil peptidi, diğer ürünün ise aspartil peptidi olduğu düşünülmektedir.

Üç farklı sıcaklıkta gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda peptidin parçalanma hızı, beklendiği gibi artmaktadır. Oda sıcaklığında gerçekleştirilen çalışmalarda peptidin pH 1'deki yarılanma ömrünün yaklaşık 40 güne kadar arttığı görülmektedir. Aynı şekilde tampon konsantrasyonu da peptidin parçalanmasında etkilidir. Tampon katalizi sonucu peptidin parçalanma hızı tampon konsantrasyonuna bağlı olarak artmakta veya azalmaktadır.



Şekil 5.1. Asparajin amino asidinin parçalanma yolları (187).

Sıcaklık reaksiyon hızını etkileyen en önemli faktörlerden birisidir. Sıcaklığın reaksiyon hızına etkisi ilk defa Arrhenius tarafından açıklanmıştır. Arrhenius'a göre reaksiyon hız sabiti, mutlak sıcaklıkla üssel olarak değişmektedir. Tablo 4.15'de görülebileceği gibi sıcaklık arttıkça aktivasyon enerjisi artmaktadır.

LyP-1 peptidine ait Arrhenius doğruları kullanılarak peptidin daha düşük veya daha yüksek sıcaklıklar için reaksiyon hız sabitinin hesaplanması, farklı sıcaklıklardaki yarılanma ömrünün belirlenmesi mümkün olmaktadır.

Peptidin yağ fazına hapsedilmesi amacıyla LyP-1'in katı dispersiyonları hazırlanmıştır. Bu teknikte peptidin soya fosfotidilkolini ile liyofilize edilerek daha lipofilik bir hale getirilmesi tasarlanmıştır. Peptidi tek başına ve katı dispersiyon halinde içeren formülasyonlar hazırlanmış ve SMEDDS içinde 37 °C'de formülasyonların stabiliteleri incelenmiştir. Katı dispersiyon tekniği ile hazırlanan peptidin stabilitesinde 2 kata yakın artış görülmüştür. Bu durumda, peptidin yağ damlacıkları içine hapsedildiği ve tampon hidrolizine karşı korunduğu söylenebilir.

Tez kapsamında yürütülen hücre kültürü çalışmalarında öncelikle etkin madde içermeyen formülasyonların çeşitli dilüsyonlarda hücrelere toksik olup olmadığının incelenmesi için Caco-2 hücre hattı kullanılarak sitotoksikite çalışmaları yapılmıştır. Caco-2 hücre hattı kolon kanseri hücreleri kökenli, literatürde bağırsak epitelinin taklit edilmesi amacıyla kullanılan hücrelerdir (193). Bu hücreler çoğalmalarını takiben tek tabaka oluşturma özellikleri nedeni ile özellikle permeabilite çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (194, 195). Aynı zamanda emülsiyon tipi formülasyonların sitotoksikite çalışmalarında da Caco-2 hücre hattının kullanıldığı görülmektedir (123, 195).

Bu tezde oral yolla uygulama ile lenfatik hedeflendirme amaçlanmaktadır. İstenilen, tıpkı yağsı yapıdaki maddelerde olduğu gibi, formülasyonun bağırsak enterositlerinden emilmesi, sonrasında M hücreleri ve Peyer plakları aracılığı ile lenfatik dolaşıma geçmesidir. Bu durumda, ilacın emileceği temel bölge bağırsak epitelidir. Bu nedenle, sitotoksikite çalışmalarında Caco-2 hücreleri tercih edilmiştir.

Yapılan deneyler sonucunda, etkin madde içermeyen SMEDDS formülasyonunun pH 7.4 fosfat tamponu ile dilüsyonu hazırlanan örneklerin uygulandığı hücreler, 24 ve 48. saatlerde MTT testi ile analiz edilmiştir. Bu örnekler içerisinde 1:100–1:400 dilüsyona sahip olan gruplarda hücre canlılığında % 20'ye, 1:1600 ve 1:3200 dilüsyona sahip olan gruplarda ise % 60'a kadar düşüş gözlemlenmiştir. Düşük dilüsyon oranına sahip gruplarda negatif kontrol olarak kullanılan % 0.1'lik SDS çözeltisi ile benzer etki görülmüştür. Bunun nedeninin, formülasyon içeriğindeki yüksek yüzey etkin madde konsantrasyonu olduğu düşünülmektedir. Yüzey etkin maddeler hücreler arası sıkı bölgelerin açılmasını, dolayısıyla etkin maddeye geçirgenliğin artmasını sağlarlar. Yüksek konsantrasyonlarda ise hücre membran yapısını ve bütünlüğünü bozarak hücrenin ölümüne neden olabilirler. Fakat formülasyonun oral verilmesini takiben mide-bağırsak kanalında sonsuz dilüsyona uğrayacağı düşünülerek dilüsyon oranı artırılmıştır. Böylece, 1:8000–1:64000 dilüsyon aralığında 48 saat sonunda hücrelerin % 80'e yakınının canlı kaldığı görülmektedir. Bu durumda, seçilen formülasyonun hücrelere sitotoksik etkisinin olmadığı söylenebilir.

Peptidin bazik pH'larda dakikalar içinde parçalanması nedeni ile daha asidik pH'larda etkin madde içermeyen formülasyonlar ile sitotoksisite çalışmaları yapılmıştır. İnce bağırsağın üst kısımlarında pH 4.5 ile 6.5 arasında değişmektedir (196). Bunun için, pH 4 ve pH 5'in en düşük tampon konsantrasyonları, dilüsyon oranı olarak ise 1:16000–1:64000 aralığı seçilmiştir. pH 4 tamponu ile yapılan çalışmalarda 2 saat sonunda hücre canlılığı % 20'ye kadar düşerken, pH 5 ile çalışılan gruplarda % 80'e varan hücre canlılığı gözlenmiştir. pH 5'de 25 mM konsantrasyondaki asetat tamponunda peptidin yarılanma ömrü 3.024 saattir. Bu nedenle biyoaktivite çalışmaları 1. ve 2. saat örnekleri alınarak 2 saat içerisinde tamamlanmıştır.

Biyoaktivite çalışmalarına başlamadan önce etkin madde içeren formülasyonun sitotoksik etkisini incelemek amacıyla Caco-2 hücrelerinde uygulama yapılmıştır. Etkin madde içeren formülasyonlarda kontrol grubu ile fark bulunmazken, sadece peptit çözeltisi uygulanan grupta boş tampona göre anlamlı

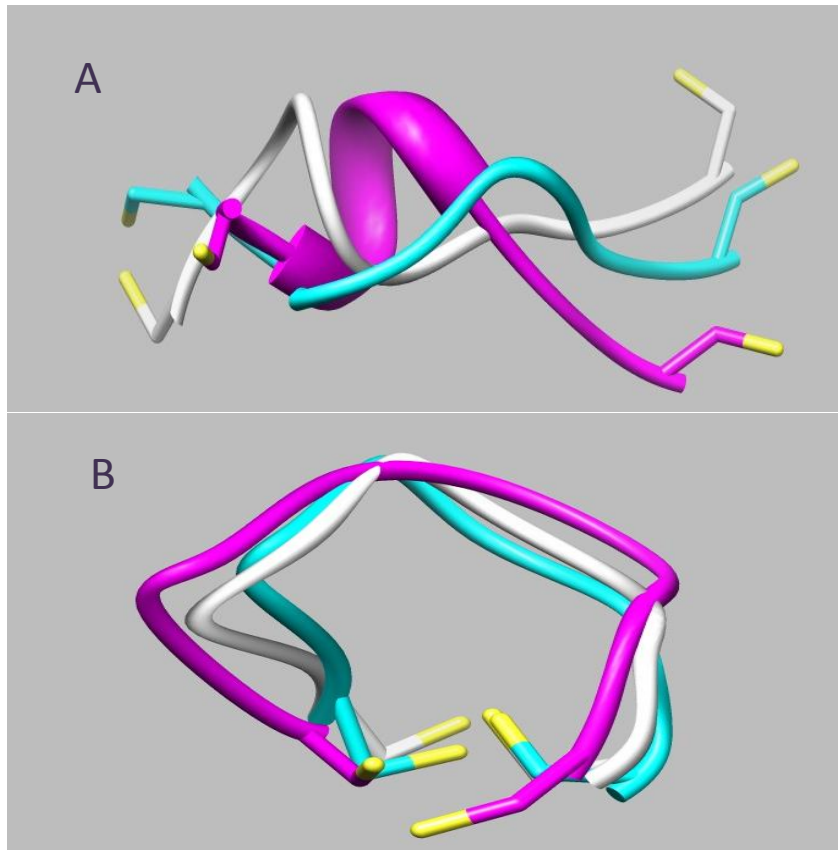
bir fark bulunmuştur ($p<0.05$). Öte yandan, etkin madde içeren formülasyonların da sitotoksik etki göstermediği söylenebilir.

Biyoaktivite çalışmalarında peptidin reseptörü olan p32'yi içerdiği bilinen ve daha önce LyP-1 ile çalışılmış olan MDA-MB 231 meme kanseri hücre hattı kullanılmıştır (197–200). Katı dispersiyonu ve peptidi tek başına içeren formülasyonlar üç farklı dilüsyonda (1:16000, 1:32000, 1:64000) hücrelere uygulanmıştır. Formülasyonun etkisini daha net görebilmek amacıyla peptidin pH 5 tamponundaki çözeltisi de uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, peptit çözeltisi boş pH 5 tamponuna göre hücre canlılığını 2 saat sonunda % 87'den % 70'e düşürmüştür. İki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Formülasyon içerisindeki katı dispersiyon ve peptit gruplarına bakıldığında peptidi yalnız başına içeren formülasyonlarda etkinin daha fazla olduğu hücre canlılığının % 60'ın altına indiği görülmektedir. Bu durumda, formülasyonun peptidin parçalanmadan hücreden geçişini artırdığını söyleyebiliriz. 1:16000 dilüsyonda 2 saat sonucunda elde edilen verilere göre katı dispersiyon ve peptidi tek başına içeren formülasyon gruplarında etkin madde içermeyen formülasyonla karşılaştırma sonrasında fark anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Katı dispersiyonu içeren gruplarda yalnızca peptit içeren formülasyon gruplarına göre biyoaktivitenin daha az olduğu gözlenmiştir. Bunun nedeninin, peptidin yağsı tabaka ile kaplı olması, bu durumda yağ fazının içinden salımının daha yavaş olması ile açıklayabiliriz. Bu durumda, hücreler ile inkübasyon süresi uzatılarak etki artırılabilir. Tüm hücre kültürü çalışmalarında rastlanan, ilerleyen zamana bağlı olarak hücre canlılığındaki artmanın ise yağ bazlı formülasyonların hücreler üzerinde besleyici etki göstererek hücre proliferasyonunu artırmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Peptit ve son yıllarda bağlandığı bulunan p32 reseptörü (165) ile etkileşiminin incelenmesi için yürütülen moleküler modelleme çalışmalarında öncelikle P32 proteinine ait moleküler dinamik (MD) çalışmaları yapılmıştır. P32 proteinin hücredeki görevi tam olarak bilinmemekle beraber oksidatif fosforilasyonda görev aldığı söylenmekte ve kanser hücrelerinde yapımının arttığı bilinmektedir (165, 167, 197, 199, 201, 202). Hücre membranı, çekirdek, mitokondri

ve sitozol gibi hücrenin değişik yerlerinde konumlanabilen bu trimer yapılı proteinin MD sonucunda elde edilen yapısı kristal yapısı ile karşılaştırıldığında, protein iskelet yapıları arasında büyük bir fark olmadığı görülmektedir (Şekil 4.33). Bununla beraber p32 yapısının iç kısımlarında sarkan amino asit kısımlarının sulu ortam içerisinde içe doğru kıvrıldığı ve halka yapısında genişlemeye neden olduğu görülmüştür. P32'nin MD yapısında görülen iç halkanın genişlemesinin (Şekil 4.33), halka içerisinde LyP-1'in konuşlanmasını veya halkadan geçişini kolaylaştırdığı düşünülmektedir. P32 proteinine ait kristal ve MD yapıları arasındaki bir diğer fark ise kristal yapısındaki eksik amino asit dizilimlerinin tamamlanması (Bkz. Şekil 4.34'da bölge 1 ve 2) ve MD sonrasında her bir zincirde ASP192 ile GLU197 amino asitleri arasında gözlenen alfa heliks yapısıdır. MD sonrasında Bölge 1'deki amino asit dizilimleri için bir yapılanma gözlenmemiştir.

Peptidin disülfür bağı ile kimyasal açıdan daha dayanıklı hale gelebileceği daha önce belirtilmiştir. Bu bağlamda, peptidin lineer ve siklik yapılarının hücre içinde alacağı konumların incelenmesi amacıyla 10 ns boyunca MD çalışmaları yürütülmüştür. Elde edilen RMSD grafiklerine (Şekil 4.35) göre lineer LyP-1'in RMSD eğrisinin siklik LyP-1'e göre daha geniş bir Angstrom aralığında yayıldığı görülmektedir. Bu da lineer LyP-1'in konformasyonel olarak sulu ortamda çok hareketli ve esnek bir yapıda olduğunu siklik LyP-1'in ise sulu ortamda daha sınırlı hareket ettiğini ifade etmektedir. 5 ile 10 ns MD trajektörlerinde uygulanan kümeleme (cluster) analizlerine göre elde edilen en düşük enerjili üçer tane peptit konformasyonu Şekil 5.2 A (lineer LyP-1) ve 5.2 B (siklik LyP-1)'de gösterilmiştir. Şekilde de görüldüğü gibi kurdele (ribbon) yapılarındaki hareketlilik lineer LyP-1 peptidinde daha fazladır. Ayrıca, MD hesaplamaları boyunca lineer LyP-1'in alfa heliks ile lineer yapıları (Şekil 5.2 A) arasında denge oluşturduğu gözlenmiştir. Lineer LyP-1'in sulu çözeltide konformasyonel çeşitliliğinin, lineer LyP-1'in p32'nin birden çok bölgesine bağlanabilmesini sağladığı düşünülmektedir (Bkz. Şekil 4.36). Siklik LyP-1'in sulu çözeltideki konformasyonlarının sınırlı olması, docking deneylerinde siklik LyP-1'in p32'nin sadece iç halka bölgesine bağlanmasını açıklamaktadır (Şekil 4.37).



Şekil 5.2. Lineer LyP-1 (A) ve siklik LyP-1 (B) küme yapılarının üst üste çakıştırılmış kurdele (ribbon) görüntüleri.

Docking deneylerinde lineer LyP-1'in p32 üzerinde bir çok bölgede farklı bağlanma konformasyonlarının olduğu tespit edilmiştir. Lineer LyP-1'in her bir farklı bağlanma modu için sulu ortamdaki afiniteleri hesaplamaların çok uzun zaman almasından dolayı belirlenmemiştir. Buna karşılık, LyP-1 peptidinin özellikle siklik formunun p32'ye bağlandığı literatürde belirtilmektedir (51, 52, 164, 165). Ayrıca, elde ettiğimiz docking çalışmaları sonuçları ile siklik LyP-1'in daha çok p32'nin iç halka yapısında konuşlandığı tespit edilmiştir. Bu sebeple siklik LyP-1'in p32 ile etkileşmesini yakından incelemek için bu peptidin p32 C zincirinin iç halka yüzeyine docking ile tespit edilmiş iki farklı konformasyonu (Konformasyon 1 ve Konformasyon 10) seçilmiştir (Bkz. Şekil 4.39). Seçilen LyP-1 konformasyonlarının p32 ile sulu ortamda etkileşmelerini incelemek için 1 ns boyunca implisit su MD hesaplamaları ve bunu takiben MM-PBSA bağlanma enerjileri hesaplamaları yürütülmüştür.

Tablo 4.17’de verilen MM-PBSA enerjilerine göre, Konformasyon 1 p32’ye Konformasyon 10’a göre daha kararlı bir entalpik afinite ile bağlanmaktadır ($\Delta H = -18$ kcal/mol). LyP-1’in her iki konformasyonunda elektrostatik enerjileri toplamının (ΔE_{el} , gaz fazı+ ΔG_{el} , sulu faz) kararlı (favorable) olduğu hesaplanmıştır (Konformasyon 1: -49.86 kcal/mol, Konformasyon 10: -14.28 kcal/mol). Aynı şekilde, bu konformasyonların elektrostatik olmayan enerjileri toplamının da (ΔE_{VDW} , gazfazı+ Δg_{none} , sulu faz) kararlı (favorable) olduğu hesaplanmıştır (Konformasyon 1: -36.89 kcal/mol, Konformasyon 10: -43.26 kcal/mol). Dolayısı ile hem elektrostatik ve hem de elektrostatik olmayan enerjilerin sıklık LyP-1’in her iki konformasyonunun da p32 ile etkileşmesinde rol oynadığı tespit edilmiştir. Ancak elektrostatik ve elektrostatik olmayan enerjilerin toplamı ($\Delta E_{el} + \Delta G_{el} + \Delta E_{VDW} + \Delta G_{none}$) Konformasyon 1’i Konformasyon 10’a göre daha kararlı bir bağlanma durumuna getirmektedir (Konformasyon 1: -86.75 kcal/mol, Konformasyon 10: -57.54 kcal/mol).

Bu çalışmalar sonucunda 1. konformasyondaki peptidin reseptöre daha yüksek afiniteyle bağlandığı görülmüş ve reseptörün tamamı ile implisit su MD çalışmaları bu docking konformasyon ile başlatılmıştır. 3.5 ns MD hesaplamaları sonunda elde edilen RMSD grafiği Şekil 4.39’da gösterilmektedir. Grafikten de görüldüğü üzere p32’nin her bir zinciri 2 ns MD’den sonra dengeye ulaşmıştır. Sıklık LyP-1 2000 ps’den (2 ns) sonra yer değiştirmiş ve C zinciri içerisinde daha stabil bir etkileşme konformasyonu bulunduğu görülmüştür.

Hesaplama kolaylığı açısından bu MD çalışmalarında sadece bir LyP-1 sıklık peptidinin p32 C zinciri ile etkileşmesi incelenmiştir. Ancak MD çalışmaları sonunda p32 iç halkasındaki hacim genişliği ve p32’nin bütün zincirlerindeki amino asit dizilimlerinin aynı olması göz önünde tutulduğunda, p32’nin iç halkasındaki diğer zincirlere de birer LyP-1’in benzer şekilde bağlanma olasılıkları yüksektir.

Tablo 4.17’de verilen MM-PBSA sonuçlarına göre 1. docking konformasyonundaki sıklık LyP-1 peptidinin p32 C-zincirine daha yüksek afiniteyle bağlandığı görülmüştür. Bu sebeple 1. docking konformasyonundaki sıklık LyP-1 peptidinin p32 (A, B ve C zincirleri kompleksi) ile fizyolojik ortamda davranışını

incelemek ve afinitesini belirlemek için 3.5 ns implisit su MD çalışmaları yürütülmüştür. MD hesaplamalarında siklik LyP-1'in 2000 ps'den (2 ns) sonra C zinciri içerisinde daha stabil bir etkileşme konformasyonu bulunduğu ve özellikle LyP1-GLY2, LyP1-ARG5 ve LyP1-ARG7 aminoasitlerinin P32 C zinciri ile spesifik hidrojen bağları oluşturduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.40-B).

MM-PBSA hesaplamaları siklik LyP-1'in p32 ile etkileşmesinde hem elektrostatik enerjileri toplamı (ΔE_{el} , gaz fazı + ΔG_{el} , sulu faz) (-12.19 kcal/mol) ve hem de elektrostatik olmayan enerjileri toplamının (ΔE_{VDW} , gazfazı + ΔG_{none} , sulu faz) (-43.80 kcal/mol) kararlı (favorable) olduğunu ve bu enerjilerin entalpik bağlanmada rol oynadığını göstermiştir (Tablo 4.17). Ancak Tablo 4.18'de verildiği gibi, MM-PBSA metodu ile hesaplanan entropi terimi ($T.\Delta S^{\circ} = -31.30$ kcal/mol) kompleks sistemin bağlanma enerjisine (ΔG°) kararlı olmayan (non-favorable) bir katkıda bulunmaktadır. Dolayısı ile LyP-1 bağlanması sadece entalpik olarak kararlı bulunmuştur.

6. SONUÇ

Bu tez çalışması sonucunda; LyP-1 peptidinin oral yolla uygulanarak lenfatik hedeflendirilmesi amacıyla, damlacık büyüklüğü ortalama 20 nm olan, fiziksel ve termodinamik açıdan stabil olan SMEDDS formülasyonları geliştirilmiştir. LyP-1 peptidine ait bir HPLC miktar tayini yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Peptide ait ayrıntılı bir stabilite çalışması yapılmış olup, 12 farklı tampon kullanılarak parçalanma hız sabitleri ve yarılanma ömürleri tespit edilmiştir. Sonuçta, peptidin asidik pH'larda daha dayanıklı olduğu bulunmuştur. Peptidin yağ fazına hapsedilmesi için, soya fosfotidilkolini kullanılarak katı dispersiyonları hazırlanmış ve bu yöntemle peptidin stabilitesini arttırmak amaçlanmıştır. Etkin madde içermeyen formülasyonların Caco-2 hücreleri üzerinde sitotoksikite çalışmaları yapılmış ve toksik etki göstermedikleri görülmüştür. Sadece peptidi ve peptidin katı dispersiyonunu içeren formülasyonlara ait biyoaktivite çalışmaları sonucunda, peptidin tümör hücrelerinde hücre canlılığını azalttığı, formülasyon içindeki peptidin ise çözelti içindeki peptide göre daha etkili olduğu görülmüştür. Son olarak; peptide ve hücrede bağlandığı p32 reseptörüne ait moleküler dinamik çalışmaları yürütülmüş, peptidin ve reseptörün sulu ortamdaki konformasyonları incelenmiştir. En olası konformasyonlarla yapılan docking çalışmaları ile peptidin reseptöre nasıl bağlandığı açığa çıkarılmıştır.

Günümüzde peptit ve protein yapısındaki ilaçların oral uygulanması üzerine birçok çalışma yapılmakta olup bu tip ilaçların taşınmasında SMEDDS'lerle birlikte diğer yağ bazlı taşıyıcı sistemlere ait örnekler tezin genel bilgiler kısmında sunulmuştur. Bu tezde çalışılan formülasyon, özellikle birden çok ilacı beraber almak zorunda olan kanser hastalarında hasta uyuncunu arttırmak amacı ile oral yolla uygulanmak üzere tasarlanmıştır. SMEDDS formülasyonlarına ait piyasada oral çözelti ve yumuşak jelatin kapsül gibi dozaj formları bulunmaktadır. Burada tasarlanan ve oral kullanım için uygun yardımcı maddeler ile hazırlanmış formülasyonun da yarı katı halde yumuşak jelatin kapsüller içine doldurulması, aynı zamanda enterik kaplanarak midedeki ortamdan korunması mümkün olabilir. Ayrıca, emülsiyon formülasyonlarının genel bilgiler bölümünde bahsedilen

katılaştırma tekniklerinden bazıları uygulanarak katı SEDDS haline getirilmesi mümkündür. Bu yolla, uygun yardımcı maddeler kullanılarak, sert enterik kaplı kapsüllere doldurma veya tablet–mini tablet haline getirme gibi yollarla da katı dozaj formları elde edilebilir. Mideden geçen enterik kaplı kapsül veya tablet bağırsak ortamında dağıldığı zaman, içerisindeki yarıkatı formülasyonun bağırsak sıvıları ile dilüsyon sonucu emülsifiye olarak nanoboyutlu damlacıklar oluşturması beklenmektedir. Bu damlacıkların, yağların emilim yolunu izleyerek büyük çoğunlukla lenf dolaşımı aracılığı ile tümöre ulaşması istenmektedir. Tümör çevresinde lenf damarlarının yoğunlaşması ve kullanılan etkin maddenin özellikle tümör çevresindeki lenf damarlarına spesifik olmasının bunu kolaylaştıracağı düşünülmektedir. Aynı zamanda, yağ damlacıkları içine hapsedilen peptidin hidrolizden korunması ve hücre membranlarından geçişinin kolaylaştırılması da mümkün olabilecektir. Yapılan moleküler modelleme çalışmaları sonucunda, reseptöre daha etkin bir şekilde bağlanabilecek peptitler sentezlenmesi, bu peptitlerin yağ asitleri ile konjuge edilerek stabilite ve lipofilisitelerinin artırılması ve de peptitlerin antikanser etkili bileşiklerle konjuge edilerek tümöre hedeflendirilmesi mümkün olabilecektir.

KAYNAKLAR

1. Kutluk, T., Kars, A. (1994). *Kanser Konusunda Genel Bilgiler: Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu Yayınları*, Ankara.
2. <http://www.kanser.gov.tr/folders/file/8iL-2006-SON.pdf>.
3. Malam, Y., Loizidou, M., Seifalian, A.M. (2009). Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. *Trends in Pharmacological Science*, 30 (11), 592–599.
4. Ross, J.S., Schenkein, D.P., Pietrusko, R., Rolfe, M., Linette, G.P., Stec, J. ve diğerleri. (2004). Targeted therapies for cancer. *American Journal of Clinical Pathology*, 122 (4), 598–609.
5. Chan, V.S.W. (2006). Nanomedicine: An unresolved regulatory issue. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 46 (3), 218–224.
6. Cho, K., Wang, X., Nie, S., Chen, Z.G., Shin, D.M. (2008). Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clinical Cancer Research*, 14 (5), 1310–1316.
7. Allen, T.M. (2002). Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 2 (10), 750–763.
8. Maeda, H. (2001). The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Advances in Enzyme Regulation*, 41, 189–207.
9. Haley, B., Frenkel, E. (2008). Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Urologic Oncology*, 26 (1), 57–64.
10. Gradishar, W.J., Tjulandin, S., Davidson, N., Shaw, H., Desai, N., Bhar, P. ve diğerleri. (2005). Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 23 (31), 7794–7803.
11. Leaf, C. (2004). Why we're losing the war on cancer (and how to win it). *Fortune*, 149 (6), 76–82.
12. Lammers, T., Hennink, W.E., Storm, G. (2008). Tumour-targeted nanomedicines: principles and practice. *British Journal of Cancer*, 99 (3), 392–397.
13. Kaş, H.S., Eldem, T. (2002). Kontrollü Salım Sistemlerinin Hedeflendirilmesi. A. Z. Gürsoy (Ed.). *Kontrollü Salım Sistemleri* (s. 304–311): İstanbul, Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayını.
14. Gursoy, R.N., Siahaan, T.J. (1999). Binding and internalization of an ICAM–1 peptide by the surface receptors of T cells. *The Journal of Peptide Research*, 53 (4), 414–421.
15. Ghose, T. (2002). *Tumor Targeting in Cancer Therapy*. M. Page (Ed.). *The Current Status of Tumor Targeting: A Review*. New Jersey: Humana Press.

16. Kukowska-Latallo, J.F., Candido, K.A., Cao, Z., Nigavekar, S.S., Majoros, I.J., Thomas, T.P. ve diğerleri. (2005). Nanoparticle targeting of anticancer drug improves therapeutic response in animal model of human epithelial cancer. *Cancer Research*, 65 (12), 5317–5324.
17. Nielsen, U.B., Marks, J.D. (2000). Internalizing antibodies and targeted cancer therapy: direct selection from phage display libraries. *Pharmaceutical Science and Technology Today*, 3 (8), 282–291.
18. Goren, D., Horowitz, A.T., Tzemach, D., Tarshish, M., Zalipsky, S., Gabizon, A. (2000). Nuclear delivery of doxorubicin via folate-targeted liposomes with bypass of multidrug-resistance efflux pump. *Clinical Cancer Research*, 6 (5), 1949–1957.
19. Jain, R.K. (2003). Molecular regulation of vessel maturation. *Nature Medicine*, 9 (6), 685–693.
20. Hashizume, H., Baluk, P., Morikawa, S., McLean, J.W., Thurston, G., Roberge, S. ve diğerleri. (2000). Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *American Journal of Pathology*, 156 (4), 1363–1380.
21. Yuan, F., Dellian, M., Fukumura, D., Leunig, M., Berk, D.A., Torchilin, V.P. ve diğerleri. (1995). Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size. *Cancer Research*, 55 (17), 3752–3756.
22. Wu, J., Akaike, T., Maeda, H. (1998). Modulation of enhanced vascular permeability in tumors by a bradykinin antagonist, a cyclooxygenase inhibitor, and a nitric oxide scavenger. *Cancer Research*, 58 (1), 159–165.
23. Gabizon, A.A. (2001). Pegylated liposomal doxorubicin: metamorphosis of an old drug into a new form of chemotherapy. *Cancer Investigation*, 19 (4), 424–436.
24. Kopecek, J., Kopeckova, P., Minko, T., Lu, Z.R., Peterson, C.M. (2001). Water soluble polymers in tumor targeted delivery. *Journal of Controlled Release*, 74 (1–3), 147–158.
25. Matsumura, Y., Maeda, H. (1986). A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Research*, 46 (12 Pt 1), 6387–6392.
26. Acharya, S., Sahoo, S.K. (2011). PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 18, 63 (3), 170–183.
27. Gomez-Graete, C., Tsapis, N., Besnard, M., Bochot, A., Fattal, E. (2007). Encapsulation of dexamethasone into biodegradable polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 331 (2), 153–159.

28. Fonseca, C., Simoes, S., Gaspar, R. (2002). Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity. *Journal of Controlled Release*, 83 (2), 273–286.
29. Danhier, F., Lecouturier, N., Vroman, B., Jerome, C., Marchand-Brynaert, J., Feron, O. ve diğ erleri. (2009). Paclitaxel-loaded PEGylated PLGA-based nanoparticles: in vitro and in vivo evaluation. *Journal of Controlled Release*, 133 (1), 11–17.
30. Manchester, M., Singh, P. (2006). Virus-based nanoparticles (VNPs): platform technologies for diagnostic imaging. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58 (14), 1505–1522.
31. Singh, P., Destito, G., Schneemann, A., Manchester, M. (2006). Canine parvovirus-like particles, a novel nanomaterial for tumor targeting. *Journal of Nanobiotechnology*, 4, 2.
32. Park, J.W., Hong, K.L., Kirpotin, D.B., Colbern, G., Shalaby, R., Baselga, J. ve diğ erleri. (2002). Anti-HER2 immunoliposomes: Enhanced efficacy attributable to targeted delivery. *Clinical Cancer Research*, 8 (4), 1172–1181.
33. Park, J.W., Kirpotin, D.B., Hong, K., Shalaby, R., Shao, Y., Nielsen, U.B. ve diğ erleri. (2001). Tumor targeting using anti-her2 immunoliposomes. *Journal of Controlled Release*, 74 (1–3), 95–113.
34. Xiong, X.B., Mahmud, A., Uludag, H., Lavasanifar, A. (2008). Multifunctional polymeric micelles for enhanced intracellular delivery of doxorubicin to metastatic cancer cells. *Pharmaceutical Research*, 25 (11), 2555–2566.
35. Ross, J.F., Chaudhuri, P.K., Ratnam, M. (1994). Differential regulation of folate receptor isoforms in normal and malignant tissues in vivo and in established cell lines. Physiologic and clinical implications. *Cancer*, 73 (9), 2432–2443.
36. Weitman, S.D., Weinberg, A.G., Coney, L.R., Zurawski, V.R., Jennings, D.S., Kamen, B.A. (1992). Cellular localization of the folate receptor: potential role in drug toxicity and folate homeostasis. *Cancer Research*, 52 (23), 6708–6711.
37. Yoo, H.S., Park, T.G. (2004). Folate-receptor-targeted delivery of doxorubicin nano-aggregates stabilized by doxorubicin-PEG-folate conjugate. *Journal of Controlled Release*, 100 (2), 247–256.
38. Bernold, D.M., Sinicrope, F.A. (2006). Advances in chemotherapy for colorectal cancer. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 4 (7), 808–821.
39. Aina, O.H., Sroka, T.C., Chen, M.L., Lam, K.S. (2002). Therapeutic cancer targeting peptides. *Biopolymers*, 66 (3), 184–199.
40. Enback, J., Laakkonen, P. (2007). Tumour-homing peptides: tools for targeting, imaging and destruction. *Biochemical Society Transitions*, 35 (Pt 4), 780–783.
41. Aina, O.H., Liu, R., Sutcliffe, J.L., Marik, J., Pan, C.X., Lam, K.S. (2007). From combinatorial chemistry to cancer-targeting peptides. *Molecular Pharmacology*, 4 (5), 631–651.

42. Aina, O.H., Marik, J., Liu, R., Lau, D.H., Lam, K.S. (2005). Identification of novel targeting peptides for human ovarian cancer cells using "one-bead on-compound" combinatorial libraries. *Molecular Cancer Therapeutics*, 4 (5), 806–813.
43. Karmali, P.P., Kotamraju, V.R., Kastantin, M., Black, M., Missirlis, D., Tirrell, M. ve diğerleri. (2009). Targeting of albumin–embedded paclitaxel nanoparticles to tumors. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 5 (1), 73–82.
44. Krumpe, L.R., Mori, T. (2006). The Use of Phage–Displayed Peptide Libraries to Develop Tumor-Targeting Drugs. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 12 (1), 79–91.
45. Akerman, M.E., Chan, W.C., Laakkonen, P., Bhatia, S.N., Ruoslahti, E. (2002). Nanocrystal targeting in vivo. *Proceedings of National Academy of Science*, 99 (20), 12617–12621.
46. Shadidi, M., Sioud, M. (2003). Selective targeting of cancer cells using synthetic peptides. *Drug Resistance Updates*, 6 (6), 363–371.
47. Yamamoto, Y., Tsutsumi, Y., Mayumi, T. (2002). Molecular design of bioconjugated cell adhesion peptides with a water–soluble polymeric modifier for enhancement of antimetastatic effect. *Current Drug Targets*, 3, 123.
48. Adessi, C., Soto, C. (2002). Converting a peptide into a drug: Strategies to improve stability and bioavailability. *Current Medicinal Chemistry*, 9 (9), 963–978.
49. Almeida, A.J., Souto, E. (2007). Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59 (6), 478–490.
50. Antosova, Z., Mackova, M., Kral, V., Macek, T. (2009). Therapeutic application of peptides and proteins: parenteral forever? *Trends in biotechnology*, 27 (11), 628–635.
51. Laakkonen, P., Porkka, K., Hoffman, J.A., Ruoslahti, E. (2002). A tumor-homing peptide with a targeting specificity related to lymphatic vessels. *Nature Medicine*, 8 (7), 751–755.
52. Laakkonen, P., Zhang, L., Ruoslahti, E. (2008). Peptide targeting of tumor lymph vessels. *Annals of New York Academy of Science*, 1131, 37–43.
53. Ruoslahti, E. (2002). Drug targeting to specific vascular sites. *Drug Discovery Today*, 7 (22), 1138–1143.
54. Makela, A.R., Enback, J., Laakkonen, J.P., Vihinen–Ranta, M., Laakkonen, P., Oker-Blom, C. (2008). Tumor targeting of baculovirus displaying a lymphatic homing peptide. *The Journal of Gene Medicine*, 10 (9), 1019–1031.

55. Makela, A.R., Matilainen, H., White, D.J., Ruoslahti, E., Oker-Blom, C. (2006). Enhanced baculovirus-mediated transduction of human cancer cells by tumor-homing peptides. *Journal of Virology*, 80 (13), 6603–6611.
56. O'Driscoll, C.M. (2002). Lipid-based formulations for intestinal lymphatic delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15 (5), 405–415.
57. Porter, C.J., Charman, W.N. (2001). Transport and absorption of drugs via the lymphatic system. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 50 (1–2), 1–2.
58. Trevaskis, N.L., Charman, W.N., Porter, C.J. (2008). Lipid-based delivery systems and intestinal lymphatic drug transport: a mechanistic update. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60 (6), 702–716.
59. Swartz, M.A. (2001). The physiology of the lymphatic system. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 50 (1–2), 3–20.
60. Zwaans, B.M., Bielenberg, D.R. (2007). Potential therapeutic strategies for lymphatic metastasis. *Microvasc Research*, 74 (2–3), 145–158.
61. Achen, M.G., Mann, G.B., Stacker, S.A. (2006). Targeting lymphangiogenesis to prevent tumour metastasis. *British Journal of Cancer*, 94 (10), 1355–1360.
62. Beasley, N.J., Prevo, R., Banerji, S., Leek, R.D., Moore, J., van Trappen, P. ve diğ erleri. (2002). Intratumoral lymphangiogenesis and lymph node metastasis in head and neck cancer. *Cancer Research*, 62 (5), 1315–1320.
63. Dadras, S.S., Paul, T., Bertoncini, J., Brown, L.F., Muzikansky, A., Jackson, D.G. ve diğ erleri. (2003). Tumor lymphangiogenesis: a novel prognostic indicator for cutaneous melanoma metastasis and survival. *American Journal of Pathology*, 162 (6), 1951–1960.
64. Lu, B., Xiong, S.B., Yang, H., Yin, X.D., Chao, R.B. (2006). Solid lipid nanoparticles of mitoxantrone for local injection against breast cancer and its lymph node metastases. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28 (1–2), 86–95.
65. Liu, J., Meisner, D., Kwong, E., Wu, X.Y., Johnston, M.R. (2007). A novel trans-lymphatic drug delivery system: implantable gelatin sponge impregnated with PLGA-paclitaxel microspheres. *Biomaterials*, 28 (21), 3236–3244.
66. Ruoslahti, E. (2002). Specialization of tumour vasculature. *Nature Reviews Cancer*, 2 (2), 83–90.
67. Alitalo, K., Carmeliet, P. (2002). Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell*, 1 (3), 219–227.
68. Shimizu, K., Kubo, H., Yamaguchi, K., Kawashima, K., Ueda, Y., Matsuo, K. ve diğ erleri. (2004). Suppression of VEGFR-3 signaling inhibits lymph node metastasis in gastric cancer. *Cancer Science*, 95 (4), 328–333.
69. Hoshida, T., Isaka, N., Hagendoorn, J., di Tomaso, E., Chen, Y.L., Pytowski, B. ve diğ erleri. (2006). Imaging steps of lymphatic metastasis reveals that vascular

endothelial growth factor-C increases metastasis by increasing delivery of cancer cells to lymph nodes: therapeutic implications. *Cancer Research*, 66 (16), 8065–8075.

70. Roberts, N., Kloos, B., Cassella, M., Podgrabinska, S., Persaud, K., Wu, Y. ve diğerleri. (2006). Inhibition of VEGFR-3 activation with the antagonistic antibody more potently suppresses lymph node and distant metastases than inactivation of VEGFR-2. *Cancer Research*, 66 (5), 2650–2657.
71. Kubo, H., Fujiwara, T., Jussila, L., Hashi, H., Ogawa, M., Shimizu, K. ve diğerleri. (2000). Involvement of vascular endothelial growth factor receptor-3 in maintenance of integrity of endothelial cell lining during tumor angiogenesis. *Blood*, 96 (2), 546–553.
72. Kadambi, A., Mouta Carreira, C., Yun, C.O., Padera, T.P., Dolmans, D.E., Carmeliet, P. ve diğerleri. (2001). Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C differentially affects tumor vascular function and leukocyte recruitment: role of VEGF-receptor 2 and host VEGF-A. *Cancer Research*, 61 (6), 2404–2408.
73. Nishioka, Y., Yoshino, H. (2001). Lymphatic targeting with nanoparticulate system. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47 (1), 55–64.
74. Wasan, K.M. (2002). The role of lymphatic transport in enhancing oral protein and peptide drug delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 28 (9), 1047–1058.
75. Holm, R., Porter, C.J., Edwards, G.A., Mullertz, A., Kristensen, H.G., Charman, W.N. (2003). Examination of oral absorption and lymphatic transport of halofantrine in a triple-cannulated canine model after administration in self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) containing structured triglycerides. *European Journal of Pharmaceutical Science*, 20 (1), 91–97.
76. Muranishi, S., Fujita, T., Murakami, M., Yamamoto, A. (1997). Potential for lymphatic targeting of peptides. *Journal of Controlled Release*, 46 (1–2), 157–164.
77. Velinova, M., Read, N., Kirby, C., Gregoriadis, G. (1996). Morphological observations on the fate of liposomes in the regional lymph nodes after footpad injection into rats. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1299 (2), 207–215.
78. Torchilin, V.P. (1994). Immunoliposomes and PEGylated immunoliposomes: possible use for targeted delivery of imaging agents. *ImmunoMethods*, 4 (3), 244–258.
79. Hawley, A.E., Illum, L., Davis, S.S. (1997). Preparation of biodegradable, surface engineered PLGA nanospheres with enhanced lymphatic drainage and lymph node uptake. *Pharmaceutical Research*, 14 (5), 657–661.
80. Hawley, A.E., Illum, L., Davis, S.S. (1997). Lymph node localisation of biodegradable nanospheres surface modified with poloxamer and poloxamine block co-polymers. *FEBS letters*, 400 (3), 319–323.

81. Bargoni, A., Cavalli, R., Caputo, O., Fundaro, A., Gasco, M.R., Zara, G.P. (1998). Solid lipid nanoparticles in lymph and plasma after duodenal administration to rats. *Pharmaceutical Research*, 15 (5), 745–750.
82. Yoshida, T., Oide, N., Sakamoto, T., Yotsumoto, S., Negishi, Y., Tsuchiya, S. ve diğ erleri. (2006). Induction of cancer cell–specific apoptosis by folate–labeled cationic liposomes. *Journal of Controlled Release*, 111 (3), 325–332.
83. Lubbe, A.S., Alexiou, C., Bergemann, C. (2001). Clinical applications of magnetic drug targeting. *The Journal of Surgical Research*, 95 (2), 200–206.
84. Oussoren, C., Storm, G. (2001). Liposomes to target the lymphatics by subcutaneous administration. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 50 (1–2), 143–156.
85. Kaminskas, L.M., Kota, J., McLeod, V.M., Kelly, B.D., Karellas, P., Porter, C.J. (2009). PEGylation of polylysine dendrimers improves absorption and lymphatic targeting following SC administration in rats. *Journal of Controlled Release*, 140 (2), 108–116.
86. Hauss, D.J. (2007). Oral Lipid Based Formulations-Enhancing the Bioavailability of Poorly Water Soluble Drugs. New York: Informa Healthcare.
87. Gursoy, R.N., Benita, S. (2004). Self–emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 58 (3), 173–182.
88. Yang, S., Gursoy, R.N., Lambert, G., Benita, S. (2004). Enhanced oral absorption of paclitaxel in a novel self–microemulsifying drug delivery system with or without concomitant use of P–glycoprotein inhibitors. *Pharmaceutical Research*, 21 (2), 261–270.
89. Khoo, S.M., Shackleford, D.M., Porter, C.J., Edwards, G.A., Charman, W.N. (2003). Intestinal lymphatic transport of halofantrine occurs after oral administration of a unit–dose lipid–based formulation to fasted dogs. *Pharmaceutical Research*, 20 (9), 1460–1465.
90. O'Driscoll, C.M. (2002). Lipid–based formulations for intestinal lymphatic delivery. *European Journal of Pharmaceutical Science*, 15 (5), 405–415.
91. Hauss, D.J., Fogal, S.E., Ficorilli, J.V., Price, C.A., Roy, T., Jayaraj, A.A. ve diğ erleri. (1998). Lipid-based delivery systems for improving the bioavailability and lymphatic transport of a poorly water-soluble LTB4 inhibitor. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 87 (2), 164–169.
92. Moody, T.W., Leyton, J., Gozes, I., Lang, L., Eckelman, W.C. (1998). VIP and breast cancer. *Annals of New York Academy of Science*, 865, 290–296.
93. Dagar, S., Krishnadas, A., Rubinstein, I., Blend, M.J., Onyuksel, H. (2003). VIP grafted sterically stabilized liposomes for targeted imaging of breast cancer: in vivo studies. *Journal of Controlled Release*, 91 (1–2), 123–133.

94. Vu, T.Q., Maddipati, R., Blute, T.A., Nehilla, B.J., Nusblat, L., Desai, T.A. (2005). Peptide-conjugated quantum dots activate neuronal receptors and initiate downstream signaling of neurite growth. *Nano Letters*, 5 (4), 603–607.
95. Mitra, A., Mulholland, J., Nan, A., McNeill, E., Ghandehari, H., Line, B.R. (2005). Targeting tumor angiogenic vasculature using polymer-RGD conjugates. *Journal of Controlled Release*, 102 (1), 191–201.
96. Gupta, A.K., Berry, C., Gupta, M., Curtis, A. (2003). Receptor-mediated targeting of magnetic nanoparticles using insulin as a surface ligand to prevent endocytosis. *IEEE Trans Nanobioscience*, 2 (4), 255–261.
97. Bouchemal, K., Briancon, S., Perrier, E., Fessi, H. (2004). Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. *International Journal of Pharmaceutics*, 280 (1–2), 241–251.
98. Solans, C., Izquierdo, P., Nolla, J., Azemar, N., Garcia-Celma, M.J. (2005). Nano-emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 10 (3–4), 102–110.
99. Tadros, T., Izquierdo, R., Esquena, J., Solans, C. (2004). Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 108, 303–318.
100. Dixit, A.R., Rajput, S.J., Patel, S.G. (2010). Preparation and bioavailability assessment of SMEDDS containing valsartan. *AAPS Pharmaceutical Science and Technology*, 11 (1), 314–321.
101. Gursoy, N., Garrigue, J.S., Razafindratsita, A., Lambert, G., Benita, S. (2003). Excipient effects on in vitro cytotoxicity of a novel paclitaxel self-emulsifying drug delivery system. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 92 (12), 2411–2418.
102. Shen, Q., Li, X., Yuan, D., Jia, W. (2010). Enhanced oral bioavailability of daidzein by self-microemulsifying drug delivery system. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*, 58 (5), 639–643.
103. Zhang, N., Zhang, W., Jin, Y., Quan, D.Q. (2011). Studies on preparation of carbamazepine (CBZ) supersaturatable self-microemulsifying (S-SMEDDS) formulation and relative bioavailability in beagle dogs. *Pharmaceutical Development and Technology*, 16(4), 415 – 21.
104. Pouton, C.W. (2000). Lipid formulations for oral administration of drugs: non-emulsifying, self-emulsifying and 'self-microemulsifying' drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11, S93–S98.
105. Porter, C.J.H., Trevaskis, N.L., Charman, W.N. (2007). Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6 (3), 231–248.
106. Cevik, O., Gursoy, N. (2010). Design and Characterization of Tumor Specific Lyp-1 Peptide-Containing SMEDDS for the Lymphatic Targeting of Solid Tumors in Cancer Therapy. *The AAPS Journal*, 12, (S2). Available from: http://www.aapsj.org/abstracts/AM_2010/W5282.pdf.

107. Cheng, M.B., Wang, J.C., Li, Y.H., Liu, X.Y., Zhang, X., Chen, D.W. ve diğerleri. (2008). Characterization of water-in-oil microemulsion for oral delivery of earthworm fibrinolytic enzyme. *Journal of Controlled Release*, 129 (1), 41–48.
108. Rao, S.P.V.R., Shao, J. (2008). Self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) for oral delivery of protein drugs I. Formulation development. *International Journal of Pharmaceutics*, 362 (1–2), 2–9.
109. Barakat, N.S. (2010). Enhanced oral bioavailability of etodolac by self-emulsifying systems: in-vitro and in-vivo evaluation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 62 (2), 173–180.
110. Kohli, K., Chopra, S., Dhar, D., Arora, S., Khar, R.K. (2010). Self-emulsifying drug delivery systems: an approach to enhance oral bioavailability. *Drug Discovery Today*, 15 (21–22), 958–965.
111. Porter, C.J.H., Charman, W.N. (1997). Uptake of drugs into the intestinal lymphatics after oral administration. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 25 (1), 71–89.
112. Basalious, E.B., Shawky, N., Badr-Eldin, S.M. (2010). SNEDDS containing bioenhancers for improvement of dissolution and oral absorption of lacidipine. I: Development and optimization. *International Journal of Pharmaceutics*, 391 (1–2), 203–211.
113. Cirri, M., Mura, P., Mora, P.C. (2007). Liquid spray formulations of xibornol by using self-microemulsifying drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*, 340 (1–2), 84–91.
114. Elnaggar, Y.S., El-Massik, M.A., Abdallah, O.Y. (2009). Self-nanoemulsifying drug delivery systems of tamoxifen citrate: design and optimization. *International Journal of Pharmaceutics*, 380 (1–2), 133–141.
115. Kommuru, T.R., Gurley, B., Khan, M.A., Reddy, I.K. (2001). Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) of coenzyme Q10: formulation development and bioavailability assessment. *International Journal of Pharmaceutics*, 212 (2), 233–246.
116. Chambin, O., Jannin, V. (2005). Interest of multifunctional lipid excipients: case of Gelucire 44/14. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 31 (6), 527–534.
117. Atef, E., Belmonte, A.A. (2008). Formulation and in vitro and in vivo characterization of a phenytoin self-emulsifying drug delivery system (SEDDS). *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 35 (4), 257–263.
118. Sha, X.Y., Yan, G.J., Wu, Y.J., Li, J.C., Fang, X. (2005). Effect of self-microemulsifying drug delivery systems containing Labrasol on tight junctions in Caco-2 cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 24 (5), 477–486.

119. Jannin, V., Musakhanian, J., Marchaud, D. (2008). Approaches for the development of solid and semi-solid lipid-based formulations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60 (6), 734–746.
120. Constantinides, P.P. (1995). Lipid Microemulsions for Improving Drug Dissolution and Oral Absorption Physical and Biopharmaceutical Aspects. *Pharmaceutical Research*, 12 (11), 1561–1572.
121. Grevel, J., Nuesch, E., Abisch, E., Kutz, K. (1986). Pharmacokinetics of Oral Cyclosporine-a (Sandimmun) in Healthy-Subjects. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 31 (2), 211–216.
122. Rang, M.J., Miller, C.A. (1999). Spontaneous Emulsification of Oils Containing Hydrocarbon, Nonionic Surfactant, and Oleyl Alcohol. *Journal of Colloids and Interface Science*, 209 (1), 179–192.
123. Gershanik, T., Haltner, E., Lehr, C.M., Benita, S. (2000). Charge-dependent interaction of self-emulsifying oil formulations with Caco-2 cells monolayers: binding, effects on barrier function and cytotoxicity. *International Journal of Pharmaceutics*, 211 (1–2), 29–36.
124. Zvonar, A., Berginc, K., Kristl, A., Gasperlin, M. (2010). Microencapsulation of self-microemulsifying system: Improving solubility and permeability of furosemide. *International Journal of Pharmaceutics*, 388 (1–2), 151–158.
125. <http://www.abo.fi/fak/mnf/phys.chem/competence/emulsion.html>
126. Sakai, K., Yoshimori, T., Obata, K., Maeda, H. (2010). Design of self-microemulsifying drug delivery systems using a high-throughput formulation screening system. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 36 (10), 1245–1252.
127. Anton, N., Benoit, J.P., Saulnier, P. (2008). Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—a review. *Journal of Controlled Release*, 128 (3), 185–199.
128. Leal-Calderon, F., Schmitt, F., Bibette, J., Emulsion Science Basic Principles, Second Edition (2007), Springer, 10.
129. Fernando Leal-Calderon, V.S., Jerome Bibette. (2007). Emulsion Science, Basic Principles (2. bs.): Springer, 10 – 11.
130. Lawrence, M.J., Rees, G.D. (2000). Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 45 (1), 89–121.
131. Reiss, H. (1975). Entropy-Induced Dispersion of Bulk Liquids. *Journal of Colloid and Interface Science*, 53 (1), 61–70.
132. Dabros, T., Yeung, A., Masliyah, J., Czarnecki, J. (1999). Emulsification through area contraction. *Journal of Colloid and Interface Science*, 210 (1), 222–224.
133. Henry, J.V., Fryer, P.J., Frith, W.J., Norton, I.T. (2009). Emulsification mechanism and storage instabilities of hydrocarbon-in-water sub-micron

- emulsions stabilised with Tweens (20 and 80), Brij 96v and sucrose monoesters. *Journal of Colloid and Interface Science*, 338 (1), 201–206.
134. Nekkanti, V., Karatgi, P., Prabhu, R., Pillai, R. (2010). Solid self-microemulsifying formulation for candesartan cilexetil. *AAPS Pharmaceutical Science and Technology*, 11 (1), 9–17.
 135. Yi, T., Wan, J.L., Xu, H.B., Yang, X.L. (2008). A new solid self-microemulsifying formulation prepared by spray-drying to improve the oral bioavailability of poorly water soluble drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 70 (2), 439–444.
 136. Wasan, E.K., Bartlett, K., Gershkovich, P., Sivak, O., Banno, B., Wong, Z. ve diğ erleri. (2009). Development and characterization of oral lipid-based amphotericin B formulations with enhanced drug solubility, stability and antifungal activity in rats infected with *Aspergillus fumigatus* or *Candida albicans*. *International Journal of Pharmaceutics*, 372 (1–2), 76–84.
 137. Goddeeris, C., Goderis, B., Van den Mooter, G. (2010). Lyotropic, liquid crystalline nanostructures of aqueous dilutions of SMEDDS revealed by small-angle X-ray scattering: impact on solubility and drug release. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 40 (2), 110–117.
 138. Guo, C., Wang, J., Cao, F., Lee, R.J., Zhai, G. (2010). Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery. *Drug Discovery Today*, 15 (23–24), 1032–1040.
 139. Bowtle, W.J. (2007). Materials, Process, and Manufacturing: Considerations for Lipid-Based Hard-Capsule Formats. D. J. Hauss (Ed.). *Oral Lipid Based Formulations-Enhancing the Bioavailability of Poorly Water Soluble Drugs* (s. 79). New York Informa Healthcare.
 140. Li, P., Hynes, S.R., Haefele, T.F., Pudipeddi, M., Royce, A.E., Serajuddin, A.T. (2009). Development of clinical dosage forms for a poorly water-soluble drug II: formulation and characterization of a novel solid microemulsion preconcentrate system for oral delivery of a poorly water-soluble drug. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98 (5), 1750–1764.
 141. Muller, R.H., Runge, S., Ravelli, V., Mehnert, W., Thunemann, A.F., Souto, E.B. (2006). Oral bioavailability of cyclosporine: solid lipid nanoparticles (SLN) versus drug nanocrystals. *International Journal of Pharmaceutics*, 317 (1), 82–89.
 142. Hansen, T., Holm, P., Schultz, K. (2004). Process characteristics and compaction of spray-dried emulsions containing a drug dissolved in lipid. *International Journal of Pharmaceutics*, 287 (1–2), 55–66.
 143. Bamba, J., Cavé, G., Bensouda, Y., Tchoreloff, P., Puisieux, F., Couarraze, G. (1995). Cryoprotection of Emulsions in Freeze-Drying: Freezing Process Analysis. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 21 (15), 1749–1760.
 144. Patil, P., Joshi, P., Paradkar, A. (2004). Effect of formulation variables on preparation and evaluation of gelled self-emulsifying drug delivery system

- (SEDDS) of ketoprofen. *AAPS Pharmaceutical Science and Technology*, 5 (3), 43–50.
145. Seo, A., Holm, P., Kristensen, H.G., Schaefer, T. (2003). The preparation of agglomerates containing solid dispersions of diazepam by melt agglomeration in a high shear mixer. *International Journal of Pharmaceutics*, 259 (1–2), 161–171.
 146. Iosio, T., Voinovich, D., Grassi, M., Pinto, J.F., Perissutti, B., Zacchigna, M. ve diğerleri. (2008). Bi-layered self-emulsifying pellets prepared by co-extrusion and spheronization: influence of formulation variables and preliminary study on the in vivo absorption. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69 (2), 686–697.
 147. Tang, B., Cheng, G., Gu, J.C., Xu, C.H. (2008). Development of solid self-emulsifying drug delivery systems: preparation techniques and dosage forms. *Drug Discovery Today*, 13 (13–14), 606–612.
 148. Ito, Y., Kusawake, T., Ishida, M., Tawa, R., Shibata, N., Takada, K. (2005). Oral solid gentamicin preparation using emulsifier and adsorbent. *Journal of Controlled Release*, 105 (1–2), 23–31.
 149. Agarwal, V., Siddiqui, A., Ali, H., Nazzal, S. (2009). Dissolution and powder flow characterization of solid self-emulsified drug delivery system (SEDDS). *International Journal of Pharmaceutics*, 366 (1–2), 44–52.
 150. Fabio, C., Elisabetta, C. (2008). Pharmaceutical composition comprising a water/oil/water double emulsion incorporated in a solid support, WO2003/013421.
 151. Wang, Z.Y., Sun, J., Wang, Y.J., Liu, X.H., Liu, Y.H., Fu, Q. ve diğerleri. (2010). Solid self-emulsifying nitrendipine pellets: Preparation and in vitro/in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, 383 (1–2), 1–6.
 152. Gupta, M.K., Tseng, Y.C., Goldman, D., Bogner, R.H. (2002). Hydrogen bonding with adsorbent during storage governs drug dissolution from solid-dispersion granules. *Pharmaceutical Research*, 19 (11), 1663–1672.
 153. You, J., Cui, F.D., Han, X., Wang, Y.S., Yang, L., Yu, Y.W. ve diğerleri. (2006). Study of the preparation of sustained release microspheres containing zedoary turmeric oil by the emulsion-solvent diffusion method and evaluation of the self-emulsification and bioavailability of the oil. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 48 (1), 35–41.
 154. Attama, A.A., Nkemnele, M.O. (2005). In vitro evaluation of drug release from self micro-emulsifying drug delivery systems using a biodegradable homolipid from Capra hircus. *International Journal of Pharmaceutics*, 304 (1–2), 4–10.
 155. Trickler, W.J., Nagvekar, A.A., Dash, A.K. (2008). A novel nanoparticle formulation for sustained paclitaxel delivery. *AAPS Pharmaceutical Science and Technology*, 9 (2), 486–493.

156. Kim, J.Y., Ku, Y.S. (2000). Enhanced absorption of indomethacin after oral or rectal administration of a self-emulsifying system containing indomethacin to rats. *International Journal of Pharmaceutics*, 194 (1), 81–89.
157. Chae, G.S., Lee, J.S., Kim, S.H., Seo, K.S., Kim, M.S., Lee, H.B. ve diğerleri. (2005). Enhancement of the stability of BCNU using self-emulsifying drug deliver systems (SEDDS) and in vitro antitumor activity of self-emulsified BCNU-loaded PLGA water. *International Journal of Pharmaceutics*, 301 (1–2), 6–14.
158. Wei, L., Li, J., Guo, L., Nie, S., Pan, W., Sun, P. ve diğerleri. (2007). Investigations of a novel self-emulsifying osmotic pump tablet containing carvedilol. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 33 (9), 990–998.
159. Garcia-Fuentes, M., Prego, C., Torres, D., Alonso, M.J. (2005). A comparative study of the potential of solid triglyceride nanostructures coated with chitosan or poly(ethylene glycol) as carriers for oral calcitonin delivery. *European Journal of Pharmaceutical Science*, 25 (1), 133–143.
160. Pather, I., G.S.V., Khankari, Rajendra K. , Hontz, John , Kumbale Ramya. (2004). Emulsions as solid dosage forms for oral administration US 6, 692, 771.
161. Mulye, N. (2003). Microemulsion concentrate composition of cyclosporin, US 6. 638. 522.
162. Arap, W., Pasqualini, R., Ruoslahti, E. (1998). Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science*, 279 (5349), 377–380.
163. Zhang, L., Giraudo, E., Hoffman, J.A., Hanahan, D., Ruoslahti, E. (2006). Lymphatic zip codes in premalignant lesions and tumors. *Cancer Research*, 66 (13), 6894–6894.
164. Laakkonen, P., Akerman, M.E., Biliran, H., Yang, M., Ferrer, F., Karpanen, T. ve diğerleri. (2004). Antitumor activity of a homing peptide that targets tumor lymphatics and tumor cells. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 101 (25), 9381–9386.
165. Fogal, V., Zhang, L., Krajewski, S., Ruoslahti, E. (2008). Mitochondrial/cell-surface protein p32/gC1qR as a molecular target in tumor cells and tumor stroma. *Cancer Research*, 68 (17), 7210–7218.
166. Jiang, J., Zhang, Y., Krainer, A.R., Xu, R.M. (1999). Crystal structure of human p32, a doughnut-shaped acidic mitochondrial matrix protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96 (7), 3572–3577.
167. Muta, T., Kang, D., Kitajima, S., Fujiwara, T., Hamasaki, N. (1997). p32 protein, a splicing factor 2-associated protein, is localized in mitochondrial matrix and is functionally important in maintaining oxidative phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*, 272 (39), 24363–24370.

168. Gupta, S., Batchu, R.B., Datta, K. (1991). Purification, partial characterization of rat kidney hyaluronic acid binding protein and its localization on the cell surface. *European Journal of Cell Biology*, 56 (1), 58–67.
169. Ghosh, I., Chowdhury, A.R., Rajeswari, M.R., Datta, K. (2004). Differential expression of Hyaluronic Acid Binding Protein 1 (HABP1)/P32/C1QBP during progression of epidermal carcinoma. *Molecular and cellular biochemistry*, 267 (1–2), 133–139.
170. Luo, G., Yu, X., Jin, C., Yang, F., Fu, D., Long, J. ve diğerleri. (2010). LyP–1–conjugated nanoparticles for targeting drug delivery to lymphatic metastatic tumors. *International Journal of Pharmaceutics*, 385 (1–2), 150–156.
171. *ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1), November, 2005.*
172. *United States Pharmacopoeia 26–National Formulary 2, (2003).* Retrieved from.
173. Ornaf R. M., Dong M. W. (2005). Key Concepts of HPLC in Pharmaceutical Analysis. Ahuja S. & Dong M. W. (Ed.). Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC (c. 6, s. 23–30). New York: Elsevier
174. Case, D.A., Darden, T.A., Cheatham, T.E., III, Simmerling, C.L., Wang, J., Duke, R.E, Luo, R. , Walker, R.C., Zhang, W., Merz, K.M. , Roberts, B.P., Wang, B., Hayik, S., Roitberg, A., Seabra, G. , Kolossvail., Wong, K.F., Paesani, F., Vanicek, J., Liu, J., Wu, X., Brozell, S.R., Steinbrecher, T. , Gohlke, H. , Cai, Q., Ye, X., Wang, J., Hsieh, M.J., Cui, G. , Roe, D.R., Mathews, D.H., Seetin, M.G., Sagui, C. , Babin, V., Luchko, T., Gusarov, S. , Kovalenko, A., Kollman, P.A. (2010). AMBER 11. San Francisco.: University of California.
175. Lindorff–Larsen, K., Piana, S., Palmo, K., Maragakis, P., Klepeis, J.L., Dror, R.O. ve diğerleri. (2010). Improved side–chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins*, 78 (8), 1950–1958.
176. Hornak, V., Abel, R., Okur, A., Strockbine, B., Roitberg, A., Simmerling, C. (2006). Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. *Proteins*, 65 (3), 712–725.
177. Case, D.A., Cheatham, T.E., 3rd, Darden, T., Gohlke, H., Luo, R., Merz, K.M., Jr. ve diğerleri. (2005). The Amber biomolecular simulation programs. *Journal of Computational Chemistry*, 26 (16), 1668–1688.
178. Onufriev, A., Bashford, D., Case, D.A. (2004). Exploring protein native states and large–scale conformational changes with a modified generalized born model. *Proteins*, 55 (2), 383–394.
179. Uberuaga, B.P., Anghel, M., Voter, A.F. (2004). Synchronization of trajectories in canonical molecular–dynamics simulations: observation, explanation, and exploitation. *The Journal of Chemical Physics*, 120 (14), 6363–6374.

180. Ryckaert, J.P., Ciccotti, G., Berendsen, H.J.C. (1977). Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: Molecular dynamics of n-alkanes. *Journal of Computational Chemistry*, 23, 327–341.
181. Srinivasan, J., Cheatham, T.E., Cieplak, P., Kollman, P.A., Case, D.A. (1998). Continuum solvent studies of the stability of DNA, RNA, and phosphoramidate-DNA helices. *Journal of the American Chemical Society*, 120 (37), 9401–9409.
182. Case, D.A. (1999). Molecular dynamics and normal mode analysis of biomolecular rigidity. P. M. D. M.F. Thorpe (Ed.). *Rigidity theory and applications* (s. 324–344). New York: Plenum.
183. Gohlke, H., Case, D.A. (2004). Converging free energy estimates: MM–PB(GB)SA studies on the protein–protein complex Ras–Raf. *Journal of computational chemistry*, 25 (2), 238–250.
184. Cornell, W.D., Cieplak, P., Bayly, C.I., Gould, I.R., Merz, K.M., Ferguson, D.M. ve diğ erleri. (1996). A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules. *Journal of the American Chemical Society*, 118 (9), 2309–2309.
185. Sitkoff, D., Sharp, K.A., Honig, B. (1994). Accurate Calculation of Hydration Free–Energies Using Macroscopic Solvent Models. *Journal of Physical Chemistry*, 98 (7), 1978–1988.
186. Trott, O., Olson, A.J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31 (2), 455–461.
187. Patel, K., Borchardt, R.T. (1990). Chemical pathways of peptide degradation. III. Effect of primary sequence on the pathways of deamidation of asparaginyl residues in hexapeptides. *Pharmaceutical Research*, 7 (8), 787–793.
188. Patel, K., Borchardt, R.T. (1990). Chemical pathways of peptide degradation. II. Kinetics of deamidation of an asparaginyl residue in a model hexapeptide. *Pharmaceutical Research*, 7 (7), 703–711.
189. Balakrishnan, P., Lee, B.J., Oh, D.H., Kim, J.O., Hong, M.J., Jee, J.P. ve diğ erleri. (2009). Enhanced oral bioavailability of dexibuprofen by a novel solid self–emulsifying drug delivery system (SEDDS). *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 72 (3), 539–545.
190. Shafiq, S., Shakeel, F. (2009). Effect of labrasol on self-nanoemulsification efficiency of ramipril nanoemulsion. *Pharmazie*, 64 (12), 812–817.
191. Garti, N., Aserin, A., Tiunova, I., Fanun, M. (2000). A DSC study of water behavior in water–in–oil microemulsions stabilized by sucrose esters and butanol. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, 170 (1), 1–18.

192. Junyaprasert, V.B., Boonme, P., Songkro, S., Krauel, K., Rades, T. (2007). Transdermal delivery of hydrophobic and hydrophilic local anesthetics from o/w and w/o Brij 97-based microemulsions. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 10 (3), 288–298.
193. Trotter, P.J., Ho, S.Y., Storch, J. (1996). Fatty acid uptake by Caco-2 human intestinal cells. *Journal of Lipid Research*, 37 (2), 336–346.
194. Buyukozturk, F., Benneyan, J.C., Carrier, R.L. (2010). Impact of emulsion-based drug delivery systems on intestinal permeability and drug release kinetics. *Journal of Controlled Release*, 142 (1), 22–30.
195. Palamakula, A., Khan, M.A. (2004). Evaluation of cytotoxicity of oils used in coenzyme Q(10) Self-Emulsifying Drug Delivery Systems (SEDDS). *International Journal of Pharmaceutics*, 273 (1–2), 63–73.
196. <http://www.nutrivisioninc.com/intesthealth.htm>. Ağ
197. Fogal, V., Richardson, A.D., Karmali, P.P., Scheffler, I.E., Smith, J.W., Ruoslahti, E. (2010). Mitochondrial p32 protein is a critical regulator of tumor metabolism via maintenance of oxidative phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology*, 30 (6), 1303–1318.
198. Li, X., Jin, Q., Chen, T., Zhang, B., Zheng, R., Wang, Z. ve diğerleri. (2009). LyP-1 ultrasonic microbubbles targeting to cancer cell as tumor bio-acoustics markers or drug carriers: targeting efficiency evaluation in, microfluidic channels. *Conference proceedings: Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, 2009, 463–466.
199. Sanchez-Martin, D., Cuesta, A.M., Fogal, V., Ruoslahti, E., Alvarez-Vallina, L. (2011). The multicompartamental p32/gClqR as a new target for antibody-based tumor targeting strategies. *The Journal of Biological Chemistry*, 286 (7), 5197–5203.
200. Yan, F., Li, X., Jin, Q., Jiang, C., Zhang, Z., Ling, T. ve diğerleri. (2011). Therapeutic ultrasonic microbubbles carrying paclitaxel and LyP-1 peptide: preparation, characterization and application to ultrasound-assisted chemotherapy in breast cancer cells. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 37 (5), 768–779.
201. Dang, C.V. (2010). p32 (C1QBP) and cancer cell metabolism: is the Warburg effect a lot of hot air? *Molecular and Cellular Biology*, 30 (6), 1300–1302.
202. Park, J.H., von Maltzahn, G., Xu, M.J., Fogal, V., Kotamraju, V.R., Ruoslahti, E. ve diğerleri. (2010). Cooperative nanomaterial system to sensitize, target, and treat tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107 (3), 981–986.

EK 1: “FIP Pharmaceutical Sciences World Congress 2010 in association with the AAPS Annual Meeting and Exposition, New Orleans, LA, USA, 12–18 Kasım 2010” ve “8th GPEN Meeting (Global Pharmaceutic Education Network), University of North Carolina, Chapel Hill, NC, USA, 10–12 Kasım 2010” tarihli toplantılarda sunulan poster özeti (Poster No:W5282).

Design and Characterization of Tumor Specific Lyp-1 Peptide-Containing SMEDDS for the Lymphatic Targeting of Solid Tumors in Cancer Therapy

O. Cevik¹, N. Gursoy¹

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

Purpose

Recent studies on tumor homing peptides have shown that the LyP-1 peptide (CGNKRTRGC) is specific to tumor lymphatics. Knowing that the lymphatic system is an important pathway of tumor metastasis, the purpose of the present work was to design SMEDDS (Self-Microemulsifying Drug Delivery System) formulations for the lymphatic delivery of a LyP-1 peptide-lipid reversible conjugate targeted to solid tumors.

Methods

Preformulation studies were carried out to determine the optimum formulation components of the SMEDDS. Ternary phase diagrams were constructed containing different oils, surfactants and cosolvents. Characterization studies were conducted using polarized light microscopy (Leica, Germany) and a nanosizer (Malvern Zetasizer Nanoseries, UK).

Results

Optimum SMEDDS formulations were obtained using Peceol as the oil phase, Labrasol:Gelucire (4:1 and 1:2 ratios) mixture as the surfactant system, and PEG 300 as the cosolvent. The oil (5 – 10%), surfactant (50 – 85%), and cosolvent (5 – 45%) were mixed homogenously on a 40°C water bath until a clear mixture was obtained. This mixture was then diluted with pH 7,4 phosphate buffer at a ratio of 1:10. The formulations were clear, isotropic systems with Newtonian type flow properties. These SMEDDS formulations were physically stable with no phase separation following a two week stability study at 25±1°C. The pH of the formulations varied between 7,05 – 7,20. The formulations were evaluated using polarized light microscopy for the possibility of liquid crystal structures that give specific anisotropic image under polarized light. None of the SMEDDS formulations appeared to have liquid crystal structures. Since non-ionic surfactants were used in the formulations, the zeta potential values were close to zero. The droplet size was 28,25±5,52 nm (PDI:0,19) and 18,04±1,84 nm (PDI:0,19) for the SMEDDS formulations containing Labrasol:Gelucire at a ratio of 4:1 and 1:2, respectively.

Conclusion

Suitable SMEDDS formulations were designed and characterized for the targeted lymphatic delivery of the anticancer peptide LyP-1.

Acknowledgment: This project is supported by TUBITAK, The Scientific and Technological Research Council of Turkey, SBAG 1001 – 109S341.

EK 2: “AAPS Annual Meeting and Exposition, Washington D.C., ABD, 23–27 Ekim 2011” tarihli toplantıda sunulan poster özeti (Poster No:T3106).

Stability Assessment of the Tumor Specific Lyp-1 Peptide at Different pH and in the Newly-Developed Self-Microemulsifying Drug Delivery Systems (SMEDDS)

O. Cevik, N. Gursoy
Hacettepe University

Purpose.

To determine the chemical stability of the anticancer peptide, Lyp-1 (CGNKRTRGC), at different pH values and in the newly-developed self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS).

Methods.

The pH and time-dependent chemical stability of the Lyp-1 peptide was monitored at different pH values ranging from 1 to 12. All studies were carried out at 37 °C and at a constant ionic strength of 0.15. The initial concentration of the peptide was 10 mM in all the solutions prepared. The samples were kept frozen at – 100 °C until analysis. The chemical stability of the peptide was further monitored in the SMEDDS formulations that were recently developed. The peptide was added into the SMEDDS formulations as is or as a solid dispersion form prepared with soy phosphatidylcholine at a 1:4 (w/w). The quantitative analysis was conducted with a validated HPLC method utilizing a RP-HPLC equipped with a C18 column. The HPLC analysis was carried out at 204 nm, and the samples were run in triplicate.

Results.

Deamidation of Asn residues is a major chemical degradation pathway of peptides and proteins. The final degradation products are known to be the isoaspartyl peptide and aspartyl peptide. It appears that the Lyp-1 peptide which also contains an Asn residue degrades into the two major degradation products. It was also found that the peptide was more stable at low pH than at neutral or high pH. On the other hand, the Lyp-1 peptide was found to be quite stable in the SMEDDS formulations.

Conclusion.

Buffer catalysis was observed during the pH-dependent chemical stability assessment of the Lyp-1 peptide. It appears that the chemical stability of the peptide could be improved when formulated into the newly-developed SMEDDS formulations, which have been designed for the lymphatic targeting of this highly potent anticancer peptide.

Acknowledgment: This project was supported by TUBITAK (The Scientific and Technological Research Council of Turkey);
Grant Number: SBAG 1001-109S341.

EK 3: ÖZGEÇMİŞ

Özge ÇEVİK

Tel: 0 555 2354390

e-posta: ozgecevik@gmail.com



Eğitim:

Yüksek Lisans, Farmasötik Teknoloji, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Ankara, Türkiye, 2008–2012.

Lisans, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Ankara, Türkiye, 2004–2008.

Lise, Meram Anadolu Lisesi, Konya, Türkiye, 2001–2004.

Proje ve Sunumlar:

Özge Çevik, R. Neslihan Gürsoy, “Stability Assessment of the Tumor Spesific Lyp-1 Peptide at Different pH and in the Newly-Developed Self-Microemulsifying Drug Delivery Systems (SMEDDS)”. Poster Sunumu, AAPS Annual Meeting and Exposition, Washington D.C., USA, 23–27 Ekim 2011.

Özge Çevik, R. Neslihan Gürsoy, “Design and Characterization of Tumor Spesific Lyp-1 Peptide-Containing SMEDDS for the Lymphatic Targeting of Solid Tumors in Cancer Therapy”. Poster sunumu, Student and Postdoc Meeting in AAPS World Congress 2010, New Orleans, LA, USA, 12–14 Kasım 2010.

Özge Çevik, R. Neslihan Gürsoy, “Design and Characterization of Tumor Spesific Lyp-1 Peptide-Containing SMEDDS for the Lymphatic Targeting of Solid Tumors in Cancer Therapy”. Poster sunumu, AAPS (American Association of Pharmaceutical Scientists) World Congress 2010, New Orleans, LA, USA, 14–18 Kasım 2010.

Özge Çevik, R. Neslihan Gürsoy, “Design and Characterization of Tumor Spesific Lyp-1 Peptide-Containing SMEDDS for the Lymphatic Targeting of Solid Tumors in Cancer Therapy”. Poster sunumu, GPEN 2010 Eight Meeting in University of North Carolina, Chapel Hill, NC, USA, 9–12 Kasım 2010.

Devam eden projeler:

- “Kanser Tedavisinde Solid Tümörlere Lenfatik Hedeflendirme Amacıyla LyP-1 İçeren İlaç Taşıyıcı Nanosistemlerin Tasarımı ve İn Vitro Değerlendirilmesi” Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projeleri Destekleme Programı (1001) (proje bursiyeri), TÜBİTAK Projesi, Başlama Tarihi: 15/03/2010, Bitiş Tarihi: 15/03/2012)
- “Kanser Tedavisinde Solid Tümörlere Lenfatik Hedeflendirme Amacıyla LyP-1 İçeren İlaç Taşıyıcı Nanosistemlerin Tasarımı ve İn Vitro Değerlendirilmesi” Hacettepe Üniversitesi BAB Hızlı Destek Projesi, 2011.

Sertifikalar:

- AAPS Annual Meeting and Exposition, Washington D.C., ABD, 23–27 Ekim 2011.
- Uluslararası Mikroenkapsülasyon Toplantısı, Kervansaray Otel ve Kongre Merkezi, Antalya, Türkiye , 11–14 Eylül 2011.
- FIP Pharmaceutical Sciences World Congress 2010 in association with the AAPS Annual Meeting and Exposition, New Orleans, LA, USA, 12–18 Kasım 2010.
- 8. GPEN Toplantısı (Global Pharmaceutic Education Network), North Carolina Üniversitesi, Chapel Hill, NC, USA, 10–12 Kasım 2010.
- 15 . Uluslararası Farmasötik Teknoloji Sempozyumu (IPTS, International Pharmaceutical Technology Symposium), Kervansaray Otel ve Kongre Merkezi, Antalya, Türkiye , 13–15 Eylül 2010.
- Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 3. Lisansüstü Öğrenci Sempozyumu , Ankara, Türkiye, 8 Aralık 2010.
- Nanofarmasötikler: Gelişme ve Uygulamaları , Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Ankara, Türkiye, 20 Kasım 2009.
- Ulusal Kanser Haftası Toplantısı, T.C. Sağlık Bakanlığı, Swiss Otel, Ankara, 01–02 Nisan 2009.
- Farmasötik Endüstri’de Patent (Patent in Pharmaceutical Industry), Dedeman Otel, Ankara, Türkiye, 26–27 Mart 2009.
- Doku Mühendisliği Uygulamalarında Biyomateryal ve Doku Uyumu, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara, Türkiye, 27 Mart 2009.
- ÜDS (Üniversitelerarası Yabancı Dil Sınavı, Mart, 2008) : 82, 5 (İngilizce)

Ödüller:

- Travelship Ödülü, International Pharmaceutical Federation (FIP) to attend the FIP Pharmaceutical Sciences World Congress 2010 in association with the AAPS Annual Meeting and Exposition, New Orleans, LA, ABD, 12–18 Kasım 2010.

Yayınlar:

- R. Neslihan Gürsoy, Özge Çevik, Kendiliğinden Emülsifiye Olabilen İlaç Taşıyıcı Sistemler ve Farmasötik Alanda Uygulamaları' Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi, 2012, Sayı 1.
- Özge Çevik, Uğur Aydın, R. Neslihan Gürsoy, 'Kanser Tedavisinde Lenfatik Hedeflendirme, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, 2011, Sayı 2.
- Özge Çevik, R. Neslihan Gürsoy, Analytical Method Development and Validation for the Anticancer Peptide, Lyp-1, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, 2011, Sayı 2.
- O. Cevik, N. Gursoy, Design and Characterization of Tumor Specific Lyp-1 Peptide-Containing SMEDDS for the Lymphatic Targeting of Solid Tumors in Cancer Therapy. The AAPS Journal. 2010; 12(S2). Available from: http://www.aapsj.org/abstracts/AM_2010/W5282.pdf
- O. Cevik, N. Gursoy, Design and Characterization of Tumor Specific Lyp-1 Peptide-Containing SMEDDS for the Lymphatic Targeting of Solid Tumors in Cancer Therapy. The AAPS Journal. 2010; 12(S3). Available from: http://www.aapsj.org/abstracts/AM_2010/W5282.pdf
- O. Cevik, N. Gursoy, Stability Assessment of the Tumor Spesific Lyp-1 Peptide at Different pH and in the NewlyDeveloped Self-Microemulsifying Drug Delivery Systems (SMEDDS) The AAPS Journal. 2011; 13(S2). Available from: http://www.aapsj.org/abstracts/AM_2011/T3106.pdf

Patent:

- Kanser Tedavisinde Kullanılmak Üzere Yağ Bazlı Nanotaşıyıcı Sistemler, Patent Başvurusu (TPE, Türk Patent Enstitüsü, No: 2011/11743).

