

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İMMÜNOKEMOTERAPÖTİK NANOPLEKSLERİN KOLON
KANSERİ TEDAVİSİNDE ETKİNLİK VE GÜVENLİLİĞİNİN İN
VİTRO-İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ecz. Safiye AKKIN

**Farmasötik Teknoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA
2022**

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İMMÜNOKEMOTERAPÖTİK NANOPLEKSLERİN KOLON
KANSERİ TEDAVİSİNDE ETKİNLİK VE GÜVENLİLİĞİNİN İN
VİTRO-İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ecz. Safiye AKKIN

Farmasötik Teknoloji Programı

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Erem BİLENSOY

ANKARA

2022

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İMMÜNOKEMOTERAPÖTİK NANOPLEKSLERİN KOLON KANSERİ
TEDAVİSİNDE ETKİNLİK VE GÜVENLİLİĞİNİN İN VİTRO-İN VİVO
DEĞERLENDİRİLMESİ

Ecz. Safiye AKKIN

Danışman: Prof. Dr. Erem BİLENSOY

Bu tez çalışması 21.09.2022 tarihinde jürimiz tarafından “Farmasötik Teknoloji Programı”nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Nevin Çelebi
(Başkent Üniversitesi)

Üye: Prof. Dr. İmran Vural
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: Prof. Dr. Petek Korkusuz
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: Prof. Dr. Betül Arıca Yegin
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: Prof. Dr. Zeynep Şafak Teksin
(Gazi Üniversitesi)

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

10 Ekim 2022

Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN
(Enstitü Müdürü)

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

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

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

10 /10/2022

(İmza)

Safiye AKKIN

i

1“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

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

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

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

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

ETİK BEYAN

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

Ecz. Safiye AKKIN

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca tüm bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, karşılaştığımız her zorlukta tüm imkanlarını seferber ederek sabır gösteren, sonsuz ilham veren ve motive eden saygıdeğer hocam **Prof. Dr. Erem BİLENSOY**'a,

Tez çalışmalarım süresince gösterdikleri destek ve katkılarından dolayı tez izleme komitesi jüri üyeleri değerli hocalarım **Prof. Dr. Petek KORKUSUZ** ve **Prof. Dr. Zeynep Şafak TEKSİN**'e,

Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanlığı'na tez çalışmalarım sırasında her türlü imkânı sağlayan tüm değerli öğretim üyesi/elemanı hocalarına, öğrencilerine ve personeline,

Birlikte yaptığımız çalışmalar sırasında gösterdikleri her türlü destek ve yardımları için **Prof. Dr. Petek KORKUSUZ**, **Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI**, **Prof. Dr. Murat ŞEN**, **Prof. Dr. Ayşe ERCAN**, **Dr. Öğr. Üyesi Elif BİLGİÇ**, **Öğr. Gör. Dr. Davut AKSÜT**, **Uzm. Biyolog Sibel GÖKŞEN**, **Biyolog Anıl IŞIK**'a,

Doktora çalışmalarım sürecinde ihtiyaç duyduğum her an yanımda olarak destek ve yardımlarını esirgemeyen başta **Dr. Öğr. Üyesi Nazlı ERDOĞDU**, **Öğr. Gör. Dr. Cem VARAN**, **Dr. Öğr. Üyesi Gamze VARAN**, **Dr. Sedat ÜNAL** ve **Ecz. Nurbanu DEMİRTÜRK** olmak üzere **BilensoyLAB** üyelerine,

Manevi ve fikri destekleri için **Dr. Ecz. Ayşe GENÇER**'e,

Tez çalışmalarım için bir mesai günü izin veren **Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu Ruhsatlandırma Dairesi**'ne,

Tüm hayatımda olduğu gibi eğitim hayatımda da her an yanımda olan, bana güvenerek bugüne ulaşabilmemde maddi ve manevi tüm desteklerini sunan **AKKIN** ailesine,

Eğitim hayatıma yıllardır destek veren dayım **Jeo. Müh. Hamit KARASU**'ya,

Eğitim hayatım boyunca aldığım maddi desteklerde her bir ferdinin katkısı bulunan **Türkiye Cumhuriyeti yurttaşlarına**,

Sonsuz Saygı, Sevgi ve Teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez çalışmalarım başlangıcında sağladıkları destek için **YÖK 100/2000 Doktora Projesi**'ne, sonrasında ise sağladıkları destek için **TÜBİTAK BİDEB 2211-C Yurtiçi Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı**'na teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tez çalışmalarım **TÜBİTAK ARDEB 1001 Projesi (217S610)** ile desteklenmiştir.

ÖZET

Akkin S., İmmünokemoterapötik Nanoplekslerin Kolon Kanseri Tedavisinde Etkinlik ve Güvenliliğinin *in vitro/in vivo* Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Teknoloji Doktora Tezi, Ankara, 2022. Kolon kanseri tedavisinde cerrahiden sonra en sık kullanılan yöntem kemoterapidir. Ancak kanser hücreleri, hayatta kalmak için immün sistem hücrelerinin tanıma mekanizmasından kaçmakta ve farklılaşma yetenekleri ile kemoterapötiklere karşı direnç geliştirmektedirler. Bu nedenle, kemoterapinin yanı sıra immünoterapinin de kullanılmasının tedavinin etkinliğini artırabileceği bilinmektedir. Nanopleksler, zıt yüklerin etkileşimine dayalı oluşan nano boyutlu sistemlerdir ve bu çalışmada nanopleks yapısını oluşturmak için siklodekstrin (CD) polimeri, 5-Florourasil (5-FU) ve İnterlökin-2 (IL-2) kullanılmıştır. Nanoplekslerin ortalama partikül büyüklükleri ve dağılımı, yüzey yükü tayini, ilaç yükleme etkinliği, her iki etkin madde için farklı ortamlarda salım profili belirleme ve çeşitli stabilite çalışmaları yapılmıştır. Konvansiyonel hücre kültürü çalışmalarında CD polimerlerin güvenliliği hücre proliferasyonuna etkisi ile belirlenmiştir. Ardından ilaç yüklü nanoplekslerin etkinlikleri 2-boyutlu hücre kültürü ve gerçek zamanlı hücre canlılığı analizi ile belirlenmiştir. 3-boyutlu hücre kültürü çalışmaları ile nanoplekslerin etkinliği hücre canlılığı, immünohistokimyasal inceleme ve elektron mikroskobu incelemesi ile belirlenmiştir. Yapılan *in vivo* çalışmalarla ise CD polimerlerin güvenlilikleri sağlıklı farelerde tek doz intravenöz (i.v.) uygulama sonrası alınan kan örnekleri ile belirlenmiştir. Son olarak, tümör indüklenen farelerde, nanoplekslerin antitümöral etkinlikleri hayatta kalma oranı, metastaz ve immün cevap açısından belirlenmiştir. Çalışmaların sonucunda, IL-2 ve 5-FU'yu birlikte taşıyan nanopleksler hazırlanmış ve parenteral yoldan kolorektal immünokemoterapi açısından umut vaat eden bir model ilaç taşıyıcı sistem ortaya konmuştur.

Anahtar kelimeler: immünokemoterapi, kolon kanseri, kombine ilaç taşınımı, nanopleks, siklodekstrin

Tez TÜBİTAK tarafından 217S610 numaralı proje ve 2211-C Doktora Burs Programı ile desteklenmiştir.

ABSTRACT

Akkin S., *In vitro-in vivo* Evaluation of Immunochemotherapeutic Nanoplexes Efficacy and Safety for the Treatment of Colon Cancer, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Pharmaceutical Technology Doctor of Philosophy Thesis, Ankara 2022. Chemotherapy is the most commonly used method after surgery in the treatment of colon cancer. However, cancer cells escape the recognition mechanism of immune system cells in to survive, developing resistance to chemotherapeutics with their differentiation abilities. Therefore, it is believed that the use of immunotherapy in combination with chemotherapy can increase the effectiveness of the treatment. Nanoplexes were formed based on opposite charge interaction of macromolecules as the nanocarrier system in this study and cyclodextrin (CD) polymer, 5-Fluorouracil (5-FU) and Interleukin-2 (IL-2) were used to obtain nanoplexes. Mean particle size, particle size distribution, surface charge, drug loading capacity, drug release profile and stability of nanoplexes were analysed. Safety of CD polymers was determined with cell culture. Then, the anticancer activities of the drug-loaded nanoplexes were determined by 2-dimensional cell culture and real-time cell viability. With 3-dimensional tumor culture studies that can reflect the microenvironment of the tumor *in vitro*, the efficiency of nanoplexes was determined by cell viability, immunohistochemical examination and electron microscopy examination. The *in vivo* safety of CD polymers was determined by blood samples obtained after a single dose intravenous (i.v.) administration in healthy mice. Finally, in tumor-induced mice, the antitumoral activities of nanoplexes were determined in terms of survival rate, metastasis and immune response parameters. As a result of the studies, nanoplexes carrying IL-2 and 5-FU together were prepared and a promising model drug delivery system was presented for future applications of parenteral colorectal immunochemotherapy.

Keywords: immunochemotherapy, colon cancer, combined drug delivery, nanoplex, cyclodextrin

The thesis was supported by TUBITAK with project number 217S610 and 2211-C PhD Scholarship Program.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	ix
ÖZET	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
ŞEKİLLER	xvii
TABLolar	xxi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Kanser	5
2.2. Tümör Mikroçevresi ve Tümörde İmmün Mikroçevre	5
2.3. Kolon Kanseri	7
2.3.1. Kolon Kanseri Tanısı	8
2.3.2. Kolon Kanseri Tedavisi	9
2.4. 5-Florourasil	10
2.5. İmmün Sistem ve Kanser	15
2.6. Kanserde İmmünoterapi	21
2.6.1. Antikor Tedavisi	21
2.6.2. Aşı Terapisi	22
2.6.3. İmmün Düzenleyiciler	22
2.6.4. Adoptif Hücresel Terapi	23
2.7. İnterlökin-2	24
2.8. Siklodekstrin	28
2.8.1. Siklodektrin Polimerleri	31
2.8.2. Siklodekstrinlerin Kanserde Kullanımı	35
2.9. Nanoteknolojinin Tıpta Uygulanması Yaklaşımlarından Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler	37
3. GEREÇ VE YÖNTEM	44
3.1. Gereç	44
3.1.1. İlaç Etkin Madde, Polimerler ve Kimyasal Maddeler	44
3.1.2. Hücre Kültürü Malzemeleri	45

3.1.3. Hayvan Deneyi Malzemeleri	47
3.2. Cihazlar	48
3.3. Yöntem	50
3.3.1. Siklodekstrin Polimerlerin Sentezlenmesi, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu	50
3.3.2. 5-FU ve IL-2 Yüklü CD Nanoplekslerin Hazırlanması	54
3.3.3. 5-FU ve IL-2 Yüklü Siklodekstrin Nanoplekslerin Karakterizasyonu	58
a. Partikül Büyüklüğü Dağılımı ve Yüzey Yüğü Tayini	58
b. Morfolojik Özelliklerin Belirlenmesi	58
c. FT-IR ve DSC Analizi	59
d. CD Polimer ve IL-2 Konsantrasyonunun Belirlenmesi	59
e. 5-FU ve IL-2 Yüklü CD Nanoplekslerin Kısa Süreli Stabilite Çalışması	60
f. IL-2'nin Biyolojik Aktivitesinin Belirlenmesi	61
g. Nanopleks Yapısındaki IL-2'nin Yapısal Bütünlüğünün Belirlenmesi	62
h. 5-FU'nun Miktar Tayini Analiz Yöntemi ve Validasyonu	63
ı. IL-2'nin Miktar Tayininin Analitik Yöntemi ve Validasyonu	65
i. Yükleme Etkinliğinin Belirlenmesi	66
j. <i>In vitro</i> İlaç Salım Çalışmaları	67
3.3.4. Hücre Kültürü Çalışmaları	68
a. Güvenlilik Çalışması	68
b. Antikanser Etkinlik Çalışması	69
c. Hücre Proliferasyonu ve Gerçek Zamanlı Hücre Canlılığı Analizi	69
d. 3B <i>In Vitro</i> Tümör Modeli	70
e. Hücrelerde İmmünohistokimyasal İnceleme	71
f. Sferoidlerin Plastik Bloklarda Işık Mikroskobu ile İncelenmesi	71
g. Kanseri Nodüllerinde <i>In Vitro</i> Olarak TUNEL ile Apoptoz Tayini	72
3.3.5. <i>In vivo</i> Antitümöral Çalışmalar ve Dokularda Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Yanıtın Belirlenmesi	73
a. Güvenlilik Çalışması	73
b. Antitümör Etkinlik Çalışması	73
c. <i>In Vivo</i> Tümör Modelinden Alınan Örneklerin Histopatolojik İncelenmesi	75
3.3.6. İstatistiksel Analiz	75
4. BULGULAR	76
4.1. Siklodekstrin Polimerlerin Sentezlenmesi, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu	76
4.2. 5-FU ve IL-2 Yüklü CD Nanoplekslerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu	86
4.2.1. Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı ile Yüzey Yüğü Tayini	86

4.2.2. Morfolojik Özelliklerin Belirlenmesi	92
4.2.3. FTIR ve DSC Analizi	96
4.2.4. CD Polimer ve IL-2 Konsantrasyonunun Belirlenmesi	100
4.2.5. 5-FU ve IL-2 Yüklü CD Nanoplekslerin Kısa Süreli Stabilitate Çalışması	102
4.2.6. IL-2'nin Biyolojik Aktivitesinin Belirlenmesi	104
4.2.7. Nanopleks Yapısındaki IL-2'nin Yapısal Bütünlüğünün Belirlenmesi	106
4.2.8. 5-FU'nun Miktar Tayini Analiz Yöntemi ve Validasyonu	107
Doğrusallık/Kalibrasyon	108
Doğruluk	109
Kesinlik	109
Duyarlılık	112
Özgüllük	112
4.2.9. IL-2'nin Miktar Tayini Analiz Yöntemi ve Validasyonu	114
4.2.10. Yükleme Etkinliğinin Belirlenmesi	114
4.2.11. <i>In vitro</i> İlaç Salım Çalışmaları	115
4.3. Hücre Kültürü Çalışmaları	119
4.3.1. Güvenlilik Çalışması	119
4.3.2. Antikanser Etkinlik Çalışması	123
4.3.3. Hücre Proliferasyonu ve Gerçek Zamanlı Hücre Canlılığı Analizi	125
4.3.4. 3B <i>In Vitro</i> Tümör Modeli	128
4.3.5. Hücrelerde İmmünoSitokimyasal İnceleme	132
4.3.6. Sferoidlerin Plastik Bloklarda Işık Mikroskobu ile İncelenmesi	133
4.3.7. Kanser Nodüllerinde <i>In Vitro</i> Olarak TUNEL ile Apoptoz Tayini	134
4.4. <i>In vivo</i> Antitümöral Çalışmalar ve Dokularda Histopatolojik ve İmmünolojik Yanıtın Belirlenmesi	136
4.4.1. Güvenlilik Çalışması	136
4.4.2. Antitümör Etkinlik Çalışması	136
4.4.3. <i>In Vivo</i> Ortama Uygulanmış Kanser Nodüllerinin Histopatolojik İncelemesi	147
5. TARTIŞMA	151
5.1. 5-FU ve IL-2 Yüklü CD Nanoplekslerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu	151
5.1.1. Partikül Büyüklüğü Dağılımı ile Yüzey Yüğü Tayini	152
5.1.2. Morfolojik Özelliklerin Belirlenmesi	155
5.1.3. FTIR ve DSC Analizi	156
5.1.4. CD Polimer ve IL-2 Konsantrasyonunun Belirlenmesi	156
5.1.5. 5-FU ve IL-2 Yüklü CD Nanoplekslerin Kısa Süreli Stabilitate Çalışması	157

5.1.6. Nanopleks Yapısındaki IL-2'nin Biyolojik Aktivitesinin ve Yapısal Bütünlüğünün Belirlenmesi	158
5.1.7. Yükleme Etkinliğinin Belirlenmesi	158
5.1.8. <i>In vitro</i> İlaç Salım Çalışmaları	160
5.2. Hücre Kültürü Çalışmaları	161
5.2.1. Güvenlilik Çalışması	161
5.2.2. Antikanser Etkinlik Çalışması	161
5.2.3. Hücre Proliferasyonu ve Gerçek Zamanlı Hücre Canlılığı Analizi	163
5.2.4. 3B <i>In Vitro</i> Tümör Modeli	163
5.2.5. Hücrelerde İmmünohistokimyasal İnceleme	164
5.2.6. Kanser Nodüllerinde <i>In Vitro</i> Olarak TUNEL ile Apoptoz Tayini	165
5.3. <i>In vivo</i> Antitümöral Çalışmalar ve Dokularda Histopatolojik ve İmmünolojik Yanıtın Belirlenmesi	165
5.3.1. Güvenlilik Çalışması	165
5.3.2. Antitümör Etkinlik Çalışması	166
5.3.3. <i>In Vivo</i> Ortama Uygulanmış Kanser Nodüllerinin Histopatolojik İncelemesi	170
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	171
7. KAYNAKLAR	175
8. EKLER	
EK-1 Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni	
EK-2 Orijinallik Raporu Örneği	
EK-3 Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası	
EK-4 TEZ KAPSAMINDA ÜRETİLEN YAYINLAR-1	
EK-5 TEZ KAPSAMINDA ÜRETİLEN YAYINLAR- 2	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

SS	Standart sapma
Å	Angström
cm	Santimetre
dk	Dakika
kDa	Kilodalton
mg	Miligram
mL	Mililitre
n	Örnekleme sayısı
nm	Nanometre
nM	Nanomolar
°C	Santigrat derece
pg	Pikogram
µg	Mikrogram
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
µL	Mikrolitre
rpm	Dakikadaki devir sayısı
r ²	Korelasyon katsayısı
2B	2 boyutlu
3B	3 boyutlu
5-FU	5-Florourasil
6OCaproylCD	Heptakis (6-O-heksanoil) siklomaltoheptoz
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ADCC	Antikor bağımlı hücresel sitotoksiste
Alm.	Almanya
ALT	Alanin transferaz
ASH	Antijen sunan hücre

AST	Aspartat transaminaz
ATMPs	İleri Tedavi Tıbbi Ürünü
ATP	Adenozin trifosfat
BCS	Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi
CAPIRI	Kapesitabin ve irinotekanın birlikte kullanıldığı tedavi biçimi
CAPOX	Kapesitabin ve oksaliplatinin birlikte kullanıldığı tedavi biçimi
CAR	Kimerik antijen reseptörü
CD	Siklodekstrin
CD (imm.)	İmmün sistem hücrelerinin farklılaşma kümesi'ne göre isimlendirilen hücre yüzey molekülü
CMF	Koloni uyarıcı faktör
CO ₂	Karbondioksit
CTLA-4	Sitotoksik T-lenfosit ilişkili protein-4
DEPT	Polarizasyon Transferi ile Bozunumsuz Geliştirme
DLS	Dinamik Işık Saçılımı
DMEM	Dulbecco's Modifiye Eagle's Besi yeri
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetri
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EGF(R)	Epidermal büyüme faktörü (reseptörü)
ELISA	Enzim-bağlı immünosorbent deneyi
EMA	Avrupa İlaç Ajansı
EP	Avrupa Farmakopesi
FBS	Fetal sığır serumu
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FOLFIRI	5-Florourasil, lökovorin ve irinotekanın birlikte kullanıldığı tedavi biçimi
FOLFOX	Folinik asit, 5-Florourasil ve oksaliplatinin birlikte kullanıldığı tedavi biçimi
FT-IR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi

HBV	Hepatit B virüsü
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
HPV	İnsan papilloma virüsü
HSQC	Heteronükleer tek kuantum tutarlılık spektroskopisi
GRAS	Genellikle güvenli kabul edilir
IC ₅₀	Yarı-maksimum inhibisyon konsantrasyonu
ICI (ICB)	İmmün kontrol noktası inhibitörleri/blokörleri
IL-2	İnterlökin-2
IFN	İnterferon
LDH	Laktat dehidrogenaz
LOD	Saptama sınırı
LOQ	Tayin edilebilirlik sınırı
LV	Lökovorin
MHC	Majör histokompatibilite kompleksi
MDSC	Miyeloid-kökenli baskılayıcı hücreler (MKBH)
MLN	Mezenterik lenf nodu
NK	Natural Killer (Doğal öldürücü hücreler)
NMR	Nükleer manyetik rezonans
NTA	Nanopartikül İzleme Analizi
PDI	Polidispersite indeksi
PD-1	Programlanmış hücre ölüm proteini-1
PDL-1	Programlanmış ölüm ligandı-1
PB	Partikül büyüklüğü
PBS	Fosfat tamponu çözeltisi
PC β CDC6	Polikasyonik amfifilik CD
PLA	Polil-aktik asit
PLGA	Poli-(laktik-ko-glikolik asit)
Poli(HEMA)	Poli(2-hidroksietil metakrilat)
RNA	Ribonükleik asit

RTCA	Gerçek Zamanlı Hücre Analizi
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid jel Elektroforez
ScoF	Simüle kolon sıvısı
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SGF	Simüle mide sıvısı
SIF	Simüle intestinal sıvı
STPP	Sodyum tripolifosfat
TAA	Tümör ilişkili antijen
TAM	Tümör ilişkili makrofaj
TCR	T hücresi reseptörü
TGF	Transforme edici büyüme faktörü
TIL	Tümör infiltre lenfositler
TLR	Toll benzeri reseptör
TNF	Tümör nekroz faktör
TUNEL	Terminal deoksinükleotidil transferaz
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu
U	Ünite
UK	Birleşik Krallık
USP	Amerikan Farmakopesi
VEGF(R)	Vasküler endotelyal büyüme faktörü (reseptörü)
VK	Varyasyon katsayısı
ZP	Zeta potansiyel
X	Ortalama
WST-1	Suda çözünür tetrazolyum tozu

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2. 1. Tümör mikroçevresi ve tümör immün mikroçevresi.	6
2. 2. Kolonun anatomik yapısı.	7
2. 3. 5-Fluorourasil'in kimyasal yapısı.	11
2. 4. İmmün sistem bileşenleri.	16
2. 5. Kanser immünite döngüsü.	18
2. 6. Warburg Etkisi.	20
2. 7. Adoptif hücresel terapi yaklaşım örnekleri.	24
2. 8. CD polimer yapısı.	32
2. 9. Proton sünger etkisi ve endozomal kaçış	35
3. 1. CD2 (QA(BCD)PS.HCl) türevinin sentez basamakları. (OK, oda koşulları altında sentezin gerçekleştirildiğini göstermektedir.)	51
3. 2. CD7 türevinin sentez aşamaları.	52
3. 3. CD8 polimerinin sentez aşamaları.	53
3. 4. Tez kapsamında hazırlanması hedeflenen 5-FU ve IL-2 yüklü CD nanopleksin şematik gösterimi.	57
4.1. CD2 polimerine ait ¹ H-NMR bulguları (D ₂ O, 298 K, 600 MHz).	79
4.2. CD2 polimerinin DEPT tarafından düzenlenmiş HSQC spektrumu (a) (D ₂ O, 298 K, 600 MHz). Spektrumun genişletilmiş hali (b).	80
4. 3. CD7'nin ¹ H-NMR spektrumu (D ₂ O, 298 K, 600 MHz).	81
4.4. CD7 polimerine ait DEPT tarafından düzenlenmiş HSQC spektrumu (a) (D ₂ O, 298 K, 600 MHz). Spektrumun genişletilmiş hali (b).	82
4.5. CD8 polimerine ait ¹ H-NMR spektrumu (D ₂ O, 298 K, 600 MHz).	84
4.6. CD8 polimerine ait DEPT tarafından düzenlenmiş HSQC spektrumu (a) (D ₂ O, 298 K, 600 MHz). Spektrumun genişletilmiş hali (b).	85
4.7. Nanoplekslerin NTA analizi ile partikül büyüklüğü sonuçları.	92
4.8. 5-FU ve IL-2 yüklü CD2 nanoplekslerin SEM görüntüsü (Ölçek: 500 nm).	93
4.9. 5-FU ve IL-2 yüklü CD7 nanoplekslerin SEM görüntüsü (Ölçek: 500 nm, 2 µm).	94
4.10. 5-FU ve IL-2 yüklü CD8 nanoplekslerin SEM görüntüsü (Ölçek: 5 µm, 20 µm).	95

4.11.	5-FU, CD polimerleri ve CD2 (a), CD7 (b) ve CD8 (c) için 5FU/IL2/CD nanoplekslerinin FTIR spektrumları. Spektrumlar 400 ve 4000 cm^{-1} dalga boyları aralığında elde edilmiştir.	97
4.12.	5-FU, CD polimerleri ve 5FU/IL2/CD nanoplekslerinin DSC termogramları. Termogramlar 10°C/dk artırılarak elde edilmiştir.	99
4.13.	Splenositlerde farklı polimer konsantrasyonlarının hücre canlılığı üzerine etkileri (n=3, $\pm$ SS).	100
4.14.	Splenositlerde farklı IL-2 konsantrasyonlarının hücre çoğalması üzerine etkileri (n=3, $\pm$ SS).	101
4.15.	Splenosit hücre canlılığına CD polimerlerin ve tek başına IL-2 ile CD nanoplekslerden salınan IL-2'nin doz bağımlı etkisi; CD2 polimeri (A), CD7 polimeri (B), CD8 polimeri (C).	105
4.16.	5-FU ve IL-2 yüklü CD nanoplekslerindeki IL-2'nin yapısal bütünlüğünü belirlemek için doğal koşullar altında SDS-PAGE analizi sonuçları. Jele beş çözelti yüklenmiştir; Hat M, Precision Plus Çift Renkli moleküler ağırlık işaretçisi; Hat 1, IL-2 standardı; Hat 2, CD2 nanopleksi; Hat 3, CD7 nanopleksi; Hat 4, CD8 nanopleksi.	107
4.17.	5-Fluorourasile ait HPLC kromatogramı.	108
4.18.	5-Fluorourasile ait kalibrasyon doğrusu ve denklemi.	108
4.19.	CD polimerlerin tek başlarına ve 5-FU ile birlikte mobil fazdaki kromatogramları.	112
4.20.	5-FU ve IL-2 yüklü CD nanoplekslerden PBS (pH=7.4) ortamında zamana karşı 5-FU'nun % kümülatif salım grafiği (n=3, $\pm$ SS). * ile işaretli grafikte ilk iki saate ait veri sunulmaktadır.	116
4.21.	5-FU ve IL-2 yüklü CD nanoplekslerden simüle sıvılarda-açlık zamana karşı 5-FU'nun % kümülatif salım grafiği (n=3, $\pm$ SS).	117
4.22.	5-FU ve IL-2 yüklü CD nanoplekslerden simüle sıvılarda-tokluk zamana karşı 5-FU'nun % kümülatif salım grafiği (n=3, $\pm$ SS).	117
4.23.	5-FU ve IL-2 yüklü CD nanoplekslerden PBS (pH=7.4) ortamında zamana karşı IL-2'nin % kümülatif salım grafiği (n=3, $\pm$ SS).	118
4.24.	5-FU ve IL-2 yüklü CD nanoplekslerden simüle sıvıda zamana karşı IL-2'nin % kümülatif salım grafiği (n=3, $\pm$ SS).	119
4.25.	CD polimerlerinin L929 hücrelerinde konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığına etkisi; CD2 (A), CD7 (B), CD8 (C). (n=3, $\pm$ SS)	120
4.26.	Farklı konsantrasyonlarda CD polimerlerinin L929 hücrelerindeki LDH aktivitesi; CD2 (A), CD7 (B) ve CD8 (C). Kültür ortamı ile muamele edilen hücreler Kontrol grubunu oluşturmaktadır. %1 (h/h) Triton-X uygulanan grup ise pozitif kontrol grubudur (n=3, $\pm$ SS).	122
4.27.	Hazırlanan nanopleksler ile polimer ve ilaç çözeltilerinin 24 (a) ve 48 (b) saat sonunda CT26 hücrelerinde antikanser etkinliği (n=3, $\pm$ SS). *p<0,05; 5-FU+IL-2 ile inkübe edilen gruba göre.	124

- 4.28. CT26 hücrelerine ait deney sonundaki analizin normalize hücre indeksi grafiği. 125
- 4.29. CT26 hücrelerine ait polimer gruplarına göre 24., 48. ve 72. saat hücre indeksi grafikleri; CD2 (a), CD7 (b), CD8 (c). 126
- 4.30. CT26 hücrelerine ait nanopleks gruplarını içeren hücre indeksi grafiği. 127
- 4.31. CT26 hücrelerine ait duplikasyon zamanı grafiği (* $p < 0,05$, 5FU ve 5FU+IL2 çözeltisi uygulanan grupta karşılaştırıldığında). 127
- 4.32. CT26 fare kolon kanseri hücreleri ile oluşturulan 3B küresel tümörün mikroskopik görüntüsü. 128
- 4.33. 3B tümör modelinde nanopleks veya diğer tedavilerin uygulama öncesi ve uygulama sonrası 24., 48. ve 72. saate ait mikroskop görüntüleri. 129
- 4.34. 3B tümör modeline uygulanan tedavi sonrasında hücre canlılığı analiz sonuçları, CD2 (A), CD7 (B), CD8 (C) ($n=6 \pm SS$). (* $p < 0,05$ 5-FU çözeltisine göre aradaki farkın anlamlı olduğu grubu belirtir.) 132
- 4.35. CD44 ve IL-2 ile işaretlenen kolon kanseri sferoidlerine ait reprezentatif mikrograflar sunulmuştur. Kontrol grubunda, deney gruplarına göre CD44 ile yoğun işaretlenme dikkat çekmektedir. 5-FU çözeltisi ve 5-FU+IL-2 çözeltisi uygulanan gruplarda IL-2 ile floresan işaretlenme belirgindir. Çekirdek: DAPI x 1000. 133
- 4.36. Formülasyon ve kontrol grubuna ait sferoidlerden alınmış yarı ince kesit örneklerine ait reprezentatif mikrograflarda; kontrol grubundaki kolon kanseri epitel hücrelerinin çekirdek ve sitoplazma bütünlüğünü koruduğu gözlenirken, formülasyon uygulanan gruplardaki hücrelerin bütünlüklerini kaybederek (**) apoptoza gittiği (✓) gözlenmektedir. (Metilen mavisi Azur II ile boyama yapılmıştır.) 134
- 4.37. 5-FU ve IL-2 yüklü CD2 nanopleks (a), 5-FU ve IL-2 yüklü CD7 nanopleks (b), 5-FU ve IL-2 yüklü CD8 nanopleks (c), 5-FU çözeltisi (d), IL-2 çözeltisi ve DMEM (f) ile inkübe edilen 3B CT-26 sferoidlerde apoptozun belirlenmesi. Fluoresin konjuge d-UTP kullanılarak apoptotik hücrelerdeki DNA zincir kırıkları yeşil renk ile boyanmıştır. 135
- 4.38. *In vivo* tümör modeli oluşturma çalışma aşamaları. (Aşama 1) Anestezi altındaki hayvan cerrahi müdahaleye hazırlanmıştır. (Aşama 2) Hayvanda kesik açılarak çekum dışarı alınmıştır. (Aşama 3) Çekuma çizik atılmıştır. (Aşama 4) Hücreler uygulanmıştır. (Aşama 5) Sütürle cerrahi alan kapatılmıştır. (Aşama 6) Batikon uygulanarak cerrahi bölge sanite edilmiştir. 137
- 4.39. Tümör indüklenen hayvanlarda uygulanan tedaviler sonrasında ağırlığın (a), tümör boyutunun(b) ve sağ kalımın (c) zaman içerisindeki değişimi (* $p < 0,05$). 139

4.40.	Uygulanan tedavi süreci sonunda hayvanlardaki metastaz odağı sayıları (* $p<0,05$).	140
4.41.	Miyeloid (a) ve lenfosit (b) hücre analizi için yapılan kapılama stratejileri.	141
4.42.	Tedavi sonrasında dalak dokusundaki T hücrelerin oranları.	142
4.43.	Tedavi sonrasında dalak dokusundaki miyeloid hücre oranları.	143
4.44.	Tedavi sonrasında tümör dokusundaki T hücrelerin oranları.	144
4.45.	Tedavi sonrasında tümör dokusundaki miyeloid hücre oranları.	145
4.46.	Tedavi sonrasında lenf nodu dokusundaki T hücrelerin oranları.	146
4.47.	Serumdaki T lenfosit ilişkili sitokin düzey analizi.	147
4.48.	PBS, 5-FU çözeltisi, 5-FU+IL-2 çözeltisi, 5-FU yüklü CD7 nanopleks ve 5-FU ve IL-2 yüklü CD7 nanopleks formülasyonları uygulanan gruplarda, tümör dokusu (A, D, G, M), karaciğer (B, E, H, N) ve akciğer (C, F, I, O) mikrografları.	148
4.49.	PBS, 5-FU çözeltisi, 5-FU+IL-2 çözeltisi ve 5-FU ve IL-2 yüklü CD7 nanopleks formülasyonları uygulanan tedavi gruplarında primer tümör odakları (*) $p<0,05$.	149
4.50.	PBS, 5-FU çözeltisi, 5-FU+IL-2 çözeltisi ve 5-FU ve IL-2 yüklü CD7 nanopleks formülasyonları uygulanan tedavi gruplarında karaciğerdeki (a) ve akciğerdeki (b) metastatik alanlar (*) $p<0,05$.	150

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. Kolon kanser tedavisini hedefleyen 5-FU içeren nano boyutlu taşıyıcı sistem çalışmalarına literatür örnekleri.	15
2.2. Kanser tedavisinde immünoterapi yaklaşımları.	21
2.3. İnterleukin-2 taşıyan ve kanser tedavisini hedefleyen nanopartiküler sistemler ile ilgili literatür örnekleri.	26
2.4. EMA tarafından yayınlanan “Beşeri tıbbi ürünlerin etiketlenmesinde ve prospektüsünde yer alan yardımcı maddeler” rehberinde siklodekstrinler için sunulan bilgiler.	29
2.5. β -CD veya türevleri ile hazırlanmış ve kanser tedavisini hedefleyen 5-FU veya IL-2 içeren taşıyıcı sistemler ile ilgili literatürde yer alan çalışma örnekleri.	31
2.6. FDA tarafından onaylanmış ve piyasada bulunan nanopartikül temelli ilaçlar.	38
3.1. Tezde kullanılan etkin maddeler.	44
3.2. Tezde kullanılan polimerler.	44
3.3. Tezde kullanılan kimyasal maddeler.	44
3.4. Tezde kullanılan hücre hatları ve kaynakları.	45
3.5. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan kimyasal ve sarf malzemeler.	45
3.6. Hayvan deneyi çalışmalarında kullanılan kimyasal maddeler.	47
3.7. Tez kapsamında kullanılan cihazların isim ve modelleri.	48
3.8. CD polimerlerin kimyasal özellikleri. Ortalama süstitüsyon derecesi (SD^1); ortalama molekül ağırlığı (MA^2) (g/mol); çapraz bağlanma oranı (CBO^3) (mol epiklorohidrin /mol CD); katyonik yoğunluk (KY^4) verileri tabloda yer almaktadır.	53
4.1. Nanopleks yapıyı oluşturmak için kullanılan CD türev ve polimerlerin sudaki zeta potansiyel değerleri (mV) (n=3, $\pm SS$).	76
4.2. Tez kapsamında kullanılan CD polimerlerinin moleküler ve kimyasal yapıları.	78
4.3. Nanopleks yapısını oluşturmak için kullanılan ve negatif yüzey yüküne sahip maddelerin sudaki zeta potansiyel değerleri (mV) (n=3, $\pm SS$).	87
4.4. CD polimerleri ile STPP nanoplekslerinin partikül büyüklüğü dağılımı ve yüzey yükü değerleri (n=3, $\pm SS$).	88

4.5.	STPP ile hazırlanan nanoplekslerinin hacim arttırılması sonucu belirlenen partikül büyüklüğü ve dağılımı ile zeta potansiyel değerleri (n=3, $\pm$ SS).	89
4.6.	Farklı IL-2 miktarları ile hazırlanan CD nanopleks formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü (nm), PDI ve zeta potansiyel (mV) değerleri (n=3, $\pm$ SS).	89
4.7.	5-FU ve IL-2 yüklü CD nanoplekslerin partikül büyüklüğü dağılımı, yüzey yükü ve pH değerleri (n=3, $\pm$ SS).	90
4.8.	5-FU ve IL-2 yüklü CD nanoplekslerin liyofilizasyon öncesi ve sonrası partikül büyüklüğü dağılımı ve yüzey yükü değerleri (n=3, $\pm$ SS) (*t-test, $p<0,05$ liyofilizasyon öncesi sonuçlarına göre) (Koyu karakter ile yazılan sonuç, istatistiksel farkın tespit edildiği sonuçtur).	91
4.9.	5-FU ve IL-2 yüklü CD nanoplekslerin partikül büyüklüğü ile dağılımı ve zeta potansiyel değerleri (n=3, $\pm$ SS).	102
4.10.	5-FU ve IL-2 yüklü CD nanoplekslerin farklı simüle sıvılarda stabilite çalışması sonucu elde edilen partikül büyüklüğü dağılımı-nm (a) ile zeta potansiyel-mV (b) değerleri (n=3, $\pm$ SS) (* $p<0,05$ Başlangıç (baş.) değerine göre istatistiksel farkı belirtir) (Koyu yazılanlar istatistiksel olarak farkın anlamlı olduğunu belirtir).	103
4.11.	5-Florourasilin doğruluk değerleri ve varyasyon katsayıları (n=6).	109
4.12.	5-Florourasile ait tekrar edebilirlik ve tekrar elde edilebilirlik değerleri ve varyasyon katsayıları.	110
4.13.	Mobil faz ile hazırlanan 5-Florourasile ait günler arası farklılık değerleri.	110
4.14.	Ultra saf su ile hazırlanan 5-Florourasile ait günler arası farklılık değerleri.	111
4.15.	5-Florourasile ait gün içi farklılık değerleri ve varyasyon katsayıları.	111
4.16.	Nanoplekslere ait 5-FU % yükleme etkinliği (%YE) değerleri (n=3, $\pm$ SS).	114
4.17.	Nanoplekslere ait IL-2 % yükleme etkinliği (%YE) değerleri (n=3, $\pm$ SS).	115
4.18.	5-Flurourasilin fare ve insan kolon karsinoma hücrelerindeki IC ₅₀ değerleri (n=3, $\pm$ SS).	123
4.19.	Sağlıklı hayvanlara farklı polimerin i.v. uygulamalarının ardından toplanan serumlardan bakılan toksisite sonuçları (n=5, $\pm$ SS).	136

1. GİRİŞ

Kolon kanseri tüm dünyada olduğu gibi Türkiye’de de en sık görülen üçüncü kanser tipidir. Kanser hücreleri hayatta kalabilmek için vücudun savunma sisteminde değişikliklere yol açarak immün sistemin normal çalışma düzeninde farklılıklara neden olmaktadır. Bu yüzden kanser hücreleri hem kemoterapötik ajanlara direnç geliştirerek tedavinin etkinliğini azaltmakta hem de bağışıklık sisteminden kurtulmaktadır. Bu nedenle kanser tedavisinde immünoterapinin kemoterapi ile kombine kullanımı umut verici bir yaklaşım olarak son yıllarda dikkat çekmektedir.

Bu tez çalışmasında araştırma hipotezimiz; kolorektal kanser tedavisinde kemoterapötik küçük molekül ile immünoterapötik makromolekülü bir arada taşıyabilen nanopleks formunda taşıyıcılarla antümöral ve antimetastatik etkinliğin önce *in vitro* sonra da *in vivo* olarak arttırılabileceğidir. *In vivoda* hedefimiz etkinlik ve güvenliliği fare modelinde göstermektedir.

Bu tez kapsamında kolon kanseri tedavisine yönelik etkin molekül olarak 5-FU ve IL-2 yüklü CD nanoplekslerin hazırlanması ve etkinliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaların ilk adımı; 5-FU konjuge edilmiş katyonik CD polimerlerin sentezlenmesidir. Bu adımda Danimarka Aalborg Üniversitesi’nden Dr. Thorbjorn T. Nielsen tarafından, iki farklı 5-FU konjuge CD polimer başarıyla sentezlenmiştir. Ancak bu türevlerden elde edilen nanoplekslerin kritik kalite parametrelerinin (ortalama partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi, yüzey yükü değerleri) istenilen düzeyde olmaması sebebi ile; tez çalışmasında farklı CD polimerleri ve alternatif türevlerle çalışma ve 5-FU’yu kimyasal olarak konjuge etmeden nanoplekse yükleme ihtiyacı doğmuştur. Bu kapsamda, ticari piyasa preparatları ve eksipyanları da bulunan, farklı CD türevlerinin sentezi ve saflaştırılması üzerine çalışan CycloLab (CycloLab, Cyclodextrin R&D Ltd., Macaristan) (<https://cyclolab.hu>) ile bilimsel iş birliği başlatılmıştır. Bu iş birliği çerçevesinde Dr. Milo Malanga 8 farklı CD türevini sentezlemiştir. Sentezlenen bu 8 farklı türevin 3 tanesi polimer, 5 tanesi ise monomer yapıdadır. Tüm türevlere ait sentez yöntemi ve karakterizasyon çalışmaları CycloLab tarafından gerçekleştirilmiştir.

Etkin maddeler ile çalışmaya başlamadan önce sentezlenen CD polimerlerin nanopleks oluşturma etkinliklerini belirlemek ve en uygun CD polimeri seçmek amacıyla ön formülasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ön formülasyon

çalışmalarında maliyeti azaltmak ve alımı yapılan yüksek maliyetli IL-2'yi ekonomik kullanabilmek adına, daha önce kitosan nanopartiküllerin yük etkileşimi ile hazırlanmasında da yaygın şekilde kullanılan, iyonotropik jelasyon mekanizması ile nanopartikül oluşturan model bir makromolekül olan sodyum tripolifosfat (STPP) ile ön deneme çalışmalarına başlanmıştır. Sentezlenen 3 farklı CD ile IL-2'yi taklit etmesi amacıyla negatif yüzey yüküne sahip ve yüksek molekül ağırlıklı STPP arasında yük etkileşimine dayalı nanopleks sistemleri literatür temel alınarak hazırlanmıştır. Nanopleks oluşum mekanizması polianyon yapıdaki molekül (STPP veya IL-2) ile CD polimerlerin pozitif yüklü grupları arasındaki etkileşim temeline dayanmaktadır.

Nanopleksler, etkin maddenin yanı sıra gen taşımada da kullanılan ve farklı hazırlama yöntemleri ile oluşturulan sistemlerdir. Nanopleks hazırlama genel olarak ekleme, vorteks ile karıştırma, oda ısısında inkübasyon gibi basamakları içermektedir ve bu basamaklar literatürde çeşitli çalışmalarda farklı prosedürlerle uygulanmıştır.

Literatür bilgileri temel alınarak, CD nanopleks oluşturmada farklı karıştırma süreleri (vorteks ile), farklı inkübasyon süreleri ve farklı CD: STPP (+/-) ağırlık oranları (mg/mg) denenmiştir. Nanoplekslerin partikül büyüklüğü ve dağılımı, yüzey yük değerleri incelenerek uygun CD türevleri ve nanopleks hazırlama yöntemi belirlenmiştir. Tez süreci ve pandemi koşulları dikkate alınarak ve olası bir 5-FU polimer konjugasyon süreci öngörülemediğinden; alternatif bir hazırlama yöntemi olan 5-FU'nun konvansiyonel olarak Van der Waals kuvvetleri ve zayıf elektrostatik etkileşimle polimerlere yüklenmesi tercih edilmiş ve bu yöntemle çalışmalar ilerletilmiştir.

5-FU'nun yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile *in vitro* miktar tayini ve analitik yöntem validasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. 5-FU ve IL-2 yüklü CD nanopleksler hazırlanmış ve partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel değerleri ölçülmüştür. IL-2'nin ELISA kiti ile miktar tayini yönteminde kalibrasyon doğrusu belirlenmiştir. Hazırlanan nanoplekslere yüklenen 5-FU ve IL-2 miktarları sırasıyla HPLC ve ELISA yöntemleriyle belirlenmiştir. Nanoplekslerin dinamik ışık saçılımı yöntemiyle belirlenen boyut analizinin yanı sıra taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile optik görüntülemeleri yapılmıştır. Nanoplekslerin kısa süreli stabilite çalışmaları sonucunda boyut ve yüzey özellikleri tayin edilmiştir. Saklama koşullarının etkisinin değerlendirildiği liyofilizasyon öncesi

ve sonrasında partikül büyüklüğü ve dağılımı ölçülmüştür. Oral uygulama potansiyeline yönelik çalışmalar kapsamında simüle gastrointestinal sıvılarda açlık ve tokluk koşullarında ve parenteral uygulamayı taklit edebilmek için fosfat tamponunda stabiliteleri değerlendirilmiş ve *in vitro* ilaç salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Salım ortamlarından alınan örnekler 5-FU için HPLC, IL-2 için ELISA ile analiz edilmiş ve kümülatif salım profilleri oluşturulmuştur. Ek olarak, hücre kültürü ortamında hazırlanan nanoplekslerin stabilite çalışmaları yürütülmüştür.

Nanopleks yapısının oluştuğu ve 5-FU'nun yapıya enkapsüle edilebilirliğini göstermek amacı ile Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) ve Diferansiyel Taramalı Kalorimetre Cihazı (DSC) ile analizleri yapılmıştır. Nanopleks yapısındaki IL-2'nin biyolojik aktivitesi ise splenosit hücrelerinde yapılan çalışma sonucu belirlenmiştir. Ayrıca, splenosit hücrelerinde CD polimerlerin güvenlik çalışması da gerçekleştirilmiştir. Splenosit hücrelerinde yapılan çalışmalar sonucu güvenlik için nanopleks yapısında bulunması gereken polimer ve IL-2 miktarı saptanmıştır. Bu miktarlar üzerinden gerekli hesaplamalar yapılmış ve yeni dozları içeren nanopleks formülasyonları aynı yöntemle hazırlanmıştır. Elde edilen nanoplekslerin partikül büyüklüğü ve dağılımı, yüzey yükü, ilaç yükleme etkinliğini belirleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca hazırlanan nanoplekslerin yapısındaki IL-2'nin yapısal bütünlüğü SDS-PAGE analizi ile belirlenmiştir.

Hücre kültürü çalışmaları kapsamında öncelikle nanopleks hazırlamada kullanılan üç polimerin güvenliliği L929 fare fibroblast hücre hattında belirlenmiştir. 5-FU'nun IC₅₀ değeri ise CT26 fare kolon kanseri hücreleri için belirlenmiştir. Belirlenen IC₅₀ değeri göz önünde bulundurularak antikanser etkinlik çalışması gerçekleştirilmiştir. Antikanser etkinlik ayrıca xCELLigence RTCA cihazı ile ölçüm yapılarak gerçek zamanlı hücre canlılığı analiziyle belirlenmiş ve sonuçlar arası karşılaştırma yapılmıştır. CT26 hücreleri ile üç boyutlu (3B) tümör modeli oluşturulmuş ve antitümoral etkinlik belirlenmiştir. Uygulanan tedaviden sonra *in vitro* olarak TUNEL (terminal deoksinükleotidil transferaz) ile apoptoz tayini yapılmıştır. 3B *in vitro* tümör modelinde immünojenik özelliklerin tayini için immünositokimyasal incelemeler yapılmıştır.

In vivo antitümoral çalışmalar kapsamında güvenlik ve immünojenik etkinlik çalışmaları yürütülmüştür. Bu amaçla CD türevlerinin güvenlilikleri farelerde tek doz

iv. uygulama sonrasında alınan kan örneklerindeki değişkenlerin incelenmesi ile belirlenmiştir. En güvenli bulunan polimer ile antitümoral etkinlik çalışması CT26 hücre enjeksiyonu ile indüklenen tümör modelinde gerçekleştirilmiştir. Tedavi süresince fareler kilo artışı, tümör büyüklüğü ve sağ kalım açısından değerlendirilmiştir. Tedavi sonrası kurban edilen hayvanlardan tümör, kolon, karaciğer ve akciğer dokuları alınarak histopatolojik ve immünolojik incelemeler yapılmıştır. Ayrıca kan örnekleri toplanmış ve sitokin seviyeleri ile immün cevap nitelikleri özellikle miyeloid ve T hücreleri açısından belirlenmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, kontrol edilemeyen hücre büyümesi ve anormal hücre yayılımı ile karakterize olan karmaşık bir hastalıktır [1]. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün tanımına göre kanser, vücudun her bir bölümünde oluşabilen ve geniş bir hastalıklar grubu olarak sınıflandırılan genel bir terimdir. Kanserin oluşumu ve yakın organlara yayılımından sonraki süreç metastazdır. Metastaz, kansere bağlı ölümlerin birincil sebebidir ve bu ölümlerin %90'ından sorumludur [2]. Geçtiğimiz yıl, dünya genelinde 19,3 milyon yeni kanser tanısı konulduğu ve 10 milyon kansere bağlı ölüm yaşandığı tahmin edilmektedir [3]. Tedavide temel olarak cerrahi tercih edilse de bu durum kanserin türü ve fazına göre değişebilmektedir. Kemoterapi ve radyoterapi klinik tedavide diğer seçeneklerdir. İmmünoterapi, hematolojik kanserlerde kemik iliği transplantasyonu, kök hücre bazlı terapiler ise diğer tedavi seçeneklerindendir [2].

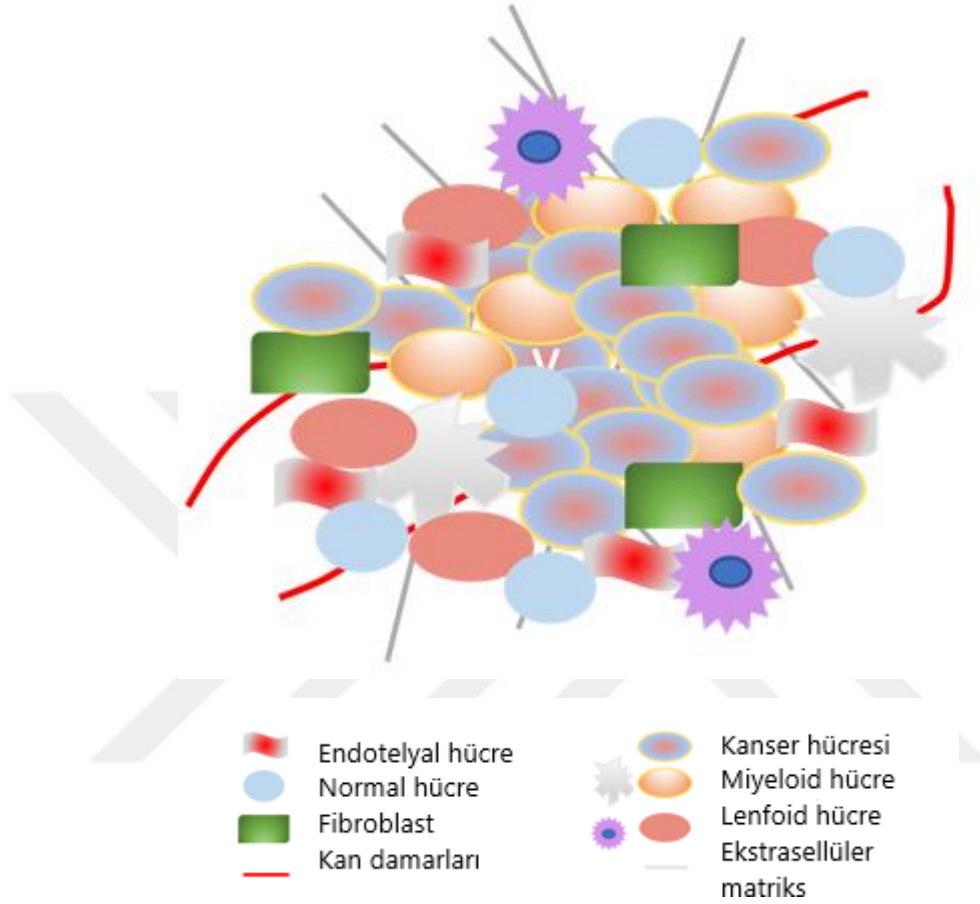
2.2. Tümör Mikroçevresi ve Tümörde İmmün Mikroçevre

Tümör mikroçevresinde, kanser hücrelerinin yanı sıra immün ve enflamatuvar hücreler, fibroblast, kan hücreleri gibi farklı hücre tipleri, besin maddeleri ve sinyal moleküllerini barındırır (Şekil 2.1.). Yara iyileşmesinin ve doku yenilenmesinin temelini oluşturan epidermal- mezenkimal geçiş normal bir süreç iken kanserde durum farklılaşmaktadır. Kanserde hipoksi (oksijen azlığı), sitokin ve büyüme faktörleri, immün ve enflamatuvar gelişimi bu geçişi artırmaktadır [4].

Bu kapsamda, tümör dokusu dört farklı heterojeniteyi barındırır; genetik heterojenite, hücresel heterojenite, O₂/besin dağılımındaki metabolik heterojenite, kanser ilerleyişi sırasındaki geçici heterojenitedir. Bu heterojen ortam, kanser tedavisini zorlaştırmakta ve tekli tedavi rejimlerinin kanser hücrelerini yok etmesini zorlaştırmaktadır [5].

Kanserin bu çok bileşenli heterojen yapısı; kanser metastazını, immün sistemden kaçışı ve ilaç direncini indüklemektedir [4]. Direnç oluşumunda kanser hücrelerinin farklılaşabilme yeteneklerinin etkisi vardır ve bu farklılaşma yetenekleri sayesinde immün sistemden kaçarak hayatta kalabilmektedirler [6]. Doğal veya edinilmiş immün sistem mekanizmalarının aktive edilmesi olarak tanımlanan

immünoterapi ile kanser hücrelerinin tanınarak metastatik oluşumların da yok edilmesi hedeflenmektedir.

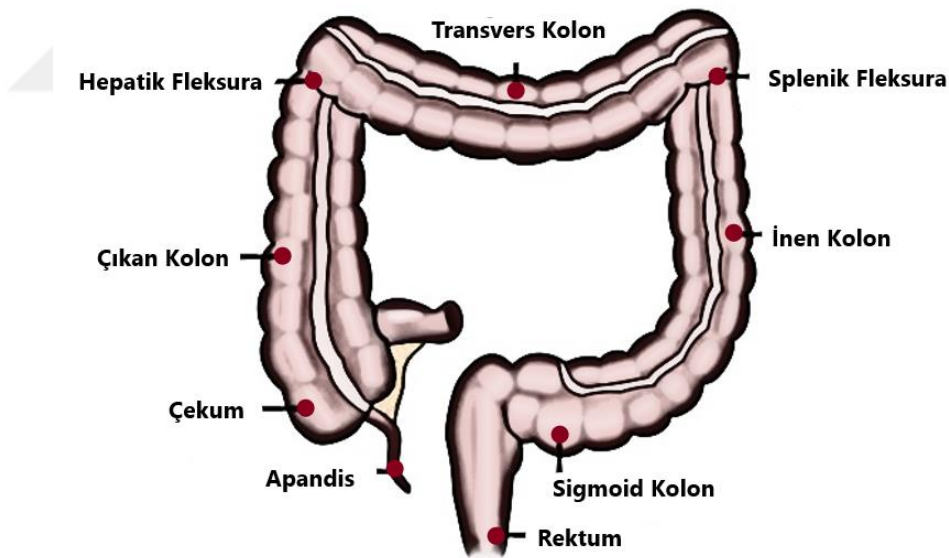


Şekil 2. 1. Tümör mikroçevresi ve tümör immün mikroçevresi.

Ancak, üzerinde çalışmaların devam ettiği bir diğer kavram tümör immün mikroçevresidir. Tümör mikroçevresinde, tümör karşıtı ve tümörü destekleyen hücrelerin yanı sıra her iki mekanizmada görev alabilen tümör ilişkili immün hücreler bulunmaktadır. Tümör gelişiminin farklı aşamalarında bu hücreler yer almaktadır. Tümör ortamında var olan sinyal moleküllerinden ve kanser ilişkili fibroblast hücrelerinden etkilenen bu ortam, kanser immünoterapisinin etkinliğini de değiştirmektedir. İmmün kontrol noktası inhibitörlerinin etkinliğinde bireysel tümör mikroçevresinin ve immün mikroçevrenin etkili olabileceği belirtilmektedir. Kanser immünoterapisinin geleceğinde önemli olacak olan tümör immün mikroçevresi üzerine çalışmalar devam etmektedir [7, 8].

2.3. Kolon Kanseri

Kolon uzunluğu 1,5 metre ve genişliği 6-8 cm aralığında olan temel görevi emilim olan ve emilmeyen yapının inen kolonda bekletilerek rektuma iletilmesi ile bakteriyel aktivitenin yoğun olduğu sindirim sistemi organlarından biridir. Kolon; çekum, çıkan kolon, hepatik fleksura (kıvrım-bükülme bölgesi), transvers kolon, splenik fleksura, inen kolon ve sigmoid kolon olmak üzere yedi farklı kısımdan oluşur (Şekil 2.2.). Rektum ise yaklaşık 15 cm olup kolonun gelişmesi sonucu oluşan sindirim sisteminin son kısmıdır. Kolorektal kanser başlığında toplanan kolon ve rektal kanserlerin oranı sırasıyla %71 ve %29'dur [9]. Ayrıca, kolorektal kanser metastatik aktivitesi olan ve karaciğere %50 oranında metastazın görüldüğü bir kanser tipidir [10]. Kolon kanserinin çoğu adenokarsinoma formundadır. Adenoma-karsinoma sekansına dayanarak adenomatöz polipler, kolorektal kansere yol açan ana öncü lezyonlar olarak tanımlanmıştır [11].



Şekil 2. 2. Kolonun anatomik yapısı.

Kolon kanseri risk faktörleri arasında yer alan ailede kolorektal kanser öyküsü, enflamatuvar bağırsak sendromu ve yaş (50 yaşın üzeri) değiştirilemeyen faktörlerdir. Değiştirilebilen faktörler ise diyet- işlenmiş ve kırmızı et tüketimi ve düşük meyve-sebze tüketimi, fiziksel aktivite, obezite, diyabet, alkol ve sigara kullanımıdır [12, 13]. Ayrıca yüksek gelire sahip ülkelerde 30 ile 40 yaş aralığındaki genç yetişkinlerde son

25 yılda kolorektal kanser insidansının arttığı, 50 yaş üzerinde ise azaldığı belirtilmiştir [9]. 50 yaşın altında gelişen bu kanserler, erken başlangıçlı kolorektal kanser olarak adlandırılmakta ve Amerika’da bu yaş grubunda en sık gözlenen ikinci ve ölümlle sonuçlanan en sık üçüncü kanser tipi olarak belirtilmektedir [14]. Bu yaş grubu için ilave risk faktörleri stres, antibiyotik kullanımı, diyet-sağlıksız pişirme yöntemleri ve glikoz-fruktoz şurubu tüketimi gibi bağırsak mikrobiyomunu bozan koşullar olduğu belirtilmektedir [15].

Dünya Sağlık Örgütü 2018’deki tahminlerine göre yeni kanser vakalarında üçüncü ve kanser kaynaklı ölümlerde ise en sık rastlanan ikinci kanserin kolorektal kanser olacağı tahmininde bulunulmuştur. Amerikan Kanser Topluluğunun her yıl yayınladığı raporda ise, 2022 yılında her iki cinsiyette de en sık görülen ve en fazla ölümlle sonuçlanan üçüncü kanser olacağı belirtilmiştir [16].

Türkiye’de ise 2017 yılında T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü tarafından yayımlanan Türkiye Kanser İstatistikleri Raporunda, kadın ve erkeklerde en sık rastlanan 3. kanser tipidir [17].

Kolorektal kanser insidansının dünya genelinde bölgeler arasında 10 kata yakın oransal olarak değiştiği bilinmektedir. İnsidansın yüksek olduğu bölgeler Avustralya, Yeni Zelanda, Avrupa ve Kuzey Amerika; düşük olduğu bölgeler ise Afrika ve Güney-Orta Asya’dır [18].

2.3.1. Kolon Kanseri Tanısı

Kolon kanserinin TNM (tümör, nod, metastaz) sınıflandırmasına göre evreleri belirlenmekte ve tedavisi uygulanmaktadır. Evre 0’da kanser sadece mukozada sınırlı kalmıştır. Evre 1’de ise kanser mukoza altı dokuya ilerlemiştir. Evre 2; 2A, 2B ve 2C olarak üçe ayrılmış olsa da temelde kanser kas dokusuna da yayılmıştır. Evre 3A’da kanser 1 ila 3 lenf nodu veya yakın dokuya ya da 4 ila 6 lenf noduna yayılmış durumdadır. Evre 3B’de ise karın zarı ve/veya lenf nodlarına yayılım vardır. Evre 3C, 7’den fazla lenf noduna veya çevre dokuya ve de organa yayılacak boyuta gelmiş kanser olarak tanımlanmaktadır. Evre 4’te ise kanser metastatik formda olup, kanserli hücreler kan ve lenf dolaşımında bulunur. Evre 4A’da bir metastatik organ, 4B’de 2 veya daha fazla metastatik organ vardır ve peritoneal metastaz gerçekleşmemiştir. Evre 4C ise peritoneal yüzeyi aşan metastatik kanser olarak tanımlanmıştır [19-21].

Tanıda kullanılan yöntemler görsel/yapısal testler ve dışkı bazlı testler olarak ikiye ayrılmaktadır. Görsel/yapısal testler; kolonoskopi-10 yılda bir, bilgisayarlı tomografi, kolonografi 5 yılda bir ve sigmoidoskopi-5 yılda bir yapılması gerekli olan testlerdir. Kolorektal kanserin tanısında kullanılan temel yöntem kolonoskopidir. Kolonoskopide temel amaç prekanseröz ve adenomatöz poliplerin saptanarak çıkarılmasıdır. Dışkı bazlı testler ise; fekal immünokimyasal testler, yüksek-hassasiyetli dışkıda gizli kan testi ve çoklu hedefli dışkı deoksiribonükleik asit (DNA) testlerdir [9]. Ayrıca Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanan kapsül kolonoskopi tekniği tanıda 2014'ten itibaren kullanılmaktadır [22]. Bu teknikte bir kamera kapsül hastaya içirilir ve hastanın kemerine takılan cihaz ile kapsülün geçişi sırasında görüntüleme yapılır. Hastanın 12 saat içerisinde bu kapsülü dışkı ile atması beklenmektedir. Kişilerin kolonoskopi ile taranması kolorektal kansere bağlı ölümlerde %50 oranında bir azalma sağlamıştır. Ayrıca dışkıda gizli kan testi taraması ve sigmoidoskopi taramaları erken dönemde oluşumları takip ederek kolon kanseri insidansını %30 azaltmıştır [11].

İmmünokimyasal testler arasında kolorektal kanser belirteci olarak sitokeratin 20 (CK20), CK7 ve CDX2 yer almaktadır. Bu hastaların genelinde (yaklaşık %80'inde), CK20 pozitif ve CK7 negatiftir. CD4X2 ise enterik farklılaşma belirteci olarak bilinmekte ve kolorektal kanserli hastaların %90'ında pozitif sonuç vermektedir [23].

2.3.2. Kolon Kanseri Tedavisi

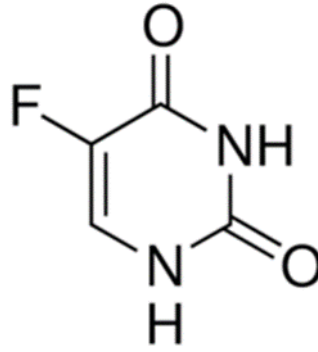
Klinikte Evre 2 de dahil olmak üzere cerrahi ilk ve tek uygulanan tedavi şeklidir. Evre 3'te cerrahinin yanı sıra adjuvan kemoterapi uygulanmaktadır. Burada 5-FU ve lökovorin (LV), FOLFOX (folinik asit, 5-FU ve oksaliptatin) veya kapesitabin ve oksaliptatin (CAPOX) rejimleri tercih edilmektedir [9]. Evre 4'te ise bu iki tedavi şekline ek olarak karaciğer metastazında neoadjuvan kemoterapi, lokal ablasyon ve arter-içine kemoterapi gibi yaklaşımlar uygulanmaktadır. Evre 4 veya tekrarlayan kanser varlığında ise cerrahi ve kemoterapiye ek olarak hedeflenmiş terapi yaklaşımları standart tedavi rejimi olarak kullanılmaktadır. Bu aşamada uygulanabilen ilaçlar; FOLFIRI (5-FU, LV, irinotekan), FOLFOX, CAPIRI (kapesitabin ve irinotekan), CAPOX, 5-FU ve LV, irinotekan, kapesitabin ve Lonsurf'tur [9].

Onaylanan hedeflenmiş terapi ajanları ise VEGF (vasküler endotermal büyüme faktörü) veya EGFR (epidermal büyüme faktörü reseptörü)'yi hedefleyen bevasizumab, setuksimab, aflibersept, ramusirumab, panitumumab ve regorafenib yer almaktadır. Pembrolizumab, nivolumab ve ipilimumab kolorektal kanser tedavisinde onaylanan immünoterapötik ilaçlardır. Bunlara ek olarak evre 4'te radyasyon tedavisi uygulanmakta ve klinik çalışmalarda biyoterapi ürünleri ile çalışılmaktadır. Biyoterapi, hastalıkları tedavi etmek için canlı organizmalardan elde edilen maddelerin kullanıldığı ve immünoterapi ve bazı hedeflenmiş terapötiklerden oluşan tedavi tipidir [24, 25]. Protein kinaz inhibitörlerinden BRAF inhibitörü olan enkorafenib (Braftovi®) Avrupa İlaç Ajansı (EMA) ve FDA'da BRAF gen mutasyonu olan metastatik kanserlerde setuksimab ile endikedir [26]. Ayrıca kemoterapi, radyoterapi, immün kontrol noktası blokörleri temelinde immünoterapi ile kombine tedavi yaklaşımları olarak değerlendirilmektedir [27].

2.4. 5-Florourasil

5-Florourasil ile ilgili ilk veriler 1957'de Dushinsky tarafından yayınlanan floropirimidinlerle ilgili çalışmada yer almaktadır. Bu çalışmada, 5-FU'nun tümör inhibitörü olarak kullanımının fare ve sıçanlardaki etkinliği gözlenmiş ve klinik çalışmalara geçileceği belirtilmiştir [28, 29]. 5-FU'nun antikanser ajan olarak kullanımı 1962 yılında Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde onaylanmıştır.

5-FU; ribonükleik asit (RNA) yapısındaki dört bazdan biri olan urasilin, C-5 pozisyonunda (5. karbon atomunda), hidrojen (H) yerine florun (F) olduğu bir urasil analogudur (Şekil 2.3.). Kemoterapötikler içerisinde antimetabolit sınıfında yer almaktadır. 5-FU, hücre içerisinde üç farklı metabolite dönüşür; florodeoksüridin monofosfat (FdUMP), florodeoksüridin trifosfat (FdUTP) ve florouridin trifosfat (FUTP). Bu aktif metabolitler timidilat sentazı inhibe eder, normal DNA ve RNA işleyişini ve işlevi sırasında yapılarına katılarak bu mekanizmaları bozar [30].



Şekil 2. 3. 5-Fluorourasil'in kimyasal yapısı.

5-FU, Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemine (BCS) göre Sınıf 3'te yer alarak yüksek suda çözünürlük ve oral uygulama sonucunda düşük permeabilite göstermektedir [31]. Ayrıca 5-FU, hızlı dağılıma ve yaklaşık 6 ile 22 dakika arasında değişen yarılanma ömrüne sahiptir [32]. Eliminasyonu büyük oranda karaciğerdedir ve %20 civarında ilacın üriner itrah ile eliminasyonu gerçekleşmektedir [33].

FDA tarafından ilk onaylanan preparat olan Efudex® topikal çözelti ve krem formunda 1970'te aktinik keratozis ve yüzeysel bazal hücre karsinoması için onay almıştır. 2000'de ise bazal hücreli deri kanseri ve aktinik keratozda (kansere öncesi durum) kullanımı onaylanmıştır [34]. Ayrıca enjeksiyonluk form olan Adrucil® kolon ve rektal kanser başta olmak üzere mide ve pankreas gibi gastrointestinal sistem kanserlerinde, meme kanseri, mesane kanseri, baş-boyun kanseri, nöroendokrin kanser, skuamöz hücreli kanser, hepatobiliyer kanserde kullanılmaktadır [35].

5-FU; lökovorin (folinik asit) ve oksaliptatin ile kombine olarak FOLFOX ya da FLOX adı ile 2004'ten beri tedavide uygulanmaktadır [36]. Lökovorin, 5-FU'nun etkinliğini artırmak için kullanılırken; oksaliptatin ise farklı bir mekanizma ile antikanser etkinlik göstermektedir. FOLFIRI ise 5-FU, lökovorin ve irinotekanın kombine olarak uygulandığı tedavi rejimine verilen kısa isimdir. Bu rejimlerin farklı kanser türlerinin tedavisinde klinikte kullanımları vardır ve devam eden etkinlik çalışmaları bulunmaktadır [37].

Ancak 5-FU kullanımı ile saç dökülmesi, deride enflamasyon, kan hücre sayılarında azalma, kemik iliği baskılanması, yorgunluk, halsizlik, baş ağrısı, baş dönmesi, uykusuzluk, paresteziler, karın ağrısı, kabızlık, ishal, dispepsi (hazımsızlık), bulantı, stomatit (ağız ve dudak enfeksiyonu), döküntü ve el ayak sendromu gibi yan etkiler görülmektedir [38]. Kemoterapi rejimlerinde kolorektal kanser tedavisinde

karaciğer toksisitesi genel bir durumdur ve 5-FU ile tedavide %47 oranında karaciğerde yağlanma ve karaciğer fonksiyon testlerinde artış görülmektedir [39]. Bu kapsamda yapılan bir çalışmada, tedavi boyunca bilgisayarlı tomografi ile hastaların karaciğer dokuları incelenmiş ve bu test değerlerinde artış görülen hastaların yarısından fazlasında, bu değerler artmadan önce karaciğer dokularında değişikliklerin başladığı bildirilmiştir [40].

Literatürde yapılan çalışmalar sonucunda, bazı kemoterapötiklerin tümör mikroçevresinde pozitif immünojenik etkiye sebep olduğu belirlenmiştir [41]. Bunun da kemoterapötik molekülün, tümörde immünojenik hücre ölümünü indüklemesi ve ardından, kalan kanser hücre kalıntılarının bir “aşı” gibi görev alabildiği belirtilmiştir [42, 43]. 5-FU’nun bu bağlamda miyeloid-kökenli baskılayıcı hücrelerin (MDSCs) ortadan kaldırılmasını sağlayarak T hücrelerinin daha aktif olarak kanserle savaşmalarını desteklediği gösterilmiştir [44]. MDSC hücreleri, tümör gelişimi boyunca dalak ve tümör dokusunda birikim gösterirler [45]. Bu hücreler salgıladıkları sitokinlerle anjiyogenez ve tümör hücresi yayılımını uyarmaktadırlar. Timom ve melanoma kanserli farelerin 5-FU ile tedavisinde MDSC hücrelerinin azaldığı gözlenmiştir [45, 46]. Bu etkinlik hem *in vitro* olarak hem de kolorektal kanserli farelerde sayısal ve hücresel aktivitesinde azalma olarak gösterilmiştir [47]. Yüzey antijenleri farelerde, başlangıçta CD11b ve Gr1’dir ve zamanla Ly6C ve Ly6G’ye farklılaşarak monosit veya nötrofile benzer fenotipik ve morfolojik özellikler kazanırlar [48]. Ek olarak antitümör immüniteyi arttıran Treg hücre oluşumunu azalttığı ve ölen kolorektal kanser hücrelerinden dendritik hücreleri aktive eden hasar-eşlikçi moleküler örgülerin (DAMP) sekresyonunu arttırdığı bulunmuştur [49]. Bu örgüler hasarlı ya da ölmekte olan hücreler tarafından salgılanan doğal immün sistemi uyaran endojen moleküllerdir.

5-FU tedavisi oral ve intravenöz enjeksiyon gibi yöntemlerle uygulanmaktadır ve yaygın olarak kullanılan yöntem iv. enjeksiyondur. Ancak enjeksiyonda ilaç majör dağılım organlarına dağılarak kolona ulaşan efektif dozu azalmaktadır. Yapılan çalışmalarla, enjekte edilen 5-FU dozunun %85’ten fazlası inaktif metaboliti olan Dihidropirimidin dehidrojenaza dönüştüğü belirlenmiştir. [50]. Oral doz olarak 15 mg/kg pellet (pellet içeriği %40 5-FU ve %60 mikrokristalize selüloz) yani 6 mg/kg dozda 5-FU içeriği sıçanlara uygulandığında; mide ve bağırsaktaki 5-FU

konsantrasyonlarının sırasıyla 90 ve 11 $\mu\text{g/g}$ doku, çekum ve kolona ise $<1 \mu\text{g/g}$ oranında dokuya ulaşabildiği belirtilmiştir [51]. Bu kapsamda, nanopartiküler sistemlerin geliştirilerek kontrollü ilaç salımı, hedef dokuya varan ilacın ve etkinliğinin artırılması için çalışmalar yapılmıştır. Nanoteknolojik ürünlerin bu alandaki en önemli üstünlüğü, nano boyutları sayesinde doğrudan hücre membranı ve hücreler arası yapılarla etkileşime girmesidir, bu durum ayrıca ilaç direnciyle ilişkili mekanizmalardan kaçınılmasını sağlamaktadır [52]. Ek olarak nanopartiküler sistem, taşıdığı ilacın, tümör içine geçişini ve burada birikimini artırmaktadır. Yapılan bir çalışmada, 5-FU yüklü PEG-PBLG nanoküreler hazırlanmış ve 5-FU'nun yarılanma ömrü yaklaşık 7 kat arttırılmıştır. *In vivo* çalışmalara LoVo insan kolon kanser hücre hattı ve Tca8113 insan oral skuamöz hücreli karsinoma hücre hattı ile farklı farelerde kanserler indüklenerek devam edilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda her iki kanserin indüklendiği fare grubunda tümör büyümesinin yavaşladığı gözlenmiştir [53]. Kolon kanseri tedavisinin hedeflendiği bir çalışmada ise mikrofluidik yöntem ile kanallardan 5-FU/PVA çözeltisi ve PLGA polimeri gönderilerek, polimer: ilaç oranı 10:1 (a/a) olacak şekilde nanopartiküller hazırlanmıştır. Bu nanopartiküllerin konvansiyonel hücre kültüründe Caco-2 ve SW480 insan kolorektal kanser hücrelerinde etkinlikleri; kontrol- tedavi uygulanmayan, serbest 5-FU çözeltisi uygulanan ve nanopartikül uygulanan olmak üzere üç grupta değerlendirilmiştir. Nanopartiküler sistem uygulanan grupta kontrollü salıma bağlı olarak azalan ama kontrol grubuna göre ise Caco-2 hücrelerinde 10 kat, SW480 hücrelerinde 1,5 kat artan hücre ölümü gözlenmiş ve antikanser etkinliği gösterilmiştir [54].

İki farklı kemoterapötiklin klinikte birlikte kullanımı ile etkinliğin artmasına dayanılarak farklı kemoterapötiklerin nanopartiküler sistemlerle taşınması üzerine çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Tablo 2.1.). Bu çalışmalardan birinde, kolon kanseri tedavisini hedefleyen 5-FU ve kurkumin yüklü kitosan nanopartiküllerin ilaç salımının 4 gün sürdüğü gözlenmiştir. Ayrıca hücre kültürü çalışmalarında antikanser etkinliğin arttığı belirlenmiştir. Farmakokinetik çalışmalarla ise etkin maddelerin plazma konsantrasyonlarının 72 saate kadar yükseldiği belirtilmiştir [55]. Bu konuda yapılan başka bir çalışmada, antikanser ilaç oksaliptatin ve 5-FU yüklü laktoferrin nanopartiküller hazırlanmıştır. Kanser hücrelerindeki antiproliferatif etkinliğin, serbest ilaçlarla kıyaslandığında nanopartiküler sistem uygulamasında arttığı

gösterilmiştir. *In vivo* çalışmalarda ise, farelere uygulanan nanopartiküler sistemle etkin maddelerin farmakokinetik parametrelerinin arttığı ve sistemik toksisitelerinin azaldığı gösterilmiştir [56]. Doksorubisin ve 5-FU içeren kitosan-bazlı nanokompleksler hazırlanmış ve 200 nm altında partikül büyüklüğüne sahip sisteme her iki etkin madde %70'in üzerinde enkapsüle edilmiştir. Pozitif yüzey yüküne sahip sistem 24 saatten uzun bir süre içeriğini salmış ve NIH/3T3 fare fibroblast hücrelerine doza bağlı ancak serbest ilaçtan daha fazla sitotoksite sergilemiştir [57].



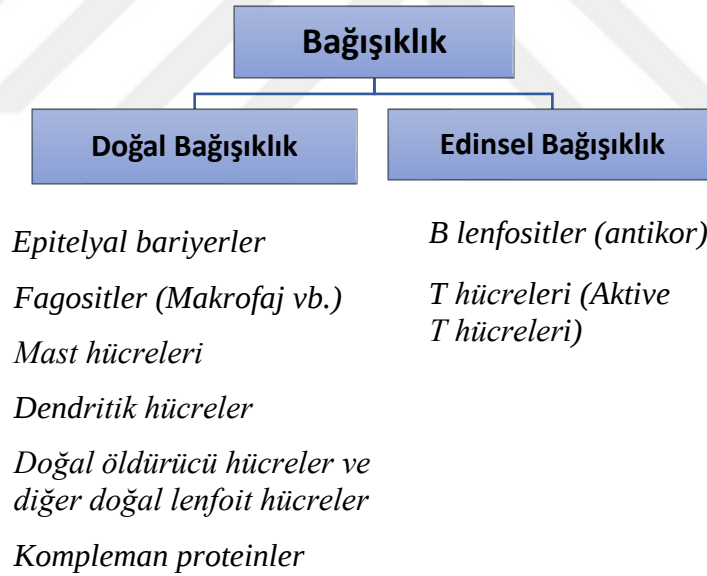
Tablo 2. 1. Kolon kanser tedavisini hedefleyen 5-FU içeren nano boyutlu taşıyıcı sistem çalışmalarına literatür örnekleri.

Nanosistem	Nano boyutlu taşıyıcı sistem hazırlamada kullanılan polimer	Sistemde 5-FU ile kombinasyonu kullanılan ilaç veya tedavi	Öne çıkan sonuçlar	Kaynak
Nanopartikül	Kitosan	Kurkumin	Plazma konsantrasyonunun etkin dozda kalış süresinde ilaç çözeltisine göre yaklaşık 10 kat uzama	[55]
Nanopartikül	Silika	-	SW480 5-FU dirençli hücrelerinde, kazanılan bu direncin önlenmesi	[58]
Nanohidrojel	PFA ve PEG-b-poli-(L-lizin)	Metformin	CT26 hücrelerinde antitümöral yanıtta artma ve yan etkilerin engellenmesi	[59]
Nanopartikül	PLGA	Hipertermi	HT-29 hücrelerinde antikanser etkinlikte artma	[60]
Nanojel	Aljinat ve siklodekstrin	-	5-FU'nun HT-29 hücre içi alımında artma ve apoptoz uyarımı	[50]
Nanopartikül	Kitosan	-	<i>In vitro</i> olarak tümör büyümesinde azalma, 3B HCT-116 sferoid yapısında bozulma	[61]
Nanopartikül	PLGA	-	CaCo-2 ve SW480 hücrelerinde antitümöral aktivitede artma	[54]
Termoduyarlı hidrojel	Polaksamer P407 ve P188	-	Lokal tedavide tümör büyümesinde büyük yavaşlama	[62]
Katı lipit nanopartikül (SLN)	Precirol	-	HCT-116 tümör modelinde 5-FU plazma seviyesinde artma, tümör büyümesinde gerileme ve karaciğere non-toksik etki	[63]
Nanosüspansiyon	Sodyum aljinat ve soya proteini	-	Uzatılmış salım ve zamana bağlı etkinlikte artma	[64]

2.5. İmmün Sistem ve Kanser

İmmün sistem; yabancı ve zararlı her türlü maddeye karşı organizmanın reaksiyon vermesini sağlayan hücre, doku ve moleküllerden oluşan savunma sistemidir [65]. İmmün sistem, doğal ve edinsel immün sistem olarak, birbirinin

oluşumunu tetikleyen ama farklı yollar üzerinden ilerleyen iki bileşenden oluşmaktadır. Doğal immünite antijenlerle ilk kez karşılaşıldığında oluşan mekanizmadır, ayrıca monosit, makrofaj, dendritik hücreler ve doğal öldürücü hücrelerin (NK hücreleri) ani ve kısa süreli oluşturdukları yanıtlardan sorumludur. Ayrıca kompleman sistem ve epitel bariyer doğal immün sistemin bileşenleridir. Doğuştan var olan doğal immünite, sağlıklı normal hücrede bulunmayan yapıları ve mikroorganizma, hasarlı veya kanser hücrelerinden açığa çıkan molekülleri tanıyarak edinsel bağışıklığın da uyarılmasını sağlamaktadır. Edinsel immün sistem ise, uzun süreli yanıt ve hafızadan sorumlu olup temelde T ve B lenfositler ile antijenik yapıya özgül yanıtı sorumludur (Şekil 2.4.) [66]. T lenfositler aracılığı ile ilerleyen süreç hücresel immün yanıt, B lenfositler aracılığı ile ilerleyen süreç ise humoral immün yanıt olarak isimlendirilmektedir. Bu yapıların yanı sıra immün sistem farklı hücreler ve moleküller (sitokin, interferon, antikor, plazma ve adhezyon molekülleri gibi), dokular (kemik iliği ve lenf düğümleri gibi) ve organlardan (timüs, dalak) oluşmaktadır [65].



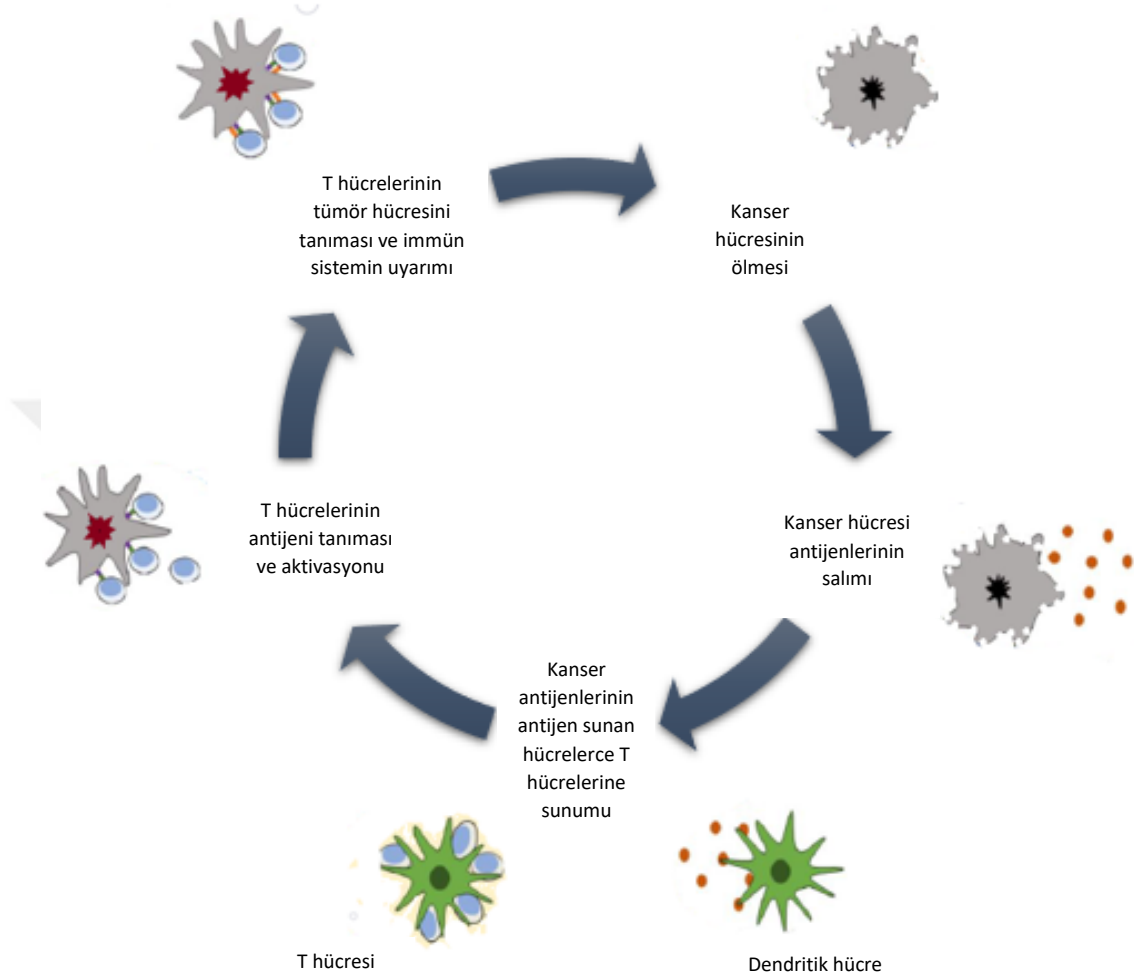
Şekil 2. 4. İmmün sistem bileşenleri.

Lökosit ve diğer immün sistem hücreleri üzerinde 400’den fazla tanımlanmış farklılaşma kümeleri (CD) bulunmaktadır. Bu yapılar tanıma ve diğer hücrelerle olan etkileşimi tanımlamada önemlidir. Ayrıca kanser ve otoimmün hastalıkların teşhisinde kullanılmaktadırlar [67].

Kanserde immün sistemin işleyişi ve kanserin immün sisteme verdiği yanıtlar, immün mekanizmalar farklılaşsa da temelde aynı tanıma ve savunma mekanizmaları ile yapılmaktadır. İmmün sistem yeni oluşan veya var olan kanser hücrelerini tespit etmeye ve yok etmeye çalışmaktadır, bu süreç “**immün gözetim**” olarak Paul Ehrlich tarafından isimlendirilmiştir. Bu süreçte birçok farklı hücre, bileşen ve yolak yer almaktadır. Sürecin temelinde tümör hücrelerinin sahip olduğu antijenler; tümör-ilişkili antijenler (TAAs), doğal immün sistem hücreleri olan dendritik hücre, makrofaj gibi antijen sunan hücreler tarafından (ASH) tanınarak T hücrelere sunulup tanıtılmaktadır [65, 68]. Dendritik hücreler doğal bağışıklık sistemine mikroorganizma, zararlı, hasar görmüş ve transforme hücreleri Toll-benzeri reseptörler (TLRs) ve NOD-benzeri reseptörler ile tanıtılmaktadırlar. Kanserde, antijen sunan hücreler kendi yüzeylerindeki Toll-benzeri reseptörler (TLRs) ile tümör hücrelerini tanımaktadırlar. Bu tanıma sonrası dendritik hücrelerde NF- κ B yolağı aktive olur ve IL-12 salımı uyarılır. Ardından B7 ve CD40 gibi yardımcı uyarıların, T hücresi üzerindeki sırasıyla CD28 ve CD40L/CTLA-4 ligandları ile bağlanacak olan, artışı gerçekleşmektedir. Sonrasında T hücresi reseptörü (TCR) ile antijen sunan hücre üzerindeki peptit-MHC kompleksi ve yukarıda adı geçen yardımcı uyarıların etkileşimi sonucu, antijenik yapı T hücresine tanıtılmaktadır. Bu işlem sonrası aktif forma geçen T hücreleri ile edinsel immün sistem uyarılır ve sitotoksik T hücreleri aracılığıyla tümör hücreleri yok edilmeye başlar. Bu yolak “**kanser immünite döngüsü**”dür (Şekil 2.5.) [6, 69, 70].

Lenfoid organlarda (dalak, kemik iliği, timüs) gerçekleşen bu tanımda majör doku uyumluluk kompleksleri (MHC); sınıf I ve II MHC görev almaktadır. Bu yapılar peptit bağlama bölgesi bulunduran membran proteinleridir. Sınıf I MHC molekülleri CD8⁺ T hücrelerine (sitotoksik T hücreleri) peptit yapıyı sunarken, sınıf II MHC molekülleri CD4⁺ T hücrelerine (yardımcı T hücreleri) sunmaktadır [71]. Naif (uyarılmamış) T hücreleri bu uyarımdan sonra çoğunlukla yardımcı T hücrelere dönüşürler, bu hücreler de kendi içinde Th1, Th2 ve Th17 olarak ayrılmaktadır. Ve bu hücreler de farklı immün molekül ve mekanizmaların uyarılmasını sağlamaktadır. Örneğin Th1 hücrelerinden salınan IL-12 doğal öldürücü hücrelerin aktivasyonundan sorumlu iken, IL-2, IFN- γ , TNF- β gibi salınan sitokinler de antijen sunumu ve hücreyel immün yanıtı düzenlemektedirler [72]. Th2 hücreleri ise IL-4, IL-5 ve IL-13 gibi

sitokinleri salarak h m ral yanıtın oluşmasını ve alerjik mekanizmaları uyarmaktadır. Th17 hücreleri ise IL-17 sitokinini uyararak doku enflemasyonunu başlatmaktadır [73].



şekil 2. 5. Kanser immünite döngüsü [74].

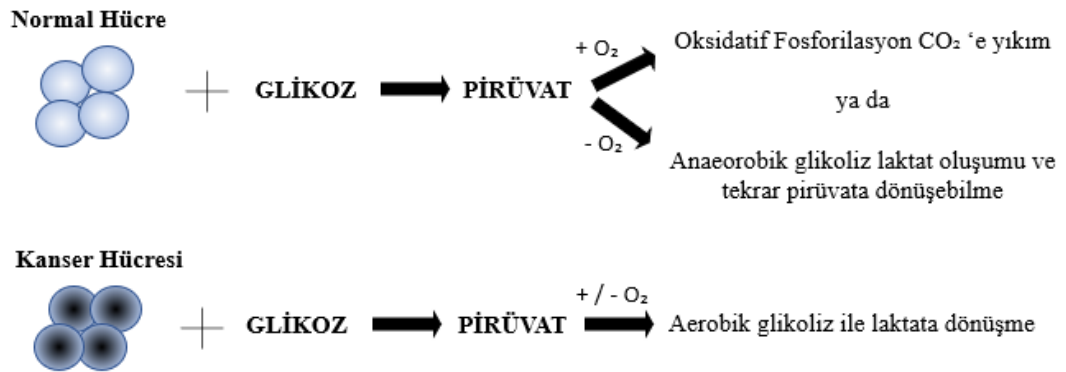
Bazı dendritik hücreler tümör h crecini yutarak antijenik yapısını MHC I molekülü üzerinde sergileyerek naif T hücreesine, bu özgül antijene karşı duyarlılaştırabilmekte ve $CD8^+$ T hücresi yanıtını oluştururken aynı dendritik hücre aynı antijenik yapıyı, MHC II molekülü aracılığıyla $CD4^+$ T hücreesine de sunmaktadırlar. Bu olay “** apraz sunum**” olarak adlandırılmakta ve tümöre karşı hızlı bir immün sistem aktivasyonu sağlamaktadır. Etkin hale gelen $CD8^+$ T hücreleri, eş uyarılara ve T hücresi yardımına ihtiyaç duymaksızın tümör antijenik yapısını tanıyarak bu tümörü yok edebilmektedirler [65].

Tümör hücreleri bu immün mekanizmalara rağmen, tümör immün mikroçevresinde yer alan bazı immün baskılayıcı hücre ve bileşenler ile büyümeye ve gelişmeye devam etmektedir. Bu süreç ise “**immün düzenleme**” olarak Robert Schreiber tarafından isimlendirilmiştir [75]. Farklı hücre ve bileşenler bu süreçte yer alır. Örneğin, tümör-ilişkili makrofajlar (TAM), miyeloid kökenli baskılayıcı hücreler (MDSC) ve düzenleyici T hücreleri (Treg) ile IL-10 ve transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β) sitokinleri efektör T hücrelerini ve sitotoksik T hücrelerinin fonksiyonlarını baskılamakta ve ayrıca tümörün direnç oluşturmalarını indüklemektedir [68]. Treg hücreleri tümör çevresindeki ATP’yi azaltarak antijen sunan hücrelerin de immünojenik etkisini azaltmaktadır [6]. MDSC ise doğrudan immün yanıtı etkilemez ancak tümör çevresinde arjinin 1’i eksprese ederek etkin T hücrelerinde amino asit, nitrik oksit sentaz ve IL-2 seviyesini azaltır [76].

Sitokinler; az miktarda salgılanan, glikoprotein ya da polipeptit yapıya sahip suda çözünabilir ekstrasellüler yapılardır [77]. Sitokinler; immün ve enflamatuvar reaksiyonlara parakrin (yakındaki hücrelere), otokrin (onları salgılayan hücrelere) ve bazen de endokrin (uzak hücrelere) mekanizmalarla aracılık eden moleküllerdir [78]. Sitokinler; tip 1 sitokinler (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, kök hücre faktörü, GM-CSF gibi), tip 2 sitokinler (IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-10 gibi), TNF ailesi (tümör nekroz faktör, lenfotoksin- α , lenfotoksin- β gibi), interlökin-1 ailesi (IL-1 α , IL-1 β , IL-18 gibi) ve TGF- β olarak sınıflandırılmaktadır [65]. Bazı sitokinler proenflamatuvar (IL-2, IL-6 ve TNF gibi), bazıları ise anti-enflamatuvar (IL-4, IL-10 ve TGF- β gibi) etki göstererek immün sistemi uyarır veya inhibe eder [78]. Sitokinler pleiotropik yapılarından dolayı kısa yarılanma ömrüne sahiptir ve bu durum parenteral ve yüksek dozda uygulanmalarını gerektirmektedir [77]. Sitokinler, yaralanmalar, kanser ve otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Yapılan bir çalışmada kemoterapötiklerle beraber uygulandığında, sitokinlerin antitümör etkinliğinin uzadığı ve arttığı gözlenmiştir [65].

Tümörün oluşumu normal dokunun anormal büyümesi ve farklılaşmasıyla karakterizedir. Oluşan bu hücreler farklı hücre bölünmesi düzenlenmesi, apoptotik yolakla ölüme direnç gösterme, metastatik karakter ve konağın immün sisteminden kaçma gibi özellikler kazanırlar. İmmün gözetim ve immün düzenleme kavramları genomik ve transkriptomik çalışmalarla doğrulanmıştır. Tümörün sahip olduğu

heterojenik yapı ve çevresel faktörler onu yeniden programlanmaya ve yeniden uyuma götürmektedir. Örneğin tümör hücreleri, “**Warburg etkisi**” olarak isimlendirilen aerobik glikolizle ATP üretmektedir (Şekil 2.6) [5]. Bu ortamda laktat birikimiyle de asidoz gözlenir. Ayrıca biriken laktat, sitotoksik T hücreleri inhibe eder ve MDSC hücrelerini uyarır. Sitokinler aracılığı ile bu durumda, doğal öldürücü hücrelerin uyarımı ve dendritik hücrelerin olgunlaşması engellenmektedir [79]. Ek olarak, oluşan hipoksi tümör büyüme ve gelişmesine tümör ilişkili makrofajlar (TAM) aracılığı ile zemin hazırlamaktadır [80, 81]. M2 benzeri tümör ilişkili makrofajlar, IL-10 ve TNF sitokinleri aracılığıyla immün sistemi baskılamaktadır [76]. Bununla birlikte tümör hücreleri kendi sergiledikleri antijenik yapıları da değiştirerek immün sistemden kaçınma yolunu izlemektedirler. Bu durum tümör immün mikroçevresinde var olan dendritik hücre fenotipinde değişikliklere sebep olarak, bu yeni antijenin tanınmamasına yol açar. Bu farklılaşma ile T hücrelerinin uyarılması, doğal öldürücü hücrelerin aktive edilmesi engellenerek tümör hücresinin büyümesi ve gelişmesi için ortam hazırlanmış olur [82]. Ayrıca tümör hücresi antijenik yapı oluşturmayı azaltabilir ve bu proteinlerin hücre yüzeyinde sunumu da azaltılarak immün sistemden kaçış gerçekleştirilebilir. Bir diğer immün yanıtı kurtulma mekanizması ise; tümör hücresinin immün sistemi baskılayan protein salımını uyarması ve hücre yüzeyinde immün sistemi inhibe edici proteinlerin sergilenmesidir [65].



Şekil 2. 6. Warburg Etkisi.

2.6. Kanserde İmmünoterapi

İlk başarılı aşı olan çiçek hastalığı aşısını 1796 yılında geliştiren Edward Jenner, mekanizması o zaman tam olarak anlaşılamamış olmasına rağmen sarkomalı hastalara “Coley toksini” adı altında enjeksiyonlar yapmış ve kanserde durağanlık ve/veya gerileme gözlemlemiştir. Coley bu çalışmasından sonra “immünoterapinin babası” olarak anılmaktadır [83]. Klinikte, kanser immünoterapisi ise BCG aşısının mesane kanseri tedavisinde 1970’te başarılı olarak uygulanması ile başlamıştır [84].

İmmünoterapi kanser tedavisinin yanı sıra astım ve rinit gibi alerji durumlarında, otoimmün hastalıklar ve organ transplantasyonunda uygulanan bir tedavi şeklidir [85, 86]. İmmünoterapi, var olan bir hastalığın immün yanıtı arttıran veya inhibe eden terapötik ajanlarla tedavisidir. İmmünoterapi yaklaşımları antikor terapisi, aşı terapisi (koruyucu ve tedaviye yönelik), adoptif hücresel terapi ve spesifik olmayan immün terapi-immün düzenleyiciler başlıkları altında (Tablo 2.2.) toplanabilmektedir [65, 87, 88].

Tablo 2. 2. Kanser tedavisinde immünoterapi yaklaşımları. [6]

Hedeflenmiş Antikorlar	Aşı Terapisi	İmmün Düzenleyiciler	Adoptif Hücresel Terapi
Monoklonal antikorlar	Dendritik hücre aşıları	Sitokinler	CAR-T hücreleri
Antikor-İlaç Konjugatları	Peptit aşılar	Kontrol noktası inhibitörleri	Tümör infiltrate lenfositler
	DNA aşıları		T hücresi reseptörleri
	Tümör hücresi aşıları		

2.6.1. Antikor Tedavisi

Antikorlar, antijen bağladıkları “Fab” bölgesi ve sabit kısım olarak nitelenen “Fc” bölgesinden oluşmaktadır. Monoklonal antikor teknolojisi, 1976’da hibridoma teknolojisinin gelişimi ile önceleri farelerin bu bölgesel yapıları ile insan bağışıklığını indükleyici etkisi zayıf olan ve zamanla indüksiyonda artış sağlayan insan antikorlarının üretimini mümkün kılmıştır. Günümüzde; fare (ibritumomab gibi),

kimerik, insanlaştırılmış ve tamamen insan monoklonal antikörler klinikte kullanılmaktadır [89]. Bunlardan rituksimab (kimerik yapıda) 1997’de FDA onayını almıştır [90]. Bu monoklonal antikörlerin etki mekanizmaları ise üç başlıkta toplanabilir;

(1) kanser hücreleri tarafından bölünme ve anjiyogeneizde kullanılan sinyal yollarını aktive eden faktörlerin ve reseptörlerin antikör bağlanması ile inhibisyonu,

(2) spesifik tümör ile ilişkili antijenlere bağlanan kimerik veya tam insan antikör bileşenlerinden oluşturulan hedef monoklonal antikora bağlı hücrel sitotoksiste (ADCC),

(3) kompleman aktivasyonu ile komplemente bağlı sitotoksiste (CDC) [91]. Bu antikörlardan Bevasizumab (Avastin®), Ramusirumab (Cyramza®), Setuksimab (Erbix®), Panitumumab (Vectibix®) FDA tarafından onaylanarak kolorektal kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Bevasizumab ve ramusirumab VEGFR’ye bağlanarak tümörü besleyen damar gelişimini, setuksimab ve panitumumab ise EGFR’ye bağlanarak tümör hücresinin büyüme ve gelişimini engellemektedir.

2.6.2. Aşı Terapisi

BCG aşısı FDA tarafından 1976’da mesane kanserinde kullanılmak üzere onaylanmıştır. Aşı terapisi; HBV ve HPV (2009) aşısı gibi profilaktik olarak ve terapötik olarak uygulanabilmektedir. FDA tarafından onaylanan HBV aşıları; Engerix-B®, Recombivax HB®, PREHEVBRIO® ve HEPSILAV-B® iken HPV aşıları ise Gardasil®, Gardasil 9® ve Cervarix®’tir [92]. Kanser ve aşı kelimeleri ile klinik çalışmalar tarandığında, 2300’ü aşan farklı fazlarda devam eden ya da tamamlanmış çalışma listelenmektedir [93].

2.6.3. İmmün Düzenleyiciler

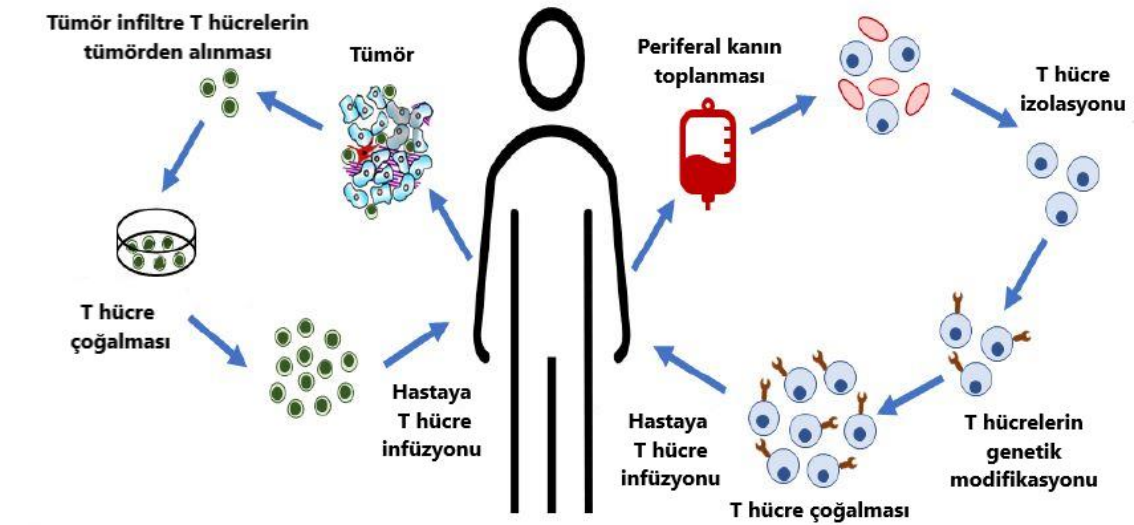
İmmün kontrol noktaları otoimmünite ve immünopatolojiden korunmak için normal hücrelerde bulunur, ancak bu mekanizma çoğunlukla tümör hücreleri tarafından bağışıklık sistemi hücrelerinden kaçınmak için kullanılmaktadır [94]. Bu sebeple bu noktaların inhibe edilmesi amacı ile immün kontrol noktası blokörleri (ICI veya ICB) geliştirilmiştir. Bu kontrol noktaları; T hücresi üzerinde bulunan CTLA-4 ve PD-1 ile tümör hücresi üzerinde bulunan PD-L1 olarak adlandırılan ve ko-

stimülasyonu sağlayan yapılardır. Kanseri hücresi, kendi MHC molekülü üzerinde sergilediği antijenik yapısını T hücresi reseptörüne sunarken; bu yapılar aktive halde kalırsa sitotoksik T-lenfosit ilişkili protein-4 (CTLA-4) ve CD80/86 veya PD-1 ve PD-L1 etkileşimi ile T hücresi inaktivasyonunu sağlayarak immün sistemden kaçmaktadır [95, 96]. Bu amaçla kolorektal kanser tedavisinde immün kontrol noktası inhibitörlerinden pembrolizumab (Keytruda®), nivolumab (Opdivo®) ve ipilimumab (Yervoy®) FDA onaylı olarak klinikte uygulanmaktadır.

Sitokinler, farklı immün sistem hücrelerinden salgılanarak immün ve enflamatuvar mekanizmaları ve immün sistem hücreleri arasındaki etkileşimi düzenleyen moleküllerdir.

2.6.4. Adoptif Hücresel Terapi

Adoptif hücresel terapi; hastanın kanından T lenfositlerin izole edilmesi, T hücrelerin aktivasyonu veya gen modifikasyonu ile düzenlenmesi ve hücre kültürü ortamında çoğaltılıp tekrar hastaya enjeksiyonunu içermektedir (Şekil 2.7.). Bu yolla tümör hücresi reseptörleri (TCR) ve kimerik antijen reseptörleri (CAR-T) ile düzenlenmiş T hücreleri, tümör hücresinden infiltre edilen lenfositler (TIL) tedavide etkinlik açısından değerlendirilmiştir. CAR-T terapisi için FDA tarafından onay alan Kymriah® ve Yescarta® olmak üzere iki ürün lenfoma tedavisinde kullanılmaktadır [97]. Ayrıca Tecartus® (lenfoma, lösemi), Brexanzi® (lenfoma), Abecma® ve Carvykti® (miyeloma) FDA tarafından onaylanan diğer CAR-T terapötikleridir [98]. Bu ürünler FDA veri tabanında Hücresel ve Gen Terapi Ürünleri, EMA veri tabanında ise İleri Tedavi Tıbbi Ürünleri (ATMPs) listesinde yer almaktadır. FDA veri tabanında 3 Ocak 2022’de güncellenen listede 23 ürün yer almaktadır [99]. FDA tarafından onay alan Sipuluecel-T® ve T-VEC® literatürde başlangıçta aşı olarak sınıflandırılmasına rağmen güncel durumda hücresel ve gen terapi ürünleri olarak sınıflandırılmışlardır [65, 100, 101]. Bu ürünler sırası ile mesane kanseri ve melanoma kanseri tedavisinde kullanılmaktadır. EMA ise ileri tedavi tıbbi ürünlerini gen tedavisi tıbbi ürünleri (12 ürün), somatik hücre tedavisi tıbbi ürünleri (3 ürün) ve doku mühendisliği ürünleri (4 ürün) olarak ayırmaktadır [102].



Şekil 2. 7. Adoptif hücresel terapi yaklaşım örnekleri [6].

2.7. İnterlökin-2

Sitokinler büyük bir protein ailesi olup, interlökinler (IL), interferonlar (IFN), koloni uyarıcı faktörler (CMF), tümör nekroz faktör (TNF) ve transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β) protein yapılarından oluşmaktadır. Bazı sitokinler immün sistem hücre ve yapılarının uyarılmasından, bazıları ise immün sistemin inhibisyonundan sorumludurlar. Örnek vermek gerekirse; IL-2, T hücresi farklılaşması ve uyarımının yanı sıra B hücre ve NK hücrelerinin aktivasyonunda görev almaktadır. TGF- β ise tüm bu hücrelerin etkinleşme ve çoğalmasını baskılamaktadır. Kanser tedavisinde IFN- γ , IFN- α , granülosit-koloni uyarıcı faktör (G-CSF) ve rekombinant IL-1, IL-2, IL-11, eritropoietin FDA tarafından onaylanan sitokinlerdir [103].

İnterlökin-2 (IL-2) ilk olarak “T hücresi büyüme hormonu” olarak 1976 yılında, aktive (efektör) T hücrelerinin süpernatantında keşfedilmiştir. Sonrasında yapılan çalışmalarda doğal öldürücü hücrelerin çoğalma ve etkinleşmesini sağladığı, düzenleyici T hücrelerinin gelişimini, sağ kalımını ve işlevini desteklediği gösterilmiştir [104].

IL-2; immün sistem hücreleri arasında iletişim sağlayan protein yapıdaki sitokinlerden biridir. IL-2’nin klinikte kullanımı metastatik renal hücre karsinoması (1992) ve melanomada (1998) FDA onayı almasıyla başlamıştır [105]. EMA renal hücre karsinomasında inhalasyon yoluyla kullanımını 2006’da onaylamıştır.

IL-2, naif (uyarılmamış) T hücresinden salgılanmaktadır ve T hücresinin efektör ve hafıza T hücresine dönüşümünü regüle etmektedir. Farklı sitokinlerin de salgılanmasını uyarak immün yanıtın farklı mekanizmalar üzerinden artmasını ya da azalmasını sağlamaktadır. IFN- γ salgılanmasını indükler ve bu da makrofaj, B ve T hücrelerinin aktivasyonunu uyarmaktadır. Bcl-2 antiapoptotik proteinini indükleyerek T hücrelerinin hayatta kalmasını sağlamaktadır. Öte yandan Treg hücrelerini uyarak, immün mekanizmanın inhibisyonunu, IL-10 ve TGF- β salımı ile sağlamaktadır [65]. Treg hücrelerinin uyarımı ile otoimmünite oluşumu engellenmekte ve immün sistemde denge sağlanmaktadır [104].

Piyasada Proleukin (Aldesleukin) olarak 1992 yılından itibaren bulunan IL-2, klinikte iv. infüzyon veya enjeksiyon yoluyla kullanılmaktadır. IL-2'nin yarılanma ömrü 7 dakikadır [106] ve bu durum tedavide etkinliğin sağlanabilmesi için yüksek doz ve tekrarlayan tedaviyi gerektirmektedir [104, 107]. Ancak bu uygulama sonucunda, IL-10 ve TGF- β salımı sonucu kılcal sızıntı sendromu ve nötrofil fonksiyonunun bozulması pleiotropik etkilere sebep olarak ciddi yan etkiler oluşturmaktadır [65, 108, 109]. Pleiotropik etki, çeşitli hücrelerce üretilme ve çok farklı hücrelere etki edebilme özelliği olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca yüksek doz IL-2 tedavisi ishal, ateş / titreme, aritmi, dispne, böbrek fonksiyon bozukluğu dahil olmak üzere tedavi uygulananların %80'den fazlasında istenmeyen etkiye sebep olmaktadır. Yüksek doz IL-2 sitotoksik T lenfositleri ve NK hücrelerini artırır ve tümörde küçülmeye neden olurken düşük doz uygulanması Treg hücreleri uyarmaktadır [110, 111]. Düşük doz ve uzun süreli IL-2 tedavisinin güvenli olduğu ve NK hücrelerinin sayısının arttığı gözlenmiştir [112]. Ayrıca tekrarlanan lenfosit uyarımı sonucu aktivasyon-indüklü hücre ölümü artmaktadır [110]. Bu sebeplerle olası ciddi yan etkileri azaltmak için ve düşük dozda uzatılmış yarılanma ömrüne sahip, terapötik etkinliği devam eden IL-2 içeren sistemlerin geliştirilmesi yönünde farklı yaklaşımlarda bulunulmuştur (Tablo 2.3.).

Tablo 2.3. İnterleukin-2 taşıyan ve kanser tedavisini hedefleyen nanopartiküler sistemler ile ilgili literatür örnekleri.

Nano boyutlu taşıyıcı sistem	Polimer	Kombinasyon	Sonuç	Kaynak
Nanolipozomal jel	Siklodekstrin	TGF- β inhibitörü	Melanoma tümör modelinde immün uyarımda ve sağ kalımda artma	[113]
Virüs benzeri partikül (VLP)	Antigen kapsid protein grubu (Rous sarcoma virüs)	Kısa zincirli fragman	Kolon kanseri tümör modelinde makrofaj uyarımı ve TNF- α salımı	[114]
Nanopartikül	Kitosan	Doksorubisin	Karaciğer tümör modelinde büyümede gecikme ve Ig G seviyesinde artma	[115]
Nanojel	Kitosan ve hidroksipropil- β -siklodekstrin	Paklitaksel	Melanomada tümör içine penetrasyonda ve immün uyarımda artma	[116]
Termosünger nanopartikül	PEGile-PLGA	Paklitaksel	Melanomada sinerjik etki ile immün yanıtta artma	[117]
Nanojel	PEG-b-poli-(L-lizin)	-	Melanomada T hücresi yorgunluğunda azalma, uzatılmış salım ve tümöre duyarlı T hücresi seviyesinde artma	[108]
pH duyarlı nanojel	PDEA-co-HP- β -cyclodextrin-co-Pluronic F127	Paklitaksel	Meme kanserinde dendritik hücre uyarımı ve immün infiltrasyonda artma	[118]

PEGile sistemler, IL-2 kompleksleri, liposomal sistemler, viral ve plazmit vektörler bu yaklaşımlara örneklerdir [113]. Bu kapsamda, IL-2 yüklü lipozom formülasyonu hazırlanmış ancak CTLL-2 fare sitotoksik T hücresi hattında serbest IL-

2'ye göre aktivitesinin 7 ile 10 kat aralığında azaldığı belirlenmiştir [119]. Yapılan bir başka çalışmada, IL-2 yüklü β -CD nanopleksleri hazırlanmış ve melanoma tedavisinde etkinliği, IL-2 geni taşıyan adenovirüs ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, CD nanoplekslerin IL-2 taşınımında daha etkili ve güvenli olduğu görülmüştür [120].

Başka bir çalışmada, prostat kanseri tedavisi için IL-2 ve β -CD nanokompozitler hazırlanmış ve CD'lerin, lenfosit, doğal öldürücü hücreler ve makrofaj gibi periferik kan hücrelerini IL-2'nin tek başına verilmesine kıyasla daha fazla arttırdığı gözlenmiştir [121]. IL-2'nin enkapsüle edilerek PLGA polimeri ile hazırlanan mikropartiküler sistemde CD8⁺ T hücresi seviyesinin *in vitro*'da arttığı ve biyoaktivitenin arttığı, bu durumun sebebinin lokal olarak IL-2 seviyesinin artışı olabileceği belirtilmiştir [104, 122]. Zhao ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, IL-2 dekstran polimerine yüklenmiş ve PLGA/PLA kopolimeri içerisinde enkapsüle edilmiştir. Sistemin etkinliği kolon kanserinde değerlendirilmiş ve IL-2 çözeltisinde kıyasla daha etkili olduğu bulunmuştur [123]. Ancak tek başına oluşan etkinliğin yeterli olmadığı ve kombinasyonların tedavide daha iyi etkinlik sağlayacağı yönünde sonuçlar bildirilmiştir.

Park ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada TGF- β inhibitörü ve IL-2'yi birlikte içeren β -siklodekstrin ile nanolipozomal jel formülasyonu hazırlanmıştır. Tümör mikroçevresinde TGF- β 'nın immün sistemi baskılayıcı etkilerinin azaldığı ve melanoma-indüklenmiş farelerde tümörde küçülme, sağ kalımda artma, CD8⁺ T hücreleri ve NK hücrelerinin seviyesinde artma gözlenmiştir [113].

İmmünokemoterapi kombine yaklaşımı ile farklı nanopartiküler sistemler hazırlanmıştır. Bir çalışmada, paklitaksel ve IL-2 yüklü kitosan nanojel formülasyonu hazırlanmış ve bu yapı eritrosit membran kaplama materyali içerisine hapsedilmiştir. Yapılan *in vitro*- *in vivo* çalışmalar sonucunda dendritik hücre ve sitotoksik T hücrelerinin sayılarının arttığı, Treg hücrelerinin azalarak immün sistemi uyaran sitokinlerin de etkisiyle antitümoral etkinliğin arttığı gözlenmiştir [124]. Kitosan temelli bir başka çalışmada doksorubisin ve IL-2 içeren nanopartiküller karaciğer tümörlü farelere uygulanmış ve sonuç olarak tümör gelişiminin azaldığı, dendritik hücre, NK hücreleri gibi farklı immün sistemi uyaran hücre tiplerinde artış olduğu görülmüştür [115]. Zhao ve arkadaşları ise paklitaksel ve IL-2 yüklü PEGile-PLGA

termosünger nanopartiküller hazırlamışlardır. Melanoma modelinde gerçekleştirilen *in vivo* çalışmalar sonucunda sinerjik bir etki gözlenmiş ve antitümör immün yanıtın oluştuğu belirlenmiştir [117].

2.8. Siklodekstrin

Siklodekstrinler (CD), nişastanın α -1,4-glikozidik bağı ile bağlı glukopiranoz ünitelerinden oluşan siklik oligosakkaritlerdir. Nişastanın glikotransferaz enzimi ile parçalanması sonucu oluşan doğal polimerlerdir. CD'ler glikopiranoz birimlerinin sandalye konformasyonuna sahip ve 3 boyutlu yapısı kesik koni şeklindedir. Glikopiranoz ünitelerinin sayısına göre 6, 7 veya 8 ünite olarak, sırasıyla α -, β - ve γ -CD şeklinde isimlendirilmektedir. Siklodekstrinlerin dış yüzeyi hidrofilik ve iç kavileri hidrofobiktir. Hidrofobik iç kavite ile hidrofobik yapıdaki farmasötik aktif bileşenler kompleks oluşturur ve bu bileşenler suda çözünür, daha stabil ve daha az yan etkiye sahip bir yapıya kavuşur [125, 126]. İç kavitesine hapsettiği hidrofobik moleküllerle inklüzyon kompleksi oluşturmakta ve hidrofilik dış yüzeyi sayesinde bu bileşiğin suda çözünürlüğünü artırmaktadır [125, 127].

Farklı CD türevleri medikal ürünlerin içeriğinde bulunmaktadır. EMA'nın 2017'de yayımlanan "Cyclodextrins used as excipients" raporunda, tablet, supozituar, parenteral çözelti, oral çözelti, göz damlası, nazal sprey ve dermal preparatlarda bulunduğu belirtilmektedir. Bu preparatlarda bulunan CD türevleri; α -CD, β -CD, γ -CD, sülfobütiler- β -CD, hidroksipropil- β -CD ve randomize metil- β -CD'dir. 2000-2004 yılları arasında α -CD, β -CD ve γ -CD türevleri FDA GRAS (Genellikle Güvenli Kabul Edilir) statüsünde yer almıştır. α -CD ve β -CD gıda bileşeni olarak da kabul edilmekte, bu türevler ile ve hidroksipropil- γ -CD ise FDA İnaktif Farmasötik Bileşenler listesinde yer almaktadır [128]. Ayrıca bu türevlerin kullanım miktarları, etiketlerinde yer alması gereken bilgiler EMA'nın "Excipients in the labelling and package leaflet of medicinal products for human use" rehberinde 2019'de güncellenerek yayınlanmıştır [129]. Bu rehberde siklodekstrinler için yer alan bilgiler Tablo 2.4.'te sunulmuştur.

Tablo 2. 4. EMA tarafından yayınlanan “Beşeri tıbbi ürünlerin etiketlenmesinde ve prospektüsünde yer alan yardımcı maddeler” rehberinde siklodekstrinler için sunulan bilgiler.

İsim	Güncellenme Tarihi	Uygulama Yolu	Eşik Değeri	Kullanma Talimatı İçin Bilgi
Siklodekstrinler <i>Örneğin:</i> <i>Alfadex</i> <i>Betadex (E 459)</i> <i>γ Siklodekstrin</i> <i>Sülfobütil-eter-β-siklodekstrin (SBE-β-CD)</i> <i>Hidroksipropil betadex</i> <i>Ramdomize Metile β-siklodekstrin (RM- β-CD)</i>	9.10.2017	Tümü	20 mg/kg/gün	Bu ilaç her dozaj birimi-birim hacimde x mg/ağırlık-hacim eşdeğerinde x mg siklodekstrin(ler) içerir. Doktorunuz tarafından tavsiye edilmedikçe 2 yaşından küçük çocuklarda kullanmayınız.
Siklodekstrinler <i>Örneğin:</i> <i>Alfadex</i> <i>Betadex (E 459)</i> <i>γ Siklodekstrin</i> <i>Sülfobütil-eter-β-siklodekstrin (SBE-β-CD)</i> <i>Hidroksipropil betadex</i> <i>Ramdomize Metile β-siklodekstrin (RM- β-CD)</i>	9.10.2017	Oral	200 mg/kg/gün	Siklodekstrinler diyare gibi sindirim sorunlarına sebep olabilir.
Siklodekstrinler <i>Örneğin:</i> <i>Alfadex</i> <i>Betadex (E 459)</i> <i>γ Siklodekstrin</i> <i>Sülfobütil-eter-β-siklodekstrin (SBE-β-CD)</i> <i>Hidroksipropil betadex</i> <i>Ramdomize Metile β-siklodekstrin (RM- β-CD)</i>	9.10.2017	Parenteral	200 mg/kg/gün (2 hafta üzeri kullanımda)	Böbrek hastalığınız varsa, bu ilacı almadan önce doktorunuzla konuşun.

Günümüzde devam etmekte olan pandemi sürecinde çalışmaları tamamlanarak çeşitli ülkelerde onaylanan ve DSÖ'nün Acil Kullanım Listesinde yer alan aşılar firma-ticari isim olarak sunulmaktadır;

- RNA aşıları; Pfizer/BioNTech Comirnaty® ve Moderna Spikevax®,
- Protein alt ünitesi aşıları; Serum Institute of India Covovax®, Novavax Nuvaxovid®,
- Replike olmayan viral vektör aşıları; Serum Institute of India Covishield® ve Oxford/AstraZeneca Vaxzevria®, Janssen Ad26.COV2.S®, CanSino
- İnaktive aşılar; Sinopharm Covilo®, Sinovac CoronaVac®, Bharat COVAXIN® aşılardır.

2 Ağustos 2022'de güncellenen bu listedeki 11 aşı köken olarak RNA, protein alt ünitesi, replike olmayan viral vektör, inaktive aşılardır [130, 131]. Bu aşılarından replike olmayan viral vektörle hazırlanan Janssen/Ad26.COV2.S® aşısının bileşenlerinden biri 2-hidroksipropil- β -CD'dir. Siklodekstrinle birlikte polisorbitat 80, trisodyum sitrat dihidrat, sodyum klorür, sitrik asit monohidrat ve etanol aşının üretiminde, nakledilmesinde ve kişiye uygulanana kadar saklanırken aşının stabil kalması için kullanılmaktadırlar [132].

Literatürde CD'lerin, IL-2 taşınmasında kullanıldığı çalışmalar mevcuttur (Tablo 2.5.). Yapılan bir çalışmada, IL-2 yüklü β -CD nanopleksleri hazırlanmış ve melanoma tedavisinde etkinliği, IL-2 geni taşıyan adenovirüs ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, CD nanoplekslerin IL-2 taşınımında daha etkili ve güvenli olduğu görülmüştür [120]. Başka bir çalışmada, prostat kanseri tedavisi için IL-2 ve β -CD nanokompozitler hazırlanmış ve CD'lerin, periferik kan hücrelerini IL-2'nin tek başına verilmesine kıyasla daha fazla arttırdığı gözlenmiştir [121].

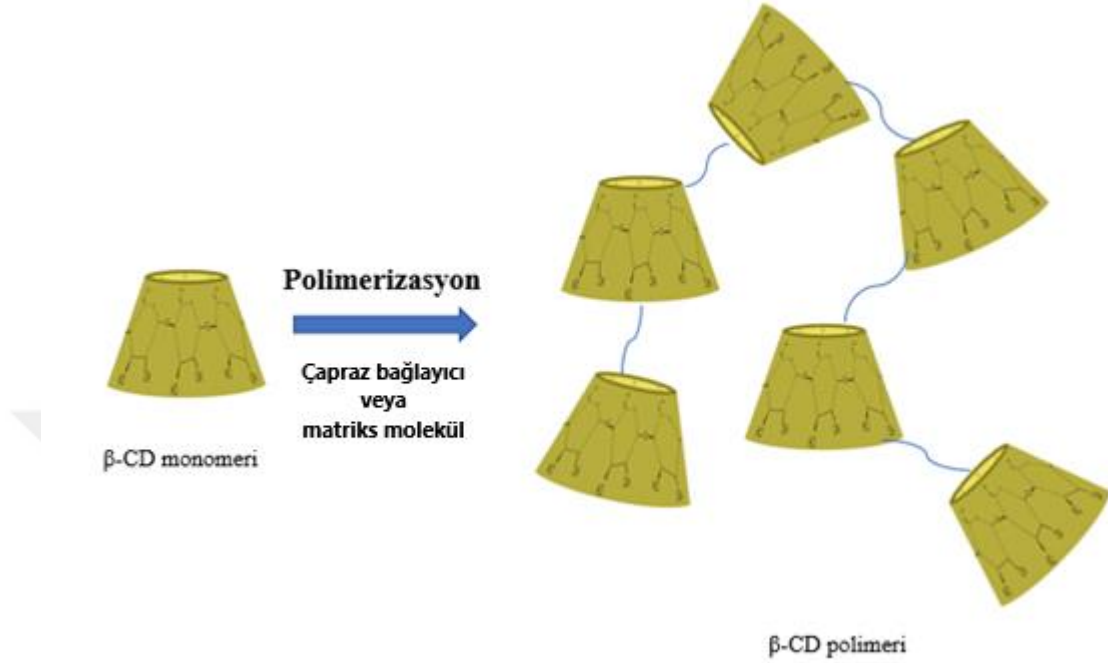
Tablo 2.5. β -CD veya türevleri ile hazırlanmış ve kanser tedavisini hedefleyen 5-FU veya IL-2 içeren taşıyıcı sistemler ile ilgili literatürde yer alan çalışma örnekleri.

Taşıyıcı sistem	Kanser	Kombinasyon	Sonuç	Kaynak
β -CD nanopleks (IL-2)	Melanoma	-	Gen taşıyan sisteme göre daha etkili ve güvenli sistem	[120]
β -CD nanokompozit (IL-2)	Prostat kanseri	-	Serbest IL-2'ye göre immün yanıtta artma	[121]
İnklüzyon kompleksi (HP- β -CD) (5-FU)	Kolorektal kanser	-	Uzatılmış salım, artan taşıma etkinliği ve hücresel alım	[133]
İnklüzyon (β -CD) kompleksi (5-FU)	Kolorektal kanser	-	IC ₅₀ değerinde %60 azalma (48 ve 72. Saat)	[134]
Nanoçiçek (Katyonik- β -CD) (5-FU)	-	Polimer: Kitosan ve aljinat	Uzatılmış salım, konsantrasyon bağımlı sağlıklı hücrede %90 sitotoksiste	[135]
Hidrojel (β -CD) (5-FU)	-	Polimer: Ksolan	%98 oranında 5-FU yüklenmesi, kontrollü salım	[136]
Adamantan-modifiye β -CD-kuantum dot nanopartikül (5-FU)	Kolorektal kanser	İlaç: miRNA-34a	Tümör büyümesinde baskılanma ve kolorektal kanserli hasta-kökenli ksenograft modelde hedefli ve etkin tedavi	[137]

2.8.1. Siklodektrin Polimerleri

CD polimerleri, birçok CD monomerini yapısında taşıyan bir makromoleküldür (Şekil 2.8.). Bu makromoleküldeki siklodektrin ünitelerinin birbirine yakınlığı, ilaç molekülleri ile etkileşimi kolaylaştırmaktadır. Ayrıca polimerik yapı, ilaçlar ile nanopartikül ve miseller kompleks oluşturma olanağı sağlamaktadır [138]. Suda çözünür ya da suda çözünmeyen yapıya sahip CD polimerler sentezlenebilmektedir. CD polimerlerin, monomerik yapıdaki CD türevine göre CD rotasyonunu kısıtlayabildiği ancak CD halkalarının birbirine olan yakınlığının kompleksleşmeyi arttırabildiği belirtilmektedir [139]. Ek olarak, CD polimerlerin nano boyutlu taşıyıcı olarak kullanımında ilacın yapısına uygun olarak

tasarlanması ve etkileşimin artırılması ile inklüzyon komplekslerinin oluşturulması çalışmaları yapılmaktadır [140].



Şekil 2. 8. CD polimer yapısı.

CD polimerlerin sentezinde; çapraz bağlayıcılar kullanılarak CD monomerlerinin birleştirilmesi veya bu monomerlerin bir matriks maddesine kovalan olarak bağlanması olmak üzere iki farklı yöntem izlenebilmektedir. Çapraz bağlayıcı kullanarak yapılan sentezde, başlangıç CD monomeri, kullanılan çapraz bağlayıcı ve bunlar arasındaki molar oran elde edilecek polimerin kimyasal özelliklerini, yoğunluk, yüzey alan ve gözenek yapısını etkilemektedir [141]. Çapraz bağlayıcılara epiklorohidrin, fenilizosiyanat, difenil karbonat ve heksametilen diizosiyanat örnek verilebilir [142].

İkinci yöntem olan kovalan bağlamada ise, CD monomerinin hidroksil (-OH) grupları vinil gruplarıyla fonksiyonelleştirilerek metil metakrilat gibi komonomerlerin varlığında matriks yapısına bağlanması ile CD polimeri oluşturulmaktadır [141]. Kullanılan matriks yapılar arasında dekstran ve kitosan bulunmaktadır [143]. CD polimerler de monomerik yapılarla benzer olarak; ilaç, tekstil, gıda ve çevre alanlarında kullanılmaktadır [141].

Siklodekstrin polimerlerinin, uygun siklodekstrin türevlerinin dallanması (dallanma öncesi modifikasyon) veya siklodekstrin polimerlerinin türevlenmesi (dallanma sonrası modifikasyon) yoluyla bu yapıya nötr veya iyonik fonksiyonel grupların eklenmesiyle türevlendirme çalışmaları gerçekleştirilmektedir. Bu çalışmalar siklodekstrinlerde bulunan hidroksi gruplarıyla reaksiyona girebilen epiklorohidrin gibi dallanma reaktifleriyle gerçekleştirilmektedir [139].

Suda çözünür bir CD polimeri, doğal β -CD yapısının epiklorohidrin ile çapraz bağlama reaksiyonuna sokularak elde edilmiş ve bu yapıların inklüzyon kompleksi oluşturabildiği bilinmektedir [144]. Bu kompleks yapı, polimere karşıt yüke sahip bir ilaç yapısı ile oluştuğunda daha güçlü etkileşim sergilenmektedir. Ayrıca epiklorohidrin- β -CD'nin ilacın çözünürlüğü ve biyoyararlanımını insan gönüllülerinde yapılan çalışmalarla arttırdığı bulunmuştur. İnsülin ile katyonik epiklorohidrin- β -CD arasında fiziksel karıştırma sonrası kitosan/aljinatla yüzey modifikasyonu yapılan 350 nm partikül boyutuna sahip nanoküre ve nanopartiküller hazırlanmıştır. Oluşan nanopartiküllerin oral uygulama çalışmaları gerçekleştirilmiş ve insülinin gastrik bozunmadan korunarak kontrollü salımının gerçekleştiği gözlenmiştir [145].

CD polimerler epiklorohidrin dışında hidroksi grupları ile reaksiyona girebilen reaktifler kullanılarak oluşturulabilmektedir [139]. İlaveten CD polimerlerinin küçük moleküllü ilaçları uzun süre salabildikleri gösterilmiştir [146]. Ayrıca, CRLX-101, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve rektal kanser tedavisi için klinik çalışmaların Faz 2 aşamasına ulaşmış olan β -CD polimerlerine bağlı kamptotesinden oluşan bir nanoparçacıktır [138, 147].

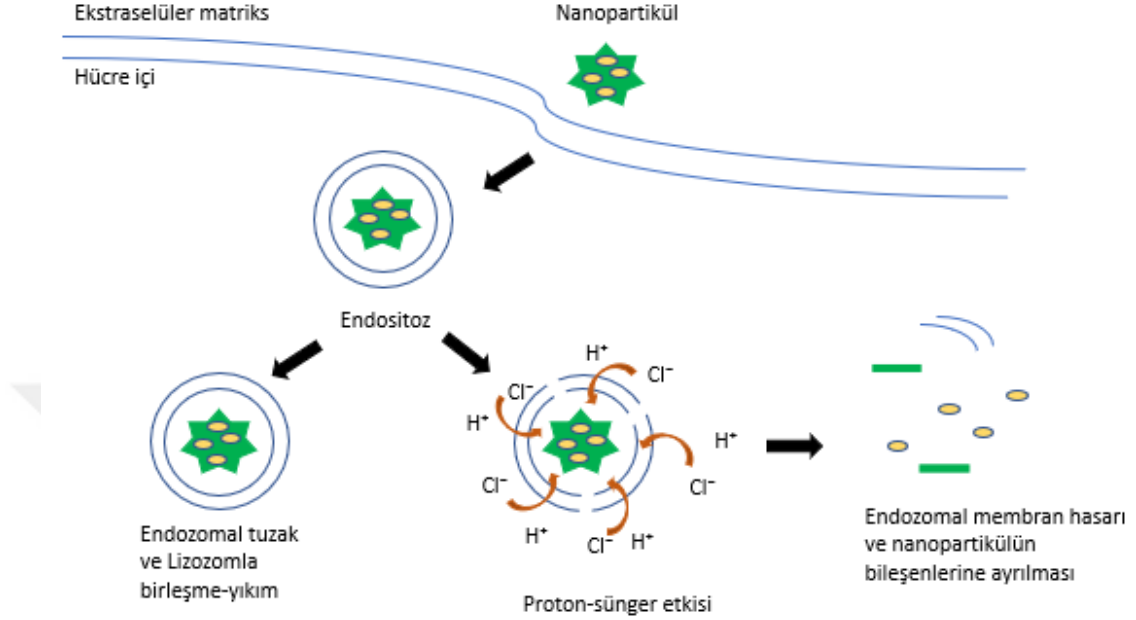
Polikatyonik CD polimerler ile antikanser ilaç ve gen yapılarını birlikte taşıyan nanopartiküler sistemlerin farklı kanser türlerinde etkinlikleri denenmiştir. Polikatyonik β -CD polimeri kullanılan ve doksorubisin ile p53 plazmid yapısı yüklenen nanopartikül sisteminin MCF-7 meme kanseri hücre hattında büyümeyi inhibe edici etkisi olduğu, *in vivoda* ise sağ kalımın arttığı gösterilmiştir [148]. Polikatyonik γ -CD polimerine paklitaksel ve p53 plazmidi yüklendiğinde ise folat reseptörü pozitif kanser hücre hatlarında apoptozun indüklendiği gözlenmiştir [149].

Katyonik β -CD polimeri epiklorohidrin ile polikondanse edilerek hazırlanmış ve bu polimerin 5-FU ile inklüzyon kompleksinin kitosan/aljinat ile kaplanması ile

“nanoçiçek” adı verilen bir taşıyıcı sistem oluşturulmuştur. Oral uygulaması amaçlanan bu sistem 300 nm partikül boyutuna ve %77 ilaç yükleme kapasitesi ile uzatılmış salım sağlayabilmiştir. Sağlıklı fare fibroblast hücrelerinde (L929) yapılan sitotoksikite çalışmalarında nanosistem içindeki artan 5-FU dozu (20 µg/mL’den 100 µg/mL’ye) ile canlılığın %100’den %90’a azaldığı 24 saat sonunda gözlenmiştir [135]. Li ve arkadaşlarının doksorubisin ve dosetaksel yüklü β-CD polimeri ile hazırlanan inklüzyon komplekslerinin hedeflendirme ajanları ile kombinasyonu ile hazırlanan nanopartiküler sistemin etkinliği karaciğer, lösemi ve serviks kanser hücrelerinde değerlendirilmiştir. Bu sistemlerin yaklaşık 100 nm partikül büyüklüğünde, 24 saatlik salım sergiledikleri ve antitümöral etkinliğin bu nanopartikül sistem ile serbest ilaçlara göre arttığı gözlenmiştir [150].

Katyonik polimerlerin en büyük üstünlüklerinden biri de artan amino grup sayısı ile artış gösteren ve hücresel alımı kolaylaştırarak endozomal lizisten kaçışı sağlayan mekanizma “**proton sünger etkisi**” dir. Polimer, proton (H^+) ve karşı iyonların (Cl^-) endozom içine çekilmesi ozmotik gradyanın bozulmasıyla sonuçlanır. Ozmotik gradyanı dengeleme girişiminde artan ozmolarite sonucu, endozom içine su akışı meydana gelir, bu durum endozomun yırtılmasıyla sonuçlanır (Şekil 2.9.). Polimerin taşıdığı yapı sitoplazmaya salınarak etkinliğini bu mekanizma sonucu gösterir. Literatürde tümör hücresi tarafından alındıktan sonra nanopartikülün bu mekanizma ile lizisten kaçtığı ve sonuçta terapötik etkinin sağlandığı belirtilmektedir [151]. Polikasyonik siklodekstrinlerin de endozomal kaçışı proton sünger etkisi ile teşvik ettiği gösterilmiştir [152]. Siklodekstrinlerin transfeksiyon etkinliklerinin yüksek olduğu ve endozomal kaçışı sağladığı bu yüzden gen taşıyıcı sistemlerde kullanıldığı çeşitli çalışmalar mevcuttur [153]. Farklı polimerlerle kombine edilen farklı CD türevlerinin de bulunduğu gen taşıyıcı sistemlerde de bu etki gösterilmiştir [154, 155]. Endozomal kaçış, biyolojik materyallerin taşınımının ve etkinliğinin artırılmasında önemli bir mekanizmadır [156]. Ayrıca siklodekstrinlerin doğal olarak membran hasarı verdikleri bilinmektedir. Siklodekstrinlerin hücre membranındaki kolesterolü uzaklaştırarak hücrenin yıkımına sebep olduğu kanıtlanmıştır. Metil-β-CD türevi klinikte bu etki mekanizması ile kullanılmaktadır [157]. Kolesterol içeriğinin kanser hücrelerinde sağlıklı hücreden daha fazla olduğu bilinmektedir. Farklı CD türevlerinin kolesterolü uzaklaştırma etkinliği üzerine çalışmalar yapılmaktadır.

Yaptığımız bir çalışmada, membrandan uzaklaştırılan kolesterol içeriğinin kanser hücresinin tipine ve CD türüne bağlı olarak değiştiği tespit edilmiştir [158].



Şekil 2. 9. Proton sünger etkisi ve endozomal kaçış [159].

2.8.2. Siklodekstrinlerin Kanserde Kullanımı

Siklodekstrinlerle 1978-Nisan 2021 arasında yapılan ve PubMed veri tabanında listelenen 5000'den fazla akademik çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalar etkinlik açısından sınıflandırıldığında antioksidan ve antimikrobiyal etkiden sonra antikanser etki en çok araştırılan üçüncü etkinliktir. Kemoterapötiklerin CD'ler ile kompleksleri hazırlanmış ve *in vitro*- *in vivo* olarak etkinlikleri değerlendirilmiştir. Bu kemoterapötiklerden örneğin paklitaksel [160], kamptotesin [161], tamoksifen [162], erlotinib [158], kurkumin [163], oksaliplatin, doksorubisin [164] ve 5-FU'nun [135] var olan toksisitelerinin azaltılarak etkinlik, stabilite, çözünürlük, biyoyararlanımlarının CD ile modifikasyonu sonucunda artırılması amaçlanmıştır [165]. Meme, kolon, akciğer, karaciğer kanserleri ve melanoma kanseri CD türevlerinin kemoterapötiklerle etkinliklerinin *in vitro* ve *in vivo* olarak değerlendirildiği kanserlerdendir. Klinik çalışma olarak ise CRLX-101'in, kamptotesin siklodekstrin nanopartikülü, akciğer, prostat kanseri, solid tümörler ve

melanoma tedavisine yönelik çalışmaları farklı fazlarda devam etmektedir. Monoterapinin yanı sıra bevasizumabla CRLX-101 kombinasyonunun uygulandığı bir çalışmada, over kanserinde klinik yararın artırıldığı Faz 2 çalışmalarında gösterilmiştir [166].

Siklodekstrinlerle hazırlanan ilaç taşıyıcı sistem ve nanosistemlerin oral ve parantral uygulama yolu ile *in vivo*'da etkinlikleri araştırılmaktadır. Oral uygulama kapsamında yapılan bir çalışmada, tamoksifen içeren metil- β -CD komplekslerin etkinliği sıçanlarda değerlendirilmiştir. Tamoksifen içeren ticari tablete göre tamoksifen metil- β -CD kompleks içeren tablette biyoyararlanımın arttığı bulunmuştur [162]. Bir başka çalışmada ise, kamptotesin yüklü polikasyonik amfililik CD (PC β CDC6) nanopartiküllerin kolon kanserindeki etkinliği araştırılmış ve enkapsüle haldeki ilacın hedef doku olan kolona aktif formda ulaştığı, serbest ilaca göre tümör dokularının küçülerek sağkalımın arttığı gözlenmiştir [161].

Parenteral uygulama kapsamında *in vitro* olarak ilerlettiğimiz bir çalışmada erlotinib yüklü PC β CDC6 nanopartiküllerinin karaciğer ve akciğer kanser hücrelerinde, sırasıyla HepG2 ve A549 hücreleri, hücre zarından kolesterolü metil- β -CD türevinden daha yüksek oranda uzaklaştırdığı belirlenmiştir. Aynı çalışmada sadece HepG2 ve sadece A549 hücrelerinden oluşturulan 3B tümör modellerinde, bu nanopartiküllerin 3B yapının daha derinine ulaştığını tespit edilmiştir [158]. Başka bir çalışmada ise paklitaksel yüklü PC β CDC6 ve heptakis (6-O-heksanoil) siklomaltoheptoz β -CD (6OCapro β CD) nanopartikülleri meme kanseri indüklenmiş farelere intraperitoneal enjeksiyonla uygulanmıştır. Bu tedavi rejimiyle klinikteki paklitaksel uygulamasında görülen kardiyak toksisitenin oluşmadığı belirlenmiştir. Ayrıca, boş ve ilaç yüklü CD nanopartiküllerinin tümör hacmini azalttığı gözlenmiş ve CD'lerin tek başına var olan etkinliklerine dair veri elde edilmiştir [160].

Kemoterapinin yanı sıra siklodekstrinler ile protein tedavisi, gen tedavisi, immünoterapi, fototerapi ve teranostik amaçlı olarak kanserin tanı ve tedavisinde uygulanmak üzere çalışılmaktadır. Bu çalışmalar arasında gen taşıyıcı sistem olarak plazmid DNA, p53 geni, siRNA ve miRNA içeren; IL-2 ve IFN α sitokinlerini içeren ve CpG adjuvanını içeren nanopartiküller yer almaktadır. Fototerapötik olarak porfirin ve tungsten nitrit taşıyan; teranostik olarak ise polidopamin ve tetrafenil etilen taşıyan nanopartiküllerin kanserdeki etkinlikleri araştırılmıştır [167].

2.9. Nanoteknolojinin Tıpta Uygulanması Yaklaşımlarından Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler

Uygulanan ilaç tedavilerinde etkin maddenin hedeflenen bölgeye belirli bir süre içerisinde ve etkili olabileceği doz olan terapötik pencere aralığında varması istenmektedir. Oral ve parenteral uygulama ilaç tedavisinde sık tercih edilen yollardır. İlacın absorpsiyonu, dağılımı ve metabolizasyonu oral uygulama için, ilacın dağılımı ve metabolizasyonu parenteral uygulama için etkinliği kısıtlayan parametrelerdir. İlaç araştırmalarında bu kapsamda hedeflenen bölgede etkin dozun birikimini sağlamak için yaklaşımlar geliştirilmiştir. Bu yaklaşımlardan biri olan nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler kanser tedavisinde çalışılmış ve birçok kemoterapötik etkin madde içeren nanopartiküler sistemler FDA onaylı olarak 1995'ten itibaren kullanılmaktadır [168]. FDA tarafından farklı hastalıkların tedavisinde onaylanan nanoilaç ürünleri 100'ün üzerindedir [169]. Pazardaki nanopartiküler ilaçların %35'i polimer bazlı, %29'u lipit-bazlı, %26'sı nanokristal ve %10'u polimerik olmayan inorganik/metalik sistemlerdir [170].

Nanoteknoloji terimi 1986'da kimya ile uğraşan bilim adamı K. Eric Drexler tarafından ilk kez kullanılmış ve sonrasında makine endüstrisi, atık su temizlenmesi, tekstil endüstrisi, biyoloji ve tıp alanlarına uygulanmıştır. Tıp alanında; tanı, tedavi, doku mühendisliği ve ilaç/gen taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde nanoteknolojiden yararlanılmaktadır [169].

Nanotıp kanser, enfeksiyon gibi yaşamı tehdit eden hastalıkların tedavisi için yeni olanaklar sunmaktadır. Nanotıpın kanser tedavisini hedefleyen uygulamalarında nanoboyutlu ilaç taşıyıcı sistemler kullanılarak, kanser ilaçlarının sahip olduğu biyodağılım ve farmakokinetik problemleri aşmak için, yeni ve etkili terapötik formülasyon stratejileri geliştirilmektedir. Nanoteknolojik ürünlerin bu alandaki en önemli üstünlüğü, nano boyutları sayesinde doğrudan hücre membranı ve hücreler arası yapılarla etkileşime girerek, ilaç direnciyle ilişkili mekanizmalardan kaçınılmasını sağlamalarıdır [52]. Ayrıca nanopartiküler sistem, taşıdığı ilacın, tümör içine geçişini ve burada birikimini artırmaktadır.

Nanopartiküller, mikron altı boyuta sahip polimer, lipit veya inorganik kökene sahip ilaç taşıyıcı sistemlerdir. İlaç taşıyıcı sistemlerin temelinde hedef doku ve hücrede pasif veya aktif hedeflendirme yoluyla birikme ve bu birikimi artırarak

sağlıklı hücrelerde toksisiteyi azaltma yaklaşımı vardır ve bunun farklı sistemler aracılığıyla sağlanmasına çalışılmaktadır. Pasif hedeflendirmede nanopartiküller, damar yapısı bozulan ve tümör içi basıncının etkisiyle tümör içine taşınmak üzere tasarlanmıştır. Aktif hedeflendirmede nanopartiküller, yüzeyde bulunan ligandların moleküler olarak tanınması yoluyla tümör-spesifik biyolojik yapılar ile etkileşime girecek ve hücre içine alınacak şekilde tasarlanmıştır [171].

Nanopartiküllerin partikül boyutu, yüzey yükü ve şeklinin yanı sıra ilaç yükleme etkinliği, uygun salım ve biyodağılım, serum/plazma stabilitesi, toksisite, immünojenisite, hedef dokuya/hücreye ulaşma ve hücre içi alım özellikleri taşıyıcı sistemin oluşturulması ve değerlendirilmesinde kullanılan parametrelerdir [168]. FDA tarafından onaylanan nanopartiküler ilaçlar; nanokristaller, lipozom ve lipit bazlı ürünler, polimer bazlı ürünler, protein bazlı ürünler, metal bazlı ürünler, dendrimer bazlı ürünler ve nanotüpler olarak nanopartikül tipine göre sınıflandırılarak Tablo 2.6.'da listelenmiştir.

Tablo 2.6. FDA tarafından onaylanmış ve piyasada bulunan nanopartikül temelli ilaçlar. [169, 170, 172, 173]

Nanopartikül Tipi	Ürün	Etkin Madde	Firma	Onay Yılı
Nanokristal	Avinza	Morfin Sülfat	Pfizer	2002
	Azopt	Brinzolamid	Novartis	1998
	Cesamet	Nobalin	Bausch	1985
	EquivaBone	Hidroksiapatit	Zimmer Biomet	2009
	Elixophyllin	Teofilin	Nostrum Labs Inc	1979
	Emend	Aprepitant	Merck & Co.	2003
	Focalin	Dekstrametülfenidat HCl	Novartis	2005
	Gris-peg	Griseofulvin	Novartis	1982
	Invega	Paliperidon	Janssen	2009
	Invega Sustenna	Paliperidon Palmitat	Janssen	2009
	Ivemend	Fosaprepitant dimeglumin	Merk & Co.	2008

Tablo 2.6. FDA tarafından onaylanmış ve piyasada bulunan nanopartikül temelli ilaçlar. [169, 170, 172, 173] **(Devam)**

Nanokristal	Megace ES	Megestrol Asetat	Par Pharmaceuticals	2001
	Naprelan	Naproksen Sodyum	Almatica	1996
	NanOss	Hidroksiapatit	RTI Surgical	2005
	OsSatura	Hidroksiapatit	Isotis Orthobiologics	2003
	Ostim	Kalsiyum Hidroksiapatit	Osartis GmbH & Co	2004
	Rapamune	Rapamisin	Wyeth Pharmaceuticals	2010
	Ritalin	Metilfenidat	Novartis	1955
	Ryanodex	Dantrolen Sodyum	Eagle Pharmaceuticals	2014
	TriCor	Fenofibrat	Abbott Laboratories	2004
	Vitoss	B-trikalsiyum Fosfat	Orthovita	2003
	Zanaflex	Tizanidine HCl	Acorda	2002
	Zyprexa	Olanzapin	Lilly Pharma	1996
Nanotüp	Somatuline Depot	Lanreotid asetat	Ipsen Pharma	2007
Lipozom ve Lipid Bazlı Ürünler	Abelcet	Amfoterisin B	Defiante Farmaceutica	1965
	Advate	Octocog Alfa	Takeda	2004
	AmBisome	Amfoterisin B	NeXstar Pharmaceuticals	1997
	Arikayce	Amikain	Insmed	2018
	Corusurf	Poraktant Alfa	Chisei USA	1999
	DaunoXome	Daunorubisin	Galen	1996
	DepoCyt	Sitarabin	Sigma-Tau	1999
	DepoDur	Morfin Sülfat	Pacira	2004
	Diprivan	Propofol	Fresenius Kabi	1989
	Doxil	Doksorubisin	Alza	1995
	Exparel	Bupivakain	Pacira Biosciences	2011
	Lipodox	Doksorubisin Hidroklorür	Sun Pharma Global FZE	2013
	Lipusu	Paklitaksel	Luye Pharma	2016
	Marqibo	Vinkristin Sülfat	Talon Therapeutics	2012
	Onivyde	İrinotekan	Merrimack Pharmaceuticals	2015
	Onpattro	RNAi	Amylam Pharmaceuticals	2018

Tablo 2.6. FDA tarafından onaylanmış ve piyasada bulunan nanopartikül temelli ilaçlar. [169, 170, 172, 173] **(Devam)**

Lipozom ve Lipid Bazlı Ürünler	Rebinyon	PEGlenmiş Kuagülasyon Faktörü IX	Novo Nordisk	2017
	Visudyne	Benzoporfirin	QLT Phototherapeutics	2001
	Vyxeos	Daunorubisin ve Sitarabin	Jazz Pharmaceuticals	2017
Misel Bazlı Ürünler	Estrasorb	Estradiol Hemihidrat	Novovax	2003
Dendrimer Bazlı Ürünler	VivaGel® BV	Astodrimer Sodyum	Starpharma	2015
Polimer Bazlı Ürünler	Adagen	PEGlenmiş Adenozin Deaminaz	Enzon	1990
	Adynovate	PEGlenmiş Antihemofilik Faktör	Baxalta US Inc	2015
	Cimzia	PEGlenmiş Sertolizumab	UCB	2008
	Copaxone	Glatiramer Asetat	Teva Pharmaceuticals	1996
	Diprivan	Profofol	Fresenius Kabi	1989
	Eligard	Leuprolide Asetat	Atrix Laboratories	2004
	Estrasorb	Östradiol (17 β -estradiol) hemihidrat	Novavax, Inc.	2003
	Genexol-PM	Paklitaksel	Lupin Ltd.	2007
	Kadcycla	Trastuzumab	Genentech	2013
	Krystexxa	PEGlenmiş Peglotikaz	Savient Pharmaceuticals	2010
	Macugen	Pegatinib Sodyum	EyeTech Pharmaceuticals	2004
	Mircera	Metoksi-PEG konjuge EPO	Hoffman-La Roche	2007
	Neulasta	PEGlenmiş Filgrastim	Amgen	2002
	OncoStar	PEGlenmiş L-asparajinaz	Enzon	1994
	Pegasys	PEGlenmiş İnterferon α -2a	Genentech	2002
	PEG-INTRON	PEGlenmiş IFN α -2b	Schering Corporation	2001
	Plegridy	PEG-IFN- β -1a	Biogen Idec	2014
	Rebinyon	Rekombinant DNA-kökenli kuagülasyon F10	NovoNordisk	2017
	Renegal	Sevelamer	Sanofi	2000
	Restasis	Siklosporin	Allergan	2003
	Somavert	PEGlenmiş İnsan Büyüme Hormonu	Pfizer Pharmaceuticals	2003

Tablo 2.6. FDA tarafından onaylanmış ve piyasada bulunan nanopartikül temelli ilaçlar. [169, 170, 172, 173] **(Devam)**

Polimer Bazlı Ürünler	Taxatore	Dosetaksel	Sanofi Aventis	1996
	Verelan	Verapamil HCl	Schwarz Pharma	1998
	Zevalin	İbritumomab Tiuksetan	Spectrum Pharms	2002
	Zilretta	Triamsinolon Asetonid	Flexion Therapeutics	2017
Protein Bazlı Ürünler	Abraxane	Paklitaksel	Celgene	2005
	Ontak	Denilökin Diftitoks	Eisai	1999
Metal Bazlı Ürünler	Dexferrum	Demir Dekstran	American Regent	1957
	Feraheme	Ferumoksitol	AMAG Pharmaceuticals	2009
	Ferinject	Demir Karboksimaltoz	Vifor	2013
	Ferlecit	Sodyum Demir Glukonat	Sanofi-Aventis	1999
	Hensify	Hafniyum Oksit	Nanobiotix	2019
	Infed	Demir Dekstran	Actavis Pharma	1957
	Monoferric	Demir Isomaltazid	Pharmacosmos	2020
	Venofer	Demir Sükroz	American Regent	2000

Kolon kanseri tedavisini hedefleyen nano boyutlu taşıyıcı sistemlere nanopartiküller, katı lipid nanopartiküller, polimerik nanopartiküller, lipozomlar, dendrimerler, eksozomlar, miseller, hidrojeller, CD bazlı nanosistemler, inorganik nanopartiküller (altın, silika) ve manyetik nanopartiküller örnek verilebilir [174-176]. Oral, intravenöz ve subkütan uygulama genel uygulama yollarıdır ve kolon kanseri tedavisine yönelik rektal uygulama için çalışmalar yapılmaktadır. Oral uygulamada etkinliği artırmak için enterik kaplı nanopartiküller kitosan, pektin-Eudragit, polimetilmetakrilat-Eudragit, PLGA-Eudragit, sodyum aljinat-Eudrajit ve albümin ile hazırlanmışlardır [176]. Pasif hedeflenmiş nanosistemlerin yanı sıra folat reseptörü, EGFR, CD44, epitelyal hücre adezyon molekülü gibi reseptörlerin hedeflendiği nanopartiküller literatürde yer almaktadır [177].

Kolon kanseri tedavisinin hedeflendiği nanopartiküler sistemlerde kemoterapötik ilaç olarak kurkumin, 5-FU, kamptotesin, doksorubisin, oksaliplatin, SN-38 (irinotekanın aktif metaboliti), kuersetin, topotekan ve paklitaksel ile çalışılmıştır. [174, 175, 177]. FDA tarafından kolon kanseri tedavisinde kullanılmak üzere onaylı olan irinotekan, oksaliplatin, 5-FU ve kapesitabin ile yüklenen farklı nanosistemlerle çalışmalar bulunmaktadır.

5-FU klinikte intravenöz ve intravenöz bolus enjeksiyon olarak uygulanmaktadır. 5-FU içeren nanopartikül, inklüzyon kompleksi, hidrojel, nanojel, lipozom, katı lipid nanopartiküller gibi çok sayıda nano boyutlu sistemle çalışılmıştır [50, 62, 134, 136, 175]. Literatürde kolon kanseri tedavisini hedefleyen bir çalışmada, hazırlanan 5-FU ve kurkumin yüklü kitosan nanopartiküllerinden ilaç salımının 4 gün sürdüğü gözlenmiştir. Ayrıca hücre kültürü çalışmalarında antikanser etkinliğin arttığı belirlenmiştir. Farmokinetik çalışmalarla ise etkin maddelerin plazma konsantrasyonlarının 72 saate kadar yükseldiği belirtilmiştir [55]. Bu konuda yapılan başka bir çalışmada, antikanser ilaç oksaliplatin ve 5-FU yüklü laktoferrin nanopartiküller hazırlanmıştır. Kanser hücrelerindeki antiproliferatif etkinliğin, serbest ilaçlarla kıyaslandığında nanopartiküler sistem uygulamasında arttığı gösterilmiştir. *In vivo* çalışmalarda ise, farelere uygulanan nanopartiküler sistem ile etkin maddelerin farmakokinetik parametrelerinin arttığı ve sistemik toksisitelerinin azaldığı gösterilmiştir [56].

İmmünoterapötik olarak kolon kanseri tedavisinde FDA tarafından onaylı monoklonal antikorlar ile hazırlanan nanopartiküllerin etkinliğine yönelik çalışmalar literatürde yer almaktadır. Bir çalışmada, setuksimab ile konjuge edilmiş kurkumin yüklü kitosan nanopartiküller hazırlanmıştır. Hazırlanan bu nanopartikülün mukoadhezif özelliği sayesinde antikanser etkinin arttığı *in vitro* olarak gösterilmiştir [178]. Başka bir çalışmada, setuksimab yüklü etil selüloz nanopartiküller hazırlanmış ve nanopartiküller oktreotid, somatostatin reseptör agonisti, ile işaretlenerek kolon kanseri tedavisi hedeflenmiştir. Bu sistemin etkinliği klinik olarak Faz I aşamasında değerlendirilmektedir (NCT03774680) [175].

Nano boyutlu ilaç taşıyıcı sistemlerden biri olan polipleks ya da nanopleks olarak adlandırılan sistemde nano yapı, zıt yüke sahip iki madde arasında kendiliğinden ve yük etkileşimine dayalı oluşmaktadır [179]. Etkin madde ve gen taşınımında kullanılmaktadır. Nanopleks değerlendirilmesinde özellikle önem taşıyan ve literatürde gen taşıyan sistemlerde N/P oranı, etkin madde taşıyan sistemlerde ise +/- oranı olarak geçen nanopleks sisteminde yer alan farklı yüklerin birbirine oranı, polimer bazlı nanopleks sistemleri açısından çok önemli bir fizikokimyasal parametredir. Etkin madde taşıyan nanoplekslerdeki +/- yük oranı, bilimsel kaynaklarda molar oran veya ağırlık oranı olarak tanımlanmaktadır [180, 181]. Nano

sistemin oluşumunda yardımcı madde gerekmemektedir. Nanopleksler, esas olarak polielektrolit varlığında oluşan umut verici, basit, yeşil ve uygun maliyetli bir nanopartiküler sistemi temsil etmektedir [182]. Gen taşıyan sistemlerde olduğu gibi etkin madde taşıyan sistemlerde de amaçlar; taşınan yapının degradasyondan korunması, hücre içi ve hücrelerarası bariyerleri geçebilmesi ve yüksek biyoyoumluluk gösterebilmesidir [183].

Literatürde etkin madde olarak; antibiyotik (siprofloksasin, levofloksasin, vankomisin, gentamisin), kurkumin, doksorubisin, ovalbümin ve gen sistemi olarak plazmit, DNA, siRNA taşıyan nanopleks sistemleri üzerine çalışmalar yer almaktadır. Nanoplekslerin hazırlanmasında taşınacak sistemin yüzeyel yüküne göre zıt yüke sahip polietilenimin, kitosan, siklodekstrin, dekstran, aljinat, PEG ile polimerler gibi polimerler kullanılmıştır.

Ovalbümin ve poli(propilakrilik asit) ile peptit yüklü nanopleks olarak hazırlanan terapötik aşı modelinin melanomada etkinliği değerlendirilmiştir. Nanopleksler 0.41 polidispersite indeksi ile 78 nm partikül büyüklüğüne sahip olup, T hücresi ve dendritik hücre seviyelerinde artan bir bağışıklık tepkisine yol açmıştır [179]. Nanoplekslerin doksorubisin için ilaç taşıyıcı sistem olarak tasarlandığı bir çalışmada, histidin-lisin ve doksorubisin: DNA konjugatının inkübasyonu ile nanopleksler hazırlanmıştır. Bu nanoplekslerin, ilaç çözeltisine kıyasla ilacın tümörde birikimini yaklaşık 5,5 kat arttırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca, bir *in vivo* meme kanseri modelinde, serbest doksorubisine kıyasla artmış tümör içi alım ve apoptoz bildirilmiştir [184]. Kombine ilaç tedavisine yönelik bir başka çalışmada ise ilk olarak antikanser etken madde mitoksantron: pullulan-polietilenimin-siklodekstrin inklüzyon kompleksi hazırlanmıştır. Daha sonra, inklüzyon kompleksi ve tümör baskılayıcı protein p53'ü kodlayan gen kullanılarak nanopleks elde edilmiştir. Hazırlanan nanoplekslerin aktiviteleri sırasıyla HepG2 ve C6 hücre dizilerinde mitoksantron ve p53 için belirlenmiştir. Kombine nanopleks formülasyonunun, her bir aktif molekülün tek başına uygulanmasından daha fazla antikanser aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, kombine nano taşıyıcı sistemin HepG2 hücreleri tarafından alımının pullulan tarafından artırıldığı ve böylece çoklu ilaç direncinin üstesinden gelinebileceği vurgulanmıştır [185].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. İlaç Etkin Madde, Polimerler ve Kimyasal Maddeler

Tez kapsamında kullanılan etkin maddeler Tablo 3.1.'de, polimerler Tablo 3.2.'de ve kimyasal malzemeler Tablo 3.3.'te sunulmuştur.

Tablo 3. 1. Tezde kullanılan etkin maddeler.

Etkin Maddenin Adı	Üretici Firma/Ülke
5-Florourasil	Sigma&Aldrich, Almanya
İnterlökin-2 (Fare IL-2, I0523)	Sigma&Aldrich, Almanya

Tablo 3. 2. Tezde kullanılan polimerler.

Polimerin Adı	Üretici Firma/Ülke
Kuaterner-amonyum- β CD polimeri (CD2)	CycloLab, Macaristan
Amino- β -CD polimeri (CD7)	CycloLab, Macaristan
Guanidino- β -CD polimeri (CD8)	CycloLab, Macaristan

Tablo 3. 3. Tezde kullanılan kimyasal maddeler.

Kimyasal Maddenin Adı	Üretici Firma/Ülke
2X Laemmli Örnek Tamponu	Biorad, ABD
2X Laemmli Örnek Tamponu	Biorad, ABD
4-12% Bis-Tris acrylamide gradient protein gel (NuPAGE)	İnvitrogen, ABD
Asetonitril	Sigma&Aldrich, Almanya
Bio-safe Coomassi G-250 boyası	Biorad, ABD
Diyaliz membran (14.000 kDa) (D9277)	Sigma&Aldrich, ABD
Fare IL-2 ELISA kiti (E-EL-M0042)	Elabscience, Çin

MOPS Tris-glisin yürütme tamponu	Novex, ABD
Precision Plus Protein Çift Boya Standardı	Biorad, ABD
Tween 80	Sigma&Aldrich, Almanya
Ultra saf su (Milli-Q)	Millipore, ABD

3.1.2. Hücre Kültürü Malzemeleri

Hücre kültürü çalışmaları sırasında kullanılan hücre hatları ve kaynakları Tablo 3. 4.'te, kimyasal ve sarf malzemeler ise Tablo 3. 5.'te sunulmaktadır.

Tablo 3. 4. Tezde kullanılan hücre hatları ve kaynakları.

Hücre Hattı	Kaynak/Ülke
L929 (CRL-1658™) (Fare, sağlıklı fibroblast hücresi)	ATCC, ABD
CT26 (CRL-2639™) (Fare, kolon kanseri hücresi)	ATCC, ABD
HT29 (HTB-38™) (İnsan, kolon kanseri hücresi)	ATCC, ABD

Tablo 3. 5. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan kimyasal ve sarf malzemeler.

Kimyasal Maddenin Adı	Üretici Firma/Ülke
Anti-IL2 antikor (ab80681)	Abcam, USA
Antikor seyreltici tampon (926001)	Biolegend, ABD
Araldite 502 Kit (13900)	EMS, ABD
DMEM (P04-03590)	Pan Biotech, Almanya
Dulbecco's modification of Eagle's medium (DMEM)	Sigma, İngiltere
Entellan (M107961)	Merck, ABD
Fetal sığır serumu (FBS)	Sigma, Almanya
Glutaraldehyde EM Grade 25% (16210)	Laborimpex, İsviçre
Goat Anti-Rabbit IgG H&L (ab150007)	Abcam, USA

Goat Anti-Rabbit IgG H&L (ab150080)	Abcam, USA
Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) (ab6721)	Abcam, USA
HBSS	Capricorn, Almanya
HEPES tamponu	Cegrogen, Almanya
Lipit dehidrojenaz Kiti (K311-400)	Biovision, ABD
Matrigel® Bazal Membran	Corning, ABD
Fare serumu (M5905)	Sigma, Almanya
Normal Tavşan Serumu (R9133)	Sigma, Almanya
PBS (P04-36500)	Pan Biotech, Almanya
Penisilin/Streptomisin	Sigma, Almanya
Poli(2-hidroksietil metakrilat) (Poli-HEMA)	Sigma&Aldrich, ABD
Propilen Oksit 450ml. (20401)	Thermo Fisher, USA
Tavşan serumu (R9133)	Sigma, Almanya
Rekombinant Anti-CD44 antikoru (ab189524)	Abcam, ABD
Tripan mavisi	Sigma, ABD
Tripsin-EDTA	Sigma, Almanya
Triton-X 100 (1139ML500)	Neofroxx, Almanya
Tween 20 (8506ML250)	Neofroxx, Almanya
Uranil Asetat 25gr. (22400)	EMS, ABD
WST-1 (Suda çözünür tetrazolyum tuzu)	Roche, Almanya
Sarf Malzemenin Adı	Üretici Firma/Ülke
FCF200-Cu Formwar/Carbon Grid 200mesh	EMS, ABD
CF400-Cu Carbon/Film Grid 400mesh	EMS, ABD
LC200-Cu Lacey/Carbon Grid 200mesh	EMS, ABD

3.1.3. Hayvan Deneyi Malzemeleri

Hayvan deneyi çalışmaları sırasında kullanılan kimyasal maddeler Tablo 3.6.'da sunulmaktadır.

Tablo 3. 6. Hayvan deneyi çalışmalarında kullanılan kimyasal maddeler.

Kimyasal Maddenin Adı	Üretici Firma/Ülke
FITC Anti-Mouse CD45 Antikoru 103108	Biolegend, ABD
FITC Rat IgG2b, κ Isotype Ctrl Antikoru 400605	Biolegend, ABD
Alexa Fluor® 488 anti-mouse/human CD11b Antikoru 101217	Biolegend, ABD
Alexa Fluor® 488 Rat IgG2a, κ Isotype Ctrl Antikoru 400625	Biolegend, ABD
APC anti-mouse Ly-6G Antikoru 127614	Biolegend, ABD
APC Rat IgG2a, κ Isotype Ctrl Antikoru 400511	Biolegend, ABD
FITC anti-mouse Ly-6G Antikoru 128006	Biolegend, ABD
FITC Rat IgG2c, κ Isotype Ctrl Antikoru 400705	Biolegend, ABD
FITC Anti-Mouse CD69 Antikoru 104506	Biolegend, ABD
FITC Armenian Hamster IgG Isotype Ctrl Antikoru 400905	Biolegend, ABD
PE Anti-Mouse CD154 Antikoru 106506	Biolegend, ABD
PE Armenian Hamster IgG Isotype Ctrl Antikoru 400907	Biolegend, ABD
APC Anti-Mouse CD62L Antikoru 104412	Biolegend, ABD
APC Rat IgG2a, κ Isotype Ctrl Antikoru 400511	Biolegend, ABD
FITC Anti-Mouse CD3 Antikoru 100204	Biolegend, ABD
LEGEND-MAX™ Mouse IL-2 ELISA Kit with Pre-Coated Plates 431007	Biolegend, ABD
LEGEND-MAX™ Mouse TNF- α ELISA Kit with Pre-Coated Plates 430907	Biolegend, ABD
LEGEND-MAX™ Mouse IFN- γ ELISA Kit with Pre-Coated Plates 430807	Biolegend, ABD

3.2. Cihazlar

Tez kapsamında kullanılan cihazlar Tablo 3.7.'de sunulmaktadır.

Tablo 3. 7. Tez kapsamında kullanılan cihazların isim ve modelleri.

Cihazın Adı / Modeli	Üretici Firma/Ülke
Akış Sitometri (FACS Canto II)	Becton Dickinson, ABD
Akış Sitometri (FACS Diva)	Becton Dickinson, ABD
Çok noktalı manyetik karıştırıcı (Multipoint HP)	Variomag, Almanya
Çok noktalı ısıtıcılı manyetik karıştırıcı (IKA RT5)	İKA, Çin
Diferansiyel taramalı kalorimetre (Pyris I)	PerkinElmer, ABD
Elektroforez tankı (Novex® Mini-Cell)	İnvitrogen, ABD
Etüv	Mammert, Almanya
Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (Spectrum Two) (FT-IR)	PerkinElmer, ABD
Hassas terazi	Mettler, İsviçre
Işık mikroskobu	Leica, Almanya
Kodak Gel Logic 200 Görüntüleme Sistemi	Kodak, ABD
Liyofilizatör	Labconco, ABD
Mikroplaka okuyucu	Molecular Devices, ABD
Nanosight NS300 cihazı	Malvern, İngiltere
Partikül büyüklüğü ölçüm cihazı (Nano ZS)	Malvern, İngiltere
pH metre	Hanna, ABD
Taramalı elektron mikroskobu (FEI QUANTA 200 FEG ESEM)	FEI, ABD
TEER ölçüm cihazı (Millicell-ERS Volt-ohm metre, Millipore)	Merck, Almanya
Termostatlı su banyosu	Mammert, Almanya

Tablo 3.7. Tez kapsamında kullanılan cihazların isim ve modelleri. **(Devam)**

Ultra saf su sistemi (Milli-Q)	Millipore, ABD
Ultrasantrifüj	Hettich, Almanya
Ultrasantrifüj (Hettich EBA 21)	Hettich, Almanya
Vorteks	IKA, Çin
Dikey akışlı 2B kabin (BHG 2004)	Faster, İtalya
Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (1100 Series)	HP Agilent, Almanya

3.3. Yöntem

3.3.1. Siklodekstrin Polimerlerin Sentezlenmesi, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu

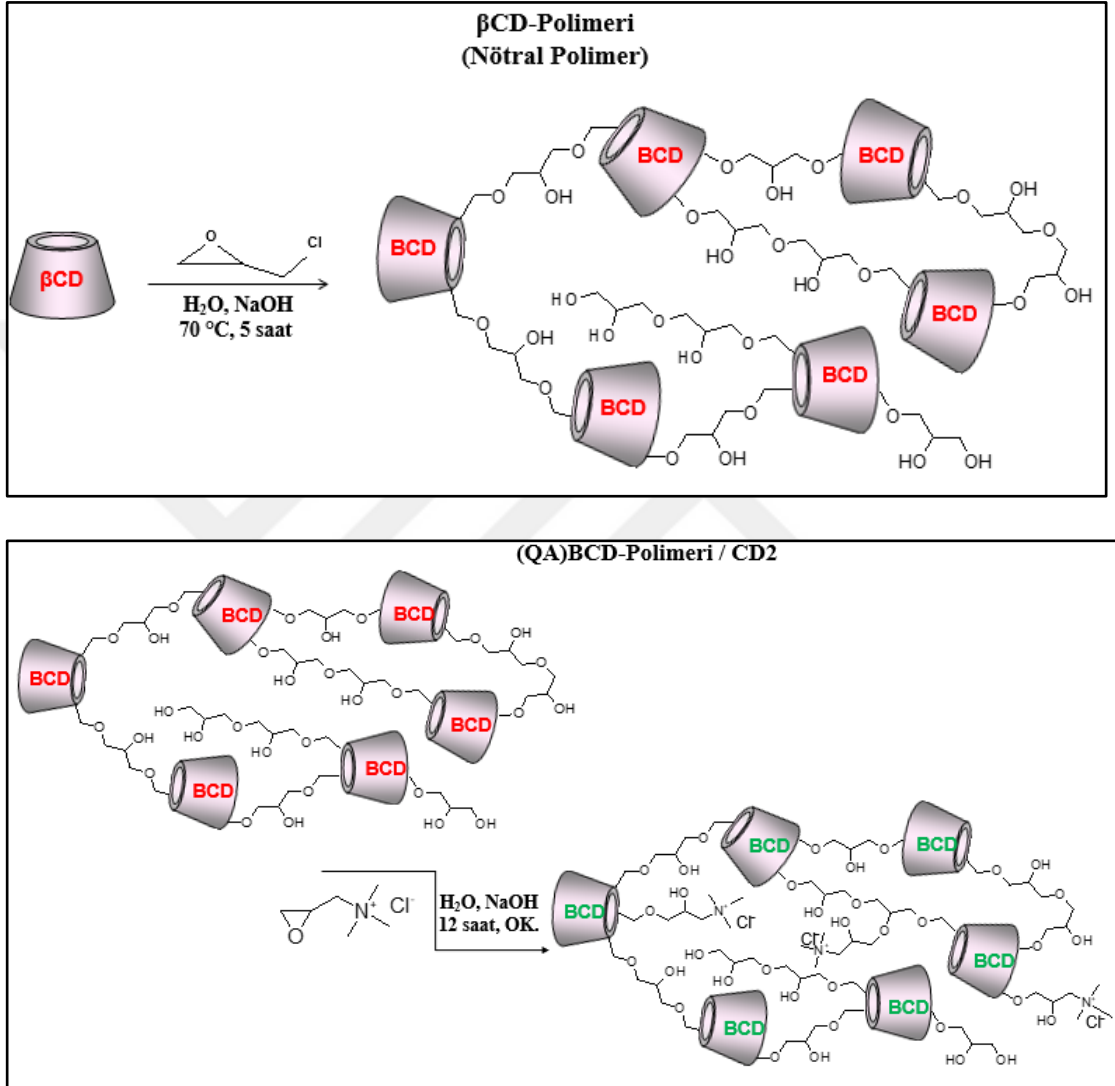
CycloLab firmasından Dr. Milo Malanga ile iş birliğine gidilmiştir. Sekiz farklı CD türev ve polimeri ile çalışmalar yapılmıştır. Çalışmalar sırasında bir sonraki iş paketlerinde kullanılması öngörülen 3 CD polimerin sentez ve karakterizasyon çalışmaları Dr. Milo Malanga ve ekibi tarafından gerçekleştirilmiştir. Sentez yöntemleri Şekil 3.1.-3.3. ile sunulmaktadır. Sentezlenen bu polimerler Proton Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (^1H -NMR), Kızılötesi Spektroskopisi (IR) ve Polarizasyon Transferi ile Bozulmadan İyileştirme (DEPT) yöntemleri ile karakterize edilmiştir.

NMR spektroskopisi kimya alanında moleküllerin yapı tayininde kullanılan yöntemlerden biridir. NMR spektroskopisi, kuvvetli bir manyetik alan içerisine yerleştirilen bir molekülde bulunan bazı atom çekirdeklerinin radyo frekansı alanındaki elektromanyetik ışınları absorblaması üzerine kurulmuş bir yapı aydınlatma yöntemidir. Bir molekülde hidrojen (^1H) içeren grupların sayıları yanında, bu gruba komşu olan gruplar da tespit edilebilmektedir. NMR spektroskopisi, atom çekirdeğinin manyetik karakterine bağlı olarak, molekülün iskeleti hakkında bilgi verir.

DEPT analizi, moleküldeki karbon atomlarının oranını, bunların C, CH, CH_2 veya CH_3 olup olmadığını belirlemek için kullanılır [186]. DEPT polarizasyonu uyarılmış bir çekirdekten diğerine, en yaygın olarak $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$, aktaran çift rezonanslı bir titreşim programıdır. Heteronükleer tek kuantum tutarlılık spektroskopisi (HSQC) ise 2 boyutlu spektral analiz sunan, bir aksiste ^1H diğerinde ^{13}C , organik moleküllerin yapı tayininde kullanılan NMR spektroskopisidir.

CD_2 polimerinin sentezi, Thomsen H. vd. tarafından yayınlanan bir yayında rodamin etiketli QA polimerinin sentezi temel alınarak yapılmıştır. Bu sentezde, kısaca, tek adımlı kopolimerizasyon reaksiyonu sonucu nötral polimer sentezi gerçekleştirilmiştir. Sonrasında bu nötral polimerden pozitif yüklü türev, alkali koşullarda alkilleyici ajan olarak glisidiltrimetilamonyum klorür kullanılarak elde edilmiştir. Yan zincirler ve CD kavitesi arasındaki ortalama molar oranı ^1H -NMR ve C-NMR yöntemi olan DEPT ile belirlenmiştir. Rodamin işaretli nötral, aniyonik ve katyonik β -CD polimerlerin; Staphylococcus epidermidis biyofilmelerine penetrasyonu

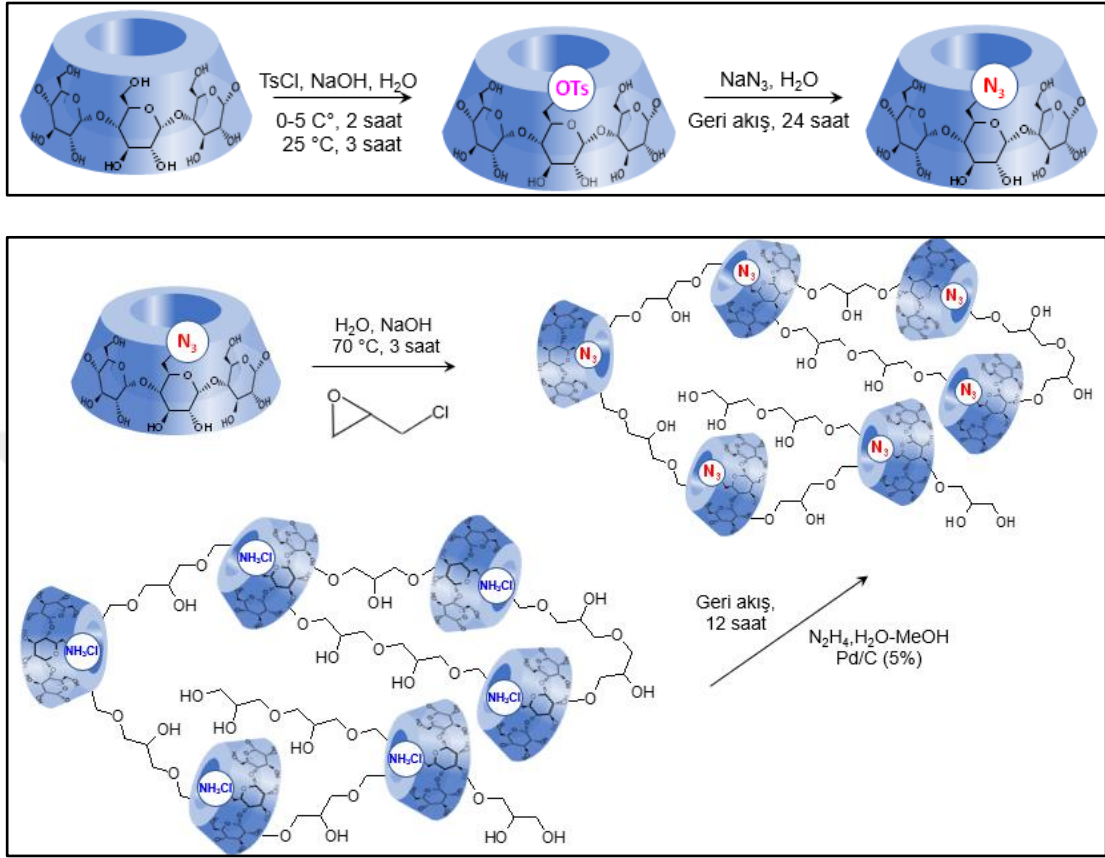
araştırılmıştır. Katyonik olan türevin diğer polimerlere kıyasla biyofilme daha iyi penetre olduğu bulunmuştur [187]. İçerdiği siklodekstrin oranının %60 olduğu tahmin edilmektedir. Beyaz kristalize formdadır. Şekil 3.1.'de CD2 polimerinin sentez basamaklarını içeren yöntem sunulmaktadır.



Şekil 3. 1. CD2 (QA(BCD)PS.HCl) türevinin sentez basamakları. (OK, oda koşulları altında sentezin gerçekleştirildiğini göstermektedir.)

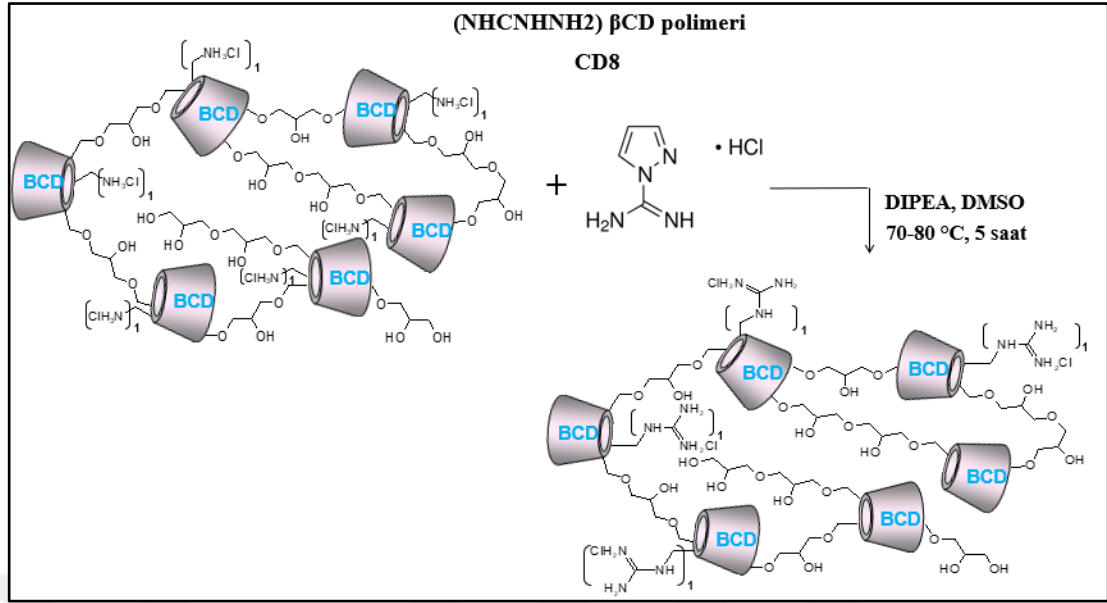
Siklodekstrin polimerlerinin epiklorohidrin ile dallanması, azidatlı yapının var olan karakterizasyon problemini önlemesi sebebi ile tercih edilmiştir. CD7 polimeri sentezinde; sentezin son adımında azid grupları amino grubuna, Pd/C katalizörlüğünde hidrazin (N_2H_4) ile muamele edilerek indirgenmiştir [139]. Sistemden su ve metanol geri akışı sağlanmıştır. Siklodekstrin içeriğinin %60 olduğu tahmin edilmektedir.

Sarımsı renge sahiptir. Şekil 3.2.'de CD7 polimerine ait monomerden başlayan sentez yöntemi verilmektedir.



Şekil 3. 2. CD7 türevinin sentez aşamaları.

CD8 polimerini sentezlemek için polimerin türevlendirilmesi yoluna gidilmiştir. Siklodekstrin halkasına bağlı olan azotlu grup üzerinden yapılan bu işlemde, başlangıç maddesi olan CD polimeri 1H-pirazol-1-karboksamidin-HCl ile DIPEA (N, N-diizopropil-etilamin) ve DMSO (dimetilsülfoksit) varlığında reaksiyona girmiştir ve ilgili polimer (CD8) elde edilmiştir [188]. Bu çalışmada CD polimerlerin fosforil gruplarına seçici bağlanması nedeniyle DNA'yı lipozomal ve nano sistemler içerisinde taşımak için uygun olduğu belirtilmiştir. Özellikle katyonik türevlerin ilaçlar ile kovalan etkileşimler kurarak, bu ilaçların hücresel bariyerleri geçmesini sağladıkları vurgulanmıştır. Ayrıca peptitlerin lizin ve arjinin grupları ile polimerin etkileşimde bulundukları belirtilmiştir. CD8 polimerinde siklodekstrin içeriğinin %60 olduğu tahmin edilmektedir. Beyaz-sarı renge sahiptir. Şekil 3.3.'te CD8 polimerine ait sentez yöntemi verilmiştir.



Şekil 3. 3. CD8 polimerinin sentez aşamaları.

Üç polimere ait bazı kimyasal özellikler Tablo 3.8. ile sunulmaktadır. Bu tabloda CD polimerlere ait ortalama süstitüsyon derecesi (SD^1); ortalama molekül ağırlığı (MA^2) (g/mol); çapraz bağlanma oranı (ÇBO^3) (mol epiklorohidrin /mol CD); katyonik yoğunluk (KY^4) (her bir siklodekstrin birimine denk gelen katyonik grup sayısı) verileri sunulmaktadır.

Tablo 3. 8. CD polimerlerin kimyasal özellikleri. Ortalama süstitüsyon derecesi (SD^1); ortalama molekül ağırlığı (MA^2) (g/mol); çapraz bağlanma oranı (ÇBO^3) (mol epiklorohidrin /mol CD); katyonik yoğunluk (KY^4) verileri tabloda yer almaktadır.

Kısaltmalar	Siklodekstrin polimerleri	SD^1	MA^2	ÇBO^3	KY^4
CD2	Kuaterner-amonyum-βCD çözünür polimer, epiklorohidrin ile çapraz bağlanmış	2.2	40.000	11	2.2
CD7	Çözünür amino-Beta-CD polimer, epiklorohidrin HCl ile çapraz bağlanmış	1	25.000	10	1
CD8	Çözünür guanidino-Beta-CD polimer, epiklorohidrin HCl ile çapraz bağlanmış	1	26.000	10	1

Tablo 3.8. değerlendirildiğinde CD2 polimerinin katyonik gruplarının diğer polimerlere göre 2,2 kat daha fazla olduğu görülmektedir. Ayrıca CD2'nin moleküler

ağırlığı, CD7 ve CD8'e göre %60 daha fazladır. CD7 ve CD8, moleküler ağırlık, çapraz bağlanma oranı ve katyonik yoğunluk açısından benzer özelliklere sahiptir.

3.3.2. 5-FU ve IL-2 Yüklü CD Nanoplekslerin Hazırlanması

Tez çalışmalarına öncelikle 5-FU konjuge CD polimerleri ile başlanması planlanmıştır. Bu kapsamda, etkin maddeler ile çalışmaya başlamadan önce Dr. Nielsen tarafından sentezlenen CD polimerlerin nanopleks oluşturma etkinliklerini belirlemek ve en uygun CD polimeri seçmek amacıyla ön formülasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ön formülasyon çalışmalarında maliyeti azaltmak ve alımı yapılan yüksek maliyetli IL-2'yi ekonomik kullanabilmek adına, daha önce kitosan nanopartiküllerin yük etkileşimi ile hazırlanmasında da yaygın şekilde kullanılan, negatif yüzey yüküne sahip olan ve iyonotropik jelasyon mekanizması ile nanopartikül oluşturan model bir molekülün sodyum tripolifosfatın, STPP kullanımı planlanmıştır. Sentezlenen 5 farklı polikasyonik (PC) CD türevi ile STPP arasında yük etkileşimine dayalı nanopleks sistemleri literatür temel alınarak hazırlanmıştır [189, 190]. Nanopleks oluşum mekanizması polianyon yapıdaki molekülün (STPP veya IL-2) negatif grupları ile CD polimerlerin pozitif yüklü amino grupları arasındaki etkileşim temeline dayanır [191].

Literatürde nanoplekslerin, etkin maddenin yanı sıra gen taşınmasında da kullanılan ve farklı hazırlama yöntemleri ile oluşturulan sistemler olduğu görülmektedir. Nanopleks hazırlama genel olarak ekleme, vorteks ile karıştırma, oda ısısında inkübasyon gibi basamakları içermektedir ve bu basamakların literatürde çeşitli çalışmalarda farklı sürelerde uygulandığı görülmektedir. Nanoplekslerin değerlendirilmesinde özellikle önem taşıyan ve literatürde gen taşıyan sistemlerde N/P oranı, etkin madde taşıyan sistemlerde ise +/- oranı olarak geçen nanopleks sisteminde yer alan farklı yüklerin birbirine oranı, polimer bazlı nanopleks sistemleri açısından çok önemli bir fizikokimyasal parametredir. Etkin madde taşıyan nanoplekslerdeki +/- yük oranı, bilimsel kaynaklarda molar oran veya ağırlık oranı olarak tanımlanmaktadır [180, 181].

Ön formülasyon çalışmalarında parametrelerin optimize edilmesi amacıyla 3^3 faktöriyel tasarım çalışmaları yapılmış ve Dr. Nielsen tarafından sentezlenen CD'ler ile hazırlanan nanopleksler partikül büyüklüğü ve dağılımı, yüzey yük değerleri

incelenerek uygun hazırlama yöntemi (+/- oranı, ideal karıştırma, vorteksleme ve inkübasyon süreleri) ve CD türevleri belirlenmiştir. Ancak, tez kapsamında, tek bir 5-FU konjuge CD polimere bağlı kalmama ve farklı CD polimerlerin etkinliklerinin belirlenmesi isteği, yeni bir partner ile çalışma ihtiyacı gerektirmiştir. Bu sebeple, CycloLab' tan sekiz farklı CD türev ve polimeri alınmış ve çalışmalara 3 CD polimeri (CD2, CD7 ve CD8) ile devam edilmiştir. Tüm polimerler 1'er mg tartılıp ayrı ayrı ultra saf suda (1 mL) çözündürülmüş ve ardından nanopleks formülasyonlarının yüzey yükünün bir göstergesi olan zeta potansiyel değeri ise mV cinsinden Malvern Zetasizer Nano ZS cihazı ile 173° açı ve 25°C sıcaklıkta belirlenmiştir. Bütün ölçümler her bir örnek için 3 tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Yeni CD polimerleri ile ilk polimerlerle yapılan çalışma sonuçları göz önünde bulundurularak nanopleksler hazırlanmıştır. Bu amaçla, 1 mg STPP 20 mL suda çözündürülmüş ve bu çözeltiden 1 mL alınarak, önceden çözündürülmüş olan 1 mg CD ve 1 mL su karışımına eklenmiştir. CD türevlerinden net pozitif yüzey yüküne sahip olanlar ile hazırlanan nanopleks formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü (PB), zeta potansiyel (ZP) ve PDI değerleri ölçülmüştür.

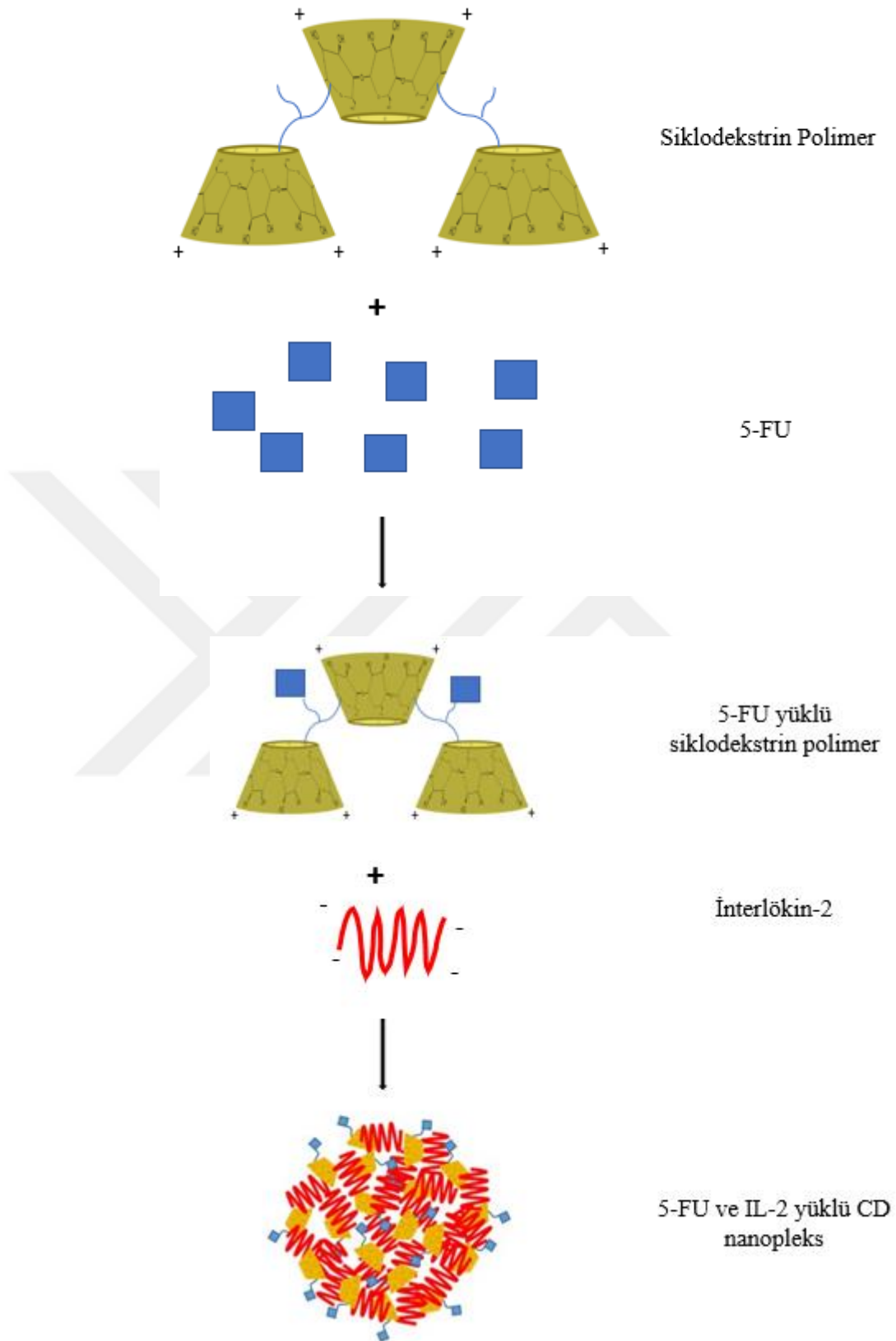
Literatürdeki çalışmalara bakıldığında nanopleks yapıların yüksek hacimlerde de hazırlandığı görülmüştür [180, 181]. Bu bilgiye dayanarak, daha ideal partikül büyüklüğüne sahip nanopleksler hazırlamak için formülasyon hacmi 2 mL'den 4 mL'ye, iki kat arttırılmıştır. Ayrıca nanopleks hazırlama yöntemi olarak CD çözeltisi üzerine STPP çözeltisi damla damla ilave ederek 30 dakika, 600 rpm'de karıştırılmış ve ardından 0,45 µm'lik filtreler ile filtre edilmiştir.

STPP'nin molekül ağırlığının (MA: 367,86 g/mol), IL-2'nin molekül ağırlığından (MA: 17,2 kDa) daha küçük olması sebebiyle geniş polidispersite değerlerinin oluşmuş olabileceği düşünülmüş ve ön formülasyon çalışmaları negatif yüzey yüküne ve daha küçük yapıya sahip olan kemoterapötik madde 5-FU (MA:130,77 g/mol) ile tekrarlanmıştır. Ayrıca hazırlanan bu nanoplekslere filtrasyonun etkisini gözlemleyebilmek için, nanopleksler 0,45 µm'lik filtrelerden geçirilmiş ve PB, ZP ile PDI değerleri belirlenmiştir.

Bu aşamada, 5-FU'nun yanı sıra tez kapsamında kullanılan ikinci etkin madde olan IL-2 ile nanopleks formülasyonları hazırlanmıştır. Literatür temel alınarak iki farklı +/- ağırlık oranında nanopleksler hazırlanmıştır [85]. Bu amaçla düşük IL-2:CD

oranı (1:50000) içeren nanopleks hazırlamak için 4 mg CD ile 0,08 µg IL-2 ve yüksek IL-2:CD oranı (1:25000) içeren nanopleks hazırlamak için 4 mg CD ve 0,16 µg IL-2 kullanılmıştır. Hazırlanan CD:IL-2 nanoplekslere ait partikül büyüklüğü dağılımı, zeta potansiyel ve polidispersite indeksi değerleri ölçülmüştür. Benzer şekilde filtrasyon sonrasında da bu değerler tekrar ölçülerek filtrasyonun etkisi değerlendirilmiştir.

Elde edilen bu sonuçlar da göz önüne alınarak, literatür temelinde polimer: ilaç oranları belirlenmiştir [57, 85]. Sonrasında CD nanopleksleri, temel kompleksleştirme prosedürleriyle hazırlanmıştır [192, 193]. İki farklı aktif madde taşıyan nanopleks formülasyonları, 10:1 (a/a) CD:5-FU oranı ve 25.000:1 (a/a) CD:IL-2 oranı ile hazırlanmıştır. İlk önce; 5-FU stok çözeltisi ultra saf su (0,4 mg/mL) içinde 600 rpm'de 1 saat karıştırılmıştır. Daha sonra 4 mg CD, 1 saat boyunca 600 rpm'de 984 µL ultra saf su içinde çözündürülmüştür. CD solüsyonuna 1 mL 5-FU stok solüsyonu ilave edilmiş ve 600 rpm'de 30 dakika karıştırılmıştır. 16 µL (10 µg/mL IL-2) IL-2 çözeltisi, 600 rpm'de 30 dakika karıştırılarak nanoplekslere ilave edilmiştir. Hazırlanan nanoplekslerin pH değerleri pH metre (Hanna Instruments, HI3220) ile ölçülmüş ve stabilite çalışmalarında değerlendirilmiştir. Hedeflenen 5-FU ve IL-2 yüklü CD nanopleksin yapısı Şekil 3.4.'te sunulmaktadır.



Şekil 3. 4. Tez kapsamında hazırlanması hedeflenen 5-FU ve IL-2 yüklü CD nanopleksin şematik gösterimi.

3.3.3. 5-FU ve IL-2 Yüklü Siklodekstrin Nanoplekslerin Karakterizasyonu

a. Partikül Büyüklüğü Dağılımı ve Yüzey Yükü Tayini

Nanopleks formülasyonlarının ortalama partikül büyüklüğü (nm) ve polidispersite indeksi, tek kullanımlık kapiler hücreler kullanılarak 173°'lik bir saçılma açısında dinamik ışık saçılımı (DLS) tekniği (Malvern Zetasizer Nano ZS Serisi, Birleşik Krallık) ile belirlenmiştir. DLS tekniğinin temelinde, seyreltik bir çözelti içerisindeki küçük parçacıklardan saçılan ışığın şiddetinin ve değişiminin ölçülmesi vardır. Yöntem mikro ve nano düzeyinde parçacıkların büyüklük dağılımlarının belirlenmesi için kullanılmaktadır.

Zeta potansiyel ise, kolloidal dağılımlarda parçacıklar arasındaki itme ve çekme kuvvetlerine dayanan yüzey yükü değeridir. Nanosistemlerin fiziksel stabilitesi ve biyolojik membranlarla etkileşiminde önemli bir parametredir. Nanoplekslerin zeta potansiyeli (mV), tek kullanımlık kapiler hücreler kullanılarak 12,8°'lik bir saçılma açısında partikül büyüklüğü ölçüm cihazı (Malvern Zetasizer Nano ZS Series, UK) ile belirlenmiştir. Ölçümler her bir formülasyon için 3'er kez yapılmış ve ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiştir.

Nanoplekslerin partikül büyüklüğü ve dağılımı ayrıca Nanopartikül İzleme Analizi (NTA) ile de ölçülmüştür. Bu analizde, aynı anda birçok partikül cihazın okuma alanından geçerken akış boyunca video ile izlenebilir ve bu süreç kaydedilerek partikül boyut ve konsantrasyonunu değerlendirilmektedir. DLS analizi ile elde edilen sonuçları doğrulamak için NTA analizi gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan nanopleksler 1/1000 oranında seyreltilerek NanoSight NS300 cihazında analiz edilmiştir.

b. Morfolojik Özelliklerin Belirlenmesi

5-FU ve IL-2 yüklü nanoplekslerin morfolojisi, Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile belirlenmiştir. Bu amaçla, taze hazırlanmış sıvı numuneler ve liyofilize edilmiş örnekler Gatan 682 Precision Etch and Coating System (PECS) ile kurutulurak 10 nm kalınlığında altın/paladyum tabakası ile kaplanmıştır. Görüntüleme, FEI QUANTA 200 FEG ESEM cihazı ve Everhardt-Thornley SED dedektörü kullanılarak yapılmıştır. Bu analiz, Bilkent Üniversitesi Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi (UNAM)'da gerçekleştirilmiştir.

c. FT-IR ve DSC Analizi

İlaç ile katı fazdaki nanopleks yapısı arasındaki etkileşim Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) ve Diferansiyel Tarama Kalorimetrisi (DSC) ile değerlendirilmiştir. 5-FU, CD polimerleri ve 5-FU yüklü CD nanoplekslerinin FT-IR spektrumları, elmas-ATR ünitesi ile donatılmış bir Perkin Elmer Spectrum Two spektrometresi ile 4000 ila 400 cm^{-1} arasında elde edilmiştir. İlaç-polimer etkileşimlerinin belirlenmesi, nanopleks ile ilaç arasındaki bağların titreşimine dayanmaktadır.

DSC analizinde numuneler ısıtılırken soğurulan enerji miktarı ölçülür ve bu analizde elde edilen termogramlar nano boyutlu sistemlerin karakterizasyonunda serbest ilaç varlığını/yokluğunu belirlemek için kullanılmaktadır. 5-FU, CD polimerleri ve 5-FU yüklü CD nanopleks formülasyonlarının termal davranışını analiz etmek için DSC gerçekleştirilmiştir. Analiz, 20 mL/dk gaz akış hızında Perkin Elmer Pyris I kullanılarak dinamik N₂ (g) altında, 20°C'den 300°C'ye 10°C/dk hızında gerçekleştirilmiştir.

Her iki analiz de Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Polimer Kimyası ABD laboratuvarlarında Prof. Dr. Murat ŞEN ve ekibi ile tamamlanmıştır.

d. CD Polimer ve IL-2 Konsantrasyonunun Belirlenmesi

In vivo çalışmalarda kullanılacak güvenli ve etkili bir nano boyutlu sistemin hazırlandığını kanıtlayabilmek için, nanoplekste bulunması gereken güvenli konsantrasyonda CD polimer ve etkili dozu sağlayacak IL-2 miktarını belirlemek için bir ön çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmaya, 6-8 haftalık sağlıklı erkek CD1 farelerden diseksiyon işlemiyle dalak çıkartılarak başlanmıştır. 40 μm por açıklığına sahip hücre filtresi içerisinde dalak parçalanmış ve tüm parçalar toplanmıştır. Hücreler, Histopaque – 1077 (1,077 g/mL) ayırma tamponu aracılığı ile santrifüj edilerek periferik kandaki PBMC fazının alındığı proseste olduğu gibi toplanmıştır. Histopaque 1077'nin PBMC fazına tekabül eden yerdeki hücre popülasyonu, fareler için splenositler olarak geçmektedir. Hücreler aCD3 (TCR üzerinden uyarımı sağlamak için CD3 yüzey molekülün antikoru) ile ilk uyarımı sağlamak amacıyla muamele edilmiştir. Sonrasında hücreler iki gruba; polimer (polimer grubu da 3'e ayrılarak) ve IL-2 ile muamele edilecekler olarak ayrılmıştır. CD2, CD7 veya CD8 polimeri 0,015-

0,031- 0,062- 0,125 ve 0,25 mg/mL konsantrasyonda olacak şekilde hücrelere eklenmiştir. IL-2 konsantrasyonları ise, 0 (Kontrol grubu, IL-2 çözeltisi eklenmeyen grup)- 1,25- 2,5- 10- 20 Ünite olarak belirlenmiştir. Hücreler polimer veya IL-2 çözeltisi ile küvete koyulup karıştırıldıktan sonra kuyucuklara, kuyucuk başına 100.000 hücre olacak şekilde (96 kuyucuklu U taban plakaya) ekilmiştir. Bu karıştırma sırasında hücreler ayrıca CFSE çoğalma boyası ile işaretlenmiştir. Hücreler bu ekim işleminden 72 saat sonra akış sitometrisinde PI boyama ile analiz edilmiştir [194].

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Kanser Enstitüsü Temel Onkoloji ABD laboratuvarlarında, Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI ve ekibi ile gerçekleştirilmiştir.

e. 5-FU ve IL-2 Yüklü CD Nanoplekslerin Kısa Süreli Stabilite Çalışması

Saklama Stabilitesi: 5-FU ve IL-2 yüklü CD nanopleks formülasyonları bir hafta boyunca +4°C'de ultra saf suda saklanmıştır. Stabilitate, ortalama partikül büyüklüğü (nm), PDI ve zeta potansiyeli (mV) değerlerindeki ($n=3 \pm SS$) değişiklikler açısından değerlendirilmiştir. Bu değerler, Malvern Zetasizer Nano ZS cihazı ile 0, 1, 4 ve 7. günlerde kaydedilmiştir.

Liyofilizasyonun Nanoplekslerin Yapısal Bütünlüğü Üzerindeki Etkisi: Bu amaçla, 5-FU ve IL-2 yüklü CD nanopleks formülasyonları 48 saat boyunca liyofilize edilmiştir (HETO PowerDry PL3000 dondurarak kurutucu, Thermo Fisher Scientific). Bu sürenin sonunda, toz numuneler 2 mL (nihai formülasyon hacmi) ultra saf su içinde liyofilizasyondan önceki hacme eşit olacak şekilde dağıtılmıştır. Ortalama partikül büyüklüğü (nm), PDI ve zeta potansiyeli (mV) değerleri liyofilizasyondan önce ve sonra ölçülmüştür.

Farklı Biyolojik Sıvılarda Nanoplekslerin Bütünlüğü: Farklı biyolojik sıvıların CD nanoplekslerinin fiziksel stabilitesi üzerindeki etkisini belirlemek için, tüm formülasyonlar simüle edilmiş mide sıvısı (SGF) pH 1.2'de ve simüle edilmiş intestinal sıvıda (pH 6.8) 2 saat süreyle; pH 6 simüle edilmiş kolonik sıvı (SCoF tokluk) 8 saat süreyle; PBS pH 7.4 ve hücre kültürü ortamı (%10 FBS ile DMEM, 100 U/mL Penisilin-Streptomisin) 24 saat boyunca inkübe edilmiştir [195]. Bu biyolojik sıvılar, Avrupa Farmakopesi (EP) 8.0 (1) ve literatüre [196] dayalı olarak hazırlanmıştır. CD nanopleks formülasyonları uygun ortam ile 1:10 (h/h) oranında seyreltilmiş ve 37 °C'de inkübe edilmiştir. CD nanoplekslerinin ortalama partikül

büyükluğu (nm), PDI ve zeta potansiyeli (mV), inkübasyondan önce ve sonra ölçülmüştür.

Avrupa Farmakopesi (EP) 8.0 (1) monografi doğrultusunda SGF pH 1,2 için; 2 gram sodyum klorür tartılır ve bir miktar suda çözündürülerek üzerine 80 mL 1 M hidroklorik asit eklenir. Ardından hacim ultra saf su ile 1000 mL'ye tamamlanır. SIF pH 6,8 için; 77 mL 0,2 M sodyum hidroksit alınarak 250 mL su ve 6,8 gram kalsiyum dihidrojen fosfat ile karıştırılır. Hacim 1000 mL'ye ultra saf su ile tamamlanır. SCoF pH 6 için ise (literatür); 0,2 gram potasyum klorür, 8 gram sodyum klorür, 0,24 gram potasyum fosfat monobazik ve 1,44 gram sodyum fosfat dibazik tartılır ve bir miktar ultra saf suda çözündürülür. Son olarak hacim 1000 mL'ye ultra saf su ile tamamlanır.

Tezde yürütülen çalışmalar kapsamında bu oranlar korunarak gerekli tuz-baz-asit vb. miktarlar 100 mL için hesaplanmış ve çözeltilerin pH ayarları hidroklorik asit ile pH-metrede ölçülerek gerçekleştirilmiştir.

f. IL-2'nin Biyolojik Aktivitesinin Belirlenmesi

In vivo çalışmalarda uygulanmak üzere etkili bir nano boyutlu sistemin hazırlandığını kanıtlayabilmek amacıyla, nanoplekste bulunan IL-2'nin biyolojik aktivitesinin nanopleks yapısı oluşurken kayba uğramadığını ya da bozunduğunu görebilmek için bu çalışma gerçekleştirilmiştir. 6-8 haftalık sağlıklı erkek CD1 farelerden diseksiyon işlemiyle dalak çıkartılmıştır. 40 µm por açıklığına sahip cell strainer (hücre filtresi) içerisinde dalak parçalanmış ve tüm parçalar toplanmıştır. Hücreler, Histopaque – 1077 (1,077 g/mL) ayırma tamponu aracılığı ile santrifüj edilerek periferik kandaki PBMC fazının alındığı proseste olduğu gibi toplanmıştır. Histopaque 1077'nin PBMC fazına tekabül eden yerdeki hücre popülasyonu, fareler için splenositler olarak geçmektedir. Hücreler aCD3 (TCR üzerinden uyarımı sağlamak için CD3 yüzey molekülün antikoru) ile ilk uyarımı sağlamak amacıyla muamele edilmiştir. Hücreler CD2 polimeri, CD7 polimeri, CD8 polimeri, IL-2 yüklü CD2 nanopleks, IL-2 yüklü CD7 nanopleks, IL-2 yüklü CD8 nanopleks veya serbest IL-2 ile birlikte küvete koyulup karıştırıldıktan sonra kuyucuklara, kuyucuk başına 100.000 hücre olacak şekilde (96 kuyucuklu U taban plakaya) ekilmiştir. Bu karıştırma sırasında hücreler ayrıca CFSE çoğalma boyası ile işaretlenmiştir. Hücreler bu ekim işleminden 72 saat sonra akış sitometrisinde PI boyama ile analiz edilmiştir [194].

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Kanser Enstitüsü Temel Onkoloji ABD laboratuvarlarında, Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI ve ekibi ile gerçekleştirilmiştir.

g. Nanopleks Yapısındaki IL-2'nin Yapısal Bütünlüğünün Belirlenmesi

Elektroforez, yüklü moleküllerin bir elektriksel alandaki hareketlerinin izlenerek ayırma ve saflaştırma işlemlerinin yapıldığı tekniktir. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yönteminde ise, SDS her molekülü homojen bir şekilde negatif yükle kaplayarak ayrışmanın sadece molekül ağırlığı üzerinden olmasını sağlamaktadır. IL-2 içeren nano boyutlu sistemlerde, IL-2'nin yapısal özelliklerini belirlemede SDS-PAGE analizi sıklıkla uygulanmaktadır. IL-2 yüklü CD nanopleks formülasyonlarında kapsüllenmiş IL-2'nin bütünlüğünü saptamak için, denatüre edici olmayan SDS-PAGE analizi yapılmıştır. (Deneme çalışmalarında 5-FU ve IL-2 yüklü CD nanoplekslerle analiz gerçekleştirildiğinde 5-FU'dan kaynaklanan jel bantlarında kirlilikler gözlenmiştir. Bu nedenle sonraki analizde IL-2 yüklü CD nanopleksler ile çalışılmıştır.) Numuneler, 2X Laemmli Numune yükleme tamponu [65.8 mM Tris-HCl, pH 6.8, %26,3 (a/h) gliserol, %2,1 SDS, %0.01 bromofenol mavisi] ile 1:1 oranında seyreltilmiştir. Her numuneden 25 µL alınarak %4–12 Bis-Tris akrilamid gradyan protein jeline (NuPAGE, Invitrogen) yüklenmiştir. Numunelerin bağıl moleküler ağırlıklarını belirlemek için Precision Plus Dual Color moleküler ağırlık standardı (Biorad) kullanılmıştır. Örnekler, 2 saat boyunca 100 V'de Tris-Glisin Yürüyen Tamponunda (25 mM Tris, 192 mM Glisin, %0,1 SDS, pH 8.3) yürütülmüştür. Jeller, protein bantlarını görselleştirmek için Bio-Safe Coomassie Stain (Biorad) ile 2 saat boyunca boyanmıştır. Jel görüntüleri, Kodak Gel Logic 200 Görüntüleme Sistemi ve Kodak Moleküler Görüntüleme Yazılımı sürüm 4.0 kullanılarak çekilmiştir [197]. Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya ABD laboratuvarında Prof. Dr. Ayşe ERCAN ile gerçekleştirilmiştir.

SDS-PAGE analizi proteinin primer yapısı hakkında bilgi verdiği için, tez kapsamında nanopleks içerisindeki IL-2'nin yapısal bütünlüğü dairesel dikroizm yöntemi ile de araştırılmıştır. Dairesel dikroizm, proteinin sekonder yapısı hakkında bilgi verir ve konformasyonundaki değişikliği gösterir. UV spektroskopisi ile benzer temele ve gereksinimlere sahiptir [198]. Serbest IL-2 çözeltisi ve IL-2 yüklü CD nanoplekslerden salınan IL-2 bu çalışma kapsamında analiz edilmiştir. Ek olarak,

yakın UV spektroskopisi (>250 nm) proteinlerin tersiyer yapısı hakkında bilgi verebildiğinden ek çalışma olarak IL-2'nin bütünlüğü UV spektroskopisi ile de araştırılmıştır. Nanopleks yapısına eklediğimiz konsantrasyondaki IL-2 miktarını içeren ultra saf su çözeltisi, spesifik dalga boyunu belirlemek ve literatürle doğrulamak adına 0-400 nm aralığında analiz edilmiştir. UV spektrumunda herhangi bir dalga boyunda pik, miktarın deteksiyon limitinden düşük olması sebebiyle gözlenmemiştir.

h. 5-FU'nun Miktar Tayini Analiz Yöntemi ve Validasyonu

Bu tez çalışmasında kullanılan antikanser ilaç 5-FU'nun *in vitro* miktar tayini ve validasyonu ters faz Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) yöntemi ile yapılmıştır [199]. Yöntemin özellikleri aşağıdaki gibidir;

- ✓ Sabit faz: *C-18 Oktadesil silika (ODS) kolon*
- ✓ Mobil faz: *Su: Asetonitril (90:10 h/h)*
- ✓ Mobil faz akış hızı: *1 mL/dak.*
- ✓ Enjeksiyon hacmi: *50 µL*
- ✓ Dedektör: *Diodearray (DAD) dedektör*
- ✓ Dalga boyu: *266 nm*
- ✓ Kolon sıcaklığı: *25°C*
- ✓ Mobil faz sıcaklığı: *18-20°C* (analizlerde bu değerin önemi görülmüştür).

Analitik yöntem validasyonunda 5-FU için kullanılan yöntemin doğrusalılık, doğruluk, kesinlik, duyarlılık ve özgüllük parametreleri incelenmiştir.

Doğrusallık/Kalibrasyon

5-FU'nun kalibrasyon denkleminin belirlenmesi için 200 µg/mL'lik 5 mL stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bunun için 2 mg 5-FU, 10 mL mobil faz içinde çözündürülmüştür. Bu stok çözeltiden hareketle 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL, 1 µg/mL ve 0,5 µg/mL'lik olacak şekilde mobil faz ile yedi dilüsyon yapılmıştır. Yukarıda belirtilen HPLC yöntemine göre farklı konsantrasyondaki 5-FU'nun çözeltilerinin analizi yapılmış ve elde edilen veriler sonucunda kalibrasyon doğrusu çizilerek, kalibrasyon denklemi bulunmuş ve korelasyon katsayısı hesaplanmıştır.

Doğruluk

Kullanılan analitik yöntemin doğruluğunu göstermek amacıyla, kalibrasyon sınırları içerisinde bulunan, 4 farklı konsantrasyonda olmak üzere (1, 5, 25, 50 µg/mL) 6 seri çözelti hazırlanarak HPLC analizi yapılmıştır. Analiz sonucu bulunan ve hazırlanan konsantrasyonlardan geri kazanımlar hesaplanmış ve geri kazanımların ortalaması (X), standart sapması (SS) ve % varyasyon katsayısı (VK) hesaplanmıştır.

Kesinlik

Bir analitik yöntemin kesinliği, art arda istatistiksel açıdan anlamlı sayıda, aynı konsantrasyonda örneğin analitik yöntem kullanılarak ölçülen konsantrasyonlarının ortalaması (X), standart sapma (SS) ve % varyasyon katsayısı (VK) hesaplanması ile değerlendirilmektedir. Bu nedenle; tekrar edilebilirlik, tekrar elde edilebilirlik ve gün içi-günler arası farklılık incelenmiştir.

Tekrar edilebilirlik: Tekrar edilebilirlik parametresi için, kalibrasyon çalışmaları için hazırlanmış farklı 5-FU konsantrasyonlarından bir tanesi (50 µg/mL) seçilerek 6 kez art arda HPLC analizi yapılmıştır. HPLC analizi ile elde edilen konsantrasyon değerlerinin ortalaması (X), standart sapma (SS) ve % varyasyon katsayısı (VK) hesaplanmıştır.

Tekrar elde edilebilirlik: Tekrar elde edilebilirlik parametresinin değerlendirilmesi amacıyla, stoktan (200 µg/mL) hareketle seyreltme ile elde edilen 6 adet aynı konsantrasyonda (50 µg/mL) hazırlanan çözeltinin HPLC analizi gerçekleştirilmiştir. HPLC analizi ile elde edilen konsantrasyon değerlerinin ortalaması (X), standart sapma (SS) ve % varyasyon katsayısı (VK) değerleri hesaplanmıştır.

Günler arası farklılık: Günler arası farklılık parametresinin değerlendirilmesi için aynı konsantrasyondan (50 µg/mL) 3 gün art arda, 5-FU'nun mobil faz ile hazırlanan çözeltilerinin HPLC ile analizi yapılarak, elde edilen konsantrasyon değerlerinin ortalaması (X), standart sapma (SS) ve % varyasyon katsayısı (VK) değerleri hesaplanmıştır.

Gün içi farklılık: Bu farklılık parametresinin değerlendirilmesi için tek bir konsantrasyondan bir örnek hazırlanarak (10 µg/mL) 4 saat ara ile gün içinde 3 kez (0. saat, 4. saat ve 8. saat) aynı örnekten enjeksiyon yapılarak, HPLC ile analizi yapılmış,

elde edilen konsantrasyon değerlerinin ortalama (X), standart sapma (SS) ve % varyasyon katsayısı (VK) değerleri hesaplanmıştır.

Duyarlılık

Analiz yönteminin duyarlılığının belirlenmesi için gözlenebilirlik sınırı (LOD) ve alt tayin sınırı (LOQ) değerleri saptanmıştır. Gözlenebilirlik sınırı, analitik yöntemde kullanılan cihazın saptayabildiği en düşük konsantrasyonu ifade eder. Alt tayin sınırı ise doğru ve tekrar edilebilen en düşük derişimdir.

LOD ve LOQ değerlerinin hesaplanmasında, kalibrasyondaki minimum konsantrasyon değeri (0,5 µg/mL) seçilmiştir. Bu konsantrasyondaki HPLC spektrumunda, 5-FU pikinden önce ve sonra düzgün çıkan bölgeler tespit edilmiştir. Sinyal/Gürültü (S/G= Signal/Noise) oranına göre LOD ve LOQ değerleri saptanmıştır. S/G oranı 3 olan konsantrasyon gözlenebilirlik sınırını, S/G oranı 10 olan konsantrasyon ise alt tayin sınırını vermektedir.

Özgüllük

İlerleyen dönemde nanopleks hazırlamada kullanılacak olan ve 5-FU ile konjuge edilmesine karar verilen CD polimerlerinin mobil fazda çözünmesi sağlanmış ve 5-FU ile kromatogramdaki yerlerinin tayini, olası girişim durumu değerlendirilmiştir.

1. IL-2'nin Miktar Tayininin Analitik Yöntemi ve Validasyonu

IL-2 miktarının belirlenmesinde Fare IL-2 ELISA kiti (E-EL-M0042) kullanılmıştır. Bu amaçla alınan kitin doğrusallık/kalibrasyon parametresi için çalışılması el kitabında önerilmektedir. Öncelikle 1000 pg/mL'lik standart IL-2 çözeltisinden hareketle 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 0 pg/mL IL-2 içeren çözelti hazırlanmış ve 3 tekrarlı olarak 100 µL/kuyucuk olacak şekilde plakaya eklenmiştir. Ardından, 90 dakika 37 °C'de inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda kuyucukların üzerindeki ortam uzaklaştırılmış ve 100 µL Biotinlenmiş Deteksiyon Antikoru her bir kuyucuğa eklenmiştir. Sonrasında ise 1 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. Bir saat sonunda kuyucukların üzerindeki ortam uzaklaştırılmış ve yıkama tamponu ile hücreler 3 kez yıkanmıştır. Bu aşamada, HRP Konjugasyon Çalışma

Solüsyonundan 100'er µL kuyucuklara eklenmiş ve plaka 30 dakika 37 °C'de inkübe edilmiştir. 30 dakika sonra üzerindeki ortam alınmış, yıkama tamponu ile kuyucuklar yıkanmış ve her kuyucuğa 90 µL Substrat Ajanı eklenmiştir. Plaka 15 dakika 37 °C'de inkübe edilmiştir ve ışıktan korunmuştur. İnkübasyon sonunda 50 µL durdurma çözeltisi kuyucuklara eklenmiş ve 450 nm'de mikropilaka okuyucuda analiz edilmiştir. Bu okuma sonrasında IL-2 miktarını belirleyebilmek için kalibrasyon doğrusu oluşturulmuştur.

i. Yükleme Etkinliğinin Belirlenmesi

5-FU ve IL-2 yüklü CD nanoplekslere yüklenen ilaç miktarının belirlenmesinde, 5-FU için HPLC yöntemi, IL-2 için ise ELISA kiti kullanılmıştır. Yüklenen 5-FU miktarı, doğrulanmış bir ters fazlı yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemiyle (Agilent 1100 HPLC Sistemi) dolaylı olarak belirlenmiştir.

Bu amaçla, yüklenmeyen serbest ilaç, Millipore Ultrafree-MC 100.000 Nominal Moleküler Ağırlık Limiti filtreleri ile 3500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek nanopleks formülasyonlarından uzaklaştırılmıştır [200]. HPLC yöntemi, ters fazlı C18 Purospher® STAR analitik kolonunda (250 mm x 4.6 mm, 5µm) gerçekleştirilmiştir. Su: asetonitrilden (90:10 h/h) oluşan mobil faz 1,00 mL/dakika akış hızında kolona verilmiştir. Analiz için 50 µL'lik numune enjekte edilmiş ve 5-FU miktarı 266 nm dalga boyunda diyot dizisi tespiti (DAD) dedektörü ile belirlenmiştir [199]. Tüm hesaplamalar Eşitlik 3.1. kullanılarak yapılmıştır.

$$\% \text{ Yükleme Etkinliği} = \frac{\text{Toplam İlaç Miktarı} - \text{Yüklenmeyen İlaç Miktarı}}{\text{Toplam İlaç Miktarı}} \times 100$$

(Eşitlik 3. 1.)

CD nanoplekslerine yüklenen IL-2 miktarı, IL-2 ELISA kiti kullanılarak belirlenmiştir. Yüklenmeyen IL-2, santrifüjlü filtre kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Elde edilen örnek üzerinden seyreltme uygulanarak (kitin deteksiyon alanında ölçümün gerçekleştirilebilmesi için 200 kat seyreltme uygulanmıştır), numuneler IL-2 ELISA kitinde bulunan plakaya 100 µL/kuyucuk olacak şekilde eklenmiştir. Bu aşamadan sonra “IL-2'nin Miktar Tayininin Analitik Yöntemi ve Validasyonu” başlığı

altında sunulan adımlar uygulanmıştır. Elde edilen miktar ve toplam ilaç miktarı üzerinden tüm hesaplamalar Eşitlik 3.1. kullanılarak yapılmıştır.

j. *In vitro* İlaç Salım Çalışmaları

In vitro ilaç salım çalışmaları, hazırlanan formülasyonların kalitelerini ve *in vivo* uygulamada ilacın uygulama ortamına geçişini değerlendirmek için yapılan çalışmalardan biridir. 5-FU'nun CD nanoplekslerden salım profili, 37°C'de sink koşullarda ve 120 rpm'de yatay çalkalayıcıda diyaliz membran tekniği ile gerçekleştirilmiştir. Kullanılan diyaliz membran 14.000 kDa moleküler ağırlık sınırı değerine sahiptir. İlk olarak, diyaliz membrana aşağıda belirtilen aşamalar uygulanarak salım işlemine hazırlanmıştır:

- ✓ Ultra saf su ile 3-4 saat boyunca yıkama
- ✓ 80 °C %3 (a/h) sodyum sülfid içeren ultra saf su ile 1 dakika yıkama
- ✓ 60 °C ultra saf su ile 2 dakika yıkama
- ✓ %2 (h/h) sülfirik asit içeren 50 °C ultra saf su ile 1 dakika yıkama.

Bu işlemler sonrasında, diyaliz membrana 1 mL nanopleks formülasyonu eklenmiş ve 9 mL salım ortamına aktarılmıştır. İlk salım ortamı, intravenöz uygulamada fizyolojik koşulları sağlamaya yönelik olarak %0,2 Tween 80 içeren PBS'dir (pH 7,4). Ek olarak, nanoplekslerin oral kullanımını değerlendirmek için salım çalışmaları (0-2 saat) pH 1,2 simüle edilmiş mide sıvısı (SGF), ardından (2-4 saat) pH 6,8 simüle edilmiş bağırsak sıvısı ve pH 6 tokluk durumunda simüle edilmiş kolonik sıvı (SCoF) (4-24 saat) ile yürütülmüştür [195]. Çalkalayıcılı su banyosunda kurulan düzende belirli zaman aralıklarında (0,5/ 1/ 2/ 3/ 4/ 8/ 12 ve 24 saat) 500 µL numune alınmış ve aynı miktarda taze tampon ya da simüle sıvı salım ortamına eklenmiştir [57]. Ancak, oral uygulama çalışmaları kapsamındaki salım deneyinde diyaliz torbası 2 saat ve 4 saat sonunda bir sonraki simüle edilmiş ortama aktarılmıştır. Bu aşamalar sonrasında yukarıda açıklanan diğer işlemler aynı şekilde uygulanmıştır. Alınan numunelerdeki 5-FU miktarı valide edilmiş HPLC yöntemi ile belirlenerek salınan kümülatif 5-FU miktarı hesaplanmıştır.

5-FU ve IL-2 yüklü nanoplekslerden IL-2'nin salım çalışmaları, yukarıda 5-FU için tarif edilen salım ortamları ile gerçekleştirilmiştir. Ancak 5-FU salımında kullanılan diyaliz membranın sınır değerinden (14.000 kDa), IL-2'nin molekül

ağırlığının büyük olması sebebiyle salımda diyaliz membran IL-2 salımını belirlemek amacıyla kullanılmamıştır. Literatür temel alınarak salım çalışmaları santrifüj tüplerinde gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, 100 µL'lik nanopleksler 900 µL'lik salım ortamında dağıtılmış ve numuneler, bir çalkalayıcı su banyosunda belirli zaman aralıklarında (0,5/1/2/3/4/8/12 ve 24 saat) toplanmıştır. Her zaman aralığı için, salım ortamı oda sıcaklığında 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiş ve daha sonra 100 µL süpernatant alınarak salım ortamına taze tampon ya da simüle sıvı eklenmiştir [113, 117]. Simüle sıvılarda yapılan çalışmalarda 2 saat ve 4 saat sonunda santrifüj edildikten sonra 0,5 mL mevcut ortam alınmış ve aynı hacimde sonraki simüle sıvı tüplere eklenmiştir. Alınan örneklerdeki IL-2 miktarı IL-2 ELISA kiti ile belirlenmiş ve kümülatif salınan IL-2 miktarı hesaplanmıştır.

3.3.4. Hücre Kültürü Çalışmaları

a. Güvenlilik Çalışması

1-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-3,5-difenilformazan (MTT) sitotoksikite testi ve L929 sağlıklı fare fibroblast hücreleri, memelilerle doğrudan veya dolaylı olarak temas edecek polimerik malzemelerin toksisitesinin *in vitro* belirlenmesi için ABD Farmakopesi (USP) 37 ve ISO 10993-5: 2009 tarafından önerilen yöntem ve hücre dizisidir.

Bu amaçla L929 hücreleri, 100 µL DMEM'de (%10 fetal sıgır serumu (FBS), penisilin (100 ünite/mL) ve streptomisin (100 mg/mL) içerir) 5.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu hücre plakalarına ekilmiştir. 24 saat sonra, kuyucuklara farklı konsantrasyonlarda herhangi bir etkin madde içermeyen CD polimer çözeltileri (0,007- 0,015- 0,031- 0,062 mg/mL) ilave edilmiştir. Hücreler 24, 48 ve 72 saat inkübe edildikten sonra hücre canlılığı çalışması suda çözünür tetrazolyum tuzu (WST-1) testi ile belirlenmiştir. Bu aşamada her kuyucuğa 100 µL WST-1 çözeltisi (1:10 WST-1: DMEM) eklenmiş ve sonrasında ölçümler Eşitlik 3.2.'de ($n = 3, \pm SS$) verildiği gibi 450 nm'de mikropilaka okuyucuda yapılmıştır.

$$\% \text{ Hücre Canlılığı} = \frac{\text{Tedavi Uygulanan Hücrelerin Ortalama Absorbansı}}{\text{Tedavi Uygulanmayan Hücrelerin Ortalama Absorbansı}} \times 100$$

(Eşitlik 3. 2.)

Laktat dehidrojenaz (LDH) enzimi normalde sitozolde bulunan ve hücre zarı hasarı durumunda hızla dış ortama nüfuz eden bir enzimdir [201]. Enzim, laktatı pirüvata oksitler ve pirüvat ortama eklenen tetrazolyum tuzu ile reaksiyona girer. Kültür ortamındaki (süpernatandaki) formazan miktarındaki artış, parçalanmış hücre sayısındaki artışla doğrudan ilişkilidir. WST-1 deneyinin yürütüldüğü plakalarda hücreler üzerindeki kültür ortamı alınmış, LDH deneyi bu kültür ortamı ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmada negatif kontrol grubu olarak, hücre ve kültür ortamı içeren kuyucuğun verisi; pozitif kontrol grubu olarak ise hücre ve %1'lik Triton X-100 çözeltisi içeren kuyucuğun verisi kullanılmıştır. Optik yoğunluk, Eşitlik 3.3.'te verildiği gibi 500 nm'de mikropilaka okuyucu ile ölçülmüştür.

$$\text{Sitotoksosite (\%)} = \frac{\text{Test örneği} - \text{Negatif kontrol}}{\text{Pozitif kontrol} - \text{Negatif kontrol}} \times 100$$

(Eşitlik 3.3.)

b. Antikanser Etkinlik Çalışması

İlk olarak, CT26 hücreleri 100 µL DMEM'de 5.000 hücre/kuyucuk ile 96 kuyucuklu hücre plakalarına ekilmiştir. 24 saat sonra, on bir farklı konsantrasyonda (0,25-0,5-1-2,5-5-10-25-50-100-200 ve 400 µM) 5-FU çözeltisi ilave edilmiştir. Hücreler 24 ve 48 saat inkübe edilmiş, ardından hücre canlılığı yukarıda tarif edildiği gibi ölçülmüştür. Bu aşamada, sadece DMEM ile tedavi edilen hücreler %100 canlı olarak kabul edilmiştir. 5-FU'nun IC₅₀ değeri Graphpad Prism 6'da hesaplanmıştır.

Yukarıda açıklanan işleme göre, hesaplanan IC₅₀ değerinde 5-FU miktarı içeren, 5-FU ve IL-2 yüklü CD nanopleksleri, 5-FU çözeltisi ve 5-FU+IL-2 çözeltisinin etkinliğini belirlemek için kuyucuklara uygulanmıştır. Ayrıca, CD nanoplekslerinin içindeki CD polimerlerinin miktarı hesaplanarak, kontrol grubu olarak bu konsantrasyonda hazırlanan CD çözeltileri kuyucuklara eklenmiştir. Son olarak, hücre canlılığı Eşitlik 3.2.'de belirtildiği gibi 24. ve 48. saatler için hesaplanmıştır.

c. Hücre Proliferasyonu ve Gerçek Zamanlı Hücre Canlılığı Analizi

Adherent hücrelerin deneyin başlangıcından itibaren zaman içinde sürekli olarak hücre büyümesini analiz etmek için xCELLigence-RTCA kullanılmıştır.

Hücrelere herhangi bir müdahale edilmesine (örneğin reaktiflerin eklenmesi) gerek olmadan her kuyucuğun dibindeki altın elektrotlarla dibe yapılan elektrik empedansını ölçerek sistem çalışmaktadır.

5-FU ve IL-2 yüklü CD nanoplekslerin CT26 hücrelerinde antikanser etkinliğinin belirlenmesinde, doz bağımlı gerçek zamanlı hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Bu amaçla öncelikle kolon kanseri hücreleri her bir kuyucuğa 200 µL içerisinde 5000 hücre/kuyucuk olacak de eklenmiştir. Gerçek zamanlı olarak hücrelerden 30 dakikada bir tabana yaptıkları impedansına ait veri “hücre indeksi” olarak kaydedilmiştir. Bu değer 1’in üzerine çıktığında, 21. saat, CD çözeltileri, 5-FU ve IL-2 yüklü CD nanopleksler, 5-FU çözelti ve 5-FU+IL-2 çözeltileri hedeflenen dozda 5-FU içerecek şekilde (polimer çözeltileri de nanopleksteki konsantrasyonda polimer içerecektir) uygulanmıştır. Uygulama sonrası bir hafta süre ile hücresel indeksler kaydedilmiş ve uygulamaya bağımlı hücresel proliferasyon değerlendirilmiştir. Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji ABD laboratuvarlarında, Prof. Dr. Petek KORKUSUZ ve ekibi ile gerçekleştirilmiştir.

d. 3B *In Vitro* Tümör Modeli

CT26 hücreleri ile 3B tümör modeli geliştirilebilmesi için yuvarlak tabanlı 96 kuyucuklu plakalar Poli-HEMA çözeltisi ile kaplanmıştır. Poli-HEMA 1,2 g 40 mL (%95’lik) etanolde çözündürülmüştür, her kuyucuğa 50 µL eklenmiştir. Gece boyunca bekletilen plakalara, hücre ekim ortamı %3 h/h oranında Matrigel® içerecek şekilde 200 µL içerisinde 5000 hücre/kuyucuk olarak ekim yapılmıştır. Ardından plakalar santrifüjlenmiştir. Santrifüjleme işlemi 10.000 rpm’de 10 dakika uygulanmıştır. Her iki günde, besi yeri değiştirilmiştir. 3. günde sferoid yapısı oluştuğu görülmüş, ancak gelişimin devam etmesi için 5. günde formülasyonların etkinliğinin değerlendirilmesine geçilmiştir [202-205].

Bu değerlendirmenin ilk adımında, sferoidlere formülasyonlar uygulandıktan sonra ve uygulama sonrası 24., 48. ve 72. saatlerde ışık mikroskobu ile görüntüleri alınmıştır. 72 saat sonunda ise pipetajla dağıtılan 3B sferoidi oluşturan hücrelerde WST-1 analizi ile canlılık ölçülmüştür.

e. Hücrelerde İmmünohistokimyasal İnceleme

CD44, P-glikoprotein 1 olarak da adlandırılan bir transmembran glikoproteinidir. Serumda yüksek çözünür CD44 seviyeleri, kolon ve mide kanseri dahil olmak üzere çeşitli kanserlerde tümör yükünün ve metastazın bir göstergesidir [206].

3B *in vitro* tümör modeli ile oluşturulan sferoidlere uygulanan formülasyonlar sonrasında, CD44 ve IL-2 için indirekt immünofloresan yöntemi ile işaretlenerek sferoidlerin immünojenik özelliklerinin tayini gerçekleştirilmiştir [207]. Bu amaçla, sferoidlere CD çözeltileri, 5-FU ve IL-2 yüklü CD nanopleksler, 5-FU çözeltisi, 5-FU+IL-2 çözeltisi ve kontrol grubu olarak DMEM kültür ortamı uygulanmıştır (n=6). 48 saat inkübasyon sonrasında, sferoidler üzerindeki besi yeri uzaklaştırılmış ve hücreler PBS ile yıkanmıştır. Kuyucuklu lamlara aktarılan sferoidler 30 dakika süreyle %4 paraformaldehit ile fiks edilmiştir. PBS ile yıkanan sferoidler permeabilizasyon için %0,2 Triton X-100 ile 10 dakika inkübe edilmiştir. Non-spesifik serum blokajı için 1 gece boyunca +4°C’de tavşan serumu (#catR9133, Normal Rabbit serum, Sigma-Aldrich) ile inkübe edilmiştir. Optimal dilüsyondaki (1/100) anti-fare CD44 (#catab189524, Recombinant Anti-CD44 antibody, Abcam) ve (1/100) IL-2 (#catab80681 Anti-IL-2 antibody) primer antikorları ile nemli ortamda inkübe edilmiştir (1 saat, RT). Sekonder antikor Alexa flour 488 (#cat ab150077, Goat Anti-Rabbit IgG H&L Alexa Fluor® 488, Abcam) ile 30 dakika inkübasyonu DAPI ile çekirdek boyanması takip etmiştir. Negatif kontrol olarak primer antikorun damlatılmadığı örnekler kullanılmıştır. Solmayan kapama medyumunu (#F4680, Sigma, Almanya) ile kapatılan örnekler karşılaştırmalı olarak dijital kamera ataşmanlı floresan mikroskobu (DM6B, Leica, Almanya) altında 495 nm eksitasyon ve 519 nm emisyon dalga boyunda değerlendirilmiştir.

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji ABD laboratuvarlarında, Prof. Dr. Petek KORKUSUZ ve ekibi ile gerçekleştirilmiştir.

f. Sferoidlerin Plastik Bloklarda Işık Mikroskobu ile İncelenmesi

Tümör hücrelerindeki morfolojik değişikliklerin incelenmesi amacı ile deney ve kontrol gruplarına ait sferoidler besi yeri uzaklaştırıldıktan sonra PBS ile yıkanmıştır (n=4). Her sferoide 2 mL gluteraldehit eklenerek buz üzerinde 1 saat

fiksasyon sağlandıktan sonra PBS ile yıkama sonrası 30 dakika süreyle karanlıkta ozmiyum tetroksit ile post-fiksasyon yapılmıştır. Agara gömülen sferoidler dereceli alkollerde dehidratasyon ve propilen oksit ile şeffaflandırma yapıldıktan sonra plastik bloklara gömülmüştür. Bir mikrometre kalınlığındaki yarı ince kesitler metilen mavisi-azur II ile boyandıktan sonra ışık mikroskobu (DM6B, Leica, Almanya) altında apoptotik değişiklikler açısından kalitatif olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakóltesi Histoloji ve Embriyoloji ABD laboratuvarlarında, Prof. Dr. Petek KORKUSUZ ve ekibi ile gerçekleştirilmiştir.

g. Kanser Nodüllerinde *In Vitro* Olarak TUNEL ile Apoptoz Tayini

TUNEL, (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling), hücre ve dokularda apoptozun varlığını DNA seviyesinde gösteren kalitatif bir yöntemdir. Bu yöntem, apoptoz sırasında oluşan DNA kırıklarını histokimyasal olarak tespit eder. Kırık DNA zincirinde yer alan serbest 3'-OH uçları deoksinükleotidil transferaz (TdT) enzimi ile işaretlenir. Floresanla konjuge olan bu hücreler mikroskop altında incelenir.

3B tümör modeli ile oluşturulan ve 5-FU ile IL-2 yüklü CD nanopleks uygulanan sferoidlerin apoptotik özellikleri TUNEL kiti ile tayin edilmiştir. Bu amaçla yukarıda anlatıldığı gibi CT26 hücrelerinden 3B sferoidler hazırlanmıştır. Ardından sferoidler 5-FU ve IL-2 yüklü CD nanopleksler, 5-FU çözeltisi, IL-2 çözeltisi ve DMEM ile 48 saat inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonrası sferoidlerin üzerindeki besi yeri uzaklaştırılarak hücreler PBS ile üç kez yıkanmıştır. 100 µL içerisinde PBS ile hücreler temiz 96-kuyucuklu hücre plakasına alınmıştır. Sonrasında %4 paraformaldehit çözeltisi 100 µL/kuyucuk olacak şekilde eklenmiştir. Hücreler 60 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda PBS ile yıkanan hücrelere, 100 µL/kuyucuk permeabilizasyon çözeltisi (%0,1 sodyum sitrat içerisinde %0,1 Triton X-100) eklenerek 2 dakika buz üzerinde inkübe edilmiştir. Sonrasında PBS ile hücreler yıkanmış ve 50 µL/kuyucuk olacak şekilde TUNEL reaksiyon karışımı eklenmiştir. TUNEL kiti olarak, Fluoresin konjuge dUTP içeren ve apoptotik hücreyi doğrudan etiketleme temeline dayanan ticari temin edilen kit (Roche 11684795910 In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein) kullanılmıştır. Hücreler 60 dakika

karanlıkta 37°C’de inkübe edilmiştir. Son olarak PBS ile yıkanan hücreler ışık mikroskobu altında incelenmiştir.

3.3.5. *In vivo* Antitümöral Çalışmalar ve Dokularda Histopatolojik ve İmmünolojik Yanıtın Belirlenmesi

a. Güvenlilik Çalışması

5-FU’in sağlıklı hücreler ve kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi bilinmektedir. Formülasyonumuzda bulunan CD polimerlerin canlı organizmada toksisiteye neden olup olmadığı belirlenmiştir. Bu amaçla CD2, CD7 ve CD8 polimerleri ile IL-2 yüklü nanopleksler hazırlanmış ve kontrol grubu olarak serum fizyolojik (SF) kullanılmıştır. Her bir deney grubu için 5 hayvan kullanılmıştır. 100 µL hacim içerisinde 5000 U IL-2 ve 3,9 mg CD olacak şekilde IL-2 yüklü nanopleksler hazırlanmış ve tek doz iv. olarak enjekte edilmiştir. Enjeksiyondan 24 saat sonra hayvanlardan kan alınmıştır. Alınan kan 2000 rpm’de, 10 dakika santrifüj edilerek serum elde edilmiştir. Serum örneklerinde alkalın fosfataz ve alanin aminotransferaz gibi değişkenler ölçülerek toksisitenin olup olmadığı belirlenmiştir.

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama Merkezi’nde (HÜDHAM) H. Ü. Kanser Enstitüsü Temel Onkoloji ABD öğretim üyesi Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI ve ekibi ile gerçekleştirilmiştir.

b. Antitümör Etkinlik Çalışması

Yapılan güvenlik çalışmaları sonrasında belirlenen CD polimer ya da polimerleri ile antitümör etkinlik değerlendirilmiştir. İlk olarak farelere 2×10^6 CT26 kolon hücresi, 100 µL (1mg/ml; 1:10) Matrigel ® içerisinde olacak şekilde hücre süspansiyonu hazırlanmıştır. Abdominal bölge ~1cm’lik insizyonel kesi alanı oluşturularak çekum çıkarılmıştır. Çekum üzerinde insizyonel çizikler oluşturularak abdominal bölgeye tekrar yerleştirilmiştir. Abdominal bölgeye yerleştirilen çekum üzerine hazırlanan hücre süspansiyonu inoküle edilmiştir. Daha sonra, abdominal insizyon bölgesi absorbe edilebilen 5/0 monofilament ile cerrahi sütür kullanılarak kapatılmıştır. Sütür alanı batikonla temizlenerek hayvanlar anestezinin etkisinden çıkana kadar gözlenmiştir. Cerrahi operasyon sonrasında farelerde oluşabilecek dehidratasyonu önlemek amacıyla 0,5 mL steril %0,9 NaCl *subkutan* (sc) olarak

enjekte edilmiştir. Tümör gelişim süreci izlenerek hücre inokülasyonu sonrası 12. günde farelere iv. olarak formülasyonlar uygulanmaya başlanmıştır. Formülasyonlar haftada 2 kez olmak üzere toplam 4 enjeksiyon yapılmıştır.

Tedavi grupları olarak 5-FU çözeltisi, 5-FU + IL-2 çözeltisi ile 5-FU ve IL-2 yüklü CD nanopleksler uygulanmıştır. Kontrol grubu olarak ise farelere sadece pH 7.4 PBS verilmiştir. Nanopleks grubunda 9, diğer gruplarda 8'er hayvan olmak üzere toplam 33 fare ile çalışmalar yürütülmüştür. Tüm gruplara 100 µL hacimde ilgili çözelti ya da formülasyon PBS içerisinde iv. olarak enjekte edilmiştir. Bu amaçla, 100 µL içerisinde gruplara göre; 3,9 mg CD polimeri, 5000 U IL-2 ve 1,3 mg 5-FU (65 mg/kg doza göre 20 g farede uygulanabilecek dozdur) bulunmaktadır.

Farelerin vücut ağırlığı ilk günden itibaren her aşamada (haftada 2 kez); tümör oluşumu, enjeksiyon zamanları ve tedavi sonlandırmada takip edilmiştir. İki hafta boyunca uygulanan tedavi sonrasında fareler sakrifiye edilmiştir. Eter yardımıyla hafif bayıltılan hayvanlardan kan alındıktan sonra sakrifikasyon işlemi yapılmıştır. Daha sonrasında dalak, mezenterik lenf nodu ve tümör dokuları çıkarılarak %10 FBS içeren RPMI besi yerine alınmıştır. Dokular ilk olarak bistüri yardımıyla küçük parçalara ayrılarak mekanik parçalama yapılmıştır. Daha sonra kollajenaz (100 U/mL), DNaseI (200 U/mL) ve %10 FBS-RPMI besi yeri karışımının içerisinde 37°C su banyosunda 1 saat inkübasyona bırakılarak enzimatik parçalama sağlanmıştır. Parçalama işleminin ardından 40 mikrometrelik (µm) steril süzgeçten geçirilerek dokuya infiltre olmuş immün hücrelerin elde edilmesi sağlanmıştır. İzole edilen hücrelerden miyeloid (anti-fare-CD45, CD11b, Ly6G ve Ly6C) ve T (anti-fare-CD45, CD3, CD4, CD8, CD44, CD28, CD69 ve CD62L) hücrelerinin fenotipik özellikleri akım sitometri (FACS Canto II, BD) cihazıyla incelenmiştir. Ayrıca hayvanlardan kan alınmıştır ve 2000 rpmde 10 dakika santrifüj edilerek serum elde edilmiştir. Serumlar -80°C'de saklanmıştır. Elde edilen serumlardan T hücresi ile ilişkili sitokinler akım sitometri (FACS Canto II, BD) cihazıyla ölçülmüştür. Nanopleks formülasyonlarının antitümöral, metastatik ve immünolojik etkileri elde edilen sonuçların analizi FACS Diva (BD, ABD) yazılımı ile yapılarak değerlendirilmiştir.

Hayvanlardan alınan kan, dalak, lenf düğümü ve tümör dokusu örnekleri histopatolojik ve immünolojik olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmalar, Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama Merkezi'nde (HÜDHAM) H. Ü. Kanseri

Enstitüsü Temel Onkoloji ABD öğretim üyesi Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI ve ekibi ile gerçekleştirilmiştir.

c. *In Vivo* Tümör Modelinden Alınan Örneklerin Histopatolojik İncelemesi

PBS, 5FU çözeltisi, 5FU+IL2 çözeltisi ve 5FU/IL2/CD nanopleks formülasyonları uygulanmış olan *in vivo* hayvan modeline ait kolorektal kanser dokusu ile karaciğer ve akciğer örnekleri %10'luk formaldehit solüsyonu ile fikse edilerek doku takip cihazında takip edilmiş ve parafine gömülmüştür. Kızaklı mikrotom cihazı (Leica SM2000R, Almanya) ile yaklaşık 3-5 µm kalınlığında seri kesitler alındıktan sonra örnekler, deparafinizasyon için etüvde bir gece süre ile bekletilmiştir. Histolojik değerlendirme için rutin Hematoksilen&Eozin boyaması yapılmıştır. Tümör dokuları, karaciğer ve akciğerdeki odaklar dijital kamera ataşmanlı ışık mikroskopunda (Leica DM6B, Almanya) değerlendirilmiştir. Her kesitte toplam mikroskopik tümör odağı sayısı hesaplandıktan sonra her odağın en (a) ve boyu (b) µm cinsinden LASX programı ile ölçülmüştür. Yapılan en ve boy ölçümlerinden $p=a/2 \times b/2$ formülü ile her örnek için karaciğerdeki toplam odak alanı hesaplanmıştır [208-212].

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji ABD laboratuvarlarında, Prof. Dr. Petek KORKUSUZ ve ekibi ile gerçekleştirilmiştir.

3.3.6. İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel analizler GraphPad Prism 6 (San Diego, CA, ABD) kullanılarak Student t-testi ve ANOVA testi, tekrar sayısının düşük olduğu çalışmalarda ise Mann-Whitney U testi ve Kruskal-Wallis ile yapılmıştır. $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı bir fark olarak kabul edilmiştir.

In vivo tümör modelinden alınan örneklerden elde edilen histopatolojik veriler normal dağılım göstermediği için Kruskal-Wallis ile çoklu ve post-hoc Bonferroni testi ile ikili karşılaştırma yapılmıştır. Veriler %95'lik güven aralığında değerlendirilmiştir.

3. BULGULAR

4.1. Siklodekstrin Polimerlerin Sentezlenmesi, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu

Sentezlenen farklı CD türevlerinden ön formülasyon çalışmalarında kullanılacak türevlerin belirlenmesi amacıyla, ilk olarak CD türevlerinin yüzey yükü tayini yapılmıştır. Bu amaçla CD türevlerinden 1'er mg tartılarak 1 mL ultra saf su içinde manyetik karıştırıcı varlığında, oda sıcaklığında çözündürülmüştür. Suda çözünen türevlerin yüzey yükü tayini zeta potansiyel ölçümü ile belirlenmiştir. Tamamen yüzey yüklerinin elektrostatik etkileşimine dayalı olarak oluşan nanopleks yapısının oluşumunu sonraki çalışmalarda da doğrulayabilmek adına etkin maddelerin yüzey yükleri hakkında fikir edinmek oldukça önemlidir. Malvern Zetasizer cihazı kullanılarak 12° açı ve 25°C sıcaklıkta, üç tekrar şeklinde gerçekleştirilen ölçümlerde elde edilen bulgular Tablo 4.1. ile verilmiştir.

Tablo 4. 1. Nanopleks yapıyı oluşturmak için kullanılan CD türev ve polimerlerin sudaki zeta potansiyel değerleri (mV) (n=3, ±SS).

CD Türevleri	Polimerler	Zeta Potansiyel (mV) ±SS
CD1	QABCD	4.42 ± 1.8
CD2	QA(BCD)PS.HCl	33.3 ± 0.6
CD3	(GUA)1-BCD	0.8 ± 1
CD4	(GUA)7-BCD	56.4 ± 0.4
CD5	Heptakis(6-deoksi-6-amino) BCD Heptahidroklorür	21.4 ± 0.5
CD6	6-monodeoksi-6-monoamino-BCD (serbest baz)	-27.4 ± 8
CD7	((NH ₂)1-BCD)PS.HCl	22.2 ± 2.3
CD8	((GUA)1-BCD)PS.HCl	34.2 ± 0.8

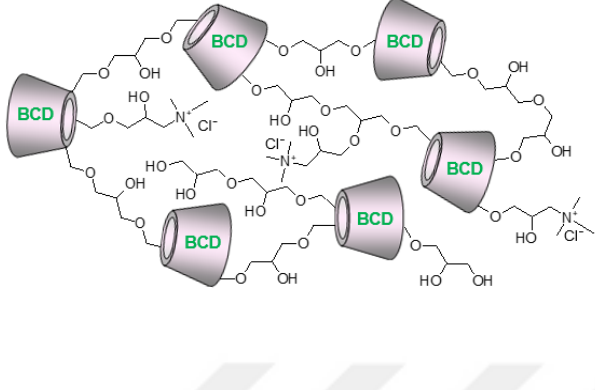
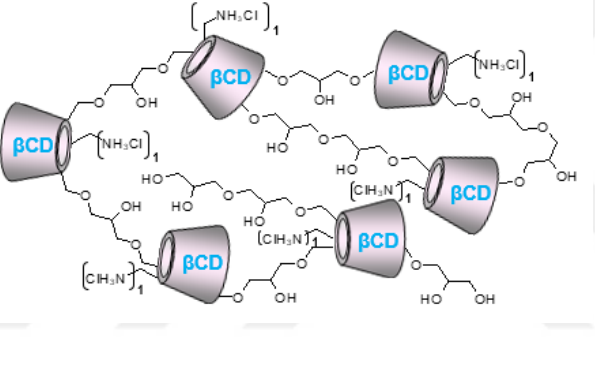
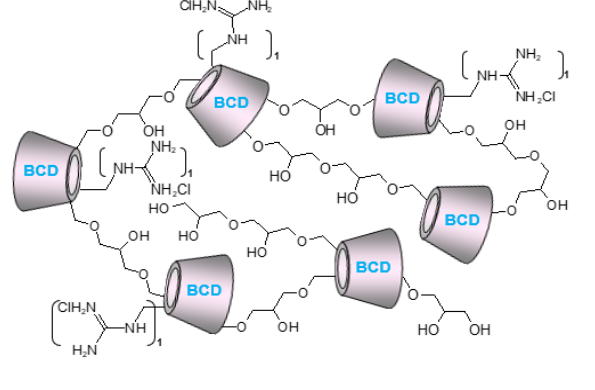
Tablo 4.1.'de sunulduğu üzere CD1, CD3 ve CD6 yapılarının nötral veya negatif yüzey yüküne sahip olmaları sebebiyle, nanopleks oluşum mekanizması olan, yük etkileşimini oluşturmayacakları sonucuna varılmıştır. Ayrıca bu üç CD türevi gibi CD4 ve CD5 yapıları da monomer CD türevleridir. Bu nedenle pozitif yüzey

yüküne sahip olan CD2, CD7 ve CD8 polimerleri ile ön formülasyon çalışmalarının yapılmasına karar verilmiştir.

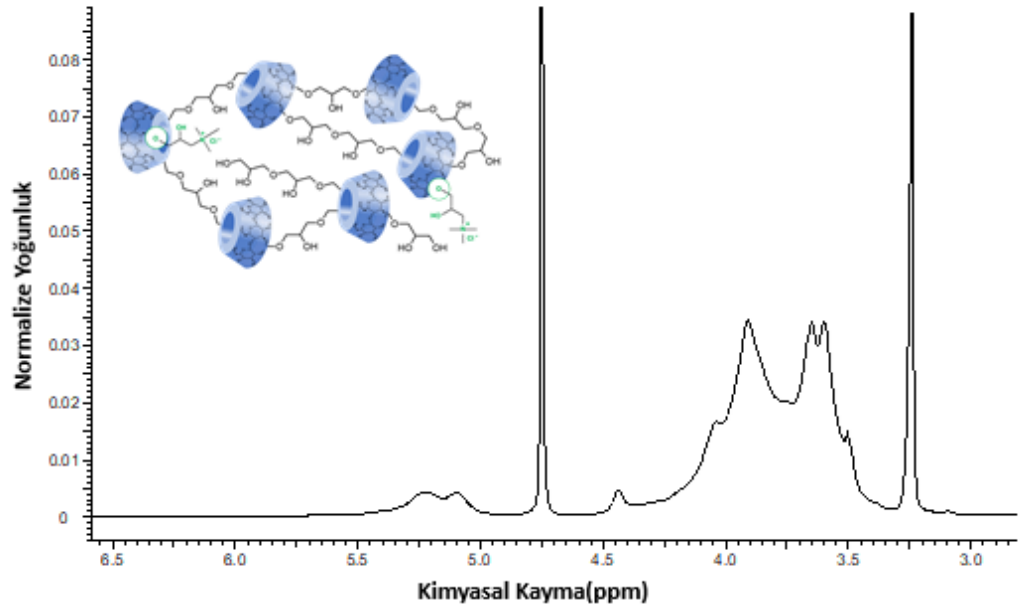
Bu tez çalışmasında kullanılan, Dr. Milo Malanga tarafından sentezlenen ön formülasyon ve formülasyon çalışmalarında kullanılan 3 CD polimerinin moleküler ve kimyasal yapıları Tablo 4.2.'de sunulmuştur. Çalışmada kolaylık sağlaması için polimerler CD2, CD7 ve CD8 olarak numaralandırılmıştır.



Tablo 4. 2. Tez kapsamında kullanılan CD polimerlerinin moleküler ve kimyasal yapıları.

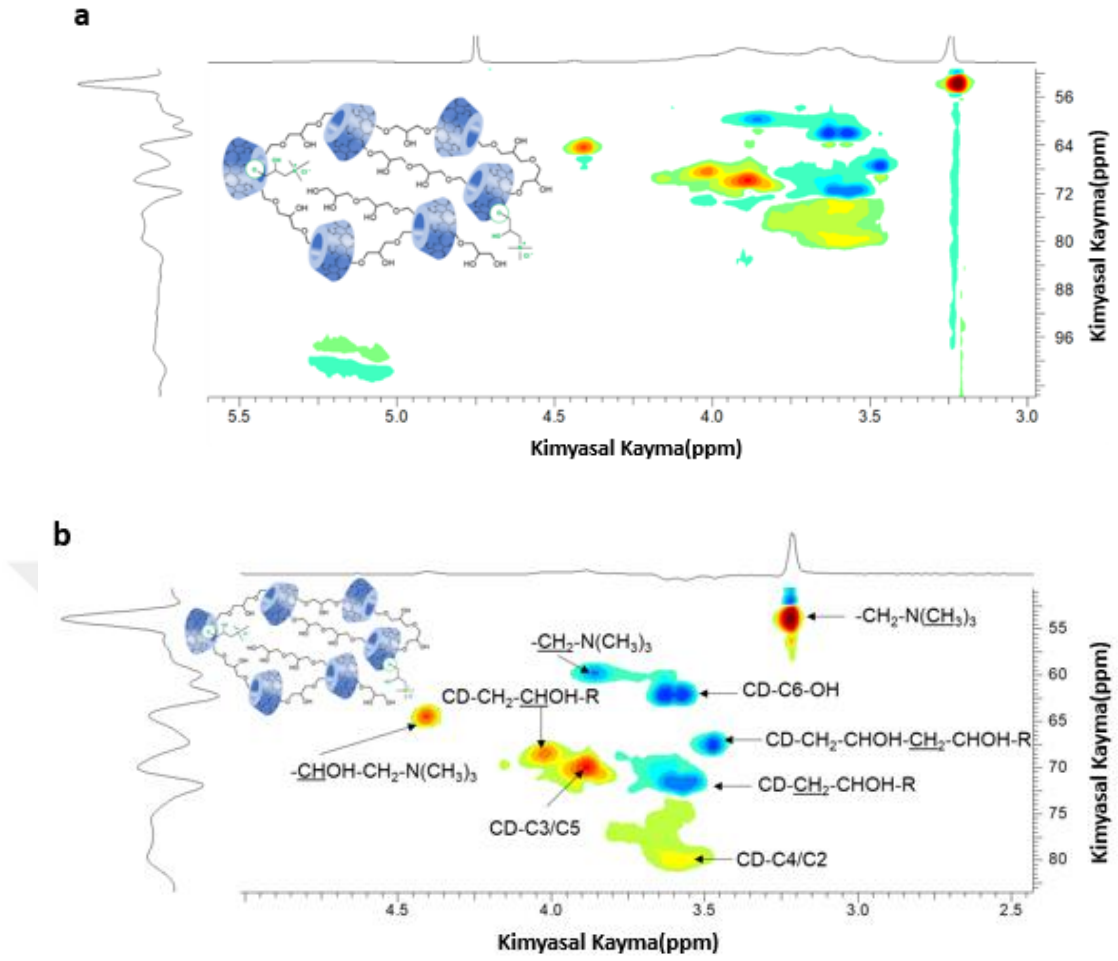
CD Polimerler	Moleküler Yapı	Kimyasal Yapı
CD2		Kuaterner-amonyum- β CD çözünür polimer, epiklorohidrin ile çapraz bağlanmış Çözünürlük: su>30 g (/100 cm ³ , 25°C) Yüzey yükü: 33.3±0.6 mV (suda)
CD7		Çözünür amino-Beta-CD polimer, epiklorohidrin HCl ile çapraz bağlanmış Çözünürlük: Suda çözünür (100 cm ³ , 25°C) Yüzey yükü: 22.2±2.3 mV (suda)
CD8		Çözünür guanidino-Beta-CD polimer, epiklorohidrin HCl ile çapraz bağlanmış Çözünürlük: Suda çözünür (100 cm ³ , 25°C) Yüzey yükü: 34.2±0.8 mV (suda)

Nanoplekslerin oluşması ancak farklı yüzey yüklerinin etkileşiminin varlığında mümkündür. CycloLab tarafından sentezlenen pozitif yüzey yüküne sahip CD polimerlerinin (CD2, CD7 ve CD8) yapısal analizlerinin sonuçları sırasıyla Şekil 4.1. – 4.6.’da sunulmaktadır.



Şekil 4. 1. CD2 polimerine ait ^1H -NMR bulguları (D_2O , 298 K, 600 MHz).

Bir βCD bazlı dallanmış yapıdaki polimerin ^1H -NMR spektrumu, polimer içindeki CD içeriğinin belirlenmesine olanak sağlamaktadır. Bununla birlikte, ^1D NMR deneyleriyle çıkarılabilen yapısal bilgi sınırlıdır. CD2'nin ^1H -NMR spektrumu, dört farklı geniş sinyal bölgesi gösterir (Şekil 4.1.). Piklerin genişliği, başarılı bir polimerizasyon gerçekleştirildiğinin bir göstergesidir. 3.0-3.5 ppm arasındaki keskin tepe, kuaterner amonyum gruplarının ($-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_3$) metil ünitesine; 4,5 ppm'deki küçük frekans, kuaterner amonyum parçalarının ($-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_3$) metin birimine; 5-5,5 ppm arasındaki CD'nin anomerik bölgesine karşılık gelmektedir. Anomer şeker kimyasındaki bir ifade olup α - ve β - konfigürasyon farklılığına sahip izomerler için kullanılmaktadır. Glikoz ünitesindeki 1 numaralı karbon atomundaki $-\text{OH}$ grubu ile 6 numaralı karbon atomundaki $-\text{OH}$ grubunun trans yapıda olması sonucunda α - izomer ya da anomeri, cis yapıda olması sonucunda β - izomeri oluşmaktadır. Anomerler birbiri ile denge halinde bulunmaktadır. 3.0-4.5 ppm arasındaki geniş tepe yapının diğer tüm rezonanslarının örtüşmesinin sonucudur.

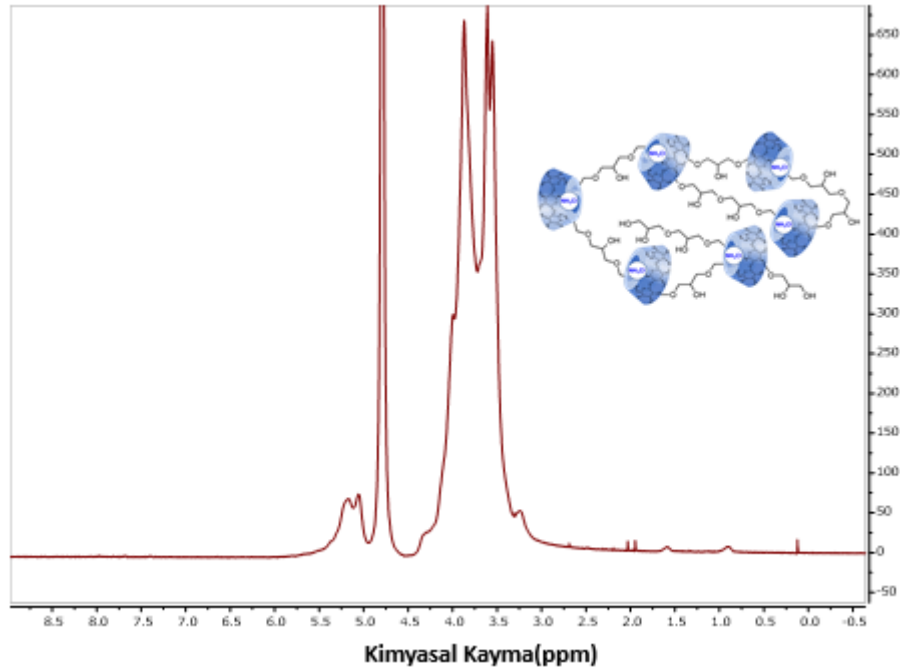


Şekil 4. 2. CD2 polimerinin DEPT tarafından düzenlenmiş HSQC spektrumu (a) (D_2O , 298 K, 600 MHz). Spektrumun genişletilmiş hali (b).

Şekil 4.2.(a)'da, CD2'nin DEPT tarafından düzenlenmiş HSQC spektrumu gösterilmektedir. 2B spektrumlar arasında, DEPT tarafından düzenlenen HSQC, polimeri oluşturan yapısal motiflerin tanımlanması/doğrulanması için kullanılan bir yöntemdir. Spektrum, dört ayrı çapraz pik grubuna bölünmüştür. ~ 5.0-5,2 ppm / 100 ppm bölgesi anomerik çapraz pik grubunu; 3,2 ppm / 54 ppm bölgesi kuaterner amonyum gruplarının metil birimlerini; 4,5 ppm / 64 ppm bölgesi kuaterner amonyum kısımlarının metil birimini ve 3.4-4-5 ppm/ 55-90 ppm bölgesi kalan tüm çapraz pikleri göstermektedir.

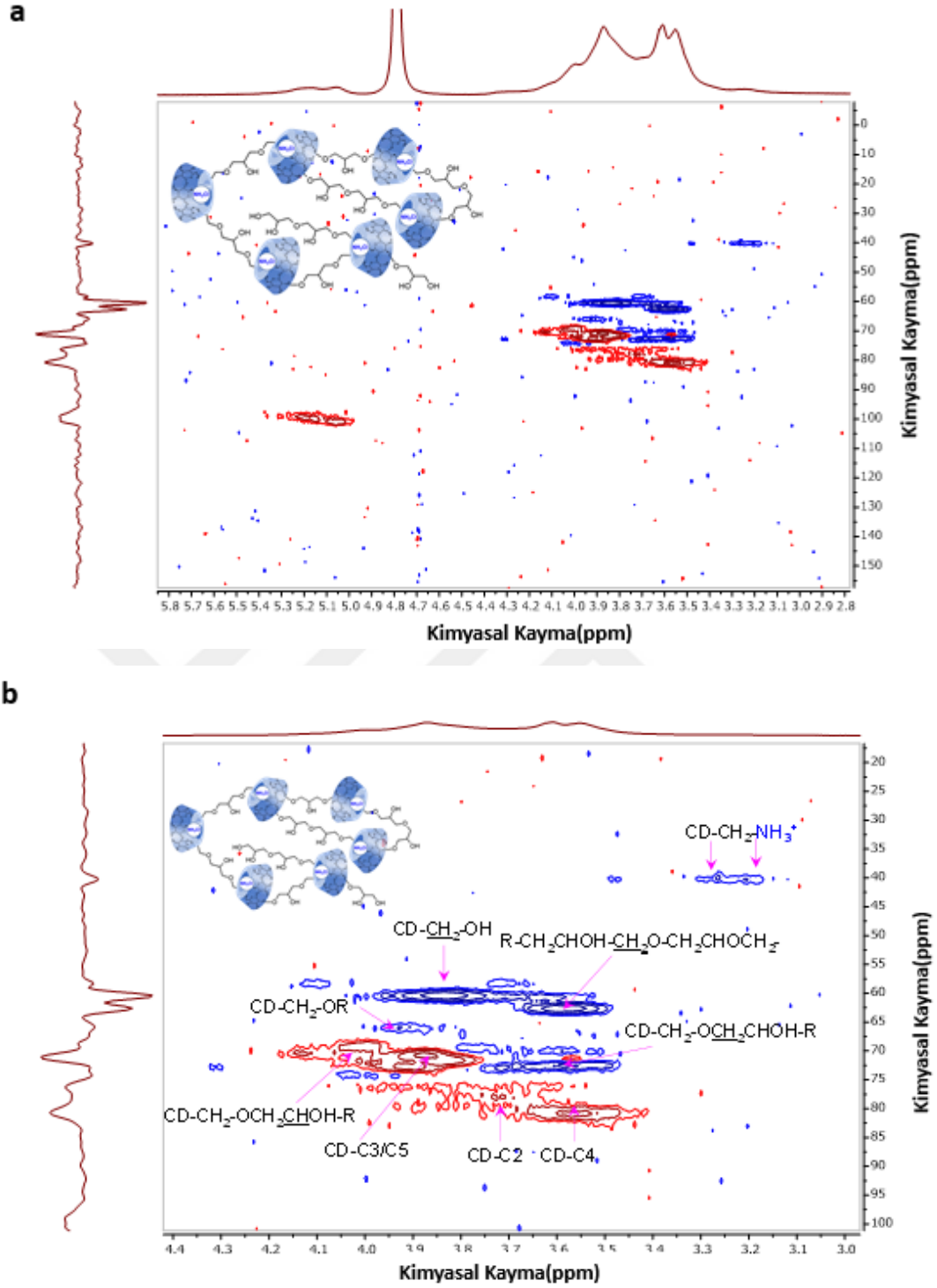
Şekil 4.2.(b)'de, CD2'nin DEPT tarafından düzenlenen HSQC spektrumunun büyütülmüş hali gösterilmektedir. Metilen birimi çapraz pikleri, değerlendirme için iyi bir başlangıç noktasıdır. CD'nin birincil tarafındaki sübstitüe edilmemiş metilen

birimleri tipik olarak 60 ppm'de (CD-C6-OH) rezonansa girer. CD'nin birincil yan metilen birimlerinin alkil grubu ile sübstitüsyonu, 65-70 ppm (CD-CH₂-CHOH-R) arasında daha yüksek alanda frekansların kaymasına neden olur. ~67 ppm ve ~72 ppm'deki iki yaygın metilen çapraz tepe seti, çapraz bağlama maddesinin protonlarını ifade eder. ~67 ppm'deki çapraz tepeler, propilen glikolünkilere benzer, bağlayıcının distal (CD'ye göre) metilen birimlerine (yapısal motif: CD-CH₂-CHOH-CH₂-O-CH₂CHO-CH₂-); ~72 ppm'deki dağınık çapraz tepeler ise HPβCD monomerininkilere benzer şekilde bağlayıcının/sübstitüe edicinin yakın (CD'ye göre) metilen birimlerine (yapısal motif: CD-CH₂-CHOH-R) karşılık gelmektedir [213]. Protonlanmış nitrojene (-CH₂-N(CH₃)₃) bitişik olan metilen birimi, daha yüksek kimyasal kaymada (3,8 ppm / 58 ppm) rezonansa girmektedir.



Şekil 4. 3. CD7'nin ¹H-NMR spektrumu (D₂O, 298 K, 600 MHz).

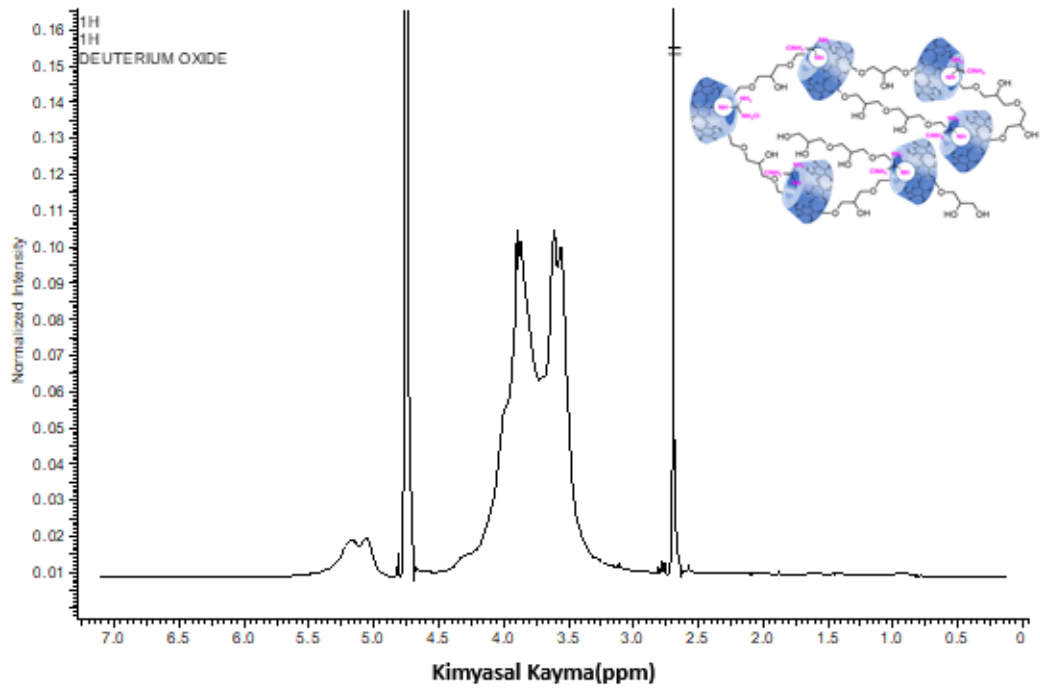
CD7'nin ¹H-NMR spektrumu (Şekil 4.3.) iki farklı geniş sinyal bölgesini göstermektedir. Piklerin genişliği, başarılı bir polimerizasyonun göstergesidir. Daha yüksek frekanslardaki bölge, 5,0-5,5 ppm, CD'nin anomerik bölgesine karşılık gelmektedir; 3,0-4,5 ppm arasındaki geniş tepe, yapının diğer tüm rezonanslarının örtüşmesinin sonucunda oluşmuştur.



Şekil 4. 4. CD7 polimerine ait DEPT tarafından düzenlenmiş HSQC spektrumu (a) (D_2O , 298 K, 600 MHz). Spektrumun genişletilmiş hali (b).

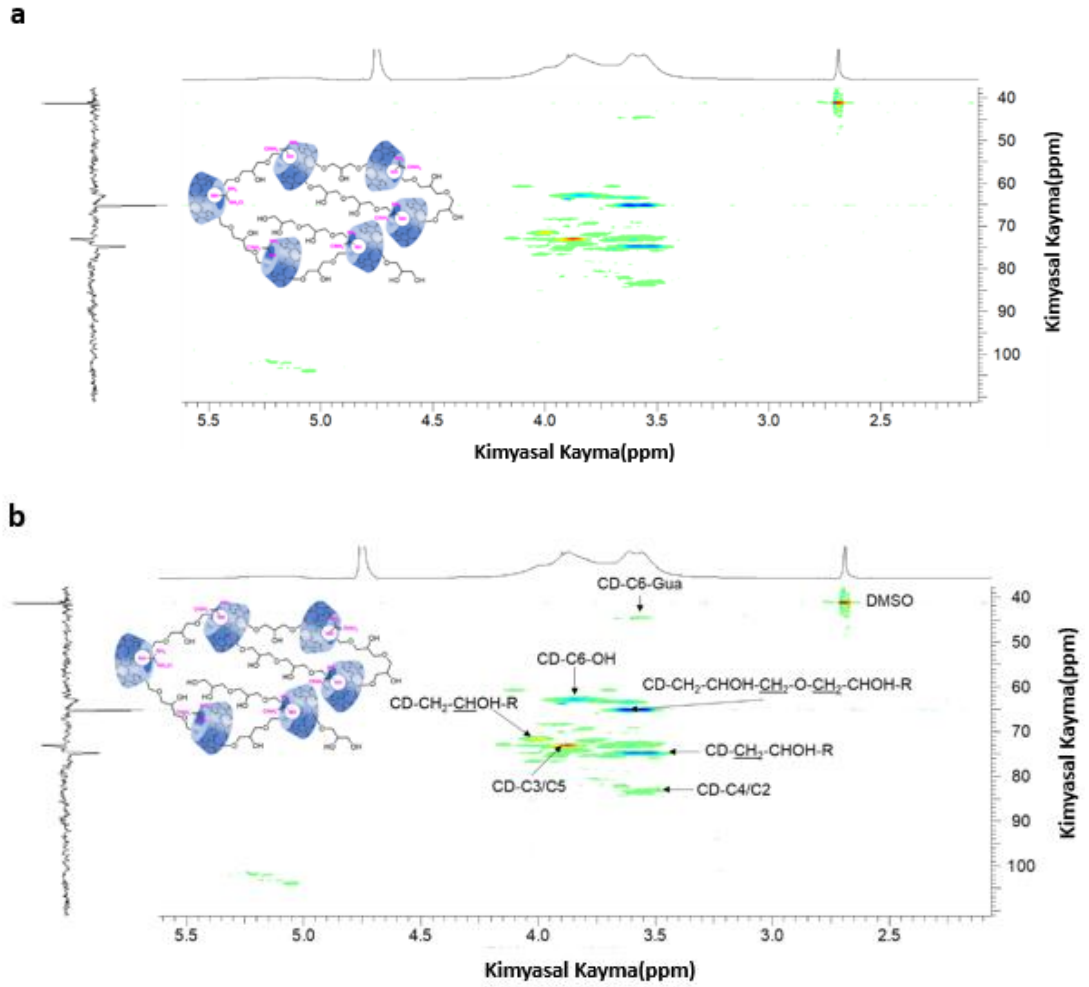
Şekil 4.4.(a)'da sunulan 2B spektrum, iki izole edilmiş çapraz tepe kümesine bölünmüştür. Anomerik çapraz tepeler kümesi $\sim 5,0-5,2$ ppm/ 100 ppm ve kalan tüm çapraz tepeler 3,4-5 ppm/ 40-90 ppm arasındadır. Şekil 4.4.(b)'de genişletilmiş spektrumda, başlangıç maddesi olan Poli-(N3)₁- β CD'nin analog spektrumundan en

önemli fark, amonyum parçasına bitişik metilen biriminin kaymasıdır. Azido grubunun indirgenmesinden sonra, çapraz tepe ~50 ppm'den ~40 ppm'ye ($\text{CD-CH}_2\text{-NH}_3^+$) taşınmış, böylece reaksiyonun gerçekleştirildiği açık bir şekilde kanıtlanmıştır. Azidlenmiş öncüye benzer şekilde, $\text{Poli-(NH}_3^+)_1\text{-}\beta\text{CD}$ 'nin DEPT tarafından düzenlenmiş HSQC spektrumunda, CD'nin birincil tarafındaki sübstitüe edilmemiş metilen birimlerini tipik olarak 60 ppm'de rezonat ($\text{CD-CH}_2\text{-OH}$) tanımlamak mümkündür. CD'nin birincil yan metilen birimlerinin alkil grubu ile sübstitüsyonu, 65-70 ppm ($\text{CD-CH}_2\text{-OR}$) arasında daha yüksek alanda frekansların kaymasına neden olur. ~62 ppm ve ~72 ppm'de kalan iki dağınık metilen çapraz pik seti, çapraz bağlama maddesinin protonlarına karşılık gelir. ~ 62 ppm'deki çapraz tepeler, propilen glikolünkilere benzer, bağlayıcının distal (CD'ye göre) metilen birimlerine (yapısal motif: $\text{R-CH}_2\text{CHOH-CH}_2\text{O-CH}_2\text{CHOCH}_2\text{-}$); ~72 ppm'deki dağınık çapraz tepeler, bu frekanslar HP β CD monomerininkilere benzer bağlayıcının/sübstitüe edicinin proksimal (CD'ye göre) metilen birimlerine (yapısal motif: $\text{CD-CH}_2\text{-OCH}_2\text{CHOH-R}$) karşılık gelmektedir. Polimeri oluşturan metin birimlerinin tam ataması, tipik olarak 80 ppm'de rezonansa giren CD'nin C4 frekanslarının beklentisiyle tanımlanması daha zordur. CD-C2'de OH gruplarının alkil gruplarıyla ikame, daha yüksek ppm'de, genellikle 75-80 ppm (CD-C2) arasında kaymaya neden olur. CD-C5'e ve sübstitüe edilmemiş CD-C3'e karşılık gelen frekanslar/arabozanlar, kısmen örtüştüklerinden monomerik CD ile bile atanması en zor olanlardır. Bir βCD bazlı dallanmış polimerin özel durumunda, sinyalin kısmi örtüşmesi ve yayılması, analizi daha da zorlaştırır. Bununla birlikte, metin birimi çapraz tepeleri arasında, daha yüksek frekanslarda (4.0-4.015 ppm) rezonansa girenler, proksimal (CD'ye göre) yapısal motife karşılık gelir: $\text{CD-CH}_2\text{-OCH}_2\text{CHOH-R}$.



Şekil 4. 5. CD8 polimerine ait ^1H -NMR spektrumu (D_2O , 298 K, 600 MHz).

Şekil 4.5.'teki spektrumda daha yüksek frekanslardaki bölge, CD'nin anomerik bölgesine 5,0-5,5 ppm karşılık gelirken 3.0-4.5 ppm arasındaki geniş tepe, yapının diğer tüm rezonanslarının örtüşmesinin sonucudur.



Şekil 4. 6. CD8 polimerine ait DEPT tarafından düzenlenmiş HSQC spektrumu (a) (D₂O, 298 K, 600 MHz). Spektrumun genişletilmiş hali (b).

Şekil 4.6.(a)'da sunulan 2B spektrum, iki izole edilmiş çapraz tepe kümesine bölünmüştür. Anomerik çapraz tepeler kümesi 5,0-5,2 ppm/ 100 ppm ve kalan tüm çapraz tepeler 3,4-5 ppm/ 45-90 ppm arasındadır. Şekil 4.4.(b)'de başlangıç maddesi Poli-(NH₃⁺)₁-βCD'nin analog spektrumuyla en önemli fark, guanidino parçasına bitişik metilen biriminin kaymasıdır. Amino grubunun dönüştürülmesinden sonra, çapraz tepe ~40 ppm'den ~45 ppm'ye (CD-C6-Gua) taşınmış, böylece reaksiyonun gerçekleştirildiği açık bir şekilde kanıtlanmıştır. Başlangıç maddesine benzer şekilde, Poli-(Gua)₁-βCD'nin DEPT tarafından düzenlenmiş HSQC spektrumunda, CD'nin birincil tarafında tipik olarak 60 ppm'de rezonansa giren sübstitüe edilmemiş metilen birimlerini de tanımlamak mümkündür (CD-C6-OH). CD'nin birincil yan metilen birimlerinin alkil grubu ile sübstitüsyonu, 65-70 ppm (CD-CH₂-OR) arasında daha yüksek alanda frekansların kaymasına neden olur.

~62 ppm ve ~72 ppm'de kalan iki dağınık metilen çapraz pik seti, çapraz bağlama maddesinin protonlarına karşılık gelir. ~ 62 ppm'deki çapraz tepeler, propilen glikolünkilere benzer, bağlayıcının distal (CD'ye göre) metilen birimlerine (yapısal motif: $R-CH_2CHOH-\underline{CH_2}O-CH_2CHOCH_2-$); ~72 ppm'deki dağınık çapraz tepeler, bu frekanslar HP β CD monomerininkilere benzer bağlayıcı/süstitüe edicinin yakın (CD'ye göre) metilen birimlerine (yapısal motif: $CD-\underline{CH_2}CHOH-R$) karşılık gelmektedir. Polimeri oluşturan metin birimlerinin, tipik olarak 80 ppm'de rezonansa giren CD'nin C4 frekanslarının beklentisiyle tanımlanması daha zordur. CD-C2'de OH gruplarının alkil gruplarıyla süstitüsyonu, daha yüksek ppm'de, genellikle 75-80 ppm (CD-C2) arasında kaymaya neden olur. CD-C5'e ve süstitüe edilmemiş CD-C3'e karşılık gelen frekanslar/arabozanlar, kısmen örtüşüklerinden monomerik CD ile bile atanması en zor olanlardır. Bir β CD bazlı dallanmış polimerin özel durumunda, sinyalin kısmi örtüşmesi ve yayılması, görevi daha da zorlaştırır. Bununla birlikte, metin birimi çapraz tepeleri arasında, daha yüksek frekanslarda (4.0-4.015 ppm) rezonansa girenler, proksimal (CD'ye göre) yapısal motife karşılık gelir: $CD-CH_2\underline{CHOH}-R$.

4.2. 5-FU ve IL-2 Yüklü CD Nanoplekslerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

4.2.1. Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı ile Yüzey Yüğü Tayini

Bu çalışmalar Dr. Nielsen tarafından sentezlenen türevlerle başlamıştır. Faktöriyel tasarım çalışmaları gerçekleştirilen bu türevlerden elde edilen nanopleksler 200-300 nm aralığında partikül büyüklüğüne, geniş polidisperite indeksi değerlerine ve çoğunlukla negatif ya da nötral yüzey yüküne sahip olmuştur. Bu türevlerden elde edilen nanopleks kritik kalite parametrelerinin (ortalama partikül büyüklüğü, PDI ve yüzey yükü) istenilen düzeyde olmaması, elde edilen nanoplekslerin partikül büyüklüğünün çok yüksek ve polidispersitelerinin çok geniş olması sebebi ile tez çıktılarına ulaşabilmek için farklı CD polimerler ile çalışma ihtiyacı oluşmuş ve CycloLab ile iş birliği yapılmıştır.

CycloLab'da sentezlenen farklı CD türevlerinden ön formülasyon çalışmalarında kullanılacak türevlerin belirlenmesi amacıyla, ilk olarak CD türevlerinin yüzey yükü tayini yapılmıştır (Tablo 4.1.). Tabloda görüldüğü gibi, CD1,

CD3 ve CD6'nın nötral ve negatif yüzey yüküne sahip olmaları; CD4 ve CD5 türevleri ise pozitif yüzey yüküne sahip monomerik yapıda CD türevleri olmaları sebebiyle ilerleyen çalışmalarda kullanılamayacağı belirlenmiştir. Zeta potansiyel değerlerine göre, net pozitif yüzey yüküne sahip olan CD polimerleri (CD2, CD7 ve CD8) ile ön formülasyon ve formülasyon çalışmalarının yapılmasına karar verilmiştir. Çünkü tez kapsamında hedeflenen sistem; nanoplekslerin oluşması ancak farklı yüzey yüklerinin etkileşimi varlığında mümkündür.

Daha önce de belirtildiği gibi, ön formülasyon çalışmalarında etkin madde IL-2'yi negatif yüzey yüküne sahip olması açısından taklit etmesi amacıyla, model molekül olarak sodyum tripolifosfat (STPP) kullanılmıştır. Literatür bilgisine dayanarak, 5-FU ve IL-2'nin negatif yüzey yüküne sahip olduğu bilinmektedir [214]. 5-FU ile katyonik kitosan ve sodyum tripolifosfat ile katyonik kitosan arasında iyonik jelasyon yöntemiyle nanopartiküler sistemlerin hazırlandığı farklı çalışmalar bulunmaktadır [191, 200]. Tüm bu bilgiler ışığında bir ön değerlendirme olabilmesi için ve tez kapsamında temin edilen etkin maddelerin yüzey yükünden emin olmak amacıyla 5-FU, IL-2 ve STPP suda çözülerek zeta potansiyel ölçümleri yapılmıştır. Tamamen yüzey yüklerinin elektrostatik etkileşimine dayalı olarak oluşan nanopleks yapısının oluşumunu sonraki çalışmalarda da doğrulayabilmek adına etkin maddelerin yüzey yükleri hakkında fikir edinmek oldukça önemlidir. Zeta potansiyel ölçümleri sonucunda literatür bilgisi ile uyumlu veriler elde edilmiştir. Ayrıca, hazırlanan nanopleks formülasyonları ultra saf su içinde olduğundan, ultra saf su için de zeta potansiyel ölçümü yapılmış ve sonuç $(-1.46 \pm 1.07 \text{ mV})$ olarak kaydedilmiştir.

Çalışmalarda kullanılan etkin maddeler ve model yapı olan STPP'ye ait zeta potansiyel (ZP) değerleri Tablo 4.3. ile verilmiştir.

Tablo 4. 3. Nanopleks yapısını oluşturmak için kullanılan ve negatif yüzey yüküne sahip maddelerin sudaki zeta potansiyel değerleri (mV) (n=3, $\pm$ SS).

Etkin Maddeler	Zeta Potansiyel (mV)
5-Florourasil (5-FU)	-17.9 ± 0.4
İnterlökin-2 (IL-2)	-22.0 ± 2.5
Sodyum tripolifosfat (STPP)	-53.1 ± 1.8

Nanopleksler, yapısal oluşumu elektrostatik etkileşime dayanan ve iki zıt yüklü yapının karıştırılması ile kendiliğinden oluşan nanopartiküler yapılardır [215, 216].

Elde edilen zeta potansiyel sonuçları ile tez kapsamında kullanılacak nanopleks yapısının, 5-FU konjuge pozitif yüklü CD polimer ve negatif yüzey yüküne sahip IL-2 ile oluşturulabilmesinin mümkün olduğu gösterilmiştir.

Tez kapsamında gerçekleştirilen Dr. Nielsen tarafından sentezlenen CD türevleri ile gerçekleştirilen ilk çalışma sonuçları göz önünde bulundurularak CD2, CD7 ve CD8 polimerleri ile nanopleksler hazırlanmıştır. Bu amaçla, 1 mg STPP 20 mL suda çözündürülmüş ve bu çözeltiden 1 mL alınarak, önceden çözündürülmüş olan 1 mg CD ve 1 mL su karışımına eklenmiş 600 rpm’de 30 dakika karıştırılmıştır. Elde edilen partikül büyüklüğü dağılımı ve yüzey yükü değerleri Tablo 4.4. ile sunulmuştur.

Tablo 4. 4. CD polimerleri ile STPP nanoplekslerinin partikül büyüklüğü dağılımı ve yüzey yükü değerleri (n=3, $\pm$ SS).

CD Polimer Tipi	PB (nm) $\pm$ SS	PDI $\pm$ SS	ZP (mV) $\pm$ SS
CD2	187 $\pm$ 5.5	0.3 $\pm$ 0.04	24.9 $\pm$ 0.1
CD7	128 $\pm$ 10	0.4 $\pm$ 0.04	10.2 $\pm$ 0.9
CD8	169 $\pm$ 78	0.4 $\pm$ 0.1	7.2 $\pm$ 0.8

Literatürdeki çalışmalara bakıldığında nanopleks yapıların yüksek hacimlerde de hazırlandığı görülmüş ve formülasyon hacmi 2 mL’den 4 mL’ye, iki kat arttırılmıştır. Ayrıca nanopleks hazırlama yöntemi olarak CD çözeltisi üzerine STPP çözeltisi damla damla ilave ederek 30 dakika, 600 rpm’de karıştırılmış ve ardından 0,45 μ m’lik filtreler ile filtre edilmiştir. Elde edilen nanoplekslere ait sonuçlara bakıldığında hacim artışının partikül büyüklüğünde CD2 nanoplekslerinde küçülmeye neden olduğu ancak CD7 ve CD8 nanoplekslerinde artışa yol açtığı gözlenmiştir (Tablo 4.5.). Sonuç olarak, 100-250 nm aralığında partikül büyüklüğüne sahip nanopleksler hazırlanmıştır.

Tablo 4. 5. STPP ile hazırlanan nanoplekslerinin hacim arttırılması sonucu belirlenen partikül büyüklüğü ve dağılımı ile zeta potansiyel değerleri (n=3, $\pm$ SS).

CD Polimer Tipi	PB (nm) $\pm$ SS	PDI $\pm$ SS	ZP (mV) $\pm$ SS
CD2	116 $\pm$ 12	0.5 $\pm$ 0.02	8.9 $\pm$ 0.3
CD7	235 $\pm$ 2.8	0.38 $\pm$ 0.01	-0.9 $\pm$ 0.2
CD8	238 $\pm$ 35.6	0.5 $\pm$ 0.03	2.7 $\pm$ 0.01

Nanopleks hazırlamada kullanılan etkin maddenin molekül ağırlığının azalması partikül büyüklüğünü doğrudan etkilemektedir. 5-FU'nun yanı sıra tez kapsamında kullanılan ikinci etkin madde olan IL-2 ile nanopleks formülasyonları hazırlanmıştır. Literatür temel alınarak iki farklı konsantrasyonda (0,08 μ g ve 0,16 μ g) IL-2 içeren nanoplekslere ait PB, PDI ve ZP değerleri Tablo 4.6.'da verilmektedir. Yüksek ve düşük IL-2:CD oranı olarak geçen bu oranlar 1:50.000 ve 1:25.000'dir.

Tablo 4. 6. Farklı IL-2 miktarları ile hazırlanan CD nanopleks formülasyonlarına ait partikül büyüklüğü (nm), PDI ve zeta potansiyel (mV) değerleri (n=3, $\pm$ SS).

CD Polimer Tipi		Yüksek IL-2:CD oranı içeren nanopleks formülasyonu			Düşük IL-2:CD oranı içeren nanopleks formülasyonu		
		PB (nm) $\pm$ SS	PDI $\pm$ SS	ZP (mV) $\pm$ SS	PB (nm) $\pm$ SS	PDI $\pm$ SS	ZP (mV) $\pm$ SS
CD2	Filtrasyon öncesi	309 $\pm$ 86	0.4 $\pm$ 0.03	32 $\pm$ 2.5	79 $\pm$ 9.4	0.44 $\pm$ 0.02	34.5 $\pm$ 2.7
	Filtrasyon sonrası	132 $\pm$ 5.5	0.5 $\pm$ 0.03	31 $\pm$ 1.7	65 $\pm$ 4.5	0.48 $\pm$ 0.01	26.8 $\pm$ 0.5
CD7	Filtrasyon öncesi	280 $\pm$ 25	0.4 $\pm$ 0.1	18 $\pm$ 2.1	60 $\pm$ 4.5	0.42 $\pm$ 0.1	19.3 $\pm$ 3.4
	Filtrasyon sonrası	262 $\pm$ 7	0.3 $\pm$ 0.2	20 $\pm$ 1.3	48 $\pm$ 7.1	0.37 $\pm$ 0.1	17.8 $\pm$ 1.8
CD8	Filtrasyon öncesi	252 $\pm$ 40	0.4 $\pm$ 0.06	32 $\pm$ 3.1	230 $\pm$ 74	0.48 $\pm$ 0.1	34.2 $\pm$ 4.7
	Filtrasyon sonrası	241 $\pm$ 25	0.7 $\pm$ 0.2	35 $\pm$ 1.5	95 $\pm$ 7	0.9 $\pm$ 0.06	28.7 $\pm$ 3.6

Bu sonuçlar göz önüne alındığında; filtre por açıklığını aşan partikül boyutu gözlenmemiştir (Tablo 4.6.). Sonuç olarak, CycloLab tarafından bu 3 CD polimerinin 5-FU ile konjugasyonlarının yapılması talep edilmiş ve çalışmalara başlanmıştır.

Her iki etkin maddeyi içeren 5-FU ve IL-2 yüklü CD nanoplekslerin hazırlanmasında öncelikle; 0,4 mg/mL olacak şekilde ultra saf su içinde 5-FU stok çözeltisi hazırlanmış, 1 saat 600 rpm’de karıştırılmıştır. Sonrasında 4 mg CD tartılmış ve 984 μ L ultra saf su içinde 1 saat 600 rpm’de çözünmesi sağlanmıştır. Hazırlanan 5-FU stok çözeltisinden 1 mL, CD çözeltisine eklenmiş ve 30 dakika 600 rpm’de karıştırılmıştır. Bu ikili sistemin üzerine, öncesinde stok olarak hazırlanan IL-2 çözeltisinden, 16 μ L (=0,16 μ g) eklenmiş ve 30 dakika 600 rpm’de karıştırılarak nanopleksler hazırlanmıştır. Nanoplekslere ait PB, PDI ve ZP ile partikül stabilitesini etkileyen parametrelerden olan pH değerleri Tablo 4.7. ile sunulmaktadır.

Tablo 4. 7. 5-FU ve IL-2 yüklü CD nanoplekslerin partikül büyüklüğü dağılımı, yüzey yükü ve pH değerleri (n=3, $\pm$ SS).

CD Polimer Tipi	PB (nm)	PDI	ZP (mV)	pH
CD2	68,4 $\pm$ 12,3	0,5 $\pm$ 0,02	25,7 $\pm$ 1,8	6,5
CD7	43,4 $\pm$ 15,4	0,6 $\pm$ 0,4	14,2 $\pm$ 1,8	5,5
CD8	91,3 $\pm$ 14,7	0,7 $\pm$ 0,2	27 $\pm$ 2,3	7

Bu sonuçlar ışığında, iki etkin maddeyi taşıyan nanopleks yapısının CD2, CD7 ve CD8 polimerleri ile 100 nm’nin altında ortalama partikül büyüklüğü elde edilmiş ve nötrale yakın pH değerleri ölçülmüştür.

5-FU ve IL-2 yüklü CD nanoplekslerin liyofilizasyon işlemi sonrası dağılımları ve bu kapsamda saklama koşullarının partikül büyüklüğü ve dağılımı ile yüzey yüküne etkisi değerlendirilmiştir. Hazırlanan nanoplekslerin bu parametrelerinin Malvern Zetasizer Nano ZS cihazı ile ölçümleri yapılmıştır. Ardından HETO PowerDry PL3000 liyofilizatörü ile 48 saat süresince liyofilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Liyofilize haldeki örnekler bu süre sonunda alınarak, liyofilizasyon öncesindeki hacmine eşit hacimde ultra saf su içinde dağıtılmış ve ardından Malvern Zetasizer Nano ZS cihazı ile partikül büyüklüğü ve dağılımı ile zeta potansiyel değerleri ölçülmüştür. Elde edilen veriler Tablo 4.8.’de gösterilmiştir.

Tablo 4. 8. 5-FU ve IL-2 yüklü CD nanoplekslerin liyofilizasyon öncesi ve sonrası partikül büyüklüğü dağılımı ve yüzey yükü değerleri (n=3, $\pm$ SS) (*t-test, $p<0,05$ liyofilizasyon öncesi sonuçlarına göre) (Koyu karakter ile yazılan sonuç, istatistiksel farkın tespit edildiği sonuçtur).

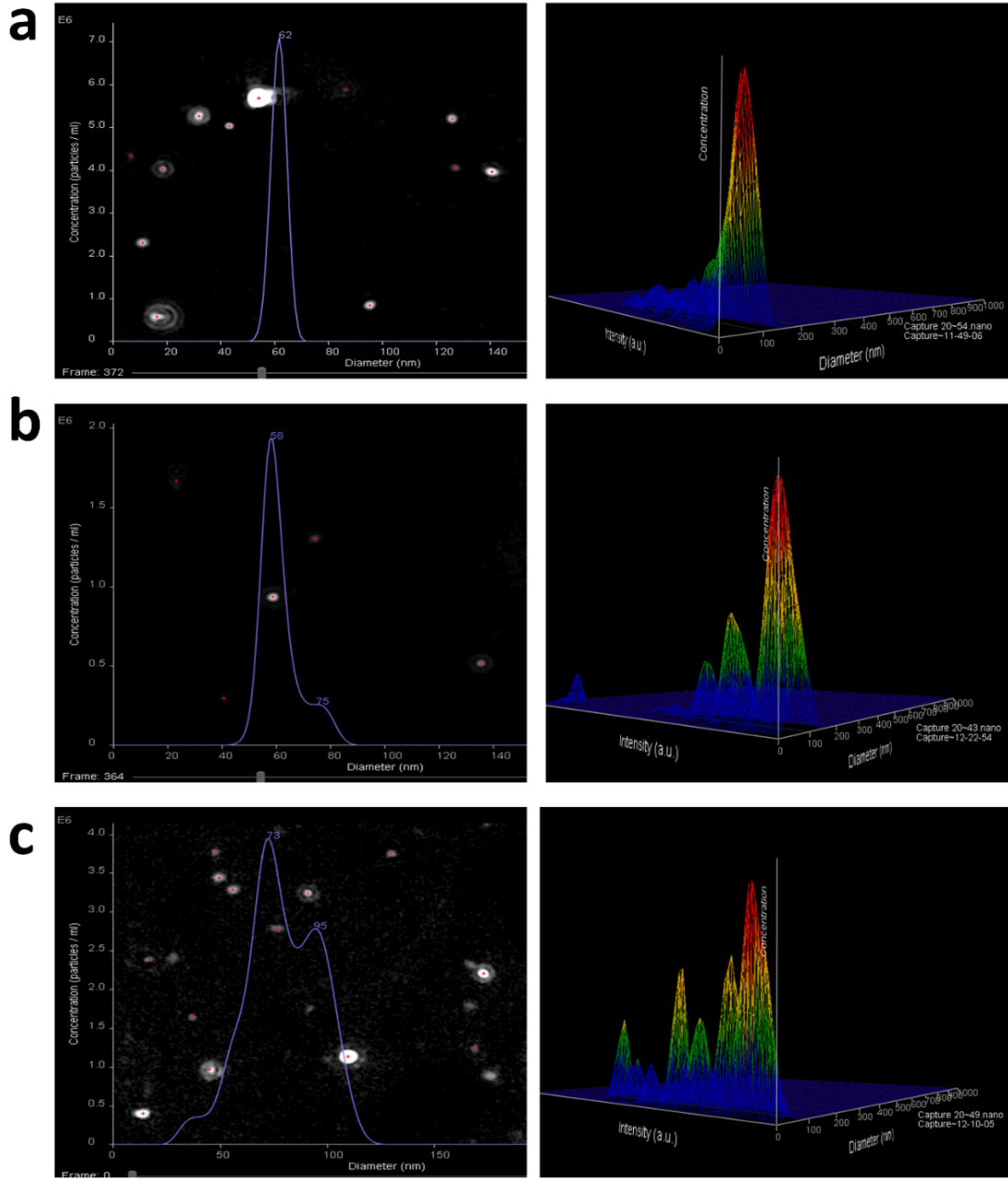
CD Polimer Tipi	Liyofilizasyon Öncesi			Liyofilizasyon Sonrası		
	PB (nm) $\pm$ SS	PDI $\pm$ SS	ZP (mV) $\pm$ SS	PB (nm) $\pm$ SS	PDI $\pm$ SS	ZP (mV) $\pm$ SS
CD2	68,4 $\pm$ 12,3	0,48 $\pm$ 0,02	25,7 $\pm$ 1,8	63,9 $\pm$ 9,7	0,52 $\pm$ 0,07	30,2 $\pm$ 1,7
CD7	43,5 $\pm$ 15,4	0,58 $\pm$ 0,3	14,2 $\pm$ 1,8	133,1$\pm$29,6*	0,73$\pm$0,3*	18,3 $\pm$ 2,8
CD8	91,2 $\pm$ 14,7	0,73 $\pm$ 0,2	27 $\pm$ 2,3	129,8 $\pm$ 22,3	0,77 $\pm$ 0,1	22,03 $\pm$ 6

Hazırlanan ilaç yüklü nanopleksler, liyofilizasyon işlemi sonrası suda disperse edildiklerinde, 5-FU ve IL-2 yüklü CD7 nanoplekslerin partikül büyüklüğü ve dağılımı değerlerinde istatistiksel fark belirlenmiştir (*t-test, $p<0,05$). CD2 ve CD8 polimerleri ile hazırlanan 5-FU ve IL-2 yüklü nanoplekslerde ise liyofilizasyon sonrası oluşan fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

DLS ile elde edilen sonuçlara ek olarak nanoplekslerin karakterizasyonu için ayrıca Nanopartikül İzleme Analizi (NTA) ile Nanosight NS300 cihazında partikül boyutu ölçümü yapılmış ve elde edilen bulgular Şekil 4.7.'de gösterilmektedir. Grafiklere bakıldığında, CD2'nin (62 nm) aksine, CD7 ve CD8'de tepe noktalarına denk gelen ikinci bir komşu tepe noktası vardır ve CD7 için ilk tepe noktası 58 nm'de ve ikincisi 75 nm'dedir. CD8 nanoplekslerinde ise 73 nm'de bir ilk tepeyi 95 nm'de ikinci bir tepe takip etmiştir.

CD2 nanoplekslerinin yaklaşık 50 ile 70 nm aralığında bir dağılım göstererek ölçülen nanoplekslerin ortalama partikül büyüklüğü 62 nm olarak kaydedilmiştir. Nanopleksler dar bir dağılım göstermiştir. CD7 nanopleksleri yaklaşık 40 ile 90 nm aralığında partikül büyüklüğü dağılımına sahiptir. CD2 nanoplekslerine göre daha büyük nanopleksler elde edilmiştir. CD7 nanopleksleri daha geniş bir aralıkta dağılım sergilemiştir. CD8 nanopleksleri ise yaklaşık 25-125 nm aralığında bir dağılıma sahiptir. CD2 ve CD7 nanoplekslerine göre daha büyük olan CD8 nanopleksler aynı zamanda daha geniş dağılıma da sahiptirler.

NTA grafikleri, zıt yüklü moleküllerin yüzey yük etkileşimi ile oluşan nanoplekslerin geniş PDI değerlerini açıklamakta ve elde edilen sonuçlar DLS sonuçları ile uyumludur.

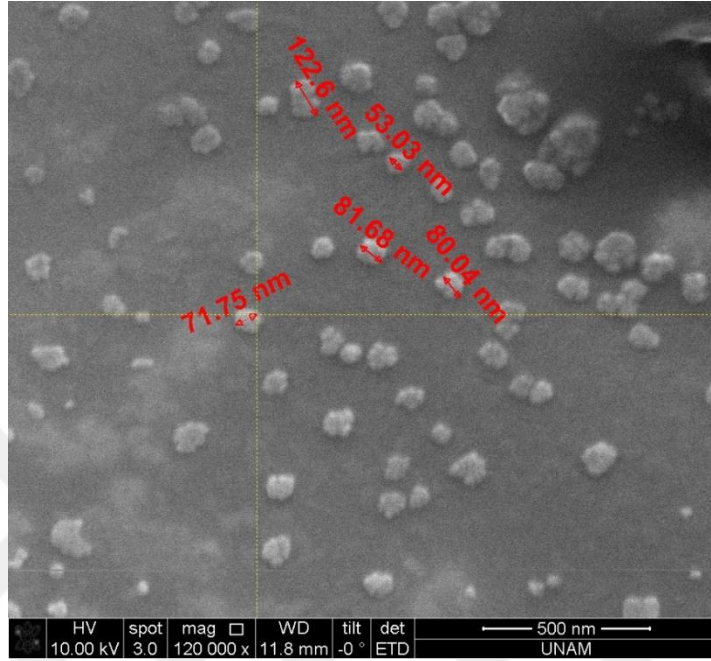


Şekil 4. 7. Nanoplekslerin NTA analizi ile partikül büyüklüğü sonuçları; CD2 nanopleksler (a), CD7 nanopleksler (b), CD8 nanopleksler (c).

4.2.2. Morfolojik Özelliklerin Belirlenmesi

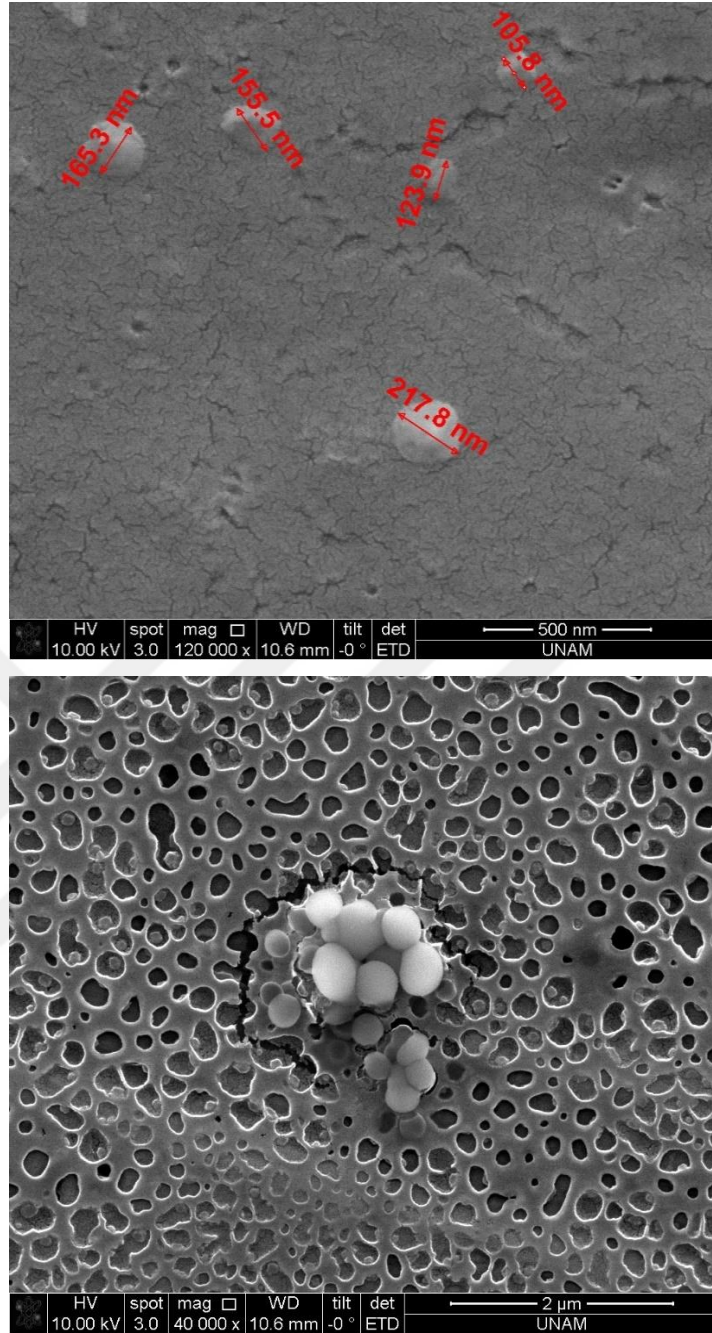
5-FU ve IL-2 yüklü nanoplekslerin SEM (Tarama Elektron Mikroskobu) ile görüntülenmesinde taze hazırlanan sıvı örnekler ve liyofilize toz örnekler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan nanoplekslerin görüntüleri Şekil 4.8.-4.10.'da

sunulmuştur. CD2 nanoplekslerine ait elde edilen görüntüler Şekil 4.8.'de yer almaktadır. Bu görüntülerde düzgün küresel formlara sahip nanopleks yapıları görülmektedir.



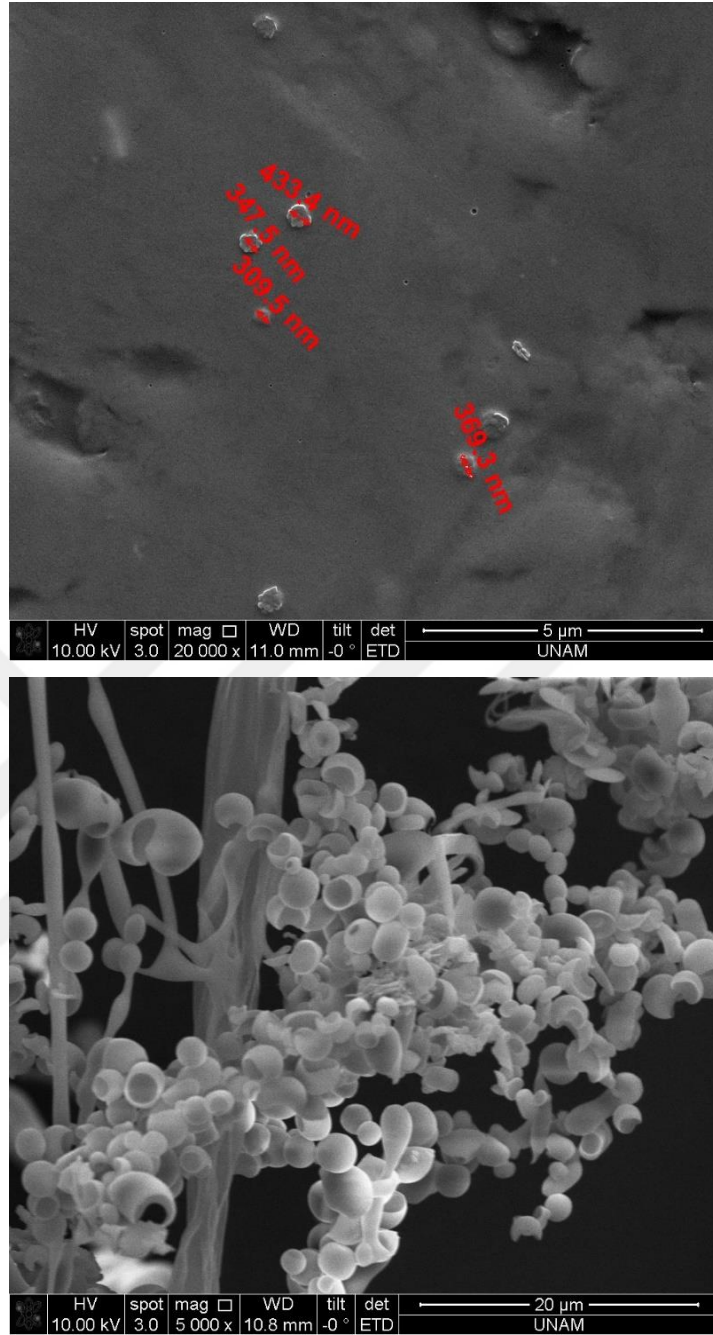
Şekil 4. 8. 5-FU ve IL-2 yüklü CD2 nanoplekslerin SEM görüntüsü (Ölçek: 500 nm).

5-FU ve IL-2 yüklü CD2 nanoplekslerin elde edilen SEM görüntülerinde yaklaşık 100 nm partikül büyüklüğüne sahip oldukları belirlenmiştir. Elde edilen bu görüntüler DLS ve NTA sonuçlarını desteklemektedir. Liyofilize toz örnek jelleşmiş yapıda olduğu için örneğin görüntüsü kaydedilememiştir.



Şekil 4. 9. 5-FU ve IL-2 yüklü CD7 nanoplekslerin SEM görüntüsü (Ölçek: 500 nm, 2 µm).

5-FU ve IL-2 yüklü CD7 nanoplekslerin elde edilen SEM görüntülerinde 100-150 nm aralığında partikül büyüklüğüne sahip oldukları belirlenmiştir (Şekil 4.9.). Bu sonuçlar DLS ve NTA analizi sonuçlarını destekler niteliktedir. Bu nanoplekslere ait ikinci görüntüde, liyofilize toz nanoplekslerin partikül büyüklüğü analizi sonucu verilmiştir. Nanoplekslerin kümeleşmiş halde bulundukları görülmüştür.



Şekil 4. 10. 5-FU ve IL-2 yüklü CD8 nanoplekslerin SEM görüntüsü (Ölçek: 5 µm, 20 µm).

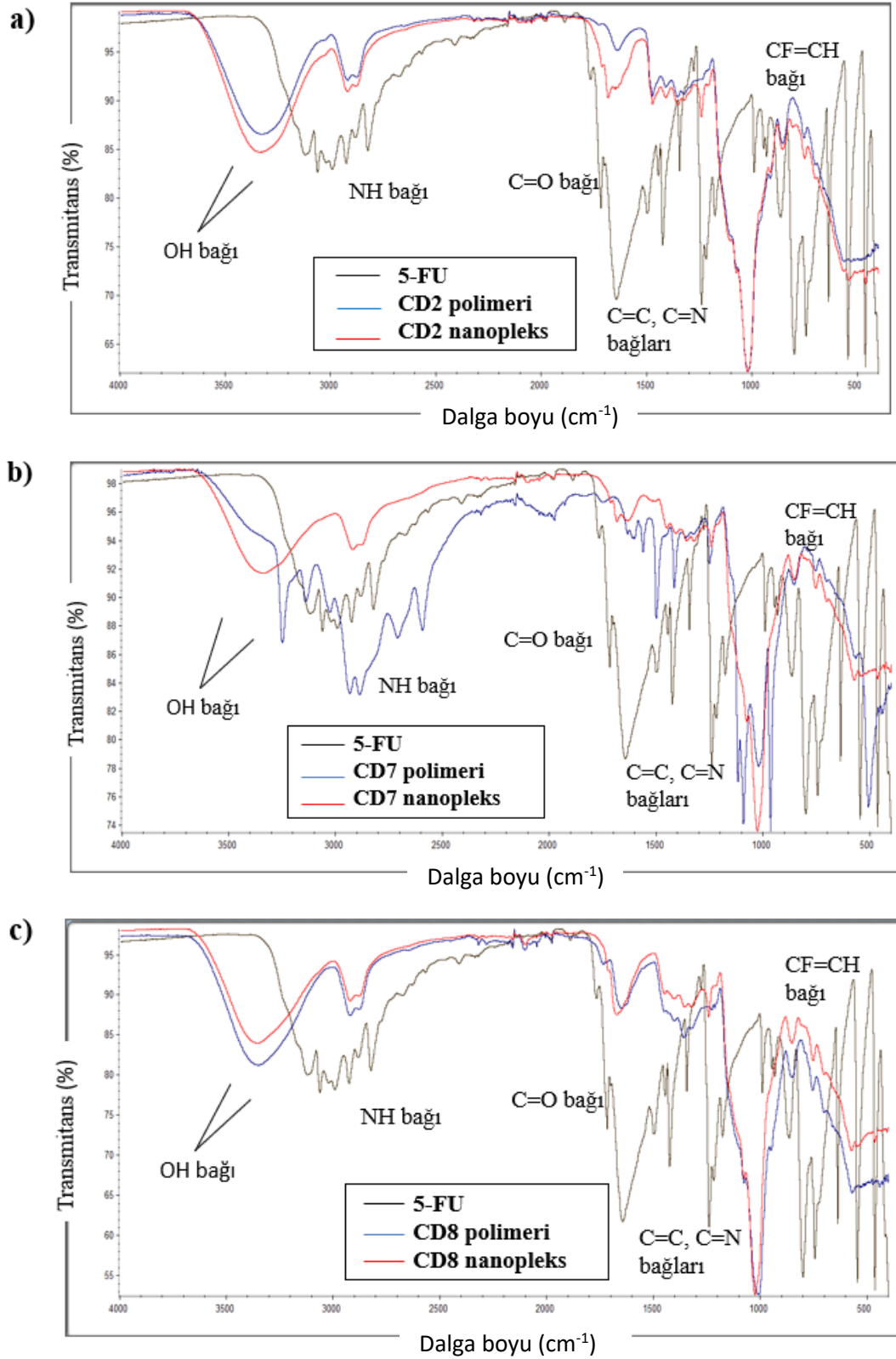
5-FU ve IL-2 yüklü CD8 nanoplekslerinin elde edilen SEM görüntülerinde yaklaşık 300 nm partikül büyüklüğüne sahip oldukları gözlenmiştir (Şekil 4.10.). Malvern Zetasizer Nano ZS cihazında ölçülen değerler ile (Tablo 4.8.'de sunulduğu üzere) geniş bir PDI değerine sahip bu nanoplekslere ait 100 ve 200 nm gibi farklı boyutlar görüntülenmiştir. NTA analizi ile elde edilen sonuçlarda da bu boyutlar elde edilmiştir. CD8 nanopleksler için, SEM analizi ve DLS ile NTA analizi sonuçları

birbirini desteklememektedir. SEM analizi için hazırlanan örnekte CD8 nanoplekslerinin analiz sürecine kadar agregе olduğu düşünölmüştür. Bu nanoplekslere ait ikinci görüntü, liyofilize toz nanoplekslere aittir. Nanoplekslerin toz kümeleri şeklinde bulundukları belirlenmiştir.

4.2.3. FTIR ve DSC Analizi

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) spektroskopisi, yapısal analize izin veren bir tekniktir ve bu çalışmada farklı CD polimerleri ile ilaç arasındaki olası kimyasal etkileşimleri gözlemlemek üzere kullanılmıştır.

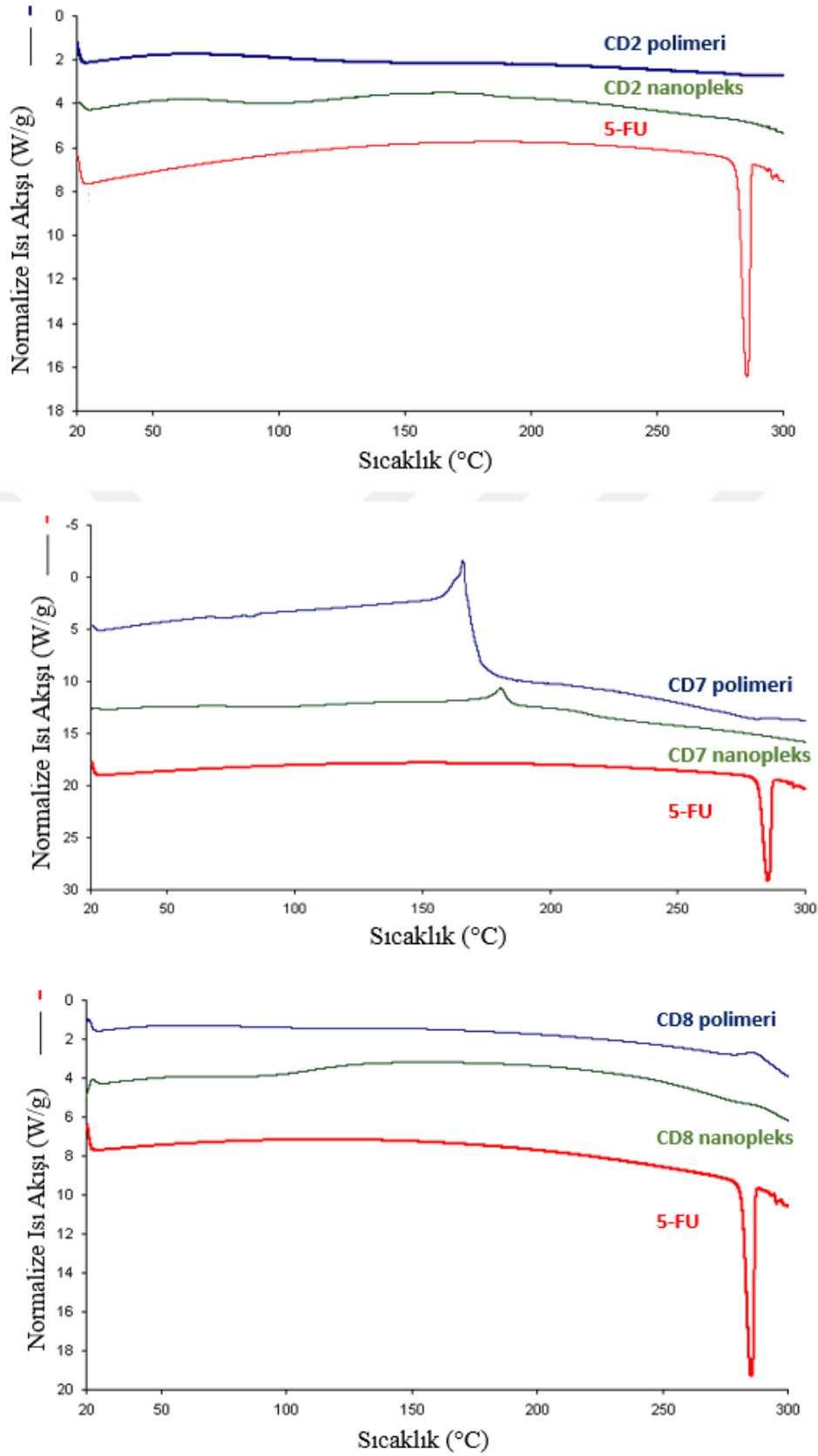
5-FU, CD polimerleri ve 5FU/IL2/CD nanopleks formölasyonlarının FTIR spektrumları Şekil 4.11.'de verilmiştir. 5- FU spektrumu, 771 cm^{-1} (CF=CH titreşimleri), 1345 cm^{-1} 'de (piridin titreşimleri), 1400-1600 cm^{-1} (C=C ve C=N titreşimleri), 1720 cm^{-1} (C=O germe) ve 2900-3100 cm^{-1} (N-H germe) karakteristik bantlar içerir. Tüm nanopleks formölasyonlarında, bu karakteristik 5-FU bantlarının tamamı gözlenmemiştir, CD2 polimeri için çok düşük yoğunlukta göröldüğü söylenebilmektedir. Tüm CD polimer ve nanopleks spektrumları, O-H gerilmesini gösteren 3200-3600 cm^{-1} 'de bir geniş banda sahiptir. Ayrıca, 1050-1085 cm^{-1} 'lik bir bant, CD polimerlerinin ve nanoplekslerin amid gruplarının C-O gerilmesini ve 1600-1700 cm^{-1} bantlarını gösterir.



Şekil 4. 11. 5-FU, CD polimerleri ve CD2 (a), CD7 (b) ve CD8 (c) için 5FU/IL2/CD nanoplekslerinin FTIR spektrumları. Spektrumlar 400 ve 4000 cm⁻¹ dalga boyları aralığında elde edilmiştir.

Diferansiyel tarama kalorimetrisi (DSC), olası etkileşimleri ve nanoplekslerdeki serbest ilacın varlığını daha fazla aydınlatmak için model ilacın, CD polimerlerinin ve ilaç yüklü CD nanoplekslerinin termal davranışını analiz etmek için kullanılmıştır.

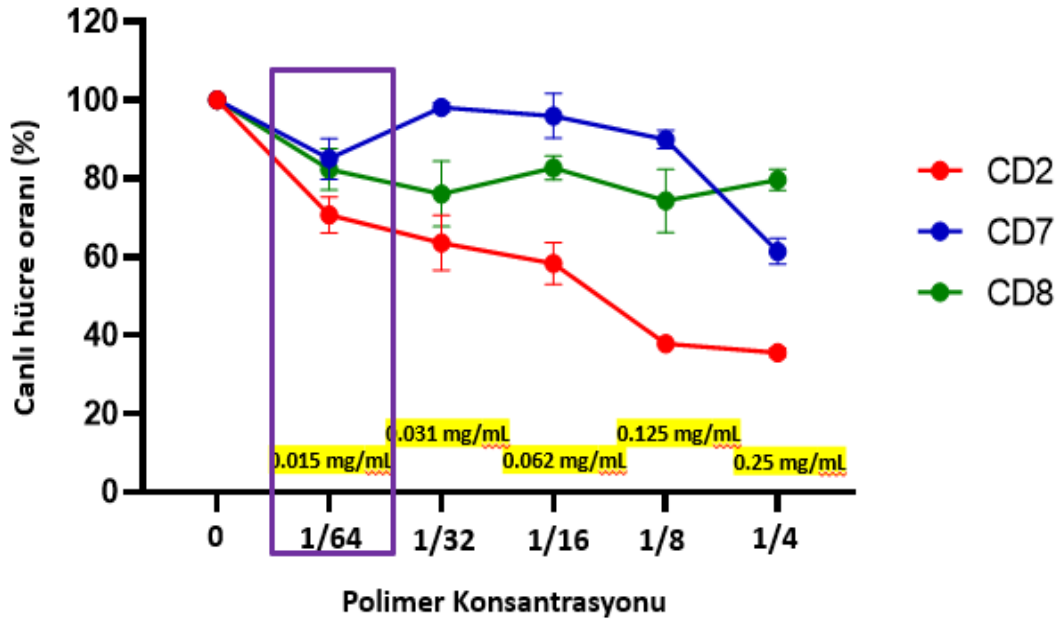
CD nanopleks formülasyonlarının termal davranışını değerlendirmek için, serbest 5-FU, CD polimerleri ve 5FU/IL2/CD nanoplekslerinin DSC analizi yapılmıştır. Moleküllerin erime veya kaynama noktalarında DSC termogramları ve endotermik pikler gözlenmektedir. Nanopartiküler sistemlerin oluşumu ile aktif maddenin tepe noktası kaybolmaktadır. Bu analizde, CD polimerlerinde veya nanoplekslerinde erime piki gözlenmemiştir. 5-FU'nun erime piki 284 °C'de literatüre uygun olarak elde edilmiştir [217, 218]. Şekil 4.12.'de verildiği gibi, tüm nanoplekslerin DSC termogramları polimere göre değişmemiş ve bu termogramlarda 5-FU'ya ait pik kaydedilmemiştir.



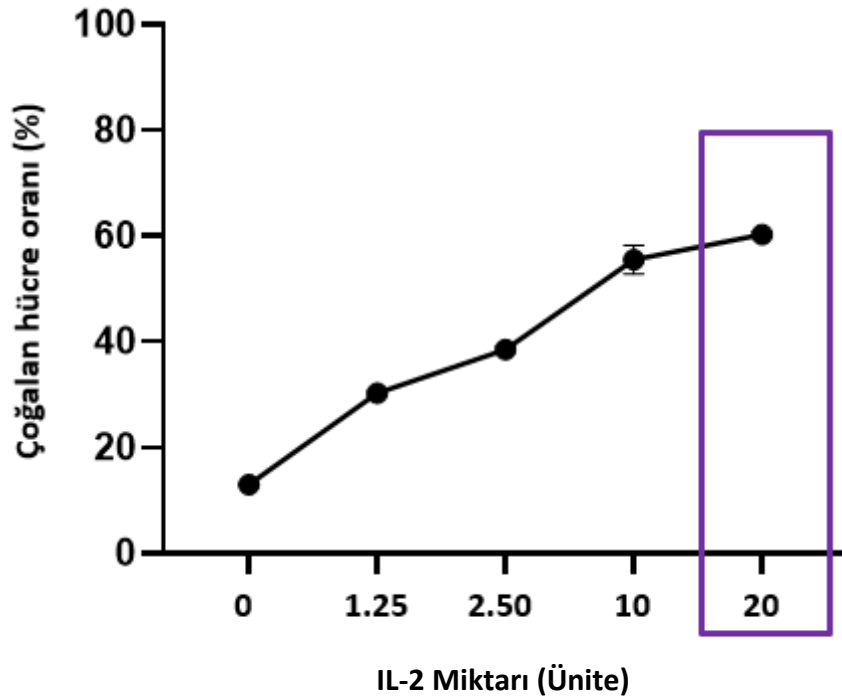
Şekil 4. 12. 5-FU, CD polimerleri ve 5FU/IL2/CD nanoplekslerinin DSC termogramları. Termogramlar 10°C/dk artırılarak elde edilmiştir.

4.2.4. CD Polimer ve IL-2 Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Kültüre edilen splenosit hücrelerinde polimer ve IL-2 çözeltilerinin konsantrasyona bağlı hücre canlılığı üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.13. ve 4.14. ile sunulmaktadır.



Şekil 4. 13. Splenositlerde farklı polimer konsantrasyonlarının hücre canlılığı üzerine etkileri (n=3, ±SS).



Şekil 4. 14. Splenositlerde farklı IL-2 konsantrasyonlarının hücre çoğalması üzerine etkileri (n=3, $\pm$ SS).

Elde edilen bu veriler doğrultusunda, her üç polimer içinde %70 ve üzeri hücre canlılığının sağlandığı 0,015 mg/mL konsantrasyonda polimerin güvenli olduğu belirlenmiştir. IL-2 miktarının ise uyarım sağlayabilmesi için 20 Ünite biriminde (=4 ng IL-2) olması gerektiği tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, formülasyonun 1 mL'sinde 0,5 mg CD polimeri ve 640 U IL-2 (=128 ng, stoğumuzdan 12,8 μ L) içermesi güvenlik ve etkinlik sağlanması için gerekli olmuştur. Bu yeni oranlarda polimer ve ilaç içeren nanopleksler hazırlanmıştır.

Nanopleks formülasyonu 1 mL'de 0,5 mg CD polimeri, 0,5 mg 5-FU ve 640 U IL-2 (=128 ng, stoğundan 12,8 μ L) içerecek şekilde hazırlanmıştır. Bölüm 3.3.2.'de belirtilen hazırlama yöntemi esas alınmıştır. Kısaca; 1 mg/mL olacak şekilde ultra saf su içinde 5-FU stok çözeltisi hazırlanmış, 1 saat 600 rpm'de karıştırılmıştır. Sonrasında 1 mg CD tartılmış ve 974 μ L ultra saf su içinde 1 saat 600 rpm'de çözünmesi sağlanmıştır. Hazırlanan 5-FU stok çözeltisinden 0,5 mL alınıp, 0,487 mL CD çözeltisine eklenmiş ve 30 dakika 600 rpm'de karıştırılmıştır. Bu ikili sistemin üzerine, öncesinde stok olarak hazırlanan IL-2 çözeltisinden, 12,8 μ L (=0,128 μ g) eklenmiş ve 30 dakika 600 rpm'de karıştırılarak nanopleksler hazırlanmıştır.

Nanoplekslere ait PB, PDI ve ZP değerleri belirlenmiştir. Elde edilen veriler Tablo 4.9.'da sunulmaktadır.

Tablo 4. 9. 5-FU ve IL-2 yüklü CD nanoplekslerin partikül büyüklüğü ile dağılımı ve zeta potansiyel değerleri (n=3, $\pm$ SS).

CD Polimer Tipi	PB (nm)	PDI	ZP (mV)
CD2	96,3 $\pm$ 9,14	0,6 $\pm$ 0,03	26,6 $\pm$ 8,4
CD7	101,6 $\pm$ 8,2	0,6 $\pm$ 0,07	18,3 $\pm$ 1,34
CD8	107,2 $\pm$ 23	0,8 $\pm$ 0,05	17,8 $\pm$ 0,49

Elde edilen bu verilerle hedeflenen partikül büyüklüğü değerinden (nanopleks tanımlamalarında belirtilen 100 nm değeri) uzaklaşmamıştır. Daha az miktarda polimer kullanılmasına rağmen katyonik yüzey yüküne sahip nanopleksler başarıyla hazırlanabilmiştir. Elde edilen bu nanoplekslerde 5-FU'nun yükleme etkinliği ortalama $\sim$ %30 olarak ölçülürken IL-2'nin yüklenme oranı ortalama %99,9 olarak belirlenmiştir.

4.2.5. 5-FU ve IL-2 Yüklü CD Nanoplekslerin Kısa Süreli Stabilité Çalışması

Tez kapsamında hazırlanan nanoplekslerin kolon kanseri tedavisinde kullanılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda antikanser etkinlik çalışmalarının, kolon kanseri indüklenmiş farelerde oral ve/veya parenteral uygulama ile belirlenmesi planlanmıştır. Oral uygulama sonrasında nanoplekslerin gastrointestinal kanal boyunca maruz kalacağı farklı pH'daki içeriklerdeki ve parenteral uygulama sonrasında kan pH'sındaki stabilitesi *in vitro* olarak simüle sıvılarda incelenmiştir.

Oral uygulama ortamlarının *in vitro*da oluşturulması amacıyla, simüle gastrik sıvı (SGF) pH 1.2, simüle intestinal sıvı (SIF) pH 6.8 ve simüle kolon sıvısı (SCoF) pH 6 ve 7.8 kullanılmıştır. Bu sıvılar Avrupa Farmakopesi (EP) 8.0 (1) ve literatür bilgileri esas alınarak hazırlanmıştır. Hazırlanan sıvıların pH'ları tekrar ölçülmüş ve pH ayarı yapılmıştır.

Parenteral uygulamanın *in vitro*da taklit edilebilmesi için pH 7.4 PBS kullanılmıştır. Oral ve parenteral uygulama ortamları, aynı zamanda nanoplekslerden etkin maddelerin salımını değerlendirmede kullanılmıştır. SGF (pH 1.2) ve SIF (pH

6.8)'de 2 saat olmak üzere ve SCoF açlık (pH 7.8), SCoF tokluk (pH 6) ve PBS (pH 7.4)'de 8 saat boyunca; DMEM'de 24 saat süresince 1:10 (h:h) oranında bu ortamlar ile seyreltilen nanopleks formülasyonları 37°C'de inkübe edilmiştir. Nanopleksler suda ise +4 °C'de 1 hafta saklanmıştır.

Başlangıçta ve inkübasyon sonucunda nanopleks formülasyonlarının partikül büyüklüğü, PDI ve ZP değerleri belirlenmiş ve bulgular istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler Tablo 4.10. ile sunulmuş ve değerler arasındaki istatistiksel analiz ANOVA testi ile gerçekleştirilmiştir (n=3, ±SS).

Tablo 4. 10. 5-FU ve IL-2 yüklü CD nanoplekslerin farklı simüle sıvılarda stabilite çalışması sonucu elde edilen partikül büyüklüğü dağılımı-nm (a) ile zeta potansiyel-mV (b) değerleri (n=3, ±SS) (*p<0,05 Başlangıç (baş.) değerine göre istatistiksel farkı belirtir) (Koyu yazılanlar istatistiksel olarak farkın anlamlı olduğunu belirtir).

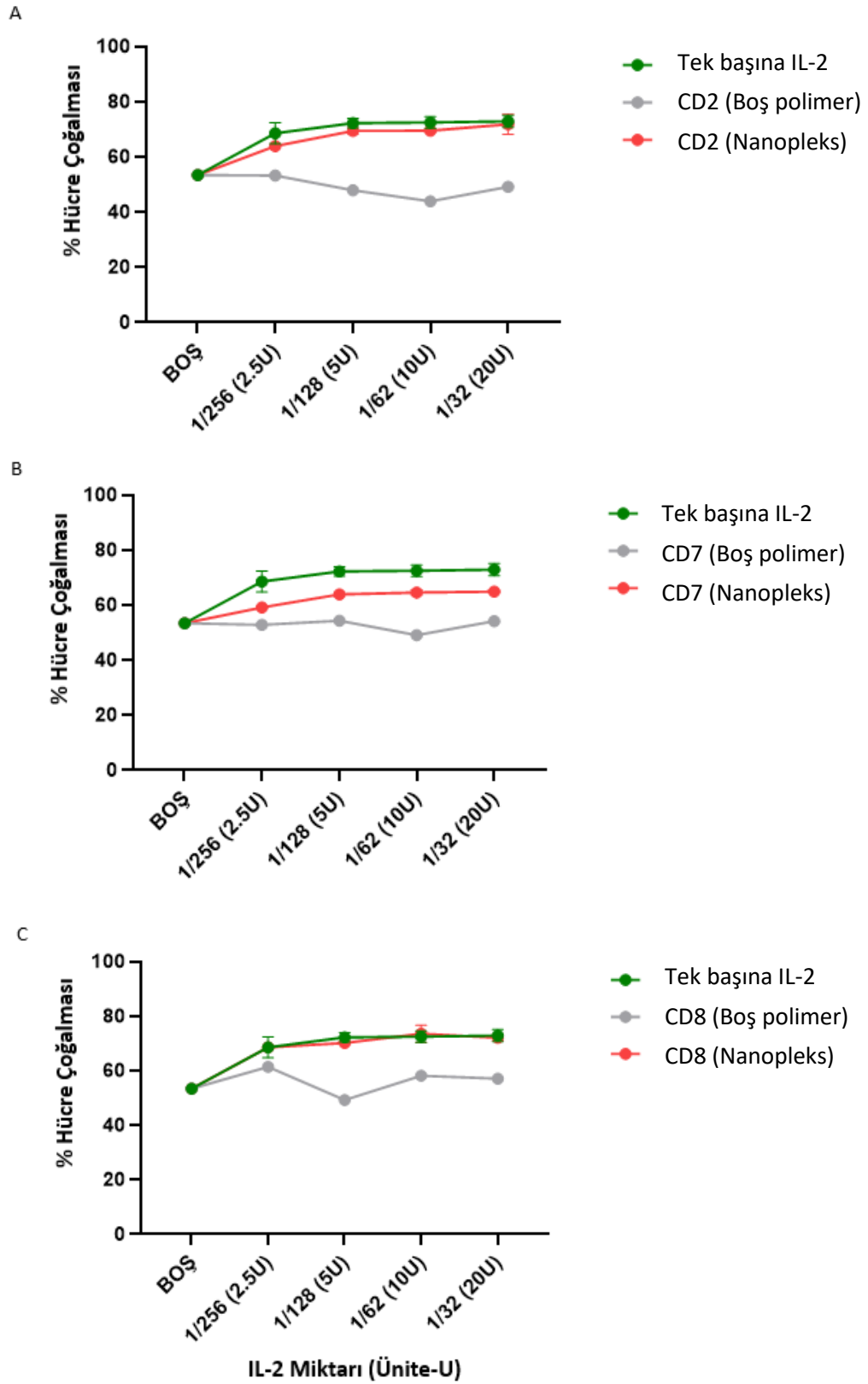
CD	ORTAM	PB (nm)		PDI		ZP (mV)	
		Baş.	İnkübasyon sonrası	Baş.	İnkübasyon sonrası	Baş.	İnkübasyon sonrası
CD2	SGF	89.1 ± 3.5	49 ± 0.4*	0.46 ± 0.03	0.48 ± 0.04	27.7±0.3	4.8 ± 0.2*
	SIF		89 ± 2.7		0.47 ± 0.006		9 ± 0.7*
	SCoF		90.1 ± 2.2		0.41 ± 0.07		8.7 ± 0.5*
	PBS		79.6 ± 0.9		0.41 ± 0.05		4.8 ± 0.6*
	DMEM		47.8 ± 2.9*		0.41 ± 0.02		29.1 ± 1.55
	Su		74.2 ± 8.5		0.49 ± 0.03		27.7 ± 0.5
CD7	SGF	38.6 ± 3.6	199.7 ± 18.5*	0.44 ± 0.14	0.26 ± 0.01	10.9±2.4	2.2 ± 0.6*
	SIF		41.49 ± 6.6		0.65 ± 0.12		3 ± 2.1*
	SCoF		53.2 ± 7		0.78 ± 0.14*		-1.14 ± 0.05*
	PBS		34.06 ± 8		0.13 ± 0.02		-1.53 ± 0.01*
	DMEM		17.2 ± 3*		0.2 ± 0.09*		-18.4 ± 1.48*
	Su		50.05 ± 9.6		0.47 ± 0.2		19 ± 2.1*
CD8	SGF	85.2 ± 17.7	130.8 ± 41.8*	0.96 ± 0.03	0.35 ± 0.06*	25.7±2.8	1.9 ± 0.4*
	SIF		41.5 ± 6.6		0.44 ± 0.07*		1.5 ± 0.6*
	SCoF		53.2 ± 7		0.63 ± 0.17*		1.02 ± 0.06*
	PBS		34.1 ± 8*		0.14 ± 0.02*		-1.39 ± 0.1*
	DMEM		36.9 ± 4*		0.46 ± 0.38*		-21 ± 0.5*
	Su		67.6 ± 6.6		0.89 ± 0.12		26.8 ± 1.2

Hazırlanan nanoplekslerin pH değerleri Tablo 4.7.'de yer aldığı üzere, nötrale yakın ölçülmüştür. SGF olarak belirtilen simüle gastrik sıvının pH'sı 1.2'dir. Nanopartiküler sistemlerin farklı sıvılar içerisinde partikül büyüklüğü ve dağılımı, yüzey yükü değerlerinin stabil kalabilmesi için, bu sıvı ortam pH'sının nanopartiküler sistemin pH'sına yakın olması gerekliliği literatürde belirtilmektedir [219]. Su ve PBS'nin pH değerleri nötre yakındır, sonuç olarak CD2 ve CD7 nanoplekslerinin bu ortamlarda stabil olduğu bulunmuştur. Öte yandan, nanopartiküllerle ilgili literatüre benzer şekilde, CD nanoplekslerinde simüle edilmiş sıvılarda zıt yüke dönüşen zeta potansiyel değerleri gözlenmiştir [220].

Nanoplekslerin suda saklama stabilitesi 1 aylık periyodu kapsayacak şekilde planlanmıştır. Ancak 1 ayın sonunda takip edilen örneklerde mor-siyah agregat oluşumları gözlenmiştir. Bu sebeple uzun süreli saklama stabilitesi çalışmaları gerçekleştirilmemiştir.

4.2.6. IL-2'nin Biyolojik Aktivitesinin Belirlenmesi

In vivo için belirlenen yeni oranlar ile IL-2 yüklü CD nanopleksler hazırlanmıştır. IL-2 çözeltisi, polimer çözeltisi ve IL-2 yüklü CD nanoplekslerin splenositleri uyartabilme aktiviteleri değerlendirilmiştir. Burada amaç nanopleks oluşurken IL-2'nin aktivitesinin kaybolmadığını ve dolaylı olarak yapısal olarak da değişmediğini göstermektir. Sonuçlar Şekil 4.15.'te sunulmuştur.

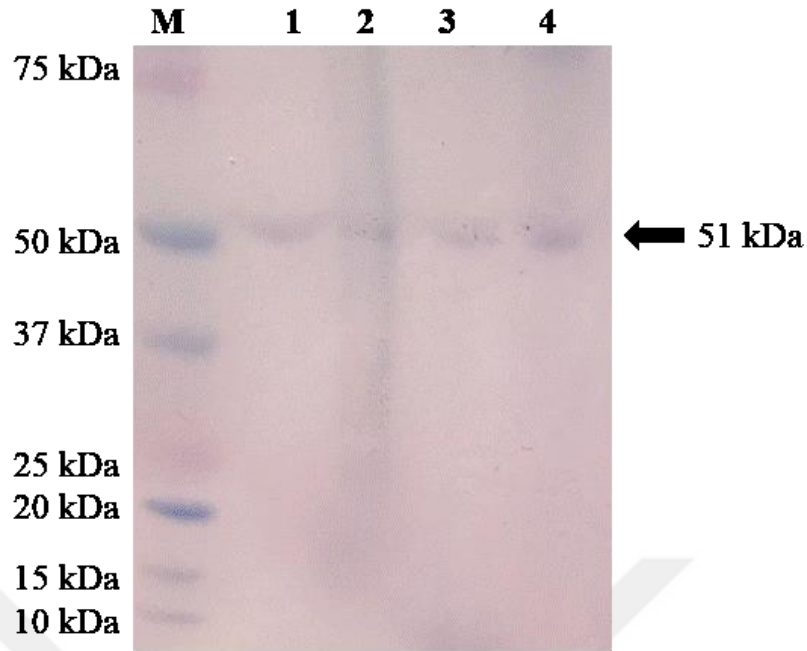


Şekil 4. 15. Splenosit hücre canlılığına CD polimerlerin ve tek başına IL-2 ile CD nanoplekslerden salınan IL-2'nin doz bağımlı etkisi; CD2 polimeri (A), CD7 polimeri (B), CD8 polimeri (C).

Bu veriler ışığında CD2 ve CD8 nanoplekslerden salınan IL-2'nin tek başına IL-2 ile benzer/aynı oranda splenositlerde proliferasyona neden olduğu, anlamlı bir değişme olmadığı görülmüştür ($p>0,05$). CD7 türevi ile hazırlanan nanoplekste ise hücre proliferasyonunda IL-2 çözeltisine göre anlamlı bir azalma olmuş; ancak splenosit hücrelerinin %50'sinden fazlasının yaşıyor olması ve IL2 yüklü CD7 nanopleks ile CD7 çözeltisi arasındaki hücre proliferasyonu farkının anlamlı ($p<0,05$) olması nedeniyle IL-2'nin tüm CD nanoplekslerde biyolojik aktivitesini koruduğu düşünülmektedir. Bu durum, dolaylı olarak ise IL-2'nin moleküler yapısının değişmediğini göstermektedir.

4.2.7. Nanopleks Yapısındaki IL-2'nin Yapısal Bütünlüğünün Belirlenmesi

CD nanopleks formülasyonlarında bulunan IL-2'nin yapısal bütünlüğünün formülasyon hazırlama aşamalarından etkilenip etkilenmediğini belirlemek için SDS-PAGE analizi yapılmıştır. 5-FU ve IL-2 yüklü CD nanoplekslerle yapılan çalışmada 5-FU kaynaklı jelde kirlilikler tespit edildiği için çalışma sadece IL-2'nin yüklendiği CD nanoplekslerle gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan nanopleksler liyofilize edilmiş ve sonrasında suda disperse edilmiştir. Vortekslenerek IL-2 yüklü CD nanoplekslerden salınan IL-2 örnekleri ve IL-2 standardının yapısı SDS-PAGE analizi ile karşılaştırılmıştır. Şekil 4.16.'da belirtildiği gibi, CD2, CD7 ve CD8 ile hazırlanan nanopleks formülasyonlarından salınan IL-2'nin, IL-2 standardı ile aynı molekül ağırlığına (51-52 kDa) sahip olduğu ve nanoplekslerin hazırlanma ve oluşum sürecinin, IL-2'nin yapısal bütünlüğünü etkilemediği belirlenmiştir.

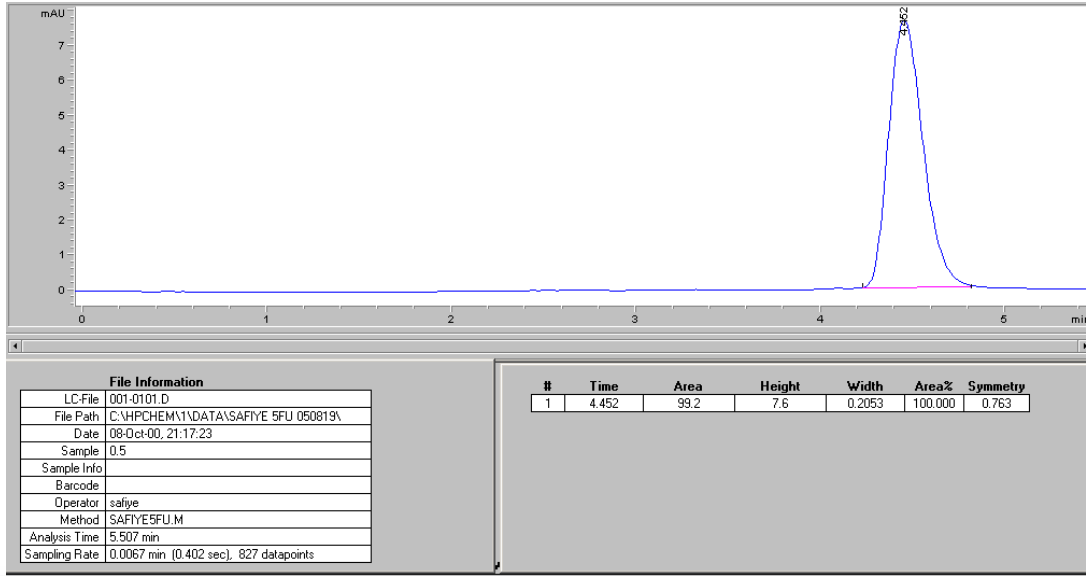


Şekil 4. 16. 5-FU ve IL-2 yüklü CD nanoplekslerindeki IL-2'nin yapısal bütünlüğünü belirlemek için doğal koşullar altında SDS-PAGE analizi sonuçları. Jele beş çözelti yüklenmiştir; Hat M, Precision Plus Çift Renkli moleküler ağırlık işaretçisi; Hat 1, IL-2 standardı; Hat 2, CD2 nanopleksi; Hat 3, CD7 nanopleksi; Hat 4, CD8 nanopleksi.

Yapısal bütünlüğü doğrulamak adına ek çalışma olarak tez kapsamında Dairesel Dikroizm (Circular dichroism-CD) çalışması gerçekleştirilmiş ancak nanopleks içerisindeki IL-2 miktarı çok düşük olduğu için analiz sonucu veri elde edilememiştir.

4.2.8. 5-FU'nun Miktar Tayini Analiz Yöntemi ve Validasyonu

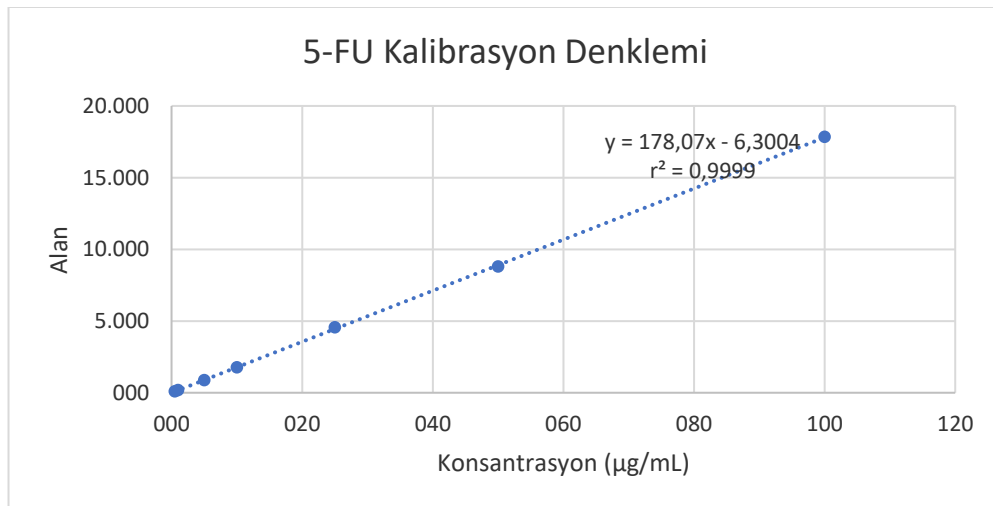
Analitik yöntem validasyonunda 5-FU için kullanılan yöntemin doğrusalılık, doğruluk, kesinlik, duyarlılık ve özgüllük parametreleri incelenmiştir. 5-FU'nun miktar tayini için kullanılan analitik yöntem ters faz HPLC yöntemi olup, sabit faz olarak C18 Oktadesil silika kolon ve mobil faz olarak Su: Asetonitril (90:10) (h/h) kullanılmıştır. Bu yöntemle 266 nm'de DAD dedektörü ile gerçekleştirilen deteksiyon sonucu, 5-FU'ya ait pik 4,45. dakikada saf olarak elde edilmiştir (Şekil 4.17.). Ancak bu pik analiz süresince ısı değişimi ile 1 dakika oynayabilmektedir.



Şekil 4. 17. 5-Florourasile ait HPLC kromotogramı.

Doğrusallık/Kalibrasyon

5-FU'nun kalibrasyon doğrusunun belirlenmesi amacıyla yedi farklı konsantrasyonda çözeltisi hazırlanmış ve HPLC'de analiz edilmiştir. Ölçülen 5-FU miktarına karşı eğri altında kalan alanın grafiği çizilerek doğrusal regresyon formülü ve korelasyon katsayısı hesaplanmıştır. Elde edilen kalibrasyon doğrusu ve denklemi Şekil 4.18. ile gösterilmiştir.



Şekil 4. 18. 5-Florourasile ait kalibrasyon doğrusu ve denklemi.

Elde edilen bulgularla, belirtilen konsantrasyon aralığında, HPLC ile analiz sonucu olan pik alanı arasında doğrusal ilişki saptanmıştır. Elde edilen kalibrasyon doğrusunun r^2 değeri 0,9999 olarak bulunmuştur.

Doğruluk

Yapılan analiz sonucu elde edilen geri kazanım ortalaması, standart sapma ve varyasyon katsayıları Tablo 4.11. ile sunulmuştur. Varyasyon katsayısı (VK) her bir konsantrasyon için %2'den küçük çıkmıştır. Bu sonuç analitik yöntemin doğruluğunu göstermiştir.

Tablo 4. 11. 5-Florourasilin doğruluk değerleri ve varyasyon katsayıları (n=6).

ÖRNEK	1 µg/mL	5 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL
1	101,9	97	96,7	99,5
2	101,9	97,8	98,8	98,9
3	102,4	100	98,08	100,3
4	101,1	99,2	96,8	98,2
5	100,8	100,3	100	98,1
6	97	98,6	97,3	96,6
Ortalama	100,85	98,81	97,79	98,6
±SS	1,97	1,27	1,21	1,26
%VK	1,95	1,29	1,24	1,28

Kesinlik

Tekrar edilebilirlik: 5-FU konsantrasyonlarından 50 µg/mL seçilerek 6 kez art arda HPLC analizi yapılmıştır.

Tekrar elde edilebilirlik: 5-FU stoğundan (200 µg/mL) hareketle seyreltme ile elde edilen 6 adet 50 µg/mL konsantrasyonunda hazırlanan çözeltinin HPLC analizi gerçekleştirilmiştir.

Yapılan analiz sonucu elde edilen veriler Tablo 4.12.'de sunulmaktadır. Bu sonuçlarda varyasyon katsayısı her iki analiz için %2'den küçük bulunmuştur. Bu bulgulara göre, HPLC yöntemi tekrar edilebilir ve tekrar elde edilebilir sonuçlar vermektedir.

Tablo 4. 12. 5-Florourasile ait tekrar edebilirlik ve tekrar elde edilebilirlik değerleri ve varyasyon katsayıları.

ÖRNEK	Tekrar Edilebilirlik ($\mu\text{g/mL}$)	Tekrar Elde Edilebilirlik ($\mu\text{g/mL}$)
1	49,78	48,34
2	49,45	48,21
3	50,17	49,68
4	49,12	49,49
5	49,06	49,81
6	48,34	48,76
Ortalama	49,37	49,0
$\pm\text{SS}$	0,62	0,7
%VK	1,27	1,47

Günler arası farklılık: Günler arası farklılık parametresinin değerlendirilmesi için aynı konsantrasyondan ($50 \mu\text{g/mL}$) 3 gün art arda ölçümler yapılmıştır. Sonuçlar Tablo 4.13. ile sunulmaktadır.

Tablo 4. 13. Mobil faz ile hazırlanan 5-Florourasile ait günler arası farklılık değerleri.

GÜNLER	1 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	25 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$
1. GÜN	0,85	9,49	24,33	47,69
2. GÜN	0,85	8,88	21,26	45,43
3. GÜN	0,89	8,65	21,75	42,8
Ortalama	0,865	9,01	22,44	45,31
$\pm\text{SS}$	0,03	0,43	1,64	2,71
% VK	3,4	4,77	7,34	5,98

Tablo 4.13. ile sunulan sonuçlarda, günler arası farklılık için varyasyon katsayısının %2'nin üzerinde olduğu görülmüştür. Bu çalışmalarda farklı günlerde ve farklı konsantrasyonlarda örnekler mobil fazda çözünerek hazırlanmıştır. Bu nedenle mobil fazda yer alan asetonitrilin, 5-FU'nun yapısında bir bozunmaya neden olabileceği düşünülerek aynı çalışma, 5-FU suda çözünen bir ilaç olduğu için ultra saf suda çözündürülerek tekrar edilmiştir ve elde edilen bulgular Tablo 4.14.'te sunulmuştur.

Tablo 4. 14. Ultra saf su ile hazırlanan 5-Florourasile ait günler arası farklılık değerleri.

GÜNLER	10 (µg/mL)	25 (µg/mL)	50 (µg/mL)
1. GÜN	7,93	20,67	44,66
2. GÜN	8,25	22,46	45,67
3. GÜN	7,72	20,47	42,72
Ortalama	796	21,2	44,35
±SS	0,26	1,09	1,49
%VK	3,35	5,15	3,38

Tablo 4.14. ile gösterilen sonuçlara göre 5-FU'nun ultra saf su ile hazırlanan stok çözeltisinde yapılan analizde de varyasyon katsayısının %2'nin üzerinde olduğu gözlenmiştir. Literatürde 5-FU yapısının kısa sürede bozunduğu belirtilmektedir [32]. Bu durum, analiz süresince 5-FU'nun miktarının günden güne önemli derecede azalması ile de yaptığımız çalışmalarda gözlenmiştir. Bu nedenle, 5-FU'nun çalışmalar sırasında örnek hazırlama süresince ve analizlerde, taze olarak hazırlanıp kullanılmasına ve gün içi farklılığın incelenmesine karar verilmiştir.

Gün içi farklılık: Bu farklılık parametresinin değerlendirilmesi için tek bir konsantrasyondan bir örnek hazırlanarak (10 µg/mL) 4 saat ara ile gün içinde 3 kez (0. saat, 4. saat ve 8. saat) aynı örnekten enjeksiyon yapılarak, HPLC ile analizi yapılmış, elde edilen veriler Tablo 4.15.'te sunulmaktadır.

Tablo 4. 15. 5-Florourasile ait gün içi farklılık değerleri ve varyasyon katsayıları.

ÖRNEK	GÜN İÇİ FARK
0.saat	9,12
4. saat	9,09
8.saat	9,09
Ortalama	9,1
±SS	0,017
%VK	0,19

Tablo 4.15. ile verilen bulgulara göre 5-FU'nun 8 saatlik süre boyunca yapılan analizlerinde varyasyon katsayısı %2'den küçük bulunmuştur. Bu sonuç ilacın gün içerisinde bozunmadan stabil kaldığını göstermektedir. Bu veriler doğrultusunda,

çalışmaların devamında hep taze hazırlanan nanopleksler kullanılmış, miktar tayini ve etkinlik analizleri nanoplekslerin hazırlaması sonrasında o gün içerisinde gerçekleştirilmiştir.

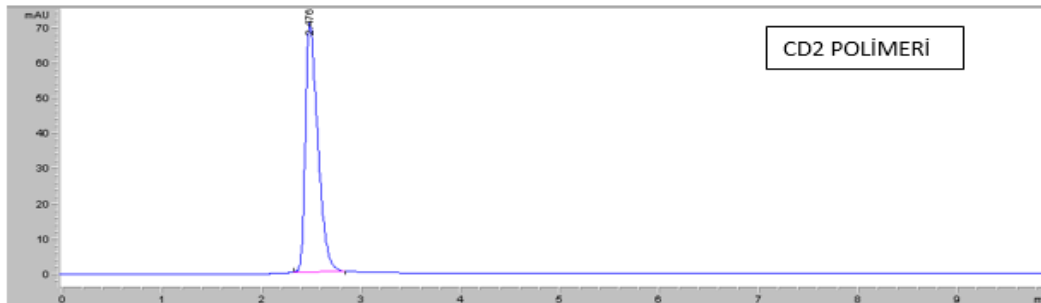
Duyarlılık

Analiz yönteminin duyarlılığının belirlenmesi için gözlenebilirlik sınırı (LOD) ve alt tayin sınırı (LOQ) değerleri saptanmıştır. Gözlenebilirlik sınırı, analitik yöntemde kullanılan cihazın saptayabildiği en düşük konsantrasyonu ifade etmektedir. Alt tayin sınırı ise doğru ve tekrar edilebilen en düşük derişimdir. S/G oranı 3 olan konsantrasyon gözlenebilirlik sınırını, S/G oranı 10 olan konsantrasyon ise alt tayin sınırını vermektedir. Yöntemin duyarlılığı için gözlenebilirlik sınırı 0,009 µg/mL ve alt tayin sınırı 0,03 µg/mL olarak tayin edilmiştir.

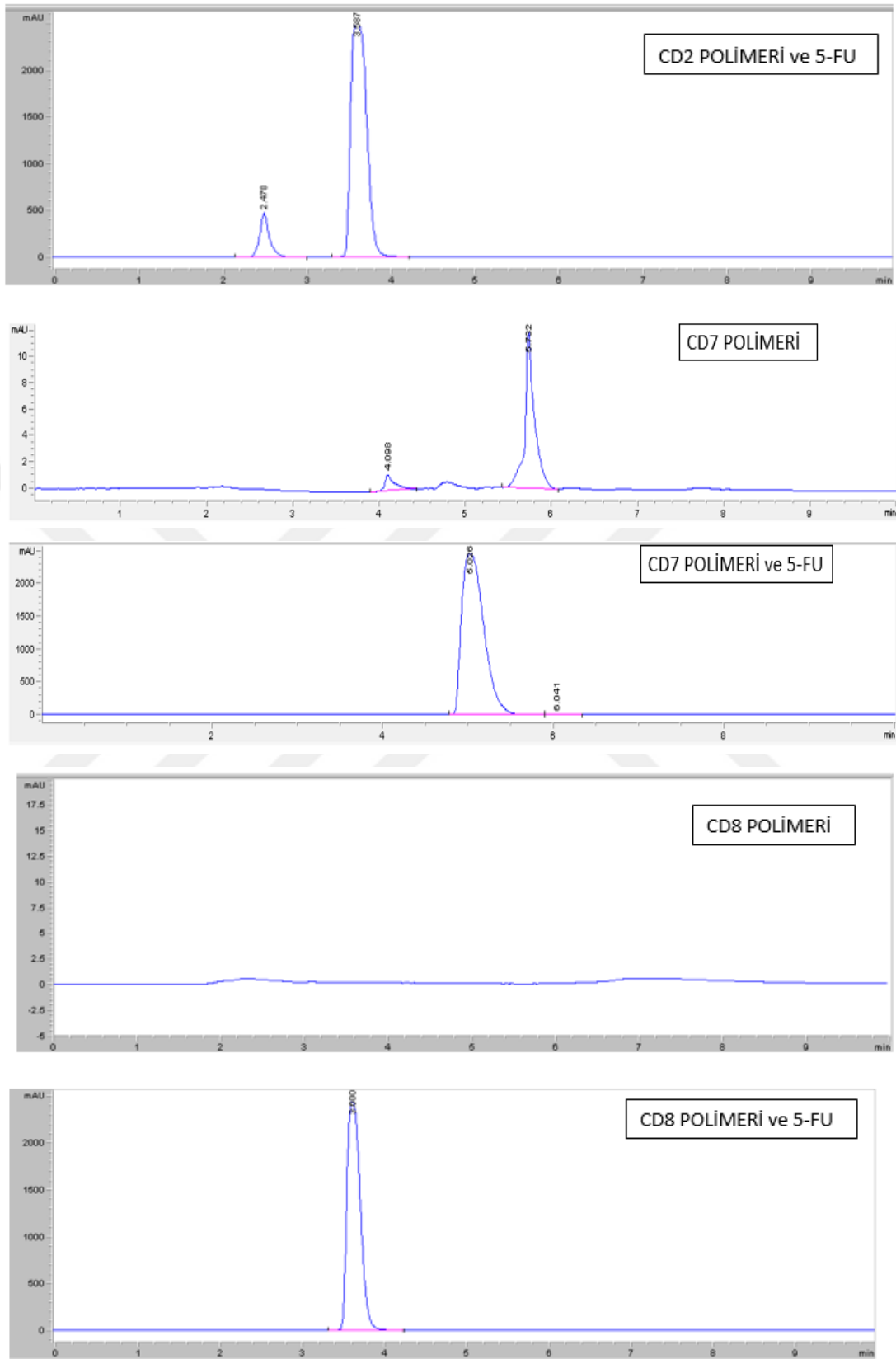
LOD ve LOQ değerleri kalibrasyon doğrusunda yer alan en küçük konsantrasyon değerinden, 0,5 µg/mL'den, düşük bulunmuştur. Bu veriler seçilen analitik yöntemin çalışmamızın amacına uygun duyarlılığa sahip olduğunu göstermiştir.

Özgüllük

Nanopleks hazırlamada kullanılacak olan CD2, CD7 ve CD8 polimerlerinin mobil fazda çözünmesi sağlanmış ve 5-FU ile kromatogramdaki yerlerinin tayini, olası girişim durumu değerlendirilmiştir. Elde edilen kromatogramlar Şekil 4.19. ile sunulmuştur.



Şekil 4. 19. CD polimerlerin tek başlarına ve 5-FU ile birlikte mobil fazdaki kromatogramları.



Şekil 4. 19. CD polimerlerin tek başlarına ve 5-FU ile birlikte mobil fazdaki kromatogramları. (Devam)

Uygulanan bu HPLC yönteminde, ilerleyen dönemde nanopleks hazırlamada kullanılmasına ve 5-FU ile konjuge edilmesine karar verilen CD polimerlerinin 5-FU piki ile girişim yapmadığı gözlenmiş ve yöntemin ilaç için özgül olduğu sonucuna varılmıştır.

4.2.9. IL-2'nin Miktar Tayini Analiz Yöntemi ve Validasyonu

IL-2 miktar tayini Fare IL-2 ELISA Kiti ile yapılmıştır. Kite bulunan el kitabında belirtilen adımlarla gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda öncelikle standartlarla analiz yapılmıştır. Standartlarla yapılan analizler sonucunda elde edilen verilerle kalibrasyon doğrusu oluşturulmuştur. Bu doğrunun denklemi Eşitlik 4.1.'de sunulmuştur.

$$y(A)=0.0172x+0.155 \quad (r^2=0,96)$$

(Eşitlik 4.1.)

4.2.10. Yükleme Etkinliğinin Belirlenmesi

5-FU ve IL-2 yüklü CD nanoplekslere yüklenen 5-FU miktarı ile sadece 5-FU'nun yüklendiği nanosistemlere yüklenen 5-FU miktarının belirlenmesinde indirekt tayin yöntemi kullanılmıştır. Ayrıca 5-FU ve IL-2 yüklü CD nanoplekslere yüklenen miktar, bu yöntemle belirlenmiştir. Bu amaçla hazırlanan nanopleks formülasyonlarından serbest ilaç (yüklenmeyen 5-FU), Millipore Ultrafree-MC 100000 NMWL filtreler ile 3500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek uzaklaştırılmıştır. Elde edilen yükleme etkinliği değerleri Tablo 4.16.'da verilmiştir.

Tablo 4. 16. Nanoplekslere ait 5-FU % yükleme etkinliği (%YE) değerleri (n=3, ±SS).

POLİMER	5-FU Yüklü CD Nanosistem %YE ±SS	5-FU ve IL-2 Yüklü CD Nanopleks %YE ±SS
CD2	29,3 ± 7,3	39,8 ± 6,1
CD7	29,8 ± 5,1	43,5 ± 2,6
CD8	33,4 ± 4,5	41 ± 5,0

5-FU ve IL-2 yüklü CD nanoplekslerde 5-FU'nun yükleme etkinliği yaklaşık olarak %40 iken, sadece 5-FU'nun yüklendiği CD nanosistemde bu değer yaklaşık

%30'dur. IL-2'nin de yüklenmesi ile hazırlanan nanoplekslerde, IL-2'nin varlığı 5-FU'nun yükleme etkinliğini azaltıcı etkide bulunmamış, aksine olumlu katkıda bulunmuştur. Bunun sebebi olarak, CD polimeri ile 5-FU arasındaki yük etkileşiminin IL-2 varlığında arttığı söylenebilmektedir.

5-FU ve IL-2 yüklü CD nanoplekslere yüklenen IL-2 miktarı ile sadece IL-2'nin yüklendiği nanoplekslere yüklenen IL-2 miktarı indirekt yöntemle ELISA kiti kullanılarak belirlenmiştir. 5-FU ve IL-2 yüklü CD nanoplekslere ait elde edilen yükleme etkinliği değerleri aynı yöntemle belirlenmiştir. Bu amaçla, hazırlanan nanopleks formülasyonları, serbest IL-2'yi uzaklaştırmak amacıyla Millipore Ultrafree-MC 100000 NMWL filtreler ile 3500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Filtrenin moleküler ağırlık cut-off değeri dikkate alınarak IL-2 için de uygun olduğu görüldüğü için bu yöntemle serbest ilacı ayırma çalışması gerçekleştirilmiştir. Filtre altından örnek alınarak ticari olarak temin edilmiş IL-2 ELISA kiti ile analiz edilmiştir.

Tablo 4. 17. Nanoplekslere ait IL-2 % yükleme etkinliği (%YE) değerleri (n=3, ±SS).

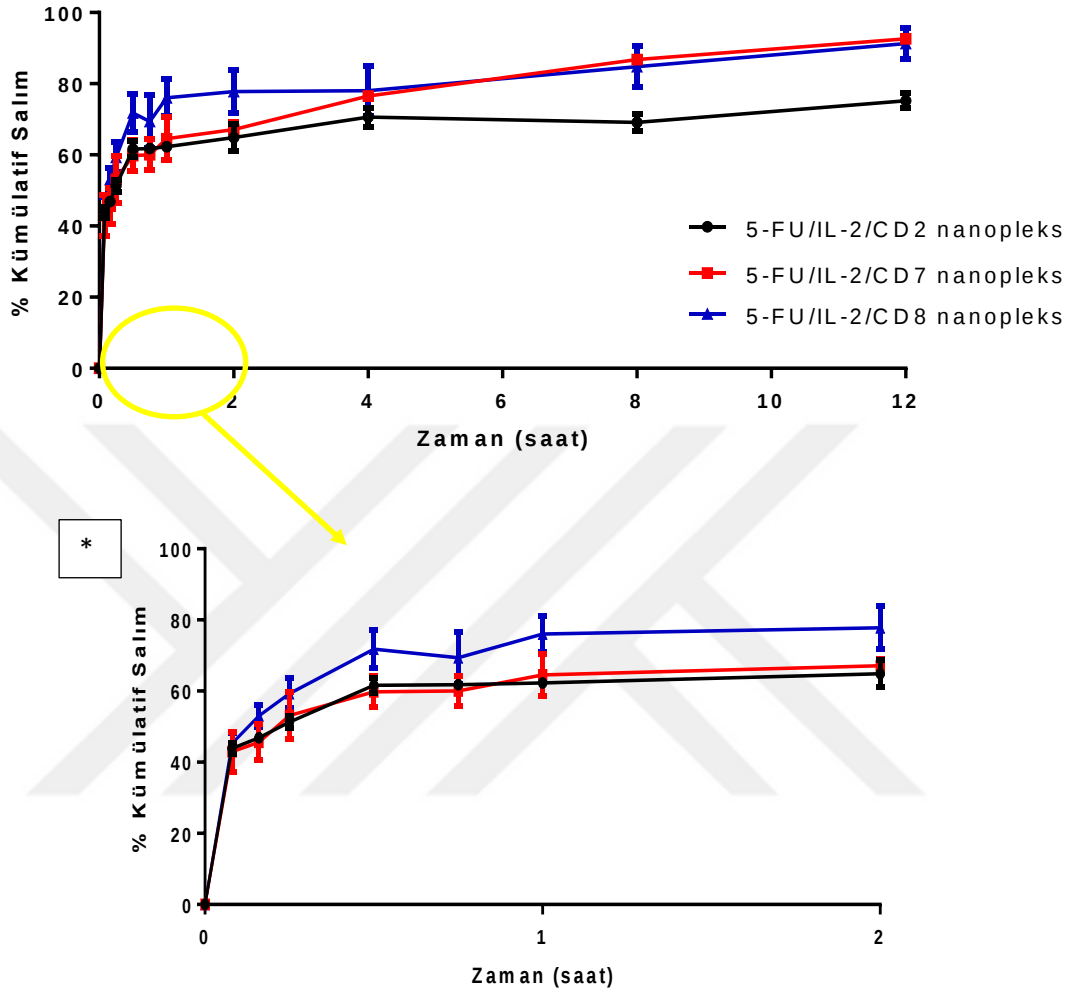
POLİMER	IL-2 Yüklü CD Nanopleks %YE ±SS	5-FU ve IL-2 Yüklü CD Nanopleks %YE ±SS
CD2	99,89 ± 0,01	99,8 ± 0,02
CD7	99,93 ± 0,03	99,9 ± 0,06
CD8	99,9 ± 0,01	99,8 ± 0,01

Tablo 4.17.'deki verilerin ışığında, IL-2'nin yüklenmesinde 5-FU'nun olumsuz bir etkisi gözlenmemiş, 5-FU ve IL-2 yüklü CD nanoplekslerle IL-2 yüklü nanoplekslere yaklaşık aynı miktarda IL-2 yüklenebilmiştir.

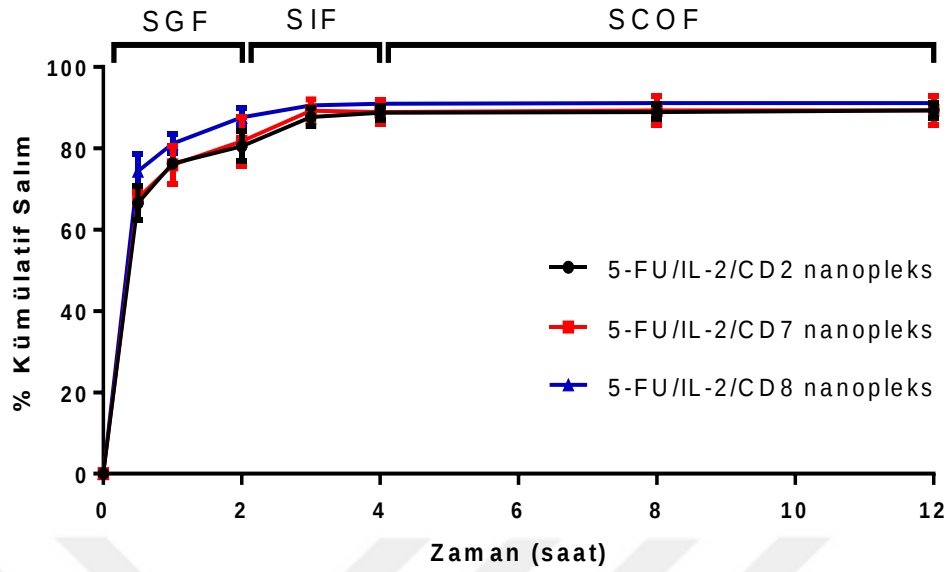
4.2.11. *In vitro* İlaç Salım Çalışmaları

5-FU ve IL-2 yüklü nanoplekslerden 5-FU'nun salım çalışmaları 37°C'de 120 rpm'de diyaliz membran tekniği ile sink koşul altında gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla hazırlanan nanopleks dispersiyonu diyaliz membrana yerleştirilmiş ve 10 mL salım ortamına konulmuştur. Çalkalayıcı su banyosunda kurulan düzende 24 saat boyunca belirli zaman aralıklarında 500 µL örnek alınmış ve salım ortamına aynı miktarda taze ortam ilave edilmiştir. Alınan örneklerdeki 5-FU miktarı valide edilen HPLC metodu

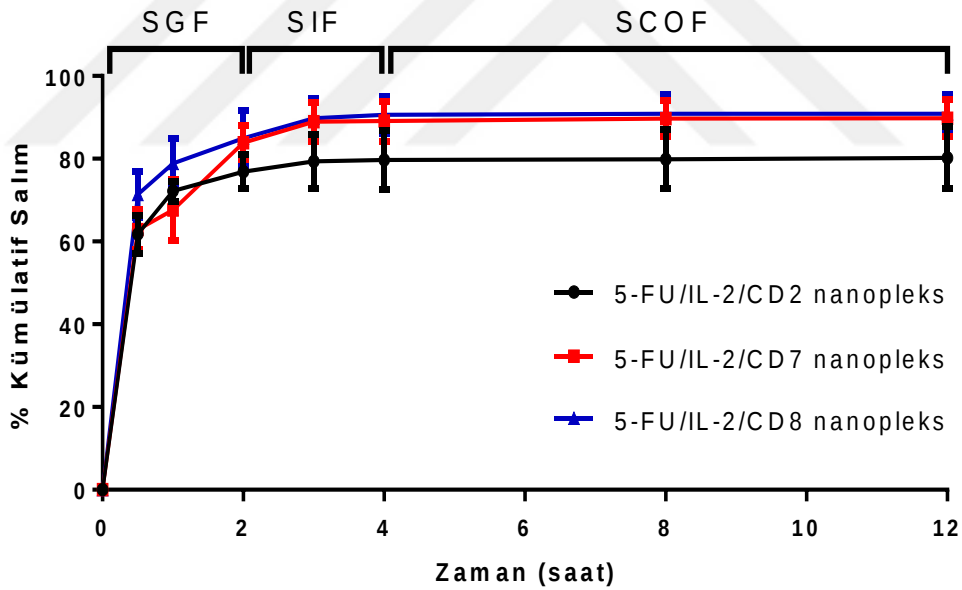
ile tayin edilmiş ve % kümülatif salınan 5-FU miktarı hesaplanmıştır. Verilerden elde edilen salım grafikleri Şekil 4.20.-4.24. ile gösterilmiştir.



Şekil 4. 20. 5-FU ve IL-2 yüklü CD nanoplekslerden PBS (pH=7.4) ortamında zamana karşı 5-FU'nun % kümülatif salım grafiği (n=3, $\pm$ SS). * ile işaretli grafikte ilk iki saate ait veri sunulmaktadır.



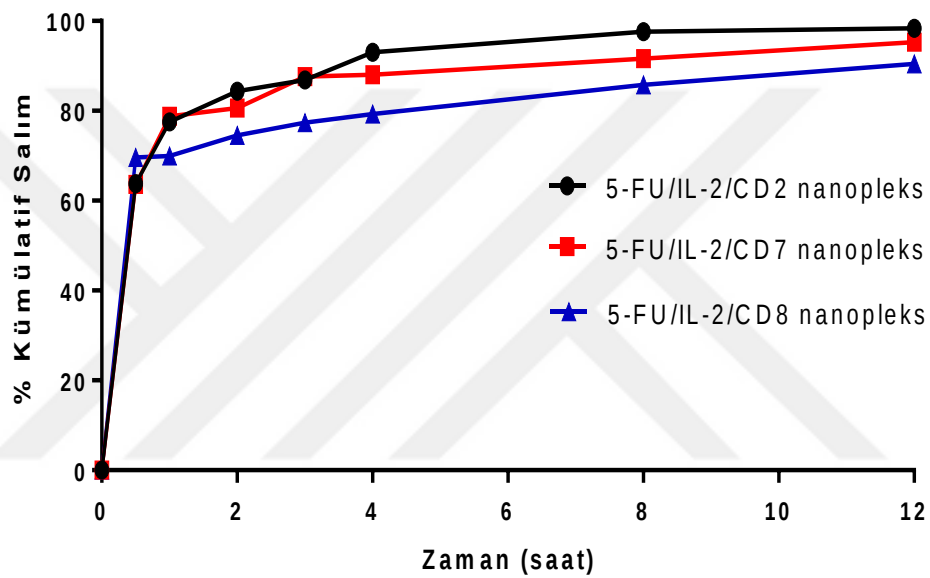
Şekil 4. 21. 5-FU ve IL-2 yüklü CD nanoplekslerden simüle sıvılarda-açlık zamana karşı 5-FU'nun % kümülatif salım grafiği (n=3, ± SS).



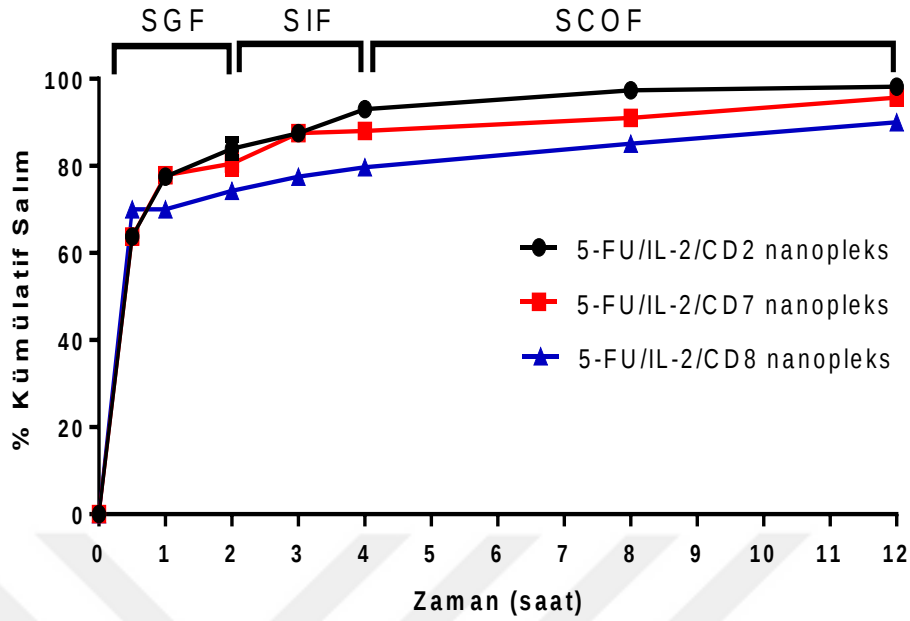
Şekil 4. 22. 5-FU ve IL-2 yüklü CD nanoplekslerden simüle sıvılarda-tokluk zamana karşı 5-FU'nun % kümülatif salım grafiği (n=3, ± SS).

Sonuç olarak, 5-FU salımının tüm nanopleks sistemlerinden ortalama olarak %90 oranında gerçekleştiği 12 saat sonunda belirlenmiştir. Özellikle ilk 4 saatte salımın hızlı ve artan miktarlarda olduğu 8 ile 12. saatten itibaren ise bu artışın azaldığı gözlenmiştir.

5-FU ve IL-2 yüklü nanoplekslerden IL-2'nin salım çalışmaları 37°C'de 120 rpm'de %0,2 Tween 80 içeren PBS (pH=7.4)'te ve simüle sıvılarda yapılmıştır. Nanopleksler 1 mL salım ortamında disperse edilmiş ve çalkalayıcı su banyosunda kurulan düzende 24 saat boyunca belirli zaman aralıklarında örnekler toplanmıştır. Salım tüpleri 10 dakika oda sıcaklığında 10.000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Süpernatandan 100 µL alınıp, salım ortamına taze ortam eklenerek her zaman aralığı için bu işlem tekrarlanmıştır. Alınan örneklerdeki IL-2 miktarı, IL-2 ELISA kiti ile tayin edilmiş ve % kümülatif salınan IL-2 miktarı hesaplanmıştır.



Şekil 4. 23. 5-FU ve IL-2 yüklü CD nanoplekslerden PBS (pH=7.4) ortamında zamana karşı IL-2'nin % kümülatif salım grafiği (n=3, ± SS).



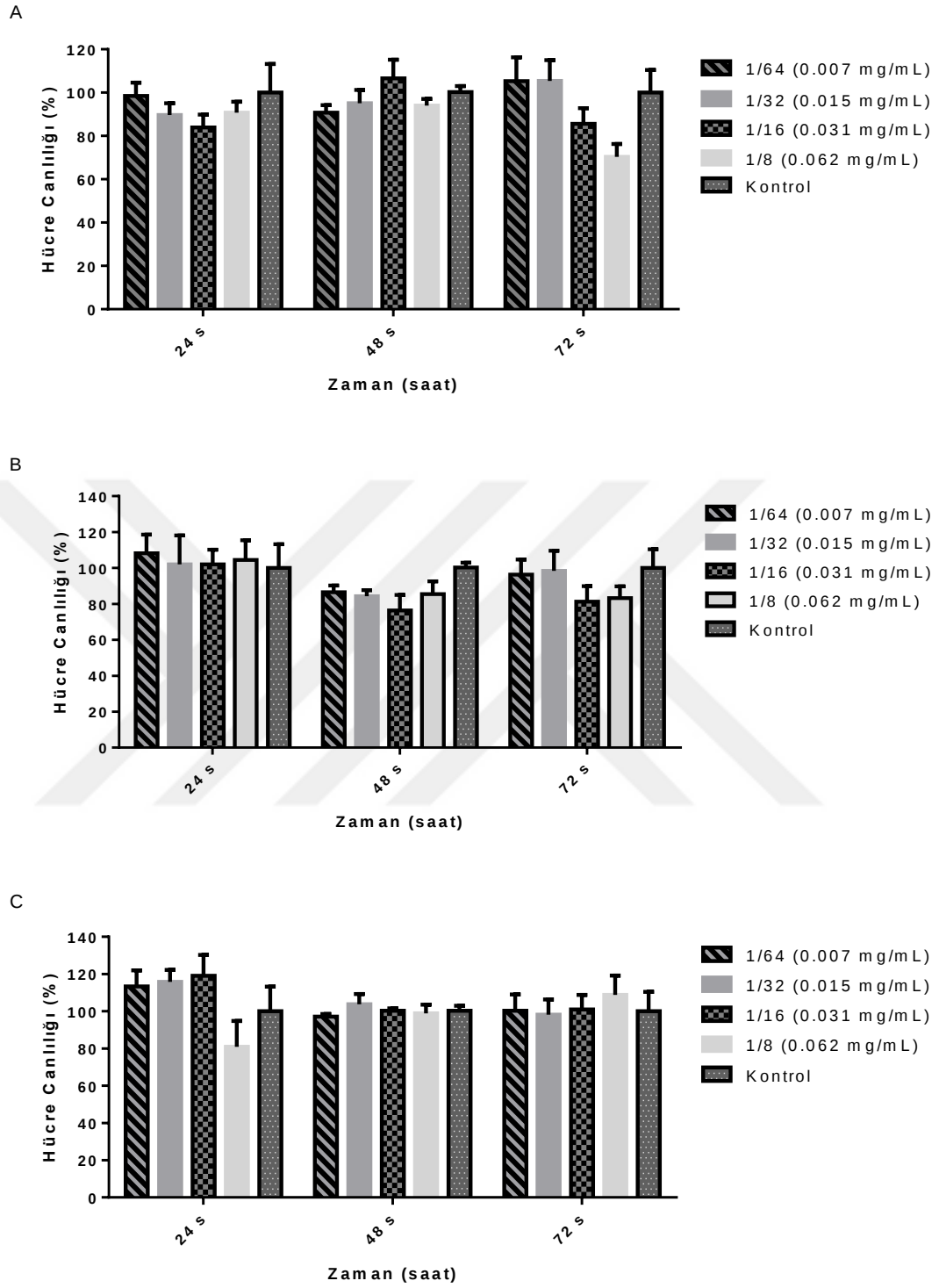
Şekil 4. 24. 5-FU ve IL-2 yüklü CD nanoplekslerden simüle sıvıda zamana karşı IL-2'nin % kümülatif salım grafiği (n=3, $\pm$ SS).

İlk bir saat içerisinde nanopleks sistemindeki IL-2'nin %63'ten fazlasının salındığı görülmektedir. Her iki salım ortamında 24 saat sonunda IL-2 salımının tüm nanopleks sistemlerinden %90 oranında tamamlandığı belirlenmiştir.

3.3. Hücre Kültürü Çalışmaları

4.3.1. Güvenlilik Çalışması

Hücre kültürü çalışmaları kapsamında ilk olarak boş CD polimerlerin farklı konsantrasyonlarının güvenlilikleri L929 fibroblast hücrelerinde WST-1 yöntemiyle belirlenmiştir. Elde edilen bulgular Şekil 4.25. ile gösterilmiştir.



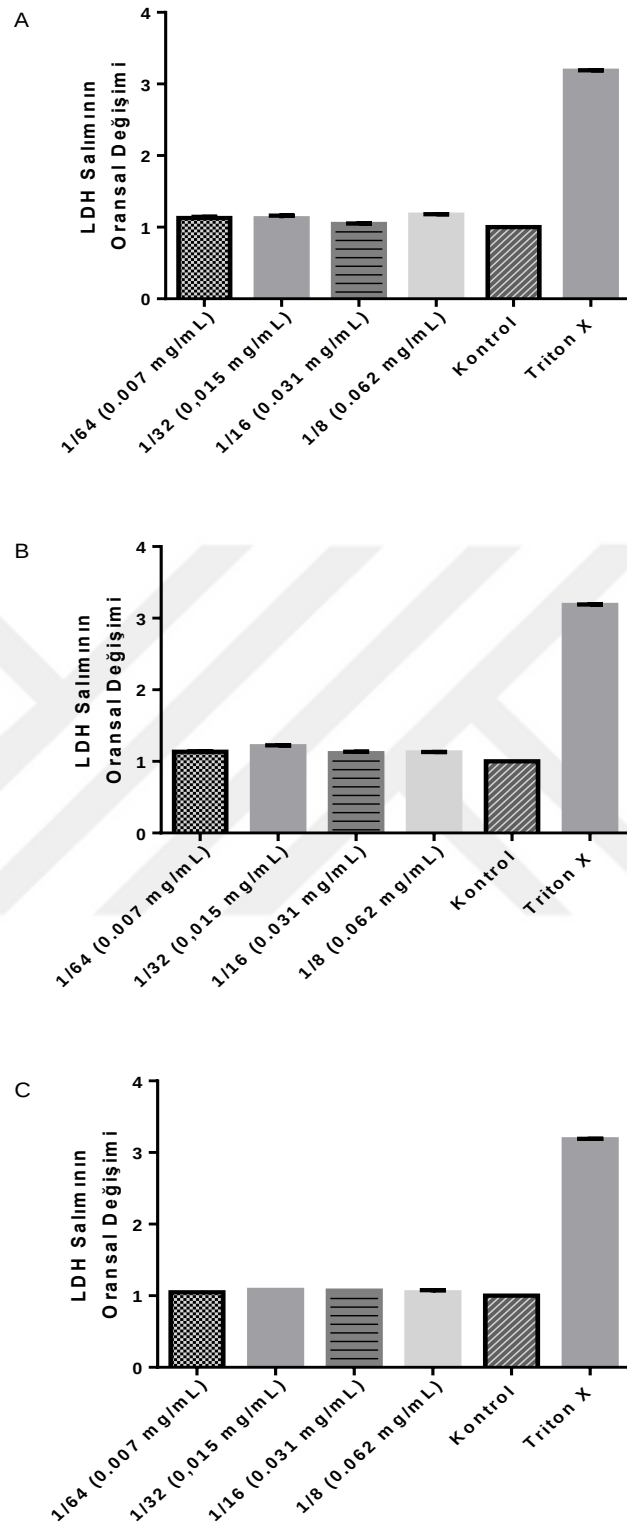
Şekil 4. 25. CD polimerlerinin L929 hücrelerinde konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığına etkisi; CD2 (A), CD7 (B), CD8 (C). (n=3, ±SS)

Şekil 4.25. ile gösterilen sonuçlara göre her üç CD polimer türevinin de L929 hücrelerinde güvenli olduğu söylenebilir. Dört farklı konsantrasyonun test edildiği çalışmada, en yüksek polimer dozlarında bile (1/8 h:h), hücre canlılığının %70'in

üzerinde olduğu belirlenmiştir. ISO 10993-5'e (2009) göre, *in vitro* sitotoksiste testinde güvenli olarak kabul edilebilir minimum hücre yaşayabilirliği sınırı %70'tir [221].

Polimerlere ait güvenlik sonuçlarında istatistiksel değerlendirme yapıldığında, polimerlerin kendi içinde farklı konsantrasyonları arasında fark olmadığı görülmüştür ($p>0,05$, ANOVA testi). CD2 polimerinin, 0,25- 0,125- 0,062 mg/mL konsantrasyonlarda CD7, CD8 ve kontrol gruplarından farklı olduğu belirlenmiş, ancak 0,031 mg/mL'de ise fark gözlenmemiştir.

Gerçekleştirilen LDH deneyine ait sonuçlar ise Şekil 4.26.'da sunulmaktadır. Laktat dehidrojenaz (LDH) enziminin belirlenmesi, hücre sitoplazmik membran hasarının değerlendirilmesinde sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir. Hücre zarı bileşenleri ile etkileşime girdiği bilinen siklodekstrin gibi moleküllerin toksisitelerinin değerlendirilmesi için de LDH enziminin belirlenmesi yöntemi uygulanmaktadır. Hücre zarının hasar görmesi durumunda sitoplazmadan hücre kültürü ortamına LDH salınır. Çalışmamızda, üç farklı boş CD polimerinin dört farklı konsantrasyonda uygulandığında L929 hücrelerinden salınan LDH miktarı ticari bir kit ile belirlenmiştir. Şekil 4.26'ya göre, boş CD polimerleri ile muamele edilen hücrelerden salınan LDH miktarının, sadece DMEM ile muamele edilen hücrelerden salınan LDH miktarı kadar olduğu gözlenmiştir. Pozitif kontrol olarak Triton-X 100 kullanılmış ve bu grupta hücrelerden salınan LDH miktarı kontrol grubuna göre 3 kat artmıştır.



Şekil 4. 26. Farklı konsantrasyonlarda CD polimerlerinin L929 hücrelerindeki LDH aktivitesi; CD2 (A), CD7 (B) ve CD8 (C). Kültür ortamı ile muamele edilen hücreler Kontrol grubunu oluşturmaktadır. %1 (h/h) Triton-X uygulanan grup ise pozitif kontrol grubudur (n=3, ±SS).

4.3.2. Antikanser Etkinlik Çalışması

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılması gereken etkin dozun belirlenmesi için 5-FU'nun hücre proliferasyonunda %50 azalmaya neden olan konsantrasyon olarak tanımlanan IC_{50} değeri belirlenmiştir. Bu amaçla CT26 ve HT29 kolon kanseri hücre hatları hücre kültürü ortamında inkübe edilmiştir. Hücreler yeterli sayıya ulaştıktan sonra 2 mL tripsin/EDTA (5x) solüsyonu ile kaldırılmış ve sayım işlemi yapılmıştır. Uygun sayıda hücre içeren solüsyon hazırlanarak hücreler 96 kuyucuklu hücre plakalarına hücre sayısı 5000 (100 μ L DMEM) olacak şekilde kuyucuklara ekilmiştir. Gece boyunca hücrelerin yüzeye tutunması sağlanmış ve ardından 5-FU'nun ultra saf su içindeki stok solüsyonundan yedi farklı konsantrasyonda (2,5-5-10-25-50-100 ve 200 μ M dozda) 5-FU çözeltisi içeren besi yeri hazırlanmıştır. Hücreler üzerindeki besi yeri uzaklaştırılmış ve hücreler farklı konsantrasyonlardaki 5-FU çözeltisi ile 24 ve 48 saat boyunca inkübe edilmişlerdir ve ardından 5-FU'nun IC_{50} değeri belirlenmiştir (Tablo 4.18.).

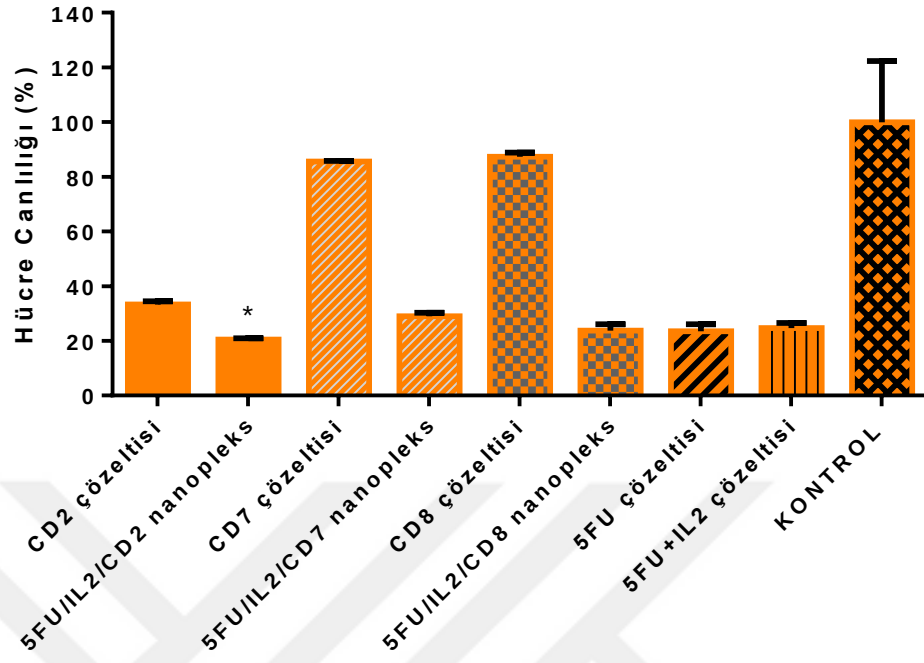
Tablo 4. 18. 5-Flurourasilin fare ve insan kolon karsinoma hücrelerindeki IC_{50} değerleri (n=3, $\pm$ SS).

HÜCRE	Zaman (saat)	IC_{50} (μ M)
CT26	24	91,6
	48	0,027
HT29	24	23,98
	48	12,68

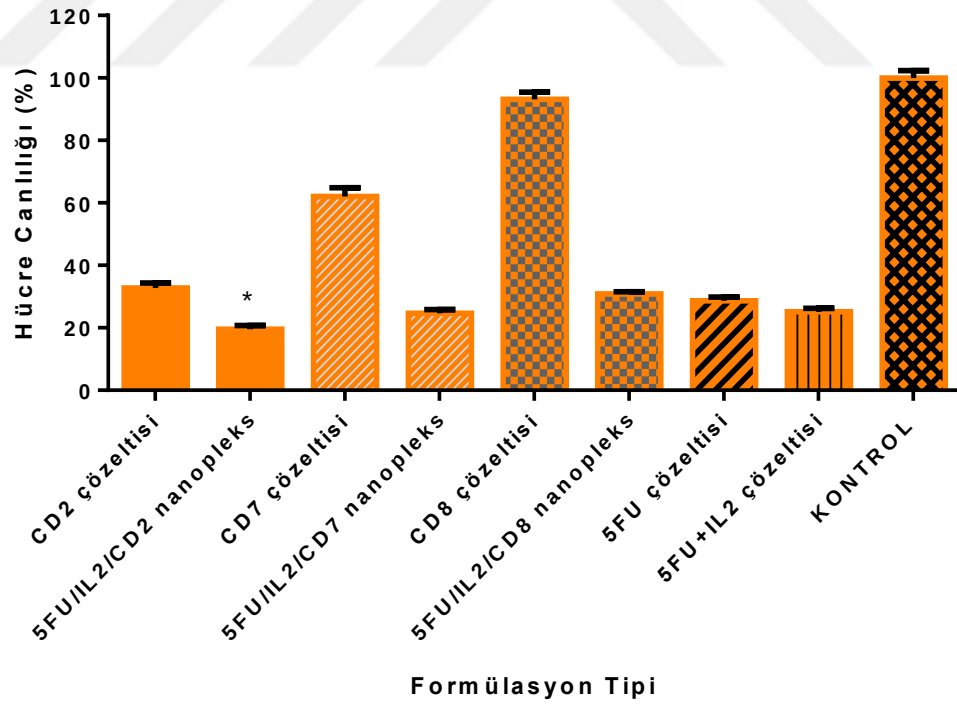
Tablo 4.18. ile elde edilen IC_{50} değerleri sunulmaktadır. Artan inkübasyon süresinde her iki hücre tipinde 5-FU'nun hücre büyümesi inhibisyonunda etkinliğinin arttığı görülmüştür. Sonrasında hazırlanacak 5-FU ve IL-2 yüklü CD nanoplekslerin etkinliği ile bu değerler baz alınarak değerlendirilecektir.

5-FU ve IL-2 yüklü nanoplekslerin CT26 hücrelerinde etkinlik çalışması (2B) kapsamında hücreler 100 μ L DMEM içerisinde 5000 hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyucuklu hücre plakalarına ekilmiştir. 24 saatlik inkübasyon sonrasında kuyucuklara 5-FU çözeltisi 91,6 μ M konsantrasyonda uygulanmıştır. Hücreler 24 ve 48 saat inkübe edilerek hücre canlılığı çalışması WST-1 testi ile belirlenmiştir (n=3).

a)



b)

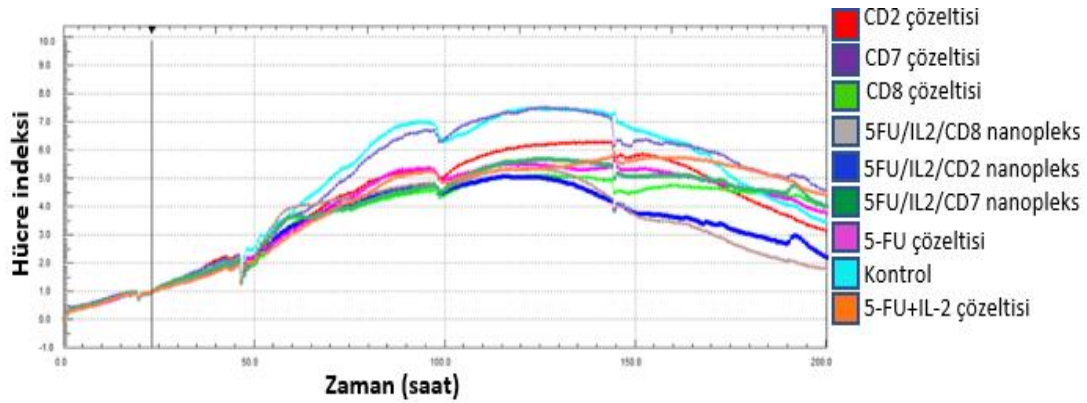


Şekil 4. 27. Hazırlanan nanopleksler ile polimer ve ilaç çözeltilerinin 24 (a) ve 48 (b) saat sonunda CT26 hücrelerinde antikanser etkinliği (n=3, ±SS). *p<0,05: 5-FU+IL-2 ile inkübe edilen gruba göre.

Polimer çözeltileri ve CD nanoplekslerinin, 5-FU'nun IC_{50} değerinin aynı konsantrasyonuna göre seyreltildiği çalışmanın sonuçları Şekil 4.27.'de verilmiştir. 5-FU ve IL-2 yüklü CD2 nanopleks 24 ve 48 saat sonunda 5-FU+IL-2 çözeltisinden daha yüksek sitotoksik etkiye sahiptir ($p<0,05$). Ek olarak aynı nanopleks 48 saatte 5-FU'dan daha yüksek sitotoksik etkiye sahiptir ($p<0,05$). Öte yandan, CD2 polimer çözeltisi tek başına CT26 hücreleri üzerinde toksik etkiye sahiptir. 5-FU ve IL-2'nin nanopleks içinde CD7 polimeri ile verilmesi, CT26 hücrelerinin canlılığını 5-FU çözeltisinden daha fazla azaltmıştır. Ancak bu durum CD8 nanopleksleri için geçerli olmamıştır. Polimerin ek sitotoksik etkisi ile CD2 nanoplekslerinde 5-FU çözeltisinin antikanser etkisinin aşıldığı gözlenmiştir.

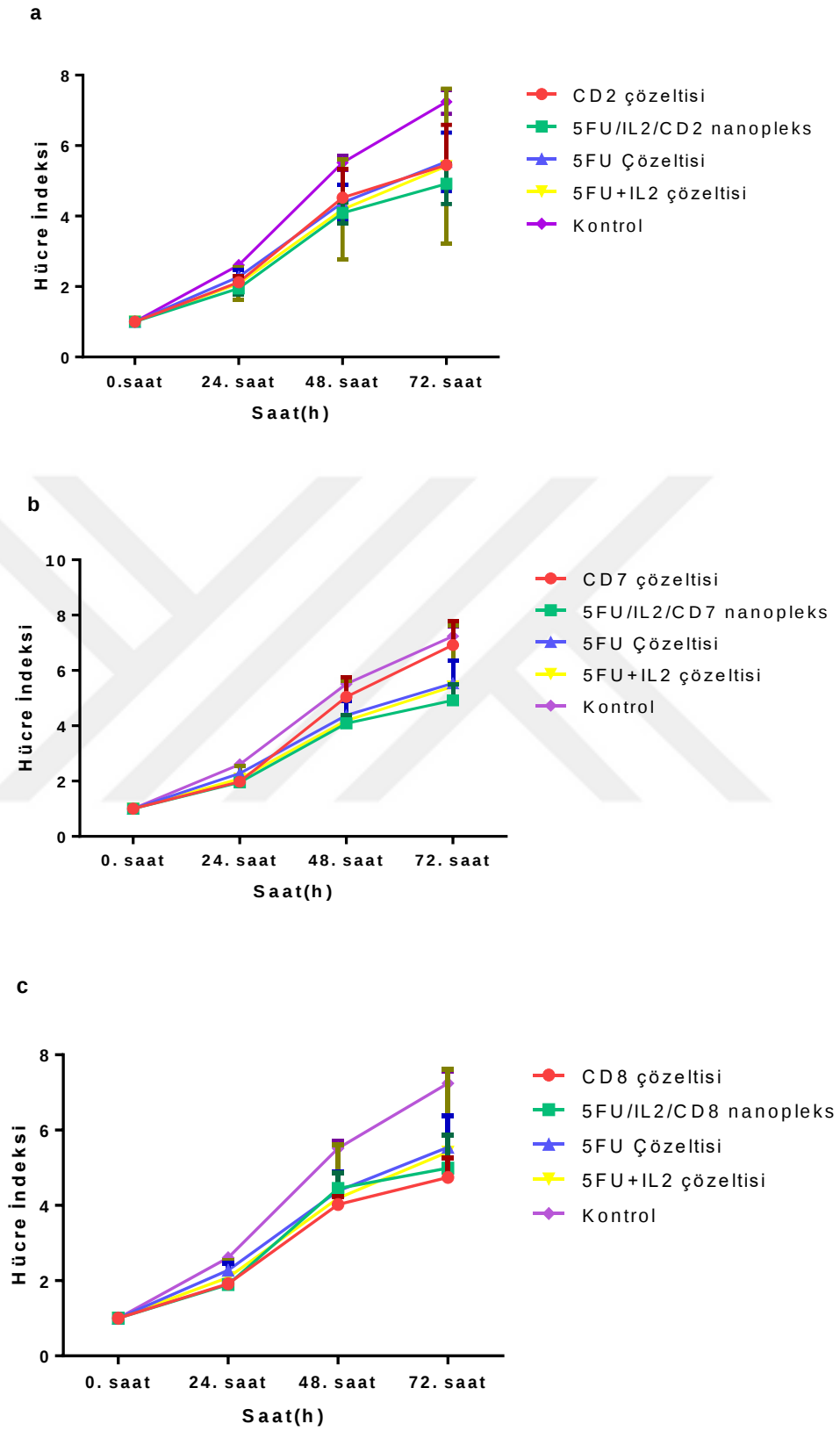
3.3.3. Hücre Proliferasyonu ve Gerçek Zamanlı Hücre Canlılığı Analizi

Kontrol grubu ile formülasyon grupları arasında proliferasyon açısından normalizasyon zamanı (21. saat) ile 200. saat aralığında proliferasyon profiline göre belirli saatlerde hücre indeksi alınarak istatistiksel analiz yapılmıştır. Şekil 4.28.'de deneyin başlangıcından sonuna kadar oluşan hücre indeksi grafiği sunulmaktadır. Buna göre kontrol grubuna ait hücre indeksinin formülasyon uygulanan gruplara göre yüksek olduğu saptanmıştır.



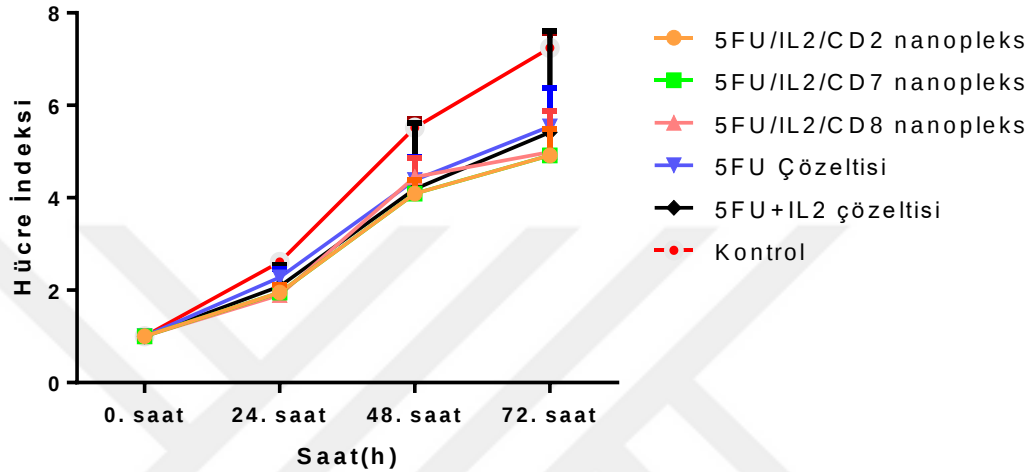
Şekil 4. 28. CT26 hücrelerine ait deney sonundaki analizin normalize hücre indeksi grafiği.

Analizde 24., 48. ve 72. saat sonuçları her polimer ve nanopleks grubunu içerecek şekilde kontrol grupları ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.29.'da sunulmuştur.



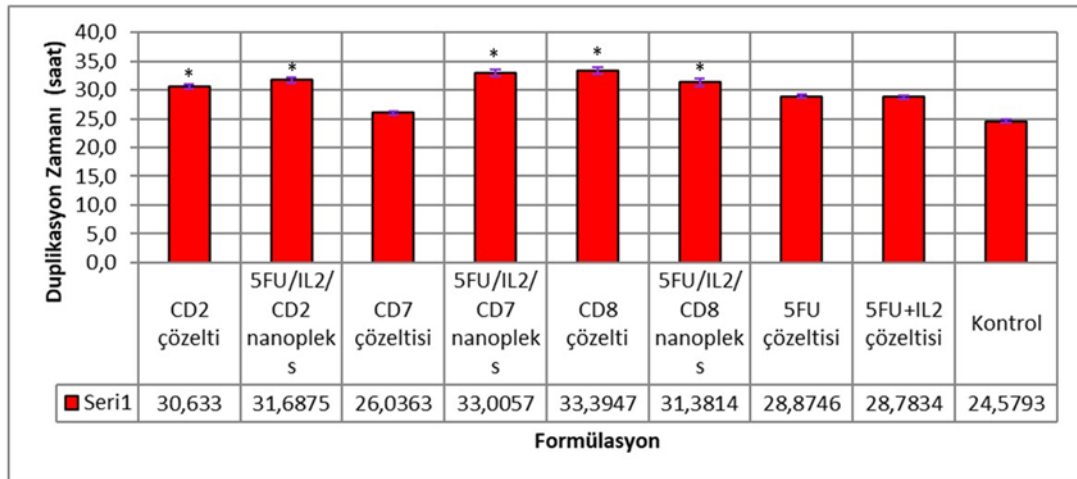
Şekil 4. 29. CT26 hücrelerine ait polimer gruplarına göre 24., 48. ve 72. saat hücre indeksi grafikleri; CD2 (a), CD7 (b), CD8 (c).

48. saat verilerinde tüm nanoplekslerin kontrolle aralarındaki fark anlamlı iken, 5-FU içeren çözeltilerle karşılaştırıldığında anlamlı fark gözlenmemiştir (Şekil 4.29.). 72. saat verilerinde de aynı durum devam etmiştir ($p<0,05$). 5-FU ve IL-2 yüklü CD nanopleksler kendi arasında karşılaştırıldığında aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur (Şekil 4.30.).



Şekil 4. 30. CT26 hücrelerine ait nanopleks gruplarını içeren hücre indeksi grafiği.

Formülasyon gruplarının duplikasyon zamanına etkisi değerlendirildiğinde Şekil 4.31.'deki sonuçlar ortaya çıkmıştır.



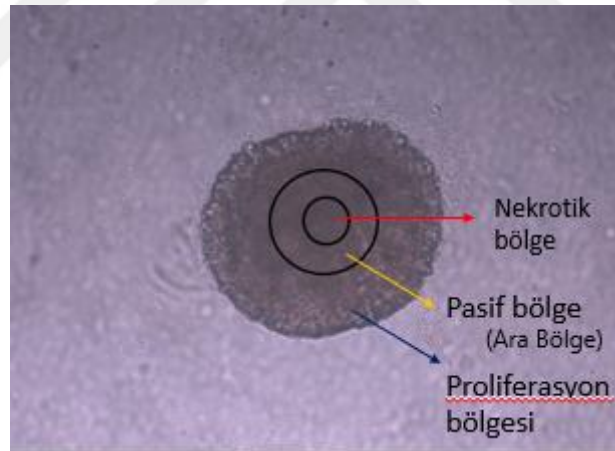
Şekil 4. 31. CT26 hücrelerine ait duplikasyon zamanı grafiği (* $p<0,05$, 5FU ve 5FU+IL2 çözeltisi uygulanan grupla karşılaştırıldığında).

CD nanopleks uygulanan tüm gruplarda hücre duplikasyon zamanının kontrol grubuna göre uzamış olduğu saptanmıştır (Şekil 4.31.). Kontrole göre 5-FU çözeltisi

ve 5-FU+IL-2 çözeltisinde yaklaşık 4 saatlik uzama gözlenmiştir. CD7 çözeltisinde 2 saatlik uzama gerçekleşirken 5-FU ve IL2 yüklü CD7 nanoplekste bu süre 9 saate yaklaşmıştır. 5-FU çözeltisi ve 5-FU+IL-2 çözeltisi uygulanan gruplarla karşılaştırıldığında ise duplikasyon zamanında 5FU/IL2/CD2 nanopleks, 5FU/IL2/CD7 nanopleks, 5FU/IL2/CD8 nanopleks, CD2 çözeltisi ve CD8 çözeltisi uygulanan gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$).

3.3.4. 3B *In Vitro* Tümör Modeli

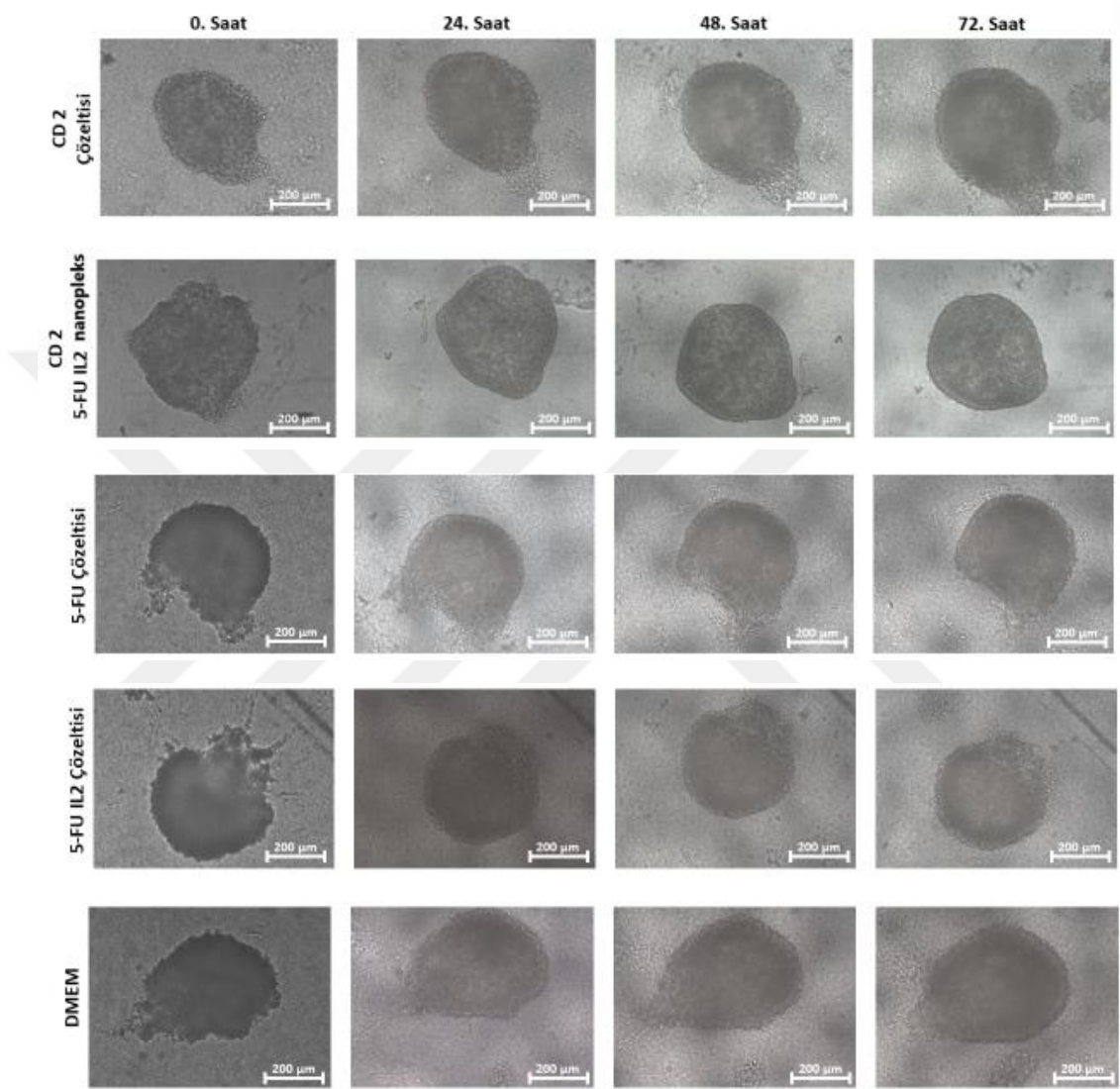
CT26 hücreleri ile 3B tümör modeli geliştirilebilmesinde Poly-HEMA çözeltisi ile kaplanan hücre plakalarına Matrigel içerisinde ve 200 μ L'de 5000 hücre/kuyucuk olacak hücre ekimi yapılmıştır. Ardından plakalar santrifüjlenmiş ve her iki günde bir, besiyeri değiştirilmiştir. 5. günde oluşan tümör modeline ait mikroskop görüntüsü Şekil 4.32.'te sunulmaktadır.



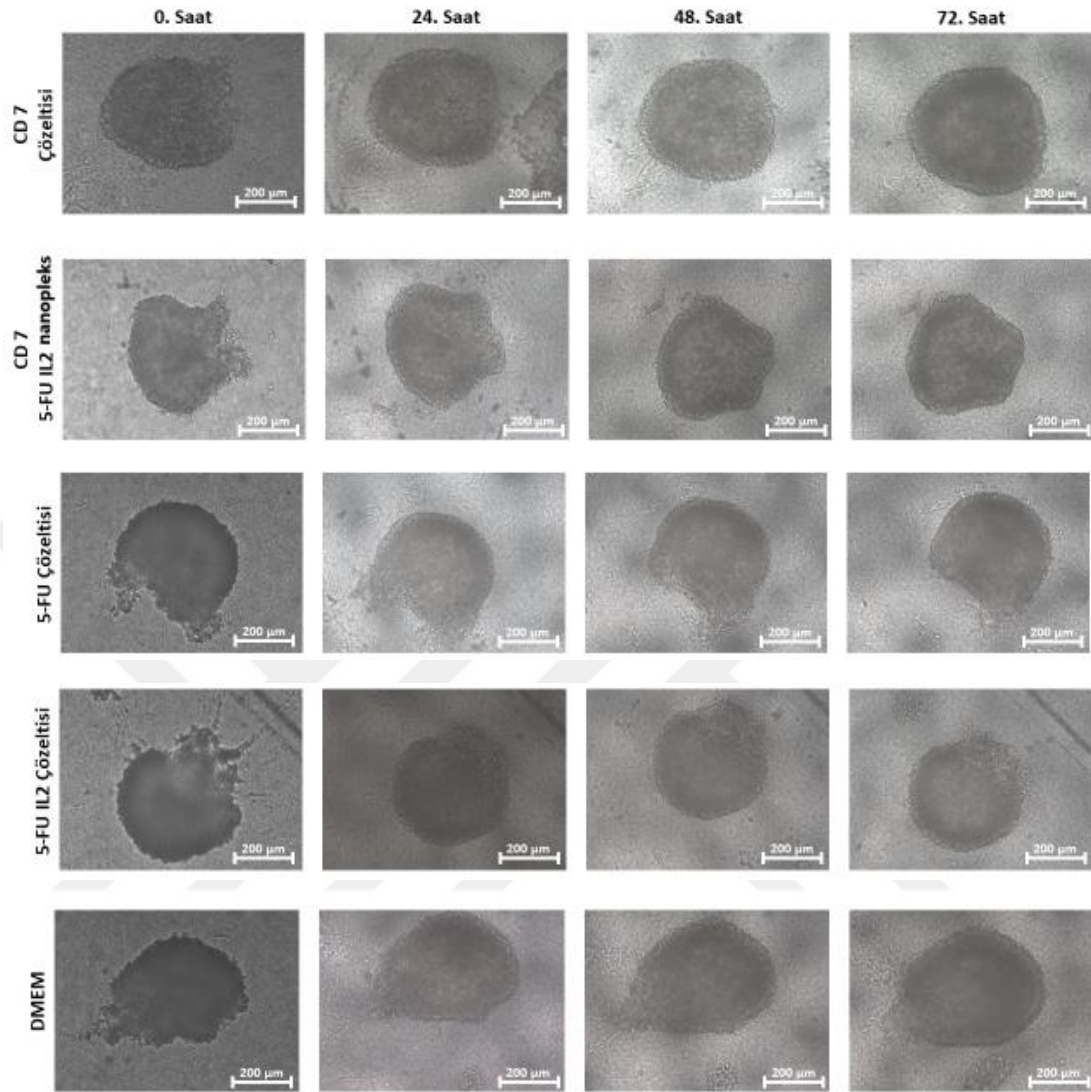
Şekil 4. 32. CT26 fare kolon kanseri hücreleri ile oluşturulan 3B küresel tümörün mikroskopik görüntüsü.

Beşinci günde oluşmuş olan 3B tümörlerin her bir grup için 1'er örnek seçilerek görselleri alınmıştır. Sonrasında 2B hücre kültüründe 5-FU için belirlenen IC_{50} değerinin 2 katı kadar 5-FU içeren ve orantısız olarak eşit miktarda CD polimeri ve IL-2 içeren CD çözeltileri, 5-FU ve IL-2 yüklü CD nanopleksler, 5-FU çözeltisi, 5-FU+IL-2 çözeltisi kuyucuklara uygulanmıştır. Kontrol grubuna ait kuyucuklara DMEM hücre kültürü ortamı eklenmiştir. Uygulanan bu tedavi sonrasında başlangıçta belirlenen kuyucukların 24., 48. ve 72. saatte görselleri kaydedilmiştir. Kaydedilen

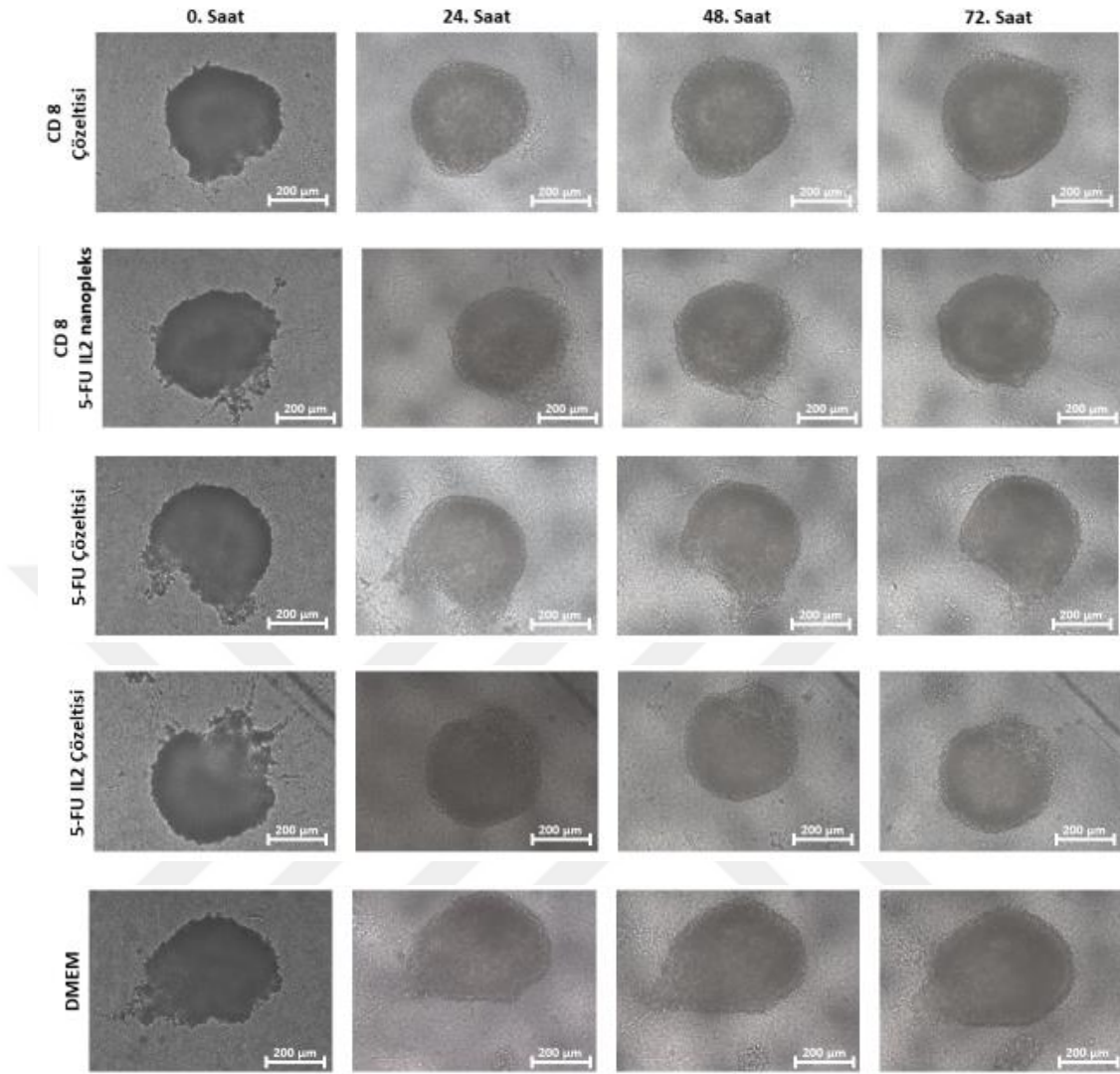
görseller Şekil 4.33.'te sunulmaktadır. 72 saat sonunda pipetajla dağıtılan hücrelerde canlılık WST-1 analizi ile belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.34.'te verilmektedir.



Şekil 4. 33. 3B tümör modelinde nanopleks veya diğer tedavilerin uygulama öncesi ve uygulama sonrası 24., 48. ve 72. saate ait mikroskop görüntüleri.

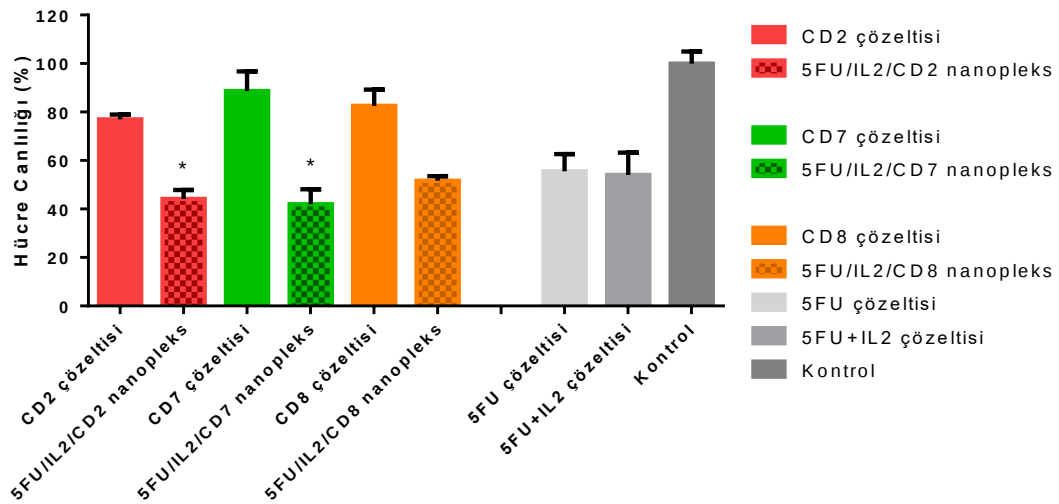


Şekil 4. 33. 3B tümör modelinde nanopleks veya diğer tedavilerin uygulama öncesi ve uygulama sonrası 24., 48. ve 72. saate ait mikroskop görüntüleri. (Devam)



Şekil 4. 33. 3B tümör modelinde nanopleks veya diğer tedavilerin uygulama öncesi ve uygulama sonrası 24., 48. ve 72. saate ait mikroskop görüntüleri. (Devam)

Elde edilen görüntülerde, CD polimer ve DMEM eklenen gruplarda sferoid boyutunda 40-80 µm büyüme kaydedilmiştir. 5-FU çözeltisi ve 5-FU+IL-2 çözeltisi uygulanan gruplarda ise sferoid boyutunun değişmediği belirlenmiştir. 5-FU ve IL-2 yüklü CD nanoplekslerin eklendiği sferoidlerde ise 40 µm küçülme gözlenmiştir. Bu verilerle CD nanoplekslerin 5-FU çözeltisine göre daha etkin olduğu gösterilmiştir.

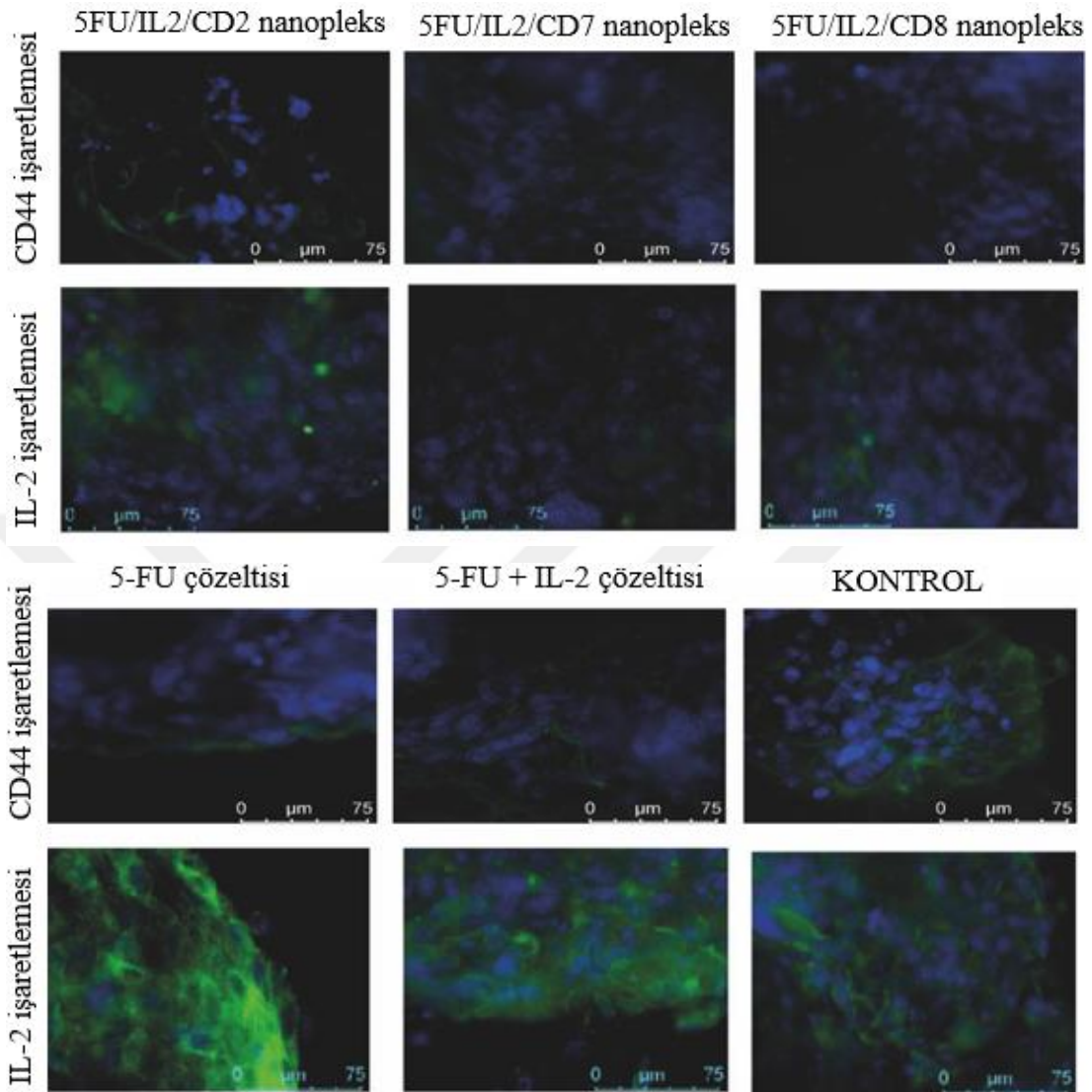


Şekil 4. 34. 3B tümör modeline uygulanan tedavi sonrasında hücre canlılığı analiz sonuçları, CD2 (A), CD7 (B), CD8 (C) ($n=6 \pm SS$). (* $p<0,05$ 5-FU çözeltisine göre aradaki farkın anlamlı olduğu grubu belirtir.)

Şekil 4.34. ile sunulan sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, CD2 ve CD7 polimerler ile hazırlanan 5-FU ve IL-2 yüklü CD nanoplekslerin 5-FU çözeltisine göre daha etkili (aradaki farkın anlamlı) olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). CD8 polimeri ile hazırlanan 5-FU ve IL-2 yüklü CD nanoplekslerde ise aradaki farkın anlamlı olmadığı gözlenmiştir ($p>0,05$).

3.3.5. Hücrelerde İmmünohistokimyasal İnceleme

Kontrol grubundaki fare kolon kanseri sferoidlerinde, hücrelerin formülasyon uygulanan gruplara göre CD44 ile daha yoğun olarak işaretlendiği gözlenmiştir. Sadece hücre kültürü ile muamele edilen kontrol grubu için tümör yükünün fazla ve metastatik aktivitenin olduğu CD44 ile yoğun işaretlenmesiyle de doğrulanmıştır. 5-FU ve IL-2 yüklü CD7 ile 5-FU ve IL-2 yüklü CD8 nanopleks uygulanan grupların göreceli olarak diğer gruplara göre (5-FU çözeltisi, 5-FU+IL-2 çözeltisi, kontrol ve 5FU/IL2/CD2 nanopleks) CD44 ile daha az işaretlendiği görülmüştür. Bu sonuç, CD7 ve CD8 nanoplekslerin daha etkili olduğunu göstermektedir. 5-FU çözeltisi ve 5-FU+IL-2 çözeltisi uygulanan sferoidlerin, IL-2 ile işaretlenmesinin, kontrol ve diğer deney gruplarına göre daha yoğun olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.35.). Üç boyutlu sferoid modelinde floresan mikroskop altında hücreler kalitatif olarak değerlendirilmiştir.

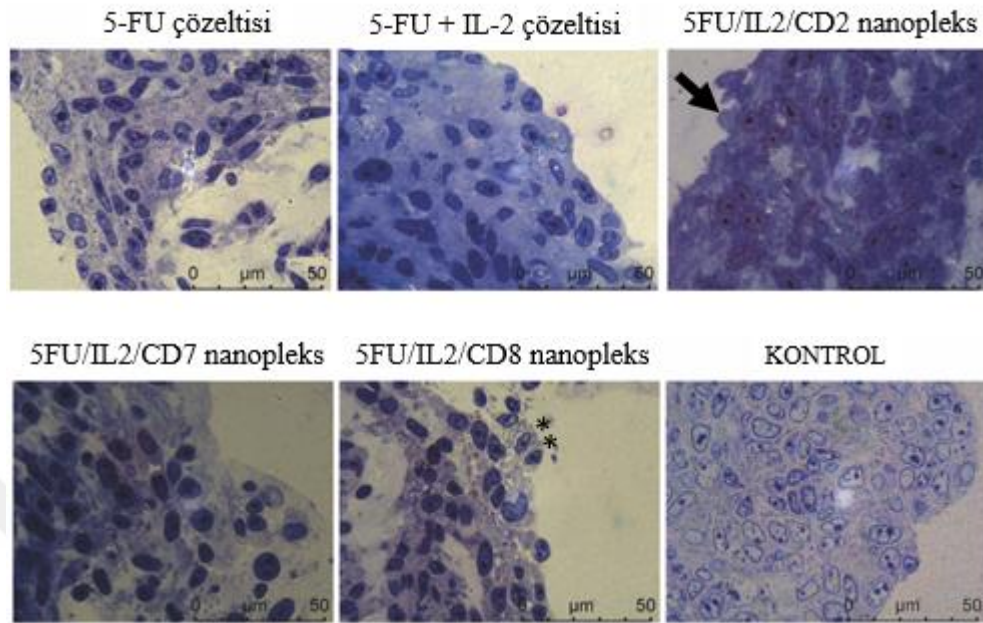


Şekil 4. 35. CD44 ve IL-2 ile işaretlenen kolon kanseri sferoidlerine ait reprezentatif mikrograflar sunulmuştur. Kontrol grubunda, deney gruplarına göre CD44 ile yoğun işaretlenme dikkat çekmektedir. 5-FU çözeltisi ve 5-FU+IL-2 çözeltisi uygulanan gruplarda IL-2 ile floresan işaretlenme belirgindir. Çekirdek: DAPI x 1000.

3.3.6. Sferoidlerin Plastik Bloklarda Işık Mikroskobu ile İncelenmesi

Sferoidlerden elde edilen örneklerde 5-FU + IL-2 çözeltisi uygulanan grupta pleomorfik çekirdek ve sitoplazma yapısı gösteren epitel hücreleri gözlenmiştir. Pleomorfizm kanser hücreleri açısından, hücrelerin veya çekirdeklerinin boyutunda ve şeklinde değişiklik göstermesi olarak tanımlanmaktadır. Tümör hücrelerinin zar yapılarının yer yer eridiği ve apoptotik görüntü sergiledikleri saptanmıştır. Tedavi uygulanan gruplara ait örneklerin tümünde apoptoza giden hücreler olduğu dikkati

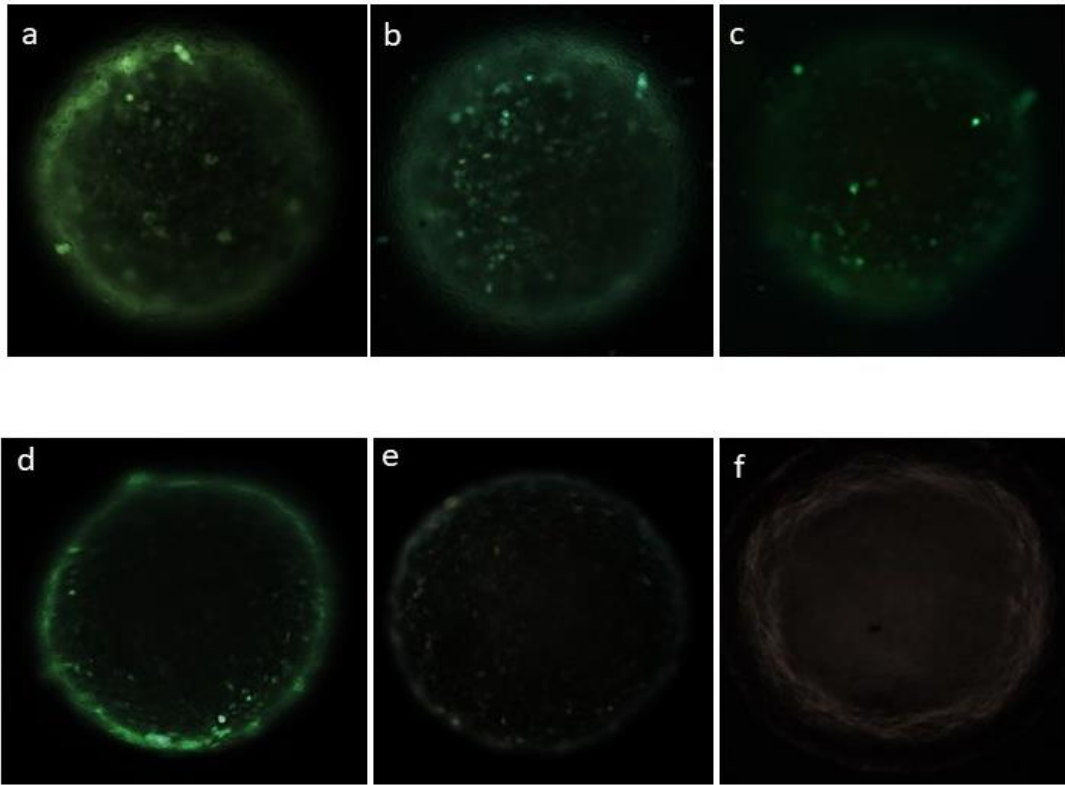
çekmektedir (Şekil 4.36.). Bu kalitatif histolojik bulguların gerçek zamanlı proliferasyon analizinde elde edilen veriler ile uyumlu olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4. 36. Formülasyon ve kontrol grubuna ait sferoidlerden alınmış yarı ince kesit örneklerine ait reprezentatif mikrograflarda; kontrol grubundaki kolon kanseri epitel hücrelerinin çekirdek ve sitoplazma bütünlüğünü koruduğu gözlenirken, formülasyon uygulanan gruplardaki hücrelerin bütünlüklerini kaybederek (**) apoptoza gittiği (↘) gözlenmektedir. (Metilen mavisi Azur II ile boyama yapılmıştır.)

3.3.7. Kanser Nodüllerinde *In Vitro* Olarak TUNEL ile Apoptoz Tayini

3B tümör modeli ile oluşturulan ve 5-FU ile IL-2 yüklü CD nanopleks uygulanan sferoidlerin apoptotik özellikleri TUNEL kiti ile tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.37. ile sunulmaktadır.



Şekil 4. 37. 5-FU ve IL-2 yüklü CD2 nanopleks (a), 5-FU ve IL-2 yüklü CD7 nanopleks (b), 5-FU ve IL-2 yüklü CD8 nanopleks (c), 5-FU çözeltisi (d), IL-2 çözeltisi ve DMEM (f) ile inkübe edilen 3B CT-26 sferoidlerde apoptozun belirlenmesi. Floresin konjuge d-UTP kullanılarak apoptotik hücrelerdeki DNA zincir kırıkları yeşil renk ile boyanmıştır.

Farklı CD nanopleks formülasyonlarının 3B küresel kolon tümörlerinde neden olduğu apoptozis TUNEL yöntemiyle belirlenmiştir. Ticari olarak temin edilen kit floresin konjuge –dUTP içerdiği için uygulama sonrası apoptotik hücreler floresan mikroskopunda yeşil renk ile görüntülenebilmişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre, Şekil 4.37.-e ve f’de gösterilen sırasıyla IL-2 çözeltisi ve sadece DMEM ile işaretlenen gruplarda herhangi bir boyama gözlenmemiştir. 5-FU çözeltisi ile inkübe edilen grupta ise apoptotik hücrelerin yoğunluğunun CD nanopleks formülasyonu ile inkübe edilen gruplara göre daha az olduğu ve sıklıkla sferoidin dış yüzeyinde ve çevresinde olduğu belirlenmiştir. Formülasyonlar apoptoz açısından incelendiğinde ise her 3 grubun da hücrelerde apoptoza neden olduğu ancak özellikle 5FU/IL2/CD7 nanopleksinin (Şekil 4.37.-b) çok katmanlı sferoidin derinlerindeki hücrelerde de apoptoza neden olduğu mikroskopik inceleme ile gösterilmiştir.

3.4. *In vivo* Antitümöral Çalışmalar ve Dokularda Histopatolojik ve İmmünolojik Yanıtın Belirlenmesi

4.4.1. Güvenlilik Çalışması

Bu çalışmalar kapsamında öncelikle CD2, CD7 ve CD8 polimerleri ile IL-2 yüklü nanopleksler hazırlanmış ve kontrol grubu olarak serum fizyolojik (SF) kullanılmıştır. 100 µL hacim içerisinde 5000 U IL-2 ve 3,9 mg CD olacak şekilde IL-2 yüklü CD nanopleksler hazırlanmış ve tek doz iv. olarak enjekte edilmiştir. Enjeksiyondan 24 saat sonra hayvanlardan serum örneklerinde alkalın fosfataz ve alanin aminotransferaz gibi değişkenler ölçülerek CD polimerlerin toksisitesinin olup olmadığı belirlenmiştir.

Tablo 4. 19. Sağlıklı hayvanlara farklı polimerin i.v. uygulamalarının ardından toplanan serumlardan bakılan toksisite sonuçları (n=5, ±SS).

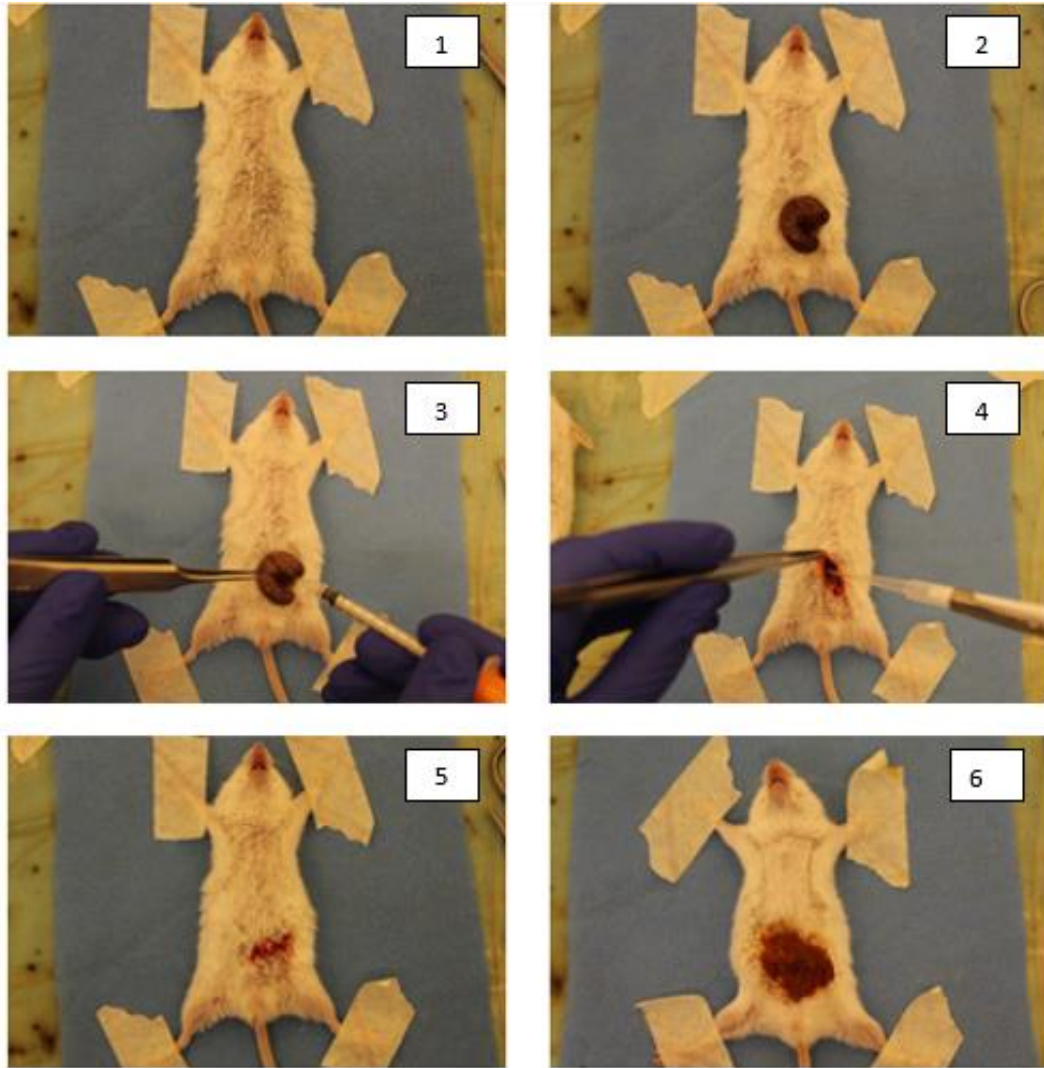
	Kontrol (PBS) ve Tedavi Grupları			
	PBS	CD2	CD7	CD8
AST (55-352 U/l)	367±2.8	748±8.5	316.5±4.9	586±4.2
ALT (41-131 U/l)	71±2.8	71±1.4	53.5±0.7	79±2.8
cCRP (mg/dl)	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3
AST/ALT	5.2±0.1	10.55±0.4	5.9±0	7.4±0.3

Yapılan bu çalışmalar sonucunda CD7 polimerinin ALT (alanin transferaz) ve AST (aspartat transaminaz) değerleri göz önüne alındığında daha güvenli olduğu tespit edilmiştir. *In vivo* çalışmaların devamının CD7 polimeri ve nanopleksi ile yapılmasına karar verilmiştir (Tablo 4.19.).

4.4.2. Antitümör Etkinlik Çalışması

2x10⁶ CT26 kolon hücresi, 100 µL (1mg/ml; 1:10) Matrigel® içerisinde olacak şekilde, abdominal bölgesinde kesi sonrasında çekum üzerinde insizyonel çizikler oluşturulan farelere inoküle edilmiştir Abdominal insizyon bölgesi absorbe edilebilen 5/0 monofilament ile cerrahi suture kullanılarak kapatılmıştır. Suture alanı batikonla temizlenerek hayvanlar anestezinin etkisinden çıkana kadar gözlenmiştir. Cerrahi operasyon sonrasında farelerde oluşabilecek dehidratasyonu önlemek amacıyla 0,5 mL

steril %0,9 NaCl subkutan (sc) olarak enjekte edilmiştir. Bu adımların uygulamalarına ait görseller Şekil 4.38.'da sunulmaktadır.

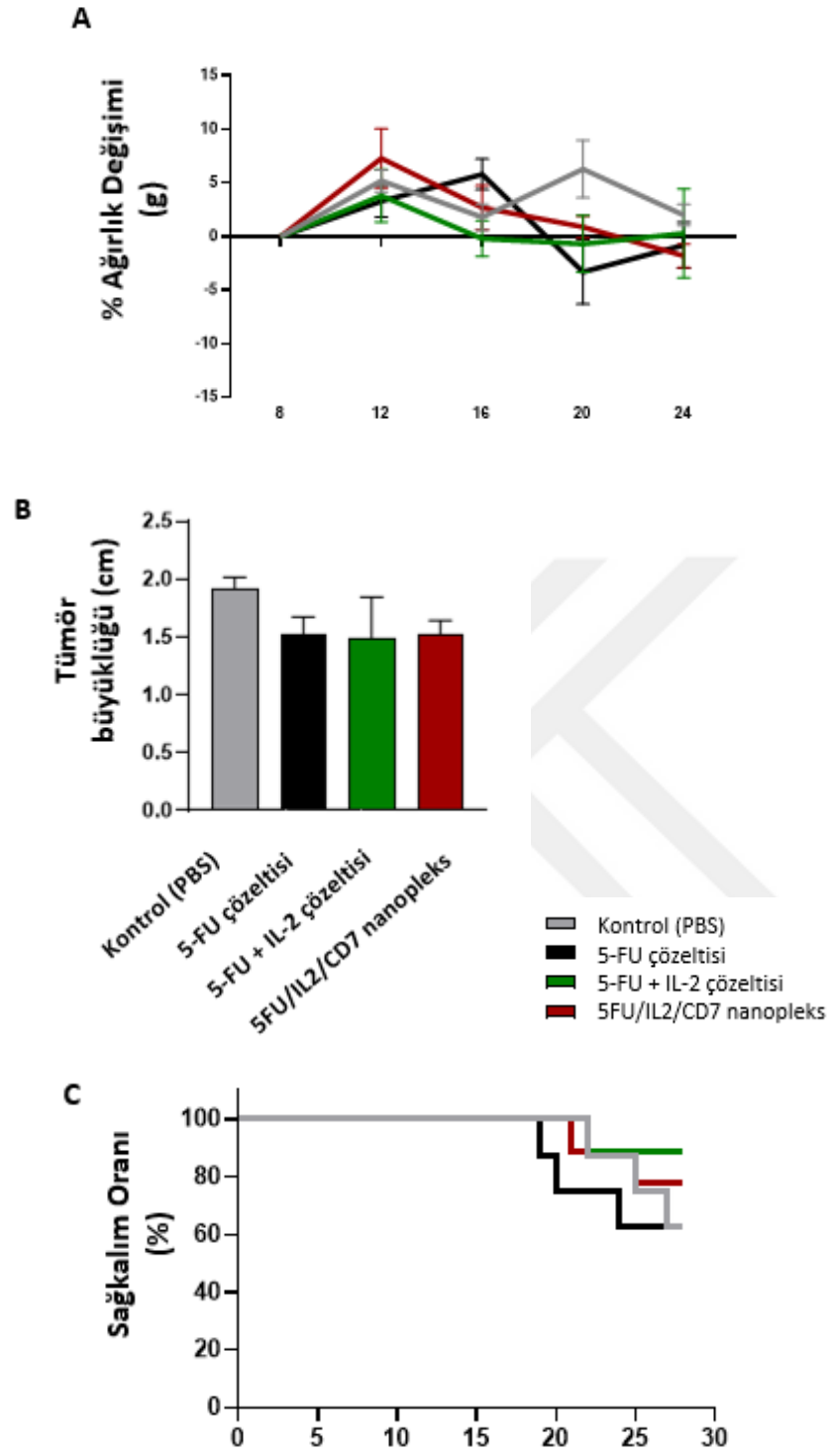


Şekil 4. 38. *In vivo* tümör modeli oluşturma çalışma aşamaları. (Aşama 1) Anestezi altındaki hayvan cerrahi müdahaleye hazırlanmıştır. (Aşama 2) Hayvanda kesik açılarak çekum dışarı alınmıştır. (Aşama 3) Çekuma çizik atılmıştır. (Aşama 4) Hücreler uygulanmıştır. (Aşama 5) Sütürle cerrahi alan kapatılmıştır. (Aşama 6) Batikon uygulanarak cerrahi bölge sanite edilmiştir.

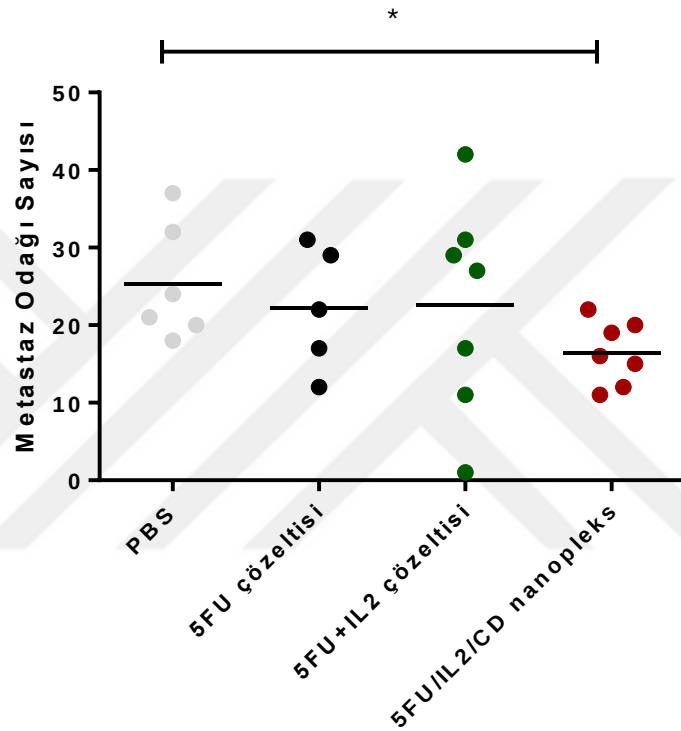
Uygulanan tedaviler öncesinde ve sonrasında, haftada iki kez olmak üzere toplam dört kez, hayvanların ağırlık ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Hayvanların tedaviler süresince ağırlıklarının değişiminde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p < 0,05$). Tümör büyüklükleri değerlendirildiğinde kontrol grubuna göre 5FU/IL2/CD7 nanopleks grubunda istatistiksel olarak azalma gözlenmiştir ($p < 0,05$) (Şekil 4.39a.). Sağ kalım oranlarına bakıldığında ise 5-FU+IL-2 çözeltisi

uygulanan ile 5FU/IL2/CD7 nanopleks uygulanan gruplarda yüksek olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). 5-FU ve IL-2 yüklü CD7 nanopleksin metastaz odağı sayısı açısından daha etkili olduğu çalışma sonuçlarında gözlenmiştir. Elde edilen bulgular Şekil 4.40.'ta sunulmaktadır.





Şekil 4. 39. Tümör indüklenen hayvanlarda uygulanan tedaviler sonrasında ağırlığın (a), tümör boyutunun(b) ve sağ kalımın (c) zaman içerisindeki değişimi (* $p < 0,05$).



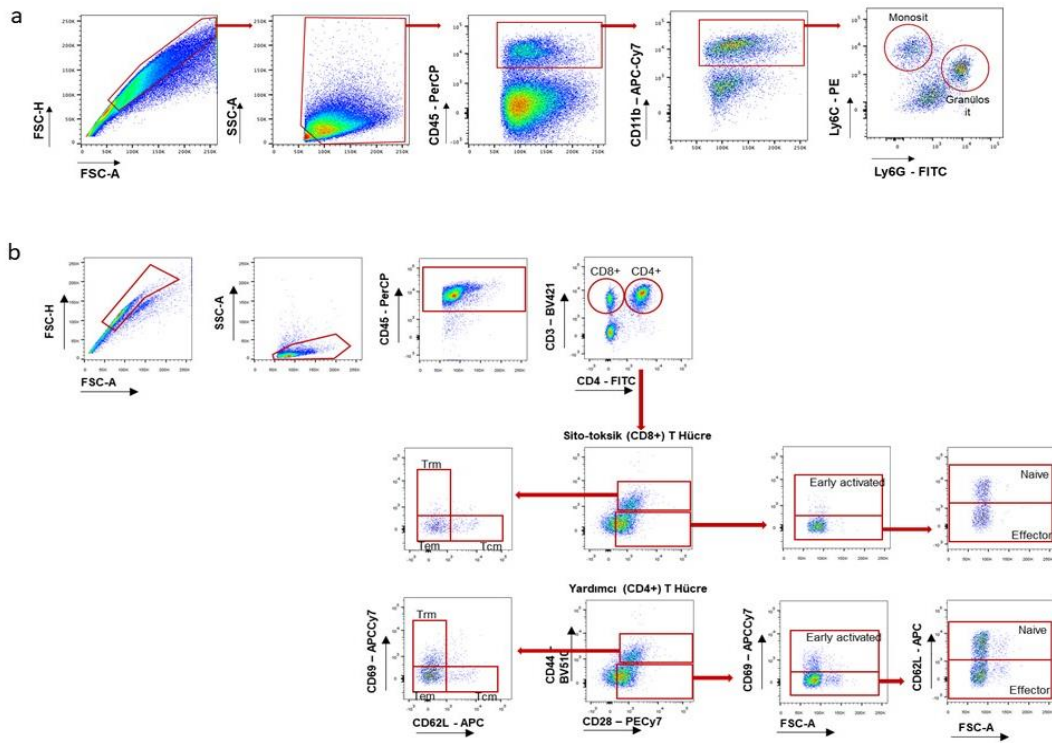
Şekil 4. 40. Uygulanan tedavi süreci sonunda hayvanlardaki metastaz odağı sayıları (* $p < 0,05$).

Metastaz odakları değerlendirildiğinde kontrol grubuna göre 5FU/IL2/CD7 nanopleks uygulanan hayvanlarda istatistiksel olarak metastaz odağı sayısının daha düşük olduğu gözlenmiştir (* $p < 0,05$).

İmmunfenotipleme analizi yapılabilmesi için üzerinde çalışmak istenilen hücreler tümör, dalak ve mezenterik lenf nodundan akış sitometresi cihazında kapılama stratejisiyle (gating strategy) ayrıştırılmışlardır. Şekil 4.41. ile gösterildiği gibi ilk olarak FSC-H/FSC-A üzerinden analizin doğru yapılması için tek düşen hücreler kapılanmıştır. Ardından SSC-A/FSC-A'dan hücreler granül durumu ve hücre boyutuna göre kapılayarak debrisler dışarıda bırakılarak ve ilgilenilen hücre

popülasyonu seçilmiştir. Ortak lökosit marker CD45 ile kapılama yapılarak immün sistem hücresi olan hücreler seçilmiştir.

Aynı şekilde, CD11b miyeloid hücre belirteci yardımıyla miyeloid hücreler işaretlenerek miyeloid kökenli olmayan hücreler analiz dışında bırakılmıştır. Son olarak Ly6C⁺ Ly6G⁻ olan popülasyon monosit ve Ly6C orta/+ Ly6G⁺ popülasyon granülositler olarak belirlenerek analizler yapılmıştır.



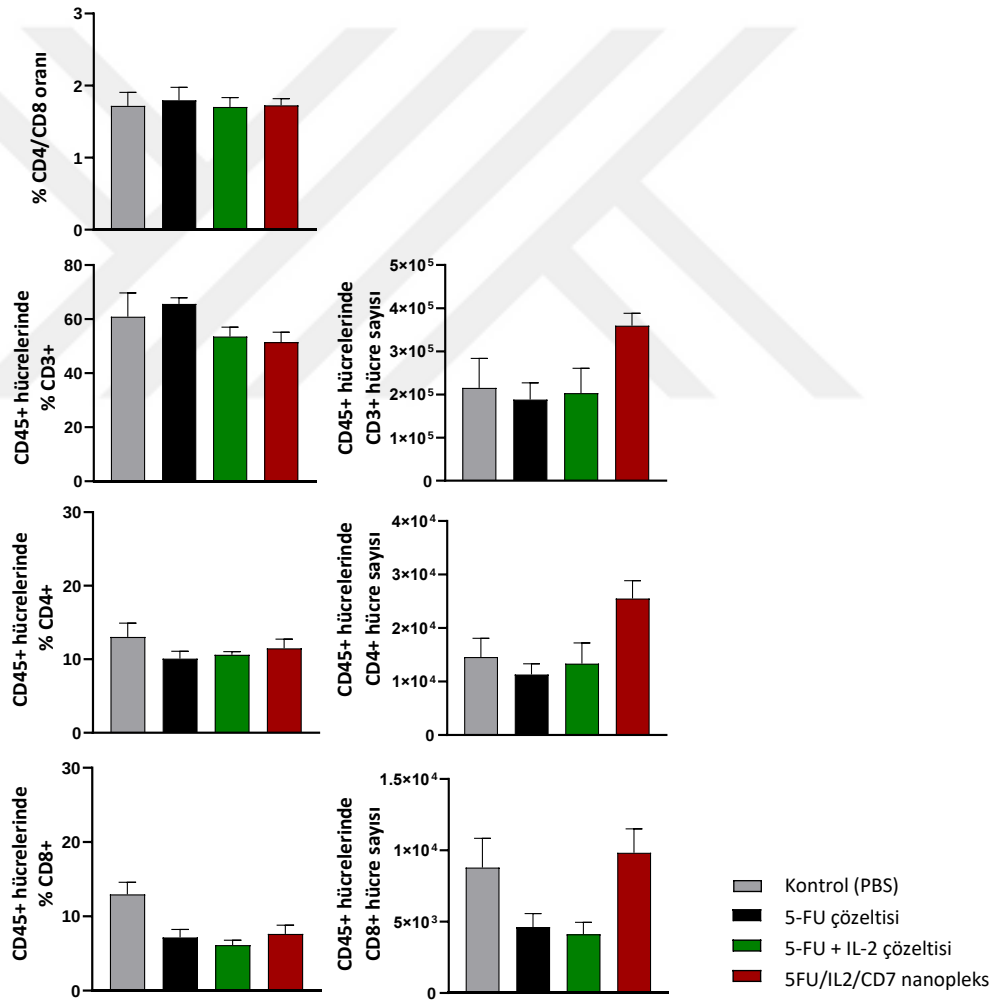
Şekil 4. 41. Miyeloid (a) ve lenfosit (b) hücre analizi için yapılan kapılama stratejileri.

Akış sitometrisi ile istenilen hücreler dokulardan ayrıştırıldıktan sonra immünofenotipleme çalışmaları yapılmıştır. Dalak ve tümör örneklerinden elde edilen CD45⁺ hücrelerinden CD3⁺, CD4⁺ ve CD8⁺ hücrelerinin oranları ile Cd11b⁺ hücreleri ve bunlardaki nötrofil ve monosit oranları belirlenmiştir. Lenf dokusu örneklerinden CD45⁺ hücrelerinden CD3⁺, CD4⁺ ve CD8⁺ hücrelerinin oranları ölçülmüştür. Elde edilen bulgular Şekil 4.42. ile gösterilmiştir. Tüm gruplarda tümöre infiltre immün hücre sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamasına rağmen, 5-FU çözeltisi grubunda diğer gruplara göre daha az immün hücre bulunmaktadır (p<0,05).

Dalak dokusundaki T hücreleri değerlendirildiğinde, istatistiksel olarak 5-FU ve IL-2 yüklü CD7 nanopleks grubunda hücre sayısı daha fazladır (p<0,05). CD3⁺ ve

CD4⁺ hücre oranları tüm tedavi gruplarında aynı iken, 5-FU ve IL-2 yüklü CD7 nanopleks grubundaki hücre sayısı 5-FU çözeltisi ile 5-FU ve IL-2 çözeltisi gruplarının yaklaşık 2 katıdır.

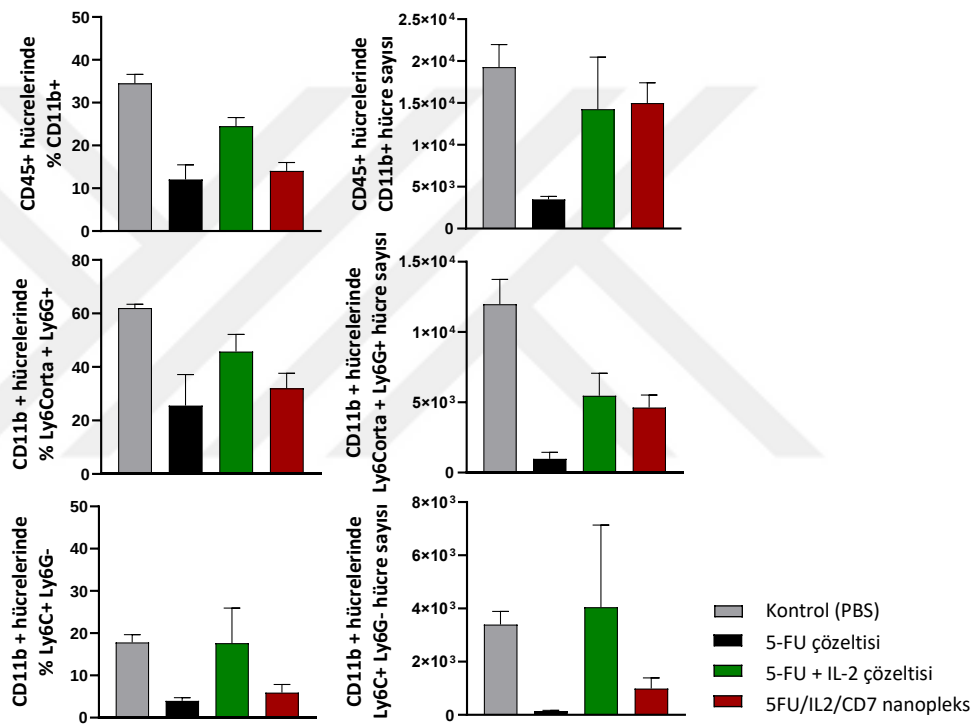
Dalakta CD8⁺ hücre yüzdeleri incelendiğinde, kontrol grubuna göre diğer tedavi gruplarının daha az yüzdeye sahip olduğu görülmektedir ($p<0,05$). Ancak doku içerisindeki hücreler incelendiğinde ise kontrol ile 5-FU ve IL-2 yüklü CD7 nanopleks gruplarının benzer sayıda CD8⁺ T hücresi içerdiği belirlenmiştir. 5-FU ve IL-2 yüklü CD7 nanopleksin, 5-FU çözeltisi ile 5-FU ve IL-2 çözeltisi gruplarına göre daha yüksek oranda CD8⁺ T hücresi barındırdığı gözlenmiştir.



Şekil 4. 42. Tedavi sonrasında dalak dokusundaki T hücrelerin oranları.

Şekil 4.43.'te dalak içerisindeki CD11b⁺ hücre yüzdelerine bakıldığında ise kontrole göre 5-FU çözeltisi, 5-FU+IL-2 çözeltisi ve 5FU/IL2/CD7 nanopleks gruplarında

istatistiksel olarak anlamlı azalma görülmüştür ($p<0,05$). Hücre sayıları incelendiğinde ise sadece kontrole göre 5-FU çözeltisi grubunda istatistiksel azalma gözlenmiştir. Dalak dokusundaki nötrofil hücre sayıları ve oranları değerlendirildiğinde kontrol grubu ile diğer tedavi grupları arasında istatistiksel fark tespit edilmiştir ($p<0,05$). 5-FU çözeltisi grubunda en düşük hücre sayısı ve oranı yer alırken bu grubu 5-FU ve IL-2 yüklü CD7 nanopleks tedavi grubu takip etmiştir. Monosit yüzdelerinde ise kontrol grubuna göre 5-FU ve IL-2 yüklü CD7 nanopleks ve 5-FU çözeltisi grubunda anlamlı fark bulunmaktadır ($p<0,05$).

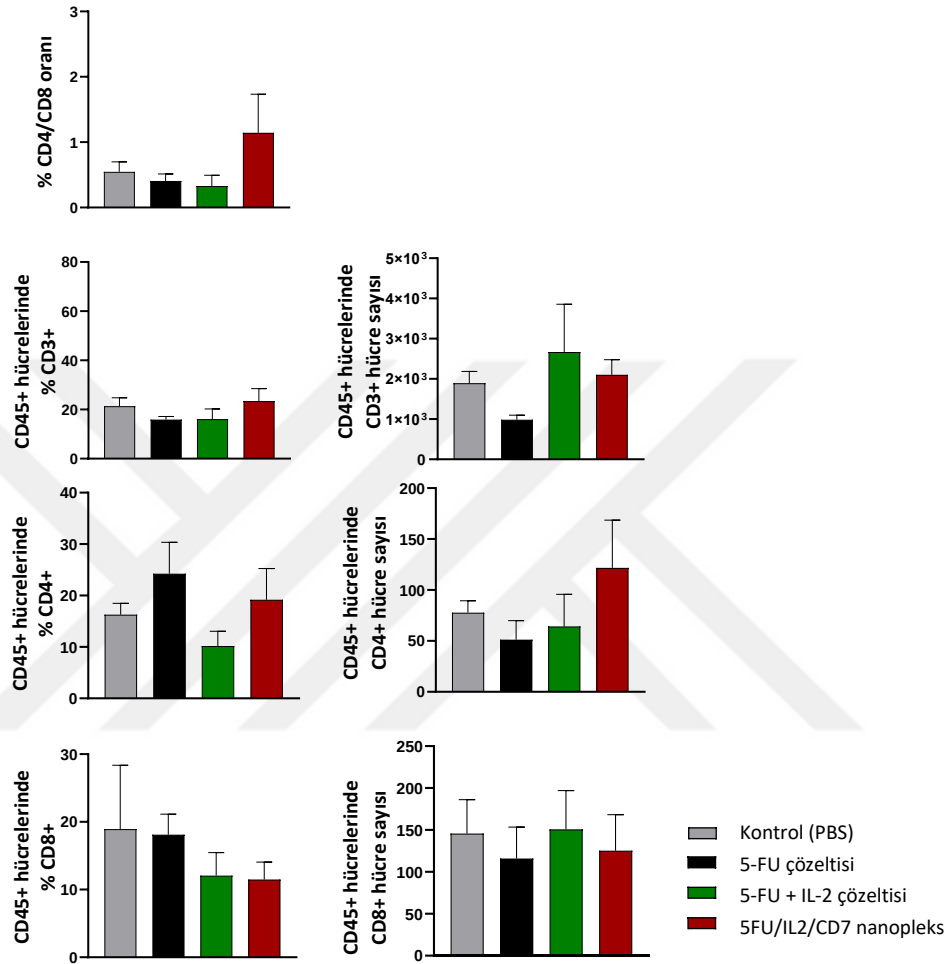


Şekil 4. 43. Tedavi sonrasında dalak dokusundaki miyeloid hücre oranları.

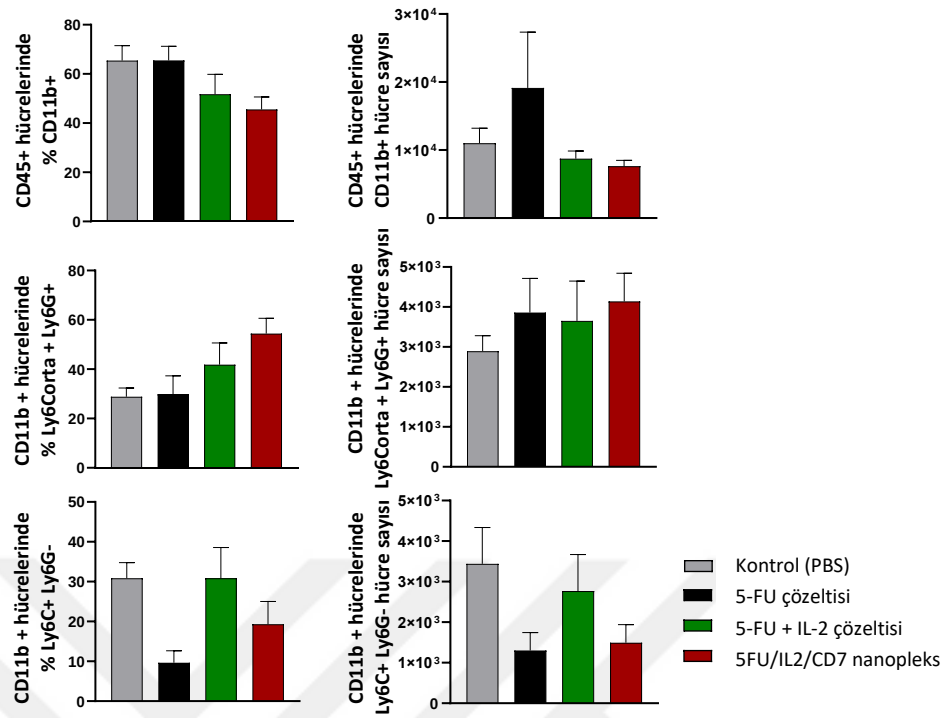
Tümörde tüm tedavi gruplarında T hücrelerinin sayısı ve yüzdelerinde istatistiksel olarak fark saptanmamıştır (Şekil 4.44.).

Tümörde CD11b⁺ hücre yüzdeleri değerlendirildiğinde 5-FU ve IL-2 yüklü CD7 nanopleks uygulanan grubun kontrol grubu ve 5-FU çözeltisi uygulanan gruptan daha az olduğu Şekil 4.45.'te görülmektedir ($p<0,05$). Miyeloid hücre yüzdesini ifade eden bu sonuca göre, 5-FU ve IL-2 yüklü CD7 nanopleks ile 5-FU ve IL-2 çözeltisi ile benzer orana sahiptir. Nötrofil yüzdeleri değerlendirildiğinde 5-FU ve IL-2 yüklü CD7 nanopleks grubunda kontrol ve 5-FU çözeltisi gruplarına göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$). 5-FU ve IL-2 yüklü CD7 nanopleks uygulanan grubun 5-FU

çözültisi uygulanan grup ile benzer monosit yüzdesine sahip olduğu belirlenmiştir. Nötrofil ve monosit hücre sayılarında olarak gruplar arasında istatistiksel fark bulunmamaktadır ($p>0,05$).

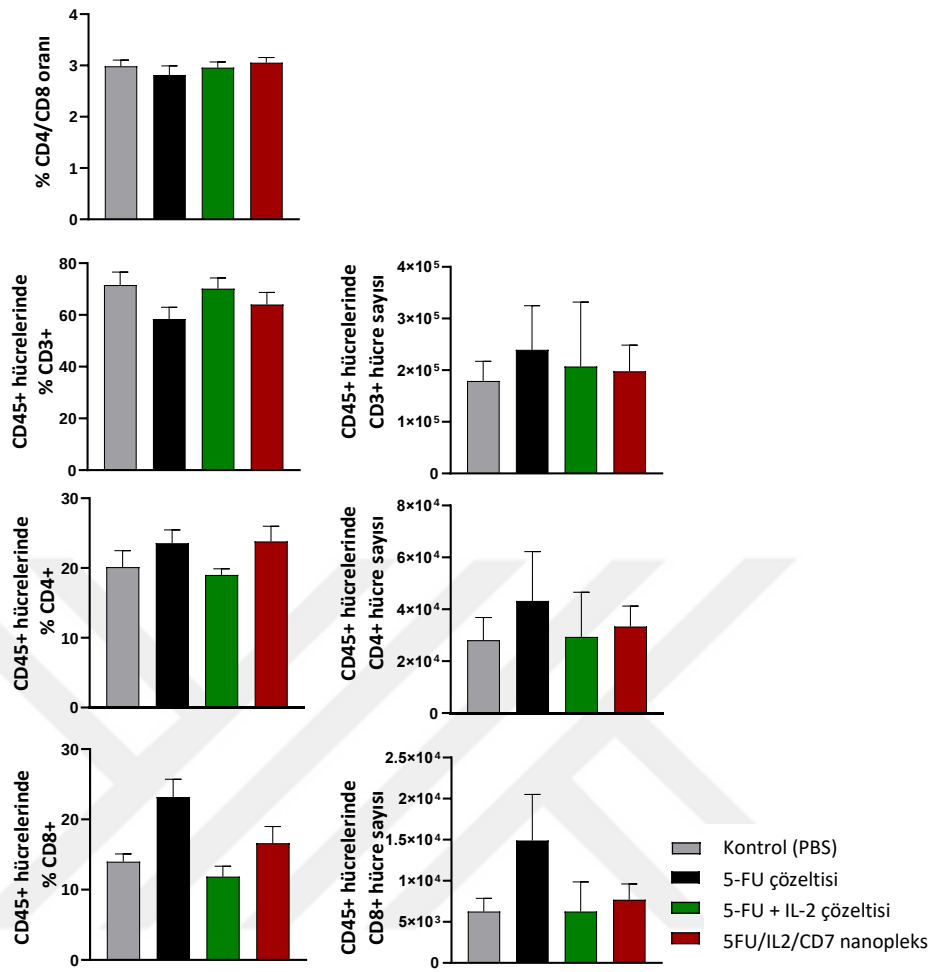


Şekil 4. 44. Tedavi sonrasında tümör dokusundaki T hücrelerin oranları.



Şekil 4. 45. Tedavi sonrasında tümör dokusundaki miyeloid hücre oranları.

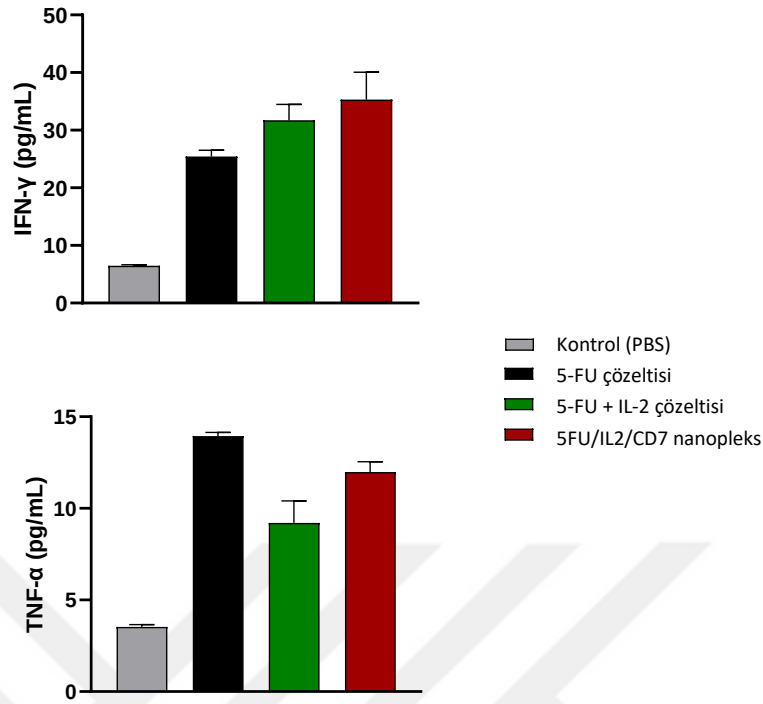
Lenf nodu içerisindeki $CD8^+$ hücre yüzdelerinde 5-FU çözeltisi ve 5-FU+IL-2 çözeltileri arasındaki fark anlamlıdır. 5-FU çözeltisi uygulanan grupta $CD8^+$ hücre sayısı daha yüksektir (Şekil 4.46.).



Şekil 4. 46. Tedavi sonrasında lenf nodu dokusundaki T hücrelerin oranları.

Uygulanan tedavilerin T hücreleri üzerindeki etkisi dalak, lenf nodu ve tümör dokularında incelenmiştir. T hücreleri, yardımcı T ($CD4^+$) hücreleri ve sitotoksik ($CD8^+$) T hücreleri olmak üzere ikiye ayrılarak incelenmiştir. Mezenterik lenf nodu ve dalakta $CD4^+$ T hücreleri ve $CD8^+$ T hücrelerinin oranları gruplar arasında farklılık gözlenmezken her iki dokuda da baskın olan hücre popülasyonu $CD4^+$ T hücreleridir. Tümörde ise gruplar arasında $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerinin oranları farklılık göstermekle birlikte baskın popülasyon $CD8^+$ T hücreleridir.

Tedaviler sonrasında hayvanlardan alınan kan örneklerinden toplanan serumlarda IFN- γ , TNF- α gibi anti-tümör yanıtlarda rol oynayan sitokin varlıkları belirlenirken; IL-2 serumdan referans değerinden düşük olduğu için tespit edilememiştir (Şekil 4.47.).

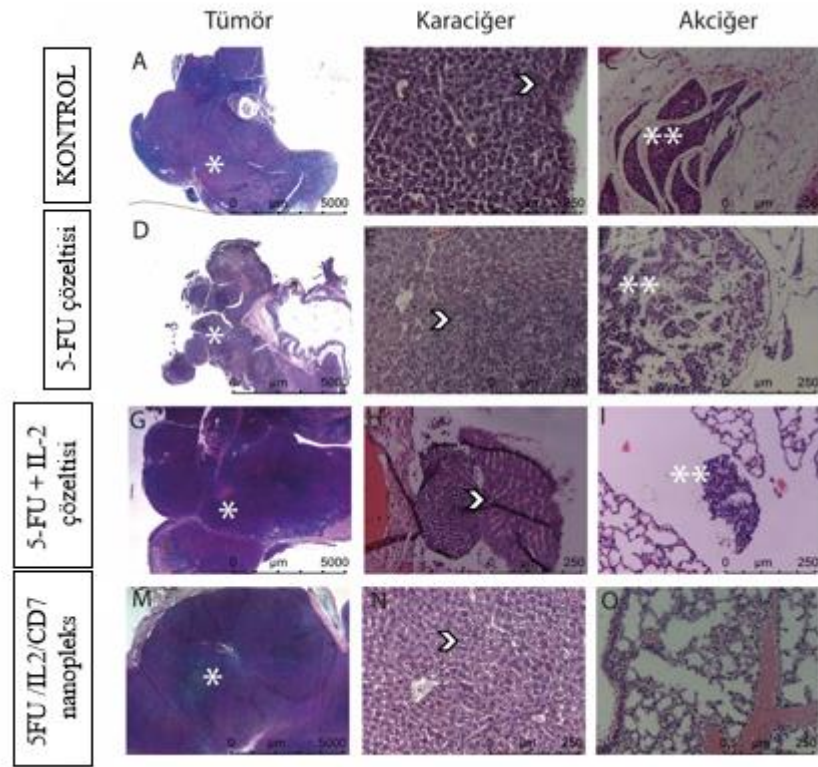


Şekil 4. 47. Serumdaki T lenfosit ilişkili sitokin düzey analizi.

Gruplar, IFN- γ ve TNF- α sitokin düzeyleri bakımından değerlendirildiğinde; kontrol grubuna göre diğer tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı artış görülmüştür ($p<0,05$). Serumdaki IFN- γ düzeyindeki artış bakımından tedavi uygulanan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamasıyla birlikte en yüksek IFN- γ düzeyi 5-FU+IL-2 çözeltisi ve 5FU/IL2/CD7 nanopleks uygulanan gruplarda belirlenmiştir ($p<0,05$). Bu durum nanopleks yapısının enflamatuvar yanıtta artışa değiştirmedigini göstermiştir. Serumdaki TNF- α sitokin düzeyine bakıldığında ise; tedavi grupları arasında enflamatuvar yanıt açısından bir farklılık bulunmamaktadır ($p<0,05$).

3.4.3. *In Vivo* Ortama Uygulanmış Kanser Nodüllerinin Histopatolojik İncelemesi

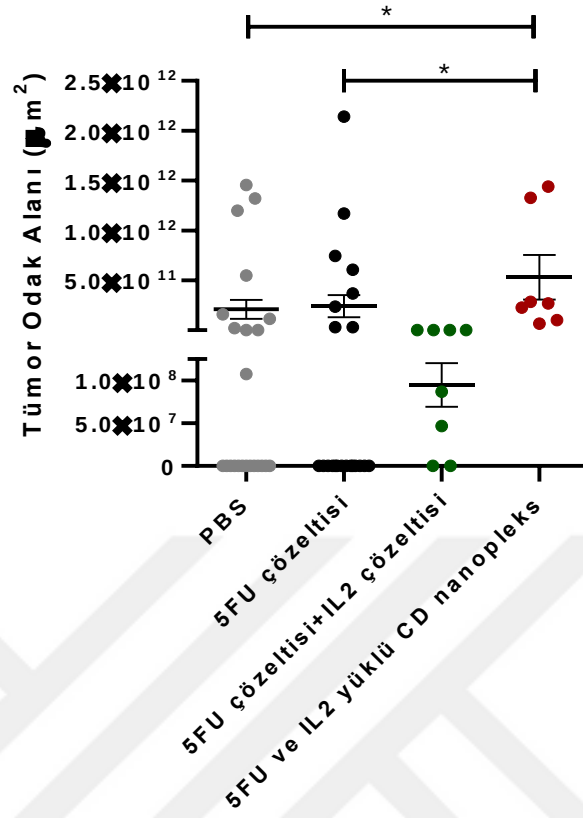
PBS, 5-FU çözeltisi, 5-FU+IL-2 çözeltisi ve 5-FU ve IL-2 yüklü CD7 nanopleks formülasyonları uygulanan gruplara ait primer tümör odakları ile uzak organ metastazı olarak akciğer ve karaciğer dokuları değerlendirilmiştir (Şekil 4.48.).



Şekil 4. 48. PBS, 5-FU çözeltisi, 5-FU+IL-2 çözeltisi, 5-FU yüklü CD7 nanopleks ve 5-FU ve IL-2 yüklü CD7 nanopleks formülasyonları uygulanan gruplarda, tümör dokusu (A, D, G, M), karaciğer (B, E, H, N) ve akciğer (C, F, I, O) mikroyrafları.

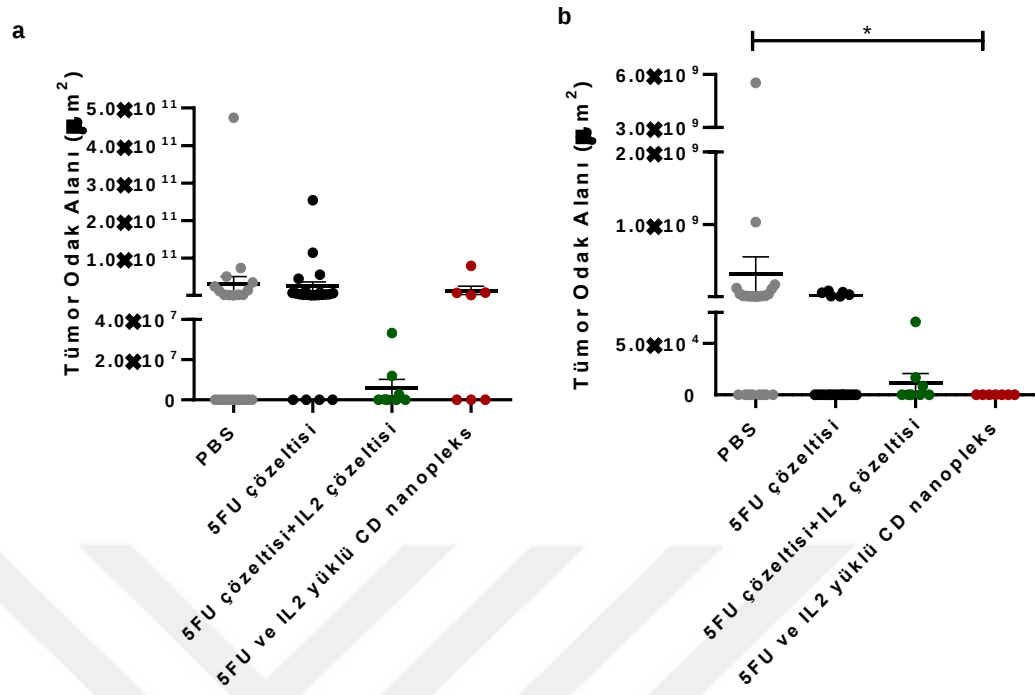
Şekil 4.48. ile sunulan graflarda ilk kolonda (A, D, G, M) ortotopik tümör dokusu peritümöral doku ile beraber izlenmektedir (*) X125. İkinci kolonda karaciğer parankiminde yerleşik metastatik tümör dokusu (**) araştırılmıştır. Üçüncü kolonda akciğer parankimasındaki tümör odağı gösterilmektedir (**) x200. Akciğer metastaz bulgusu olmayan 5-FU+IL-2 çözelti grubu (O) representatif olarak sunulmuştur.

Primer tümör odakları değerlendirildiğinde, 5-FU ve IL-2 yüklü CD7 nanopleks formülasyonu uygulanan tedavi grubunda PBS ve 5-FU çözeltisi uygulananlara göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak daha az tümör odağı geliştiği gözlenmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.49.).



Şekil 4. 49. PBS, 5-FU çözeltisi, 5-FU+IL-2 çözeltisi ve 5-FU ve IL-2 yüklü CD7 nanopleks formülasyonları uygulanan tedavi gruplarında primer tümör odakları (*) $p < 0,05$.

PBS uygulanan grup ile 5-FU çözeltisi, 5-FU+IL-2 çözeltisi ve 5-FU ve IL-2 yüklü CD7 nanopleks formülasyonları uygulanan gruplar arasında hepatik metastaz alanı açısından anlamlı fark bulunmamaktadır (Şekil 4.50a.). Ancak akciğerdeki metastatik odaklar izlendiğinde; 5-FU ve IL-2 yüklü CD7 nanopleks uygulanan grupta metastatik odak alanı PBS uygulanan alana göre anlamlı olarak azalmıştır ($p < 0,05$) (Şekil 4.50b.). Tümör odak alanları değerlendirildiğinde ise en küçük primer odakların, karaciğer ve akciğer odaklarının 5-FU+IL-2 çözelti uygulanan tedavi grubunda olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4. 50. PBS, 5-FU çözeltisi, 5-FU+IL-2 çözeltisi ve 5-FU ve IL-2 yüklü CD7 nanopleks formülasyonları uygulanan tedavi gruplarında karaciğerdeki (a) ve akciğerdeki (b) metastatik alanlar (*) $p < 0,05$.

4. TARTIŞMA

Tez kapsamında, antikanser ilaç 5-FU ve immünoterapötik molekül IL-2'nin aynı nano boyutlu taşıyıcı sistem ile formülasyonu ve kolon kanseri tedavisindeki etkinliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Kolorektal kanser tedavisinde etkinliği bilinen ancak yan etkileri sebebiyle klinikte kullanımı sınırlı olan 5-FU ve klinik çalışmalarda kolon kanserindeki etkinliği araştırılan IL-2 ile yüklü CD polimeri ile hazırlanan immünokemoterapötik CD nanoplekslerin farelerde kolon kanseri tedavisinde güvenli ve etkili olduğu bulunmuştur.

5.1. 5-FU ve IL-2 Yüklü CD Nanoplekslerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Tezde kullanılan antikanser molekül 5-FU, kolon kanseri tedavisinde kullanılan kemoterapötiklerden biridir, ancak tümör bölgesine ulaşan 5-FU miktarının düşük olması ve mevcut toksisitesi nedeniyle kullanımı sınırlıdır [62, 222]. Literatürdeki çalışmalar, 5-FU'nun nanopartiküler sistemler yoluyla taşınmasının toksisitesini azalttığını ve etkinliğini arttırdığını göstermiştir [54, 222-224].

Tezdeki immün terapötik molekül olan IL-2 ise ilk olarak 1976'da T hücresi büyüme faktörü olarak tanımlanmıştır. IL-2, mitojenle aktive olan insan T hücrelerinin süpernatantında bulunur ve burada T hücrelerinin *in vitro* büyümesini ve çoğalmasını desteklemede önemli bir rol oynar. Literatürde de bildirildiği gibi, IL-2'nin kolorektal kanserde antitümör etkinliği söz konusudur ve bu nedenle etkinliği değerlendirilmeye devam edilen kolon kanseri tedavi ajanları arasında umut verici yaklaşım olarak kabul edilmiştir [225]. Kolon kanserinde, kanser hücreleri ve stromal fibroblastlar, malignitelerin çoğundan sorumlu olan “stromal reaksiyon” adı verilen mekanizma ile submukozal dokuya infiltre olmaktadır. Kanser bağışıklığının histolojik sınıflandırmasına dayanarak, dışlanmış tip kolon kanserleri araştırılmıştır. Bu tipte, T-hücre aktivasyonunun ve kanser hücrelerine penetrasyonun inhibitör faktörler ve kompleks kanser vaskülarizasyonu gibi birçok faktör ile engellenebildiği bulunmuştur [226]. Bu koşullarda, IL-2, T hücresi aktivasyonunu uyarmak için önemli bir faktördür. Tümör infiltre edici lenfositler ve kimerik antijen reseptör tedavileri gibi *ex vivo* genişletilmiş otolog T hücrelerinin adaptif transferinde, lenfoma ve lösemide

yüksek doz IL-2 kullanımının gerekli olduğu gösterilmiştir. Etkinliği artırmak ve yan etkileri en aza indirmek için yüksek doz ve düşük doz IL-2 kullanımı ile ilgili klinik çalışmalar farklı kanserlerde devam etmektedir [110, 227].

Kolon kanseri tedavisi amacıyla 5-FU ve IL-2 yüklü farklı katyonik CD polimerleri kullanılarak nanopleks sistemler hazırlanmıştır.

5.1.1. Partikül Büyüklüğü Dağılımı ile Yüzey Yükü Tayini

Nanopleks hazırlama genel olarak ekleme, vorteks ile karıştırma, oda ısısında inkübasyon gibi basamakları içermektedir ve bu basamakların literatürde çalışmalarda farklı sürelerde uygulandığı görülmektedir. Ayrıca etkin madde taşıyan nanoplekslerdeki önemli bir parametre de +/- yük oranı, bilimsel kaynaklarda molar oran veya ağırlık oranı olarak tanımlanmaktadır. Gen ve protein taşıyan sistemlerde daha yüksek oransal farka sahip sistemler hazırlanmıştır [228-230].

CycloLab'tan alınan 3 CD polimeri ve STPP ile hazırlanan nanoplekslerde 120-190 nm aralığında nanopleksler hazırlanmış ve bu boyutların nanopleks tanımından daha yüksek boyuta sahip olması sebebiyle daha iyi sonuç alınabilecek ek parametreler için literatür araştırması yapılmıştır. Literatürdeki çalışmalara bakıldığında nanopleks yapılarının yüksek hacimlerde de hazırlandığı görülmüştür [181, 231, 232] ve çalışmamızda nanopleks son hacminde iki kat artış yapılmıştır. Ancak etkin maddelerle çalışma sırasında yapının değişecek olması (özellikle IL-2 için) düşünülerek etkin madde ile hazırlanan nanopleksler hazırlandığında partikül büyüklüğü ve dağılımı bilgileri ile bu ön çalışma bilgisinin değerlendirilmesi planlanmıştır.

STPP'nin, IL-2'nin ve 5-FU'nun molekül ağırlıklarının birbirinden çok farklı olması nedeniyle ön çalışmaların bu aşamada sonlandırılarak, pozitif yüzey yüküne sahip CD polimerleriyle tezde bulunan etkin maddelerden IL-2 ile nanopleks formülasyonları hazırlanmıştır. Literatür temel alınarak +/- ağırlık oranında nanopleksler hazırlanmıştır [85]. Hazırlanan IL-2 yüklü CD nanoplekslere filtrasyon işleminin partikül büyüklüğü ve dağılımına etkisi değerlendirilmiştir. İşlem sonrasında partikül boyutu azalsa da dağılımının arttığı belirlenmiştir. Bu durum yapının filtrasyon sırasında bozularak parçalandığı şeklinde yorumlanmıştır. Bu sebeple nihai formülasyonda filtrasyon işlemi uygulanmamıştır.

Elde edilen bu sonuçlar da göz önüne alınarak, literatür temelinde polimer: ilaç oranları belirlenmiştir [57, 85]. Sonrasında CD nanopleksleri, temel kompleksleştirme prosedürleriyle hazırlanmıştır [192, 193]. İki farklı aktif madde taşıyan nanopleks formülasyonları, 10:1 (a/a) CD:5-FU oranı ve 25.000:1 (a/a) CD:IL-2 oranı ile hazırlanmıştır [57, 85].

Ön formülasyon çalışmaları sonucu elde edilen bulgular doğrultusunda hazırlanan nanopleks formülasyonlarının ortalama partikül büyüklüğü ile dağılımı ve zeta potansiyel değerleri belirlenmiştir. Tablo 4.7. ile gösterildiği gibi 5-FU ve IL-2 yüklü CD nanoplekslerin partikül büyüklükleri $43,4 \pm 15,4$ ile $91,3 \pm 14,7$ nm arasında değişmektedir. Nano boyutlu taşıyıcı sistemlerin partikül boyutu ve dağılımını belirlemek için, FDA'ya sunulan raporlarda lazer saçılma teknikleri (örneğin DLS) ve elektron mikroskobu (EM) yöntemleri yaygın olarak kullanılmıştır. DLS, stabilite tespiti için ön aşamalarda uygun bir yöntemdir ve tez kapsamında formülasyonların karakterizasyonu için kullanılan ilk yöntemdir.

Bilindiği gibi nanopartiküler sistemlerin partikül büyüklüğü, nanopartiküllerin kararlılığı ve biyolojik dağılımında oldukça önemli bir parametredir. Ayrıca nanopartiküler sistemlerin biyolojik membranlar ile etkileşiminde partikül boyutu önemli rol oynamaktadır [233]. Nanopartiküler sistemler, ilacı pasif ve aktif hedefleme olmak üzere iki mekanizma ile hedef dokuya ulaştırabilmektedir. Tümör gelişimi ve farklılaşması devam eden dinamik bir süreç olup tümör mikroçevresi çok sayıda hücre ve molekülden oluşmaktadır. Bu karmaşık fizyolojik ortam içinde nanopartiküler sistemler, ilaçların boyut ve şekil olarak ayarlanabilmesi, tümör bölgesinde daha fazla miktarda birikmesi ve uzun süreli salınması gibi bazı avantajlar sunmaktadır [234]. Pasif hedefleme, artmış geçirgenlik ve tutulma (EPR) etkisi adı verilen tümörün doğal fizyolojisinden faydalanan ve nano boyutlu taşıyıcı sistemlerin partikül büyüklüğüne dayanan hedefleme stratejisidir [235]. EPR etkisinden faydalanan ve retiküloendotelial sistemden kaçmak için nanopartiküllerin tümör tipine bağlı olarak ortalama 200-300 nm'nin altında ve 10 nm'nin üstünde partikül boyutuna sahip olmaları gerekmektedir [236]. Bu bilgiler doğrultusunda tez kapsamında hazırlanan nanopleks sistemlerin pasif hedeflendirmeden faydalanan için uygun partikül büyüklüğü değerine sahip olduğu söylenebilir.

PDI ise bir dağılımın düzensizliğinin derecesini tanımlamak için kullanılan bir terimdir ve ölçümler sırasında kullanılan Malvern Zetasizer cihazına göre 0 ile 1 arasında bir değerdir. 0,7'den düşük PDI değeri, nanopartiküller ve kolloidal sistemler için kabul edilebilir değerlerdir. Farklı boyut dağılım algoritmalarının, iki uç PDI değeri (0,05–0,7) arasında kalan verilerle çalıştığı bilinmektedir [237]. Tez kapsamında hazırlanan nanoplekslerin oluşumu yalnızca zıt yüklü makromoleküler bileşenlerin (yani katyonik CD polimeri ve IL-2) ile 5-FU'nun yük etkileşimine dayanmaktadır. Bu nanoplekslerin hazırlanmasında hiçbir organik çözücü, stabilizatör ve yüzey aktif madde kullanılmamış, polimerin homojen küresel nanoagregatlar ile sonuçlanması için çökelebileceği bir ara yüzey oluşumu tamamen önlenmiştir. PDI, hazırlanan nanopartikül dispersiyonu içindeki nanopartiküllerin ortalama boyuta olan uzaklığını belirlemek için kullanılan bir değerdir. Bu çalışmada 100 nm'nin altında nanoplekslerin hazırlanması amaçlanmış ve bu hedefe ulaşılmıştır. Tez kapsamında hazırlanan 5FU/IL2/CD nanoplekslerin PDI değerlerinin 0,5 ile 0,7 arasında olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.7.). Nanopleksler farklı yüzey yüklerinin etkileşimi sonrası oluşan nano boyutlu taşıyıcı sistemler olduğundan formülasyon sırasında yapıya katılan farklı yüklerin oranı partikül büyüklüğü ve PDI gibi parametrelerde önemli değişikliklere yol açmaktadır [238]. Nanoplekslerde yapıya eklenen moleküller (örneğin hedeflenen ajanlar, ilaçlar ve polimerler) arttıkça ve bu moleküllerin moleküler ağırlığı arttıkça PDI değerinin arttığı bilinmektedir. Örneğin, Yang ve ark. karaciğer kanseri hücrelerinin reseptörünü hedefleyen laktobinoik asit konjuge PEG ile doksorubisin yüklü β CD nanokompleksleri tasarlamışlardır. Hazırlanan nanoplekslerin 68 nm partikül büyüklüğüne ve 0,42 PDI değerine sahip olduğunu belirtmişlerdir [164]. Bir başka çalışmada ise, kurkumin yüklü negatif yüzey yüküne sahip çapraz bağlı β CD ile kitosanın 37°C'de karıştırılmasıyla nanokompleksler hazırlanmıştır. Nanokomplekslerin 300 nm'nin üzerinde partikül boyutuna ve yaklaşık 0,4 PDI değerine sahip olduğu belirlenmiştir [163]. Antibiyotik yüklü dekstran nanopleks sistemlerinde ise partikül boyutlarının 80 ile 550 nm arasında değiştiği ve polidispersite değerinin 0,5 olduğu belirtilmiştir [182, 239, 240]. Tez kapsamında CD polimerleri ile IL-2 ve 5-FU birlikte kullanılmıştır. IL-2 ve 5-FU, kovalent olarak bağlanmamış sadece elektrostatik etkileşime dayalı olarak nanopleks yapısını

oluşturmuştur. Elde edilen 5-FU ve IL-2 yüklü CD nanoplekslerinin partikül boyutu ve PDI değerleri, literatür çalışmaları ile uyumlu olduğu gözlenmiştir.

Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin yüzey yükleri hakkında bilgi veren zeta potansiyel değeri, nanopartiküllerde stabilite, biyolojik membranlarla etkileşim, opsonizasyon ve biyodağılım gibi birçok özelliği doğrudan etkileyen bir parametredir. Nanoplekslerin oluşumu temel olarak farklı yüzey yüküne sahip polimer/polimerler ile ilaçlar arasındaki elektrostatik etkileşime dayanmaktadır [241]. Tez kapsamında kullanılan etkin maddeler 5-FU ve IL-2'nin negatif yüke sahip olmaları nedeniyle çalışma kapsamında katyonik CD türevleri kullanılmıştır. Ayrıca yüzey yükünün biyolojik membranlarla etkileşiminde doğrudan rol oynadığı da bilinmektedir. Araştırma grubumuzda yapılan bir çalışmada, kamptotesin yüklü polikasyonik CD nanopartiküllerin kolorektal tümörlerin tedavisinde negatif yüklü nanopartiküllere göre etkin bir tedavi olanağı sunduğu gözlenmiştir [161]. Yüzey yükünün bir indikatörü olan zeta potansiyel değerinin katyonik ve anyonik olarak sınıflandırılmasına dair literatürde farklı görüşler yer almaktadır. Bir yayında; $\geq +10$ mV pozitif yüklü ve ≤ -10 mV negatif yüzey yüklü olarak tanımlanmaktadır [242]. Başka bir çalışmada ise; +25 mV zeta potansiyele sahip nanopartikül pozitif yüklü olarak sınıflandırılırken, +42 mV değeri yüksek pozitif yüklü nanopartikül olarak sınıflandırılmıştır [243, 244]. Bu bilgiler doğrultusunda tez kapsamında kullanılan CD türevlerinin ve hazırlanan nanoplekslerin pozitif yüzey yüküne sahip olduğu gözlenmiştir (Tablo 4.7.).

5.1.2. Morfolojik Özelliklerin Belirlenmesi

Hazırlanan nanoplekslerin sıvı haldeki SEM görüntüleri Şekil 4.8.-4.10.'da görüldüğü gibi elde edilmiştir. Nanopleks formülasyonlarının farklı ölçeklerdeki SEM görüntüleri sunulmuştur (500 nm, 2- 5- 20 μ m). Bilindiği gibi SEM, yüksek enerjili bir elektron ışını ile görüntülenecek numunenin yüzeyini tarayarak görüntü almaktadır. Bu elektron bombardımanı, oligosakkarit türevi olan siklodekstrinlerin yapılarında bozulmaya neden olur. Benzer erime ve bulanık görüntüleme, kitosan gibi diğer polisakkaritlerde de olabilir. Görüntüleme sırasında bu sebeple olduğu düşünülen CD yapısında bozulmalar gözleniş ve hedef parçacıklara daha yüksek büyütme ile yaklaşıldığında nanopleks yapısı kaybolmuş, görüntü elde edilememiştir.

Sunulan görüntülerde, CD2 ve CD7 nanoplekslerinin ortalama partikül büyüklüğü 100 nm, CD8 nanoplekslerde ise 300 nm'nin üzerinde olduğu gözlenmiştir. Literatürde örneklerin liyofilize toz haline getirilmesinden sonra yapılan iki çalışmada, dekstran sülfat ile hazırlanan vankomisin nanoplekslerinin köşeli, kurkumin yüklü kitosan nanoplekslerinin ise küresel olduğu belirtilmiştir [180, 181]. 5-FU yüklü kitosan nanoplekslerinin morfolojik olarak CD7 ve CD8 nanopleksleri gibi küresel veya CD2 nanopleksleri gibi köşeli olduğu literatürde yer almaktadır [55, 57, 200]. Bu görüntüler, geniş PDI dağılımı ile değerlendirildiğinde DLS ölçümlerinin sonuçlarını doğrulamıştır. Her iki sonuç, pasif hedefleme ile EPR etkisinden yararlanan nanopartiküler sistemin hedef dokuya rediküloendotelyal sistemden kaçarak taşınabileceğini göstermektedir.

5.1.3. FTIR ve DSC Analizi

FTIR analizinde; CD polimer ve nanoplekslerin bantlarında benzerlikler görülürken, bant yoğunluklarının farklı olması, bantlardaki kaymalar ve 5-FU piklerinin kaybolması yeni bağların oluştuğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, 5-FU'nun CD polimerleri ile etkileşime girerek başarılı bir şekilde nanoplekslere enkapsüle edildiğini göstermektedir [134, 217, 245]. DSC analizinde de 5-FU'ya ait erime pikinin nanoplekslerde oluşmadığı gözlenmiş ve 5-FU'nun nanopleks içerisine kapsüllendiği gösterilmiştir [217, 218].

5.1.4. CD Polimer ve IL-2 Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Tezde kullanılan immünoterapötik molekül IL-2'nin *in vivo* çalışmalarda uygulanması gereken uygun dozun bulunması amacıyla ilk olarak splenositlerde yapılan *in vitro* çalışma ile artan IL-2 miktarına göre çoğalan hücre oranı belirlenmiştir (Şekil 4.14.). Bu çalışma ile formülasyonlarda bulunması gereken IL-2 miktarının 20 U olması gerektiğine karar verilmiştir. Belirlenen bu yeni IL-2 miktarını sağlamak için formülasyonlar yeni oranlarda CD polimerler ve IL-2 ile hazırlanmıştır. Hazırlanan formülasyonların *in vitro* karakterizasyonları yapılmış ve partikül büyüklüğü, dağılımı ve zeta potansiyel değerleri açısından yukarıda tartışılan bilgiler doğrultusunda hedeflenen aralıkta oldukları belirlenmiştir (Tablo 4.9.).

5.1.5. 5-FU ve IL-2 Yüklü CD Nanoplekslerin Kısa Süreli Stabilite Çalışması

Stabilite, farmasötik ürünlerin kalitesini tanımlamak için temel bir parametredir. Nanopartiküler sistemlerde kararlılık, agregasyon, kristallik, şekil, boyut ve yüzey özelliklerini içerir [246]. Ayrıca, tümörde pozitif yüzey yüküne sahip sterik olarak stabilize edilmiş nanopartiküllerin birikimi artar ve hücredeki ECM bileşenlerine bağlanarak atılımları azalır [247]. 5FU/IL2/CD nanoplekslerinin sudaki fiziksel bütünlüğü gösterilmiştir. Nanopleksler, herhangi bir seyreltme olmaksızın bir hafta boyunca kendi ortamlarında (ultra saf su) stabil kalmıştır. Yapılan bir çalışmada, hyaluronik asit (HA) ve protamin yüklü nanopleksler iki hafta boyunca stabil kalırken, sonraki dört hafta boyunca yapı kendi içinde yeniden organize olmuştur [248]. Başka bir çalışmada, karagenan ve protamin yüklü nanoplekslerin ortamlarında oda sıcaklığında 24 saat stabil olduğu bulunmuştur [249]. Çalışmamızda, nanoplekslerin ortamında renk değişimi ve mor-siyah agregat oluşumu gözlemlendiği için deneylerimiz bir haftada sonlandırılmıştır. 5-FU'nun yapısal bozunmasının bundan sorumlu olması muhtemeldir.

PBS'de ise, CD2 ve CD7 nanoplekslerinin, CD8 nanoplekslerinden daha kararlı olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte, iyonik ortam, CD polimer katyonik gruplarının protonasyonu yoluyla nanoplekslerin bozulmasına yol açtığı ve nanoplekslerin yapısal homojenliğini etkilediğinden, tüm nanoplekslerin SGF'de kararsız olduğu gözlemlenmiştir. Dul ve ark. tarafından yürütülen bir çalışmada, nanopleksler, PBS ve 0,01 M HCl ortamında agregasyon nedeniyle kararsız bulunmuştur [249]. Çalışmamızda CD7 ve CD8 nanopleksleri için benzer agregasyonlar tespit edilmiştir. Suda olduğu gibi, tüm 5FU/IL2/CD nanopleksleri SIF ve SCoF'de iyi stabilite göstermiştir. DMEM'de farklı enzimler ve elektrostatik moleküller baz alınarak nanoplekslerin partikül büyüklükleri başlangıç değerlerinden daha küçük ölçülmüştür. Tüm nanopleksler için partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değerleri göz önüne alındığında, en kararlı saklama ortamı su olmuştur.

5.1.6. Nanopleks Yapısındaki IL-2'nin Biyolojik Aktivitesinin ve Yapısal Bütünlüğünün Belirlenmesi

Formülasyon hazırlama sonrasında nanopleks yapısındaki IL-2'nin yapısal bütünlüğünün ve biyolojik aktivitesinin varlığı belirlenmiştir. IL-2'nin biyolojik etkinlik çalışmasında, serbest IL-2 çözeltisi ile karşılaştırıldığında nanopleks yapısındaki IL-2'nin biyolojik aktivitesinin azalmadığı görülmüştür (Şekil 4.15.). IL-2'nin yapısal bütünlüğü ise SDS-PAGE analizi ile belirlenmiştir [197]. Proteinlerin analizi açısından oldukça güçlü bir yöntem olan SDS-PAGE bir elektroforez tekniğidir. Bu yöntemde tayin edilecek moleküller SDS ile kaplandığından yüzey yükleri tamamen negatif olmaktadır. Bu sayede yürütme jelinde moleküller yüzey yüklerinden bağımsız olarak sadece moleküler ağırlıkları sayesinde ilerleyebilmektedirler. Bu şartlarda yapılan çalışmada, nanopleks formülasyonlarından salınan IL-2 örnekleri ve IL-2 çözeltisi için ayırt edilebilir spesifik bant gösterilmiştir (Şekil 4.16.). Bantlar, IL-2 moleküler ağırlığının 3 katına karşılık gelen yaklaşık 52 kDa'da gözlenmiş ve IL-2'nin üçlü yapıda olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, IL-2'nin yapısal bütünlüğünün, nanoplekslerin hazırlanma sürecinden olumsuz etkilenmediği söylenebilir. Yapısal bütünlüğünü koruyan IL-2'lerin biyolojik aktivitelerini de ayrıca tayin etmek gerekmektedir. Proteinler, yapılarının yanı sıra konformasyonları sayesinde görevlerini yerine getirebilirler. SDS-PAGE analizinde, SDS proteinleri denatüre eder ve bu nedenle bütün proteinler benzer yapı gösterirler.

5.1.7. Yükleme Etkinliğinin Belirlenmesi

Geleneksel olarak, ilaç taşıyıcı sistemlerde yükleme etkinliği ve enkapsülasyonu ölçmek için yüklenmemiş serbest ilaç ilk önce ultrafiltrasyon, ultrasantrifüj, diyaliz veya katı faz ekstraksiyonu kullanılarak nano boyutlu taşıyıcılardan ayrılır. Yüklenmemiş ilaç miktarı daha sonra ölçülebilir ve başlangıçta eklenen ilaç miktarı veya direkt yöntemle ölçülen toplam bağlı ilaç miktarı ile karşılaştırılabilir, bu da ilacın yüzde olarak yükleme etkinliğini verir [250]. Çalışmamızda santrifüj ve filtrasyonun kullanıldığı literatür yöntemi baz alınmıştır. CD nanopleks formülasyonlarının yükleme etkinliği 5-FU için %39,8-%41, IL-2 için de yaklaşık %99 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.16. ve 4.17.). 5-FU için elde edilen bu değer referans alındığında nanopleks içerisindeki 5-FU miktarı 0.61 μ M olarak

hesaplanmaktadır (M_A 5-FU= 130.08 g/mol). Hidrofilik ilaçların yüklenmesi (LE) ve kapsülleme etkinliği (EE), sulu fazda hızla çözündükleri için genellikle hidrofobik ilaçlardan daha düşük gözlenmektedir [251]. Bazı antikanser ilaçları nikotinamid, doksorubisin ve 5-FU yüklü nanopartiküllerin %35 ile 55 arasında değişen düşük EE değerleri gösterilmiştir. Nikotinamid yüklü katı lipid nanopartiküller için bu değer %36'dır [251]. Yük etkileşimine dayalı nanopartiküler sistemler araştırıldığında; örneğin Sun ve ark. 1:1 kütle oranında iyonik jelasyon yöntemini kullanarak 5-FU yüklü kitosan nanopartiküller hazırlamışlardır. EE %44,2 olarak hesaplanmıştır [200]. Kombine bir sistemde, kurkumin ve 5-FU yüklü kitosan bazlı nanopartiküller, Anitha ve arkadaşları tarafından kolon kanseri tedavisinde *in vitro* olarak etkinliği ve *in vivo* olarak biyoyararlanımı araştırmak için hazırlanmıştır [55]. Bu sistemde iyonik çapraz bağlama yöntemi ve 1:5 ağırlık oranı kullanılmıştır. Sonuç olarak %48 EE ile antikanser etkisini ve biyoyararlanımı arttırdığı bulunmuştur. Başka bir çalışmada, doksorubisin ve 5-FU (10:1 Kitosan:5-FU ağırlık oranı) ile yüklenen kitosan bazlı nanokompleksler iyonik etkileşim ile oluşturulmuştur. Bu çalışmada EE, doksorubisin için %44 ve 5-FU için %55 bulunmuştur [57].

IL-2 yüklü nanopartiküller ile yapılan bir çalışmada, paklitaksel ile kombine tedavi yaklaşımı ile poli(laktik-ko-glikolik asit) polimer kullanılarak termosünger nanopartiküller hazırlanmıştır. IL-2'nin nanopartiküllerdeki EE değeri %68 olarak bulunmuştur [117]. Farklı bir polimer kullanılarak IL-2 ve TGF- β içeren nanolipozom hazırlanmış ve IL-2'nin EE %80 bulunmuştur [113]. Kombine terapi yaklaşımı ile hazırlanan başka bir sistemde IL-2 ve doksorubisin yüklü polikarbonat bazlı nanoveziküller hazırlanmış ve IL-2 EE %92,4 olarak ölçülmüştür [105]. Literatür bilgileri ışığında, bu çalışmada hazırlanan nanoplekslerde IL-2'nin daha yüksek EE değeri (%99,8'in üzerinde) kaydedilmiştir. Tamamının yüklendiğini düşünürsek, nanopleks içerisindeki IL-2 miktarının yaklaşık 4.65 nM olduğu hesaplanmaktadır (M_A IL-2= 17,2 kDa). Nanopleks sistemi içerisinde yüksek oranda IL-2'nin taşınabildiği gösterilerek, *in vivo* çalışmalarda artan etkinlik sağlanacağı düşünülmektedir.

5.1.8. *In vitro* İlaç Salım Çalışmaları

Nanopartiküllerin *in vitro* salım profilleri, matematiksel modeller kullanılarak *in vivo* salım kinetiğinin öngörülmesi ve ayrıca sistemlerin hedeflenen kaliteyi sağlaması için yapılan çalışmalardandır. Formülasyonlar arası farkın değerlendirilmesini sağlarken, *in vivo*da var olan pek çok faktörün yansıtılamaması nedeniyle sadece kalitenin değerlendirilmesinde salım çalışmaları kullanılmaktadır [252, 253]. Salım çalışmalarıyla ilgili herhangi bir düzenleyici standart bulunmamakla birlikte, sürekli akış, diyaliz membranı ve numune ve ayırım yöntemleri olmak üzere üç yöntem nanopartiküllerin salım profillerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır [254]. Bu çalışmada 5-FU yüklü nanopartiküllerde yaygın olarak çalışıldığı için diyaliz membran yöntemi seçilmiştir. Literatürde 5-FU ile yük etkileşimine dayalı olarak hazırlanan farklı nanokompleksler ve nanopartiküller üzerine çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin Sun ve ark. tarafından hazırlanan 5-FU yüklü kitosan nanopartikülleri ile PBS (pH 7.4) ortamında yapılan salım çalışmalarında 42 dakika içerisinde salım %76 olurken, 8 saat sonunda bu oran %80'de kalmıştır [200]. Ayrıca, kombine kemoterapi yaklaşımı olarak hazırlanan doksorubisin ve 5-FU yüklü kitosan-polilaktik asit bazlı nanokomplekslerin PBS'de salımının 24 saatte %40, 72 saatte ise %80'e ulaştığı bulunmuştur. Tez kapsamında hazırlanan 5-FU ve IL-2 yüklü CD nanoplekslerinden 5-FU salımı, simüle sıvılarda ve PBS'de (pH 7.4) 8. saatte %80 tamamlanmış ve 12. saatin sonunda salım profili platoya ulaşmıştır.

IL-2 salımına bakıldığında, *in vitro* olarak yapılan salım çalışmaları azdır ve bu çalışmalarda santrifüj tüplerinde salım planı tercih edilmektedir. Diyaliz membran, IL-2'nin moleküler ağırlığından daha küçük moleküler por açıklık değerine sahip olduğundan uygun değildir. Literatürde santrifüj tüpleri ile yapılan çalışmalara bir örnek vermek gerekirse, paklitaksel ve IL-2 yüklü termosünger nanopartiküller, IL-2'nin %60'ı PBS'de 4 günde salınmıştır (pH 7.4) [117]. Ayrıca doksorubisin ve IL-2 yüklü nanoveziküller hazırlanmış ve PBS'de (pH 7.4) salım çalışmaları sonucunda 24 saat sonunda IL-2'nin %50'si salınmıştır [113]. Çalışmalarımızda 5-FU ve IL-2 yüklü CD nanoplekslerinden IL-2 salınımı PBS'de (pH 7.4) ve simüle sıvılarda %90 oranında tamamlanmıştır. Nanopartiküler sistemlere hedeflenen miktarda etkin madde yüklemenin yanı sıra yüklenen etkin maddenin hedeflenen sürede salınması da tümörlü bölgede tedavi için gerekli ilaç dozunun sağlanması açısından oldukça

önemlidir. Bu nedenle hazırlanan nanopleks sistemlerden hem 5-FU'nun hem de IL-2'nin yüklenen miktarının tamamına yakınının (yaklaşık %90) salındığı gözlenmiştir.

5.2. Hücre Kültürü Çalışmaları

5.2.1. Güvenlilik Çalışması

Tez kapsamında hücre kültürü çalışmaları ile ilk olarak boş CD polimerlerin güvenlilikleri WST-1 ve LDH analiziyle belirlenmiştir. Sırasıyla farklı hücresel mekanizmalara dayanan WST-1 ve LDH analizleri, hücresel membranın hasar görmesi sonucunda mitokondriyal aktiviteyi ve LDH salınımını ölçmektedir [255]. Çalışmalar, kullanılan CD polimerlerinin bu dört dilüsyonunun WST-1 ve LDH sonuçlarıyla, sağlıklı L929 fibroblast hücre hattında %70'in üzerinde canlılığı devam ettirdiği belirlenmiştir. Kullanılan CD polimerlerin, sağlıklı hücrede ciddi toksisiteye sebep olmadığı gözlenmiştir. Elde edilen bu sonuç, devam edecek çalışmalarda üç polimerin de kullanılabileceğini göstermiştir.

5.2.2. Antikanser Etkinlik Çalışması

Etkinlik çalışmalarında kullanılması gereken 5-FU dozunu belirlemek amacıyla, 5-FU çözeltisinin yarı maksimum inhibitör konsantrasyonu (IC_{50}) değeri, CT26 hücrelerinde 24 ve 48 saat inkübasyon süresi sonunda hesaplanmıştır. Bu bulgular doğrultusunda ilerleyen hücre kültürü çalışmalarında formülasyonlardaki ilaç miktarını eşitlemek için polimer çözeltileri ve CD nanopleksleri, aynı 5-FU konsantrasyonuna göre seyreltilmiştir.

İlaç yüklü CD nanoplekslerin antikanser etkinlikleri hem konvansiyonel 2B hem de 3B hücre kültürü çalışmalarıyla belirlenmiştir. 2B hücre kültürü çalışmaları sonuçlarına (Şekil 4.27.) göre 5-FU ve IL-2 yüklü CD2 ve CD7 nanopleks formülasyonlarının 5-FU çözeltisinden daha yüksek sitotoksik etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. İlaç yüklü nanopartiküller, serbest ilaç çözeltilerine kıyasla daha yüksek ilaç alımına ve hücreler arası dağıtımına dayalı olarak daha yüksek sitotoksisiteye sahip olabilmektedir [222]. Öte yandan, CD2 polimer çözeltisi tek başına CT26 hücreleri üzerinde toksik etkiye sahiptir. Kanser hücrelerinin sağlıklı hücrelere göre farklı hücre zarına sahip olduğu bilinmektedir. Farklılıklardan biri, membran lipitlerinin

bileşimidir. Kolesterol hücre zarının sertliğinden sorumludur ve kolesterol seviyesi hücreden hücreye değişmektedir. Siklodekstrinler, kolesterolü hücre zarından uzaklaştırmaya dayalı sitotoksik etkiye sahip olabilir [256]. Ayrıca klinikte metil- β -CD hücre ölümünü indüklemek ve hücre zarı kolesterolünü düzenleyerek göçü azaltmak için kullanılmaktadır. Ek olarak, kanserde ilaç direnci, tedavide etkisizliğe neden olmakta ve direncin üstesinden gelmek için birçok farklı terapötik yaklaşım üzerine çalışılmaktadır. Bu yaklaşımlardan biri, dirençli kanser hücrelerinde membran kolesterolünün yüksek olması nedeniyle bu kolesterol seviyesinin düşürülmesidir. Bu amaçla kolesterolü tüketerek direnci azaltmak için metformin veya metil- β -CD uygulanmaktadır [157]. CD2 polimerinin sitotoksik etkisinin benzer kolesterol tükenme mekanizmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Aksine, CD8 polimeri için bu mekanizma geçerli olmamıştır, bunun nedeninin yapısal farklılıklar olabileceği sonucuna varılmıştır. CD7 polimeri ise sitotoksik etki olarak bu polimerlerin arasında olarak değerlendirilmiştir. 5-FU ve IL-2'nin nanopleks içinde CD7 polimeri ile verilmesi, 5-FU çözeltisinin üzerinde kanser hücre canlılığını azaltmıştır. Durum CD8 nanopleksleri için geçerli olmamıştır. Polimerin ek etkisi ile CD2 nanoplekslerinde 5-FU çözeltisinin aşıldığı gözlenmiştir.

CD2 polimerinin sitotoksik etkisinin bir nedeni de CD polimer içeriği olabilir. CT26 hücrelerine uygulanan 0,119 mg/mL ve L929 hücrelerine uygulanan 0,062 mg/mL'dir. CD2 dozu arasında yaklaşık iki kat fark vardır. Öte yandan; CD8 polimeri guanidino- β -CD polimeridir ve guanidino grubuna dayalı polimerlerin antimikrobiyal aktivitelerinin bu grup sayesinde lipid membranla elektrostatik etkileşim aracılığıyla membran hasarına sebep olmalarına dayandığı gösterilmiştir [257]. CD7 polimeri, amino- β -CD polimeridir ve amino grubunun kolesterolün -OH gruplarıyla H bağları oluşturduğu bilinmektedir [258]. CD2 polimeri ise kuaterner amonyum- β -CD polimeridir ve kuaterner amonyum grupları daha katyonik yapılarından dolayı yüzey aktif madde benzeri aktiviteye sahiptir. Örneğin benzalkonyum klorür yapısında kuaterner amonyum içerir ve farmasötik ürünlerde güçlü bir antimikrobiyal koruyucu olarak kullanılır [259]. Polimerler arasında yapısal farklılıklar ve CD2 polimerinin kuaterner amonyum içermesi bu sitotoksik etkinin bir diğer nedeni olabilir.

5.2.3. Hücre Proliferasyonu ve Gerçek Zamanlı Hücre Canlılığı Analizi

Gerçek zamanlı hücre canlılığı analizi, etkin maddelerin hücreler üzerindeki zamana bağlı etkisini değerlendirerek uygun konsantrasyon, uygun tedavi süresinin gerçek zamanlı olarak belirlenmesinde kullanılmaktadır. 2B hücre kültürü çalışmaları sonucunda elde edilen verilerle hesaplanan 5-FU'nun CT26 hücrelerindeki IC₅₀ dozu ile gerçek zamanlı hücre canlılığı analizi gerçekleştirilmiştir. Tez kapsamında yapılan gerçek zamanlı hücre proliferasyonu sonuçlarına bakıldığında, her 3 CD türevi ile hazırlanan nanoplekslerin 48. ve 72. saat sonunda kontrol grubuna göre hücre proliferasyonunun anlamlı ölçüde azalttığı gözlenmiştir. Ancak nanopleks formülasyonları 5-FU içeren çözeltilerle karşılaştırıldığında anlamlı fark gözlenmemiştir (Şekil 4.29.). Duplikasyon verileri de değerlendirildiğinde tüm CD nanoplekslerin etkililiği konvansiyonel hücre kültürü verilerinin yanı sıra gerçek zamanlı hücre canlılığı ile de gösterilmiştir. Literatürle uyumlu olarak nanopartiküler sistemin serbest ilaç çözeltilisine göre daha etkili olduğu ve elde edilen verilerin WST-1 sonuçları ile orantılı olduğu kanıtlanmıştır [260, 261].

5.2.4. 3B *In Vitro* Tümör Modeli

Konvansiyonel hücre kültürü çalışmalarından sonra formülasyonların etkinlikleri 3B hücre kültürü yönteminde belirlenmiştir. İskele dayalı yöntem ile oluşturulan 3B tümör modelinde literatürle benzer şekilde nekrotik çekirdek, ara tabaka ve proliferasyon bölgeleri gözlenmiştir (Şekil 4.33.). Bu durum tümör modelinin başarılı bir şekilde oluşturulduğunu göstermektedir [262].

3B tümör modelinde antitümoral etkinliğe gelindiğinde ise her 3 CD türevi ile hazırlanan ve ilaç yüklü nanopleks formülasyonlarının serbest ilaç çözeltilisine göre daha fazla hücre ölümüne neden olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.34.). Ancak bulgular konvansiyonel 2B hücre kültürü sonuçları ile karşılaştırıldığında nanoplekslerin hücre proliferasyonundaki etkisinin 3B hücre kültüründe daha az olduğu da gözlenmiştir. *In vitro* 3B küresel sferoidin yapısı göz önünde bulundurulduğunda bu beklenen bir sonuçtur. Konvansiyonel hücre kültürü çalışmalarında hücreler tek tabaka olarak hücre kültür plakalarına ekilmekte ve hücrelerin üzerine uygulanan formülasyonlarla bütün hücrelere muamele etmek mümkündür. Ancak 3B yapı oluştuğunda hücreler kültür kabından ziyade birbirlerine tutunmakta ve katmanlı bir yapı oluşturmaktadırlar. Bu

yapıdan dolayı her hücrenin formülasyona maruz kalma süresi değişmektedir. 3B sferoidlerde iç tabakalarda yer alan hücrelere ulaşmak daha zor olmaktadır. Bu nedenle 3B hücre kültürü çalışmaları *in vivo* modelleri *in vitro* ortamlarda taklit etmek için daha uygun yöntemlerdir. Literatüre bakıldığında, bir çalışmada 5-FU yüklü kitosan nanopartiküllerin etkinliği HCT-116 hücreleri üzerinde değerlendirilmiştir. Nanopartikülün 2B hücre kültüründe 7 μ M 5-FU içeriğinde 5-FU çözeltisine göre istatistiksel olarak etkili olduğu bulunurken 3B modelde 15 μ M 5-FU içeriğinde bu durum gözlenmiştir [61]. Bir başka çalışmada ise 5-FU yüklü PLGA nanopartiküllerin HT-29 sferoid modelinde 5-FU çözeltisine göre daha etkili olduğu belirtilmiştir [60].

5.2.5. Hücrelerde İmmünohistokimyasal İnceleme

In vitro 3B küresel kolon kanseri tümörleri immünohistokimyasal olarak da incelenmiştir. Bu amaçla 3B tümör modeli örnekleri öncelikle CD44 ve IL-2 antikoları ile inkübe edilmiştir. Sonrasında FITC-avidin ve DAPI ile boyama yapılmıştır. DAPI, çift sarmallı DNA'ya seçici olarak bağlanan ve yüksek özgüllüğe sahip güçlü floresan DNA-DAPI kompleksleri oluşturan bir floresan boyadır. Avidin, protein yapıda bir molekül olup biyotine güçlü olarak bağlanmaktadır. Bu bağlanma temel alınarak immün çalışmalar yapılmaktadır. FITC ise proteine afinitesi olan fluoresin izotiyosiyonatın kısa ismidir. Her iki boyamada kontrol gruplarının yeşil floresan vererek daha yoğun işaretlendiği gözlenmiştir. Bu sonuç canlılığın devam ettiğini göstermektedir. 5-FU çözelti ile 5-FU+IL-2 çözeltisi uygulanan grupların ise daha az işaretlendiği, CD7 nanopleksinde ise en az işaretleme gözlenmiştir. 5-FU'nun kolon kanseri hücrelerinde apoptozu indüklediği bilinmektedir. Hücre çekirdeğindeki mavi işaretleme apoptotik bulguları belirtmektedir. 5-FU çözelti grupları ile karşılaştırıldığında CD7 nanopleksin apoptozu daha fazla indüklediği tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada, DC-eksozomlarına 5-FU yüklemesi ile oluşturulan ilaç taşıyıcı sistemin etkinliği CT26 hücrelerinde test edilmiştir. Bizim çalışmamıza benzer şekilde, kontrol grubundaki hücrelerde yaygın ve eşit olarak dağılan mavi floresan sergilenmiştir. Aynı çalışmada 5-FU çözeltisi uygulanan grupta hücre çekirdeğinde mavi parlaklık ve noktalar tespit edilmiş ve apoptotik bulgular doğrulanmıştır. 5-FU yüklü DC-eksozomlarında, 5-FU çözeltisi uygulanan gruba göre hücrelerde apoptozun indüklenme eğiliminin daha fazla olduğu belirlenmiştir [263].

5.2.6. Kanser Nodüllerinde *In Vitro* Olarak TUNEL ile Apoptoz Tayini

Farklı formülasyonlarla inkübe edilen 3B sferoidlerdeki apoptozun varlığı TUNEL yöntemiyle belirlenmiştir. TUNEL, hücre ve dokulardaki apoptoz varlığını DNA seviyesinde göstermektedir. DNA zincir kırıklarının enzimatik süreç içeren işlemlerden sonra floresan boyama ile kalitatif olarak tayini yapılmaktadır. Apoptoz programlanmış hücre ölümüdür, hücrelerin fizyolojik sürecinde ve patolojik olaylarda gerçekleşen doğal bir süreçtir. Tümör hücrelerinin ortadan kaldırılması da bu patolojik süreçlerden biridir. Ticari olarak temin edilen kit ile yapılan deney sonuçlarında ve elde edilen mikroskop görüntülerinde 5-FU'nun tek başına apoptozu indüklediği gözlenmiştir. Kolorektal kanser hücrelerinde 5-FU'nun protein kinaz C ve Kaspaz-9 aktivasyonu yaparak apoptozu indüklediği belirtilmektedir [264]. Kolon kanseri hücreleri ile 2B ve 3B hücre kültürü çalışmalarında yapılan TUNEL analizlerinde 3B örneklerde apoptoz oranlarının daha düşük olduğu gözlenmiştir [265]. Bir başka çalışmada ise 5-FU'nun kolon kanseri hücrelerine girişinin ve etki göstermesinin 3B modelde, 2B modele göre daha fazla dirençle karşılaştığı belirtilmektedir [266]. Galaktozillenmiş kitosanla hazırlanan ve yük etkileşimine dayalı 5-FU yüklü nanopartiküllerin karaciğer hücrelerinde etkinliği değerlendirilmiştir. Yapılan analiz sonucunda, 5-FU çözeltisine göre 5-FU yüklü galaktozillenmiş-kitosan nanopartiküllerin daha fazla apoptoza sebep olduğu bulunmuştur [267]. Tez kapsamında yük etkileşimine dayalı olarak oluşturulan 5-FU ve IL-2 yüklü CD nanoplekslerin CT26 hücreleri ile hazırlanan 3B modelde daha fazla apoptoza yol açtıkları tespit edilmiştir. Nanoplekslerin çok katmanlı 3B yapıya daha iyi penetre olarak etkinliğinin 5-FU çözeltisine göre arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.37.).

5.3. *In vivo* Antitümöral Çalışmalar ve Dokularda Histopatolojik ve İmmünolojik Yanıtın Belirlenmesi

5.3.1. Güvenlilik Çalışması

Tez kapsamında yapılan *in vivo* çalışmalarda ilk olarak sağlıklı farelerde CD polimerlerin güvenlilikleri belirlenmiştir. Elde edilen bulgular Tablo 4.26. ile gösterilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda sadece PBS enjekte edilen farelerle karşılaştırıldığında CD7 polimeri güvenli olarak kabul edilmiş ve ilerleyen

çalışmalarda kullanılan CD polimeri olmuştur. ALT (alanin aminotransferaz) ve AST (aspartat aminotransferaz) karaciğer tarafından üretilen enzimlerdir ve karaciğer hasarının ve toksisitenin belirlenmesinde kullanılan temel enzimlerdir. Sonuçlar değerlendirildiğinde CD2 ve CD8 türevlerinin karaciğer üzerinde hasara neden olabileceği ve toksik olarak değerlendirilebileceği için çalışmalara CD7 türevi ile devam edilmiştir. İlaç taşıyıcı sistemlerin etkililiklerinin yanı sıra güvenliplikleri de değerlendirilmesi gereken en önemli parametredir. Özellikle konvansiyonel kemoterapide karşılaşılan sistemik toksisitenin önüne geçilmek için sıklıkla kullanılan ve araştırılan nanopartiküler taşıyıcı sistemlerin güvenliplikleri önemlidir.

5.3.2. Antitümör Etkinlik alışması

Hayvanlarda indüklenen ve haftalar içerisinde gelişen tümör ile insanda yıllar içerisinde gelişen tümörün yapısal farklılıkları vardır. Hayvan tümörü dış destekli olarak ve kontrolsüz büyüme ile oluşurken, insan tümörü hücresel kaynaklı başlayarak nispeten daha stabil ve uzun sürece yayılan bir yapı sergiler. IL-2 melanoma ve metastatik renal hücre karsinomasında endikedir. Klinik ve klinik öncesinde çözelti formu ve nanopartiküler sistemlere yüklenerek IL-2'nin etkinliği prostat, kolon, meme, karaciğer gibi kanser türlerinde çalışılmaktadır [113-115]. Onaylı bir tedavi rejimi olarak IL-2 ve 5-FU'nun klinikte kullanımı bulunmamaktadır. Bu tezde IL-2 ve 5-FU'nun birlikte nanopartiküller bir taşıyıcı sisteme yüklemenin yanı sıra iki molekülün çözelti formlarının da birlikte kullanılarak kolon kanserindeki etkinliğinin ilk defa belirlenmesi açısından da önem taşımaktadır.

Yüksek doz IL-2 klinikte iv. infüzyon yoluyla $6-7.2 \times 10^5$ IU/kg/doz, 12-15 doz/gün olarak kanserde ve bulaşıcı hastalıkların tedavisinde uygulanmaktadır. 1990'larda melanoma ve metastatik renal hücre karsinomasında yüksek doz kullanımı onaylanmıştır. Yüksek doz IL-2 tedavisinde kılcal sızıntı sendromu, nötrofil fonksiyonunun bozulması pleiotropik etkilere sebep olarak ciddi yan etkiler görülebilmektedir. Ayrıca ishal, ateş / titreme, aritmi, dispne, böbrek fonksiyon bozukluğu dahil olmak üzere tedavi uygulananların %80'den fazlasında istenmeyen etkiye sebep olmaktadır. Düşük doz olarak ise immünsupresan olarak farklı dozlarda kullanımı vardır [108-111, 227].

Tezde uygulanan doz ise; 5000 IU olarak 20 g fareye 84 saat (3,5 gün) şeklindedir. Bu doz başka bir ifade ile 250.000 IU/kg/ 3,5 gündür. Günlük olarak ise 71.428 IU'ya karşılık gelmektedir. Fare ve insan dozları her ne kadar aynı olmasa da sadece rakamsal olarak bakıldığında ve değerlendirildiğinde kliniğe göre günde 15 kez yapılan dozlama burada günde bire düşmektedir.

CD7 polimeri ile hazırlanan nanoplekslerin etkinlikleri fare kolon kanseri modelinde belirlenmiştir. *In vivo* çalışmalarda tedavi grupları ve PBS enjekte edilen kontrol grubu arasında zamana bağlı hayvan ağırlıkları incelendiğinde anlamlı bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.39a.). Ancak CT26 hücreleri ile indüklenen kolon kanseri, hayvanlarda karın içi yaygın tümör oluşumuna neden olmuştur. Karın içi yaygın tümörün hayvanlarda mide üzerinde baskıya neden olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle, hayvan ağırlıklarındaki değişimde hayvanların besin alımının yanı sıra tümör büyüklüğünün de etkisi vardır. Literatürde IL-2'nin monoterapi olarak uygulamasının yer aldığı bir çalışmada CT26 ile indüklenen kolon kanserli farelerde immün yanıt izlenmiştir. IL-2 uygulandığında tümörde CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerinin sayısında PBS uygulanan grupla karşılaştırıldığında anlamlı fark görülmemiştir. Tek başına IL-2 uygulaması terapötik etkinlik olarak PBS'ye göre orta seviyede kalmış, tümör ağırlığında anlamlı fark bulunmamıştır. Morfolojik ve patolojik değişiklikler izlendiğinde ise IL-2 uygulaması sonrasında majör dokularda, kalp-dalak-karaciğer-kaciğer-böbrek, değişiklik saptanmamıştır [268].

Hayvanlardaki tümör büyüklükleri sonuçlarına bakıldığında, 5-FU ve IL-2 yüklü CD7 nanopleks formülasyonunun enjekte edildiği grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.39b.). Sağ kalım sonuçlarında ise 28 günlük takip süresi boyunca, formülasyona IL-2 eklenmesinin sağ kalımı artırdığı gözlenmiştir (Şekil 4.39c.). Kontrol grubu ve 5-FU çözeltisi grubunda, 28 gün sonunda sağ kalım %60 olarak belirlenirken 5-FU+IL-2 çözeltisi %90 ile en yüksek sağ kalımın belirlendiği gruptur. Nanopleks uygulanan grupta ise sağ kalım yaklaşık %80 oranındadır.

In vivo çalışmalarda hayvanlarda tümör odağının yanı sıra karın içi farklı yerlerde dağılmış çok sayıda metastatik odak gözlenmiştir (Şekil 4.40.). Tedavi süresinin sonunda sağ kalımı devam eden hayvanlar kurban edilmiş ve metastaz odakları sayılmıştır. Elde edilen bulgular doğrultusunda, 5-FU+IL-2 yüklü CD7

nanopleks grubunun metastaz odak sayısının diğer gruplara göre en az olduğu ve grup içi birbirleri ile daha yüksek benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında 5-FU/IL2/CD7 nanopleks grubunda metastaz odağı sayısında anlamlı bir azalma olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$).

Şekil 4.43. ve Şekil 4.45. ile tedavi sonrası dalak ve tümör hücrelerinde toplam $CD45^+$ hücrelerindeki $CD11b^+$ hücre oranları gösterilmiştir. $CD45^+$, ortak lökosit belirteci olarak tanımlanır ve immün sistem hücrelerinin yüzdesini gösterir. Tümör yükü olan hayvanlarda, en büyük sekonder lenfoid organ olarak bilinen dalakta baskın miyeloid ($CD11b^+$) popülasyonunun büyük çoğunluğunu miyeloid kökenli baskılayıcı hücrelerden (MKBH) oluştuğu bilinmektedir [269, 270]. Dalaktaki miyeloid hücre yüzdesinde kontrol grubuna göre, 5-FU çözeltisi ve 5FU/IL2/CD7 nanopleks uygulanan gruplarda istatistiksel olarak anlamlı azalma görülürken, iki grup arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p<0,05$). Yani 5-FU ve 5FU/IL2/CD7 nanopleks uygulaması yapılan gruplarda anti-enflamatuvar yanıt baskılanmıştır ancak iki grubun baskılayıcı özelliği değerlendirildiğinde IL-2 ile birlikte nanopleks oluşturulmasının 5-FU'nun etkinliği üzerinde olumsuz bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

Dalak infiltre miyeloid hücre popülasyonuna bakıldığında kontrol grubuna göre diğer gruplarda belirgin bir azalma ve baskın popülasyonun nötrofiller olduğu gözlenmiştir. Tümör içerisindeki $CD8^+$ ve $CD4^+$ T hücreleri popülasyonlarından tümör infiltre $CD8^+$ T hücreleri daha yüksek yüzdeye sahiptir. Bu sonuç doğrultusunda anti-tümör etkinliğin daha fazla olması beklenecektir. Ancak T hücreleri popülasyonlarındaki en büyük yüzdenin hafıza T hücrelerine ait olduğundan anti-tümör yanıtın baskılanıyor olabileceği düşünülmektedir. Hafıza popülasyonu eğer yorulmuş T hücrelerinden oluşuyorsa anti-tümör yanıt için yeniden uyarıma ihtiyaç duyulmaktadır. Bunun için tümör infiltre miyeloid hücre popülasyonlarının etkinliği yüksek önem arz etmektedir.

MLN (mezenterik lenf nodu)'deki uygulanan tedavi grupları arasında ve tedavi grupları kontrol grubu ile kıyaslandığında $CD4^+$ T hücreleri popülasyonları açısından bir farklılık gözlenmemiştir. Gözlenen ve tümör bölgesine drene eden lenf nodunda yüksek olan $CD4^+$ T hücrelerinin popülasyonu, miyeloid hücreler tarafından yeterli düzeyde antijen sunumu ve kostimülasyonla uyarılırsa; salgıladıkları enflamatuvar sitokinler aracılığıyla immün sistemin aktivasyonuna yüksek düzeyde katkıda

bulunabilir. Dalaktaki T hücreleri popülasyonlarına bakıldığında yüzde olarak $CD4^+$ T hücreleri $CD8^+$ T hücrelerinden daha fazladır. Lenfositlerdeki aktivasyon oranına bakıldığında yüksek oranda efektör lenfosit popülasyonu gözlenmektedir. Bu da anti-tümör etkinlikte bir artışa katkıda bulunabilir ancak tümör-infiltrat T hücreleri popülasyonlarındaki efektör yüzdenin düşüklüğü tümöre infiltrat olma kapasitesindeki düşüklüğe veya tümör mikroçevresindeki yüksek düzeydeki baskılayıcı faktörlere bağlı olabilir. Sitokin düzey analizleri sonucunda elde edilen bulgular dahilinde; anti-enflamatuvar sitokinlerin kontrol grubuna göre diğer gruplarda belirgin düzeyde artışı olduğu tespit edilmiştir.

Literatürde bazı kemoterapötiklerin tümör mikroçevresinde pozitif immünojenik etkiye sebep olduğu belirlenmiştir [41]. 5-FU'nun bu bağlamda miyeloid-kökenli baskılayıcı hücrelerin (MDSCs) ortadan kaldırılmasını sağlayarak T hücrelerinin daha aktif olarak kanserle savaşmalarını desteklediği gösterilmiştir [44]. MDSC hücreleri, tümör gelişimi boyunca dalak ve tümör dokusunda birikim gösterirler [45]. Bu hücreler salgıladıkları sitokinlerle anjiyogenez ve tümör hücresi yayılımını uyarmaktadırlar. Melanoma kanserli farelerin 5-FU ile tedavisinde MDSC hücrelerinin azaldığı gözlenmiştir [46]. Bu etkinlik hem *in vitro* olarak hem de kolorektal kanserli farelerde sayısal ve aktivitesinde azalma olarak gösterilmiştir [47]. Tezde, 5-FU'nun MDSC hücreleri üzerine etkisi CT26 hücreleri ile indüklenen kolon kanseri indüklenen farelerin dalak dokusunda miyeloid kökenli hücrelerin azalması olarak gözlenmiştir. IL-2'nin ise immün sistemi uyarımıyla miyeloid ve lenfositleri artırdığı bilinmektedir. Bu artırıcı etki 5-FU+IL-2 çözeltisi ile 5-FU ve IL-2 yüklü CD7 nanoplekste de görülmüştür.

Literatürde bir başka çalışmada ise, 5-FU çözeltisinin etkinliğinin ve buradaki uygulama sayısının CT26 hücreleri ile indüklenen kolon kanseri modelinde etkisi değerlendirilmiştir. Üçüncü uygulamada birinci uygulamaya göre, dalakta $CD44^+$ T hücrelerinin sayısında azalma ve MDSC hücre sayısında artma tespit edilmiştir. NK hücreleri ve $CD45^+$ hücre sayısının değişmediği, PBS uygulanan grupla benzer kaldığı belirlenmiştir. Sitotoksik etkinin ise uygulama sayısı arttıkça yükseldiği bulunmuştur. Bu çalışmada ayrıca, anti-PDL1 ile kombine tedavi uygulanmış ve terapötik etkinin arttığı gösterilmiştir [271].

4.3.3. *In Vivo* Ortama Uygulanmış Kanser Nodüllerinin Histopatolojik İncelemesi

In vivo çalışma sonrası hayvanlarda alınan karaciğer, akciğer ve tümör dokusu örnekleri histopatolojik ve metastaz varlığı açısından değerlendirilmiştir. 5-FU çözeltisi ile 5-FU+IL-2 çözeltisi, CD7 nanopleks ile karşılaştırıldığında karaciğerdeki metastaz alanlarında fark gözlenmemiştir. Akciğerdeki metastazın PBS uygulanan gruba göre CD7 nanopleks formülasyon grubunda daha az olduğu gözlenmiştir ancak 5-FU çözeltilerine göre fark olmadığı bulunmuştur. Primer tümör odaklarına gelindiğinde ise ilaç yüklü CD7 nanopleks formülasyonu uygulanan farelerde 5-FU çözeltisi uygulanan farelere gruba göre istatistiksel olarak daha az odak geliştiği görülmüştür. Bu kapsamda, metastatik aktivite ve nüksün kemoterapi sonrasında kombine tedavilerle önlenebileceğine yönelik literatür çalışmaları bulunmaktadır [272].

Son olarak, tezde yer alan çalışmaların büyük çoğunluğu Covid-19 pandemisi döneminde gerçekleştirilmiştir. Bu sebeple hem madde malzeme temini hem de çalışmaların yapılacağı birimlerdeki önlemler tez sürecini etkilemiştir. Çalışmaların planlanan sürelerde yapılamaması ve sonuçların geç elde edilmesi, bu datalardan çıkacak ön sonuçların değerlendirileceği yeni çalışma planlarının yapılmasını engellemiştir.

Etkin maddelerimizden IL-2'nin ticari olarak temininde miktarının oldukça düşük olması ve maliyetinin yüksekliği çalışmalarda özenli kullanımını getirmiştir. Daha detaylı analizlerin yapılmasını engelleyen bir parametre de bu olmuştur.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kanser kemoterapisi ve immünoterapinin kombine tedavide kullanılması son yıllarda dikkat çeken yaklaşımlardır. Kolon kanserinde, 70'ten fazla immünoterapiye dayalı klinik çalışmanın çoğunda kombinasyon tedavi tercih edilmiştir. Bu tez kapsamında antikanser etkin madde 5-FU ve immünoterapötik molekül IL-2'yi beraber taşıyan CD nanopleksler hazırlanmış *in vitro* karakterizasyon çalışmalarının ardından konvansiyonel ve 3B hücre kültürü çalışmaları ve *in vivo* çalışmalarla etkinlikleri belirlenmiştir.

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda:

- Nanopleks tanımında da geçen ve hedeflenen nano boyut olan 100 nm'nin altında 5-FU ve IL-2 yüklü siklodekstrin nanopleksler hazırlanmıştır.
- Yapılan yapısal analizlerle 5-FU'nun nanopleks içerisine enkapsüle olduğu gösterilmiştir.
- 5-FU ve IL-2 yüklü CD nanopleksler, IL-2'de herhangi bir yapısal değişikliğe maruz kalmadan ve biyolojik aktivite kaybı olmadan başarılı bir şekilde hazırlanmıştır. Pasif hedeflendirmeye uygun fizikokimyasal özelliklere sahip oldukları belirlenmiştir.
- Nano boyutlu ilaç taşıyıcı sistem olan CD nanopleksler, yüzey aktif maddeler vb. ilave edilmeden sadece yük etkileşimine dayalı olarak oluşturulmuştur. Bu sayede formülasyon kaynaklı toksisitenin önüne geçilmiştir.
- Validasyonları gerçekleştirilen analitik yöntemlerle nanopleks içerisine yüklenen etkin maddelerin her birisi için yükleme etkinliği miktarları bulunmuş ve *in vitro* salım çalışmaları yürütülerek etkin maddelerin neredeyse tamamının salındığı gözlenmiştir. Kullanılan CD polimerlerin ve nanopleks yapısının 5-FU ve IL-2 salımını olumsuz etkilemediği sonucuna varılmıştır.
- Her iki etkin maddenin de nanopleks yapısına dahil edilmesinin birbirlerinin yükleme etkinliklerinde olumsuz bir değişikliğe neden olmadığı gözlenmiştir.
- Gerçekleştirilen stabilite çalışmalarında, oral uygulama kapsamında değerlendirilen simüle gastrik sıvıda inkübasyon sonrasında nanoplekslerin partikül büyüklüğü ve dağılımı açısından stabil kalmadığı gözlenmiştir. Bunun sebebinin asidik pH olduğu düşünülmektedir. Ancak salım çalışmalarında

simüle gastrik sıvıda IL-2 miktarı, ELISA kitinde belirlenebilmiştir. Antikor bağlı plakada gerçekleştirilen bu kitte, antikora bağlanan IL-2 bölgesinin zarar görmediği ve böylelikle miktar tayini yapılabildiği sonucuna varılmıştır.

- Sağlıklı fibroblast hücrelerinde yapılan güvenlik çalışmalarında yüksek dozlarda bile CD polimerlerin güvenilir olduğu belirlenmiştir.
- CD nanoplekslerin etkinliğini belirlemek için kolon kanseri hücrelerinde 2B ve 3B hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Hücre yaşayabilirliğinin değerlendirildiği bu çalışmalarda CD2 polimerinin tek başına canlılığı diğer iki polimerden daha fazla azalttığı görülmüştür. CD7 nanoplekslerinde polimer etkisinden bağımsız 5-FU çözeltisine göre artan etkinlik gözlenmiştir.
- 2B ve 3B hücre kültürü çalışmalarının sonuçlarının birbirlerinden farklı olduğu, nano boyutlu ilaç taşıyıcı sistemlerin etkililiklerinin konvansiyonel hücre kültürü çalışmalarına ek olarak 3B hücre kültüründe de değerlendirilmesinin gerekliliği gösterilmiştir.
- Hücre proliferasyonu ve gerçek zamanlı hücre canlılığı analizinde formülasyon uygulanmasından 75 saat sonra kontrol ve 5-FU çözeltisi grubuna kıyasla üç CD nanopleksin de hücre indeksi değerini azalttığı bulunmuştur. Hücre sayısının ikiye katlandığı sürede ise tüm CD nanoplekslerde istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenirken, CD7 nanoplekslerinde bu artışın 5-FU çözeltisi ve diğer ilaç içeren gruplara göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir.
- 3B tümör modelinde uygulanan formülasyonlar sonrası TUNEL ile apoptoz tayini yapılmıştır. CD7 nanoplekslerinin 3B yapının daha derinlerine difüze olduğu ve diğer gruplara göre apoptozun arttığı gözlenmiştir. Bu çalışmalarda elde edilen *in vitro* veriler, CD nanoplekslerinin kombine ilaç taşınımı için uygun olduğunu ve kolon kanseri tedavisi için umut vadettiğini göstermiştir.
- *In vitro* çalışmalarla güvenilir oldukları belirlenen CD polimerlerin güvenlilikleri sağlıklı *in vivo* farelerde belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda CD türevlerinden 2 tanesinin (CD2 ve CD8) karaciğer enzimleri üzerinde anlamlı değişikliğe yol açtığı belirlenmiştir. *In vitro* güvenlik çalışmalarının yanı sıra polimerlerin güvenliliklerinin *in vivo* çalışmalarla da belirlenmesi gerekli olduğu düşünülmektedir.

- Tümör dokusunda miyeloid hücre popülasyonunda kontrol grubuna göre diğer gruplarda azalma gözlenmiştir, fakat nötrofil ve monosit hücre dağılımları gruplar arasında farklılık göstermektedir. İlaç yüklü CD nanopleks ve 5-FU çözelti gruplarında baskın popülasyon kontrolden farklı olarak nötrofillerdir.
- Dalak infiltre miyeloid hücre popülasyonuna bakıldığında kontrol grubuna göre diğer gruplarda belirgin bir azalma ve baskın popülasyonun nötrofiller olduğu tespit edilmiştir.
- Tümörde tüm tedavi gruplarında T hücrelerinin sayısı ve yüzdelerinde istatistiksel olarak fark saptanmamıştır. Bunun için tümör infiltre miyeloid hücre popülasyonlarının etkinliği yüksek önem arz etmektedir.
- MLN'deki gözlemlenen ve beklenildiği üzere yüksek olan CD4⁺T hücreleri popülasyonu, miyeloid hücreler tarafından yeterli düzeyde ko-stimülasyona maruz kalırsa immün sistemin aktivasyonuna yüksek düzeyde katkıda bulunabilir. Ancak gruplar arasında CD4⁺ T hücreleri popülasyonları arasında bir farklılık belirlenmemiştir.
- Sitokin düzey analizleri sonucunda elde edilen bulgular dahilinde; anti-enflamatuvar sitokinlerin kontrol grubuna göre diğer gruplarda belirgin düzeyde artışı olduğu tespit edilmiştir.
- Hayvanlardan alınan kanser dokusu incelendiğinde primer tümör odaklarının 5-FU ve IL-2 yüklü CD7 nanoplekslerinde 5-FU çözeltisi uygulanan ve kontrol grubuna göre daha az olduğu bulunmuştur. Hepatik odak sayısı açısından uygulanan tedaviler arasında fark gözlenmemiştir. Akciğerde ise kontrol grubuna göre daha az sayıda odak 5-FU ve IL-2 yüklü CD7 nanoplekste tespit edilmiştir.

Elde edilen tüm bu sonuçlar, CD polimerlerin iki farklı tedavi yaklaşımı bileşenini bir arada taşıyabilen ve taşıdığı etkin maddelerin biyokimyasal ve fizyolojik özelliklerini kaybetmeden nano boyutlu ilaç taşıyıcı sistemler içinde bulunduğunu göstermiştir. Nanopleks içerisinde immünokemoterapi *in vivo* modelde uygulandığında önemli ölçüde daha düşük metastatik odak sayısı gözlenmiştir. Antikanser aktivite açısından ise, klinikte birlikte onaylı kullanımı bulunmayan 5-FU ve IL-2'nin serbest çözelti formunda da birlikte çalışarak etkin tedavinin sağlandığı

görülmüştür. Bu taşıyıcı sistemin farmakokinetik çalışmalarla desteklenerek kolon kanseri indüklenen hayvanlarda eş zamanlı yürütülmesi etkinliğin süreç içerisindeki durumunu da anlamamızı sağlayacağı için ilerleyen süreçte düşünülmektedir. Sonuç olarak, CD nanopleksler kolon kanserinde immünokemoterapi için uygun olabilir ve bu, immünoterapötik ajanlarla kombinasyon halinde diğer kemoterapötiklerle doğrulanmalıdır. Ayrıca hazırlanan bu nanoplekslerle immünokemoterapinin yanı sıra farklı kemoterapötik, immünoterapötik, radyoterapötikler gibi ajanlarla tedavinin de kolon kanseri üzerindeki etkinliği değerlendirilebilir. Diğer kanserlerde bu nanosistemin hazırlanma prensipleri gözetilerek, farklı tedavilerin kombinasyonunu içeren yeni bir nanopleks sistemi tasarlanabilir ve kolaylıkla hazırlanarak etkinlik *in vitro* ve *in vivo* olarak değerlendirilebilir. Gelecekteki çalışmalarda aşılması gereken zorluk, IL-2 yüklü nano boyutlu taşıyıcıların oral uygulanmasıdır. Oral uygulama ile intestinal immünizasyon ve parenteral uygulamadan kaçınarak gastrointestinal kanserlerin etkili ve güvenli tedavisi önemli gelişmeler olacaktır.

6. KAYNAKLAR

1. Pavlopoulou A, Spandidos D A, Michalopoulos I. Human cancer databases (review). *Oncol Rep.* 2015;33(1):3-18.
2. Yin W, Wang J, Jiang L, James Kang Y. Cancer and stem cells. *Exp Biol Med* (Maywood). 2021;246(16):1791-1801.
3. Sung H, Ferlay J, Siegel R L, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A ve ark. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-249.
4. Roche J. The Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer. *Cancers* (Basel). 2018;10(2).
5. Wang X, Zhang H, Chen X. Drug resistance and combating drug resistance in cancer. *Cancer Drug Resist.* 2019;2:141-160.
6. Akkin S, Varan G, Bilensoy E. A Review on Cancer Immunotherapy and Applications of Nanotechnology to Chemoimmunotherapy of Different Cancers. *Molecules.* 2021;26(11).
7. Lei X, Lei Y, Li J K, Du W X, Li R G, Yang J ve ark. Immune cells within the tumor microenvironment: Biological functions and roles in cancer immunotherapy. *Cancer Lett.* 2020;470:126-133.
8. Mao X, Xu J, Wang W, Liang C, Hua J, Liu J ve ark. Crosstalk between cancer-associated fibroblasts and immune cells in the tumor microenvironment: new findings and future perspectives. *Mol Cancer.* 2021;20(1):131.
9. Ahmed M. Colon Cancer: A Clinician's Perspective in 2019. *Gastroenterology Res.* 2020;13(1):1-10.
10. Nadalin S, Settmacher U, Rauchfuss F, Balci D, Konigsrainer A, Line P D. RAPID procedure for colorectal cancer liver metastasis. *Int J Surg.* 2020;82S:93-96.
11. Von Renteln D, Bouin M, Barkun A N. Current standards and new developments of colorectal polyp management and resection techniques. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017;11(9):835-842.
12. Johnson C M, Wei C, Ensor J E, Smolenski D J, Amos C I, Levin B ve ark. Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. *Cancer Causes Control.* 2013;24(6):1207-22.
13. Xia Z, Su Y R, Petersen P, Qi L, Kim A E, Figueiredo J C ve ark. Functional informed genome-wide interaction analysis of body mass index, diabetes and colorectal cancer risk. *Cancer Med.* 2020;9(10):3563-3573.
14. Patel S G, Ahnen D J. Colorectal Cancer in the Young. *Curr Gastroenterol Rep.* 2018;20(4):15.
15. Hofseth L J, Hebert J R, Chanda A, Chen H, Love B L, Pena M M ve ark. Early-onset colorectal cancer: initial clues and current views. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2020;17(6):352-364.

16. Siegel R L, Miller K D, Fuchs H E, Jemal A. Cancer statistics, 2022. CA Cancer J Clin. 2022;72(1):7-33.
17. T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Türkiye Kanseri İstatistikleri 2017. 27.03.2022]; Available from: https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/istatistik/Turkiye_Kanser_Istatistikleri_2017.pdf.
18. Global Burden of Disease Cancer C, Fitzmaurice C, Allen C, Barber R M, Barregard L, Bhutta Z A ve ark. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. JAMA Oncol. 2017;3(4):524-548.
19. Brenner H, Kloor M, Pox C P. Colorectal cancer. The Lancet. 2014;383(9927):1490-1502.
20. Society A C. Colorectal Cancer Stages. 2020 [cited 2022 03.09.2022]; Available from: <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/detection-diagnosis-staging/staged.html>.
21. UK C R. TNM Staging. 2022 12.01.2022 [cited 2022 03.09.2022]; Available from: <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/bowel-cancer/stages-types-and-grades/TNM-staging>.
22. Pasha S F. Applications of Colon Capsule Endoscopy. Curr Gastroenterol Rep. 2018;20(5):22.
23. Fleming M, Ravula S, Tatishchev S F, Wang H L. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. J Gastrointest Oncol. 2012;3(3):153-73.
24. Health N C I a t N I o. Biotherapy. [cited 2022 19.07.2022]; Available from: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/biotherapy>.
25. Health N C I a t N I o. Immunotherapy to Treat Cancer. 24.09.2019 [cited 2022 19.07.2022]; Available from: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/immunotherapy>.
26. Braftovi, INN-Encorafenib, Summary of Product Characteristics. 23.03.2022]; Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/braftovi-epar-product-information_en.pdf.
27. Ciardiello D, Vitiello P P, Cardone C, Martini G, Troiani T, Martinelli E ve ark. Immunotherapy of colorectal cancer: Challenges for therapeutic efficacy. Cancer Treat Rev. 2019;76:22-32.
28. Shirasaka T. Development history and concept of an oral anticancer agent S-1 (TS-1): its clinical usefulness and future vistas. Jpn J Clin Oncol. 2009;39(1):2-15.
29. Duschinsky R, Plevin E, Heidelberger C. The Synthesis of 5-Fluoropyrimidines. Journal of the American Chemical Society. 1957;79(16):4559-4560.

30. Longley D B, Harkin D P, Johnston P G. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(5):330-8.
31. Goindi S, Arora P, Kumar N, Puri A. Development of novel ionic liquid-based microemulsion formulation for dermal delivery of 5-Fluorouracil. *AAPS PharmSciTech*. 2014;15(4):810-21.
32. Maring J G, Schouten L, Greijdanus B, de Vries E G, Uges D R. A simple and sensitive fully validated HPLC-UV method for the determination of 5-fluorouracil and its metabolite 5,6-dihydrofluorouracil in plasma. *Ther Drug Monit*. 2005;27(1):25-30.
33. Diasio R B, Harris B E. Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. *Clin Pharmacokinet*. 1989;16(4):215-37.
34. Moore A Y. Clinical applications for topical 5-fluorouracil in the treatment of dermatological disorders. *J Dermatolog Treat*. 2009;20(6):328-35.
35. Lee J J, Beumer J H, Chu E. Therapeutic drug monitoring of 5-fluorouracil. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2016;78(3):447-64.
36. Salem M E, Yin J, Goldberg R M, Pederson L D, Wolmark N, Alberts S R ve ark. Evaluation of the change of outcomes over a 10-year period in patients with stage III colon cancer: pooled analysis of 6501 patients treated with fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin in the ACCENT database. *Ann Oncol*. 2020;31(4):480-486.
37. Jeon E K, Hong S H, Kim T H, Jung S E, Park J C, Won H S ve ark. Modified FOLFIRI as Second-Line Chemotherapy after Failure of Modified FOLFOX-4 in Advanced Gastric Cancer. *Cancer Res Treat*. 2011;43(3):148-53.
38. Rahbar M, Morsali A, Bozorgmehr M R, Beyramabadi S A. Quantum chemical studies of chitosan nanoparticles as effective drug delivery systems for 5-fluorouracil anticancer drug. *Journal of Molecular Liquids*. 2020;302.
39. McWhirter D, Kitteringham N, Jones R P, Malik H, Park K, Palmer D. Chemotherapy induced hepatotoxicity in metastatic colorectal cancer: a review of mechanisms and outcomes. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2013;88(2):404-15.
40. Alessandrino F, Qin L, Cruz G, Sahu S, Rosenthal M H, Meyerhardt J A ve ark. 5-Fluorouracil induced liver toxicity in patients with colorectal cancer: role of computed tomography texture analysis as a potential biomarker. *Abdom Radiol (NY)*. 2019;44(9):3099-3106.
41. Vacchelli E, Eggermont A, Sautes-Fridman C, Galon J, Zitvogel L, Kroemer G ve ark. Trial Watch: Toll-like receptor agonists for cancer therapy. *Oncoimmunology*. 2013;2(8):e25238.
42. Korbelik M, Zhang W, Merchant S. Involvement of damage-associated molecular patterns in tumor response to photodynamic therapy: surface expression of calreticulin and high-mobility group box-1 release. *Cancer Immunol Immunother*. 2011;60(10):1431-7.
43. Kleinovink J W, van Driel P B, Snoeks T J, Prokopi N, Fransen M F, Cruz L J ve ark. Combination of Photodynamic Therapy and Specific Immunotherapy

- Efficiently Eradicates Established Tumors. *Clin Cancer Res.* 2016;22(6):1459-68.
44. Da Silva C G, Rueda F, Lowik C W, Ossendorp F, Cruz L J. Combinatorial prospects of nano-targeted chemoimmunotherapy. *Biomaterials.* 2016;83:308-20.
 45. Vincent J, Mignot G, Chalmin F, Ladoire S, Bruchard M, Chevriaux A ve ark. 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. *Cancer Res.* 2010;70(8):3052-61.
 46. Otsubo D, Yamashita K, Fujita M, Nishi M, Kimura Y, Hasegawa H ve ark. Early-phase Treatment by Low-dose 5-Fluorouracil or Primary Tumor Resection Inhibits MDSC-mediated Lung Metastasis Formation. *Anticancer Res.* 2015;35(8):4425-31.
 47. Kanterman J, Sade-Feldman M, Biton M, Ish-Shalom E, Lasry A, Goldshtein A ve ark. Adverse immunoregulatory effects of 5FU and CPT11 chemotherapy on myeloid-derived suppressor cells and colorectal cancer outcomes. *Cancer Res.* 2014;74(21):6022-35.
 48. Cassetta L, Baekkevold E S, Brandau S, Bujko A, Cassatella M A, Dorhoi A ve ark. Deciphering myeloid-derived suppressor cells: isolation and markers in humans, mice and non-human primates. *Cancer Immunol Immunother.* 2019;68(4):687-697.
 49. Gmeiner W H. Fluoropyrimidine Modulation of the Anti-Tumor Immune Response-Prospects for Improved Colorectal Cancer Treatment. *Cancers (Basel).* 2020;12(6).
 50. Hosseinifar T, Sheybani S, Abdouss M, Hassani Najafabadi S A, Shafiee Ardestani M. Pressure responsive nanogel base on Alginate-Cyclodextrin with enhanced apoptosis mechanism for colon cancer delivery. *J Biomed Mater Res A.* 2018;106(2):349-359.
 51. He W, Du Q, Cao D Y, Xiang B, Fan L F. Study on colon-specific pectin/ethylcellulose film-coated 5-fluorouracil pellets in rats. *Int J Pharm.* 2008;348(1-2):35-45.
 52. Frank D, Tyagi C, Tomar L, Choonara Y E, du Toit L C, Kumar P ve ark. Overview of the role of nanotechnological innovations in the detection and treatment of solid tumors. *Int J Nanomedicine.* 2014;9:589-613.
 53. Le P N, Nguyen N H, Nguyen C K, Tran N Q. Smart dendrimer-based nanogel for enhancing 5-fluorouracil loading efficiency against MCF7 cancer cell growth. *Bulletin of Materials Science.* 2016;39(6):1493-1500.
 54. Ghasemi Toudeshkchouei M, Zahedi P, Shavandi A. Microfluidic-Assisted Preparation of 5-Fluorouracil-Loaded PLGA Nanoparticles as a Potential System for Colorectal Cancer Therapy. *Materials (Basel).* 2020;13(7).
 55. Anitha A, Deepa N, Chennazhi K P, Lakshmanan V K, Jayakumar R. Combinatorial anticancer effects of curcumin and 5-fluorouracil loaded

thiolated chitosan nanoparticles towards colon cancer treatment. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1840(9):2730-43.

56. Ahmed F, Kumari S, Kondapi A K. Evaluation of Antiproliferative Activity, Safety and Biodistribution of Oxaliplatin and 5-Fluorouracil Loaded Lactoferrin Nanoparticles for the Management of Colon Adenocarcinoma: an In Vitro and an In Vivo Study. *Pharm Res*. 2018;35(9):178.
57. Di Martino A, Kucharczyk P, Capakova Z, Humpolicek P, Sedlarik V. Chitosan-based nanocomplexes for simultaneous loading, burst reduction and controlled release of doxorubicin and 5-fluorouracil. *Int J Biol Macromol*. 2017;102:613-624.
58. Chen L, She X, Wang T, He L, Shigdar S, Duan W ve ark. Overcoming acquired drug resistance in colorectal cancer cells by targeted delivery of 5-FU with EGF grafted hollow mesoporous silica nanoparticles. *Nanoscale*. 2015;7(33):14080-92.
59. Wu X, He C, Wu Y, Chen X. Synergistic therapeutic effects of Schiff's base cross-linked injectable hydrogels for local co-delivery of metformin and 5-fluorouracil in a mouse colon carcinoma model. *Biomaterials*. 2016;75:148-162.
60. Eynali S, Khoei S, Khoei S, Esmaelbeygi E. Evaluation of the cytotoxic effects of hyperthermia and 5-fluorouracil-loaded magnetic nanoparticles on human colon cancer cell line HT-29. *Int J Hyperthermia*. 2017;33(3):327-335.
61. Smith T, Affram K, Bulumko E, Agyare E. Evaluation of in-vitro cytotoxic effect of 5-FU loaded-chitosan nanoparticles against spheroid models. *J Nat Sci*. 2018;4(10).
62. Al Sabbagh C, Seguin J, Agapova E, Kramerich D, Boudy V, Mignet N. Thermosensitive hydrogels for local delivery of 5-fluorouracil as neoadjuvant or adjuvant therapy in colorectal cancer. *Eur J Pharm Biopharm*. 2020;157:154-164.
63. Smith T, Affram K, Nottingham E L, Han B, Amissah F, Krishnan S ve ark. Application of smart solid lipid nanoparticles to enhance the efficacy of 5-fluorouracil in the treatment of colorectal cancer. *Sci Rep*. 2020;10(1):16989.
64. Abdullah S, El Hadad S, Aldahlawi A. In vitro optimization, characterization and anti-tumor evaluation against colorectal cancer of a novel 5-fluorouracil oral nanosuspension using soy protein, polysaccharides-protein complexation, and in-situ gel formation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2022;67.
65. Abul K. Abbas A H H L, Shiv Pillai. *Cellular and Molecular Immunology* 2017.
66. Borghaei H, Smith M R, Campbell K S. Immunotherapy of cancer. *Eur J Pharmacol*. 2009;625(1-3):41-54.
67. Engel P, Boumsell L, Balderas R, Bensussan A, Gattei V, Horejsi V ve ark. CD Nomenclature 2015: Human Leukocyte Differentiation Antigen

- Workshops as a Driving Force in Immunology. *J Immunol.* 2015;195(10):4555-63.
68. Qian H, Liu B, Jiang X. Application of nanomaterials in cancer immunotherapy. *Materials Today Chemistry.* 2018;7:53-64.
 69. Merino M, Contreras A, Casares N, Troconiz I F, Ten Hagen T L, Berraondo P ve ark. A new immune-nanoplatform for promoting adaptive antitumor immune response. *Nanomedicine.* 2019;17:13-25.
 70. Riley R S, June C H, Langer R, Mitchell M J. Delivery technologies for cancer immunotherapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2019;18(3):175-196.
 71. Buchbinder E I, Desai A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am J Clin Oncol.* 2016;39(1):98-106.
 72. Zhai Q, Chen Y, Xu J, Huang Y, Sun J, Liu Y ve ark. Lymphoma Immunochemotherapy: Targeted Delivery of Doxorubicin via a Dual Functional Nanocarrier. *Mol Pharm.* 2017;14(11):3888-3895.
 73. Kroschinsky F, Stolz F, von Bonin S, Beutel G, Kochanek M, Kiehl M ve ark. New drugs, new toxicities: severe side effects of modern targeted and immunotherapy of cancer and their management. *Crit Care.* 2017;21(1):89.
 74. Akkin S, Varan G, Aksut D, Malanga M, Ercan A, Sen M ve ark. A different approach to immunochemotherapy for colon Cancer: Development of nanoplexes of cyclodextrins and Interleukin-2 loaded with 5-FU. *Int J Pharm.* 2022;623:121940.
 75. Pedrosa L, Esposito F, Thomson T M, Maurel J. The Tumor Microenvironment in Colorectal Cancer Therapy. *Cancers (Basel).* 2019;11(8).
 76. Miao L, Li J, Liu Q, Feng R, Das M, Lin C M ve ark. Transient and Local Expression of Chemokine and Immune Checkpoint Traps To Treat Pancreatic Cancer. *ACS Nano.* 2017;11(9):8690-8706.
 77. de Oliveira C M B, Sakata R K, Issy A M, Gerola L R, Salomão R. Cytokines and Pain. *Brazilian Journal of Anesthesiology.* 2011;61(2):255-265.
 78. Zhang J M, An J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin.* 2007;45(2):27-37.
 79. Becker J C, Andersen M H, Schrama D, Thor Straten P. Immune-suppressive properties of the tumor microenvironment. *Cancer Immunol Immunother.* 2013;62(7):1137-48.
 80. Domingues B, Lopes J M, Soares P, Populo H. Melanoma treatment in review. *Immunotargets Ther.* 2018;7:35-49.
 81. Shen S, Li H J, Chen K G, Wang Y C, Yang X Z, Lian Z X ve ark. Spatial Targeting of Tumor-Associated Macrophages and Tumor Cells with a pH-Sensitive Cluster Nanocarrier for Cancer Chemoimmunotherapy. *Nano Lett.* 2017;17(6):3822-3829.

82. Diao J, Gu H, Tang M, Zhao J, Cattral M S. Tumor Dendritic Cells (DCs) Derived from Precursors of Conventional DCs Are Dispensable for Intratumor CTL Responses. *J Immunol.* 2018;201(4):1306-1314.
83. Abbott M, Ustoyev Y. Cancer and the Immune System: The History and Background of Immunotherapy. *Semin Oncol Nurs.* 2019;35(5):150923.
84. Stanculeanu D L, Daniela Z, Lazescu A, Bunghez R, Anghel R. Development of new immunotherapy treatments in different cancer types. *J Med Life.* 2016;9(3):240-248.
85. Horwitz D A, Bickerton S, Koss M, Fahmy T M, La Cava A. Suppression of Murine Lupus by CD4⁺ and CD8⁺ Treg Cells Induced by T Cell-Targeted Nanoparticles Loaded With Interleukin-2 and Transforming Growth Factor beta. *Arthritis Rheumatol.* 2019;71(4):632-640.
86. Mohapatra S S, Qazi M, Hellermann G. Immunotherapy for allergies and asthma: present and future. *Curr Opin Pharmacol.* 2010;10(3):276-88.
87. Andersen M H. Anti-cancer immunotherapy: breakthroughs and future strategies. *Semin Immunopathol.* 2018.
88. Sau S, Alsaab H O, Bhise K, Alzhrani R, Nabil G, Iyer A K. Multifunctional nanoparticles for cancer immunotherapy: A groundbreaking approach for reprogramming malfunctioned tumor environment. *J Control Release.* 2018;274:24-34.
89. Ecker D M, Jones S D, Levine H L. The therapeutic monoclonal antibody market. *MAbs.* 2015;7(1):9-14.
90. Weiner L M, Surana R, Wang S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(5):317-27.
91. Kimiz-Gebologlu I, Gulce-Iz S, Biray-Avci C. Monoclonal antibodies in cancer immunotherapy. *Mol Biol Rep.* 2018;45(6):2935-2940.
92. FDA. Vaccines Licensed for Use in the United States. 2022 [cited 2022 19.07.2022]; Available from: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/vaccines/vaccines-licensed-use-united-states>.
93. U.S. National Institutes of Health U S N L o M. ClinicalTrials.gov. [cited 2022 25.07.2022]; Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=cancer&term=vaccine&cntry=&state=&city=&dist=>.
94. Zhang Y, Wu L, Li Z, Zhang W, Luo F, Chu Y ve ark. Glycocalyx-Mimicking Nanoparticles Improve Anti-PD-L1 Cancer Immunotherapy through Reversion of Tumor-Associated Macrophages. *Biomacromolecules.* 2018;19(6):2098-2108.
95. Cheng K, Ding Y, Zhao Y, Ye S, Zhao X, Zhang Y ve ark. Sequentially Responsive Therapeutic Peptide Assembling Nanoparticles for Dual-Targeted Cancer Immunotherapy. *Nano Lett.* 2018;18(5):3250-3258.

96. Soularue E, Lepage P, Colombel J F, Coutzac C, Faleck D, Marthey L ve ark. Enterocolitis due to immune checkpoint inhibitors: a systematic review. *Gut*. 2018;67(11):2056-2067.
97. Zheng P P, Kros J M, Li J. Approved CAR T cell therapies: ice bucket challenges on glaring safety risks and long-term impacts. *Drug Discov Today*. 2018;23(6):1175-1182.
98. National Cancer Institute, CAR T Cells: Engineering Patients' Immune Cells to Treat Their Cancers. 10.03.2022]; Available from: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/research/car-t-cells>.
99. Administration U S F D. Approved Cellular and Gene Therapy Products. 03.01.2022 [cited 2022 05.06.2022]; Available from: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/approved-cellular-and-gene-therapy-products>.
100. FDA. PROVENGE (sipuleucel-T). 2019 [cited 2022 19.07.2022]; Available from: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/provenge-sipuleucel-t>.
101. FDA. IMLYGIC. 2022 [cited 2022 19.07.2022]; Available from: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/imlygic>.
102. Iglesias-Lopez C, Agusti A, Vallano A, Obach M. Current landscape of clinical development and approval of advanced therapies. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2021;23:606-618.
103. Baldo B A. Side effects of cytokines approved for therapy. *Drug Saf*. 2014;37(11):921-43.
104. McHugh M D, Park J, Uhrich R, Gao W, Horwitz D A, Fahmy T M. Paracrine co-delivery of TGF-beta and IL-2 using CD4-targeted nanoparticles for induction and maintenance of regulatory T cells. *Biomaterials*. 2015;59:172-81.
105. Wu T, Qiao Q, Qin X, Zhang D, Zhang Z. Immunostimulatory cytokine and doxorubicin co-loaded nanovesicles for cancer immunochemotherapy. *Nanomedicine*. 2019;18:66-77.
106. Donohue J H, Rosenberg S A. The fate of interleukin-2 after in vivo administration. *J Immunol*. 1983;130(5):2203-8.
107. Atkins M B. Cytokine-based therapy and biochemotherapy for advanced melanoma. *Clin Cancer Res*. 2006;12(7 Pt 2):2353s-2358s.
108. Xie Y Q, Arik H, Wei L, Zheng Y, Suh H, Irvine D J ve ark. Redox-responsive interleukin-2 nanogel specifically and safely promotes the proliferation and memory precursor differentiation of tumor-reactive T-cells. *Biomater Sci*. 2019;7(4):1345-1357.
109. Wang Y J, Fletcher R, Yu J, Zhang L. Immunogenic effects of chemotherapy-induced tumor cell death. *Genes Dis*. 2018;5(3):194-203.

110. Mizui M. Natural and modified IL-2 for the treatment of cancer and autoimmune diseases. *Clin Immunol*. 2019;206:63-70.
111. Zhang Q, Lou Y, Bai X L, Liang T B. Immunometabolism: A novel perspective of liver cancer microenvironment and its influence on tumor progression. *World J Gastroenterol*. 2018;24(31):3500-3512.
112. Zorn E, Nelson E A, Mohseni M, Porcheray F, Kim H, Litsa D ve ark. IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. *Blood*. 2006;108(5):1571-9.
113. Park J, Wrzesinski S H, Stern E, Look M, Criscione J, Ragheb R ve ark. Combination delivery of TGF-beta inhibitor and IL-2 by nanoscale liposomal polymeric gels enhances tumour immunotherapy. *Nat Mater*. 2012;11(10):895-905.
114. Deo V K, Kato T, Park E Y. Virus-Like Particles Displaying Recombinant Short-Chain Fragment Region and Interleukin 2 for Targeting Colon Cancer Tumors and Attracting Macrophages. *J Pharm Sci*. 2016;105(5):1614-1622.
115. Wu J, Tang C, Yin C. Co-delivery of doxorubicin and interleukin-2 via chitosan based nanoparticles for enhanced antitumor efficacy. *Acta Biomater*. 2017;47:81-90.
116. Song Q, Yin Y, Shang L, Wu T, Zhang D, Kong M ve ark. Tumor Microenvironment Responsive Nanogel for the Combinatorial Antitumor Effect of Chemotherapy and Immunotherapy. *Nano Lett*. 2017;17(10):6366-6375.
117. Zhao Y, Song Q, Yin Y, Wu T, Hu X, Gao X ve ark. Immunochemotherapy mediated by thermosponge nanoparticles for synergistic anti-tumor effects. *J Control Release*. 2018;269:322-336.
118. Shang L, Jiang X, Yang T, Xu H, Xie Q, Hu M ve ark. Enhancing cancer chemo-immunotherapy by biomimetic nanogel with tumor targeting capacity and rapid drug-releasing in tumor microenvironment. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2021.
119. Pellequer Y, Ollivon M, Barratt G. Formulation of liposomes associated with recombinant interleukin-2: effect on interleukin-2 activity. *Biomed Pharmacother*. 2004;58(3):162-7.
120. Yao H, Ng S S, Huo L F, Chow B K, Shen Z, Yang M ve ark. Effective melanoma immunotherapy with interleukin-2 delivered by a novel polymeric nanoparticle. *Mol Cancer Ther*. 2011;10(6):1082-92.
121. Anisimova N Y, Sosnov A V, Ustyuzhanina N E, Baronzio G, Kiselevsky M V. Cytotoxic Activity of Peripheral Blood Mononuclear Leukocytes, Activated by Interleukin-2/beta-Cyclodextrin Nanocomposition against Androgen Receptor-Negative Prostate Cancers. *ISRN Oncol*. 2011;2011:405656.
122. Steenblock E R, Fadel T, Labowsky M, Pober J S, Fahmy T M. An artificial antigen-presenting cell with paracrine delivery of IL-2 impacts the magnitude and direction of the T cell response. *J Biol Chem*. 2011;286(40):34883-92.

123. Zhao H, Wu F, Cai Y, Chen Y, Wei L, Liu Z ve ark. Local antitumor effects of intratumoral delivery of rIL-2 loaded sustained-release dextran/PLGA-PLA core/shell microspheres. *Int J Pharm.* 2013;450(1-2):235-40.
124. Song W, Musetti S N, Huang L. Nanomaterials for cancer immunotherapy. *Biomaterials.* 2017;148:16-30.
125. Zafar N, Fessi H, Elaissari A. Cyclodextrin containing biodegradable particles: from preparation to drug delivery applications. *Int J Pharm.* 2014;461(1-2):351-66.
126. Jansook P, Ogawa N, Loftsson T. Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. *Int J Pharm.* 2018;535(1-2):272-284.
127. Varan G, Varan C, Erdogar N, Hincal A A, Bilensoy E. Amphiphilic cyclodextrin nanoparticles. *Int J Pharm.* 2017;531(2):457-469.
128. Agency E M. Cyclodextrins used as excipients. 10.04.2022]; Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/questions-answers-cyclodextrins-used-excipients-medicinal-products-human-use_en.pdf.
129. Agency E M. Annex to the European Commission guideline on 'Excipients in the labelling and package leaflet of medicinal products for human use' (SANTE-2017-11668). 10.04.2022]; Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/annex-european-commission-guideline-excipients-labelling-package-leaflet-medicinal-products-human_en.pdf
130. Organization W H. Coronavirus disease (COVID-19): Vaccines. 16.03.2022 10.04.2022]; Available from: [https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/coronavirus-disease-\(covid-19\)-vaccines](https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/coronavirus-disease-(covid-19)-vaccines)
131. (WHO) W H O. 11 Vaccines Granted Emergency Use Listing (EUL) by WHO. 2022 02.08.2022 [cited 2022 02.08.2022]; Available from: <https://covid19.trackvaccines.org/agency/who/>.
132. Prevention C f D C a. Johnson & Johnson's Janssen COVID-19 Vaccine: Overview and Safety. 04.04.2022; Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/vaccines/different-vaccines/janssen.html>
133. Wang L L, Zheng W S, Chen S H, Han Y X, Jiang J D. Development of rectal delivered thermo-reversible gelling film encapsulating a 5-fluorouracil hydroxypropyl-beta-cyclodextrin complex. *Carbohydr Polym.* 2016;137:9-18.
134. Di Donato C, Lavorgna M, Fattorusso R, Isernia C, Isidori M, Malgieri G ve ark. Alpha- and Beta-Cyclodextrin Inclusion Complexes with 5-Fluorouracil: Characterization and Cytotoxic Activity Evaluation. *Molecules.* 2016;21(12).
135. Lakkakula J R, Matshaya T, Krause R W. Cationic cyclodextrin/alginate chitosan nanoflowers as 5-fluorouracil drug delivery system. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017;70(Pt 1):169-177.

136. Gami P, Kundu D, Seera S D K, Banerjee T. Chemically crosslinked xylan-beta-Cyclodextrin hydrogel for the in vitro delivery of curcumin and 5-Fluorouracil. *Int J Biol Macromol*. 2020;158:18-31.
137. Xu J, Zhang G, Luo X, Wang D, Zhou W, Zhang Y ve ark. Co-delivery of 5-fluorouracil and miRNA-34a mimics by host-guest self-assembly nanocarriers for efficacious targeted therapy in colorectal cancer patient-derived tumor xenografts. *Theranostics*. 2021;11(5):2475-2489.
138. Nielsen T T, Amiel C, Duroux L, Larsen K L, Stade L W, Wimmer R ve ark. Formation of nanoparticles by cooperative inclusion between (S)-camptothecin-modified dextrans and beta-cyclodextrin polymers. *Beilstein J Org Chem*. 2015;11:147-54.
139. Malanga M, Balint M, Puskas I, Tuza K, Sohajda T, Jicsinszky L ve ark. Synthetic strategies for the fluorescent labeling of epichlorohydrin-branched cyclodextrin polymers. *Beilstein J Org Chem*. 2014;10:3007-18.
140. Viale M, Tosto R, Giglio V, Pappalardo G, Oliveri V, Maric I ve ark. Cyclodextrin polymers decorated with RGD peptide as delivery systems for targeted anti-cancer chemotherapy. *Invest New Drugs*. 2019;37(4):771-778.
141. Folch-Cano C, Yazdani-Pedram M, Olea-Azar C. Inclusion and functionalization of polymers with cyclodextrins: current applications and future prospects. *Molecules*. 2014;19(9):14066-79.
142. Binello A, Robaldo B, Barge A, Cavalli R, Cravotto G. Synthesis of cyclodextrin-based polymers and their use as debittering agents. *Journal of Applied Polymer Science*. 2008;107(4):2549-2557.
143. di Cagno M, Terndrup Nielsen T, Lambertsen Larsen K, Kuntsche J, Bauer-Brandl A. beta-Cyclodextrin-dextran polymers for the solubilization of poorly soluble drugs. *Int J Pharm*. 2014;468(1-2):258-63.
144. Chen J, Qin X, Zhong S, Chen S, Su W, Liu Y. Characterization of Curcumin/Cyclodextrin Polymer Inclusion Complex and Investigation on Its Antioxidant and Antiproliferative Activities. *Molecules*. 2018;23(5).
145. Zhang N, Li J, Jiang W, Ren C, Li J, Xin J ve ark. Effective protection and controlled release of insulin by cationic beta-cyclodextrin polymers from alginate/chitosan nanoparticles. *Int J Pharm*. 2010;393(1-2):212-8.
146. Rohner N A, Schomisch S J, Marks J M, von Recum H A. Cyclodextrin Polymer Preserves Sirolimus Activity and Local Persistence for Antifibrotic Delivery over the Time Course of Wound Healing. *Mol Pharm*. 2019;16(4):1766-1774.
147. Young C, Schluep T, Hwang J, Eliasof S. CRLX101 (formerly IT-101)-A Novel Nanopharmaceutical of Camptothecin in Clinical Development. *Curr Bioact Compd*. 2011;7(1):8-14.
148. Chen W, Zhang M, Shen W, Du B, Yang J, Zhang Q. A Polycationic Brush Mediated Co-Delivery of Doxorubicin and Gene for Combination Therapy. *Polymers (Basel)*. 2019;11(1).

149. Zhao F, Yin H, Li J. Supramolecular self-assembly forming a multifunctional synergistic system for targeted co-delivery of gene and drug. *Biomaterials*. 2014;35(3):1050-62.
150. Li B, Feng Z, He L, Li W, Wang Q, Liu J ve ark. Self-Assembled Supramolecular Nanoparticles for Targeted Delivery and Combination Chemotherapy. *ChemMedChem*. 2018;13(19):2037-2044.
151. Wei T, Zhang Y, Lei M, Qin Y, Wang Z, Chen Z ve ark. Development of oral curcumin based on pH-responsive transmembrane peptide-cyclodextrin derivative nanoparticles for hepatoma. *Carbohydr Polym*. 2022;277:118892.
152. Luo H C, Li N, Yan L, Mai K J, Sun K, Wang W ve ark. Comparison of the cellular transport mechanism of cationic, star-shaped polymers and liposomes in HaCat cells. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:1085-1096.
153. Manzanares D, Perez-Carrion M D, Jimenez Blanco J L, Ortiz Mellet C, Garcia Fernandez J M, Cena V. Cyclodextrin-Based Nanostructure Efficiently Delivers siRNA to Glioblastoma Cells Preferentially via Macropinocytosis. *Int J Mol Sci*. 2020;21(23).
154. Wojnilowicz M, Glab A, Bertucci A, Caruso F, Cavaliere F. Super-resolution Imaging of Proton Sponge-Triggered Rupture of Endosomes and Cytosolic Release of Small Interfering RNA. *ACS Nano*. 2019;13(1):187-202.
155. Badwaik V, Liu L, Gunasekera D, Kulkarni A, Thompson D H. Mechanistic Insight into Receptor-Mediated Delivery of Cationic-beta-Cyclodextrin:Hyaluronic Acid-Adamantamethamidyl Host:Guest pDNA Nanoparticles to CD44(+) Cells. *Mol Pharm*. 2016;13(3):1176-84.
156. Miyazaki H, Ogura M, Sakaguchi Y, Hasegawa T, Atobe S, Terai K. Mechanism of jet injector-induced plasmid DNA uptake: Contribution of shear stress and endocytosis. *Int J Pharm*. 2021;609:121200.
157. Mohammad N, Malvi P, Meena A S, Singh S V, Chaube B, Vannuruswamy G ve ark. Cholesterol depletion by methyl-beta-cyclodextrin augments tamoxifen induced cell death by enhancing its uptake in melanoma. *Mol Cancer*. 2014;13:204.
158. Varan G, Akkin S, Demirturk N, Benito J M, Bilensoy E. Erlotinib entrapped in cholesterol-depleting cyclodextrin nanoparticles shows improved antitumoral efficacy in 3D spheroid tumors of the lung and the liver. *J Drug Target*. 2021;29(4):439-453.
159. Smith S A, Selby L I, Johnston A P R, Such G K. The Endosomal Escape of Nanoparticles: Toward More Efficient Cellular Delivery. *Bioconjug Chem*. 2019;30(2):263-272.
160. Varan G, Varan C, Ozturk S C, Benito J M, Esendagli G, Bilensoy E. Therapeutic Efficacy and Biodistribution of Paclitaxel-Bound Amphiphilic Cyclodextrin Nanoparticles: Analyses in 3D Tumor Culture and Tumor-Bearing Animals In Vivo. *Nanomaterials (Basel)*. 2021;11(2).
161. Unal S, Can Ozturk S, Bilgic E, Yanik H, Korkusuz P, Aktas Y ve ark. Therapeutic efficacy and gastrointestinal biodistribution of polycationic

- nanoparticles for oral camptothecin delivery in early and late-stage colorectal tumor-bearing animal model. *Eur J Pharm Biopharm.* 2021;169:168-177.
162. Erdoğar N, Nemutlu E, İskit A B, Kara S C, Teksin Z Ş, Bilensoy E. Improved oral bioavailability of anticancer drug tamoxifen through complexation with water soluble cyclodextrins: in vitro and in vivo evaluation. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry.* 2019;96(1-2):81-91.
 163. Karpkird T, Manaprasertsak A, Penkitti A, Sinthuvanich C, Singchuwong T, Leepasert T. A novel chitosan-citric acid crosslinked beta-cyclodextrin nanocarriers for insoluble drug delivery. *Carbohydr Res.* 2020;498:108184.
 164. Yang T, Du G, Cui Y, Yu R, Hua C, Tian W ve ark. pH-sensitive doxorubicin-loaded polymeric nanocomplex based on beta-cyclodextrin for liver cancer-targeted therapy. *Int J Nanomedicine.* 2019;14:1997-2010.
 165. Matencio A, Hoti G, Monfared Y K, Rezayat A, Pedrazzo A R, Caldera F ve ark. Cyclodextrin Monomers and Polymers for Drug Activity Enhancement. *Polymers (Basel).* 2021;13(11).
 166. Krasner C N, Campos S M, Young C L, Chadda K R, Lee H, Birrer M J ve ark. Sequential Phase II clinical trials evaluating CRLX101 as monotherapy and in combination with bevacizumab in recurrent ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2021;162(3):661-666.
 167. Yi S, Liao R, Zhao W, Huang Y, He Y. Multifunctional co-transport carriers based on cyclodextrin assembly for cancer synergistic therapy. *Theranostics.* 2022;12(6):2560-2579.
 168. Truong N P, Whittaker M R, Mak C W, Davis T P. The importance of nanoparticle shape in cancer drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv.* 2015;12(1):129-42.
 169. Farjadian F, Ghasemi A, Gohari O, Roointan A, Karimi M, Hamblin M R. Nanopharmaceuticals and nanomedicines currently on the market: challenges and opportunities. *Nanomedicine (Lond).* 2019;14(1):93-126.
 170. Abdellatif A A H, Alsowinea A F. Approved and marketed nanoparticles for disease targeting and applications in COVID-19. *Nanotechnology Reviews.* 2021;10(1):1941-1977.
 171. Xin Y, Yin M, Zhao L, Meng F, Luo L. Recent progress on nanoparticle-based drug delivery systems for cancer therapy. *Cancer Biol Med.* 2017;14(3):228-241.
 172. Center for Drug Evaluation and Research, Advancing Health through Innovation 2018 New Drug Therapy Approvals. 01.03.2022]; Available from: <https://www.fda.gov/media/120357/download>.
 173. Halwani A A. Development of Pharmaceutical Nanomedicines: From the Bench to the Market. *Pharmaceutics.* 2022;14(1).
 174. Naeem M, Awan U A, Subhan F, Cao J, Hlaing S P, Lee J ve ark. Advances in colon-targeted nano-drug delivery systems: challenges and solutions. *Arch Pharm Res.* 2020;43(1):153-169.

175. Wahab S, Alshahrani M Y, Ahmad M F, Abbas H. Current trends and future perspectives of nanomedicine for the management of colon cancer. *Eur J Pharmacol.* 2021;910:174464.
176. Wathoni N, Nguyen A N, Rusdin A, Umar A K, Mohammed A F A, Motoyama K ve ark. Enteric-Coated Strategies in Colorectal Cancer Nanoparticle Drug Delivery System. *Drug Des Devel Ther.* 2020;14:4387-4405.
177. Wang K, Shen R, Meng T, Hu F, Yuan H. Nano-Drug Delivery Systems Based on Different Targeting Mechanisms in the Targeted Therapy of Colorectal Cancer. *Molecules.* 2022;27(9).
178. Sabra R, Billa N, Roberts C J. Cetuximab-conjugated chitosan-pectinate (modified) composite nanoparticles for targeting colon cancer. *Int J Pharm.* 2019;572:118775.
179. Qiu F, Becker K W, Knight F C, Baljon J J, Sevimli S, Shae D ve ark. Poly(propylacrylic acid)-peptide nanoplexes as a platform for enhancing the immunogenicity of neoantigen cancer vaccines. *Biomaterials.* 2018;182:82-91.
180. Hassan D, Omolo C A, Gannimani R, Waddad A Y, Mocktar C, Rambharose S ve ark. Delivery of novel vancomycin nanoplexes for combating methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections. *Int J Pharm.* 2019;558:143-156.
181. Nguyen M H, Tran T T, Hadinoto K. Controlling the burst release of amorphous drug-polysaccharide nanoparticle complex via crosslinking of the polysaccharide chains. *Eur J Pharm Biopharm.* 2016;104:156-63.
182. Sikwal D R, Kalhapure R S, Rambharose S, Vepuri S, Soliman M, Mocktar C ve ark. Polyelectrolyte complex of vancomycin as a nanoantibiotic: Preparation, in vitro and in silico studies. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2016;63:489-98.
183. Zhang X, Lin Z I, Yang J, Liu G L, Hu Z, Huang H ve ark. Carbon Dioxide-Derived Biodegradable and Cationic Polycarbonates as a New siRNA Carrier for Gene Therapy in Pancreatic Cancer. *Nanomaterials (Basel).* 2021;11(9).
184. Zhao N, Leng Q, Woodle M C, Mixson A J. Enhanced tumor uptake and activity of nanoplex-loaded doxorubicin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019;513(1):242-247.
185. Mitha A T, Rekha M R. Multifunctional polymeric nanoplexes for anticancer co-delivery of p53 and mitoxantrone. *J Mater Chem B.* 2014;2(45):8005-8016.
186. YORK C U I T C O N. DEPT. 2022 [cited 2022 26.7.2022]; Available from: <https://nmr.chem.columbia.edu/content/dept>.
187. Thomsen H, Benkovics G, Fenyvesi E, Farewell A, Malanga M, Ericson M B. Delivery of cyclodextrin polymers to bacterial biofilms - An exploratory study using rhodamine labelled cyclodextrins and multiphoton microscopy. *Int J Pharm.* 2017;531(2):650-657.
188. Mourtzis N, Paravatou M, Mavridis I M, Roberts M L, Yannakopoulou K. Synthesis, characterization, and remarkable biological properties of

- cyclodextrins bearing guanidinoalkylamino and aminoalkylamino groups on their primary side. *Chemistry*. 2008;14(14):4188-200.
189. Lee E, Park S J, Lee J H, Kim M S, Kim C-H. Preparation of chitosan–TPP nanoparticles and their physical and biological properties. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016;11(1):166-167.
 190. Anand M, Sathyapriya P, Maruthupandy M, Hameedha Beevi A. Synthesis of chitosan nanoparticles by TPP and their potential mosquito larvicidal application. *Frontiers in Laboratory Medicine*. 2018;2(2):72-78.
 191. Hejjaji E M A, Smith A M, Morris G A. The potential of chitosan-tripolyphosphate microparticles in the visualisation of latent fingerprints. *Food Hydrocolloids*. 2017;71:290-298.
 192. Kaban K, Salva E, Akbuga J. Modulation of the dual-faced effects of miR-141 with chitosan/miR-141 nanoplexes in breast cancer cells. *J Gene Med*. 2019;21(9):e3116.
 193. Sohrabi M J, Dehpour A R, Attar F, Hasan A, Mohammad-Sadeghi N, Meratan A A ve ark. Silymarin-albumin nanoplex: Preparation and its potential application as an antioxidant in nervous system in vitro and in vivo. *Int J Pharm*. 2019;572:118824.
 194. Sevmis M, Yoyen-Ermis D, Aydin C, Bilgic E, Korkusuz P, Uner A ve ark. Splenectomy-Induced Leukocytosis Promotes Intratumoral Accumulation of Myeloid-Derived Suppressor Cells, Angiogenesis and Metastasis. *Immunol Invest*. 2017;46(7):663-676.
 195. Sur-Erdem I, Hussain M S, Asif M, Pinarbasi N, Aksu A C, Noegel A A. Nesprin-1 impact on tumorigenic cell phenotypes. *Mol Biol Rep*. 2020;47(2):921-934.
 196. Marques M R C, Loebenberg R, Almukainzi M. Simulated Biological Fluids with Possible Application in Dissolution Testing. *Dissolution Technologies*. 2011;18(3):15-28.
 197. Devrim B, Bozkir A, Canefe K. Preparation and evaluation of PLGA microparticles as carrier for the pulmonary delivery of rhIL-2 : I. Effects of some formulation parameters on microparticle characteristics. *J Microencapsul*. 2011;28(6):582-94.
 198. Kiss E, Szabó V A, Horváth P. Simple circular dichroism method for selection of the optimal cyclodextrin for drug complexation. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. 2019;95(3-4):223-233.
 199. Yan C, Chen D, Gu J, Qin J. Nanoparticles of 5-fluorouracil (5-FU) loaded N-succinyl-chitosan (Suc-Chi) for cancer chemotherapy: preparation, characterization--in-vitro drug release and anti-tumour activity. *J Pharm Pharmacol*. 2006;58(9):1177-81.
 200. Sun L, Chen Y, Zhou Y, Guo D, Fan Y, Guo F ve ark. Preparation of 5-fluorouracil-loaded chitosan nanoparticles and study of the sustained release in vitro and in vivo. *Asian J Pharm Sci*. 2017;12(5):418-423.

201. Oldham R K. Cancer Biotherapy: More Than Immunotherapy. *Cancer Biother Radiopharm.* 2017;32(4):111-114.
202. Varan G, Patrulea V, Borchard G, Bilensoy E. Cellular Interaction and Tumoral Penetration Properties of Cyclodextrin Nanoparticles on 3D Breast Tumor Model. *Nanomaterials (Basel).* 2018;8(2).
203. Babic A, Herceg V, Ateb I, Allemann E, Lange N. Tunable phosphatase-sensitive stable prodrugs of 5-aminolevulinic acid for tumor fluorescence photodetection. *J Control Release.* 2016;235:155-164.
204. Bhavé M S, Hassanbhai A M, Anand P, Luo K Q, Teoh S H. Effect of Heat-Inactivated *Clostridium sporogenes* and Its Conditioned Media on 3-Dimensional Colorectal Cancer Cell Models. *Sci Rep.* 2015;5:15681.
205. Freund E, Liedtke K R, Miebach L, Wende K, Heidecke A, Kaushik N K ve ark. Identification of Two Kinase Inhibitors with Synergistic Toxicity with Low-Dose Hydrogen Peroxide in Colorectal Cancer Cells in vitro. *Cancers (Basel).* 2020;12(1).
206. Senbanjo L T, Chellaiah M A. CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells. *Front Cell Dev Biol.* 2017;5:18.
207. Aksu-Menges E, Eylem C C, Nemutlu E, Gizer M, Korkusuz P, Topaloglu H ve ark. Reduced mitochondrial fission and impaired energy metabolism in human primary skeletal muscle cells of Megaconial Congenital Muscular Dystrophy. *Sci Rep.* 2021;11(1):18161.
208. Agarwalla P, Banerjee R. N-end rule pathway inhibition assists colon tumor regression via necroptosis. *Mol Ther Oncolytics.* 2016;3:16020.
209. Chen H, Sells E, Pandey R, Abril E R, Hsu C, Krouse R S ve ark. Kallikrein 6 protease advances colon tumorigenesis via induction of the high mobility group A2 protein. *Oncotarget.* 2019;10(58):6062-6078.
210. Cheriyaundath S, Basu S, Haase G, Doernberg H, Gavert N, Brabletz T ve ark. ISG15 induction is required during L1-mediated colon cancer progression and metastasis. *Oncotarget.* 2019;10(67):7122-7131.
211. Paulson B, Kim I H, Namgoong J M, Kim Y G, Lee S, Moon Y ve ark. Longitudinal micro-endoscopic monitoring of high-success intramucosal xenografts for mouse models of colorectal cancer. *Int J Med Sci.* 2019;16(11):1453-1460.
212. Tan H X, Gong W Z, Zhou K, Xiao Z G, Hou F T, Huang T ve ark. CXCR4/TGF-beta1 mediated hepatic stellate cells differentiation into carcinoma-associated fibroblasts and promoted liver metastasis of colon cancer. *Cancer Biol Ther.* 2020;21(3):258-268.
213. Malanga M, Szeman J, Fenyvesi E, Puskas I, Csabai K, Gyemant G ve ark. "Back to the Future": A New Look at Hydroxypropyl Beta-Cyclodextrins. *J Pharm Sci.* 2016;105(9):2921-2931.
214. Wielinska J, Nowacki A, Liberek B. 5-Fluorouracil-Complete Insight into Its Neutral and Ionised Forms. *Molecules.* 2019;24(20).

215. Marin-Menendez A, Montis C, Diaz-Calvo T, Carta D, Hatzixanthis K, Morris C J ve ark. Antimicrobial Nanoplexes meet Model Bacterial Membranes: the key role of Cardiolipin. *Sci Rep*. 2017;7:41242.
216. Gary D J, Min J, Kim Y, Park K, Won Y Y. The effect of N/P ratio on the in vitro and in vivo interaction properties of PEGylated poly[2-(dimethylamino)ethyl methacrylate]-based siRNA complexes. *Macromol Biosci*. 2013;13(8):1059-71.
217. Sanchez-Vazquez B, Lee J B, Strimaite M, Buanz A, Bailey R, Gershkovich P ve ark. Solid lipid nanoparticles self-assembled from spray dried microparticles. *Int J Pharm*. 2019;572:118784.
218. Kalantarian P, Najafabadi A R, Haririan I, Vatanara A, Yamini Y, Darabi M ve ark. Preparation of 5-fluorouracil nanoparticles by supercritical antisolvents for pulmonary delivery. *Int J Nanomedicine*. 2010;5:763-70.
219. Badran M M, Mady M M, Ghannam M M, Shakeel F. Preparation and characterization of polymeric nanoparticles surface modified with chitosan for target treatment of colorectal cancer. *Int J Biol Macromol*. 2017;95:643-649.
220. Zhang Q, Yang H, Sahito B, Li X, Peng L, Gao X ve ark. Nanostructured lipid carriers with exceptional gastrointestinal stability and inhibition of P-gp efflux for improved oral delivery of tilmicosin. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2020;187:110649.
221. (ISO) I O f S. Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. 2009 [cited 2022 31.07.2022]; Available from: http://www.dent.chula.ac.th/upload/images2/dent-bio-material/cytotoxicitytest/ISO10993_5_2009.pdf.
222. Handali S, Moghimipour E, Rezaei M, Ramezani Z, Dorkoosh F A. PHBV/PLGA nanoparticles for enhanced delivery of 5-fluorouracil as promising treatment of colon cancer. *Pharm Dev Technol*. 2020;25(2):206-218.
223. Mattos A C, Altmeyer C, Tominaga T T, Khalil N M, Mainardes R M. Polymeric nanoparticles for oral delivery of 5-fluorouracil: Formulation optimization, cytotoxicity assay and pre-clinical pharmacokinetics study. *Eur J Pharm Sci*. 2016;84:83-91.
224. Mansoori B, Mohammadi A, Abedi-Gaballu F, Abbaspour S, Ghasabi M, Yekta R ve ark. Hyaluronic acid-decorated liposomal nanoparticles for targeted delivery of 5-fluorouracil into HT-29 colorectal cancer cells. *J Cell Physiol*. 2020;235(10):6817-6830.
225. Rocca Y S, Roberti M P, Julia E P, Pampena M B, Bruno L, Rivero S ve ark. Phenotypic and Functional Dysregulated Blood NK Cells in Colorectal Cancer Patients Can Be Activated by Cetuximab Plus IL-2 or IL-15. *Front Immunol*. 2016;7:413.
226. Yorita N, Yuge R, Takigawa H, Atsushi O, Kuwai T, Kuraoka K ve ark. Stromal reaction inhibitor and immune-checkpoint inhibitor combination

- therapy attenuates excluded-type colorectal cancer in a mouse model. *Cancer Lett.* 2020.
227. Pol J G, Caudana P, Paillet J, Piaggio E, Kroemer G. Effects of interleukin-2 in immunostimulation and immunosuppression. *J Exp Med.* 2020;217(1).
 228. Aalinkeel R, Nair B, Chen C K, Mahajan S D, Reynolds J L, Zhang H ve ark. Nanotherapy silencing the interleukin-8 gene produces regression of prostate cancer by inhibition of angiogenesis. *Immunology.* 2016;148(4):387-406.
 229. Liu X, Li Y, Sun X, Muftuoglu Y, Wang B, Yu T ve ark. Powerful anti-colon cancer effect of modified nanoparticle-mediated IL-15 immunogene therapy through activation of the host immune system. *Theranostics.* 2018;8(13):3490-3503.
 230. Khorsand B, Nicholson N, Do A V, Femino J E, Martin J A, Petersen E ve ark. Regeneration of bone using nanoplex delivery of FGF-2 and BMP-2 genes in diaphyseal long bone radial defects in a diabetic rabbit model. *J Control Release.* 2017;248:53-59.
 231. Hassan H, Diebold S S, Smyth L A, Walters A A, Lombardi G, Al-Jamal K T. Application of carbon nanotubes in cancer vaccines: Achievements, challenges and chances. *J Control Release.* 2019;297:79-90.
 232. Brezanirova I, Trousil J, Cernochova Z, Kral V, Hruby M, Stepanek P ve ark. Self-assembled chitosan-alginate polyplex nanoparticles containing temoporfin. *Colloid and Polymer Science.* 2017;295(8):1259-1270.
 233. Verma A, Stellacci F. Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *Small.* 2010;6(1):12-21.
 234. Yang M, Li J, Gu P, Fan X. The application of nanoparticles in cancer immunotherapy: Targeting tumor microenvironment. *Bioact Mater.* 2021;6(7):1973-1987.
 235. Shakeran Z, Keyhanfar M, Varshosaz J, Sutherland D S. Biodegradable nanocarriers based on chitosan-modified mesoporous silica nanoparticles for delivery of methotrexate for application in breast cancer treatment. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2021;118:111526.
 236. Yu Z, Li X, Duan J, Yang X D. Targeted Treatment of Colon Cancer with Aptamer-Guided Albumin Nanoparticles Loaded with Docetaxel. *Int J Nanomedicine.* 2020;15:6737-6748.
 237. Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, Hasanzadeh Davarani F, Javanmard R, Dokhani A ve ark. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics.* 2018;10(2).
 238. Cheow W S, Hadinoto K. Self-assembled amorphous drug-polyelectrolyte nanoparticle complex with enhanced dissolution rate and saturation solubility. *J Colloid Interface Sci.* 2012;367(1):518-26.
 239. Souza P R, Vilsinski B H, Nunes C S, Bonkovoski L C, Garcia F, Nakamura C V ve ark. Application of a polyelectrolyte complex based on biocompatible polysaccharides for colorectal cancer inhibition. *Carbohydr Res.* 2020;108194.

240. Shendge R S, Pande V V, Kadnor N A, Jamdhade A A, Kadam R N. A Facile Approach to Enhance Solubility and Dissolution Rate of Norfloxacin by Nanoplex. *Pharmacophore*. 2014;5(3):406-416.
241. Kiew T Y, Cheow W S, Hadinoto K. Preserving the supersaturation generation capability of amorphous drug-polysaccharide nanoparticle complex after freeze drying. *Int J Pharm*. 2015;484(1-2):115-23.
242. Smith M C, Crist R M, Clogston J D, McNeil S E. Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes. *Anal Bioanal Chem*. 2017;409(24):5779-5787.
243. Quinones J P, Peniche H, Peniche C. Chitosan Based Self-Assembled Nanoparticles in Drug Delivery. *Polymers (Basel)*. 2018;10(3).
244. Weiss M, Fan J, Claudel M, Sonntag T, Didier P, Ronzani C ve ark. Density of surface charge is a more predictive factor of the toxicity of cationic carbon nanoparticles than zeta potential. *J Nanobiotechnology*. 2021;19(1):5.
245. Tıǧlı Aydın R S, Pulat M. 5-Fluorouracil Encapsulated Chitosan Nanoparticles for pH-Stimulated Drug Delivery: Evaluation of Controlled Release Kinetics. *Journal of Nanomaterials*. 2012;2012:1-10.
246. Phan H. T. H A J. What Does Nanoparticle Stability Mean? *Journal of Physical Chemistry C: Nanomaterials and interfaces*. 2019;16495–16507.
247. Moradi Kashkooli F, Soltani M, Souri M. Controlled anti-cancer drug release through advanced nano-drug delivery systems: Static and dynamic targeting strategies. *J Control Release*. 2020;327:316-349.
248. Umerska A, Paluch K J, Martinez M J, Corrigan O I, Medina C, Tajber L. Self-assembled hyaluronate/protamine polyelectrolyte nanoplexes: synthesis, stability, biocompatibility and potential use as peptide carriers. *J Biomed Nanotechnol*. 2014;10(12):3658-73.
249. Dul M, Paluch K J, Kelly H, Healy A M, Sasse A, Tajber L. Self-assembled carrageenan/protamine polyelectrolyte nanoplexes-Investigation of critical parameters governing their formation and characteristics. *Carbohydr Polym*. 2015;123:339-49.
250. Fan Y, Marioli M, Zhang K. Analytical characterization of liposomes and other lipid nanoparticles for drug delivery. *J Pharm Biomed Anal*. 2021;192:113642.
251. Vakilinezhad M A, Tanha S, Montaseri H, Dinarvand R, Azadi A, Akbari Javar H. Application of Response Surface Method for Preparation, Optimization, and Characterization of Nicotinamide Loaded Solid Lipid Nanoparticles. *Adv Pharm Bull*. 2018;8(2):245-256.
252. Jan N, Madni A, Rahim M A, Khan N U, Jamshaid T, Khan A ve ark. In vitro anti-leukemic assessment and sustained release behaviour of cytarabine loaded biodegradable polymer based nanoparticles. *Life Sci*. 2021;267:118971.
253. Parmar R, Misra R, Mohanty S. In vitro controlled release of Rifampicin through liquid-crystalline folate nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2015;129:198-205.

254. Weng J, Tong H H Y, Chow S F. In Vitro Release Study of the Polymeric Drug Nanoparticles: Development and Validation of a Novel Method. *Pharmaceutics*. 2020;12(8).
255. Shah M, Bournier L, Ali S, Al-Enazy S, Rytting E. Cytotoxicity of Endocytosis and Efflux Inhibitors in the BeWo Cell Line. *J Pharm Res Int*. 2017;17(5).
256. Varan G, Oncul S, Ercan A, Benito J M, Ortiz Mellet C, Bilensoy E. Cholesterol-Targeted Anticancer and Apoptotic Effects of Anionic and Polycationic Amphiphilic Cyclodextrin Nanoparticles. *J Pharm Sci*. 2016;105(10):3172-3182.
257. Ha Y, Kwon J H. Effects of lipid membrane composition on the distribution of biocidal guanidine oligomer with solid supported lipid membranes. *RSC Adv*. 2020;10(38):22343-22351.
258. Garmy N, Taieb N, Yahi N, Fantini J. Interaction of cholesterol with sphingosine: physicochemical characterization and impact on intestinal absorption. *J Lipid Res*. 2005;46(1):36-45.
259. Merchel Piovesan Pereira B, Tagkopoulos I. Benzalkonium Chlorides: Uses, Regulatory Status, and Microbial Resistance. *Appl Environ Microbiol*. 2019;85(13).
260. Stephan Dürr S L, Jenny Mann, Christina Janko, Rainer Tietze, Eveline Schreiber, Martin Herrmann, Christoph Alexiou. Real-time Cell Analysis of Human Cancer Cell Lines after Chemotherapy with Functionalized Magnetic Nanoparticles. *ANTICANCER RESEARCH*. 2012;32:1983-1989.
261. Boyacioglu O, Bilgic E, Varan C, Bilensoy E, Nemutlu E, Sevim D ve ark. ACPA decreases non-small cell lung cancer line growth through Akt/PI3K and JNK pathways in vitro. *Cell Death Dis*. 2021;12(1):56.
262. Castro F, Leite Pereira C, Helena Macedo M, Almeida A, Jose Silveira M, Dias S ve ark. Advances on colorectal cancer 3D models: The needed translational technology for nanomedicine screening. *Adv Drug Deliv Rev*. 2021;175:113824.
263. Xu M. C Q, Li J., Peng L., Ding L. Dendritic cell-derived exosome-entrapped fluorouracil can enhance its anti-colon cancer effect. *JBUON*. 2020;25(3):1413-1422.
264. Mhaidat N M, Bouklihacene M, Thorne R F. 5-Fluorouracil-induced apoptosis in colorectal cancer cells is caspase-9-dependent and mediated by activation of protein kinase C-delta. *Oncol Lett*. 2014;8(2):699-704.
265. Ozgocmen M, Bayram D, Yavuz Turel G, Togay V A, Sahin Calapoglu N. Secoisolariciresinol diglucoside induces caspase-3-mediated apoptosis in monolayer and spheroid cultures of human colon carcinoma cells. *J Food Biochem*. 2021;45(5):e13719.
266. Koch J, Monch D, Maass A, Gromoll C, Hehr T, Leibold T ve ark. Three dimensional cultivation increases chemo- and radioresistance of colorectal cancer cell lines. *PLoS One*. 2021;16(1):e0244513.

267. Cheng M, He B, Wan T, Zhu W, Han J, Zha B ve ark. 5-Fluorouracil nanoparticles inhibit hepatocellular carcinoma via activation of the p53 pathway in the orthotopic transplant mouse model. *PLoS One*. 2012;7(10):e47115.
268. Shi L, Sheng J, Chen G, Zhu P, Shi C, Li B ve ark. Combining IL-2-based immunotherapy with commensal probiotics produces enhanced antitumor immune response and tumor clearance. *J Immunother Cancer*. 2020;8(2).
269. Kano A. Tumor cell secretion of soluble factor(s) for specific immunosuppression. *Sci Rep*. 2015;5:8913.
270. Kim C H. Homeostatic and pathogenic extramedullary hematopoiesis. *J Blood Med*. 2010;1:13-9.
271. Wu Y, Deng Z, Wang H, Ma W, Zhou C, Zhang S. Repeated cycles of 5-fluorouracil chemotherapy impaired anti-tumor functions of cytotoxic T cells in a CT26 tumor-bearing mouse model. *BMC Immunol*. 2016;17(1):29.
272. Chang J, Bhasin S S, Bielenberg D R, Sukhatme V P, Bhasin M, Huang S ve ark. Chemotherapy-generated cell debris stimulates colon carcinoma tumor growth via osteopontin. *FASEB J*. 2019;33(1):114-125.

7. EKLER

EK-1 Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni



**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı : 52338575 - 53

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 23.08.2017 (ÇARŞAMBA)
TOPLANTI SAYISI	: 2017/08
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 2017/59
KARAR NUMARASI	: 2017/59 -06
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Prof. Dr. Erem BILENSOY
HAYVAN DENEYLERİNDEN SORUMLU ARAŞTIRMACI	: Doç. Dr. Güneş ESENDAĞLI, Uzm. Bio. Gamze VARAN, Uzm. Bio. Cem VARAN, Ecz. Safiye AKKIN
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	: Prof. Dr. Petek KORKUSUZ, Dr. Elif BİLGİÇ
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	: 133 Adet BALB/c Fare (6-8 Hafta)

Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Erem BILENSOY' un araştırma yürütücüsü olduğu 2017/59 kayıt numaralı *"İmmünokemoterapötik Nanoplekslerin Kolon Kanseri Tedavisinde Etkinlik ve Güvenliğinin in vitro – in vivo Değerlendirilmesi"* isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir. Kurul üyesi Doç. Dr. Güneş ESENDAĞLI çıkar çatışması nedeni ile tartışma ve oylamaya katılmamıştır.

Prof. Dr. Nüket Örnek BÜKEN
Başkan Vekili

Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 06100 Sıhhiye-Ankara
Telefon: 0 (312) 305 1000-1082 • Faks: 0 (312) 310 0580
www.etikkurul.hacettepe.edu.tr/index_bdk.php

Ayrıntılı Bilgi için:

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU GÜNDEMİ - İMZA SİRKÜLERİ
 TOPLANTI TARİHİ : 23.08.2017 (ÇARŞAMBA)
 TOPLANTI SAYISI : 2017/08
 TOPLANTI SAATİ : 13.30

(İZİNLİ) Prof. Dr. Sema ÇALIŞ (Başkan)	Prof. Dr. Nüket Örnek BUKEN (Üye)	Prof. Dr. M. Yıldırım SARA (Üye)
Doç. Dr. Meltem TUNCER (Üye)	Doç. Dr. A. Cevdet AKMAN (Üye)	(İZİNLİ) Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR (Üye)
Doç. Dr. Güneş ESENDAĞLI (Üye)	Doç. Dr. Aytekin AKYOL (Üye)	Doç. Dr. Ezgi KÖNÜK (Üye)
Doç. Dr. İlyas ONBAŞILAR (Üye)	(İZİNLİ) Doç. Dr. Mehmet Alper ÇETİNKAYA (Üye)	Yrd. Doç. Dr. Banu Cahide TEL (Üye)
Mevlüt OKSUZÖĞLU (Üye)	(İZİNLİ) Serdar ÇAKIROĞLU (Üye)	(İZİNLİ) Avukat Yasemin ÖZSELÇUK (Üye)

EK-2 Orijinallik Raporu Örneği**Dijital Makbuz**

Bu makbuz ödevinizin **Turnitin**'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Safiye Akkın
Ödev başlığı: Deneme
Gönderi Başlığı: İMMÜNOKEMOTERAPÖTİK NANOPEKSLERİN KOLON KANSE...
Dosya adı: Safiye_Tez_turnitin_2.pdf
Dosya boyutu: 4.19M
Sayfa sayısı: 178
Kelime sayısı: 37,566
Karakter sayısı: 244,352
Gönderim Tarihi: 07-Eki-2022 09:35ÖÖ (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 1919001506

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İMMÜNOKEMOTERAPÖTİK NANOPEKSLERİN KOLON
KANSERİ TEDAVİSİNDE ETKİNLİK VE GÜVENLİLİĞİNİN İN
VİTRO-İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ

Ecz. Safiye AKKIN

Farmasötik Teknoloji Programı
DOKTORA TEZİ

ANKARA
2022

İMMÜNOKEMOTERAPÖTİK NANOPLEKSLERİN KOLON KANSERİ TEDAVİSİNDE ETKİNLİK VE GÜVENLİLİĞİNİN İN VİTRO-İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 7	% 6	% 2	% 1
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 2
2	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1
3	Safiye Akkın, Gamze Varan, Davut Aksüt, Milo Malanga, Ayşe Ercan, Murat Şen, Erem Bilensoy. "A different approach to immunochemotherapy for colon Cancer: Development of nanoplexes of cyclodextrins and Interleukin-2 loaded with 5-FU", International Journal of Pharmaceutics, 2022 Yayın	<% 1
4	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<% 1
5	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<% 1
6	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1

EK-3 Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası

	HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURULU
<i>Deney Hayvanı Kullanım Sertifikası</i>	
<i>SAFİYE AKKIN</i>	
Orman ve Su İşleri Bakanlığı tarafından Onbeş Şubat İkibinondört tarihinde yayımlanan “Hayvan Deneyleri Etik Kurallarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik” uyarınca eğitim almış ve Deney Hayvanı Kullanım Sertifikası almaya hak kazanmıştır	
Prof.Dr. Sema ÇALIŞ Etik Kurul Başkanı	Prof.Dr. A. Haluk ÖZEN Rektör
KURS KATEGORİSİ : B BELGE NO: 2017/509 TARİH: 20.06.2017	
	
*Yürürlükte bulunan Orman ve Su İşleri Bakanlığı tarafından yürürlükte değildir	

EK-4 Tez Kapsamında Üretilen Yayınlar-1

webofscience.com/wos/woscc/summary/ce5ba485-fbd9-40e5-8cc7-757a7051210c-4cb4c902/relevance/1

Q A Review on Cancer Immunotherapy and Applications of Nanotechnology to Chemoimmunotherapy of Different Cancers (Title)

Copy query link

Publications You may also like...

Refine results

Search within results...

Filter by Marked List

Quick Filters

Authors

Show Researcher Profiles

Publication Years

0/1

Add To Marked List

Export

1

A Review on Cancer Immunotherapy and Applications of Nanotechnology to Chemoimmunotherapy of Different Cancers

Akkin, S; Varan, G and Bilensoy, E

Jun 2021 | MOLECULES 26 (11)

Clinically, different approaches are adopted worldwide for the treatment of cancer, which immunotherapy for cancer treatment has been the focus of attention in recent years, and system response to cancer cells both prophylactically and therapeutically. The applica...

Free Full Text from Publisher

Page size 50

1 record matched your query of the 85,126,321 in the data limits you selected.

Close Journal Information

MOLECULES

Journal Impact Factor™
2021
4.927

Five Year
5.11

JCR Category	Category Rank	Category Quartile
BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY <i>in SCIE edition</i>	114/256	Q2
CHEMISTRY, MULTIDISCIPLINARY <i>in SCIE edition</i>	65/179	Q2

Source: Journal Citation Reports 2021. Learn more

Journal Citation Indicator™
2021
0.64

New
2020
0.62

JCI Category	Category Rank	Category Quartile
BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY <i>in SCIE edition</i>	170/321	Q3
CHEMISTRY, MULTIDISCIPLINARY <i>in SCIE edition</i>	82/224	Q2

The Journal Citation Indicator is a measure of the average Category Normalized Citation Impact (CNCI) of citable items (articles and reviews) published by a journal over a recent three year period. It is used to help you evaluate journals based on other metrics besides the Journal Impact Factor (JIF).

Learn more

48

?

Review

A Review on Cancer Immunotherapy and Applications of Nanotechnology to Chemoimmunotherapy of Different Cancers

Safiye Akkın ¹ , Gamze Varan ² and Erem Bilensoy ^{1,*} 

¹ Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Hacettepe University, 06100 Ankara, Turkey;

² Department of Vaccine Technology, Hacettepe University Vaccine Institute, 06100 Ankara, Turkey;

* Correspondence:

Abstract: Clinically, different approaches are adopted worldwide for the treatment of cancer, which still ranks second among all causes of death. Immunotherapy for cancer treatment has been the focus of attention in recent years, aiming for an eventual antitumoral effect through the immune system response to cancer cells both prophylactically and therapeutically. The application of nanoparticulate delivery systems for cancer immunotherapy, which is defined as the use of immune system features in cancer treatment, is currently the focus of research. Nanomedicines and nanoparticulate macromolecule delivery for cancer therapy is believed to facilitate selective cytotoxicity based on passive or active targeting to tumors resulting in improved therapeutic efficacy and reduced side effects. Today, with more than 55 different nanomedicines in the market, it is possible to provide more effective cancer diagnosis and treatment by using nanotechnology. Cancer immunotherapy uses the body's immune system to respond to cancer cells; however, this may lead to increased immune response and immunogenicity. Selectivity and targeting to cancer cells and tumors may lead the way to safer immunotherapy and nanotechnology-based delivery approaches that can help achieve the desired success in cancer treatment.

Keywords: cancer; nanoparticle; immunotherapy; macromolecule delivery; targeting



Citation: Akkın, S.; Varan, G.; Bilensoy, E. A Review on Cancer Immunotherapy and Applications of Nanotechnology to Chemoimmunotherapy of Different Cancers. *Molecules* **2021**, *26*, 3382. <https://doi.org/10.3390/molecules26113382>

Academic Editor: Gerardo Byk

Received: 12 May 2021

Accepted: 1 June 2021

Published: 3 June 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Cancer is a complex disease characterized by uncontrolled growth of cells and expansion of these abnormal cells in the body, which caused over 9.6 million deaths worldwide in 2017 alone [1]. Regarding the estimation of American Cancer Society for 2021, specialists consider that nearly 1.9 million people will be diagnosed with cancer and almost 608,570 people will die from cancer [2]. The cancer-related mortality in the world is expected to reach 22 million by the year 2030.

Among the various approaches employed in cancer treatment, surgery is usually the first treatment of choice. The appropriate strategy for treatment is developed according to the type and stage of cancer. Other treatment methods in clinical practice are chemotherapy and radiotherapy and combinations of these approaches. Chemotherapy using various antineoplastic agents can be applied as first line treatment for therapeutic purposes, but also to prevent the proliferation of cancer cells after surgery or radiotherapy or to reduce the size of tumor tissue prior to surgery. Today, although it is possible to treat cancer with one treatment method alone or with a combination of different treatment methods, the desired success rate in cancer treatment has not yet been achieved. The main reason for this failure is the systemic toxicity and undesired side effects caused by the treatment strategy, particularly for chemotherapy. In order to overcome these side effects and provide more effective cancer treatment with lower doses of active ingredient, different treatment strategies have been developed. Immunotherapy, which has attracted attention in recent years, can be defined as the use of immune system features in cancer treatment [3]. In other

words, immunotherapy is defined as a type of biotherapy and is based on the sensitization of the patient's immune system to cancer, which increases selectivity and reduces side effects [4]. The prevalence of cancer immunotherapy in clinical trials led to the selection of cancer immunotherapy as the "2013 Breakthrough of the Year" by *Science* [5].

As with other treatment methods, immunotherapy is subject to some limitations because it may impair immune homeostasis by causing an immune reaction that should not be employed against normal tissue. For instance, inflammation, colitis and pruritus can be observed frequently depending on dosage of drugs and personal factors [6]. However, positive results are obtained in immunotherapy studies that target minimum side effects compared to conventional treatments. Therefore, the advances and improvement in immunotherapy through nanotechnology and nanoparticulate delivery systems may have a positive impact on treatment success.

In this review, cancer immunotherapy is explained, and the clinical applications are detailed. In addition, the role and privileges of immunochemotherapy and nanoparticulate delivery systems in immunotherapy are summarized in the light of preclinical studies and recent literature.

2. The Immune System and Its Role in Cancer Immunotherapy

The immune system consists of innate and adaptive immune components (Table 1). The innate arm is the first defense mechanism against the antigen and is responsible for generating sudden and short-lived responses with monocytes, macrophages, dendritic cells and natural killer cells. Innate system cells are in charge of recognition of non-host cells and the presenting of cells of antigenic nature to adaptive system cells. Innate immune system cells have receptors to recognize microorganisms, damaged cells and transformed cells, i.e., tumor cells.

Table 1. Immune system types and constituents.

Innate Immunity	Adoptive Immunity
Epithelial barriers	B Lymphocytes
Phagocytes (Macrophage ex.)	T Lymphocytes
Mast cells	
Dendritic cells	
Natural killer and other innate lymphoid cells	
Complement proteins	

On the other hand, the adaptive arm produces long-lasting responses using T cells and B cells, eventually generating immune memory [7]. Adaptive immunity is based on T and B-lymphocytes that proliferate after recognition and destroy antigenic structures by stimulating various mechanisms. Besides these cells, the immune system's constituents include cytokines, antibodies, plasma and adhesion molecules, tissues and organs such as the thymus, bone marrow and spleen [8].

Cancer growth and metastasis are able to exert immunosuppression mechanisms that prevent cancer from being recognized by immune system. Thus, cancer immunotherapy aims to activate the immune system against these malignant cells [5]. Immunochemotherapy is orchestrated to stimulate patient's own immune system passively or actively to recognize and destroy damaged or abnormal cells. Cancer immunotherapy is significantly advantageous in preventing recurrence by regulating the tumor microenvironment and reducing the presence of tumor neoantigen [5]. The immune system tries to detect the cancer cells and nascent tumors and this is called "immune surveillance of cancer". The detection and destruction of damaged or cancer cells by the immune system is a complex pathway that develops as a result of the coordination of many cells. The most important component of this multistep process is tumor-associated antigens (TAAs). TAAs are released from dead tumor cells and greatly occupy the tumor surface and are presented to T cells with antigen-presenting cells (APCs) such as dendritic cells (DC), macrophages

and B lymphocytes. The main function of DCs of the innate system is to recognize microorganisms, damaged cells and transformed cells, such as cancer cells, using Toll-like receptors (TLRs) and nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors [9]. TLRs can be expressed on tumor cells as well as on other immune cells such as T cells and MDSCs. In particular, TLR-4 can detect damaged cell pathogen-associated molecular patterns and damage-associated molecular patterns [10]. Another component that plays a role in this field is TLR-9, which is expressed on DCs and NK cells. Clinical trials on stand-alone or combination therapy based on TLR-9 are ongoing [11]. After recognition of a foreign or harmful structure, the DCs retain this antigenic structure to present and activate the adaptive immune system cells by modifying their own surface with antigens and presenting them to the T cell receptors via the class I and II major histocompatibility complex (MHC) in the lymph nodes [12,13]. Class I MHC molecules can induce $CD8^+$ T cells, which are called cytotoxic T cells (Tc) [14], that are able to destroy tumor cells and consequently offer more TAAs to enhance the immune response. This pathway is called “Cancer-Immunity Cycle” (Figure 1) [15]. Other member of the MHC molecule, class II MHC molecule, also has epitopes to be recognized by $CD4^+$ T cells, which are T helpers (Th) [14]. After recognition, T cells are activated and proliferated, and the cells which have these tumor specific epitopes are called effector T cells.

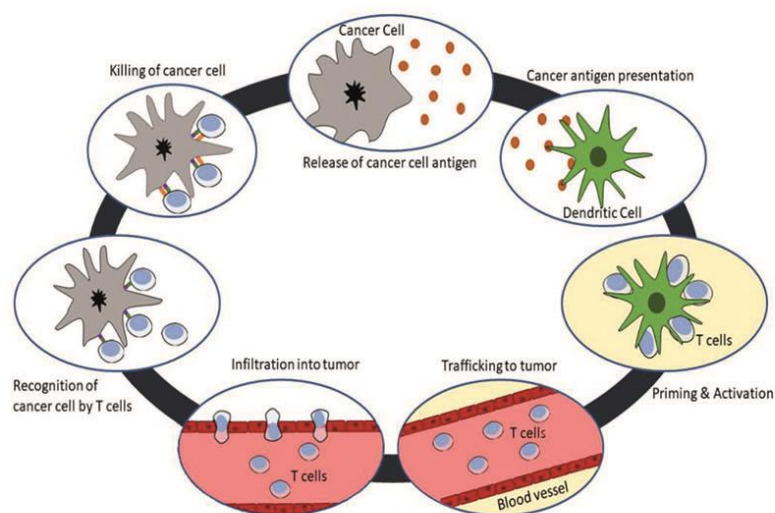


Figure 1. The cancer immunity cycle. This cycle starts with the release of antigens from cancer cells and ends with the formation of immunity to the cancer cell, and many different cells play a role in this natural process.

The immune system attempts to eradicate cancer cells even if the tumor continues to grow and differentiate. This pathway is the process of immuno-regulation and involves different cell types and factors [15]. For example, T cells may emit inhibitory signals, such as Natural killer (NK) cells, stimulatory or regulatory T cells (Tregs) [12]. Tregs produce high levels of TGF- β and interleukin-10 (IL-10) to inhibit cytotoxic T-lymphocytes and APCs in addition reduce the immunogenic effect by reducing ATP assembly in the extracellular environment [16]. Similar to Tregs, myeloid-derived suppressor cells (MDSC) do not have a direct anti-tumor effect, but they reduce arginine amino acid, nitric oxide synthase and interleukin-2 (IL-2) levels by expressing arginine I in effector T cells [17]. Moreover, in cancer treatment, different cytokines are used for the induction of DCs and NK cells and proliferation of T cells, especially cytotoxic T lymphocytes (CTLs). Cytokines

released from many different cells are the main mediator molecules in immune system cells and regulate the immune and inflammatory responses. Cytokines are a large family that consist of many proteins such as interleukins (ILs), colony-stimulating factors (CSFs), interferons (IFNs), tumor necrosis factors (TNFs) and transforming growth factor (TGF- β). In cancer treatment, different cytokines are used for the induction of DCs and NK cells and the proliferation of T cells, especially cytotoxic T lymphocytes (CTLs). In clinical use for the treatment of cancer, high-dose cytokine administration is required to induce tumor regression [18,19].

The tumor microenvironment is characterized by enhanced vascularization, hypoxia, reduced pH and increased interstitial blood pressure besides the immune cells [20]. This complex feature is a barrier restricting drug permeation into solid tumors and the activation of immune cells in tumor microenvironment. Moreover, the tumor microenvironment plays an important role in tumor development, and especially metastasis, by protecting itself from the immune system through various mechanisms. In this regard, the most widely known mechanism is that the presence of hypoxia induces tumor-associated macrophages and promotes tumor progression. (TAMs) [21]. Besides, tumor cells can protect themselves from the immune system by reducing the levels of MHC class I molecules or inducing mutation in MHC class I genes. In addition, tumors are able to express B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) gene to inhibit apoptosis and act as signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) as oncogenic molecules [22].

Tumor metastasis is a multistage process in which malignant cells spread from the primary tumor to the organ via blood and lymphatic circulation. Basically, tumor growth and metastasis are caused by angiogenesis and lymphangiogenesis triggered by chemical signals from tumor cells. Therefore, cancer cells change the normal immune mechanism and try to avoid the immune system by regulating new antigens and proteins (Figure 2) [23]. For example, tumors change the DC phenotype through their microenvironment and the change in DC phenotype causes the differentiation of MDSC and M2 macrophages. As a result of this differentiation, the activation of antitumor CTL and Th1 cells is inhibited and the release of growth factors necessary for the tumor increases [24]. Another immunosuppressive agent available in the tumor microenvironment is the M2-like type macrophage stimulated for IL-10, arginase I, and TNF-secretion [15].

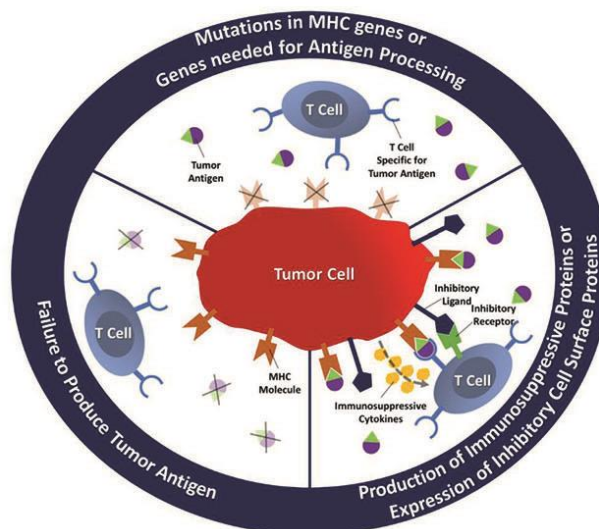


Figure 2. Mechanism of tumor escape from the immune system.

The strategies developed by the tumor to escape the immune system are based on blocking the activity of T cells because when the T cell recognizes the tumor, antitumor activity is stimulated. Suppressing the production of antigens necessary for the T cell to recognize that the tumor is a way of hiding the tumor from the immune system. The tumor that avoids antigen production cannot be recognized by T cells and antitumor activity cannot be triggered. The tumor can also inhibit antigen processing by causing mutations in genes such as MHC gene required for antigens [25]. In addition, the tumor microenvironment may exhibit immunosuppressive properties due to various cytokines such as vascular endothelial growth factor (VEGF), interleukins, and transforming growth factor beta (TGF- β), secreted by both cancer and immune system cells.

Tumorigenesis is a very complex process in which many metabolic changes occur, from cancer cell differentiation to metastasis. Changes in this process are in favor of tumor development. The tumor metabolism is specialized to provide the energy and factors, such as protein and DNA, necessary for the rapid division and proliferation of cancer cells and their survival. Significant changes occur in the mitochondria of cancer cells, both to prevent apoptotic effects and to provide the necessary energy in a short time. Unlike healthy cells, lactate dehydrogenase [4] accumulation is observed in cancer cells that prefer glycolysis even in the presence of oxygen. This metabolic change, known as the “Warburg Effect”, is known to be caused by oncogenes. The high concentration of LDH accumulated in the cancer cell causes direct suppression of the immune system by inhibiting CTLs and preventing the conversion of monocytes to DCs. This is another strategy for cancer cells to escape from the immune system [26].

3. Strategies in Cancer Immunotherapy

The efficacy of cancer immunotherapy has been demonstrated by clinical studies as well as in vitro and in vivo studies [22]. There are many different immunotherapeutic drugs approved by the Food and Drug Administration (FDA) to be used in cancer therapy: recombinant-human-IL-2 for renal cancer cell therapy; first monoclonal antibody for B-cell malignancies; first DC-based cancer vaccine for prostate cancer therapy; chimeric antigen receptor (CAR)-engineered cell therapy for B-cell lymphoma; and programmed death ligand-1 (PD-L1) immune checkpoint blockers for melanoma are examples of immunotherapeutics approved for use in the treatment of cancer in the last thirty years [27]. The evaluation of more than 40 antibodies in cancer are continued in late-stage clinical studies.

On the other hand, immunotherapeutics administered in combination therapy can be considered a reasonable and effective way to treat cancer [12]. The FDA and European Medicines Agency (EMA) approved two vaccines—T-VEC (ImyIgc[®]) to induce DC production in melanoma and Sipuleucel-T (Provenge[®]) to supply genes expressing granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in metastatic prostate cancer, respectively [28]. More than 80 antibody-based products are already approved by the FDA and EMA [29]. Furthermore, ipilimumab, pembrolizumab, nivolumab, atezolizumab, durvalumab, cemiplimab and avelumab are immune checkpoint inhibitors (ICIs) approved by the FDA and authorized by the EMA in the last seven years [30]. For unresectable or metastatic hepatocellular carcinoma, atezolizumab and bevacizumab are approved as combined therapy by the FDA in 2020 [31]. Meanwhile, the FDA has promoted different combinations of immunotherapy, such as ipilimumab plus T-VEC, pembrolizumab plus T-VEC, ipilimumab plus peptide vaccine, nivolumab plus peptide vaccine and pembrolizumab plus viral vaccine in melanoma, and ipilimumab plus Sipuleucel-T in prostate cancer [32].

Cancer immunotherapy strategies are basically divided into four types (Figure 3): immunomodulation, adoptive cellular therapy, targeted antibodies and cancer vaccines.

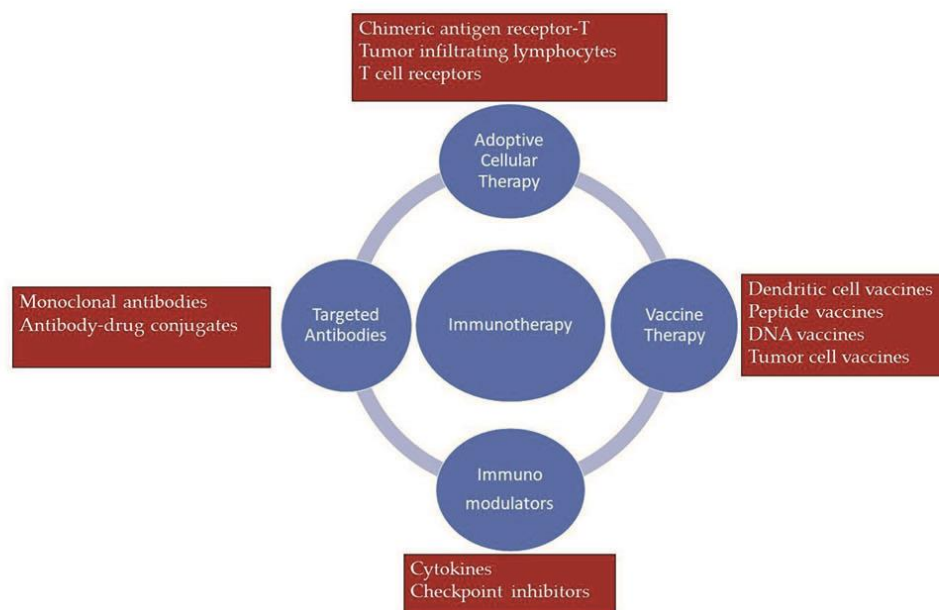


Figure 3. Immunotherapy approaches for cancer treatment.

- (A) **Immunomodulation** focuses on improving the immune response by priming the host immune system. Although different agents play a role in immunomodulation, the basic approach is based on the stimulation of antigen presenting cells to T cells and consequently the further killing of tumor cells by T cells. Cytokines are the leading immunomodulation agents. There are several cytokine-based immunomodulators approved for use in immunotherapy of different cancer types. For example, Aldesleukin (Proleukin®) is a synthetic form of IL-2 produced by recombinant DNA technology and is approved for the treatment of kidney cancer and melanoma [33]. Another example is interferon alfa-2b (Intron A®), also produced by recombinant technology and used in the treatment of leukemia, lymphoma and melanoma [34].

Another immunomodulator group used in cancer immunotherapy are checkpoint inhibitors. Checkpoint inhibitors act by blocking the proteins that prevent the immune system from attacking cancer cells. According to their mechanism of action, they can also be defined as targeted therapy, because checkpoint inhibitors inhibit specific proteins on the T cell or cancer cell. For example, Ipilimumab (Yervoy®), developed to inhibit CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte associated protein 4) expressed on T cells, is used in the treatment of advanced melanoma. Normally, CTLA-4 is a protein receptor that acts as an immune checkpoint that downregulates immune responses. In this way, it prevents the immune system from attacking healthy cells in autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis and ulcerative colitis. However, in the treatment of melanoma, the aim is to increase the attack of T cells to the tumor by inhibiting this CTLA-4 receptor [35]. PD-L1 is one of the cell surface proteins expressed on cancer cells that functions as an immune system suppressor. Atezolizumab (Tecentriq®), developed as a PD-L1 inhibitor, is used in the treatment of lung cancer and urothelial cancer [36]. Although a limited patient group benefits from immune checkpoint blockers with close to 40% response rates in the clinics, the effect depends on the T cell levels at the tumor site. For this reason, these agents are combined with other chemotherapeutics, radiotherapeutics or vaccines. In addition, recent studies have shown that some chemotherapeutic agents, such as Doxorubicin, have induced

host immune system when used alone or combined with immunotherapy. Moreover, the research on the efficacy of doxorubicin and immune checkpoint blockers is ongoing in clinical trials (NCT04028063). It is known that doxorubicin can induce antitumor T cell responses that induce immunogenic cell death by releasing calreticulin (CRT) and high mobility group box 1 (HMGB1) [27,37]. In a study, α PD-L1 and α CTLA-4 antibodies combined with IL-2 in collagen-binding domain (CBD). Tumor volume was reduced in the melanoma, colon, and breast tumor models in the CBD-IL2-treated group. However, when CBD-ICI and CBD-IL2 were administered together, it was emphasized that the tumor was almost completely destroyed in the breast tumor model and a survival rate of 69% was achieved after 100 days [38]. In another study CBD combined with the chemokine CCL4 and its effectiveness was evaluated in multiple tumor models. In addition to increased tumor accumulation, overexpress of DC and T cells was been reported [39]. IL-12 was combined with CDB to minimize its adverse effects and its efficacy was evaluated after intravenous administration in a melanoma model. As a result of the study, it was reported that IFN- γ , ALT and AST levels were decreased compared to free IL-12. While short-term tumor shrinkage was observed when IL-12 was administered alone, a long-term antitumoral response of nearly 60% was obtained when IL-12 and ICI were administered in combination [40]. In addition, clinical trials are ongoing on new immune checkpoint inhibitors. For example, success in the treatment of solid tumors is observed in phase I studies with antibodies targeted to CD47, CD73, A2Ar and TIM-3 [41].

(B) **Adoptive cell therapy** is a type of immunotherapy applied to help the immune system fight cancer cells. In cellular immunotherapy, T cells are used in different ways by taking advantage of their natural abilities to eliminate cancer cells (Figure 4). Basically, T cells are collected from the cancer patient's blood or tumor tissue and then changed in the laboratory to better target the cancer cells and then given to the patient [42]. The presence of T cells may not always be sufficient to eliminate cancer cells. Killer T cells must also be present in a sufficient number of tumor sites, be pre-activated and maintain their activity until the tumor is completely eliminated. Tumor-Infiltrating Lymphocyte (TIL) therapy, one of the adoptive cell therapy applications, is an immunotherapy approach that aims to provide all of these conditions. In TIL treatment, T cells that have already infiltrated the tumor tissue of the patient with cancer are collected, expanded and re-infused into the patient in order to provide a sufficient number. Despite the promising benefits of TIL therapy, it has some limitations. Unfortunately, although T cells are reproduced in vitro conditions, sometimes sufficient numbers are still not achieved in patients. To overcome this problems, engineered T cell receptor (TCR) therapy using peripheral lymphocytes has been developed with a genetic engineering approach. This approach not only activates and expands existing anti-tumor T cells, but also enables the T cells to target specific cancer antigens. In both TIL and TCR treatment approaches, only cancer cells presenting their antigens can be targeted. T cells can recognize cancer thanks to the MHC-mediated presentation of specific antigens expressed on the surface of cancer cells. In the chimeric antigen receptor (CAR-T) approach developed to overcome this limitation, T cells recognize cancer cells as MHC-independent. This approach is an example of personalized medicine practice and the FDA and EMA have also approved CAR-T therapeutic products Kymriah[®] and Yescarta[®] for use in lymphoma treatment [43].

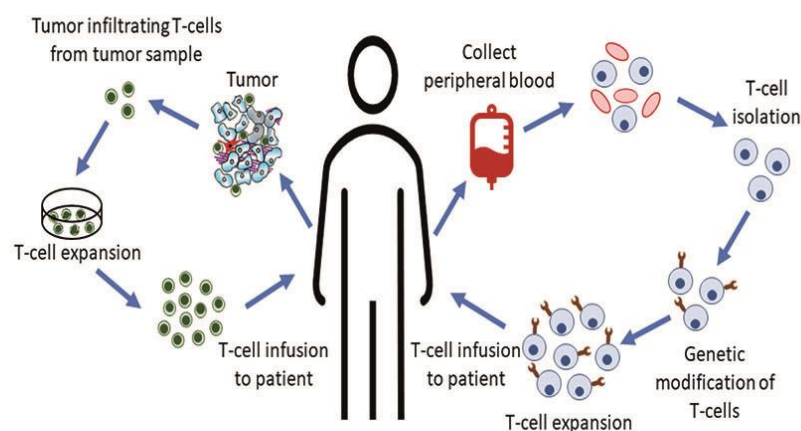


Figure 4. Adoptive cell therapy approaches.

- (C) **Targeted Antibodies:** Monoclonal antibodies (mAbs) can be briefly defined as antibodies that bind to specific parts of an antigen. The high specificity of monoclonal antibodies binding to cancer cells has made it inevitable that it would be used in cancer treatment. mAbs have been researched for use in cancer treatment for many years and there are a variety of products on the market. The idea of benefiting from active targeting in cancer treatment has made the use of mAbs inevitable. In particular, the discovery of tumor-specific antigens has increased the interest in mAbs. The main reason for using mAbs in chemotherapy is that systemic toxicity can be prevented. For this reason, versatile research continues for the use of mAbs in cancer treatment. Rituximab, developed for CD20 expressed on the surface of B cells in non-Hodgkin lymphoma, is the first mAb used in cancer treatment. Subsequently, anti-HER2 Trastuzumab for breast cancer treatment and anti-VEGF Bevacizumab and anti-EGFR Cetuximab for colorectal cancer treatment were approved. To date, approximately 30 mAbs are FDA-approved for use in cancer treatment and are on the market [44,45]. mAbs can be used alone in cancer treatment or in combination with anticancer agents. This technological approach, called antibody–drug conjugate, aims to carry anticancer drugs to the tumor via mAbs produced specifically on the cancer cell surface antigen. In this way, a form of chemotherapy with increased efficiency and reduced side effects is provided [46]. Kadcyla is an antibody–drug conjugate approved by the FDA and EMA in 2013 for use in the treatment of HER2-positive metastatic breast cancer [47]. It is a combination of anti-HER2 Trastuzumab and DM1, a chemotherapy drug effective on microtubules. Adcetris is a conjugation of Brentuximab (chimeric IgG1) that targets CD30 on the cancer cell surface and the cytotoxic agent monomethyl auristatin E. It was approved by the FDA in 2011 and then by the EMA in 2012 for use in the treatment of Hodgkin lymphoma [48]. The mAbs and antibody–drug conjugate that have been approved for use in cancer treatment are summarized in Table 2.

Table 2. Summary of monoclonal antibodies used in the treatment of cancer in the clinic.

Name	Target	Antibody/Cytotoxic Agent	Indication(s)
Rituximab (MabThera [®] , Rituxan [®])	CD20	Human–mouse chimeric IgG1κ	Non-Hodgkin's lymphoma
Ibritumomab (Zevalin [®])	CD20	Murine IgG1κ linked chelator tiuxetan	Non-Hodgkin's lymphoma
Ofatumumab (Arzerra [®])	CD20	Fully human IgG1κ	B-cell CLL
Obinutuzumab (Gazyva [®] , Gazyvaro [®])	CD20	humanized mAb of IgG1κ	CLL
Isatuximab (Sarclisa [®])	CD38	Chimeric IgG1	Multiple myeloma
Daratumumab (Darzalex Faspro TM)	CD38	Human IgG1	Multiple myeloma
Necitumumab (Portrazza [®])	EGFR	Human IgG1	Non-small cell lung cancer
Cetuximab	EGFR	Chimeric IgG1	Colorectal cancer; Head and neck squamous cell carcinoma
Panitumumab	EGFR	Human IgG2	Colorectal cancer
Bevasizumab	VEGF	Humanized IgG1	Colorectal cancer; Non-small cell lung cancer; Renal cancer; Glioblastoma; Ovarian cancer
Ramucirumab	VEGFR2	Human IgG1	Gastric cancer
Pertuzumab	HER2	Humanized IgG1	Breast cancer
Trastuzumab	HER2	Humanized IgG1	Breast cancer

The previously mentioned approaches (adoptive cellular therapies, targeted antibodies and immunomodulators) used in cancer immunotherapy are grouped as passive immunotherapy. In passive immunotherapy, ex vivo activated cells are used to stimulate the immune system against cancer cells.

(D) **Vaccine** use in cancer immunotherapy is an example of active immunotherapy. In active immunotherapy, the aim is to activate the effector functions of the immune system [49]. The main purpose of cancer vaccines containing tumor cells or antigens is to stimulate the immune system, destroy the tumor and prevent relapse. Cancer vaccines are responsible for introducing specific antigens expressed on the surface of cancer cells to the immune system. With the elucidation of the structures of cancer cell specific tumor-associated antigens, interest in cancer vaccines is increasing day by day. These antigens are combined with adjuvants and used to activate the immune system against cancer. Cancer vaccines are developed to prevent or treat cancer. For example, there are vaccines for human papillomavirus (HPV), which is associated with different types of cancer such as cervical, vaginal and throat is done to prevent cancer. Similarly, the Hepatitis B (HBV) virus can be used to reduce the risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease. In cancer vaccines developed for therapeutic purposes, adjuvants that help increase the immune response are generally used. Sipuleucel-T (Provenge), the first commercially available cancer vaccine, is a dendritic cell-based vaccine developed for the treatment of hormone-refractory prostate cancer [50]. Talimogene laherparepvec (T-VEC) is a vaccine used in the treatment of melanoma and is an oncolytic herpes simplex virus developed with a genetic engineering approach. It is also the first FDA-approved oncolytic viral therapy product [51,52].

4. Nano-Immunotherapy Applications in Cancer Treatment

Nanomedicines benefit from the present innovative and targeted approaches to the selective treatment of cancer. With this technology, several nano-sized drug carrier systems have been developed to overcome biodistribution and pharmacokinetic problems of active pharmaceutical ingredients (APIs). The use of nanoparticulate systems in cancer started in 1995 with the FDA approval of Doxil[®] (PEGylated liposomal doxorubicin). Then, in 1996, Doxil[®] was approved by the EMA under the trade name Caelyx [53]. Since then, FDA and EMA approved nanosystems have increased rapidly. About 55 nanomedicines are currently

used in clinical settings and more than half of them have reached the market for cancer therapy. The combination of two innovative strategies in cancer treatment, immunotherapy and nanotherapy, are promising fields. Currently, there are over 100 clinical studies using combinations of different immunotherapeutic and nanocarriers. Besides the clinical studies, the combination of atezolizumab (Tecentriq) with Abraxane was approved by the FDA for use in the treatment of metastatic triple negative breast cancer [54]. However, atezolizumab is not approved for use with Taxol (paclitaxel). This strategy is the first approved example of the combined application of nanomaterials with biological therapeutics in cancer treatment.

Nanoparticulate carrier systems have been investigated for use in cancer treatment for many years with several advantages as a result of their unique structures (Figure 5) listed as follows:

- Nanoparticles interact directly with the cell membrane and intracellular structures, avoiding the drug resistance mechanism by bypassing the cellular efflux pump and increasing uptake into tumor cells.
- Nanoparticulate systems increase the cellular uptake and accumulation of the transported drugs into the tumors.
- Nanosystems enhance the efficiency and stability of active molecules by protecting them from biological factors such as enzymes during blood circulation.
- The surface of nanosize carriers can be modified to active targeting or also targeted passively thanks to their particle sizes. Long-term circulation of these nanoparticles can strengthen the targeting ability.
- Nanomedicines provide enhanced immune responses in comparison to the use of conventional immunotherapy alone.

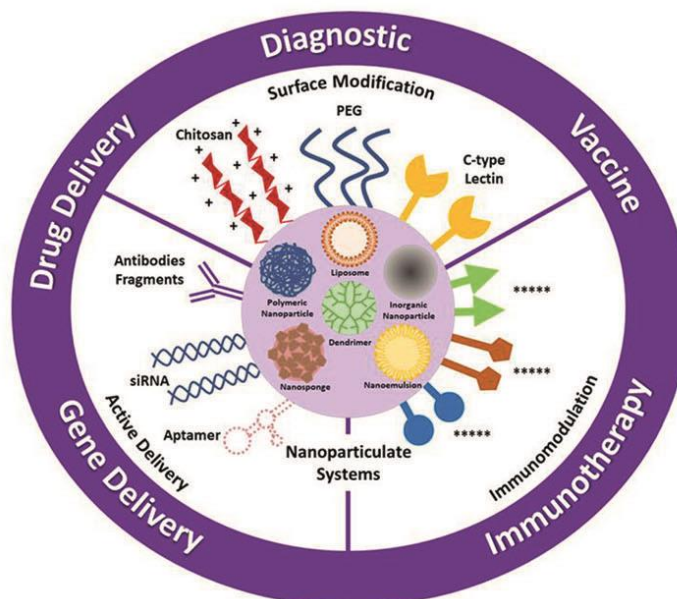


Figure 5. Various types of nanoparticulate delivery systems and possible approaches in cancer therapy.

Nanoparticulate systems increase the response of the immune system through various mechanisms, i.e., by targeting specific immune cells, activating and enabling immune cells to recognize cancer cells [53]. By using nanocarrier systems, it is possible to protect the active molecule from biological factors and to deliver the drugs effectively to cancer tissues.

Thanks to these advantages, nanoparticles are used in cancer nano-immunotherapy for the delivery of cytokines, vaccines, immune checkpoint inhibitors, agonistic antibodies and engineered T cells [13]. Another advantage of using nanoparticles in cancer immunotherapy is that systemic toxicity can be eliminated with these delivery systems. Immunotherapy may cause severe side effects and toxicity commonly characterized by skin reactions such as pain, swelling, redness, itchiness, rash and soreness. In addition, gastrointestinal side effects such as diarrhea, vomiting, colitis and also neurotoxicity, endocrine problems and pneumonia are the other adverse effects of conventional immunotherapy [14,55]. Nanosystems can help in reducing the amount of immunotherapeutic required for treatment. Moreover, they can help the active ingredient to accumulate at the tumor site avoiding other organs to overcome systemic side effects [21,56]. Besides active targeting, it is also possible to benefit passive targeting in cancer immunotherapy. As in chemotherapy, the enhanced permeability and retention effect due to the natural structure of the tumor microenvironment also enables the use of nanoparticles in immunotherapy by using passive targeting. Different nanoparticles, such as polymeric, lipid-based or metallic particles, are used as delivery systems for genes and drugs in cancer immunotherapy. Examples of studies performed in this field in the last 5 years are summarized in Tables 3 and 4.

Table 3. Summary of several nanoparticulate drug delivery systems on cancer immunotherapy.

Nanocarrier	Chemotherapeutic Load	Immunotherapeutic Load/Cell	Therapeutic Indication	Findings
Thermosensitive PLGA nanoparticle	Doxorubicin	IFN- γ	Melanoma	Increased cytokine levels and drug circulation [57]
Immunoliposome	-	Fab segment of anti-PD-L1	Melanoma	Similar antitumoral effect with lower dose than anti-PD-L1 and Long circulation time [12]
Poly (propyl acrylic acid) nanoplex	-	Decalceine modified antigenic peptide	Melanoma	Increased activation of CD8 ⁺ T cells and prolong antigen uptake [58]
ChitosanNanoparticle	-	OVA	Melanoma	Promoted DC maturation, induced antigen specific CD8 ⁺ T cells and increased anticancer efficacy [59]
PEG-b-PAEMA pH-sensitive cluster nanoparticles	Platinum prodrug	BLZ-945	Colon cancer	Reduced tumor volume and TAM level [60]
High density lipoprotein nanodisc	Doxorubicin	Anti PD-1	Colon cancer	Higher antitumor effect No toxicity and liver metastasis [27]
Lipid nanocapsule (MPB-DOPE and DOPG)	SN-38	Functionalized T cells with SN-38 nanocapsule	Lymphoma	Highly concentrated in lymph node than free drug, reduced tumor burden and enhanced survival rate [61]
Polyglycerol and Cyclic tripeptides of L-arginine, glycine and L-aspartic acid nanodiamond	Doxorubicin	Nano-DOX delivery was provided with DC-mediated.	Glioblastoma	Activation of DC and lymphocytes, Stimulated glioblastoma cells' immunogenicity [62]

Abb: MPB-DOPE (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[4-(p-maleimidophenyl) butyramide]; DOPG (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol); SPC (Soy phosphatidylcholine); (DSPE-PEG-Mal) 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N[maleimide(polyethyleneglycol)-2000] (ammonium salt); OVA ovalbumin.

Table 4. Summary of several nanoparticulate gene delivery systems on cancer immunotherapy.

Nanocarrier	Gene System	Combined Drug	Therapeutic Indication	Findings
Multi-walled carbon nanotubes	OVA AntiCD40 CpG	-	Melanoma	Enhanced antigen specific T cells, reduced tumor volume [63]
Polyethyleneimine nanoplexes	VEGFR-2 encoded DNA	-	Melanoma	Increased IL-2, IFN- γ , TNF- α Reduced tumor volume, enhanced survival rate [64]
Lipid nanoparticle (DOPE and Cholesterol)	p-DNA	Anti PD-L1	Melanoma	Enhanced antitumoral effect [65]
Lipoplex (DOTAP and m-PEG-PLA)	p-IL-15	-	Colon cancer	Increased IL-15 and TNF- α , induced apoptosis in tumor and inhibited tumor cell proliferation [66]
1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium propane and dioleoylphosphatidyl ethanolamine nanocomplex	SGT-53 plasmid	Anti PD-L1	Lymphoma	Enhanced immune response, reduced tumor volume and lung metastasis [67]
Poly (propylene sulfide) and Dextran nanoparticle	CpG	OVA	Lymphoma	Stronger CD8 ⁺ T cells activation [68]
DOTAP lipid nanoparticle	p-CXCL12 and p-PD-L1	-	Pancreatic cancer	Enhanced accumulation in tumor, increased CD8 ⁺ T cells, IL-12a, TNF- α , IFN- γ level [17]
Cationic polylactic nanoplexes	IL-8 siRNA	-	Prostate cancer	Increased IL-8 expression, Reduced tumor volume [69]
Multi-walled carbon nanotubes	CpG	-	Prostate cancer	Increased T cells and IL-6 level and suppressed tumor growth [70]
PEGylated lipid polyplex	p-IL-15	-	Hepatocellular carcinoma	Increased lymphocytes, IFN- γ , IL-12 [71]
Lipid nanoparticle	IL-12 mRNA	-	Hepatocellular carcinoma	Augmented CD4 ⁺ T cells Reduced tumor burden [72]
Gal-C-dextran nanocomplex	CpG AntiIL-10 AntiIL-10R	-	Hepatocellular carcinoma	Induced TAMs mediated immune activity Enhanced tumor accumulation [73]
Folic acid-functionalized PEI nanoparticle	PD-L1 siRNA	-	Ovarian cancer	Knockdown of PD-L1 Increased sensitivity cancer cells [74]
Nanodisc (ApoA-I peptide, Sphingomyelin and Cholesterol)	CpG	Doxorubicin	Glioblastoma	Enhanced tumor regression and survival rate [75]

The purpose of this review is to summarize the applications of cancer immunotherapy with a focus on nanosystems. In this context, the most recent nano-immunotherapy approaches for the most common types of cancer have been compiled.

4.1. Nano-Immunotherapy of Melanoma

Melanoma has the fastest increase in incidence among cancer types. Current treatment includes surgery, chemotherapy, targeted therapy or radiation therapy [76]. Immunotherapy is generally used in the treatment for stage III and IV melanoma. Treatment with immunotherapy may use immune checkpoint inhibitors (Keytruda® and Opdivo®), cytokines (IFN and IL-2), or imiquimod cream. Cancer vaccines, which are another immunotherapy approach used in the treatment of melanoma, attract great attention. There are many vaccines for this purpose in clinical trials. One of these vaccines is NeoVax (NCT01970358), a

personalized neoantigen cancer vaccine consisting of peptide plus poly-ICLC (Polyinosinic-Polycytidylic acid stabilized with polylysine and carboxymethylcellulose, also known as Hiltonol®). Another example of a vaccine, NEO-PV-01 (NCT02897765), consists of nivolumab and an adjuvant and is evaluated for the treatment of melanoma, bladder and lung cancers [77]. IVAC® Mutanome (NCT02035956) has been investigated for stage III and IV melanoma patients. It is the first fully personalized RNA vaccine concept. Reportedly, vaccination with IVAC® Mutanome was very well tolerated and showed high immune-enhancing effect [78]. Clinical studies have shown that immunotherapy can be a good treatment option especially in the spread and invasion of melanoma cells in lymph nodes. However, the expected therapeutic response from conventional immunotherapy fails due to high cytotoxicity to immune cells such as monocytes, macrophages, NK cells, hepatocytes and neurons [55]. In such cases, biochemotherapy and new delivery systems, such as those that combine nanoparticles and immunotherapy or chemotherapy, gain importance [79].

As mentioned above, nanoscale systems are utilized to improve the effectiveness of treatment by eliminating toxicity caused by conventional immunotherapy [80–82]. For example, the transport of IL-2 with adenovirus was developed by modifying T cells as stimulants and inducers of NK and B cells. In order to overcome the immunogenicity caused by the adenovirus, a new carrier system needs to be developed. For this purpose, Yao et al. prepared β -cyclodextrin and folate conjugate polyethyleneimine polyplexes as non-immunogenic vehicle for IL-2. This nanosystem was designed as a polycationic vector. For this purpose, cationic charge was achieved by using polyethyleneimine. In addition, active targeting is achieved through modification with folic acid. It was emphasized that the toxicity caused by multiple dosing, which is required in the IL-2 treatment regimen, can also be avoided thanks to active targeting. The *in vivo* studies revealed that dose-dependent antitumoral effect was observed in melanoma-induced mice. The activities of the viral vector and polyplex as IL-2 carriers were reported to be equivalent and that this system could be considered an alternative strategy for melanoma treatment [83]. In a study about combination immunotherapy approaches for melanoma treatment, Park et al. designed a liposomal gel system to co-deliver TGF- β receptor I inhibitor (SB505124) and IL-2 to overcome the immunoinhibitory nature of the tumor microenvironment. TGF- β receptor I inhibitor was incorporated into the nanoparticulate system by forming an inclusion complex with methacrylate- β -cyclodextrin to solubilize the TGF- β inhibitor. Additionally, IL-2 encapsulating a polylactic acid-polyethylene glycol-poly(lactic acid) (PLA-PEG-PLA) nanoparticle combined with the drug: the cyclodextrin inclusion complex in the liposomal gel system has a particle size of nearly 120 nm. It was reported that the nanosystem delayed tumor growth, improved survival rate and therapeutic benefits by inducing NK cells and CD8⁺ T cells in the tumor microenvironment. It was also shown that sustained and slow release of IL-2 is possible, and that a sufficient dose of IL-2 can be provided for the treatment of metastatic melanoma [84].

Some anticancer drugs have immunomodulatory effects and increase efficacy in melanoma treatment when used together with immunotherapeutics [85]. In a study performed to benefit from the immunogenic efficiency of Paclitaxel and IL-2-loaded biomimetic chitosan nanogel formulation was prepared and modified with erythrocyte membrane coating material to achieve nanosponge properties. According to the results, it was reported that chitosan nanogel provides increased antitumoral effects by enhancing the inductive effect of dendritic cells, cytotoxic T lymphocytes and immunostimulatory cytokine secretion [79]. In another study, paclitaxel and TLR-4 agonist were encapsulated into poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles showing a prolonged release profile. The nanoparticles had an equivalent cytotoxic effect on melanoma cell lines with lower concentrations as regards the paclitaxel solution. Furthermore, melanoma-induced mice studies showed that the APCs and T cells were activated, and tumor volume was reduced with higher secretion of IL-2, IFN- γ , TNF- α and IL-1 β compared to drug solution [86].

4.2. Nano-Immunotherapy of Colorectal Cancer

As estimated by the World Health Organization (WHO) for 2018, colorectal cancer (CRC) was the third most common cancer based on new cases and the second most common cancer-related cause of death in world. Although surgery is first choice treatment, chemotherapy is also applied before and after surgery according to the stage of cancer in the patient. In addition, targeted therapy and radiation therapy is applied in clinical settings [87]. In immunotherapy, another approach in the treatment of CRC see the use of targeted antibodies such as Avastin® and Cyramza®, and ICI applications such as Keytruda® and Opvirdo® are among the treatment regimens in the clinic [88].

Considering the approaches to nanoparticulate delivery systems, not only mono-immunotherapy but also combined therapy are investigated, as shown in Tables 3 and 4. Besides these examples, Bousheri et al. developed lipopolysaccharide (LPS) loaded PLGA nanoparticles and investigated the effects of LPS on TLR-4 structure, which is a component of innate immunity and induces cytokine synthesis. The efficiency of LPS loaded nanoparticles and LPS solution was compared in the murine colorectal cancer model. According to the findings, it was observed that nanoparticles decreased the systemic toxicity of LPS and increased TNF- α and IL-6 levels compared to the LPS solution. On the other hand, it was observed that PLGA nanoparticles prevent the recurrence of tumors when injected into peritumors in mice [21]. As mentioned before, some chemotherapeutic agents have an immunogenic effect in addition to the antitumor response. For instance, the anticancer drug Oxaliplatin, used in the treatment of colorectal cancer, may enhance the immune response by increasing CD8⁺ T cells expression by lowering Myeloid-derived suppressor cells and Treg levels. It is also known that when these agents are combined with immune adjuvants such as antibodies or cytokines, immune activation is induced in the tumor [89]. In the literature, self-assembled core-shell nanosystems loaded with Oxaliplatin and dihydroartemisinin were combined with anti-PD-L1 antibody therapy. This nanosystem containing oxaliplatin loaded ZN nanoparticles is covered with a lipid bilayer containing cholesterol-DHA conjugate. It was observed that prolonged antitumor immunity was achieved by inducing T cell activation in murine colorectal tumors and by reducing suppressor cell infiltration [90].

Exosome is membranous vesicles and function as cell–cell communication mediator. In biology and pharmacology, these systems are used as therapeutic carrier systems for RNA and drugs to treat several diseases. In this context, Lugini et al. developed exosomes from human colorectal cancer inducing mesenchymal stromal cells that play promoter roles of tumor progression. Therefore, it was suggested that tumor growth inhibition might be carried out by stopping exosome formation in the tumor [91]. On the other hand, exosomes are used as vehicles for the delivery of therapeutics to treat colorectal cancer. Additionally, vaccine studies containing exosomes which have been derived from dendritic or tumor cells have been performed in treatment of colorectal cancer and many cancers [92]. In addition, researchers presented exosome-mimetic nanovesicles derived from M1 macrophages (M1NVs). Once M1 types macrophages are activated, tumor growth is suppressed and tumor vascularization is normalized. Actually, TAMs in tumor microenvironment, is alternatively activated M2 types, which foster tumor growth and angiogenesis by releasing anti-inflammatory cytokines. M1NVs are formed to repolarize M2 macrophages to M1 types and investigated whether the two systems augment ICI therapies with anti-PD-L1 or not. In vivo studies were carried out in CT26-bearing mice showed that M1NVs have no toxic effects on major organs and they accumulate at the tumor area. Treatment with M1NVs and a-PD-L1 decreased tumor volume by inducing a form of apoptotic cells compared to M1NVs or a-PD-L1 alone. Moreover, q-PCR studies showed that the combination upregulated pro-inflammatory genes and M1 markers, such as CD86 and CD80, also reduced anti-inflammatory genes and M2 markers [93].

4.3. Nano-Immunotherapy of Lung Cancer

Constituting almost all of the lung cancer cases, non-small cell lung cancer (NSCLC) is commonly treated with surgery. However, sometimes chemotherapy and radiotherapy are used alone or combination as well. In the early stages of this cancer, different radiation treatments can be preferred, such as brachytherapy or radiofrequency ablation. Advanced stage lung cancer is treated with chemotherapeutic agents that are targeted to gene mutations such as ALK, BRAF and receptors such as EGFR and VEGFR [94]. CIMAvax-EGF[®] was approved by the Cuban Regulatory Authority in 2008 and is known as the first vaccine for the treatment of stage IIIB and IV lung cancer. CIMAvax-EGF[®] has been approved in recent years and used in Argentina, Bosnia and Herzegovina, Colombia, Kazakhstan, Paraguay and Peru. The vaccine contains human recombinant EGF, a recombinant carrier protein and an adjuvant Montanide ISA51. CIMAvax-EGF[®] aims to prevent interaction with EGFR by producing antibodies against EGF [95]. On the other hand, a clinical trial investigated the effectiveness of CIMAvax-EGF[®], nivolumab and pembrolizumab on NSCLC as well as head and neck squamous cell cancer (NCT02955290). In this phase I/II trial, it was reported that administration of drugs as cancer vaccine was well tolerated by patients and provided more effective treatment [96].

Another vaccine candidate is AST-VAC2, an allogeneic cancer vaccine targeting the regulation regulate telomerase level of cells. It is developed by Cancer Research UK in phase I/IIa for NSCLC treatment and possible side effects and safety problems are investigated (NCT03371485). Another allogeneic cellular vaccine is 1650-G, which is combined with a beta glucan oral supplement in phase I/II clinical trials (NCT01829373). It was reported that a safe and strong immunogenic response was observed in this study. On the other hand, the TUSC1 nanoparticle gene delivery system contains the FUS1 gene that induces apoptosis and is absent or reduced in most of the lung cancers. The nanoparticle is being investigated for the effectiveness of its combination with Tarceva[®] in NSCLC patients in phase I/II clinical trials (NCT01455389).

The main reason for using nanoparticles in the treatment of lung cancer is to provide a reliable and effective treatment regimen by eliminating off-target cytotoxicity, as in other cancer types [97]. Zhang et al. evaluated the effectiveness of glycocalyx-mimicking nanoparticles self-assembled into amphiphilic copolymers to target tumor-associated macrophages (TAMs) in Lewis lung cancer induced mice. In the study, TAMs were collected from the tumor tissue of mice and it was observed that nanoparticles were internalized through the lectin receptor to reduce activity and were affected by the reversal of TAMs. These glycocalyx-mimicking nanoparticles were reported to enhance the specific interaction with lectin receptors due to high concentrations of carbohydrates. When tumor-induced mice were injected intravenously with α -PD-L1 and subcutaneous nanoparticles, an increase in the expression of IL-12 and a decrease in the level of IL-10, arginase I (a cross-reactivity mechanism is of genetically coded for protected immunity), and CCL22 (macrophage-derived chemokine responsible of activating T cells). Nanoparticles also inhibited tumor growth by depleting TREGs [22].

4.4. Nano-Immunotherapy of Lymphoma

Lymphomas are commonly classified into two types as Hodgkin lymphoma and Non-Hodgkin lymphoma (NHL). However, lymphoma has many subtypes depending on the type of cell from which the cancer originated, such as B-cells or T-cells. Both these types of lymphomas are treated with alkylating agents, antibiotics, corticosteroids and/or radiotherapeutic agents [98]. In addition, immunotherapy is used as a new strategy in the clinic, such as CAR-T cell therapy, monoclonal antibodies, immunomodulatory agents and ICI. In lymphoma, tumor cells can spread from the lymph node to the extranodal regions. Hence, conventional chemotherapy is often insufficient to reach tumor cells. To overcome this problem, new studies have been performed for immunotherapy alone or combined with chemotherapy by using nanotechnology. Vaccine studies are also frequently investigated in this area [99,100]. Notably, there are several studies with CpG, which

is used as vaccine adjuvant to target lymph nodes in the literature. In a study, it was aimed to combine a dendritic cell (DC) targeting vaccine and chemotherapy to be used in lymphoma treatment. The adjuvant was formed by combining CpG with the cationic polymer chitosan. CpG is a TLR-9 agonist and enhances cytokine synthesis after inducing DCs. After transfection in tumor cells, the adjuvant is formulated with mannose to target DC cells. It is known that mannose is phagocytosed via receptors on the DC surface. It was determined that vaccine formulation has an improved targeting effect. The effectiveness of the system was demonstrated in the lymphoma treatment model as well as in the lymphoma prevention model. For this purpose, the vaccine was combined with the anticancer drug doxorubicin. The combined system showed stronger antitumoral efficacy compared to chemotherapy and immunotherapy [100]. In another study, the efficiency of PEG-Fmoc-NLG (PEG-derivatized NLG919) micelles loaded with doxorubicin in lymphoma was investigated. NLG (NLG919) is an indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO-1) inhibitor agent. It was reported that nanoparticles increase CD4⁺/CD8⁺ T cells and IFN- γ levels as a result of the intravenous administration in A20 lymphoma mouse model. In addition, IC₅₀ values of nanoparticle formulation, free doxorubicin and Doxil[®] were compared and it was seen that nanoparticles had the lowest value with 0.58 $\mu\text{g/mL}$. In contrast to free doxorubicin solution, cardiotoxicity was not observed in the nanoparticle treated groups [101].

4.5. Nano-Immunotherapy of Breast Cancer

The treatment of breast cancer is mainly based on chemotherapy and breast conserving surgery (lumpectomy) or mastectomy. Radiotherapy is an alternative strategy used instead of breast conserving surgery. Studies are also ongoing for hormone therapy in the treatment of breast cancer as well as immunotherapy and targeted therapy [102]. NeuVaxTM is a cancer vaccine that contains HER-2 derived peptides and targets HER-2 positive breast cancer cells. This vaccine was combined with Leukine[®] (GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) in a Phase III clinical trial in 2016 and compared to GM-CSF (NCT01479244) for disease-free survival. Additionally, in three different clinical studies, the NeuVaxTM and trastuzumab and/or GM-CSF vaccine combinations were in phase II, NCT02297698, NCT02636582, NCT01570036, respectively. In these studies with trastuzumab, it was seen that there was a significant clinical benefit in treatment. In another study, AVX901 containing trastuzumab to target HER-2 was shown to be safe in phase I (NCT01526473) and continued phase II clinical trial (NCT03632941) with pembrolizumab.

The existence of nanomedicines such as Abraxane[®] and Myocet[®], which are approved for use in the treatment of breast cancer, makes the application of nanoparticulate systems indispensable in developing alternative strategies in breast cancer treatment. In this regard, both natural and synthetic nanoparticles are frequently investigated for use in nano-immunotherapy [103,104]. To overcome the challenges of antibody therapies such as safety, efficacy and bioavailability, Colzani et al. incorporated trastuzumab into PLGA biodegradable nanoparticles. Thus, it was aimed to protect trastuzumab against pH conditions. With SDS-PAGE, circular dichroism and fluorescence emission methods, it was shown that trastuzumab is released from nanoparticles while preserving structural integrity. The released trastuzumab was evaluated for selectivity for binding to HER-2 in SKBR3 cell lines by flow cytometry and confocal microscopy. In addition, trastuzumab and doxorubicin loaded PLGA nanoparticles were prepared to reduce the risk of tumor recurrence and this immunochemotherapeutic system showed higher cytotoxicity on tumor cells compared to the groups treated with free doxorubicin solution and doxorubicin loaded PLGA nanoparticles [105].

As mentioned above, another example of the use of exosomes as biocompatible therapeutic cargo is focused on breast cancer. Exosomes were used in this study aiming to kill cancer cells by activating cytotoxic T cells. It has been reported that exosomes expressing monoclonal antibodies specific for T cell CD3 and cancer cell-associated epidermal growth factor receptor (EGFR) elicit strong antitumor immunity. In vivo studies showed a specific and strong toxicity on MDA-MB-468 triple negative breast cancer cells via interaction with

T cells and EGFR. Moreover, it was observed that tumor growth was reduced in exosome treated animals when compared with PBS-treated animals [106].

4.6. Nano-Immunotherapy of Hepatocellular Carcinoma

Liver cancer is one of the common cancer types worldwide mostly caused by hepatitis B virus (HBV) and/or hepatitis C virus (HCV), excessive alcohol consumption, diabetes, obesity and smoking. The HBV vaccine has been used to treat liver infection since 1982 but there is no vaccine for hepatocellular carcinoma yet. The treatment strategies for hepatocellular carcinoma are surgery, liver transplantation, embolization, radiotherapy, chemotherapy and targeted therapy drugs such as Nexavar®, Lenvima® and Stivarga® [107]. Additionally, hepatic artery invasion, which is a direct application of chemotherapeutic agents into hepatic artery to enhance efficiency of drugs, is applied clinically. The immunotherapeutic drugs Opvivo® and Keytruda® are used in unresectable and metastatic liver cancer to help control the tumor growth [108,109].

A vaccine clinical trial has been performed with HepaVac-101, which consists of RNA-based immunomodulating agent in phase I/II. This vaccine was combined with cyclophosphamide and was evaluated for early as well as intermediate stage of hepatocellular carcinoma (NCT03203005). Targeted therapy and combined therapy with immunotherapy or nanotechnology have been studied to improve survival rates of liver cancer patients. For instance, doxorubicin and recombinant human IL-2 was combined into chitosan nanocomplexes having a particle size of around 200 nm and surface modification with folate. According to in vitro findings, it was found that activity and structure of rhIL-2 was protected in nanocomplexes. Moreover, nanocomplexes enhanced cellular uptake of doxorubicin and decreased cell viability on SMMC-7711 cell lines in comparison to corresponding free drugs and polymer solutions. The in vivo studies showed that the mice had unchanged body weight, reduced hemolysis ratio in liver and tumor volume, and increased IgG level and tumor infiltrated lymphocytes in the nanocomplex treated group [110].

4.7. Nano-Immunotherapy of Gynecological Cancers

Ovarian cancer is the fifth leading cause of cancer-related death among women globally. Surgery and chemotherapy are generally used in clinical settings for treatment of ovarian cancer. On the other hand, immunotherapy (bevacizumab) and hormone therapy (anastrozole, letrozole or tamoxifen) are preferred in stage IV and at recurrence. Cervical cancer is the second leading cause of cancer death in women aged 20 to 39 years [111]. Surgery, radiation, chemotherapy, targeted therapy such as bevacizumab (Avastin®) and Keytruda® may implement as treatment regimen in ovarian and cervical cancer. There are three HPV vaccines—Gardasil®, Gardasil 9® and Cervarix®—which are approved by the regulatory authorities and used in clinical settings [112]. In addition, Gardasil 9® was approved for the prevention of oropharyngeal and head and neck cancer for males and females between the ages of 9 and 45. A new vaccine is Depovax™, which completed phase I study as DPX-Survivac. The system is a liposome-based DC vaccine combined with low dose cyclophosphamide (oral) for ovarian cancer, fallopian tube and peritoneal cancer [113].

Ovarian cancer is considered a “cold” tumor because of its limited response to immunotherapies. The most basic feature of tumors categorized as “cold” is the absence of T cells in the tumor microenvironment [114]. This leads to the need to develop systems that can provide more effector cells to eradicate the tumor. Nanoparticulate systems are used to overcome the deficiencies in this field and to provide more effective immunotherapy [115]. In a study aimed to block the programmed death ligand-1 (PD-L1), which is highly expressed in ovarian cancer cells and causes immunosuppression. Accordingly, PD-L1 siRNA loaded folic acid (FA) modified polyethyleneimine nanoparticles were prepared. Modification with FA was reported to increase cellular uptake of nanoparticles, as these cells also overexpress folate receptors. Moreover, it has been stated that as a result of the inhibition of PD-L1, T cells become more sensitive to tumors [74].

4.8. Nano-Immunotherapy of Bladder Cancer

Bladder cancer is estimated to rank fourth among new cases of cancer in men [111]. Surgery is the main option in the treatment of bladder cancer. Immunotherapy, chemotherapy, and radiotherapy are the other treatment regimens used in clinical settings [116]. Additionally, ICI such as nivolumab, pembrolimumab, and avelumab are approved by the FDA for bladder cancer. There are also combination studies in which immunotherapeutics or chemotherapeutics have been evaluated in many different clinical trials [117].

BCG (Bacille Calmette-Guérin) immunotherapy is reported as the standard treatment for bladder cancer [118]. In the case of nanoparticulate immunotherapeutic systems, BCG was loaded into the liposome using emulsified liquid evaporation. Although BCG has a very high molecular weight and negative charge, the liposomal system has been successfully developed with a particle size of 280 nm. In vivo studies in tumor-induced rats have shown that antitumor efficacy is higher than free BCG in terms of tumor weight reduction [119]. In another study, Erdoğan et al. formulated BCG loaded chitosan nanoparticles with a particle size of 375 nm using an ionotropic gelation technique. In this study, the aim was to develop nanoparticles suitable for intravesical drug delivery, which is a mucosal application. In intravesical administration, the thick mucus gel layer (Bladder Permeability Barrier) covering the bladder mucosa is a barrier that must be overcome. For this purpose, chitosan nanoparticles with cationic surface charge and penetration enhancers were used in the study. In vivo studies in tumor-associated rats have shown that nanoparticles had higher antitumor activity than free BCG solution without any adverse effects on the lung tissues [120].

In addition, the BCG cell wall skeleton (BCG-CWS) is used as an adjuvant in nanoparticulate systems. Masuda et al. showed that BCG-CWS nanoparticles (CWS-NP) induced antitumoral and immune effects after intravenous administration in mice. In that study, it was determined that CWS-NP application promoted dendritic cell maturation and cytokine stimulation. Moreover, it was observed that CWS-NP increased the antitumoral efficacy of OVA-NP in combination therapy [121]. In another study, BCG-CWS nanoparticles were encapsulated in liposomes in order to reduce the side effects of BCG treatment. As a result of this study, increased antitumor activity was also shown with the induction of autophagy and ROS production [122].

5. Conclusions

Although there are various alternative treatment regimens, cancer still remains as the second leading cause of death globally according to a 2021 WHO report. Many approaches are used in clinical settings to eliminate cancer, such as chemotherapy, radiotherapy and surgery. Immunotherapy is more recent than these therapies and includes cellular therapy, antibody therapy, vaccine therapy, and nonspecific therapy. Nanotechnology-based therapies have been launched as novel and more selective therapeutics for cancer treatment. For an eventual improved efficacy, nanoparticulate drug delivery system combined immunotherapeutics are being developed both in vitro and clinically. As a result of advances in cell biology and tumor biochemistry, the structures of cancers and tumors are increasingly being clarified. In particular, as the tumor microenvironment and immunosuppressive mechanisms are enlightened, the success of immunotherapy increases. The idea of destroying the tumor by re-stimulating the immune system and its elements, which naturally exist but are inhibited in tumor development, gains importance day by day. It is possible to treat cancer by using effective and less active molecules with nano-immunotherapy. Moreover, nano-immunotherapy studies emphasize that personalized medicine is possible, important and inevitable in cancer treatment. As in other fields, the use of nanoparticulate systems in cancer immunotherapy is expected to provide selectivity and enhancement of antitumoral effects and will be the cancer treatment strategy of the future.

Author Contributions: Conceptualization, E.B., G.V. and S.A.; original draft preparation, S.A. and G.V.; review and editing E.B. All authors have agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This review work received no external funding.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: Authors would like to acknowledge Cem Varan for his valuable support in designing the figures in this manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

ADCC	Antibody-dependent cellular cytotoxicity
APCs	Antigen presenting cells
CAR-T	Chimeric antigen receptor
CRC	Colorectal cancer
CRT	Calretikuin
CSF	Colony Stimulating Factor
CTL	Cytotoxic T lymphocyte
CTLA-4	Cytotoxic T lymphocyte antigen-4
DC	Dendritic cell
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EM	Exosome mimetic
EMA	European Medicines Agency
FDA	Food and Drug Administration
HER-2	Human epidermal growth factor receptor 2
ICI, ICB	Immune checkpoint inhibitor or blocker
IDO	Indoleamine 2,3-dioxygenase
IL	Interleukin
IFN	Interferon
LNP	Lipid nanoparticles
LPS	Lipopolysaccharide
MDSC	Myeloid-derived suppressor cell
MHC	Major histocompatibility complex
MRI	Magnetic resonance imaging
MSNP	Mesoporous silica nanoparticles
NK	Natural Killer
NSCLC	Non-small cell lung cancer
OVA	Ovalbumin
PBL	Peripheral blood lymphocytes
PDAC	Pancreatic ductal adenocarcinoma
PD-1	Programmed death-1
PD-L1/2	Programmed death-ligand 1 and 2
PEG	Polyethylene glycol
PEI	Polyethyleneimine
PLA	Polylactic acid
PLGA	Poly (lactic-co-glycolic acid)
TAA	Tumor-associated antigens
TAMs	Tumor-associated macrophages
TCR	T cell receptor
Tc	Cytotoxic T cells
Th	T helper cells
Tregs	Regulator T cells
TILs	Tumor-infiltrated lymphocytes
TLRs	Toll-like receptors
TNF	Tumor necrose factors
TSA	Tumor specific antigen
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor

References

- Global Burden of Disease Cancer Collaboration; Fitzmaurice, C.; Abate, D.; Abbasi, N.; Abbastabar, H.; Abd-Allah, F.; Abdel-Rahman, O.; Abdelalim, A.; Abdoli, A.; Abdollahpour, I.; et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol.* **2019**, *5*, 1749–1768. [\[CrossRef\]](#)
- Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Fuchs, H.E.; Jemal, A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 7–33. [\[CrossRef\]](#)
- Waldman, A.D.; Fritz, J.M.; Lenardo, M.J. A guide to cancer immunotherapy: From T cell basic science to clinical practice. *Nat. Rev. Immunol.* **2020**, *20*, 651–668. [\[CrossRef\]](#)
- Oldham, R.K. Cancer Biotherapy: More than Immunotherapy. *Cancer Biother. Radiopharm.* **2017**, *32*, 111–114. [\[CrossRef\]](#)
- Yang, Y. Cancer immunotherapy: Harnessing the immune system to battle cancer. *J. Clin. Investig.* **2015**, *125*, 3335–3337. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Dine, J.; Gordon, R.; Shames, Y.; Kasler, M.K.; Barton-Burke, M. Immune checkpoint inhibitors: An innovation in immunotherapy for the treatment and management of patients with cancer. *Asia Pac. J. Oncol. Nurs.* **2017**, *4*, 127–135. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Borghaei, H.; Smith, M.R.; Campbell, K.S. Immunotherapy of cancer. *Eur. J. Pharmacol.* **2009**, *625*, 41–54. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Farc, O.; Cristea, V. An overview of the tumor microenvironment, from cells to complex networks (Review). *Exp. Ther. Med.* **2020**, *21*, 1. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Rameshbabu, S.; Labadie, B.; Argulian, A.; Patnaik, A. Targeting Innate Immunity in Cancer Therapy. *Vaccines* **2021**, *9*, 138. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Li, J.; Yang, F.; Wei, F.; Ren, X. The role of toll-like receptor 4 in tumor microenvironment. *Oncotarget* **2017**, *8*, 66656–66667. [\[CrossRef\]](#)
- Karapetyan, L.; Luke, J.J.; Davar, D. Toll-Like Receptor 9 Agonists in Cancer. *OncoTargets Ther.* **2020**, *13*, 10039–10061. [\[CrossRef\]](#)
- Merino, M.; Contreras, A.; Casares, N.; Troconiz, I.F.; Hagen, T.L.T.; Berraondo, P.; Zalba, S.; Garrido, M.J. A new immunonano platform for promoting adaptive antitumor immune response. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2019**, *17*, 13–25. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Riley, R.S.; June, C.H.; Langer, R.; Mitchell, M.J. Delivery technologies for cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2019**, *18*, 175–196. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Mantia, C.; Buchbinder, E.I. Immunotherapy Toxicity. *Hematol. Clin. N. Am.* **2019**, *33*, 275–290. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Qi, S.-S.; Sun, J.-H.; Yu, H.-H.; Yu, S.-Q. Co-delivery nanoparticles of anti-cancer drugs for improving chemotherapy efficacy. *Drug Deliv.* **2017**, *24*, 1909–1926. [\[CrossRef\]](#)
- Schenk, U.; Frascoli, M.; Proietti, M.; Geffers, R.; Traggiai, E.; Buer, J.; Ricordi, C.; Westendorf, A.M.; Grassi, F. ATP inhibits the generation and function of regulatory T cells through the activation of purinergic P2X receptors. *Sci. Signal.* **2011**, *4*, ra12. [\[CrossRef\]](#)
- Miao, L.; Li, J.; Liu, Q.; Feng, R.; Das, M.; Lin, C.M.; Goodwin, T.J.; Dorosheva, O.; Liu, R.; Huang, L. Transient and Local Expression of Chemokine and Immune Checkpoint Traps To Treat Pancreatic Cancer. *ACS Nano* **2017**, *11*, 8690–8706. [\[CrossRef\]](#)
- Chulpanova, D.S.; Kitaeva, K.V.; Green, A.R.; Rizvanov, A.A.; Solovyeva, V.V. Molecular Aspects and Future Perspectives of Cytokine-Based Anti-cancer Immunotherapy. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*, 402. [\[CrossRef\]](#)
- Zhang, Y.; Schmidt-Wolf, I.G.H. Ten-year update of the international registry on cytokine-induced killer cells in cancer immunotherapy. *J. Cell. Physiol.* **2020**, *235*, 9291–9303. [\[CrossRef\]](#)
- Galli, F.; Aguilera, J.V.; Palermo, B.; Markovic, S.N.; Nisticò, P.; Signore, A. Relevance of immune cell and tumor microenvironment imaging in the new era of immunotherapy. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2020**, *39*, 1–21. [\[CrossRef\]](#)
- Boushehri, M.A.S.; Abdel-Mottaleb, M.M.A.; Béduneau, A.; Pellequer, Y.; Lamprecht, A. A nanoparticle-based approach to improve the outcome of cancer active immunotherapy with lipopolysaccharides. *Drug Deliv.* **2018**, *25*, 1414–1425. [\[CrossRef\]](#)
- Zhang, Y.; Wu, L.; Li, Z.; Zhang, W.; Luo, F.; Chu, Y.; Chen, G. Glycocalyx-Mimicking Nanoparticles Improve Anti-PD-L1 Cancer Immunotherapy through Reversion of Tumor-Associated Macrophages. *Biomacromolecules* **2018**, *19*, 2098–2108. [\[CrossRef\]](#)
- Vinay, D.S.; Ryan, E.P.; Pawelec, G.; Talib, W.H.; Stagg, J.; Elkord, E.; Lichter, T.; Decker, W.K.; Whelan, R.L.; Kumara, H.M.C.S.; et al. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Semin. Cancer Biol.* **2015**, *35*, S185–S198. [\[CrossRef\]](#)
- Diao, J.; Gu, H.; Tang, M.; Zhao, J.; Catral, M.S. Tumor Dendritic Cells (DCs) Derived from Precursors of Conventional DCs Are Dispensable for Intratumor CTL Responses. *J. Immunol.* **2018**, *201*, 1306–1314. [\[CrossRef\]](#)
- Garrido, F.; Aptsiauri, N.; Doorduijn, E.M.; Lora, A.M.G.; Van Hall, T. The urgent need to recover MHC class I in cancers for effective immunotherapy. *Curr. Opin. Immunol.* **2016**, *39*, 44–51. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Becker, J.C.; Andersen, M.H.; Schrama, D.; Straten, P.T. Immune-suppressive properties of the tumor microenvironment. *Cancer Immunol. Immunother.* **2013**, *62*, 1137–1148. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Kuai, R.; Yuan, W.; Son, S.; Nam, J.; Xu, Y.; Fan, Y.; Schwendeman, A.; Moon, J.J. Elimination of established tumors with nanodisc-based combination chemioimmunotherapy. *Sci. Adv.* **2018**, *4*, eaao1736. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Slaney, C.Y.; Kershaw, M.H. Challenges and Opportunities for Effective Cancer Immunotherapies. *Cancers* **2020**, *12*, 3164. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Kaplan, H.; Muralidharan, M.; Schneider, Z.; Reichert, J.M. Antibodies to watch in 2020. *mAbs* **2020**, *12*, 1703531. [\[CrossRef\]](#)
- Vaddepally, R.K.; Kharel, P.; Pandey, R.; Garje, R.; Chandra, A.B. Review of Indications of FDA-Approved Immune Checkpoint Inhibitors per NCCN Guidelines with the Level of Evidence. *Cancers* **2020**, *12*, 738. [\[CrossRef\]](#)

31. Wang, W.; Wang, J.; Zhang, X.; Wang, Y.; Shi, J.; Jia, X.; Dang, S. Atezolizumab plus bevacizumab for unresectable or metastatic hepatocellular carcinoma: A cost-effectiveness analysis. *J. Clin. Oncol.* **2021**, *39*, 295. [CrossRef]
32. Zhao, J.; Chen, Y.; Ding, Z.-Y.; Liu, J.-Y. Safety and Efficacy of Therapeutic Cancer Vaccines Alone or in Combination with Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer Treatment. *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*, 1184. [CrossRef]
33. Quijano-Rubio, A.; Ulge, U.Y.; Walkey, C.D.; Silva, D.-A. The advent of de novo proteins for cancer immunotherapy. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2020**, *56*, 119–128. [CrossRef] [PubMed]
34. Han, S.; Huang, K.; Gu, Z.; Wu, J. Tumor immune microenvironment modulation-based drug delivery strategies for cancer immunotherapy. *Nanoscale* **2020**, *12*, 413–436. [CrossRef] [PubMed]
35. Sun, L.; Chen, L.; Li, H. Checkpoint-modulating immunotherapies in tumor treatment: Targets, drugs, and mechanisms. *Int. Immunopharmacol.* **2019**, *67*, 160–175. [CrossRef]
36. Bernard-Tessier, A.; Bonnet, C.; Lavaud, P.; Gizzi, M.; Lorient, Y.; Massard, C. Atezolizumab (Tecentriq®): Activité, indication et modalités d'utilisation dans les carcinomes urothéliaux localement avancés ou métastatiques. *Bull. Cancer* **2018**, *105*, 140–145. [CrossRef] [PubMed]
37. Lu, J.; Liu, X.; Liao, Y.-P.; Salazar, F.; Sun, B.; Jiang, W.; Chang, C.H.; Jiang, J.; Wang, X.; Wu, A.; et al. Nano-enabled pancreas cancer immunotherapy using immunogenic cell death and reversing immunosuppression. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 1–14. [CrossRef] [PubMed]
38. Ishihara, J.; Ishihara, A.; Sasaki, K.; Lee, S.S.-Y.; Williford, J.-M.; Yasui, M.; Abe, H.; Potin, L.; Hosseinchi, P.; Fukunaga, K.; et al. Targeted antibody and cytokine cancer immunotherapies through collagen affinity. *Sci. Transl. Med.* **2019**, *11*, eaau3259. [CrossRef]
39. Williford, J.-M.; Ishihara, J.; Ishihara, A.; Mansurov, A.; Hosseinchi, P.; Marchell, T.M.; Potin, L.; Swartz, M.A.; Hubbell, J.A. Recruitment of CD103+ dendritic cells via tumor-targeted chemokine delivery enhances efficacy of checkpoint inhibitor immunotherapy. *Sci. Adv.* **2019**, *5*, eaay1357. [CrossRef] [PubMed]
40. Mansurov, A.; Ishihara, J.; Hosseinchi, P.; Potin, L.; Marchell, T.M.; Ishihara, A.; Williford, J.-M.; Alpar, A.T.; Racz, M.M.; Gray, L.T.; et al. Collagen-binding IL-12 enhances tumour inflammation and drives the complete remission of established immunologically cold mouse tumours. *Nat. Biomed. Eng.* **2020**, *4*, 531–543. [CrossRef]
41. Marin-Acevedo, J.A.; Kimbrough, E.O.; Lou, Y. Next generation of immune checkpoint inhibitors and beyond. *J. Hematol. Oncol.* **2021**, *14*, 1–29. [CrossRef]
42. Rohaan, M.W.; Wilgenhof, S.; Haanen, J.B.A.G. Adoptive cellular therapies: The current landscape. *Virchows Archiv.* **2019**, *474*, 449–461. [CrossRef] [PubMed]
43. Zheng, P.-P.; Kros, J.M.; Li, J. Approved CAR T cell therapies: Ice bucket challenges on glaring safety risks and long-term impacts. *Drug Discov. Today* **2018**, *23*, 1175–1182. [CrossRef] [PubMed]
44. Zahavi, D.; Weiner, L. Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy. *Antibodies* **2020**, *9*, 34. [CrossRef] [PubMed]
45. Lu, R.-M.; Hwang, Y.-C.; Liu, I.-J.; Lee, C.-C.; Tsai, H.-Z.; Li, H.-J.; Wu, H.-C. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *J. Biomed. Sci.* **2020**, *27*, 1–30. [CrossRef]
46. Hafeez, U.; Parakh, S.; Gan, H.K.; Scott, A.M. Antibody–Drug Conjugates for Cancer Therapy. *Molecules* **2020**, *25*, 4764. [CrossRef]
47. Chen, L.; Wang, L.; Shion, H.; Yu, C.; Yu, Y.Q.; Zhu, L.; Li, M.; Chen, W.; Gao, K. In-depth structural characterization of Kadcyla® (ado-trastuzumab emtansine) and its biosimilar candidate. *mAbs* **2016**, *8*, 1210–1223. [CrossRef]
48. Gravanis, L.; Tzoganis, K.; Van Hennik, P.; De Graeff, P.; Schmitt, P.; Mueller-Berghaus, J.; Salmonson, T.; Gisselbrecht, C.; Laane, E.; Bergmann, L.; et al. The European Medicines Agency Review of Brentuximab Vedotin (Adcetris) for the Treatment of Adult Patients With Relapsed or Refractory CD30+ Hodgkin Lymphoma or Systemic Anaplastic Large Cell Lymphoma: Summary of the Scientific Assessment of the Committee for Medicinal Products for Human Use. *Oncologist* **2015**, *21*, 102–109. [CrossRef]
49. Keshavarz-Fathi, M.; Rezaei, N. Chapter 2—Immunotherapeutic Approaches in Cancer. In *Vaccines for Cancer Immunotherapy*; Rezaei, N., Keshavarz-Fathi, M., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2019; pp. 19–44. [CrossRef]
50. Handy, C.E.; Antonarakis, E.S. Sipuleucel-T for the treatment of prostate cancer: Novel insights and future directions. *Future Oncol.* **2018**, *14*, 907–917. [CrossRef]
51. Raman, S.S.; Hecht, J.R.; Chan, E. Talimogene laherparepvec: Review of its mechanism of action and clinical efficacy and safety. *Immunotherapy* **2019**, *11*, 705–723. [CrossRef]
52. Bommarreddy, P.K.; Patel, A.; Hossain, S.; Kaufman, H.L. Talimogene Laherparepvec (T-VEC) and Other Oncolytic Viruses for the Treatment of Melanoma. *Am. J. Clin. Dermatol.* **2017**, *18*, 1–15. [CrossRef]
53. Ventola, C.L. Cancer Immunotherapy, Part 1: Current Strategies and Agents. *Pharm. Ther.* **2017**, *42*, 375–383.
54. Shi, Y. Clinical Translation of Nanomedicine and Biomaterials for Cancer Immunotherapy: Progress and Perspectives. *Adv. Ther.* **2020**, *3*, 1900215. [CrossRef]
55. Kroschinsky, F.; Stölzel, F.; Von Bonin, S.; Beutel, G.; Kochanek, M.; Kiehl, M.; Schellongowski, P. New drugs, new toxicities: Severe side effects of modern targeted and immunotherapy of cancer and their management. *Crit. Care* **2017**, *21*, 1–11. [CrossRef] [PubMed]
56. Gupta, J.; Safdari, H.A.; Hoque, M. Nanoparticle mediated cancer immunotherapy. *Semin. Cancer Biol.* **2021**, *69*, 307–324. [CrossRef]
57. Yin, Y.; Hu, Q.; Xu, C.; Qiao, Q.; Qin, X.; Song, Q.; Peng, Y.; Zhao, Y.; Zhang, Z. Co-delivery of Doxorubicin and Interferon-γ by Thermosensitive Nanoparticles for Cancer Immunotherapy. *Mol. Pharm.* **2018**, *15*, 4161–4172. [CrossRef]

58. Qiu, F.; Becker, K.W.; Knight, F.; Baljon, J.J.; Sevimli, S.; Shae, D.; Gilchuk, P.; Joyce, S.; Wilson, J.T. Poly(propylacrylic acid)-peptide nanoplexes as a platform for enhancing the immunogenicity of neoantigen cancer vaccines. *Biomaterials* **2018**, *182*, 82–91. [CrossRef] [PubMed]
59. Han, H.D.; Byeon, Y.; Jang, J.-H.; Jeon, H.N.; Kim, G.H.; Kim, M.G.; Pack, C.-G.; Kang, T.H.; Jung, I.D.; Lim, Y.T.; et al. In vivo stepwise immunomodulation using chitosan nanoparticles as a platform nanotechnology for cancer immunotherapy. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 38348. [CrossRef]
60. Shen, S.; Li, H.-J.; Chen, K.-G.; Wang, Y.-C.; Yang, X.-Z.; Lian, Z.-X.; Du, J.-Z.; Wang, J. Spatial Targeting of Tumor-Associated Macrophages and Tumor Cells with a pH-Sensitive Cluster Nanocarrier for Cancer Chemoimmunotherapy. *Nano Lett.* **2017**, *17*, 3822–3829. [CrossRef]
61. Huang, B.; Abraham, W.D.; Zheng, Y.; López, S.C.B.; Luo, S.S.; Irvine, D.J. Active targeting of chemotherapy to disseminated tumors using nanoparticle-carrying T cells. *Sci. Transl. Med.* **2015**, *7*, 291ra94. [CrossRef] [PubMed]
62. Li, T.-F.; Li, K.; Zhang, Q.; Wang, C.; Yue, Y.; Chen, Z.; Yuan, S.-J.; Liu, X.; Wen, Y.; Han, M.; et al. Dendritic cell-mediated delivery of doxorubicin-polyglycerol-nanodiamond composites elicits enhanced anti-cancer immune response in glioblastoma. *Biomaterials* **2018**, *181*, 35–52. [CrossRef]
63. Hassan, H.A.; Smyth, L.; Wang, T.-W.; Costa, P.M.; Ratnasothy, K.; Diebold, S.S.; Lombardi, G.; Al-Jamal, K.T. Dual stimulation of antigen presenting cells using carbon nanotube-based vaccine delivery system for cancer immunotherapy. *Biomaterials* **2016**, *104*, 310–322. [CrossRef] [PubMed]
64. Weihuan, F.; Wu, M.; Fang, C.; Cheng, C.; Zhao, M.; Fang, W.; Chu, P.K.; Guping, T.; Tang, G. Engineering Nanoparticle-Coated Bacteria as Oral DNA Vaccines for Cancer Immunotherapy. *Nano Lett.* **2015**, *15*, 2732–2739. [CrossRef]
65. Kawai, M.; Nakamura, T.; Miura, N.; Maeta, M.; Tanaka, H.; Ueda, K.; Higashi, K.; Moribe, K.; Tange, K.; Nakai, Y.; et al. DNA-loaded nano-adjuvant formed with a vitamin E-scaffold intracellular environmentally-responsive lipid-like material for cancer immunotherapy. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2018**, *14*, 2587–2597. [CrossRef]
66. Liu, X.; Li, Y.; Sun, X.; Muftuoglu, Y.; Wang, B.; Yu, T.; Hu, Y.; Ma, L.; Xiang, M.; Guo, G.; et al. Powerful anti-colon cancer effect of modified nanoparticle-mediated IL-15 immunogene therapy through activation of the host immune system. *Theranostics* **2018**, *8*, 3490–3503. [CrossRef] [PubMed]
67. Kim, S.-S.; Harford, J.B.; Moghe, M.; Rait, A.; Chang, E.H. Combination with SGT-53 overcomes tumor resistance to a checkpoint inhibitor. *Oncolimmunology* **2018**, *7*, e1484982. [CrossRef] [PubMed]
68. de Titta, A.; Ballester, M.; Julier, Z.; Nembrini, C.; Jeanbart, L.; van der Vlies, A.J.; Swartz, M.A.; Hubbell, J.A. Nanoparticle conjugation of CpG enhances adjuvancy for cellular immunity and memory recall at low dose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 19902–19907. [CrossRef]
69. Aalink, R.; Nair, B.; Chen, C.; Mahajan, S.D.; Reynolds, J.L.; Zhang, H.; Sun, H.; Sykes, N.E.; Chadha, K.C.; Turowski, S.G.; et al. Nanotherapy silencing the interleukin-8 gene produces regression of prostate cancer by inhibition of angiogenesis. *Immunology* **2016**, *148*, 387–406. [CrossRef] [PubMed]
70. Xia, Q.; Gong, C.; Gu, F.; Wang, Z.; Hu, C.; Zhang, L.; Qiang, L.; Ding, X.; Gao, S.; Gao, Y. Functionalized Multi-Walled Carbon Nanotubes for Targeting Delivery of Immunostimulatory CpG Oligonucleotides Against Prostate Cancer. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2018**, *14*, 1613–1626. [CrossRef] [PubMed]
71. Liu, L.; Zong, Z.-M.; Liu, Q.; Jiang, S.-S.; Zhang, Q.; Cen, L.-Q.; Gao, J.; Gao, X.-G.; Huang, J.-D.; Liu, Y.; et al. A novel galactose-PEG-conjugated biodegradable copolymer is an efficient gene delivery vector for immunotherapy of hepatocellular carcinoma. *Biomaterials* **2018**, *184*, 20–30. [CrossRef]
72. Lai, I.; Swaminathan, S.; Baylot, V.; Mosley, A.; Dhanasekaran, R.; Gabay, M.; Felsner, D.W. Lipid nanoparticles that deliver IL-12 messenger RNA suppress tumorigenesis in MYC oncogene-driven hepatocellular carcinoma. *J. Immunother. Cancer* **2018**, *6*, 125. [CrossRef] [PubMed]
73. Huang, Z.; Zhang, Z.; Jiang, Y.; Zhang, D.; Chen, J.; Dong, L.; Zhang, J. Targeted delivery of oligonucleotides into tumor-associated macrophages for cancer immunotherapy. *J. Control. Release* **2012**, *158*, 286–292. [CrossRef]
74. Teo, P.Y.; Yang, C.; Whilding, L.M.; Parente-Pereira, A.C.; Maher, J.; George, A.; Hedrick, J.L.; Yang, Y.Y.; Ghaem-Maghani, S. Ovarian Cancer Immunotherapy Using PD-L1 siRNA Targeted Delivery from Folic Acid-Functionalized Polyethylenimine: Strategies to Enhance T Cell Killing. *Adv. Healthc. Mater.* **2015**, *4*, 1180–1189. [CrossRef]
75. Kadiyala, P.; Li, D.; Nuñez, F.M.; Altshuler, D.; Doherty, R.; Kuai, R.; Yu, M.; Kamran, N.; Edwards, M.; Moon, J.J.; et al. High-Density Lipoprotein-Mimicking Nanodiscs for Chemo-immunotherapy against Glioblastoma Multiforme. *ACS Nano* **2019**, *13*, 1365–1384. [CrossRef] [PubMed]
76. Domingues, B.; Lopes, J.M.; Soares, P.; Populo, H. Melanoma treatment in review. *ImmunoTargets Ther.* **2018**, *7*, 35–49. [CrossRef] [PubMed]
77. Vasquez, M.; Tenesaca, S.; Berraondo, P. New trends in antitumor vaccines in melanoma. *Ann. Transl. Med.* **2017**, *5*, 384. [CrossRef]
78. Miller, M.; Sahin, U.; Derhovanessian, E.; Kloke, B.-P.; Simon, P.; Bukur, V.; Albrecht, C.; Paruzynski, A.; Löwer, M.; Kuhn, A.; et al. IVAC MUTANOME: A first-in-human phase I clinical trial targeting individual mutant neoantigens for the treatment of melanoma. *Ann. Oncol.* **2017**, *28*, xi1–xi2. [CrossRef]
79. Song, Q.; Yin, Y.; Shang, L.; Wu, T.; Zhang, D.; Kong, M.; Zhao, Y.; He, Y.; Tan, S.; Guo, Y.; et al. Tumor Microenvironment Responsive Nanogel for the Combinatorial Antitumor Effect of Chemotherapy and Immunotherapy. *Nano Lett.* **2017**, *17*, 6366–6375. [CrossRef] [PubMed]

80. Irvine, D.J.; Dane, E.L. Enhancing cancer immunotherapy with nanomedicine. *Nat. Rev. Immunol.* **2020**, *20*, 321–334. [CrossRef]
81. Liu, Q.; Duo, Y.; Fu, J.; Qiu, M.; Sun, Z.; Adah, D.; Kang, J.; Xie, Z.; Fan, T.; Bao, S.; et al. Nano-immunotherapy: Unique mechanisms of nanomaterials in synergizing cancer immunotherapy. *Nano Today* **2021**, *36*, 101023. [CrossRef]
82. Yang, Z.; Ma, Y.; Zhao, H.; Yuan, Y.; Kim, B.Y.S. Nanotechnology platforms for cancer immunotherapy. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2020**, *12*, e1590. [CrossRef] [PubMed]
83. Yao, H.; Ng, S.S.; Huo, L.-F.; Chow, B.K.C.; Shen, Z.; Yang, M.; Sze, J.; Ko, O.; Li, M.; Yue, A.; et al. Effective Melanoma Immunotherapy with Interleukin-2 Delivered by a Novel Polymeric Nanoparticle. *Mol. Cancer Ther.* **2011**, *10*, 1082–1092. [CrossRef] [PubMed]
84. Park, J.; Wrzesinski, S.H.; Stern, E.; Look, M.; Criscione, J.M.; Ragheb, R.; Jay, S.M.; Demento, S.L.; Agawu, A.; Limon, P.L.; et al. Combination delivery of TGF- β inhibitor and IL-2 by nanoscale liposomal polymeric gels enhances tumour immunotherapy. *Nat. Mater.* **2012**, *11*, 895–905. [CrossRef]
85. Zhu, L.; Chen, L. Progress in research on paclitaxel and tumor immunotherapy. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **2019**, *24*, 40. [CrossRef]
86. Roy, A.; Singh, M.S.; Upadhyay, P.; Bhaskar, S. Nanoparticle mediated co-delivery of paclitaxel and a TLR-4 agonist results in tumor regression and enhanced immune response in the tumor microenvironment of a mouse model. *Int. J. Pharm.* **2013**, *445*, 171–180. [CrossRef]
87. Koi, M.; Carethers, J.M. The colorectal cancer immune microenvironment and approach to immunotherapies. *Future Oncol.* **2017**, *13*, 1633–1647. [CrossRef] [PubMed]
88. Ciardiello, D.; Vitiello, P.P.; Cardone, C.; Martini, G.; Troiani, T.; Martinelli, E.; Ciardiello, F. Immunotherapy of colorectal cancer: Challenges for therapeutic efficacy. *Cancer Treat. Rev.* **2019**, *76*, 22–32. [CrossRef]
89. Gou, H.-F.; Huang, J.; Shi, H.-S.; Chen, X.-C.; Wang, Y.-S. Chemo-Immunotherapy with Oxaliplatin and Interleukin-7 Inhibits Colon Cancer Metastasis in Mice. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e85789. [CrossRef]
90. Duan, X.; Chan, C.; Han, W.; Guo, N.; Weichselbaum, R.R.; Lin, W. Immunostimulatory nanomedicines synergize with checkpoint blockade immunotherapy to eradicate colorectal tumors. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1–15. [CrossRef]
91. Lugini, L.; Valtieri, M.; Federici, C.; Cecchetti, S.; Meschini, S.; Condello, M.; Signore, M.; Fais, S. Exosomes from human colorectal cancer induce a tumor-like behavior in colonic mesenchymal stromal cells. *Oncotarget* **2016**, *7*, 50086–50098. [CrossRef]
92. Sarvzadeh, M.; Ghasemi, F.; Tavakoli, F.; Khatami, S.S.; Razi, E.; Sharifi, H.; Biouki, N.M.; Taghizadeh, M. Vaccines for colorectal cancer: An update. *J. Cell. Biochem.* **2019**, *120*, 8815–8828. [CrossRef]
93. Choo, Y.W.; Kang, M.; Kim, H.Y.; Han, J.; Kang, S.; Lee, J.-R.; Jeong, G.-J.; Kwon, S.P.; Song, S.Y.; Go, S.; et al. M1 Macrophage-Derived Nanovesicles Potentiate the Anticancer Efficacy of Immune Checkpoint Inhibitors. *ACS Nano* **2018**, *12*, 8977–8993. [CrossRef] [PubMed]
94. Du, L.; Herbst, R.S.; Morgensztern, D. Immunotherapy in Lung Cancer. *Hematol. Clin. N. Am.* **2017**, *31*, 131–141. [CrossRef]
95. Tagliamento, M.; Rijavec, E.; Barletta, G.; Biello, F.; Rossi, G.; Genova, C. CIMAvax-EGF, a therapeutic non-small cell lung cancer vaccine. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2018**, *18*, 829–835. [CrossRef]
96. Oliveres, H.; Cagle, C.; Passiglia, F.; Taverna, S.; Smits, E.; Rolfo, C. Vaccine and immune cell therapy in non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Dis.* **2018**, *10*, S1602–S1614. [CrossRef]
97. García-Fernández, C.; Fornaguera, C.; Borrós, S. Nanomedicine in Non-Small Cell Lung Cancer: From Conventional Treatments to Immunotherapy. *Cancers* **2020**, *12*, 1609. [CrossRef]
98. Jiang, M.; Bennani, N.N.; Feldman, A.L. Lymphoma classification update: T-cell lymphomas, Hodgkin lymphomas, and histiocytic/dendritic cell neoplasms. *Expert Rev. Hematol.* **2017**, *10*, 239–249. [CrossRef] [PubMed]
99. Xu-Monette, Z.Y.; Young, K.H. Therapeutic vaccines for aggressive B-cell lymphoma. *Leuk. Lymphoma* **2020**, *61*, 3038–3051. [CrossRef] [PubMed]
100. Zhou, T.; Peng, J.; Hao, Y.; Shi, K.; Zhou, K.; Yang, Y.; Yang, C.; He, X.; Chen, X.; Qian, Z. The construction of a lymphoma cell-based, DC-targeted vaccine, and its application in lymphoma prevention and cure. *Bioact. Mater.* **2021**, *6*, 697–711. [CrossRef]
101. Zhai, Q.; Chen, Y.; Xu, J.; Huang, Y.; Sun, J.; Liu, Y.; Zhang, X.; Li, S.; Tang, S. Lymphoma Immunotherapy: Targeted Delivery of Doxorubicin via a Dual Functional Nanocarrier. *Mol. Pharm.* **2017**, *14*, 3888–3895. [CrossRef] [PubMed]
102. García-Aranda, M.; Redondo, M. Immunotherapy: A Challenge of Breast Cancer Treatment. *Cancers* **2019**, *11*, 1822. [CrossRef]
103. Bahreyni, A.; Mohamud, Y.; Luo, H. Emerging nanomedicines for effective breast cancer immunotherapy. *J. Nanobiotechnol.* **2020**, *18*, 1–14. [CrossRef]
104. Hussain, Z.; Khan, J.A.; Murtaza, S. Nanotechnology: An Emerging Therapeutic Option for Breast Cancer. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **2018**, *28*, 163–175. [CrossRef] [PubMed]
105. Colzani, B.; Pandolfi, L.; Hoti, A.; Iovene, P.A.; Natalello, A.; Avvakumova, S.; Colombo, M.; Prosperi, D. Investigation of antitumor activities of trastuzumab delivered by PLGA nanoparticles. *Int. J. Nanomed.* **2018**, *13*, 957–973. [CrossRef] [PubMed]
106. Cheng, Q.; Shi, X.; Han, M.; Smbatyan, G.; Lenz, H.-J.; Zhang, Y. Reprogramming Exosomes as Nanoscale Controllers of Cellular Immunity. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 16413–16417. [CrossRef]
107. Bruix, J.; Han, K.-H.; Gores, G.; Llovet, J.M.; Mazzaferro, V.M. Liver cancer: Approaching a personalized care. *J. Hepatol.* **2015**, *62*, S144–S156. [CrossRef]
108. Finkelmeier, F.; Waidmann, O.; Trojan, J. Nivolumab for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2018**, *18*, 1169–1175. [CrossRef]

109. Buonaguro, L.; Mauriello, A.; Cavalluzzo, B.; Petrizzo, A.; Tagliamonte, M. Immunotherapy in hepatocellular carcinoma. *Ann. Hepatol.* **2019**, *18*, 291–297. [CrossRef] [PubMed]
110. Wu, J.; Tang, C.; Yin, C. Co-delivery of doxorubicin and interleukin-2 via chitosan based nanoparticles for enhanced antitumor efficacy. *Acta Biomater.* **2017**, *47*, 81–90. [CrossRef]
111. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Jemal, A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J. Clin.* **2019**, *69*, 7–34. [CrossRef] [PubMed]
112. Gupta, G.; Glueck, R.; Patel, P.R. HPV vaccines: Global perspectives. *Hum. Vaccines Immunother.* **2017**, *13*, 1421–1424. [CrossRef]
113. Sau, S.; Alsaab, H.O.; Bhise, K.; Alzhrani, R.; Nabil, G.; Iyer, A.K. Multifunctional nanoparticles for cancer immunotherapy: A groundbreaking approach for reprogramming malfunctioned tumor environment. *J. Control. Release* **2018**, *274*, 24–34. [CrossRef] [PubMed]
114. Kather, J.N.; Suarez-Carmona, M.; Charoentong, P.; Weis, C.-A.; Hirsch, D.; Bankhead, P.; Horning, M.; Ferber, D.; Kel, I.; Herpel, E.; et al. Topography of cancer-associated immune cells in human solid tumors. *eLife* **2018**, *7*. [CrossRef] [PubMed]
115. Corradetti, B.; Pisano, S.; Conlan, R.S.; Ferrari, M. Nanotechnology and Immunotherapy in Ovarian Cancer: Tracing New Landscapes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2019**, *370*, 636–646. [CrossRef]
116. DeGeorge, K.C.; Holt, H.R.; Hodges, S.C. Bladder Cancer: Diagnosis and Treatment. *Am. Fam. Physician* **2017**, *96*, 507–514.
117. Aggen, D.H.; Drake, C.G. Biomarkers for immunotherapy in bladder cancer: A moving target. *J. Immunother. Cancer* **2017**, *5*, 94. [CrossRef]
118. Buss, J.H.; Begnini, K.R.; Bender, C.B.; Pohlmann, A.R.; Guterres, S.S.; Collares, T.; Seixas, F.K. Nano-BCG: A Promising Delivery System for Treatment of Human Bladder Cancer. *Front. Pharmacol.* **2018**, *8*, 977. [CrossRef] [PubMed]
119. Nakamura, T.; Fukiage, M.; Higuchi, M.; Nakaya, A.; Yano, I.; Miyazaki, J.; Nishiyama, H.; Akaza, H.; Ito, T.; Hosokawa, H.; et al. Nanoparticulation of BCG-CWS for application to bladder cancer therapy. *J. Control. Release* **2014**, *176*, 44–53. [CrossRef]
120. Erdoğan, N.; İskit, A.B.; Eroğlu, H.; Sargon, M.F.; Mungan, N.; Bilensoy, E. Antitumor Efficacy of Bacillus Calmette-Guerin Loaded Cationic Nanoparticles for Intravesical Immunotherapy of Bladder Tumor Induced Rat Model. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2015**, *15*, 10156–10164. [CrossRef]
121. Masuda, H.; Nakamura, T.; Noma, Y.; Harashima, H. Application of BCG-CWS as a systemic adjuvant by using nanoparticulation technology. *Mol. Pharm.* **2018**, *15*, 5762–5771. [CrossRef]
122. Whang, Y.M.; Yoon, D.H.; Hwang, G.Y.; Yoon, H.; Park, S.I.; Choi, Y.W.; Chang, I.H. Liposome-Encapsulated Bacillus Calmette-Guérin Cell Wall Skeleton Enhances Antitumor Efficiency for Bladder Cancer In Vitro and In Vivo via Induction of AMP-Activated Protein Kinase. *Cancers* **2020**, *12*, 3679. [CrossRef] [PubMed]

EK-5 Tez Kapsamında Üretilen Yayınlar- 2

web

ofscience.com/wos/woscc/summary/41d35d70-b36d-465e-9631-eac590f1921b-4cb4fdbf/relevance/1

Science™

Search

Search > Results for A different approach to immunochemotherapy for colon Cancer: ...

1 result from Web of Science Core Collection for:

A different approach to immunochemotherapy for colon Cancer: Development of nanoplexes of cyclodextrins and Interleukin-2 loaded with Interleukin-2 loaded with 5-FU

Abkin,S,Vazan,G; (-); Bilenkov,E

Jul 25 2021 | INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS 623

Immune system deficiencies are crucial in the progression of cancer, predominantly because eradicate cancer cells. Immunochemotherapy is currently considered an innovative approach also aiding in the efficacy of chemotherapeutics. The aim of this study was to prepare a cycle

Full Text at Publisher ***

Copy query link

Publications You may also like...

Refine results

Search within results... 🔍

Filter by Marked List

Quick Filters

None of the results contain data in this field.

Authors

Show Researcher Profiles

Sen, Murat

Malanga, Milo

1

1

🔍

📄

🌐

🏠

👤

🔖

🔗

🔒

🔧

⚙️

🔄

🔍

📄

🌐

🏠

👤

🔖

🔗

🔒

🔧

⚙️

🔄

X CLOSE JOURNAL INFORMATION

INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS

Journal Impact Factor™
2021
Five Year
6.274

JCR Category
PHARMACOLOGY & PHARMACY
In SCIE edition

Category Rank
40/279

Category Quartile
Q1

Source: Journal Citation Reports 2021. Learn more 📄

Journal Citation Indicator™
2020
1.68

JCI Category
PHARMACOLOGY & PHARMACY
In SCIE edition

Category Rank
22/361

Category Quartile
Q1

The Journal Citation Indicator is a measure of the average Category Normalized Citation Impact (CNCI) of citable items (articles and reviews) published by a journal over a recent three year period. It is used to help you evaluate journals based on other metrics besides the Journal Impact Factor (JIF).

Learn more 📄



A different approach to immunochemotherapy for colon Cancer: Development of nanoplexes of cyclodextrins and Interleukin-2 loaded with 5-FU

Safiye Akkin^a, Gamze Varan^b, Davut Aksüt^c, Milo Malanga^d, Ayşe Ercan^e, Murat Şen^c, Erem Bilensoy^{a,*}

^a Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Hacettepe University, 06100 Ankara, Turkey

^b Department of Vaccine Technology, Vaccine Institute, Hacettepe University, 06100 Ankara, Turkey

^c Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Hacettepe University, 06100 Ankara, Turkey

^d CycloLab- Cyclodextrin Research & Development Laboratory, Organic Synthesis Laboratory, 1097 Budapest, Hungary

^e Department of Chemistry, Faculty of Science, Hacettepe University, 06800 Beytepe, Ankara, Turkey

ARTICLE INFO

Keywords:
Colorectal cancer
Cyclodextrin polymer
Immunochemotherapy
Nanoplex
5-Fluorouracil
Interleukin-2

ABSTRACT

Immune system deficiencies are crucial in the progression of cancer, predominantly because immune cells are not stimulated by cytokines to eradicate cancer cells. Immunochemotherapy is currently considered an innovative approach that creates pathways in cancer treatment, sometimes also aiding in the efficacy of chemotherapeutics. The aim of this study was to prepare a cyclodextrin (CD) nanoplex based on charge interaction to deliver the anticancer drug 5-fluorouracil (5-FU) and Interleukin-2 (IL-2), thereby forming a nanoscale drug delivery system aimed at chemo-immunotherapy for colorectal cancers. The CD:IL-2 nanoplexes were obtained with a particle size below 100 nm and a cationic surface charge based on the extent of charge interaction of the cationic CD polymer with negatively charged IL-2. The loading capacity of CD nanoplexes was 40% for 5-FU and 99.8% for IL-2. Nanoplexes maintained physical stability in terms of particle size and zeta potential in aqueous solution for 1 week at +4 °C. Moreover, the structural integrity of IL-2 loaded into CD nanoplexes was confirmed by SDS-PAGE analysis. The cumulative release rates of both 5-FU and IL-2 were found to be more than 80% in simulated biological fluids in 12 h. Cell culture studies demonstrate that CD polymers are safe on healthy L929 mouse fibroblast cells. Drug-loaded CD nanoplexes were determined to have a higher anticancer effect than free drug solution against CT26 mouse colon carcinoma cells. In addition, intestinal permeability studies supported the conclusion that CD nanoplexes could be promising candidates for oral chemotherapy as well. In conclusion, effective cancer therapy utilizing the absorptive/cellular uptake effect of CDs, the synergic effect and co-transport of chemotherapeutic drugs and immunotherapeutic molecules is a promising approach. Furthermore, the transport of IL-2 with this nano-sized system can reduce or avoid its toxicity problem in the clinic.

1. Introduction

Cancer is a life-threatening health problem worldwide and second after cardiovascular diseases in terms of fatalities (Siegel et al., 2020). Colorectal cancer (CRC) is expected to become the third-most common cause of cancer-related deaths for both sexes worldwide (Rawla et al., 2019; Siegel et al., 2020). In the treatment of CRC, several chemotherapeutic combinations are used along with surgery. Besides chemotherapy, targeted therapies and immunotherapeutic agents approved by the Food and Drug Administration (FDA) are also used in clinical

treatment, mostly in combination, due to the diverse nature of the cancer and the large surface area of the tumor site leading to easier metastasis to neighboring organs. In 2004, the FDA approved immunotherapeutic bevacizumab along with chemotherapy as first-line treatment in patients with advanced colorectal cancer (Bang et al., 2020). Later, both the FDA and the European Medicines Agency (EMA) approved combined therapies FOLFOX (Oxaliplatin + 5-fluorouracil (FU) + leucovorin) and FOLFIRI (Irinotecan + 5-FU + leucovorin) (Stanel et al., 2017). Fluoropyrimidine (i.e., 5-FU) was reported to increase overall survival by approximately 10 months in patients with

* Corresponding author.

E-mail address:

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121940>

Received 24 January 2022; Received in revised form 13 June 2022; Accepted 15 June 2022

Available online 18 June 2022

0378-5173/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

CRC. As a result of the combined treatment of fluoropyrimidines with cytotoxic agents, targeted therapeutics or bevacizumab, this rate was reported to be over 30 months (Bang et al., 2020). More than 230 studies in which 5-FU was applied in combination with chemotherapeutics, immunotherapeutics, phototherapeutics and surgery for the treatment of colon cancer are reported in clinical trial databases (clinicaltrials.gov, 2021).

Colorectal cancer chemotherapy has been based on 5-FU for several decades. 5-FU is an antimetabolite chemotherapeutic agent, that is a structural analogue of molecules necessary for cell growth and replication and acts on enzymes required for the synthesis of these molecules. Its active metabolites inhibit thymidylate synthase and disrupt RNA and DNA synthesis (Longley et al., 2003). Injectable 5-FU is prescribed in colorectal, breast, head and neck, bladder, and gastrointestinal cancers (Di Martino et al., 2017) with 5-FU being the first line recommended chemotherapeutic in colon cancer (Bang et al., 2020). In addition, topical solutions and creams and injectable products containing 5-FU are on the market for the treatment of basal cell skin cancer and actinic keratoses. The water solubility of 5-FU is 11.1 g/L at 22 °C and shows poor permeability, which leads to only 28% bioavailability after oral administration (Imoto et al., 2009). Moreover, 5-FU has an extremely short half-life of approximately 8 to 20 min (Goindi et al., 2014). This short half-life requires repeated high doses of 5-FU, consequently causing hematological, gastrointestinal, and bone marrow toxicities (Badran et al., 2017).

In combination with 5-FU, IL-2, a cytokine co-stimulating different immune mechanisms toward antigenic structures of tumors, viruses and toxins is proposed as a model component of immunochemotherapeutic nanoplexes developed in this study. IL-2 is responsible for the stimulation of T cells which sustain the long-term response and memory of the immune system. Clinical use of high dose IL-2 was approved for metastatic renal cell carcinoma in 1992 and melanoma in 1998 by the FDA (Wu et al., 2019). In colon cancer, the efficacy of interleukin-2 has been researched in mono and combination therapies in preclinical and clinical trials during the last few years. For instance, combining IL-2 with L19, an antibody fragment directed against the angiogenesis-associated B-fibronectin isoform ectodomain-B and used to target solid tumors, has resulted in high-dose accumulation inside the tumor without serious toxicity. When combined with radiotherapy, CTLA-4 or paclitaxel and cyclophosphamide have been shown to increase antitumoral activity in preclinical *in vivo* administration to models of colon cancer. Clinical studies of PEGylated IL-2 with nivolumab for colorectal cancer are underway (Briukhovetska et al., 2021; Mortara et al., 2018).

The half-life of IL-2 is 7 min, and it requires high doses and repeated therapy to maintain efficacy in treatment (Donohue and Rosenberg, 1983; McHugh et al., 2015). However, high-dose IL-2 causes serious side effects, such as capillary leak syndrome and neutrophil dysfunction (Xie et al., 2019). For these reasons, different approaches have been taken to reduce side effects and develop systems containing IL-2 that provide extended therapeutic efficacy at a low dose. For example, IL-2-fusion proteins, anti-IL-2 antibodies, and IL-2 loaded nanoparticulate delivery systems are being researched by several groups (Frick et al., 2016; Mizui, 2019; Tang et al., 2019).

Cyclodextrin (CD) polymers are macromolecules that can be synthesized by combining CD monomers using crosslinkers such as epichlorohydrin, phenyl isocyanate, diphenyl carbonate and hexamethylene diisocyanate or by covalently linking these monomers to a matrix agent (Binello et al., 2008; Polch-Cano et al., 2014). It is reported that stronger complexes are formed between the water-soluble CD polymer and the drug with an opposite surface charge (Chen et al., 2018; Gidwani and Vyas, 2014). Water-soluble drugs are shown to increase permeability by acting directly on mucous membranes when conjugated with CDs, thereby increasing absorption and bioavailability of the drug. In addition, epichlorohydrin- β CD (EPI- β CD) has been found to increase the solubility and bioavailability of the drug through studies on human volunteers (Zhang et al., 2010). Cationic β CD polymers were synthesized

using a condensation reaction between monomers with epichlorohydrin in a nanoflower system. In a study performed for the oral administration of 5-FU, a nanoflower carrier system was developed in which alginate and chitosan were used as “petals” and cationic β CD as polymeric cores. Lakkakula et al. reported that with this nanoflower system, the loading efficiency of 5-FU is over 70%, and it exhibits a sustained release profile (Lakkakula et al., 2017). Besides drug delivery, several cationic CD carriers have been developed as gene carrier systems for macromolecular delivery in the literature. It is emphasized in the literature that the greatest advantage of these systems is to protect the genetic material from nuclease degradation (Neva et al., 2020; Rivero-Barbarroja et al., 2020).

Nanoplexes used as drug and gene delivery systems are self-forming nanoparticles based on electrostatic interaction between two opposite charged structures (Dong et al., 2019; Gary et al., 2013; Marin-Menendez et al., 2017). In the preparation and characterization of drug-loaded nanoplex systems, it is important to provide the interaction of charged groups called the $\pm$ charge ratio, weight ratio, or molar ratio (Aji Alex et al., 2017; Hassan et al., 2019; Nguyen et al., 2016). Self-assembled nanoplex vaccine containing ovalbumin and poly (propyl acrylic acid) were evaluated on melanoma model. The nanoplex diameters were 78 nm with a polydispersity index of 0.41. Increased immune response was demonstrated at the T cell and dendritic cell levels (Qiu et al., 2018). Nanoplexes were prepared by incubating histidine-lysine and Doxorubicin: DNA conjugate in a study where they were used as Doxorubicin delivery systems. When compared to the drug solution, these nanoplexes increase the drug accumulation in the tumor by around 5.5-fold in breast tumor-induced mice (Zhao et al., 2019). In another study aimed at combined drug therapy, first the anticancer active substance mitoxantrone: pullulan-PEI-CD inclusion complex was prepared. Then, the nanoplex was prepared by using the inclusion complex and the gene encoding the tumor suppressor protein p53. The activities of the nanoplexes were determined for mitoxantrone and p53 in HepG2 and C6 cell lines, respectively. The antitumor activity of the prepared combination nanoplex formulation was found to be higher than that of each active molecule alone. Moreover, the combined nanocarrier system improved the uptake of pullulan by HepG2 cells, allowing multidrug resistance to be overcome (Mitha and Rekha, 2014).

The aim of this study is to develop an effective cancer immunochemotherapy with a nanoplex formulation based on a charge interaction of cationic CD polymers with IL-2 further encapsulated with 5-FU, to facilitate the stable delivery of IL-2 and the controlled release and targeting of 5-FU to colon tumors. 5-FU and IL-2 complexed with three different CD polymers that had been cross-linked with epichlorohydrin. 5-FU/IL-2/CD nanoplexes were extensively characterized in terms of particle size distribution, zeta potential, physical stability in biorelevant media, bioactivity of IL-2 in nanoplex form, as well as loading capacity and release profiles of both active molecules. Cell culture studies were performed to evaluate the effectiveness of the nanoplexes against colon tumors.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Cationic CD polymers were synthesized and characterized by CycloLab R&D Laboratory (Hungary). 5-FU and recombinant mouse IL-2 were purchased from Sigma-Aldrich (Germany). Dialysis Tubing Cellulose Membrane (avg. flat width 25 mm, MWCO: 14000 Da) was obtained from Sigma & Aldrich (Germany). Mouse IL-2 ELISA Detection Kit (B-EL-M0042) was purchased from Elabscience (China). L929 mouse fibroblast and CT26 mouse colon carcinoma cell lines were purchased from American Type Culture Collection (ATCC). LDH-Cytotoxicity Colorimetric Assay Kit (K311-400) was purchased from Biovision (USA). Ultrapure water was obtained from Millipore Simplicity 185 Ultrapure Water System (Millipore, France). All other chemicals used were of

Table 1
Cartoon representations and physicochemical properties of cationic CD polymers used in the preparation of nanoplexes.

CD Polymers	Molecular Structure	Polymer Name	Physicochemical properties
CD1		Quaternary- Ammonium-βCD polymer hydrochloride, cross-linked with epichlorohydrin	Solubility: Water greater than 30 g (in 100 cm ³ , at 25 °C) Surface Charge: 33.3 ± 0.6 mV (in water)
CD2		Amino-βCD polymer hydrochloride, cross-linked with epichlorohydrin	Solubility: Water soluble (in 100 cm ³ , at 25 °C) Surface Charge: 22.2 ± 2.3 mV (in water)
CD3		Guanidino-βCD polymer hydrochloride, cross-linked with epichlorohydrin	Solubility: Water soluble (in 100 cm ³ , at 25 °C) Surface Charge: 34.2 ± 0.8 mV (in water)

analytical grade and obtained from Sigma & Aldrich (Germany).

2.2. Preparation of 5-FU and IL-2 nanoplexes

The 3 different CD-based polymers used in the study were quaternary ammonium βCD polymer (CD1), amino βCD polymer hydrochloride (CD2) and guanidino βCD polymer hydrochloride (CD3) (cartoon representations and essential physicochemical properties displayed in Table 1). CD nanoplexes were prepared with basic complexation procedures (Kaban et al., 2019; Sohrabi et al., 2019). In the literature, there are nanoplex studies prepared using different parameters. The ratios used in the preparation of nanoplexes in this study were adapted from previous studies (Di Martino et al., 2017; Horwitz et al., 2019). Briefly, nanoplex formulations carrying active substances were prepared with a CD: 5-FU ratio of 10:1 (w/w) and a CD: IL-2 ratio of 25.000:1 (w/w) (Di Martino et al., 2017; Horwitz et al., 2019). First, a 5-FU stock solution was prepared in ultrapure water (0.4 mg/mL) by mixing it at 600 rpm for 1 h. Then 4 mg of CD was dissolved in 984 μL of ultrapure water at 600 rpm for 1 h. A 1 mL 5-FU stock solution was added to the CD solution and stirred at 600 rpm for 30 min. 16 μL of IL-2 solution (10 μg/mL) was added to the nanoplexes and mixed for 30 min at 600 rpm. The pH values of the prepared nanoplexes were measured with a pH-meter (Hanna Instruments, HI3220) and evaluated in stability studies.

2.3. In vitro characterization of 5-FU and IL-2 nanoplexes

2.3.1. Size distribution and surface charge of nanoplexes

The mean particle size (nm) and polydispersity index (PDI) of

nanoplex formulations were determined by the dynamic light scattering (DLS) technique (Malvern Zetasizer Nano ZS Series, UK) at a scattering angle of 173° using disposable capillary cells. The zeta potential (mV) was measured by a particle size analyzer (Malvern Zetasizer Nano ZS Series, UK) at a scattering angle of 12.8° using disposable capillary cells. Each measurement was carried out in triplicate and expressed as mean ± standard deviation. The Nanoparticle Tracking Analyzer (NTA) was also used to examine the particle size and distribution of nanoplexes diluted 1:1000 in ultrapure water (NanoSight NS300).

2.3.2. Morphology of nanoplexes

The morphology of 5-FU and IL-2 loaded nanoplexes was determined by scanning electron microscopy (SEM). For this purpose, freshly prepared liquid samples were dried and coated with a 10 nm-thick layer of gold / palladium using the Gatan 682 Precision Etching and Coating System (PECS). Imaging was performed using the FEI Quanta 200 FEG ESEM device and the Everhardt-Thornley SED detector.

2.3.3. Fourier Transform Infrared spectroscopy

The interaction between the guest molecule and the nanoplex structure in the solid phase was evaluated using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR). FT-IR spectra of 5-FU, CD polymers and 5-FU loaded CD nanoplexes were obtained from 4000 to 400 cm⁻¹ with a Perkin Elmer Spectrum Two spectrometer equipped with a diamond-ATR unit. The determination of drug-polymer interactions is based on the vibration of the bonds between the nanoplex and the drug.

2.3.4. Differential scanning calorimetry

Differential Scanning Calorimetry (DSC) was used to analyze the thermal behavior of 5-FU, CD polymers and 5-FU loaded CD nanoplex formulations. The analysis was performed at a rate of 10 °C/min from 20 °C to 300 °C, under dynamic N₂ (g) using Perkin Elmer Pyris 1 at a gas flow rate of 20 mL/min.

2.3.5. Loading capacity of nanoplexes

The loaded active molecule quantity was determined indirectly with a validated reverse phase high pressure liquid chromatography (HPLC) method (Agilent 1100 HPLC System). For this purpose, the undissolved free drug was removed from nanoplex formulations through centrifugation for 10 min at 3500 rpm with Millipore Ultrafree-MC 100,000 NMWL filters (Sun et al., 2017). The HPLC system comprised of reversed phase C18 Purospher® STAR analytical column (250 mm × 4.6 mm, 5 µm), mobile phase of water: acetonitrile (90:10 v/v) delivered at a flow rate 1.00 mL/min. A 50 µL sample was injected for analysis, and 5-FU in the supernatant was then quantified by diode array detection (DAD) at 266 nm wavelength (Yan et al., 2006). All calculations were performed using Equation 1.

The amount of IL-2 loaded in CD nanoplexes was determined using the IL-2 ELISA kit. Unloaded IL-2 was taken using a centrifugal filter, and manufacturers manual was applied. Briefly, 100 µL unloaded IL-2 samples or standard were added to the pre-coated wells. After 90 min of incubation at 37 °C, a biotinylated detection antibody was added to each well and incubated for 60 min. After washing steps, samples were incubated with Avidin-HRP conjugate. Finally, after the substrate reagent was added, the optical density was measured using spectrophotometry at 450 nm. The amount of unloaded IL-2 in the samples was calculated with the calibration equation prepared using the kit standard. Then, the amount of loaded IL-2 in the nanoplex formulations was determined using Equation 1.

2.3.6. Integrity of nanoplexes

2.3.6.1. Storage stability. 5-FU and IL-2 loaded CD nanoplex dispersions were kept in ultrapure water at + 4 °C for one week. Stability was evaluated in terms of changes in mean particle size (nm), PDI and zeta potential (mV) values (n = 3 ± SD). These values were recorded with Malvern Zetasizer Nano ZS device on days 0, 1, 4 and 7.

2.3.6.2. Effect of lyophilization on integrity. For this purpose, loaded nanoplex formulations were lyophilized for 48 h (HETO PowerDry PL3000 freeze drier, Thermo Fisher Scientific). At the end of this period, powder samples dispersed in 2 mL (volume of final formulation) of ultrapure water to equal the volume prior to lyophilization. Mean particle size (nm), PDI and zeta potential (mV) values were measured before and after lyophilization.

2.3.6.3. Integrity in different biological fluids. To determine the effect of different biological fluids on the physical stability of CD nanoplexes, all formulations were incubated in simulated gastric fluid (SGF) pH 1.2 for 2 h, simulated intestinal fluid (Sur-Erdem et al., 2020) pH 6.8 for 2 h and simulated colonic fluid (SCoF feast) pH 6 for 8 h, phosphate buffer solution (PBS) pH 7.4 for 8 h and cell culture medium (DMEM with 10% FBS, 100 U/mL Penicillin- Streptomycin) for 24 h. These biological fluids were prepared based on European Pharmacopoeia (EP) 8.0 (1) and literature (Marques et al., 2011). CD nanoplex formulations were diluted with appropriate media in a ratio of 1:10 (v/v) and incubated at 37 °C. Mean particle size (nm), PDI and zeta potential (mV) of the CD nanoplexes were measured before and after incubation.

2.3.7. Assessment of IL-2 integrity

To detect the integrity of IL-2 encapsulated in CD nanoplex formulations, non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) was

performed. Samples were diluted at a 1:1 ratio with 2X Laemmli Sample loading buffer (65.8 mM Tris-HCl, pH 6.8, 26.3% (w/v) glycerol, 2.1% SDS, 0.01% bromophenol blue). 25 µL of each sample was loaded onto 4–12% Bis-Tris acrylamide gradient protein gel (NuPAGE, Invitrogen). To determine the relative molecular weights of the samples, Precision Plus Dual Color molecular weight standard in the range 10–250 kDa (Biorad) was used. As a positive control, native recombinant IL-2 was used and loaded onto the gel as well. Samples were run with Tris-Glycine Running Buffer (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1% SDS, pH 8.3) at 100 V for 2 h. Gels were stained for 2 h with Bio-Safe Coomassie Stain (Biorad) to visualize the protein bands. Gel images were captured using the Kodak Gel Logic 200 Imaging System and Kodak Molecular Imaging Software version 4.0 (Devrim et al., 2011).

2.3.8. In vitro drug release from CD nanoplexes

The release profile of 5-FU from CD nanoplexes were performed using the dialysis membrane technique under sink condition at 37 °C and shaking with 120 rpm. For this purpose, 1 mL nanoplex formulation was added into the dialysis membrane and transferred into 9 mL of different release media. The first release medium was PBS (pH 7.4) containing 0.2% Tween 80 to provide physiological conditions in intravenous administration. The system was put in a shaking water bath and at predetermined time intervals (0, 5, 10, 15 and 30 min and 1, 2, 4, 8, 12 h), and a sample was taken from the PBS and replaced by the same volume of fresh PBS. In addition, to mimic eventual oral administration of nanoplexes, release studies were also conducted with pH 4.5 simulated gastric fluid (SGF) for a period of (0–2 h), followed by pH 6.8 simulated intestinal fluid SIF (Sur-Erdem et al., 2020) for (2–4 h) and in pH 6 simulated colonic fluid (SCoF) (4–24 h). In the apparatus set up in the water bath with shaker, a 500 µL sample was taken at certain time intervals (0.5, 1, 2, 3, 4, 8, 12 and 24 h) in corresponding media, and the same amount of fresh medium was added to maintain the volume of the release medium (Di Martino et al., 2017). The amount of 5-FU in the samples taken was determined by HPLC and the cumulative amount of 5-FU released was calculated.

The release studies of IL-2 from 5-FU and IL-2 loaded nanoplexes were carried out as described above for 5-FU. However, nanoplexes of 100 µL were dispersed in a release medium of 900 µL, and samples were collected at specific time intervals (0.5, 1, 2, 3, 4, 8, 12 and 24 h) in a shaker water bath. IL-2 release studies were also performed in simulate fluids as described for 5-FU. For each time interval, the release medium was centrifuged for 10 min at room temperature at 10,000 rpm and then 100 µL of the supernatant was taken and fresh medium was added to the release medium (Park et al., 2012; Zhao et al., 2018). The amount of IL-2 in the samples were determined by using an IL-2 ELISA kit and the cumulative amount of released IL-2 was calculated.

2.4. Cell culture studies

2.4.1. Safety of CD polymers

The MTT cytotoxicity test and L929 mouse fibroblast cells are proposed by the US Pharmacopoeia (USP) 37 and ISO 10993-5: 2009 for *in vitro* determination of the toxicity of polymeric materials that will directly or indirectly contact the mammalian cell. For this purpose, L929 cells were seeded in 96-well cell plates, with 5,000 cells per well in 100 µL DMEM. After 24 h, different concentrations of CD polymer solutions (0.007, 0.015, 0.031, 0.062 mg/mL) were added to the wells. After the cells were incubated for 24, 48 and 72 h, the cell viability study was determined using a WST-1 test. At this stage, 100 µL of WST-1 solution (1:10 WST-1: DMEM) was added to each well. Measurements were made with a microplate reader at 450 nm as given in Equation 2 (n = 3, ± SD).

2.4.2. Lactate dehydrogenase activity

The lactate dehydrogenase enzyme (Oldham, 2017) is an enzyme normally found in cytosol and is rapidly permeated to the external environment in the event of cell membrane damage. The enzyme

oxidizes the lactate to the pyruvate and reacts with the tetrazolium salt added to the pyruvate medium. The increase in the amount of formazan in the culture medium (supernatant) is directly related to the increase in the number of lysed cells. Data of the well containing the cell and culture medium serve as a negative control in the study; as a positive control, data of the well containing 1% Triton X-100 solution were used. Optical density was measured with the microplate reader at 500 nm as given in Equation 3.

2.4.3. Cytotoxicity of CD nanoplexes on 2D CT26 cell culture

Firstly, CT26 cells were planted in 96-well cell plates, with 5,000 cells / well in 100 μ L DMEM. After 24 h, 5-FU solution was added at eleven different concentrations (0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 200 and 400 μ M). The cells were incubated for 24 and 48 h, then cell viability was measured as described above. At this stage, cells treated only with DMEM were considered 100% viable. The IC_{50} value of 5-FU was calculated in GraphPad Prism 6. According to the process described above, at the calculated IC_{50} value containing the 5-FU amount, solutions 5-FU loaded CD nanoplexes, 5-FU and IL-2 loaded CD nanoplexes, 5-FU solution and 5-FU + IL-2 solution were applied into well to observe the efficacy. Also, by calculating the amount of CD polymers inside the nanoplexes, CD solutions were used as control groups. Lastly, cell viability was determined at 24 and 48 h, as noted above.

2.4.4. Permeation of CD nanoplexes into Caco-2 cells

The permeation of 5-FU and IL-2 loaded nanoplexes according to the 5-FU solution were investigated in the Caco-2 cell monolayer. Caco-2 cells were grown on 12-well polycarbonate membrane filters (Thinerts™, pore diameter 1 μ m, area 1.13 cm²) at a density of 6×10^4 cells / insert. The culture medium for apical and basolateral parts of the inserts were changed every 2 days for 21 days. The culture medium was removed and pre-incubated with 0.5 mL of Hanks' balanced salt solution (HBSS) containing 10 mM HEPES for 30 min 37 °C. The transport medium was added on the basolateral side as 1.5 mL volume, and the donor solution (containing 200 μ M of 5-FU) was placed on the apical side of the monolayer (Sanchez-Vazquez et al., 2019). Cells were incubated at 37 °C for 4 h. Samples were taken from the basolateral side and filtered through a membrane filter (0.45 μ m, polyvinylidene fluoride). The samples were diluted with mobile phase at 1:1 ratio and analyzed in HPLC. The apparent permeability coefficient (P_{app}) of 5-FU was calculated using Equation 4.

2.5. Statistical analysis

All statistical analyses were performed by Student's *t*-test and ANOVA test using GraphPad Prism version 6 (San Diego, CA, USA). $p < 0.05$ was considered to denote a statistically significant difference.

3. Results and discussion

In this study, cationic CD polymers were incubated with chemotherapeutic drug 5-FU and immunotherapeutic drug IL-2 to prepare nano-sized systems based on opposite charge interaction of macromolecules for colon cancer treatment. Nanoplexes, which have received attention in the literature as gene and drug carrier nanosystems, have several advantages over other nanoparticulate systems. The nanoplex preparation method is an easy-to-use method that involves mixing only drug(s) and polymer solutions. In addition, the energy required for nanoplex preparation is minimal. Moreover, nanoplex preparation does not necessitate the use of a lot of solvents or sophisticated equipment. The ratio of different charges in the nanoplex system, known in the literature as the N/P ratio in gene-carrying systems and the +/– ratio in active substance-carrying systems, is a critical physicochemical parameter for polymer-based nanoplex systems. In literature, the +/– charge ratio in nanoplexes containing active substances is referred to as a molar ratio or weight ratio (Hassan et al., 2019; Nguyen et al., 2016). The

Table 2
Mean particle diameter (nm), polydispersity index and zeta potential (mV) data of 5-FU/IL-2/CD nanoplexes (n = 3, $\pm$ SD).

Polymer Type	Mean Particle Size (nm)	PDI	Zeta Potential (mV)	pH
CD1	68.4 $\pm$ 12.3	0.48 $\pm$ 0.02	+25.7 $\pm$ 1.8	6.5
CD2	43.4 $\pm$ 15.4	0.58 $\pm$ 0.36	+14.2 $\pm$ 1.8	5.5
CD3	91.3 $\pm$ 14.7	0.73 $\pm$ 0.2	+27 $\pm$ 2.3	7.0

particle size, polydispersity index, and zeta potential values of nanoplexes were measured. The amounts of 5-FU and IL-2 loaded on the prepared nanoplexes were determined using HPLC and ELISA, respectively. In addition to the size analysis of nanoplexes using the dynamic light scattering method and a nanoparticle tracking analyzer, optical imaging with a SEM was also performed. Short-term stability studies were used to determine the size and surface properties of nanoplexes. *In vitro* drug release studies were performed in fasted and fed state simulated fluids for oral administration, as well as in phosphate buffer to mimic parenteral administration. Furthermore, the stability of nanoplexes prepared in release media and cell culture media was investigated. FT-IR and DSC analyses were used to demonstrate the formation of the nanoplex structure and the incorporation of 5-FU into the structure. The safety of CD polymers was determined in the L929 mouse fibroblast cell line, and their anticancer activity was determined in CT26 murine colon cancer cells. Permeability tests were performed in CaCo-2 cells as part of the oral administration research.

3.1. *In vitro* characterization of nanoplexes

3.1.1. Size distribution and surface charge of nanoplexes

The particle sizes of the nanoplexes were below 100 nm. Considering the *in vitro* characterization results of 5-FU/IL-2/CD nanoplexes, the smallest particle size (43.4 $\pm$ 15.4 nm) with positive zeta potential value (+14.2 $\pm$ 1.8 mV) was obtained for nanoplexes prepared with CD2 derivative as seen in Table 2. Unlike CD2 derivative, nanoplexes prepared with CD3 polymer have the largest particle size (91.3 $\pm$ 14.7 nm) with the highest positive zeta potential value (+27 $\pm$ 2.3 mV). PDI values of nanoplexes vary with a range of 0.48 to 0.73 according to the type of CD polymer used (Table 2). All nanoplexes had close to neutral pH as measured with a pH-meter (Table 2).

For the characterization of nanoplexes, particle size measurement was additionally carried out with Nanosight NS300 and the obtained findings are shown in Fig. 1. When looking at the graphs, it is clear that the particle size distribution curve, unlike CD1 (62 nm), has a second neighboring peak that coincides with the peaks in CD2 and CD3. The first peak for CD2 is at 58 nm, and the second is at 75 nm. In CD3 nanoplexes, a first peak at 73 nm is followed by a second peak at 95 nm. NTA graphs can explain the PDI values of the nanoplexes formed by the surface charge interaction of oppositely charged molecules, and the acquired results can be stated to be confirmed by DLS results.

Particle size distribution is an important parameter in the stability and biodistribution of nanoparticles. Additionally, particle size and zeta potential values are crucial in interaction with biological membranes of the nanocarriers (Verma and Stellacci, 2010). In order to determine particle size distribution, laser scattering techniques (e.g., DLS) and electron microscopy (EM) have been used commonly in reports. DLS is convenient in early stages of stability detection. In addition, EM provides the opportunity to observe the morphology and size of nanoparticles. Though DLS and EM are preferable in pre-clinical studies, different techniques (e.g., centrifugal techniques, particle tracking analysis) can prosecute analysis of batch-to-batch variability in multiple production (Caputo et al., 2019). In these cases, we combined the use of DLS and EM techniques for the determination of particle characterization, and the data obtained using both methods supported and

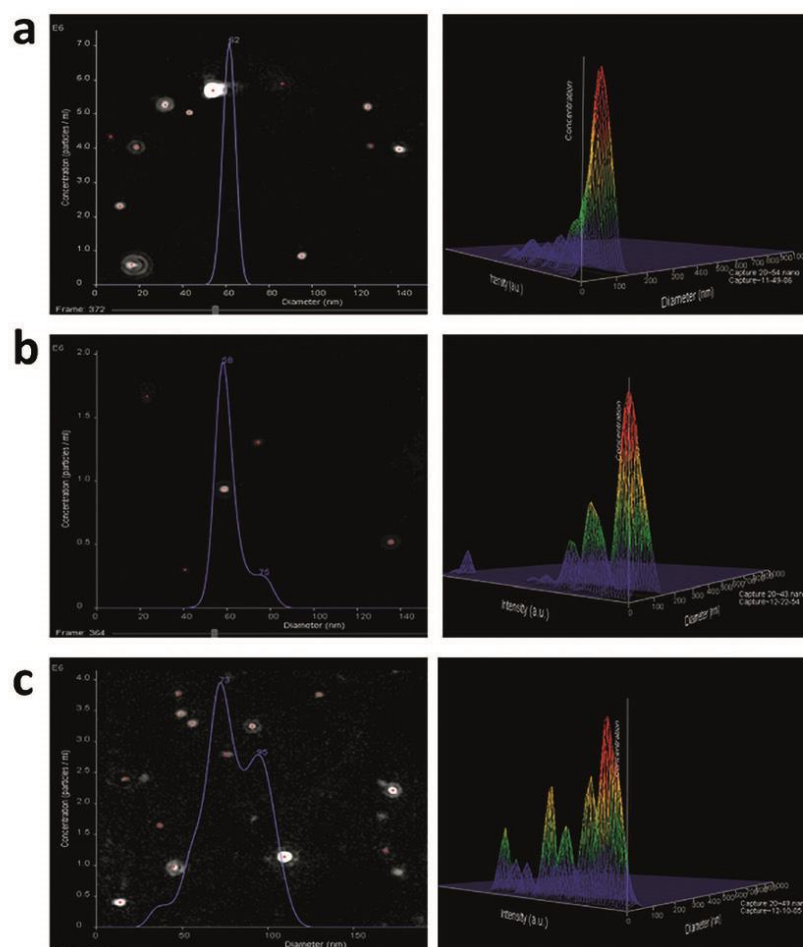


Fig. 1. Characterization of 5-FU and IL-2 loaded CD1 (a), CD2 (b) and CD3 (c) nanoplex formulations by nanoparticle tracking analyzer.

confirmed each other. We observed that particle sizes of 5-FU and IL-2 loaded CD nanoplexes were below 100 nm, and PDI values were distributed in wide ranges.

Tumor microenvironments consist of multiple cells and molecules during tumor development and differentiation. In this complexity, nanoparticulate systems present some advantages for the delivery of drugs like tunability of size and shape, to accumulate at a higher amount at the target site and to release over a long-term period in the tumor area (Yang et al., 2021). Nanoparticles can deliver the drug through two main mechanisms, which are passive and active targeting. Passive targeting is based on the so-called enhanced permeability and retention (EPR) effect (Shakeran et al., 2021). To sustain the effect and escape reticuloendothelial system uptake, nanoparticles should not exceed 200–300 nm and should not have a size below 10 nm (Yu et al., 2020).

As nanoplex systems are formed on the basis of electrostatic interactions, structural properties of active substances and polymer have affected particle size (Kiew et al., 2015). As the number of molecules such as drugs, active substances and targeting agents added to the

nanoplex structure increased, the polydispersity index increased. For example, Yang et al. designed Lactobionic acid conjugated and PEGylated doxorubicin loaded β CD nanocomplexes for targeted liver cancer therapy. The nanoplexes have 68 nm of particle size and 0.42 PDI values (Yang et al., 2019). In a study, curcumin was loaded into cross-linked β CD, the structure has negative surface charge and nanocomplexes with cationic chitosan were prepared by stirring at 37 °C. The complex had a particle size more than 300 nm and nearly 0.4 PDI (Karpkird et al., 2020). It was found that in antibiotic loaded dextran nanoplex systems, particle sizes ranged from 80 to 550 nm, and the polydispersity value was at 0.5 (Hassan et al., 2019; Shendge et al., 2014; Sikwal et al., 2016). In this study, the two macromolecules, CD polymers and IL-2, were used along with 5-FU forming nanoplexes based solely on electrostatic interaction. As seen in different studies, particle size and PDI values of 5-FU-IL-2 loaded CD nanoplexes were in accordance with these studies. In fact, all CD polymers were able to form nanoplexes smaller than 100 nm with net positive surface charges suggesting higher capability of escaping macrophage uptake and easier cellular uptake. The relatively

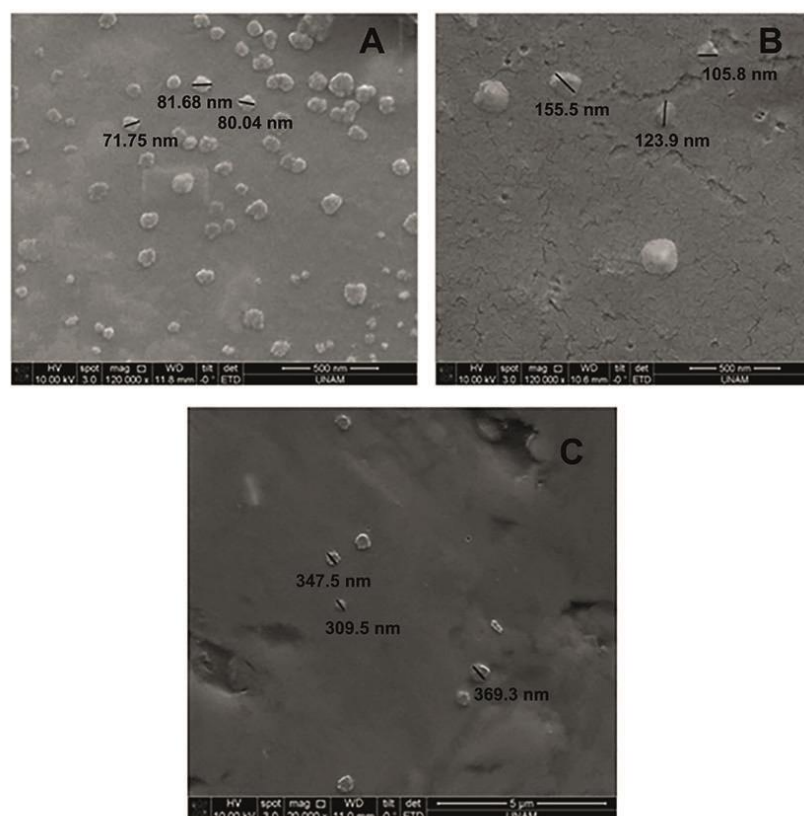


Fig. 2. SEM images of 5-FU/IL-2/CD nanoplexes for CD1 (A), CD2 (B) and CD3 (C) respectively.

more polydisperse nature of the nanoplexes results from the mechanism of formation and the high ratio needed for IL-2 per CD.

3.1.2. Morphology of nanoplexes

Morphological images of the three different 5-FU/IL-2/CD nanoplexes were taken by scanning electron microscopy (SEM). As seen in Fig. 2, microscopic images showed more angular and smaller particle size in CD1 nanoplexes (Fig. 2A), while spherical and smooth particles were observed in CD2 nanoplexes (Fig. 2B). Particles of different sizes were also viewed in CD3 nanoplexes (Fig. 2C), and this result also confirmed the wide PDI distribution in measurements with the Malvern Zetasizer Nano ZS.

SEM images of the prepared nanoplexes in liquid form were obtained as seen in Fig. 2. The particle size of CD1 and CD2 nanoplexes were viewed with a mean 100 nm; conversely, CD3 nanoplexes surpassed 300 nm. After samples were lyophilized into powder, clustered nanoplexes resembling a bunch of grapes were visualized as in the studies of Nguyen et al. In a study conducted by Hassan et al., it was observed that vancomycin nanoplexes prepared with dextran sulfate were angular, while chitosan nanoplexes loaded with curcumin were spherical (Hassan et al., 2019; Nguyen et al., 2016). It is stated in the literature that chitosan nanoplexes loaded with 5-FU are morphologically spherical like CD2, and CD3 nanoplexes are angular like CD1 nanoplexes (Anitha et al., 2014; Di Martino et al., 2017; Sun et al., 2017). These images have verified results of DLS measures when evaluated with wide PDI

distribution.

3.1.3. Fourier Transform Infrared spectroscopy

Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy is a technique that allows structural analysis elucidation and can show possible chemical interactions between the different CD polymers and the drug.

FTIR spectra of 5-FU, CD polymers and 5-FU/IL-2/CD nanoplex formulations are given in Fig. 3. The 5-FU spectrum contains characteristic bands at 771 cm^{-1} (CF = CH vibrations), 1345 cm^{-1} (pyridine vibrations), $1400\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ (C = C and C = N vibrations), 1720 cm^{-1} (C = O stretching) and $2900\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$ (N-H stretching). In all nanoplex formulations, these major bands of 5-FU cannot be observed or are observed with very low intensity for CD1. All CD polymer and nanoplex spectra have one broad band at $3200\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$ indicating O-H stretching. Also, a $1050\text{--}1085\text{ cm}^{-1}$ band shows C-O stretching and $1600\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ bands of amide groups of CD polymers and nanoplexes. While similarities are observed in the bands of the polymer and nanoplexes, the band intensities being different, shifts in bands and the disappearance of the 5-FU peaks indicate that new bonds are formed. This suggests that 5-FU is effectively interacting with the CD polymers resulting in encapsulating into nanoplexes (Di Donato et al., 2016; Sanchez-Vazquez et al., 2019; Tigli Aydın and Pulat, 2012).

3.1.4. Differential scanning calorimetry

Differential scanning calorimetry (DSC) was used to analyze thermal

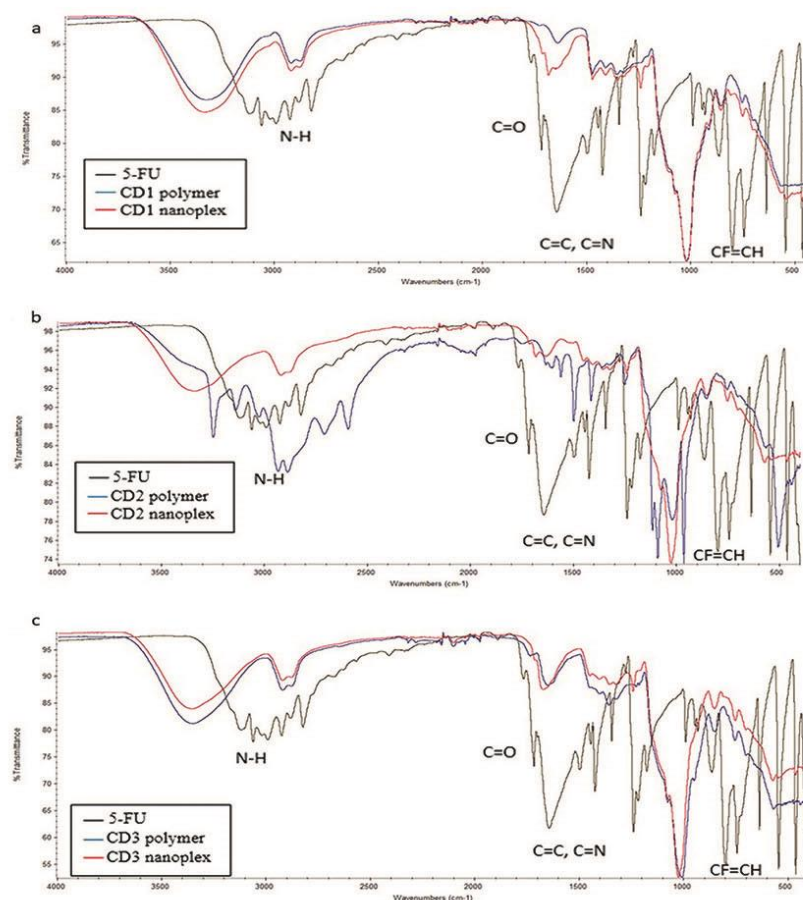


Fig. 3. FTIR spectra of 5-FU, CD polymers and 5-FU/IL-2/CD nanoplexes for CD1 (a), CD2 (b) and CD3 (c). The spectra were obtained in the range of 400 and 4000 cm^{-1} wavelengths.

behavior of the model drug, CD polymers and drug-loaded CD nanoplexes to further elucidate possible interactions and the presence of the free crystalline drug in the nanoplexes. In order to assess the thermal behavior of 5-FU loaded CD nanoplex formulations, DSC analysis was performed on free 5-FU, CD polymers and 5-FU/IL-2/CD nanoplexes. DSC thermograms and endothermic peaks are observed at the melting or boiling points of molecules. With the formation of the nanoparticulate systems, the peak of the active substance disappears. In this analysis, no melting peak was observed in the CD polymer or nanoplexes. The melting peak of 5-FU seen at 284 °C as in accordance with literature (Kalantarian et al., 2010; Sanchez-Vazquez et al., 2019), as given in Fig. 4, while the DSC thermograms of all nanoplexes did not have the peak of 5-FU.

3.1.5. Loading capacity of nanoplexes

The loading capacity of 5-FU is approximately 40% in 5-FU/IL-2/CD nanoplexes and approximately 30% in 5-FU loaded CD nanoplexes. It was observed that the incorporation of IL-2 into the nanoplex structure increases the loading capacity of CD nanoplex for 5-FU. As seen in

Table 3, 5-FU did not have a negative effect on the loading of IL-2. Approximately the same amount of IL-2 was loaded on 5-FU/IL-2/CD nanoplexes and on IL-2 loaded CD nanoplexes.

The loading capacity of 5-FU and IL-2 were found to be approximately 40% and above 99.8%, respectively. The loading capacity (LC) and encapsulation efficiency (EE) of hydrophilic drugs is observed to be generally lower than hydrophobic drugs because they tend to dissolve quickly in the aqueous phase (Vakilinezhad et al., 2018). Some anticancer drugs nanoparticles loading with nicotinamide, doxorubicin and 5-FU showed low EE varying from 35% to 55. For nicotinamide loaded solid lipid nanoparticles, the value is 36% (Vakilinezhad et al., 2018). Nanoparticulate systems based on charge interaction are investigated and for instance, Sun et al. generated 5-FU loaded chitosan nanoparticles using the ionic gelation method at 1:1 mass ratio, and EE was calculated as 44.2% (Sun et al., 2017). In a combined system, curcumin and 5-FU loaded chitosan-based nanoparticles were prepared to investigate *in vitro* efficacy and *in vivo* bioavailability in the treatment of colon cancer by Anitha et al (Anitha et al., 2014). The ionic cross-linking method and a 1:5 wt ratio was used. As a result, increased anticancer

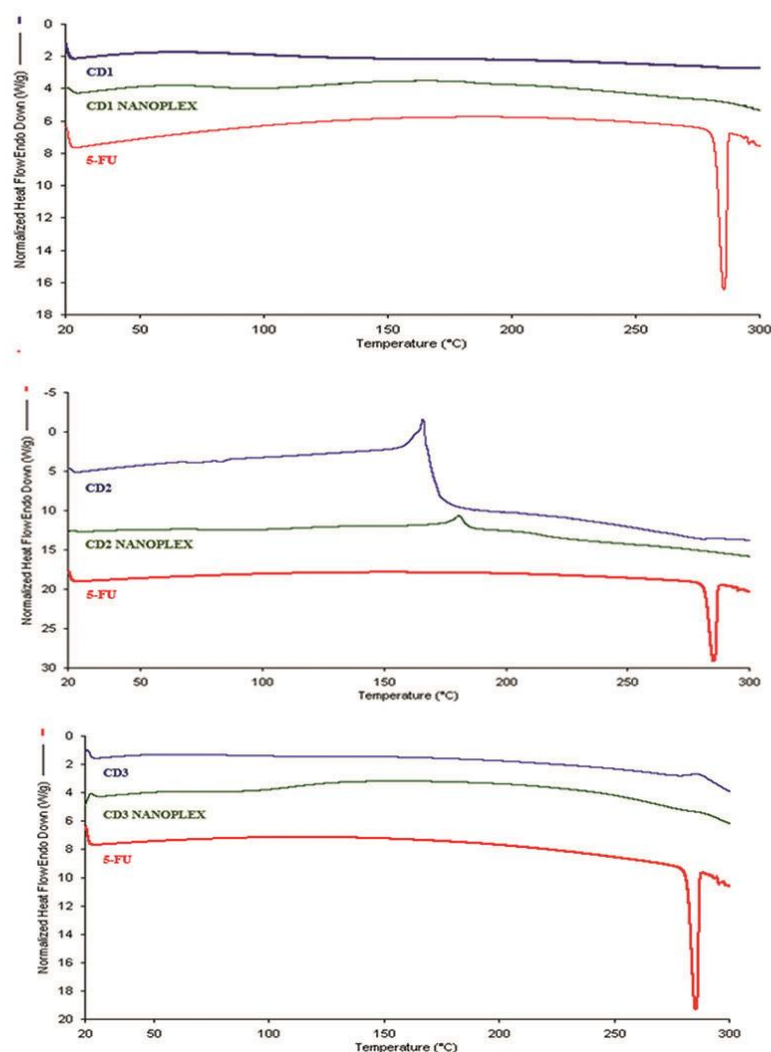


Fig. 4. DSC thermograms of 5-FU, CD polymers and 5-FU/IL-2/CD nanoplexes. The thermograms was obtained by increasing 10 °C/ min.

Table 3

Loading amount of 5-FU and IL-2 in only or combined drug in CD nanoplexes. The loading amount was calculated with HPLC method and ELISA kit for 5-FU and IL-2, respectively (n = 3 ± SD).

Polymer Type	Loaded Amount of 5-FU (%)		Loaded Amount of IL-2 (%)	
	5-FU/CD Nanoplexes	5-FU/IL-2/CD Nanoplexes	IL-2/CD Nanoplexes	5-FU/IL-2/CD Nanoplexes
CD1	29.3 ± 7	39.8 ± 6.1	99.89 ± 0.01	99.8 ± 0.02
CD2	29.8 ± 5	43.5 ± 2.6	99.93 ± 0.03	99.9 ± 0.06
CD3	33.4 ± 4	41 ± 5.0	99.9 ± 0.01	99.8 ± 0.01

effect and bioavailability was obtained with 48% EE. Chitosan-based nanocomplexes loaded with doxorubicin and 5-FU (10:1 (Chitosan:5-FU) weight ratio) were prepared with ionic interaction. This study revealed 44% EE for doxorubicin and 55% for 5-FU (Di Martino et al., 2017). We obtained similar loading capacity values of 5-FU in nearly 40% in CD nanoplexes compared to those in the literature.

In a study with IL-2 loaded nanoparticles, thermosponge nanoparticles were prepared using poly (lactic-co-glycolic acid) polymer with a combined treatment approach with paclitaxel. EE of IL-2 in the nanoparticles have found to be 68% (Zhao et al., 2018). Using the polymer, nanoliposome containing IL-2 and TGF-β were prepared, and the EE of IL-2 was found to be 80% (Park et al., 2012). In another system prepared with a combined therapy approach, IL-2 and doxorubicin loaded polycarbonate based nanovesicles were studied and IL-2 EE was

Table 4

Stability of nanoplexes in water, different biological fluids, and cell culture medium (DMEM). The incubation time was 2 h for SGF and SIF, 8 h for SCoF and PBS, 24 h for DMEM and 1 week for water as storage media. All measurements were carried out on Malvern Zetasizer Nano ZS ($n = 3 \pm \text{SD}$) * $p < 0.05$ indicates a significant difference between initial and post-incubation stability profile.

Polymer Type	Medium	PS (nm)		PDI		ZP (mV)	
		Initial	After incubation	Initial	After incubation	Initial	After incubation
CD1	SGF	89.1 $\pm$ 3.5	49 $\pm$ 0.4*	0.46 $\pm$ 0.03	0.48 $\pm$ 0.04	27.7 $\pm$ 0.3	4.8 $\pm$ 0.2*
	SIF		89 $\pm$ 2.7		0.47 $\pm$ 0.006		9 $\pm$ 0.7*
	SCoF		90.1 $\pm$ 2.2		0.41 $\pm$ 0.07		8.7 $\pm$ 0.5*
	PBS		79.6 $\pm$ 0.9		0.41 $\pm$ 0.05		4.8 $\pm$ 0.6*
	DMEM		47.8 $\pm$ 2.9*		0.41 $\pm$ 0.02		29.1 $\pm$ 1.55
	Water		74.2 $\pm$ 8.5		0.49 $\pm$ 0.03		27.7 $\pm$ 0.5
CD2	SGF	38.6 $\pm$ 3.6	199.7 $\pm$ 18.5*	0.44 $\pm$ 0.14	0.26 $\pm$ 0.01	10.9 $\pm$ 2.4	2.2 $\pm$ 0.6*
	SIF		41.49 $\pm$ 6.6		0.65 $\pm$ 0.12		3 $\pm$ 2.1*
	SCoF		53.2 $\pm$ 7		0.78 $\pm$ 0.14*		-1.14 $\pm$ 0.05*
	PBS		34.06 $\pm$ 8		0.13 $\pm$ 0.02		-1.53 $\pm$ 0.01*
	DMEM		17.2 $\pm$ 3*		0.2 $\pm$ 0.09*		-18.4 $\pm$ 1.48*
	Water		50.05 $\pm$ 9.6		0.47 $\pm$ 0.2		19 $\pm$ 2.1*
CD3	SGF	85.2 $\pm$ 17.7	130.8 $\pm$ 41.8*	0.96 $\pm$ 0.03	0.35 $\pm$ 0.06*	25.7 $\pm$ 2.8	1.9 $\pm$ 0.4*
	SIF		41.5 $\pm$ 6.6		0.44 $\pm$ 0.07*		1.5 $\pm$ 0.6*
	SCoF		53.2 $\pm$ 7		0.63 $\pm$ 0.17*		1.02 $\pm$ 0.06*
	PBS		34.1 $\pm$ 8*		0.14 $\pm$ 0.02*		-1.39 $\pm$ 0.1*
	DMEM		36.9 $\pm$ 4*		0.46 $\pm$ 0.38*		-21 $\pm$ 0.5*
	Water		67.6 $\pm$ 6.6		0.89 $\pm$ 0.12		26.8 $\pm$ 1.2

Table 5

Stability of nanoplexes pre- and post-lyophilization process. Lyophilization was performed 48 h at -80°C 0.1 mbar conditions. Lyophilized nanoplexes was dispersed in water and all measurements were performed using Malvern Zetasizer Nano ZS ($n = 3 \pm \text{SD}$) * $p < 0.05$.

Polymer Type	Prior to lyophilization			After of lyophilization		
	PS (nm)	PDI	ZP (mV)	PS (nm)	PDI	ZP (mV)
CD1	68.4 $\pm$ 12.3	0.48 $\pm$ 0.02	25.7 $\pm$ 1.8	63.9 $\pm$ 9.7	0.52 $\pm$ 0.07	30.2 $\pm$ 1.7
	43.5 $\pm$ 15.4	0.58 $\pm$ 0.3	14.2 $\pm$ 1.8	133.1 $\pm$ 29.6*	0.73 $\pm$ 0.3*	18.3 $\pm$ 2.8
CD2	91.2 $\pm$ 14.7	0.73 $\pm$ 0.2	27 $\pm$ 2.3	129.8 $\pm$ 22.3	0.77 $\pm$ 0.1	22.03 $\pm$ 6

measured at 92.4% (Wu et al., 2019). Our findings revealed almost complete EE of IL-2 (over 99.8%) to the nanoplexes prepared in this study benefiting from both the charge interaction of the two

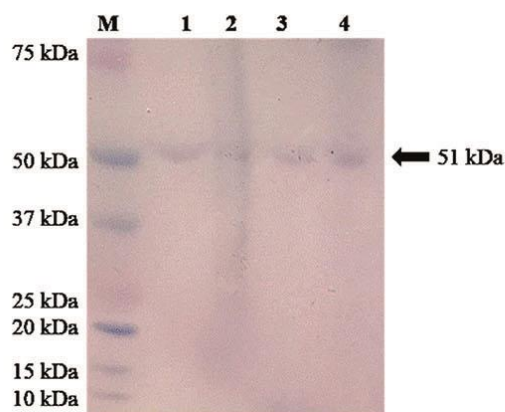


Fig. 5. Native PAGE analysis to identify IL-2 integrity of 5-FU/IL-2/CD nanoplexes. Four formula was loaded Lane M, Precision Plus Dual Color molecular weight marker (Biorad); Lane 1, IL-2 standard; Lane 2, CD1 nanoplexes; Lane 3, CD2 nanoplexes; Lane 4, CD3 nanoplexes.

macromolecules and from the CD polymer affinity to IL-2 chemical structure.

3.1.6. Integrity of nanoplexes

Physical stability analysis of the 5-FU/IL-2/CD nanoplex at $+4^\circ\text{C}$ for one week was evaluated in terms of particle size, PDI and zeta potential values ($n = 3 \pm \text{SD}$) as seen in Table 4. As a result of the statistical evaluation, it was observed that there was no difference between the initial and post-incubation mean particle size and PDI values of the CD1 and CD2 nanoplexes when incubated in PBS and water, and the nanoplexes remained stable ($p > 0.05$) during storage. In contrast, there was significant change observed for all CD nanoplexes incubated with SGF and DMEM.

The pH values of the prepared nanoplexes were measured as close to neutral, as shown in Table 2. In the literature, it is emphasized that to ensure that the particle size distribution and the surface charge values of nanoparticulate systems in different liquids are stable, the pH of the nanoparticulate system should be close to the pH of the liquid (Guncum et al., 2018). The pH values of water and PBS are close to neutral, and as a result CD1 and CD2 nanoplexes were found to be stable in these medias. On the other hand, like the literature about nanoparticles, zeta potential values which changed to the opposite charge in simulated liquids were observed in CD nanoplexes (Zhang et al., 2020).

The reconstitution of loaded nanoplexes in water after the lyophilization process is represented in Table 5. A statistical difference was determined only in the particle size and distribution values of 5-FU/IL-2/CD2 nanoplexes (t -test, $p < 0.05$). Nanoplexes prepared with CD1 and CD3 polymers did not reveal any significant difference after lyophilization ($p > 0.05$).

Stability is a basic parameter to describe the quality of pharmaceutical products. In nanoparticulate systems, stability involves aggregation, crystallinity, shape, size and surface properties (Phan, 2019). Moreover, the accumulation of sterically stabilized nanoparticles with a positive surface charge in the tumor increases and their excretion decreases by binding to ECM components in the cell (Moradi Kashkooli et al., 2020). The physical integrity of 5-FU/IL-2/CD nanoplexes in water has been demonstrated. The nanoplexes remained stable in their own medium (ultrapure water) for a week without any dilution. While hyaluronic acid (HA) and protamine loaded nanoplexes were stable for two weeks, the system was dynamic and re-organized in terms of structure during the next four weeks, according to the literature (Umerska et al., 2014). In another study, carrageenan and protamine-loaded nanoplexes were found to be stable in their medium for 24 h at

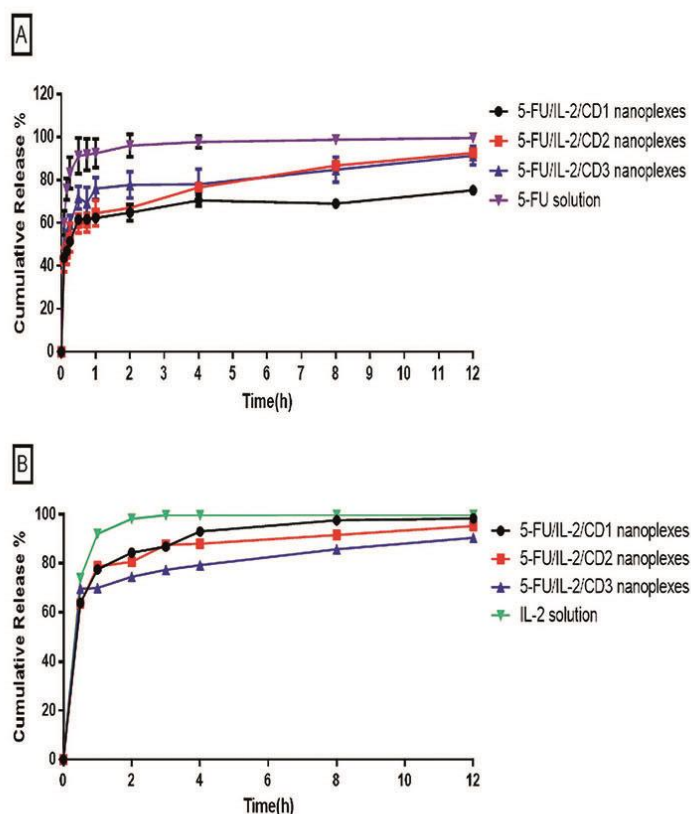


Fig. 6. Cumulative release profiles of 5-FU (a) and IL-2 (b) from 5-FU/IL-2/CD nanoplexes performed in PBS (pH = 7.4) with 0.2% Tween 80 at 24 h. The experiment conducted in sink conditions at 37 °C. Release amount of 5-FU was calculated with HPLC, as for IL-2 was detected with ELISA kit and results are graphed for all CD nanoplexes (n = 3, $\pm$ SD).

room temperature (Dul et al., 2015). Since color change and purple-black aggregate were noticed in the medium of nanoplexes, our experiments were completed after a week. The structural degradation of 5-FU is most likely to be responsible for this.

In another medium, PBS, CD1 and CD2 nanoplexes have more stable than CD3 nanoplexes. However, all nanoplexes are labile in SGF as the ionic medium affected nanoplexes structural uniformity by protonation of the CD polymer cationic groups leading to the disrupting of the nanoplex. In a study conducted by Dul et al., nanoplexes were unstable because of aggregation in PBS and 0.01 M HCl medium (Dul et al., 2015). Similar aggregations were detected for CD2 and CD3 nanoplexes in our study. As in water, all 5-FU/IL-2/CD nanoplexes have shown good stability in SIF and SCoF. Based on different enzymes and electrostatic molecules in DMEM, the particle sizes of nanoplexes were measured as smaller than the beginning values. Considering the particle size, PDI and zeta potential values for all nanoplexes, the most stable storage medium was water. The results are predictable as it targets the disintegration of nanoplexes and releasing the drugs into the medium.

3.1.7. Assessment of IL-2 integrity

PAGE analysis was performed with the released IL-2 from 5-FU and IL-2 loaded nanoplexes (Lane 2–4) and IL-2 standard (Lane 1) to evaluate whether IL-2 maintains its structure in nanoplex form. As indicated

in Fig. 5, the process of nanoplex formation did not affect the structural integrity of recombinant IL-2, revealing identical bands with equal densities.

The integrity of IL-2 structure in the nanoplexes was investigated using PAGE analysis. Following studies conducted under native conditions, distinguishable and identical bands of IL-2 were detected for IL-2 loaded nanoplexes and recombinant IL-2 samples (Lane 1–4) (Fig. 5). The bands are visualized as heterotrimers of IL-2, at equal densities, suggesting that the integrity of IL-2 was not affected by different nanoplex preparation processes (Devrim et al., 2011).

3.1.8. In vitro drug release from CD nanoplexes

As a result of the release studies in PBS (pH 7.4), it was determined that in the first hour, 60% of 5-FU was released from CD1 and CD2 nanoplexes, and 80% of the drug from CD3 (Fig. 6a). It was observed that nanoplexes exhibited a very rapid release profile in PBS. It was determined that CD1 and CD3 nanoplexes completed the release, especially in the first 4 h, and there was no significant change in the release profile in the following time periods. It was observed that 80% of the loaded 5-FU in the CD2 nanoplex formulation was released in 8 h. At the end of the 12th hour, the release profile reached a plateau.

When the release of IL-2 from nanoplexes in PBS was examined, it was observed that CD1 and CD2 nanoplexes exhibited a similar profile,

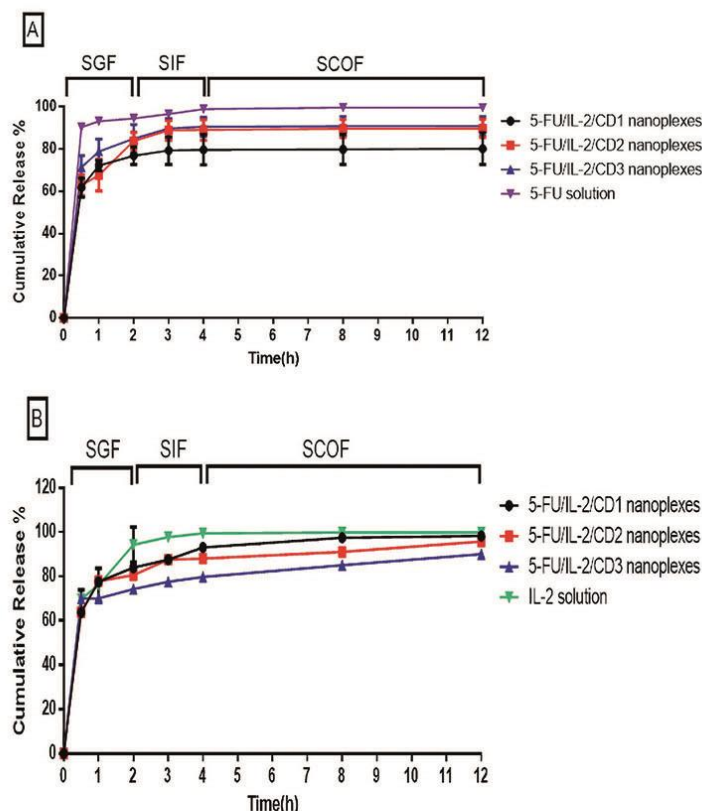


Fig. 7. Cumulative release profiles of 5-FU (A) and IL-2 (B) from CD nanoplexes performed in stimulated fluids that SGF (pH 4.5) at 2 h, SIF (pH 6.8) at 2 h and SCOF (pH 6) at 20 h, respectively. The experiment conducted in sink conditions at 37 °C. Release of 5-FU was calculated with HPLC, as for IL-2 was detected with ELISA kit and results are graphed for all CD nanoplexes ($n = 3$, $\pm$ SD).

and more than 80% of them were released at the end of 4 h. More than 63% of IL-2 in the nanoplex systems were released within the first hour. The release of IL-2 from CD3 nanoplexes is slower than the other two derivatives, and the amount of released IL-2 at the end of 4 h was calculated to be around 70%. At the end of 12 h, IL-2 release was completed 90% from all nanoplexes systems, as seen in Fig. 6b.

On release studies with simulated fluids, release of 5-FU was completed above 80% at the end of 12 h and approximately 50% of IL-2 was released from 5-FU/IL-2/CD nanoplexes, as seen in Fig. 7. CD2 and CD3 nanoplexes showed similar release of 5-FU and IL-2 in PBS and stimulated fluids. However, for 5-FU, the release from CD1 nanoplexes was less than from CD2 and CD3 nanoplexes. At release of IL-2 from CD1 nanoplexes was like in other CD nanoplexes.

In vitro release profiles designed using mathematical models can offer important outputs for the prediction of *in vivo* release kinetics of nanoparticles. Although there are no regulatory standards, three methods, namely continuous flow, dialysis membrane, and sample and separate methods are used forming a nanoparticulate release profile (Weng et al., 2020). In this study, the dialysis membrane method was selected, similar to other 5-FU nanoparticulate release studies. In the literature, there are studies of different nanocomplexes and nanoparticles prepared based on charge interaction with 5-FU. For instance, chitosan nanoparticles loaded with 5-FU were prepared by Sun et al. Release studies were

carried out in PBS (pH 7.4), and 76% of the release occurred within 42 min, while this rate remained at 80% at the end of 8 h. Furthermore, chitosan- polylactic acid based nanocomplexes loaded with doxorubicin and 5-FU were prepared as a combined chemotherapy approach. In PBS, the release is at 40% in 24 h and reaches 80% in 72 h. In our study, 5-FU release from 5-FU/IL-2/CD nanoplexes was completed at 80% in stimulated fluids and PBS (pH 7.4) at 8 h.

As for IL-2, *in vitro* release studies are few, and centrifuge tubes are preferred in these studies. Dialysis membrane is not appropriate as it has smaller molecular weight cut-off than molecular weight of IL-2. To give an example to the studies done with this process in the literature, thermosponge nanoparticles loaded with paclitaxel and IL-2, 60% of IL-2 have released at 4 days in PBS (pH 7.4) (Zhao et al., 2018). Moreover, doxorubicin and IL-2 loaded nanovesicles were prepared, and as a result of release studies in PBS (pH 7.4), 50% of IL-2 was released at the end of 24 h (Wu et al., 2019). In our studies, IL-2 release from 5-FU/IL-2/CD nanoplexes was completed 90% in stimulated fluids and PBS (pH 7.4).

We believe that almost complete and controlled release of 5-FU and IL-2 in 12 h is a result of the nanoplex electrostatic interactions controlling the liberation of the active molecules from the CD polymers. SGF, SIF, SCOF and PBS were used as release media with strong ionic presence and high possibility of protonation of the CD polymers facilitating the liberation of the active molecules from the CD polymers.

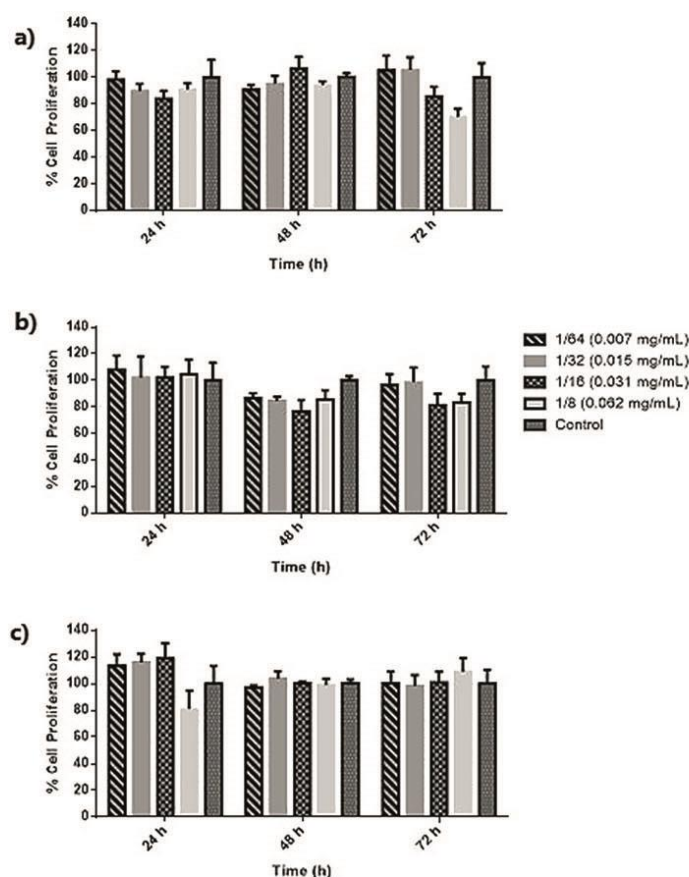


Fig. 8. Cell proliferation of healthy L929 fibroblast cells. Effect of four different concentrations of CD1 (a), CD2 (b) and CD3(c) polymer was evaluated by WST-1 colorimetric assay for 24, 48 and 72 h. Control group was treated with the DMEM was considered as 100% ($n = 3$, $\pm$ SD).

3.2. Cell culture studies

3.2.1. Safety of CD polymers

The results of cell culture studies performed to determine the safety of blank CD polymers that do not contain any drug or immunotherapeutic molecules are presented in Figs. 8 and 9. Cell proliferation profiles indicate that all three CD polymers have no toxic effect on L929 healthy mouse fibroblast cell line. It was determined that even at the highest doses (1/8 v/v), cell viability was around 80%. According to ISO 10993-5 (2009), the minimum acceptable cell viability limit in the *in vitro* cytotoxic test is 70%.

Determination of the stable cytoplasmic lactate dehydrogenase (LDH) enzyme is a frequently preferred method in the evaluation of cell cytoplasmic membrane damage. It is particularly suitable for evaluating the toxicities of molecules such as CD, which are known to interact with cell membrane components. In the case of damage to the cell membrane, LDH is released from the cytoplasm into the cell culture medium. In this study, the amount of LDH released from L929 cells as a result of incubation of three different blank CD polymers with four different concentrations was determined with a commercial kit. In the light of the

findings, it can be said that the amount of LDH released from cells treated with blank CD polymers was like that released from cells treated with DMEM alone (Fig. 9). Triton-X 100 was used as a positive control and increased the amount of LDH released from the cells 3 times compared to the control group.

The WST-1 and LDH assays based on different cellular mechanism, respectively, measure mitochondrial activity and release of LDH as a result of damage cellular membrane (Shah et al., 2017). The studies showed those four dilutions of CD polymers exerted no cytotoxicity through the WST-1 and LDH results. In evaluation, according to ISO 10993-5 (2009), cell viability over 70% is considered safe in toxicity tests on L929 cells, suggesting preliminarily the CD polymers and resulting nanoplexes to be safe nanocarriers for human therapeutic use.

3.2.2. Cytotoxicity of CD nanoplexes on 2D CT26 cell culture

The anticancer activity of CD nanoplexes was determined by WST-1 studies against CT26 human colon cancer cell line. First, IC_{50} values of 5-FU solution were calculated with different concentrations. According to WST-1 studies, IC_{50} values of 5-FU were determined as 91.6 μ M and 0.27 μ M in 24 and 48 h, respectively (Graphpad Prism 6).

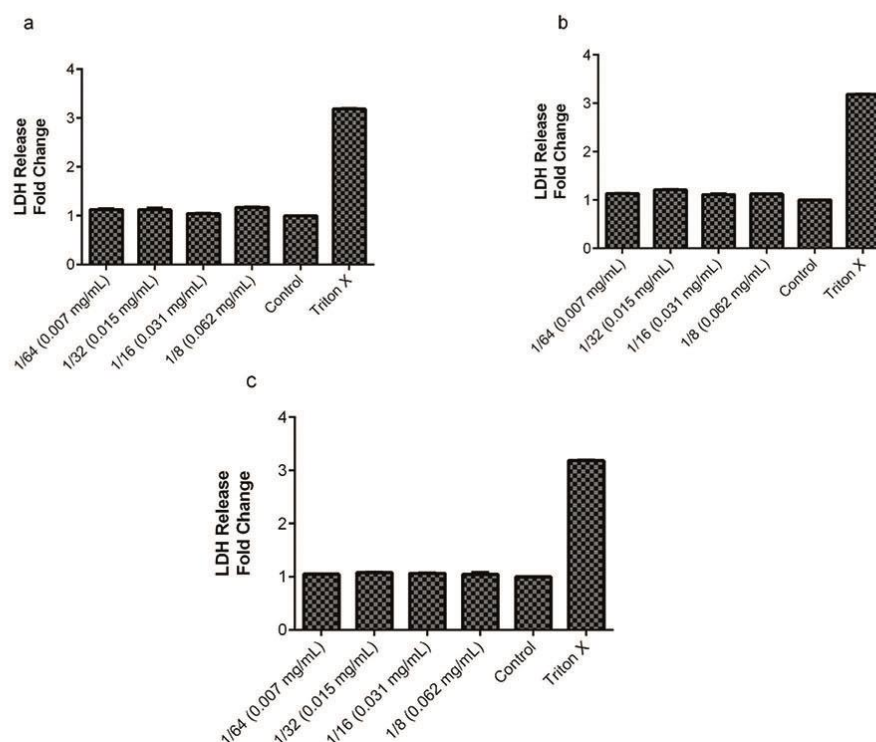


Fig. 9. Lactate dehydrogenase (LDH) activity of different concentrations of CD1 (a), CD2 (b) and CD3(c) polymer by quantifying the amount of LDH protein in cell culture supernatants. Cells incubated with the complete DMEM were considered as control. Cells were treated with 1.0% (v/v) Triton X-100, for positive control of LDH. Values were expressed as a fold change compared to the wells incubated with DMEM at 48 h ($n = 3$, $\pm$ SD).

As seen in Fig. 10, CD2 and CD3 solutions showed a similar effect of above 80% viable to CT26 cells in 24 h. The CD1 solution has an anticancer effect on CT26. CD1 nanoplexes caused statistically higher cell death according to 5-FU solution or 5-FU and IL-2 solution in 24 and 48 h.

CD2 nanoplexes exhibited lower cell viability comparing to these solutions in 48 h; however, the differences are not statistically significant. CD3 nanoplexes did not have higher anticancer effect than 5-FU solution in 48 h.

The half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values of 5-FU solution were determined for 24 and 48 h on CT26 cells. Polymer solutions and CD nanoplexes were diluted using the same concentration of the IC_{50} value. Fig. 10 indicates 5-FU/IL-2/CD1 nanoplexes has the highest cytotoxic effect compared with 5-FU + IL-2 solution at 24 h and 48 h ($p < 0.05$). Moreover, 5-FU and IL-2 loaded CD1 nanoplexes have a higher cytotoxic effect than 5-FU solution at 48 h ($p < 0.05$). The drug-loaded nanoparticles may have higher cytotoxicity based on higher drug uptake and intercellular delivery compared to drug solutions (Handali et al., 2020). On the other hand, CD1 polymer solution also showed a cytotoxic effect on CT26 cells alone. Although CD derivatives are generally classified as GRAS and are known to be safe vehicles in terms of cytotoxicity, some CD derivatives have been reported to extract cholesterol from cell membranes, disrupting cell membrane integrity and leading the cell to apoptosis. This effect is used to overcome drug resistance in chemotherapeutics (Varan et al., 2021; Varan et al., 2016). It is known that cancer cells have different cell membranes than healthy cells. One of these differences is membrane lipid composition.

Cholesterol is responsible for cell membrane rigidity, and the cholesterol domain level changes from cell to cell. The number of cholesterol domains is very high in drug-resistant cancer cells. In clinics, methyl- β CD is used to induce cell death and reduce migration by regulating cell membrane cholesterol. Drug resistance in cancer is responsible for non-effective therapy, and many different therapeutic approaches have been studied to overcome resistance. One of these approaches is the reduced level of cholesterol because of higher membrane cholesterol in resistant cancer cells. For this purpose, metformin or methyl- β CD are applied to reduce resistance by depleting cholesterol. This may be a basis for the observed cytotoxic effect of CD1 polymer possibly originating from a similar cholesterol depletion mechanism. Nevertheless, the structure of CD polymers and C1 polymer is very different than the small molecule Methyl- β CD. Among the three CD polymers used in this study, CD1 is the only one that permanently charged groups not affected by pH changes. CD2 is the most sensitive to pH changes as it contains primary amines. At a pH around 8, they are partially deprotonated and undergo oxidation or carbonation very quickly, acting like scavengers. CD3 is practically a permanently charged polymer as well, similar to CD1. The fact that the same CD polymers were found to be non-toxic to L929 cells but showed cytotoxicity to colon cancer cells is similar to our previous findings regarding non-ionic and polycationic amphiphilic CD nanoparticles (Varan et al., 2017). We believe that the toxicity observed with CD1 is mainly because a very high concentration of the polymer was required to obtain loaded nanoplexes at the IC_{50} level for 5-FU. However, further studies at the molecular level should be conducted to differentiate and elucidate the cellular responses to blank CD polymers at the protein and

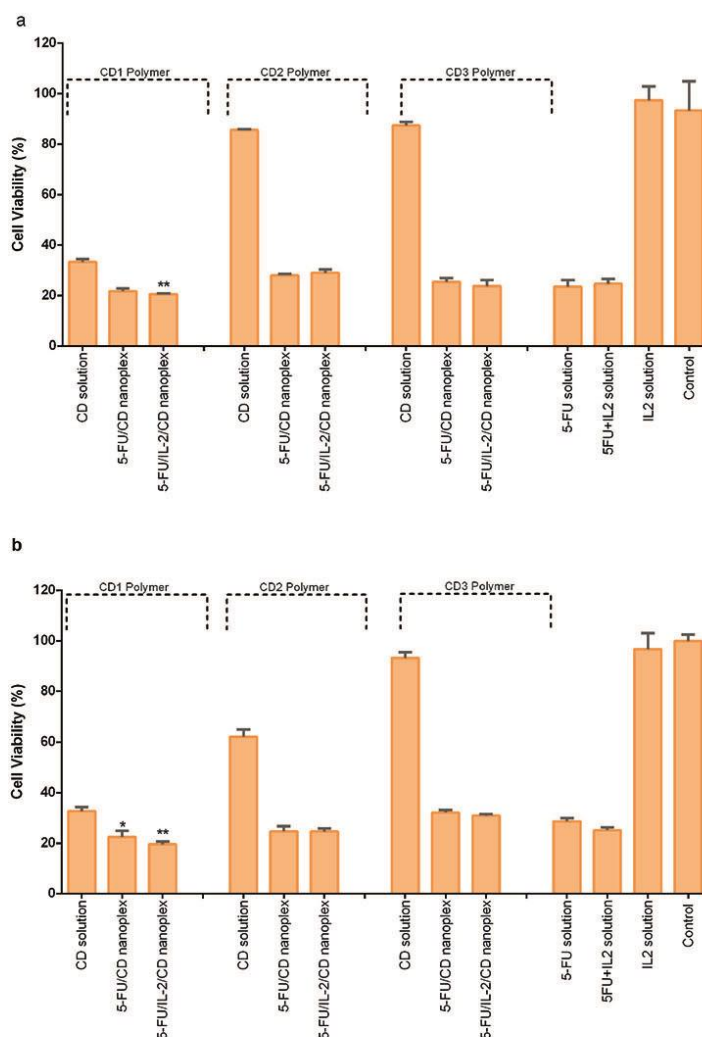


Fig. 10. Cytotoxicity of 5-FU solution, 5-FU + IL-2 solution, CD polymer, 5-FU/CD nanoplexes and 5-FU/IL-2/CD nanoplexes against CT26 cells for 24 h (a) and 48 h (b). Cells were treated with DMEM were determined as control and 100% viable. The assays were performed with WST-1 ($n = 3$, $\pm$ SD). * $p < 0.05$ compared with 5-FU solution and ** $p < 0.05$ compared with 5-FU + IL-2 solution.

Table 6

Apparent permeability coefficient values of 5-FU solution, 5-FU and IL-2 loaded CD nanoplexes ($n = 3 \pm$ SD).

Formulation	Papp ($\times 10^{-6}$ cm/s) $\pm$ SD (apparent permeability constant)	Fold increase in apparent permeability coefficient
5-FU	2.11 $\pm$ 0.05	1
CD1 nanoplex	1.62 $\pm$ 0.08	0.5
CD2 nanoplex	3.09 $\pm$ 0.04	1.5
CD3 nanoplex	1.87 $\pm$ 0.19	0.8

metabolite levels as was previously performed for the amphiphilic CD nanoparticles (Ercan et al., 2021; Ercan et al., 2018).

Our findings indicate that CD nanoplexes carrying 5-FU or 5-FU-IL-2 combination were as cytotoxic as these molecules in solution form. This could be beneficial in administering lower and targeted doses of IL-2 to avoid the systemic dose-dependent toxicity of this immunotherapeutic molecule.

3.2.3. Permeation of CD nanoplexes into Caco-2 cells

It was observed that the permeability of 5-FU and IL-2 loaded CD2 nanoplex from Caco-2 cells was about 1.5 times higher than the 5-FU solution. Other CD nanoplexes exhibited lower permeability than the 5-FU in solution form as seen in Table 6.

To explore the intestinal absorption through an eventual oral administration, permeability of 5-FU + IL-2 loaded CD nanoplexes was analyzed in Caco-2 cells. After the cell planting, to verify formation of the cell mono layers a transepithelial electrical resistance (TEER) was measured and found to be 800–900 $\Omega\text{-cm}^2$ on the 21st day. Before and after the experiment, at values for control and treated groups, the Caco-2 cell monolayer showed no difference statistically. In the analysis, the monolayer integrity was affected by the treatments. The highest apparent permeability coefficient (P_{app}) was found for CD2 nanoplexes, suggesting nanoplexes prepared with CD2 are optimal candidates for oral or mucosal administration of macromolecules. Considering these findings, oral administration of 5-FU + IL-2 loaded CD2 nanoplexes can be possible, provided the stability of IL-2 is maintained through GI conditions. This could also be a good platform for the oral delivery of peptides, proteins and molecules with a negative charge. In fact, the effect of pH on the different CD polymers can prove to be advantageous in oral delivery.

4. Conclusion

5-FU is one of the major chemotherapeutics in colon cancer treatment; however, its application is limited because of the low amount of drug accumulating at the tumor area and existing systemic toxicity (Al Sabbagh et al., 2020; Handali et al., 2020). Studies in the literature have shown that the delivery of 5-FU via nanoparticle systems reduces toxicity and increases its effectiveness (Ghasemi Toudeshkhoei et al., 2020; Handali et al., 2020; Mansoori et al., 2020; Mattos et al., 2016).

In colon cancer, cancer cells and stromal fibroblasts infiltrate into submucosal tissue through a mechanism called “stromal reaction” which is responsible for most malignancies. Based on histological classification of cancer immunity, “excluded-type” colon cancers are investigated and found that T-cell activation and penetration to cancer cells can be inhibited by many factors such as lack of chemokine or IL-10 and complex cancer vascularization (Yorita et al., 2020). In these cases, IL-2 is an important factor to promote T-cell activation.

Studies on treatment with standard IL-2 revealed that the intraleisional route increases efficacy in melanoma. In the adoptive transfer of ex-vivo expanded autologous T cells, like tumor infiltrating lymphocytes and chimeric antigen receptor therapies, it was shown that usage of high-dose IL-2 is necessary in lymphoma and leukemia. Clinical studies on usage of high and low doses are in progress in different cancers to increase efficacy and minimize side effects (Mizui, 2019; Pol et al., 2020).

Cancer immunotherapy and the use of immunotherapy in combined therapy are approaches that have attracted attention in recent years. More than 70 immunotherapy-based clinical trials in colon cancer are listed, most of which prefer combination therapy. IL-2, which is known to be effective in immunotherapy, was preferred in approximately one-tenth of these clinical studies. However, limitations such as the short half-life of IL-2 hinder its success in treatment. Nano-sized drug delivery systems, on the other hand, are preferred to overcome the obstacles to clinical success in cancer treatment and to increase the effectiveness of the treatment. In this paper, 5-FU and IL-2 loaded CD nanoplexes were prepared successfully without any structural degradation of IL-2. These CD nanoplexes were prepared based on charge interaction only, without the addition of surfactants, etc. In the light of the *in vitro* findings, it can be said that 5-FU/IL-2/CD nanoplexes are safety and suitable nano-sized delivery systems for IL-2 transport. Nanoplex formulations prepared using three different CD polymers were evaluated for both anticancer drug and immunotherapeutic molecules as a result of detailed *in vitro* characterization studies. *In vitro* data obtained in this study showed that CD nanoplexes are suitable for combined drug delivery and show promise for colon cancer treatment through either parenteral or oral/mucosal routes. In this context, it is thought that the efficacy of dual active molecule-loaded CD nanoplexes in chemimmunotherapy is worth examining with advanced cell culture and *in vivo* studies.

CRediT authorship contribution statement

Safiye Akkin: Methodology, Data curation, Writing – original draft. **Ganize Varan:** Methodology, Data curation. **Davut Aksit:** Data curation. **Milo Malanga:** Methodology, Data curation. **Ayşe Ercan:** Methodology, Writing – review & editing. **Murat Şen:** Conceptualization, Writing – review & editing. **Erem Bilensoy:** Conceptualization, Funding acquisition, Methodology, Supervision, Writing – review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper: [Erem Bilensoy reports financial support was provided by Scientific and Technological Research Council of Turkey].

Acknowledgement

Authors would like to thank The Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Scientific Research Project 217S610 for financial support of this study. Safiye Akkin is a recipient of grant from TUBITAK BİDEB National Scholarship Programme for PhD Students (2211-C).

References

- Aji Alex, M.R., Nehate, C., Veerananarayan, S., Kumar, D.S., Kulshreshtha, R., Koul, V., 2017. Self assembled dual responsive micelles stabilized with protein for co-delivery of drug and siRNA in cancer therapy. *Biomaterials* 133, 94–106.
- Al Sabbagh, C., Seguin, J., Agapova, E., Kramerich, D., Boudy, V., Mignet, N., 2020. Thermosensitive hydrogels for local delivery of 5-fluorouracil as neoadjuvant or adjuvant therapy in colorectal cancer. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 157, 154–164.
- Anitha, A., Deepa, N., Chennazhi, K.P., Lakshmanan, V.-K., Jayakumar, R., 2014. Combinatorial anticancer effects of curcumin and 5-fluorouracil loaded thiolated chitosan nanoparticles towards colon cancer treatment. *Biochim Biophys. Acta* 1840 (9), 2730–2743.
- Badran, M.M., Mady, M.M., Ghannam, M.M., Shakeel, F., 2017. Preparation and characterization of polymeric nanoparticles surface modified with chitosan for target treatment of colorectal cancer. *Int. J. Biol. Macromol.* 95, 643–649.
- Bang, Y.H., Hong, Y.S., Lee, J.S., Lee, K.-W., Han, H.S., Kim, S.Y., Kim, J.-W., Kim, H.K., Kim, J.W., Eun, C.K., Kim, T.W., Kim, J.E., 2020. Effectiveness of combining bevacizumab with first-line chemotherapy regimens for metastatic colorectal cancer in real-world practice. *Clin. Colorectal Cancer* 20 (2), 101–112.e6.
- Binello, A., Robaldo, B., Barge, A., Cavalli, R., Cravotto, G., 2008. Synthesis of cyclodextrin-based polymers and their use as debittering agents. *J. Appl. Polym. Sci.* 107 (4), 2549–2557.
- Brukhovetska, D., Dörr, J., Endres, S., Libby, P., Dinarello, C.A., Kobold, S., 2021. Interleukins in cancer: from biology to therapy. *Nat. Rev. Cancer* 21 (8), 481–499.
- Caputo, F., Clogston, J., Calzolari, L., Rosslein, M., Prina Mello, A., 2019. Measuring particle size distribution of nanoparticle enabled medicinal products, the joint view of EUNCL and NCI-NCL. A step by step approach combining orthogonal measurements with increasing complexity. *J. Control. Release* 299, 31–43.
- Chen, J., Qin, X., Zhong, S., Chen, S., Su, W., Liu, Y., 2018. Characterization of curcumin/cyclodextrin polymer inclusion complex and investigation on its antioxidant and antiproliferative activities. *Molecules* 23 (5), 1179.
- clinicaltrials.gov.tr, 2021. clinicaltrials.gov.tr.
- Devrim, B., Bozkır, A., Canefe, K., 2011. Preparation and evaluation of PLGA microparticles as carrier for the pulmonary delivery of rhIL-2. I. Effects of some formulation parameters on microparticle characteristics. *J. Microencapsul.* 28, 582–594.
- Di Donato, C., Lavorgna, M., Fattorusso, R., Isernia, C., Isidori, M., Malgieri, G., Piscitelli, C., Russo, C., Russo, L., Iacovino, R., 2016. Alpha- and beta-cyclodextrin inclusion complexes with 5-fluorouracil: characterization and cytotoxic activity evaluation. *Molecules* 21 (12), 1644.
- Di Martino, A., Kucharczyk, P., Capakova, Z., Humpolicek, P., Sedlářik, V., 2017. Chitosan-based nanocomplexes for simultaneous loading, burst reduction and controlled release of doxorubicin and 5-fluorouracil. *Int. J. Biol. Macromol.* 102, 613–624.
- Dong, B., Lim, L.M., Hadinoto, K., 2019. Enhancing the physical stability and supersaturation generation of amorphous drug polyelectrolyte nanoparticle complex via incorporation of crystallization inhibitor at the nanoparticle formation step: a case of HPMC versus PVP. *Eur. J. Pharm. Sci.* 138.
- Donohue, J.H., Rosenberg, S.A., 1983. The fate of interleukin-2 after *in vivo* administration. *J. Immunol.* 130, 2203–2208.
- Dul, M., Paluch, K.J., Kelly, H., Healy, A.M., Sasse, A., Tajber, L., 2015. Self-assembled carrageenan/protamine polyelectrolyte nanoplexes Investigation of critical

- parameters governing their formation and characteristics. *Carbohydr. Polym.* 123, 339–349.
- Ercan, A., Celebier, M., Oncul, S., Varan, G., Kocak, E., Benito, J.M., Bilensoy, E., 2021. Polycationic cyclodextrin nanoparticles induce apoptosis and affect antitumoral activity in HepG2 cell line: an evaluation at the molecular level. *Int. J. Pharm.* 598.
- Ercan, A., Celebier, M., Varan, G., Oncul, S., Nenni, M., Kaplan, O., Bilensoy, E., 2018. Global omics strategies to investigate the effect of cyclodextrin nanoparticles on MCF-7 breast cancer cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* 123, 377–386.
- Folch Cano, C., Yazdani-Pedram, M., Olea-Azar, C., 2014. Inclusion and functionalization of polymers with cyclodextrins: current applications and future prospects. *Molecules* 19, 14066–14079.
- Frick, S.U., Domogalla, M.P., Baier, G., Wurm, F.R., Mäiländer, V., Landfester, K., Steinbrink, K., 2016. Interleukin-2 functionalized nanocapsules for T cell-based immunotherapy. *ACS Nano* 10 (10), 9216–9226.
- Gary, D.J., Min, J., Kim, Y., Park, K., Won, Y.-Y., 2013. The effect of N/P ratio on the in vitro and in vivo interaction properties of PEGylated poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate)-based siRNA complexes. *Macromol. Biosci.* 13 (8), 1059–1071.
- Ghasemi Toudeshkhoei, M., Zahedi, P., Shavandi, A., 2020. Microfluidic-assisted preparation of 5-fluorouracil loaded PLGA nanoparticles as a potential system for colorectal cancer therapy. *Materials (Basel)* 13.
- Gidwani, B., Vyas, A., 2014. Synthesis, characterization and application of epichlorohydrin-beta-cyclodextrin polymer. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 114, 130–137.
- Goindi, S., Arora, P., Kumar, N., Puri, A., 2014. Development of novel ionic liquid based microemulsion formulation for dermal delivery of 5-Fluorouracil. *AAPS PharmSciTech* 15 (4), 810–821.
- Güncü, E., Işık, N., Anlas, C., Ünal, N., Bulut, E., Bakirel, T., 2018. Development and characterization of polymeric-based nanoparticles for sustained release of amoxicillin – an antimicrobial drug. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 46 (sup2), 964–973.
- Handali, S., Moghimipour, E., Rezaki, M., Ramezani, Z., Dorkoosh, F.A., 2020. PHBV/PLGA nanoparticles for enhanced delivery of 5-fluorouracil as promising treatment of colon cancer. *Pharm. Dev. Technol.* 25 (2), 206–218.
- Hassan, D., Omolo, C.A., Gannimani, R., Waddad, A.Y., Mocktar, C., Rambharose, S., Agrawal, N., Govender, T., 2019. Delivery of novel vancomycin nanoplexes for combating methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections. *Int. J. Pharm.* 558, 143–156.
- Horvitz, D.A., Bickerton, S., Koss, M., Fahmy, T.M., La Cava, A., 2019. Suppression of murine lupus by CD4+ and CD8+ Treg cells induced by T cell-targeted nanoparticles loaded with interleukin 2 and transforming growth factor beta. *Arthritis Rheumatol.* 71, 632–640.
- Imoto, M., Azuma, H., Yamamoto, I., Otagiri, M., Imai, T., 2009. Permeability of 5-fluorouracil and its prodrugs in Caco 2 cell monolayers: evidence for shift from paracellular to transcellular transport by prodrug formation. *J. Drug Delivery Sci. Technol.* 19 (1), 37–41.
- Kaban, K., Salva, E., Akbuga, J., 2019. Modulation of the dual-faced effects of miR-141 with chitosan/miR-141 nanoplexes in breast cancer cells. *J. Gene Med.* 21.
- Kalantarian, P., Najafabadi, A.R., Haririan, I., Vatanara, A., Yamini, Y., Darabi, M., Gilani, K., 2010. Preparation of 5-fluorouracil nanoparticles by supercritical antisolvents for pulmonary delivery. *Int. J. Nanomed.* 5, 763–770.
- Karpkird, T., Manaprasertsak, A., Penkitti, A., Sinthuvani, C., Singhuwong, T., Leepasert, T., 2020. A novel chitosan-citric acid crosslinked beta-cyclodextrin nanocarriers for insoluble drug delivery. *Carbohydr. Res.* 498.
- Kiew, T.Y., Cheow, W.S., Hadinoto, K., 2015. Preserving the supersaturation generation capability of amorphous drug-polysaccharide nanoparticle complex after freeze drying. *Int. J. Pharm.* 484 (1–2), 115–123.
- Lakkakula, J.R., Matshaya, T., Krause, R.W., 2017. Cationic cyclodextrin/alginate chitosan nanoflowers as 5-fluorouracil drug delivery system. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 70, 169–177.
- Longley, D.B., Harkin, D.P., Johnston, P.G., 2003. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat. Rev. Cancer* 3 (5), 330–338.
- Mansoori, B., Mohammadi, A., Abedi-Gaballu, F., Abbaspour, S., Ghasabi, M., Yekta, R., Shirjang, S., Dehghan, G., Hamblin, M.R., Baradaran, B., 2020. Hyaluronic acid-decorated liposomal nanoparticles for targeted delivery of 5-fluorouracil into HT-29 colorectal cancer cells. *J. Cell. Physiol.* 235 (10), 6817–6830.
- Marin-Menendez, A., Montis, C., Diaz-Calvo, T., Carta, D., Hatzixanthos, K., Morris, C.J., McArthur, M., Berti, D., 2017. Antimicrobial Nanoplexes meet Model Bacterial Membranes: the key role of Cardiolipin. *Sci. Rep.* 7, 41242.
- Marques, M.R.C., Loebenberg, R., Almukainzi, M., 2011. Simulated biological fluids with possible application in dissolution testing. *Dissolution Technol.* 18 (3), 15–28.
- Mattos, A.C., Altmeyer, C., Tominga, T.T., Khalil, N.M., Mainardes, R.M., 2016. Polymeric nanoparticles for oral delivery of 5-fluorouracil: Formulation optimization, cytotoxicity assay and pre-clinical pharmacokinetics study. *Eur. J. Pharm. Sci.* 84, 83–91.
- McHugh, M.D., Park, J., Ulrich, R., Gao, W., Horvitz, D.A., Fahmy, T.M., 2015. Paracrine co-delivery of TGF-beta and IL-2 using CD4-targeted nanoparticles for induction and maintenance of regulatory T cells. *Biomaterials* 59, 172–181.
- Mitha, A.T., Rekha, M.R., 2014. Multifunctional polymeric nanoplexes for anticancer co-delivery of p53 and mitoxantrone. *J. Mater. Chem. B* 2 (45), 8005–8016.
- Mizui, M., 2019. Natural and modified IL-2 for the treatment of cancer and autoimmune diseases. *Clin. Immunol.* 206, 63–70.
- Moradi Kashkooli, F., Soltani, M., Souri, M., 2020. Controlled anti-cancer drug release through advanced nano drug delivery systems: Static and dynamic targeting strategies. *J. Control. Release* 327, 316–349.
- Mortara, L., Balza, E., Bruno, A., Poggi, A., Orecchia, P., Carnemolla, B., 2018. Anti-cancer therapies employing IL-2 cytokine tumor targeting: contribution of innate, adaptive and immunosuppressive cells in the anti-tumor efficacy. *Front. Immunol.* 9, 2905.
- Neva, T., Carbajo Gordillo, A.I., Benito, J.M., Lana, H., Marcelo, G., Ortiz Mellet, C., Tros de Ilarduya, C., Mendicuti, F., García Fernández, J.M., 2020. Tuning the topological landscape of DNA-Cyclodextrin nanocomplexes by molecular design. *Chemistry* 26 (66), 15259–15269.
- Nguyen, M.H., Tran, T.T., Hadinoto, K., 2016. Controlling the burst release of amorphous drug-polysaccharide nanoparticle complex via crosslinking of the polysaccharide chains. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 104, 156–163.
- Oldham, R.K., 2017. Cancer biotherapy: more than immunotherapy. *Cancer Biother. Radiopharm.* 32 (4), 111–114.
- Park, J., Wrzesinski, S.H., Stern, E., Look, M., Criscione, J., Ragheb, R., Jay, S.M., Demento, S.L., Agawu, A., Licona Limon, P., Ferrandino, A.F., Gonzalez, D., Habermann, A., Flavell, R.A., Fahmy, T.M., 2012. Combination delivery of TGF-beta inhibitor and IL-2 by nanoscale liposomal polymeric gels enhances tumour immunotherapy. *Nat. Mater.* 11, 895–905.
- Phan, H.T., Haes, A.J., 2019. What Does Nanoparticle Stability Mean? *J. Phys. Chem. C. Nanomater. Interfaces* 123 (27), 16495–16507.
- Pol, J.G., Caudana, P., Paillet, J., Piaggio, E., Kroemer, G., 2020. Effects of interleukin-2 in immunostimulation and immunosuppression. *J. Exp. Med.* 217.
- Qiu, F., Becker, K.W., Knight, F.C., Baljon, J.J., Sevimli, S., Shae, D., Gilchuk, P., Joyce, S., Wilson, J.T., 2018. Poly(propylacrylic acid) peptide nanoplexes as a platform for enhancing the immunogenicity of neoantigen cancer vaccines. *Biomaterials* 182, 82–91.
- Rawla, P., Sunkara, T., Barsouk, A., 2019. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Prz. Gastroenterol.* 14 (2), 89–103.
- Rivero-Barbaroja, G., Benito, J.M., Ortiz Mellet, C., García Fernández, J.M., 2020. Cyclodextrin-Based Functional Glyconanomaterials. *Nanomaterials (Basel)* 10.
- Sanchez-Vazquez, B., Lee, J.B., Strimatte, M., Buanz, A., Bailey, R., Gershkovich, P., Pasparkis, G., Williams, G.R., 2019. Solid lipid nanoparticles self-assembled from spray dried microparticles. *Int. J. Pharm.* 572.
- Shah, M., Bournier, L., Ali, S., Al-Enazy, S., Rytting, E., 2017. Cytotoxicity of endocytosis and efflux inhibitors in the BeWo cell line. *J. Pharm. Res. Int.* 17 (5), 1–7.
- Shakeran, Z., Keyhanfar, M., Varshosaz, J., Sutherland, D.S., 2021. Biodegradable nanocarriers based on chitosan-modified mesoporous silica nanoparticles for delivery of methotrexate for application in breast cancer treatment. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 118.
- Shendge, R.S., Pande, V.V., Kadnor, N.A., Jamdhade, A.A., Kadam, R.N., 2014. A facile approach to enhance solubility and dissolution rate of norfloxacin by nanoplex. *Pharmaceutics* 5, 406–416.
- Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A., 2020. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J. Clin.* 70 (1), 7–30.
- Sikwal, D.R., Kalhapure, R.S., Rambharose, S., Vepuri, S., Soliman, M., Mocktar, C., Govender, T., 2016. Polyelectrolyte complex of vancomycin as a nanoantibiotic preparation, in vitro and in silico studies. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 63, 489–498.
- Sohrabi, M.J., Delipour, A.R., Attar, F., Hasan, A., Mohammad Sadeghi, N., Meratan, A.A., Aziz, F.M., Salahi, A., Shekha, M.S., Akhtari, K., Shahpasand, K., Hojati, S.M.M., Sharifi, M., Saboury, A.A., Rezaei, S.M., Mousavi, S.E., Falahati, M., 2019. Silymarin-albumin nanoplex: Preparation and its potential application as an antioxidant in nervous system in vitro and in vivo. *Int. J. Pharm.* 572.
- Stanel, S.C., Sjoberg, J., Salmonson, T., Foggi, P., Caleno, M., Melchiorri, D., Gravanis, I., Tzoganis, K., Pignatti, F., 2017. European Medicines Agency approval summary: zaltrap for the treatment of patients with oxaliplatin-resistant metastatic colorectal cancer. *ESMO Open* 2.
- Sun, L.I., Chen, Y., Zhou, Y., Guo, D., Fan, Y., Guo, F., Zheng, Y., Chen, W., 2017. Preparation of 5-fluorouracil-loaded chitosan nanoparticles and study of the sustained release in vitro and in vivo. *Asian J. Pharm. Sci.* 12 (5), 418–423.
- Sur-Erdem, I., Hussain, M.S., Asif, M., Pinarbasi, N., Aksu, A.C., Noegel, A.A., 2020. Nesprin-1 impact on tumorigenic cell phenotypes. *Mol. Biol. Rep.* 47 (2), 921–934.
- Tang, S., Zhou, L., Liu, Z., Zou, L., Xiao, M., Huang, C., Xie, Z., He, H., Guo, Y., Cao, Y., Huang, H., Wu, X., Meng, D., Ye, L., Wu, Y., Yang, X., Zhou, X., 2019. Ceria nanoparticles promoted the cytotoxic activity of CD8(+) T cells by activating NF-kappaB signaling. *Biomater. Sci.* 7, 2533–2544.
- Tighi Aydin, R.S., Pulat, M., 2012. 5-Fluorouracil encapsulated chitosan nanoparticles for pH-stimulated drug delivery: evaluation of controlled release kinetics. *J. Nanomater.* 2012, 1–10.
- Umerska, A., Paluch, K.J., Martinez, M.-J., Corrigan, O.I., Medina, C., Tajber, L., 2014. Self-assembled hyaluronate/protamine polyelectrolyte nanoplexes: synthesis, stability, biocompatibility and potential use as peptide carriers. *J. Biomed. Nanotechnol.* 10 (12), 3658–3673.
- Vakilinezhad, M.A., Tanha, S., Montazeri, H., Dinarvand, R., Azadi, A., Akbari Javar, H., 2018. Application of response surface method for preparation, optimization, and characterization of nicotinamide loaded solid lipid nanoparticles. *Adv. Pharm. Bull.* 8, 245–256.
- Varan, G., Akkun, S., Demirtürk, N., Benito, J.M., Bilensoy, E., 2021. Erlotinib entrapped in cholesterol-depleting cyclodextrin nanoparticles shows improved antitumoral efficacy in 3D spheroid tumors of the lung and the liver. *J. Drug Target.* 29 (4), 439–453.
- Varan, G., Benito, J.M., Mellet, C.O., Bilensoy, E., 2017. Development of polycationic amphiphilic cyclodextrin nanoparticles for anticancer drug delivery. *Beilstein J. Nanotechnol.* 8, 1457–1468.
- Varan, G., Öncül, S., Ercan, A., Benito, J.M., Ortiz Mellet, C., Bilensoy, E., 2016. Cholesterol-targeted anticancer and apoptotic effects of anionic and polycationic amphiphilic cyclodextrin nanoparticles. *J. Pharm. Sci.* 105 (10), 3172–3182.

- Verma, A., Stellacci, F., 2010. Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *Small* 6, 12–21.
- Weng, J., Tong, H.H.Y., Chow, S.F., 2020. In vitro release study of the polymeric drug nanoparticles: development and validation of a novel method. *Pharmaceutics* 12 (8), 732.
- Wu, T., Qiao, Q., Qin, X., Zhang, D., Zhang, Z., 2019. Immunostimulatory cytokine and doxorubicin co-loaded nanovesicles for cancer immunochemotherapy. *Nanomedicine* 18, 66–77.
- Xie, Y.-Q., Arik, H., Wei, L., Zheng, Y., Suh, H., Irvine, D.J., Tang, L.I., 2019. Redox-responsive interleukin-2 nanogel specifically and safely promotes the proliferation and memory precursor differentiation of tumor-reactive T-cells. *Biomater. Sci.* 7 (4), 1345–1357.
- Yan, C., Chen, D., Gu, J., Qin, J., 2006. Nanoparticles of 5-fluorouracil (5-FU) loaded N-succinyl chitosan (Suc-Chi) for cancer chemotherapy: preparation, characterization-in-vitro drug release and anti-tumour activity. *J. Pharm. Pharmacol.* 58, 1177–1181.
- Yang, M., Li, J., Gu, P., Fan, X., 2021. The application of nanoparticles in cancer immunotherapy: Targeting tumor microenvironment. *Bioact. Mater.* 6 (7), 1973–1987.
- Yang, T., Du, G., Cui, Y., Yu, R., Hua, C., Tian, W., Zhang, Y., 2019. pH-sensitive doxorubicin-loaded polymeric nanocomplex based on beta-cyclodextrin for liver cancer-targeted therapy. *Int. J. Nanomed.* 14, 1997–2010.
- Yorita, N., Yuge, R., Takigawa, H., Ono, A., Kuwai, T., Kuraoka, K., Kitadai, Y., Tanaka, S., Chayama, K., 2020. Stromal reaction inhibitor and immune-checkpoint inhibitor combination therapy attenuates excluded-type colorectal cancer in a mouse model. *Cancer Lett.* 498, 111–120.
- Yu, Z., Li, X., Duan, J., Yang, X.D., 2020. Targeted treatment of colon cancer with aptamer-guided albumin nanoparticles loaded with docetaxel. *Int. J. Nanomed.* 15, 6737–6748.
- Zhang, N., Li, J., Jiang, W., Ren, C., Li, J., Xin, J., Li, K., 2010. Effective protection and controlled release of insulin by cationic beta-cyclodextrin polymers from alginate/chitosan nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 393, 212–218.
- Zhang, Q., Yang, H., Sahito, B., Li, X., Peng, L., Gao, X., Ji, H., Wang, L., Jiang, S., Guo, D., 2020. Nanostructured lipid carriers with exceptional gastrointestinal stability and inhibition of P-gp efflux for improved oral delivery of tiludronate. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 187.
- Zhao, N.a., Leng, Q., Woodle, M.C., Mixson, A.J., 2019. Enhanced tumor uptake and activity of nanoplex-loaded doxorubicin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 513 (1), 242–247.
- Zhao, Y., Song, Q., Yin, Y., Wu, T., Hu, X., Gao, X., Li, G., Tan, S., Zhang, Z., 2018. Immunochemotherapy mediated by thermosponge nanoparticles for synergistic anti-tumor effects. *J. Control. Release* 269, 322–336.

8. ÖZGEÇMİŞ

