

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HÜCRE İÇİNE GEN/İLAÇ TAŞINIMINA YÖNELİK
AKTİF HEDEFLENDİRİLMİŞ
NANO İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİN
GELİŞTİRİLMESİ

Umut Can ÖZ

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Asuman BOZKIR

Bu araştırma TÜBİTAK'ın 213M760 numaralı 1003 projesi ve TÜBİTAK 2214-A-Yurt Dışı
Doktora Sırası Araştırma Burs Programı ile desteklenmiştir.

ANKARA

2017

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Hücre İçine Gen/İlaç Taşınımına Yönelik Aktif Hedeflendirilmiş Nano İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.



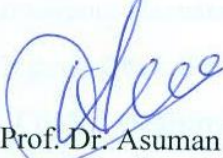
Umut Can ÖZ
15.09.2017

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalında
Umut Can ÖZ tarafından hazırlanan
“Hücre İçine Gen/İlaç Taşınımına Yönelik Aktif Hedeflendirilmiş Nano İlaç Taşıyıcı
Sistemlerin Geliştirilmesi” adlı tez çalışması
aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile
kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 15.09.2017



Prof. Dr. Nurten Özdemir
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Asuman Bozkır
Ankara Üniversitesi
Raportör



Prof. Dr. Fügen Aktan
Ankara Üniversitesi
Üye



Prof. Dr. İmran Vural
Hacettepe Üniversitesi
Üye



Doç. Dr. Güneş Esendağlı
Hacettepe Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	i
Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	viii
Kısaltmalar	x
Şekiller	xi
Çizelgeler	xvi
1. GİRİŞ	1
1.1. Giriş ve Amaç	1
1.2. Polimerzomlar	2
1.3. Polimerzom Oluşum Prensipleri	5
1.4. Polimerzom Hazırlama Yöntemleri	13
1.4.1. Organik Çözücü Kullanılan Polimerzom Hazırlama Yöntemleri	14
1.4.1.1. Çözücü Değişimi Yöntemi	14
1.4.1.2. Mikroakışkan Yöntemi	15
1.4.2. Organik Çözücü Kullanılmayan Polimerzom Hazırlama Yöntemleri	17
1.4.2.1. Film Hidrasyonu Yöntemi	17
1.4.2.2. Elektroformasyon Yöntemi	17
1.4.2.3. Doğrudan Hidrasyon Yöntemi	18
1.4.2.4. pH Değişimi Yöntemi	18
1.4.3. Polimerizasyona Bağlı Kendiliğinden Oluşum	19
1.5. Polimerzomların Uygulama Alanları	19
1.5.1. Kimyasal Etkin Madde / Biyomakromolekül Taşınımı ve Hedeflendirilmesi	20
1.5.1.1. Kimyasal Etkin Madde Taşınımı	20
1.5.1.2. Biyomakromolekül Taşınımı	22
1.5.1.3. Polimerzomların Hedeflendirilmesi	24
1.5.2. Gen Terapisi Amaçlı Viral Olmayan Vektör / Sentetik Virüs Olarak Polimerzom Kullanımı	28
1.5.3. Polimerzomların Görüntüleme Alanında Kullanımı	31

1.5.4. Polimerzomların Yapay Hücre / Nanoreaktör Olarak Kullanımı	33
1.5.4.1. Polimerzomların Bölümlendirilmiş Yapay Hücreler Olarak Kullanımı	34
1.5.4.1.1. Nanoreaktör Olarak Seçici ve Yarı Geçirgen Polimerzomlar	35
1.5.4.1.2. Nanoreaktör Olarak Membranı Kanallar ile Donatılmış Polimerzomlar	37
1.5.4.2. Gen ve Protein İfade Eden Yapay Hücreler	39
1.5.4.3. Kendiliğinden Çalışan Motorlar	41
1.6. Kargo Enkapsülasyon Yöntemleri	42
1.6.1. Polimerzom Oluşumu Esnasında Kargo Enkapsülasyonu	43
1.6.2. Polimerzom Oluşumu Sonrasında Kargo Enkapsülasyonu	45
1.7. Polimerzomların Stabilitesi	47
1.8. Polimerzomlardan Kargo Bileşiklerinin Salımı	50
1.9. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kopolimer, Peptit ve pDNA Hakkında Bilgiler	52
1.9.1. Prostat Kanseri	52
1.9.2. BikDDA Geni	54
1.9.3. Dosetaksel Trihidrat	55
1.9.4. Üzerinde Araştırma Yapılan Kopolimerler	57
1.9.5. Hedefleyici Peptit Sekansı	60
2. GEREÇ ve YÖNTEM	63
2.1. Materyal	63
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	63
2.1.2. Kullanılan Cihazlar	64
2.2. Yöntemler	65
2.2.1. P(OEG ₁₀ MA) ₂₀ -PDPA ₁₀₀ Polimeri ile Yapılan Çalışmalar	65
2.2.1.1. BikDDA Geninin Floresans Ajan İle İşaretlenmesi ve Kalibrasyonu	65
2.2.1.2. P(OEG ₁₀ MA) ₂₀ -PDPA ₁₀₀ Kopolimerinin Sentezi ve Karakterizasyonu	67
2.2.1.3. PDPA ₁₀₀ - P(OEG ₁₀ MA) ₂₀ -S-S-P(OEG ₁₀ MA) ₂₀ -PDPA ₁₀₀ Kopolimerinin Sentezi ve Karakterizasyonu	68
2.2.1.4. H ₂ N-P(OEG ₁₀ MA) ₂₀ -PDPA ₁₀₀ Kopolimerinin Sentezi ve Karakterizasyonu	70
2.2.1.5. CGRFLTGGTGRLLRIS Peptit Sekansının Sentezi ve Karakterizasyonu	71

2.2.1.6. Peptit ile Kopolimerin Farklı Stratejiler ile Konjugasyonu ve Karakterizasyonu	72
2.2.1.7. P(OEG ₁₀ MA) ₂₀ -PDPA ₁₀₀ Kopolimerinin Kalibrasyon Doğrusunun Oluşturulması	75
2.2.1.8. P(OEG ₁₀ MA) ₂₀ -PDPA ₁₀₀ Polimerzomlarının Formülasyonu, Saflaştırılması ve BikDDA Yüklenmesi	75
2.2.1.9. P(OEG ₁₀ MA) ₂₀ -PDPA ₁₀₀ Polimerzom Formülasyonlarının Karakterizasyonu	77
2.2.1.10. P(OEG ₁₀ MA) ₂₀ -PDPA ₁₀₀ Polimerzomlarının Hücrelerde Yapılan Çalışmaları	79
2.2.2. PEtOx- <i>b</i> -PLA Polimeri ile Yapılan Çalışmalar	80
2.2.2.1. Dosetaksel İçin Yapılan Kalibrasyon ve Validasyon	80
2.2.2.1.1. Doğruluk	81
2.2.2.1.2. Kesinlik	82
2.2.2.1.2.1. Tekrarlanabilirlik	82
2.2.2.1.2.2. Ara Kesinlik	82
2.2.2.1.2.3. Tekrar Elde Edilebilirlik	83
2.2.2.1.3. Seçicilik	83
2.2.2.1.4. Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ)	83
2.2.2.1.5. Doğrusallık	83
2.2.2.2. Kopolimerin Blok Uzunluklarının Belirlenmesi ve Saflaştırma Çalışmaları	84
2.2.2.3. PEtOx- <i>b</i> -PLA Polimeri ile Yapılan Polimerzom Formülasyonu Çalışmaları	87
2.2.2.4. PEtOx- <i>b</i> -PLA Polimerzom Formülasyonlarının Karakterizasyonu	90
2.2.2.4.1. Polimerzomların Ortalama Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyeli Ölçümleri	91
2.2.2.4.2. Geliştirilen Polimerzom Formülasyonunun Tekrarlanabilirliğinin Tayin Edilmesi	91
2.2.2.4.3. Polimerzom Formülasyonlarının Morfolojik Değerlendirilmesi	91
2.2.2.4.4. Polimerzom Formülasyonlarının BikDDA Enkapsülasyonu Açısından Değerlendirilmesi	92
2.2.2.4.5. Polimerzom Formülasyonlarının Dosetaksel Enkapsülasyonu Açısından Değerlendirilmesi	92

2.2.2.4.5. Polimerzom Formülasyonlarının Stabilitesi	93
2.2.2.4.6. Polimerzom Formülasyonlarına Enkapsüle Edilen Materyalin Açığa Çıkışının İncelenmesi	95
2.2.2.4.7. Laminar Kabin Altında Aseptik Şartlarda Polimerzom Formülasyonu Üretimi	95
2.2.2.5. PEOx- <i>b</i> -PLA Polimerzomlarının Hücrelerde Yapılan Çalışmaları	96
3. BULGULAR	98
3.1. P(OEG ₁₀ MA) ₂₀ -PDPA ₁₀₀ Polimeri ile Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular	98
3.1.1. Sentezlenen P(OEG ₁₀ MA) ₂₀ -PDPA ₁₀₀ Esaslı Kopolimerlere Ait Karakterizasyon Bulguları	98
3.1.2. BikDDA Geninin Kalibrasyon Grafiği	104
3.1.3. Sentezlenen Hedeflendirici Peptit Sekansına Ait Karakterizasyonuna ait Bulgular	105
3.1.4. P(OEG ₁₀ MA) ₂₀ -PDPA ₁₀₀ Esaslı Polimerzom Formülasyonlarına Ait Karakterizasyon Bulguları	106
3.1.4. P(OEG ₁₀ MA) ₂₀ -PDPA ₁₀₀ Esaslı Polimerzom Formülasyonlarının Hücrelerde Yapılan Çalışmalarına Ait Bulgular	116
3.2. PEOx ₃₇ -PLA ₂₀₀ Polimeri ile Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular	121
3.2.1. Dosetakselin Kalibrasyonu ve Validasyonuna Ait Bulgular	121
3.2.2. PEOx- <i>b</i> -PLA Kopolimerinin Karakterizasyonu ve Blok Uzunluklarının Belirlenmesine Ait Bulgular	128
3.2.4. PEOx ₃₇ - <i>b</i> -PLA ₂₀₀ Polimerzom Formülasyonlarının Karakterizasyon Bulguları	134
3.2.5. PEOx- <i>b</i> -PLA Polimerzom Formülasyonlarının Hücrelerde Yapılan Çalışmalarına Ait Bulgular	150
4. TARTIŞMA	155
4.1. P(OEG ₁₀ MA) ₂₀ -PDPA ₁₀₀ Kopolimeri ile Yapılan Çalışmalar	155
4.1.1. BikDDA Geninin Floresans Ajan İle İşaretlenmesi ve Kalibrasyonuna Ait Bulguların Değerlendirilmesi	155
4.1.2. Sistein Uçlu Hedeflendirici Peptit Sekansının Sentezi ve Saflaştırılmasına Ait Bulguların Değerlendirilmesi	156
4.1.3. P(OEG ₁₀ MA) ₂₀ -PDPA ₁₀₀ Esaslı Kopolimerlerin Sentezi ve Hedeflendirici Peptit Sekansı ile Konjugasyonlarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi	157

4.1.4. P(OEG ₁₀ MA) ₂₀ -PDPA ₁₀₀ Polimerzomlarının Formülasyonu, Saflaştırılması ve BikDDA Yüklenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	160
4.1.5. P(OEG ₁₀ MA) ₂₀ -PDPA ₁₀₀ Esaslı Polimerzomların Karakterizasyon Bulgularının Değerlendirilmesi	163
4.1.6. P(OEG ₁₀ MA) ₂₀ -PDPA ₁₀₀ Esaslı Polimerzom Formülasyonlarının Hücrelerde Yapılan Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi	164
4.2. PEtOx- <i>b</i> -PLA Kopolimeri ile Yapılan Çalışmalar	167
4.2.1. Dosetakselin Kalibrasyonu ve Validasyonuna Ait Bulguların Değerlendirilmesi	167
4.2.2. PEtOx- <i>b</i> -PLA Kopolimerinin Blok Uzunluklarının Belirlenmesi, Saflaştırılmasına ve Sentezine Ait Bulguların Değerlendirilmesi	168
4.2.3. PEtOx- <i>b</i> -PLA Kopolimeri ile Yapılan Polimerzom Formülasyonu Çalışmalarının Değerlendirilmesi	173
4.2.4. PEtOx- <i>b</i> -PLA Polimerzom Formülasyonlarının Karakterizasyon Bulgularının Değerlendirilmesi	178
4.2.5. PEtOx ₃₇ - <i>b</i> -PLA ₂₀₀ Polimerzomlarının Hücrelerde Yapılan Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi	184
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	187
ÖZET	192
SUMMARY	193
KAYNAKLAR	194
ÖZGEÇMİŞ	220

ÖNSÖZ

“Hücre İçine Gen/İlaç Taşınımına Yönelik Aktif Hedeflendirilmiş Nano İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi” başlıklı bu doktora tezi çalışması, farklı kopolimerlerden hareketle polimerzom formülasyonlarının, Türkiye’de ilk defa hazırlanmasını, prostat kanserini hedefleyecek peptit ile modifiye edilmesini, kimyasal etkin madde ve genetik materyal yüklenmesini, in-vitro karakterizasyon bilgilerini ve hazırlanan polimerzom esaslı formülasyonların hücresel çalışmalarını kapsamaktadır.

Uzun ve bilinmezi bol olan doktora tezi yolculuğumun hiç bir aşamasında kendimi yalnız hissetmeyerek, gerek deneysel olarak gerek fikirsel olarak ve gerekse de sosyal olarak beni tamamlayan kişilere değinmeden tezimi tamamlayamazdım. Dolayısıyla, ilerleyen sayfalarda okuyacağınız bu tezde en az benim kadar emeği olduğunu düşündüğüm kişilerden bahsederek başlamak istiyorum.

Deneysel çalışmalarım sırasınca derin bilgisini ve tecrübesini esirgemeyerek sonsuz desteğini hep hissettiğim, hayata bakış açısı ve ileri görüşlü vizyonu ile bana çok şey katan danışmanım Sayın Prof. Dr. Asuman Bozkır’a,

Çalışmalarımı aksatmadan devam ettirebilmem için her türlü imkanı sağlayan Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Eczacılık Teknolojisi Bölümü Başkanı Sayın Prof. Dr. Nurten Özdemir’e,

Polimerzomlarda olduğu kadar aşına olmadığım diğer pek çok bilimsel deneyimler ile ilgili her türlü desteği sağlayıp, bilim insanı nasıl olmalıdır vizyonundan yararlanma şansına sahip olduğum Beppe’ye,

Yaptığımız çalışmalarda desteğini hissettiğim Sayın Prof. Dr. İmran Vural’a,

Herhangi bir konuda yardım istediğimde beni geri çevirmeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Ongun Mehmet SAKA, Yrd. Doç. Dr. Burcu Devrim’e,

Tez projesinde çalıştığımız Sayın Doç. Dr. Dilek Telci’ye ve Dr. Özgür Yılmaz’a,

Beraber çalışma fırsatını bulduğum Dr. Alessandro Poma’ya, Dr. Robin Bofinger’a Lijuan Guan’a, Aslı Kara’ya, Naile Öztürk’e, Umut Uğur Özköse’ye, Sevgi Gülyüz’e, Zeynep Büşra Bolat’a, Ece Nezir’e,

Sürekli olarak tavsiyelerini ve desteklerini gördüğüm Dr. Berrin Küçüktürkmen'e,

Ve

En büyük sevinç ve mutluluk tedarikçim Merve Demirbüğen ile tüm hayatım süresince öncelikleri beni sevmek olup sürekli yanımda olan babam Bayram Öz'e ve annem Melaha Öz'e,

Teşekkürü bir borç bilirim.



KISALTMALAR

Cy5	: Siyanin5
DCM	: Diklorometan
DMF	: Dimetilformamid
DTX	: Dosetaksiel trihidrat
GPC	: Jel permeasyon kromatografisi
ICH	: Uluslararası harmonizasyon komitesi
MALDI-TOF	: Matriks aracılı lazer desorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektroskopisi
PBD	: Poli(bütadien)
PBS	: Fosfat-salin tamponu
PCL	: Poli(kaprolakton)
pDNA	: plazmid Deoksiribo Nükleik Asit
PDLLA	: Poli(<i>D,L</i> -laktid)
PDPA	: Poli[2-(diisopropilamino)etil metakrilat]
PEG	: Poli(etilen glikol)
PEO	: Poli(etilen oksit)
PEtOx	: Poli(2-etil-2-oksazolin)
PLA	: Poli(<i>L</i> -laktid)
PMPC	: Poli(2-(metakriloiloksi)etil fosforilkolin)
POEGMA	: Poli[oligo(etilenglikol) metakrilat]
PPh₃	: Trifenilfosfin
PSMA	: Prostat spesifik membran antijeni
PTA	: Fosfotungustik asit
ROP	: Halka açılma polimerizasyonu
SEC	: Boyut dışlama kromatografisi
SMCC	: 4-[<i>N</i> -malemidometil]sikloheksan-1-karboksilat
TEM	: Geçirimli elektron mikroskopu

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Polimerzom yapısının şematik gösterilişi	4
Şekil 1.2. Poli(etilen oksit)-ko-poli(bütlen oksit) kopolimerinin su içerisindeki konsantrasyonu ve molekül ağırlığına bağlı faz diyagramı	6
Şekil 1.3. f değerinin, amfifilik kopolimerlerden elde edilen yapıların morfolojisi üzerine etkisi	8
Şekil 1.4. Paketleme parametresi doğrultusunda amfifilik kopolimerlerden elde edilen yapılar	9
Şekil 1.5. Paketleme parametresi ile ortalama eğrilik (H) ve Gauss eğriliği (K) arasındaki ilişki	10
Şekil 1.6. Kopolimer çifte tabakalarının oluşumu ve veziküller halinde kapanmasının şematik gösterimi	11
Şekil 1.7. Dar açılı X-ışını saçılmasından yararlanarak hesaplanmış polimerzom membranının elektron dansite profili ve hidrofobik / hidrofilik blokların konformasyonunu şematize eden şekil	12
Şekil 1.8. Çözücü değişimi yönteminin şematik gösterilişi	15
Şekil 1.9. Mikroakışkan teknolojisine ait fotoğraflar. Çift emülsiyon şablonuna dayanan polimerzom üretimi (a), Hidrodinamik akış odaklı mikroakışkan yöntemiyle polimerzom üretimi (b)	16
Şekil 1.10. Polimerzomların uygulama alanları	20
Şekil 1.11. Hedeflendirilmiş polimerzomların tümör bölgelerinde EPR etkisinin aracılığıyla pasif hedeflendirilmesi	25
Şekil 1.12. Üç basamaklı kaskad reaksiyonunu gerçekleştirmek amacıyla tasarlanmış PS-PIAT polimerzomları	37
Şekil 1.13. DNA nano-gözeneği taşıyan PMPC-PDPA polimerzomlarının şematize ifadesi	39
Şekil 1.14. Kargo bileşiklerin polimerzomlar içerisine enkapsüle edilme yöntemlerinin şematize edilmiş hali	46
Şekil 1.15. POEGMA-PDPA polimerzomlarının boş ve paklitaksel yüklü haldeki stabiliteleri	47

Şekil 1.16. Polimerzomların füzyon mekanizmasının şematize edilmesi	48
Şekil 1.17. a) Polimerzomların farklı santrifüj hızlarından sonraki türbidite değerleri, b) Polimerzomların 14000 rpm santrifüjden önceki boyut dağılımı, c) Polimerzomların 14000 rpm santrifüjden sonraki boyut dağılımı, d) Polimerzomların SDS ilavesinden önce ve sonra ölçülen türbidite değerleri, e) Polimerzomların SDS eklenmeden önceki boyut dağılımları, f) Polimerzomların SDS ilavesinden sonraki boyut dağılımları	49
Şekil 1.18. Polimerzomların taşıdıkları kargoları salım mekanizmaları	52
Şekil 1.19. Dosetaksel trihidratın kimyasal yapısı	57
Şekil 1.20. PEtOx ₃₇ -b-PLA ₂₀₀ kopolimerinin kimyasal yapısı	58
Şekil 1.21. P(OEG ₁₀ MA) ₂₀ -ko-PDPA ₁₀₀ kopolimerinin kimyasal yapısı	59
Şekil 1.22. PDPA esaslı çeşitli kopolimerlerin pH duyarlı kendiliğinden oluşum ve ayrılma süreci	60
Şekil 2.1. P(OEG ₁₀ MA) ₂₀ -PDPA ₁₀₀ kopolimerinin sentez şeması	68
Şekil 2.2. PDPA ₁₀₀ -P(OEG ₁₀ MA) ₂₀ -S-S-P(OEG ₁₀ MA) ₂₀ -PDPA ₁₀₀ kopolimerinin sentez şeması	69
Şekil 2.3. H ₂ N-P(OEG ₁₀ MA) ₂₀ -PDPA ₁₀₀ kopolimerinin sentez şeması	71
Şekil 2.4. Hedefleyici peptit sekansı ile PDPA ₁₀₀ -P(OEG ₁₀ MA) ₂₀ -S-S-P(OEG ₁₀ MA) ₂₀ -PDPA ₁₀₀ kopolimerinin konjugasyon şeması	73
Şekil 2.5. Hedefleyici peptit sekansı ile P(OEG ₁₀ MA) ₂₀ -PDPA ₁₀₀ kopolimerinin SMCC aracılığıyla konjugasyon şeması	74
Şekil 2.6. pH değişimi yöntemi ile polimerzom hazırlanmasına ait deney düzeneği	76
Şekil 2.7. PEtOx-b-PLA blok kopolimerinin sentez şeması	85
Şekil 3.1. P(OEG ₁₀ MA) ₂₀ -PDPA ₁₀₀ kopolimerinin, pH 2,0 PBS içerisindeki kalibrasyonu	98
Şekil 3.2. P(OEG ₁₀ MA) ₂₀ -PDPA ₁₀₀ kopolimerine ait GPC analizi sonucu P(OEG ₁₀ MA) ₂₀ -PDPA ₁₀₀ kopolimerine ait, Şekil 3.2.'de sunulan GPC analizi sonucu, kopolimerin molekül ağırlığı dağılımını göstermektedir.	99
Şekil 3.3. P(OEG ₁₀ MA) ₂₀ -PDPA ₁₀₀ kopolimerine ait ¹ H-NMR kromatogramı	100
Şekil 3.4. PDPA ₁₀₀ -P(OEG ₁₀ MA) ₂₀ -S-S-P(OEG ₁₀ MA) ₂₀ -PDPA ₁₀₀ kopolimerine ait ¹ H-NMR kromatogramı	101

- Şekil 3.5.** $H_2N-P(OEG_{10}MA)_{20}-PDPA_{100}$ kopolimerine ait 1H -NMR kromatogramı 102
- Şekil 3.6.** $P(OEG_{10}MA)_{20}-PDPA_{100}$ kopolimeri ile floresans Tamra etiketli maleimid-peptit563 ve sistein-peptit563 konjugatlarının HPLC kromatogramları (a,b) ve kimyasal yapıları (c,d) 103
- Şekil 3.7.** Cy5 ile işaretlenmiş BikDDA geninin, pH 7,4 PBS içerisindeki florimetrik kalibrasyonu 104
- Şekil 3.8.** Sentezi gerçekleştirilen, saflaştırılmamış sistein uçlu peptit563'ün, üretim sonrasına ait preparatif HPLC pikleri 105
- Şekil 3.9.** Sentezlenen sistein uçlu peptit563'ün molekül ağırlığını gösteren MALDI-TOF kromatogramı 105
- Şekil 3.10.** Saflaştırma sonrası analitik HPLC ile saflığı kontrol edilen sistein uçlu peptit563'e ait kromatogram 106
- Şekil 3.11.** pH değişimi yöntemiyle üretilmiş, boş $P(OEG_{10}MA)_{20}-PDPA_{100}$ polimerzomlarına ait TEM görüntüleri 107
- Şekil 3.12.** pH değişimi yöntemiyle üretilen BikDDA yüklenmiş $P(OEG_{10}MA)_{20}-PDPA_{100}$ polimerzomuna ait TEM görüntüsü 108
- Şekil 3.13.** pH değişimi yöntemiyle üretilen, peptit563 ile konjuge edilmiş $P(OEG_{10}MA)_{20}-PDPA_{100}$ ile üretilen polimerzomlara ait TEM görüntüleri 109
- Şekil 3.14.** $P(OEG_{10}MA)_{20}-PDPA_{88}$ kopolimeri kullanılarak pH değişimi yöntemiyle elde edilen evrik yapılara ait TEM görüntüleri 110
- Şekil 3.15.** $P(OEG_{10}MA)_{20}-PDPA_{100}$ kopolimeri kullanılarak film hidrasyonu yöntemi ile elde edilen yapılara ait TEM görüntüleri 111
- Şekil 3.16.** $P(OEG_{10}MA)_{20}-PDPA_{100}$ kopolimeri kullanılarak film hidrasyonu yöntemi ile elde edilen yapılara ait TEM görüntüsü (4 haftalık manyetik karıştırma sonrası). 112
- Şekil 3.17.** $P(OEG_{10}MA)_{20}-PDPA_{100}$ kopolimeri kullanılarak pH değişimi yöntemi ile elde edilen polimerzom formülasyonlarına ait ortalama partikül büyüklüğü (a) ve korelasyon fonksiyonu (b) grafikleri 114
- Şekil 3.18.** PNT1A (a), LNCaP (b) ve HUVEC (c) hücrelerinde MTS analizi aracılığıyla yapılan, $P(OEG_{10}MA)_{20}-PDPA_{100}$ kopolimerine ait hücre canlılık testi sonuçları 116
- Şekil 3.19.** Hedeflendirilen yapılabacağı LNCaP hücrelerinde MTS analizi aracılığıyla yapılan, $P(OEG_{10}MA)_{20}-PDPA_{100}$ polimerzom formülasyonuna ait hücre canlılık testi

sonuçları (a). BikDDA yüklü hedeflendirilmiş polimerzomların LNCaP hücreleri üzerindeki hücre canlılığı testi sonuçları (b) 117

Şekil 3.20. Peptit563 ile prostat kanserine spesifik hedeflendirilmiş P(OE₁₀GMA)₂₀-PDPA₁₀₀ polimerzomlarının, 72 saatlik inkübasyon sonrasında PNT1A ve LNCaP hücreleri tarafından alımını gösteren konfokal mikroskop görüntüleri 118

Şekil 3.21. Peptit563 ile prostat kanserine spesifik hedeflendirilmiş P(OE₁₀GMA)₂₀-PDPA₁₀₀ polimerzomlarının PNT1A ve LNCaP hücreleri tarafından alımını gösteren akış sitometrisi verileri 119

Şekil 3.22. Piyasada transfeksiyon ajanı olarak kullanılan X-tremeGENE-GFP reajanı ile EGFP kodlanmış BikDDA yüklü P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ polimerzomlarının LNCaP hücreleri üzerindeki transfeksiyon etkinliği verileri 120

Şekil 3.23. Dosetaksel trihidratın HPLC kromatogramı 121

Şekil 3.24. Dosetaksel trihidratın pH 7,4 PBS içindeki kalibrasyon grafiği 122

Şekil 3.25. DTX'in pH 7,4 PBS tamponu içerisindeki miktar tayinine ilişkin doğrusallık grafiği 127

Şekil 3.26. PEtOx₃₇-b-PLA₂₀₀ kopolimerine ait FTIR spektrumu 129

Şekil 3.27. PEtOx-b-PLA kopolimerine ait ¹H-NMR kromatogramı 130

Şekil 3.28. PEtOx₃₀₀₀-b-PLA₉₀₀₀ kopolimeri ile elde edilen yapıların TEM görüntüleri 131

Şekil 3.29. PEtOx₄₀₀₀-b-PLA₉₀₀₀ kopolimeri ile elde edilen yapıların TEM görüntüleri 132

Şekil 3.30. PEtOx₇₅₀₀-b-PLA₉₀₀₀ kopolimeri ile elde edilen yapıların TEM görüntüleri 133

Şekil 3.31. Tekrarı yapılan formülasyonlara ait ortalama partikül büyüklüğü ve PDI verilerinin grafiksel ifadesi 138

Şekil 3.32. Tekrarı yapılan formülasyonlara ait ortalama DTX enkapsülasyon etkinliği ve kopolimer konsantrasyonu verilerinin grafiksel ifadesi 138

Şekil 3.33. Optimize edilen çözücü değişimi yöntemi ile üretilen polimerzom formülasyonlarının, koloidal haldeki +4°C'de 3 aylık ve +37°C'de 24 saatlik stabilite sonuçlarına işaret eden partikül büyüklüğü dağılımı grafiği 139

Şekil 3.34. BikDDA geni ve BikDDA yüklü polimerzomlara ait agaroz jel görüntüleri 142

Şekil 3.35. 500 µg/mL DTX içeren PEtOx- <i>b</i> -PLA polimerzom formülasyonlarının 37°C ve +4°C deki etkin madde çıkış grafiği	143
Şekil 3.36. PEtOx ₃₆₀₀ - <i>b</i> -PLA ₁₄₄₀₀ kopolimeri ile elde edilen polimerzom yapılarına ait TEM görüntüleri	145
Şekil 3.37. PEtOx ₄₆₀₀ - <i>b</i> -PLA ₁₄₄₀₀ kopolimeri ile elde edilen polimerzom yapılarına ait TEM görüntüleri	146
Şekil 3.38. PEtOx ₆₂₀₀ - <i>b</i> -PLA ₁₄₄₀₀ kopolimeri ile elde edilen polimerzom yapılarına ait TEM görüntüleri	147
Şekil 3.39. DTX yüklü PEtOx ₃₆₀₀ - <i>b</i> -PLA ₁₄₄₀₀ polimerzomlarına ait TEM görüntüleri	148
Şekil 3.40. BikDDA enkapsüle edilmiş PEtOx ₃₆₀₀ - <i>b</i> -PLA ₁₄₄₀₀ polimerzomlarına ait TEM görüntüleri	149
Şekil 3.41. Diyaliz saflaştırılması yapılmamış (a) ve yapılmış (b) PEtOx ₃₇ - <i>b</i> -PLA ₂₀₀ kopolimeri ile yapılan polimerzom önformülasyonlarına ait TEM görüntüleri	150
Şekil 3.42. BikDDA enkapsüle edilmiş PEtOx- <i>b</i> -PLA polimerzom formülasyonunun LNCaP hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi	151
Şekil 3.43. BikDDA enkapsüle edilmiş PEtOx- <i>b</i> -PLA polimerzom formülasyonunun PNT1A hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi	151
Şekil 3.44. DTX enkapsüle edilmiş PEtOx- <i>b</i> -PLA polimerzom formülasyonunun LNCaP hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi	152
Şekil 3.45. DTX enkapsüle edilmiş PEtOx- <i>b</i> -PLA polimerzom formülasyonunun PNT1A hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi	152
Şekil 3.46. Peptit563 ile prostat kanserine spesifik hedeflendirilmiş PEtOx ₃₇ - <i>b</i> -PLA ₂₀₀ polimerzomlarının, 4 saatlik inkübasyon sonrasında PNT1A ve LNCaP hücreleri tarafından alımını gösteren konfokal mikroskop görüntüleri	154

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Floresans spektroskopisinin işlem ayrıntıları.	67
Çizelge 2.2. Preperatif HPLC'nin detayları.	72
Çizelge 2.3. Sentezlenen PEOx- <i>b</i> -PLA polimerlerinin listesi.	86
Çizelge 3.1. P(OEG ₁₀ MA) ₂₀ -PDPA ₁₀₀ kopolimeri kullanılarak pH değişimi yöntemi ile elde edilen polimerzom formülasyonlarına ait ortalama partikül büyüklüğü ve dağılımı verileri.	113
Çizelge 3.2. P(OEG ₁₀ MA) ₂₀ -PDPA ₁₀₀ kopolimeri kullanılarak pH değişimi yöntemi ile elde edilen polimerzom formülasyonlarına ait enkapsülasyon etkinliği ve kopolimer konsantrasyonu verileri.	115
Çizelge 3.3. P(OEG ₁₀ MA) ₂₀ -PDPA ₁₀₀ kopolimeri kullanılarak pH değişimi yöntemi ile elde edilen polimerzom formülasyonlarına ait zeta potansiyeli verileri.	115
Çizelge 3.4. Dosetaksel trihidratın HPLC ile yapılan miktar tayini çalışmasına ait parametreler.	122
Çizelge 3.5. Dosetaksel trihidratın kalibrasyon doğrusuna ait parametreler.	123
Çizelge 3.6. Dosetaksel trihidratın pH 7,4 PBS içerisindeki LOD ve LOQ değerleri.	123
Çizelge 3.7. Dosetaksel trihidratın tayin yöntemine ait doğruluk bulguları.	124
Çizelge 3.8. Dosetaksel trihidratın tayin yöntemine ait tekrarlanabilirlik bulguları.	125
Çizelge 3.9. Dosetaksel trihidratın tayin yöntemine ait ara kesinlik bulguları.	126
Çizelge 3.10. DTX'in miktar tayini yöntemine ait doğrusallık parametreleri.	127
Çizelge 3.11. Farklı blok uzunluklarındaki PEOx- <i>b</i> -PLA kopolimerinden elde edilen yapılar.	128
Çizelge 3.12. Çözücü değişimi yönteminde kullanılan PBS miktarının formülasyon sonucu üzerine etkisinin optimizasyonu.	134
Çizelge 3.13. Çözücü değişimi yönteminde kullanılan PBS miktarının formülasyonun partikül büyüklüğü üzerine etkisi (n=3).	135

Çizelge 3.14. Polimerzom formülasyonlarına yüklenecek DTX miktarının seçiminde, elde edilen formülasyonun morfolojik değerlendirilmesi. 135

Çizelge 3.15. Polimerzom formülasyonuna yüklenecek DTX miktarının seçiminde, elde edilen formülasyonun kopolimer konsantrasyonu açısından kıyaslanması (n=3). 137

Çizelge 3.16. Polimerzom formülasyonuna yüklenecek DTX miktarının seçiminde, elde edilen formülasyonun partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve enkapsülasyon etkinliği açısından kıyaslanması (n=3). 137

Çizelge 3.17. 10:02 oranında kopolimer:DTX kullanılan polimerzom formülasyonunun zeta potansiyeli değerlendirilmesi (n=3). 137

Çizelge 3.18. Enkapsülasyon gerçekleştirilmiş polimerzom formülasyonunun tekrarlanabilirliğine dair formülasyon değişkenlerinin değerlendirildiği tablo (n=3). 137

Çizelge 3.19. Kolloidal haldeki polimerzom formülasyonlarına ait haldeki +4°C’de 3 ay ve +37°C’de 24 saat sonrasında ölçülen partikül büyüklüğü sonuçları (n=3). 140

Çizelge 3.20. Polimerzom formülasyonlarına yüklenecek BikDDA miktarının seçiminde, elde edilen formülasyonun morfolojik değerlendirilmesi (n=3). 140

Çizelge 3.21. Polimerzom formülasyonlarına yüklenecek BikDDA miktarının seçiminde, elde edilen formülasyonun kopolimer konsantrasyonu açısından kıyaslanması (n=3). 137

Çizelge 3.22. Polimerzom formülasyonuna yüklenecek BikDDA miktarının seçiminde, elde edilen formülasyonun partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve enkapsülasyon etkinliği açısından kıyaslanması (n=3). 137

Çizelge 3.23. 10:0,014 oranında kopolimer:BikDDA kullanılan polimerzom formülasyonunun zeta potansiyeli değerlendirilmesi (n=3). 142

Çizelge 3.24. Hedeflendirici peptit ve kumarin ile fonksiyonelleştirilmiş polimerzomların ortalama partikül büyüklüğü, PDI ve enkapsülasyon etkinliği verilerinin sunumu. 144

1. GİRİŞ

1.1. Giriş ve Amaç

21. yüzyılda ilaç ve tıbbi biyoteknoloji alanlarındaki en önemli yeri teşkil eden araştırma konuları nanoteknolojinin faydalarından yararlanarak sentetik ilaç moleküllerinin veya genetik materyallerin seçici olarak insan vücudundaki hedef organlara/hücrelere taşınarak kanser gibi tedavisi henüz kesinleşmemiş hastalıklar için kullanımı olmuştur. Son 20 yılda büyük bir hızla gelişen polimerizasyon tekniklerinin yardımıyla üretilen kopolimerlerin kullanımıyla elde edilen polimerik veziküllerin tıp/sağlık alanında kullanılmasıyla hazırlanan nanotaşıyıcılar bu teknolojilerden en önemlisidir.

Polimerik veziküler taşıyıcı sistemler olan polimerzomların 1999 yılında keşfedilmesinin ardından, gerek kimyasal etkin madde gerekse de biyomakromoleküllerin taşınmasında kullanılmasına yönelik çalışmalar yapılmıştır. Yapısı gereği hidrofilik ve hidrofobik molekülleri, kopolimerin yapısında herhangi bir değişiklik yapılmadan taşıyabilen polimerzomlar, lipozomların daha dayanıklı analoglarıdır. Tez kapsamında üretilen polimerzomların yüzeyinde, prostat kanseri hücrelerine özgü olan prostat spesifik membran antijeni (PSMA)'ne afinitesi olan peptit563 bulunacak şekilde formülasyonları gerçekleştirilmiştir.

Bu doktora tezi çalışması kapsamında başlıca; biyoyumlu ancak biyoparçalanır olmayan Poli[oligo(etilenglikol) metakrilat]-ko-poli[2-(diisopropilamino) etil metakrilat] (POEGMA-PDPA) ve hem biyoparçalanır hem de biyoyumlu olan poli(2-etil-2-oksazolin)-b-poli(laktik asit) (PEtOx-b-PLA) kopolimerlerinin sentezi, saflaştırılması, karakterizasyonu yapılmış ve bu polimerlerden hareketle farklı morfolojilerdeki polimerzomlar üretilmiştir. Üretilen polimerzomlara prostat kanserine karşı etkili olan BikDDA geni yüklenmiş ve genetik materyal yüklü polimerzom formülasyonları hazırlanarak karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir.

Daha sonrasında, sentezlenmiş polimere, polimerzomları vücuda uygulandıklarında sadece prostat kanserine yönlendirecek hedefleyici peptit sekansının bağlanması amaçlanmış ve bu amaçla ilgili peptit sekansının sentezlenmesi, saflaştırılması ve karakterizasyonu yapılmıştır. Sentezlenen polimer ve peptit sekansı farklı konjugasyon teknikleri ile birbirine kimyasal olarak bağlanmış ve bu yapı da karakterize edilmiştir. Hazırlanan peptit-polimer konjugatları ile polimerzomlar yeniden üretilerek genetik materyal yüklenmiştir. Üretilen polimerzom formülasyonlarının toksisiteleri sağlıklı kontrol hücre hattı, sağlıklı prostat epitel hücreleri ve kanserli prostat hücreleri üzerinde denenmiş ve toksik olmayan polimerzom formülasyonlarının dozu belirlenmiştir. Dozu belirlenen polimerzom formüllerinin kanser seçici hücre taşıyım deneyleri ve taşıdığı genetik materyali transfekte etme yetenekleri araştırılıp değerlendirilmiştir.

Ayrıca poliestere bazlı biyouyumlu ve biyoparçalanır PEtOx-*b*-PLA kopolimerlerinden hareketle farklı morfolojilerdeki nano-yapılar elde edilip karakterize edilmiş ve bu yapılara pro-apoptotik BikDDA geni ve kemoterapötik dosetaksel etkin maddesi yüklenerek, gerekli hücresel çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Bu tez kapsamında prostat kanserine yönelik aktif hedeflendirilmiş, dosetaksel ve BikDDA yüklü farklı kopolimerlerden üretilmiş polimerzomların geliştirilmesi amaçlanmıştır.

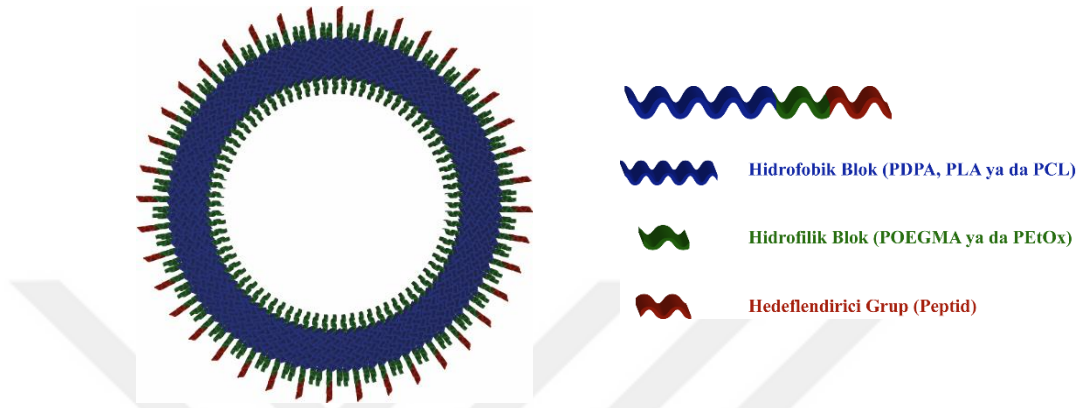
1.2. Polimerzomlar

Günümüz teknolojisi ve bilimsel gelişme, insanoğlunun doğayı taklit etme çabaları sonucunda elde edilen verilerin birikerek yorumlanması ile ortaya çıkmaktadır. Yaşamın yapı taşlarının ayrıştırılıp izole edilmesinin ve herhangi bir canlı sistemin/organizmanın karmaşık yapısını oluşturmuş dinamik doğanın sağlanmasının ilk adımı “bölümlendirme”dir (compartmentalization) (Massignani ve ark., 2010).

Bölümlendirme, bir başka deyişle kontrol edilebilir hacimler yaratma ve molekülleri birbirinden ayırma yeteneği, karmaşık uygulamalar için en önemli gereksinimdir. Biyolojik bölümlendirme, boyutları nanometreden mikrometreye kadar değişebilen, sulu bir ortamı çevreleyen birkaç nanometre kalınlığındaki membranın oluşturduğu yapıların kullanılması ile gerçekleşmektedir. Membran oluşumu, kapalı sulu bölümlerin meydana gelişinin temel yapıtaşısıdır. Farklı birimlerden oluşan bu tasarım, hücre içindeki düzenlenmenin ve insan vücudu gibi kompleks bir makinenin kontrolü için gerekli evrimsel bir adımdır. Hücre seviyesinde protein taşınımının, endozomal membranın tomurcuklanarak taşınacak proteini tamamen çevreleyerek, gerçekleşebilmesi veya bazı hücre organellerinin kendilerine özgü membranlar ile çevrelenmesi bölümlendirmeye örnek verilebilir (Alberts ve ark., 2002). Bilim adamları onlarca yıldır bu yeteneği taklit etmek için çok sayıda sentetik yaklaşımlar denemiştir ve bu sentetik yaklaşımların en başarılısı bölümlendirmeden sorumlu biyolojik yapı taşının taklit edilmesi ile elde edilen “fosfolipit” lerdir. Hâlihazırda, fosfolipitlerin makromoleküler analogları, polimer kimyasının derin bir şekilde anlaşılmasıyla ve gelişmiş kopolimerizasyon tekniklerinin kullanılmasıyla başarılı bir şekilde sentezlenebilmektedir. Yapısında hidrofilik ve hidrofobik kısımları taşıyan (amfifilik) kopolimerler, “kendiliğinden oluşum” (self-assembly) ile bir membranın çevrelediği çeşitli yapılara dönüşecek şekilde tasarlanabilmektedirler. Bunların en basitleri, bir membranın küresel şekilde içine kapanması ile meydana gelen keseler ile temsil edilir ki bunlarda veziküller olarak adlandırılır.

Amfifilik kopolimerlerden oluşmuş veziküller, yaygın olarak bilinen ismiyle “polimerzom” lar ya da “sentetik virüsler” olarak tanımlanmışlardır. Polimerzomlar kimyasal etkin madde (Ahmed ve ark., 2006) / gen (Lomas ve ark., 2010) /protein (Rameez ve ark., 2008) gibi çeşitli kargo taşıyıcı araç, nanoreaktör (Gaitzsch ve ark., 2012), medikal görüntüleme ve teşhis ajanı (Huang ve ark., 2015) olarak kullanılmaktadır. Kelime olarak polimerzom; ingilizce “polymer” kelimesi ve yunanca “some” (...gövdesi) kelimelerinin bir arada kullanılması ile ortaya çıkmıştır ve ilk olarak 1999 yılında Dennis Discher ve ark. tarafından tanımlanıp isimlendirilmiştir (Discher ve ark., 1999). 5-15 nanometre kalınlığındaki polimerik bir membranın sulu bir lümeni çevrelemesi ile meydana gelen mikroskobik/nanoskopik partiküllerdir.

Membranın esas yapısını, sulu ortam ile temasını en aza indirmek için bir araya gelmiş, kopolimerin hidrofobik bloğu oluşturmaktadır. Buna ek olarak kopolimerin hidrofilik bloğu ise hem polimerzom lümenine hem de dış sulu ortama doğru dallanmış pozisyonunda bulunmaktadır.



Şekil 1.1. Polimerzom yapısının şematik gösterilişi.

Amfifilik kopolimerlerin sulu ortamlarda kendiliğinden oluşum prensibiyle meydana getirdiği polimerzomlar, yapıları itibariyle lipozomları andırmaktadır. Lipozomların sergiledikleri bütün avantajlara sahip olmasının haricinde ayrıca lipozomlara kıyasla membran kalınlıkları çok daha fazla olan polimerzomların bu özellikleri nedeniyle kolloidal stabiliteleri hem kinetik hem de termodinamik açıdan çok daha fazladır (Discher ve Eisenberg, 2002). Ayrıca yapıları itibariyle çok çeşitli kimyasal modifikasyona uygun olduğu için farklı amaçlar için kullanımları mümkündür. Avantajlarının yanı sıra polimerzom formülasyonlarının dezavantaj olarak değerlendirilebilecek tek yönleri ise, üretimleri için gerekli kopolimerlerin hayli gelişmiş kopolimerizasyon bilgisi ve zorlu reaksiyonlar sonrasında elde edilebilir olması ve çok dar bir moleküler mimari alanda polimerzom yapılarına dönüşmeleridir. Üretim yöntemi ve kullanılan kopolimerlerin benzerliği nedeniyle polimerzomlar, miseller yapıya kısmen benzemektedir. Miseller yapıya göre en önemli üstünlükleri ise kimyasal olarak çeşitli maddeleri (hidrofilik ve hidrofobik) herhangi bir elektrostatik etkileşim ya da fazladan başka bir mekanizmaya ihtiyaç duymaksızın taşıyabilmeleridir. Standart matris ya da kapsül tipi katı nanopartiküllere göre üretim

yöntemleri kolay ve ölçek büyötmeye uygun olup, agregasyon göstermezler ve farklı kimyasal yapıdaki maddelerin taşınımına elverişlidirler. Polimerzomların bu avantajları ve amaçlanan uygulamaya yönelik olarak boyutlarının mikrometre seviyesinden nanometre seviyesine değışecek şekilde üretilebilir olmaları, biyomedikal ve elektronik uygulamalara kadar farklı alanlarda çalışan bilim insanları ve mühendislerin dikkatini çekmektedir.

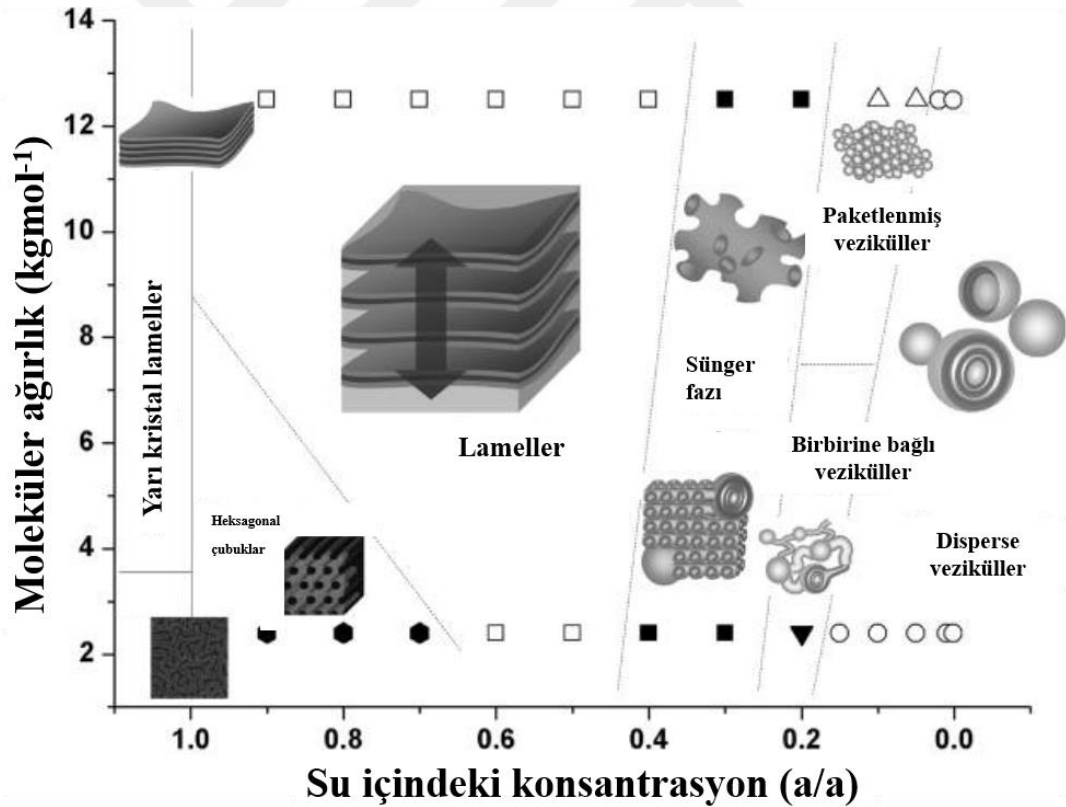
1.3. Polimerzom Oluşum Prensipleri

Son 20 yıldır biyouyumlu kopolimerlerin insan vücudunun temel yapıtaşı olan su ile temasıyla oluşturdukları nano-yapılar biyomedikal alanda dikkatleri üzerine çeken bir konu olmaya başlamıştır.

Kovalan bağlanmış hidrofilik ve hidrofobik bloklardan oluşan kopolimerler, molekülün bir kısmı için seçici çözücölere maruziyet sonucunda nanometre skalasında agreste olurlar. Bu durum, kopolimerlerin yapısı, çeşitli moleköler ağırlık aralığı ve dolayısıyla membran kalınlığı üzerinde farklı bileşimleri göz önüne alındığında, işlevsel olarak sınırsız uygulamalara izin vermektedir. Dolayısıyla kopolimerlerin farklı çözücölere maruziyetlerinde, kendiliğinden oluşum ile meydana getirdikleri değışik geometri ve morfolojideki mikro- / nano-yapıların meydana gelme mekanizmalarının bilinmesi önem taşımaktadır.

Amfifilik kopolimerlerin su içindeki liyotropik (çözücü ile uyarılmış) davranışları temel olarak hidrofobik etkiye dayanmaktadır. Amfifilik kopolimerin su ile temasında hidrofobik zincirler birbirlerine yaklaşarak su moleköleri ile temaslarını en aza indirirken hidrofilik kısımlar ise polar olan sulu ortama doğru yönelenerek pozisyonlanırlar (Malinova ve ark., 2010). Hidrofobik zincirlerin birbirine yaklaşması hidrojen bağları, π - π etkileşimleri, kolombik (coulombic) ve dipolar etkileşimler veya diğeri ikincil birleşme değeri etkileşimler gibi birbirini tamamlayıcı etkileşimler aracılığıyla oluşmaktadır. Bu etkileşimler su içerisindeki kopolimerin konsantrasyonu

ile yakın ilişkilidir. Kritik agregasyon konsantrasyonu olarak bilinen belirli bir konsantrasyonda amfifilik kopolimerler kendiliğinden oluşum ile iyi bilinen yapılara dönüşmektedir. Amfifilik kopolimerlerin polimerzomlara dönüşmesi ilk olarak misel↔çubuk↔vezikül şeklindeki kinetik faz değişimleri (Shen ve Eisenberg, 1999) ile kabaca ifade edilmiş olsa da, 2005 yılında bu dönüşüm detaylı bir şekilde ortaya konulmuştur (Battaglia ve Ryan, 2005b). Bu son değerlendirmeye göre amfifilik kopolimerlerin molekül ağırlığı ve sulu ortamdaki konsantrasyonlarına göre dört morfolojik kendiliğinden oluşum bölgesine sahip oldukları gösterilmiştir; Liyotropik fazlar (altıgen biçimli çubuklar ve lameller), Sürekli fazlar (sünger fazı), Veziküler jeller (birbirine bağlanmış çok tabakalı veziküller ve altıgen şeklinde paketlenmiş veziküller) ve İzotropik vezikül dispersiyonu (tek ve çok tabakalı) (Battaglia ve Ryan, 2006a) (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Poli(etilen oksit)-ko-poli(bütilen oksit) kopolimerinin su içerisindeki konsantrasyonu ve molekül ağırlığına bağlı faz diyagramı (Battaglia ve Ryan, 2006a).

Sistemdeki kopolimer konsantrasyonu, kritik agregasyon konsantrasyonunu aşmaya başladıkça oluşan küresel miseller kübik olarak paketlenmiş yapılara, silindirik miseller ise altıgen şeklinde paketlenmiş yapılara dönüşmektedir ve membranlar ise lameller yapıları üretmek üzere istiflenmeye başlar. Ortaya çıkan bu yapıları içeren sistemin seyreltilmesi sonucunda ise lameller yapılarda, tabakaları birbirine bağlayan delikler oluşur ve bu yapılara sünger fazı denir. Bir sünger fazı kompleks topolojiye sahip sonsuz membran içerir ve bu membranın içinde bulunduğu ortamı ikiye böldüğü bilinmektedir. Bu durumun akabinde ise lameller yapının tabakaları veziküller halinde parçalanır. Seyreltmeye devam edilmesiyle membranlar birbirinden ayrılmaya ve ortamdaki suyu çevrelemeye başlayıp, termodinamik / kinetik açıdan en stabil ve denge durumunda olan tek tek dağılmış vezikülleri ortaya çıkar (Battaglia ve Ryan, 2005b). Düşük molekül ağırlığına sahip kopolimerler ilk olarak altıgen şekilli evrik yapıları oluşturduktan sonra lameller faza geçiş yaparken, yüksek molekül ağırlığına sahip kopolimerler ise doğrudan lameller fazı oluştururlar. Lameller fazdan sünger faza geçişler kopolimerin molekül ağırlığından etkilenmemektedir. Ancak sünger fazdan sonraki geçişler yine kopolimerin molekül büyüklüğüne bağlıdır. Küçük molekül ağırlıklı kopolimerler sünger fazdan sonra disperse olmuş vezikülleri yüksek konsantrasyonda oluştururken, yüksek molekül ağırlığına sahip kopolimerler ise başlangıçta veziküler jel kümelerini oluşturur ve sonunda disperse olmuş veziküllere ayrılır (Massignani ve ark., 2010).

Sulu ortamdaki kopolimerlerin, nano boyuttaki yapılara evriminin altında “paketleme parametresi”, “kendiliğinden eğrilme”, “kopolimer blokları arasındaki yüzeyler arası enerji” ve “hidrofobik bloğun düzeni ve kristallliği” gibi olgular yatmaktadır (Antonietti ve Förster, 2003). Bunlar, tipik olarak polimerzom oluşum sürecini yöneten başlıca faktörlerdir. Bu faktörleri “Geometrik Şartlar” ve “Termodinamik Şartlar” olmak üzere iki sınıfta değerlendirebiliriz.

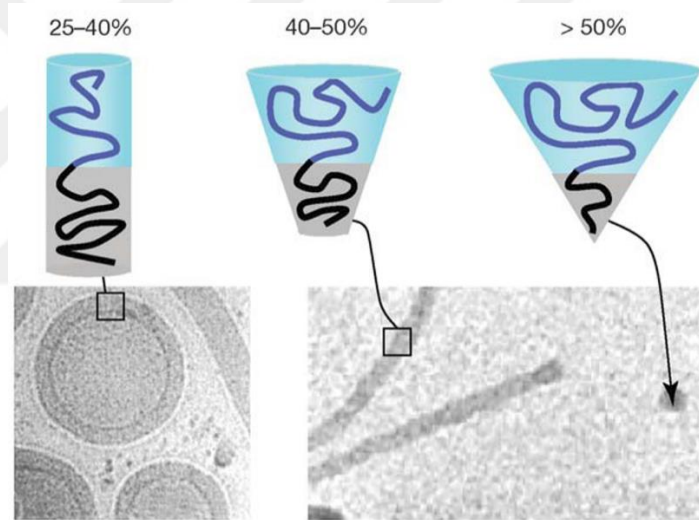
- Geometrik Şartlar:

Polimerzomların 1999 yılında keşfedilmesinin ardından, bu veziküler yapıların özellikle lineer kopolimerlerden hareketle nasıl oluştukları konusunda en kabul gören

kuram, amfifilik kopolimer molekülündeki hidrofilik bloğun moleküler ağırlığının, kopolimerin toplam ağırlığına oranlanması sonucunda elde edilen f değerinin yorumlanması ile ortaya çıkmıştır.

Molekül ağırlıkları 2 kDa ile 20 kDa arasında değişen kopolimerlerden, Şekil 1.3.'te gösterildiği üzere:

- f değerinin $\approx \% 35 \pm 10$ olduğu durumlarda veziküllerin oluştuğu,
- $f > \% 45$ olduğunda miseller yapıların elde edildiği ve
- $f < \% 25$ olduğunda ise evrik yapılar ulaşıldığı, Prof. Dennis Discher ve ekibi tarafından belirlenmiştir (Discher ve ark., 1999; Discher ve Ahmed, 2006).



Şekil 1.3. f değerinin, amfifilik kopolimerlerden elde edilen yapıların morfolojisi üzerine etkisi (Discher ve Ahmed, 2006).

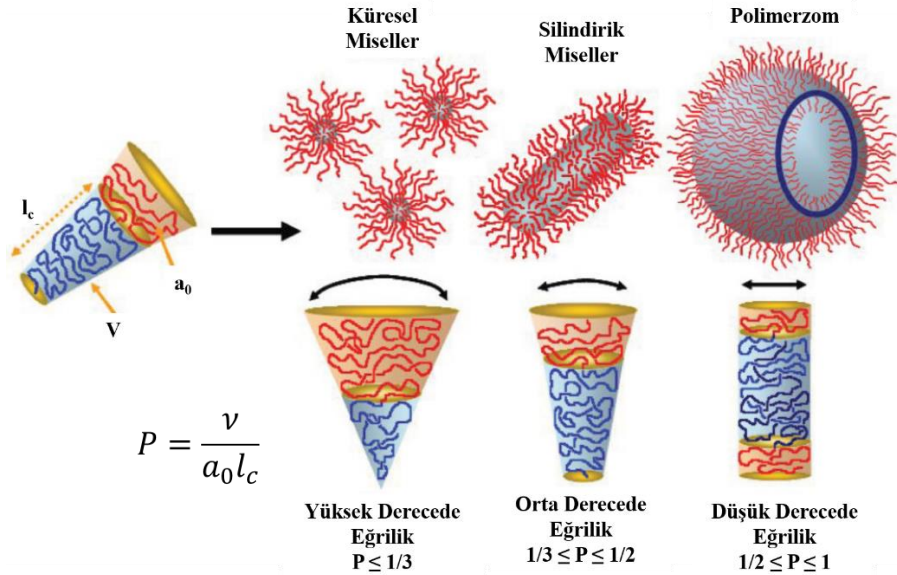
Yukarıda detaylandırılan kuramda f değeri, kopolimer agregatlarının morfolojisini belirlerken, kopolimerin molekül ağırlığı da membran kalınlığını belirlemektedir. Kopolimerin molekül ağırlığı arttıkça, meydana gelen veziküllerin membran kalınlığı da orantısal olarak artmaktadır. Kriyojenik geçirimli elektron mikroskobu görüntüleri 100-200 nm boyutundaki polimerzomların membran kalınlıklarının 2-50 nm (Aranda-Espinoza ve ark., 2001; Bermudez ve ark., 2002) arasında değiştiğini gösterirken, lipozomların membran kalınlıkları 3-5 nm (Chapman, 1988) ile sınırlıdır.

Ayrıca, yüksek molekül ağırlığına (~ 50 kDa) sahip lineer kopolimerlerde $f < \% 20$ olduğu durumlarda da polimerzom yapılarının elde edilebildiği ortaya konulup (Meng ve ark., 2005) kimyasal etkin madde taşınımında kullanılabileceği gösterilmiştir (Lee ve Feijen, 2012).

Lipitler ve yüzey aktif maddelerde yaygın olarak uygulanan ve aşağıda anlatılan kurala benzer şekilde, kopolimerlerden evrimleşen nano-yapıların morfolojisi, boyutsuz "paketleme parametresi (P) ile tarif edilebilmektedir. Paketleme parametresi amfifilik molekülün hidrofobik bloğunun hacmi (v), hidrofilik bloğun denge halinde kapladığı optimal alan (a_0) ve hidrofobik bloğun uzunluğu (l_0) ile, Şekil 1.4.'te gösterildiği biçimde, ilişkilidir.

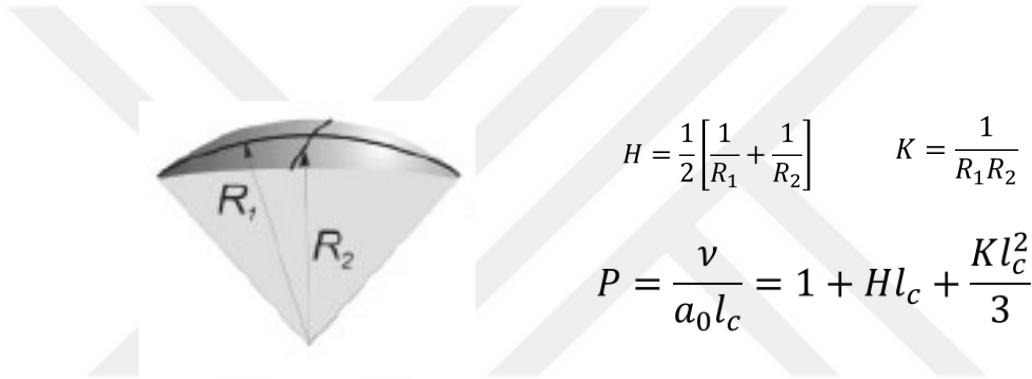
Genellikle P değerinin;

- $P \leq 1/3$ olduğu durumlarda küresel miseller,
- $1/3 \leq P \leq 1/2$ olduğu durumlarda silindirik miseller ve
- $1/2 \leq P \leq 1$ olduğu durumlarda ise veziküler sistemlerin oluştuğu kabul edilir.
- $P = 1$ olduğu zaman ise lameller yapıların oluştuğu gözlemlenmiştir.



Şekil 1.4. Paketleme parametresi doğrultusunda amfifilik kopolimerlerden elde edilen yapılar (Blanazs ve ark., 2009) .

Polimerik veziküllerin oluşumu, öncelikle amfifilik molekülün çifte tabakayı oluşturmaları ve ardından ikinci aşama olarak vezikülü oluşturacak şekilde kapanmaları olmak üzere iki aşamalı kendiliğinden oluşum süreci olarak değerlendirilebilir. Bu nedenle, önce çifte tabakaların oluşumuna yol açan koşullar ve ardından veziküllerin kapanmaları için gerekli şartlar hesaba katılmalıdır. En genel tanımlama ile kendiliğinden oluşma prensibi ile meydana gelen amfifilik yapıların şeklini belirleyen faktör, kopolimerin hidrofilik bloğunun boyutu ile hidrofobik bloğunun boyutsal oranıdır. Bu durum, Şekil 1.5.'de gösterildiği gibi R_1 ve R_2 eğrilik yarıçapları olarak verilen ortalama eğriliğin (H) ve Gauss eğriliğinin (K) hidrofobik-hidrofilik ara yüzeyin eğriliğinin belirlenmesinde kullanılır.



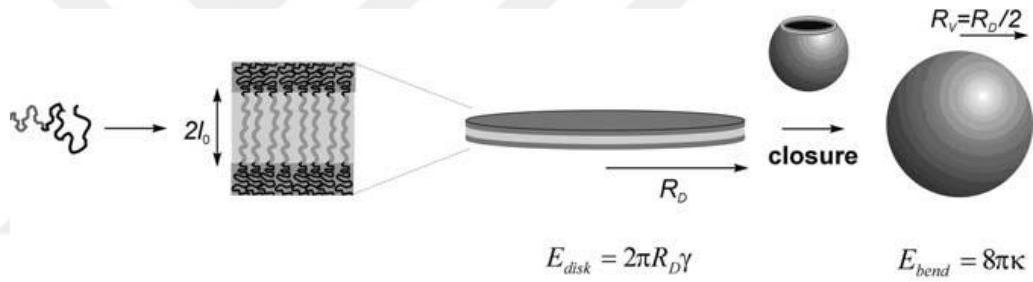
Şekil 1.5. Paketleme parametresi ile ortalama eğrilik (H) ve Gauss eğriliği (K) arasındaki ilişki (Antonietti ve Förster, 2003).

- Termodinamik Şartlar:

Blok kopolimerleri içeren bir sistemin serbest enerjisi, hidrofilik / hidrofobik bloklar arasındaki ara yüzey enerjisine ve sonuç olarak hidrofilik bloğun hidrasyonuna bağlıdır. Bu ara yüzey enerjisi, blok kopolimerler iyi düzenlenmiş mikro alanlara toplandığında meydana gelen entropi kaybını telafi etmek içindir (Balasubramanian ve ark., 2016).

Vezikül şekli belirlenirken bir diğer önemli parametre kopolimer çifte tabakasının “kendiliğinden eğilmesi”dir. Bu parametredeki değişim vezikülün morfolojisini belirler ve farklı geometrik formlar ile sonuçlanan değişimlere neden olabilmektedir.

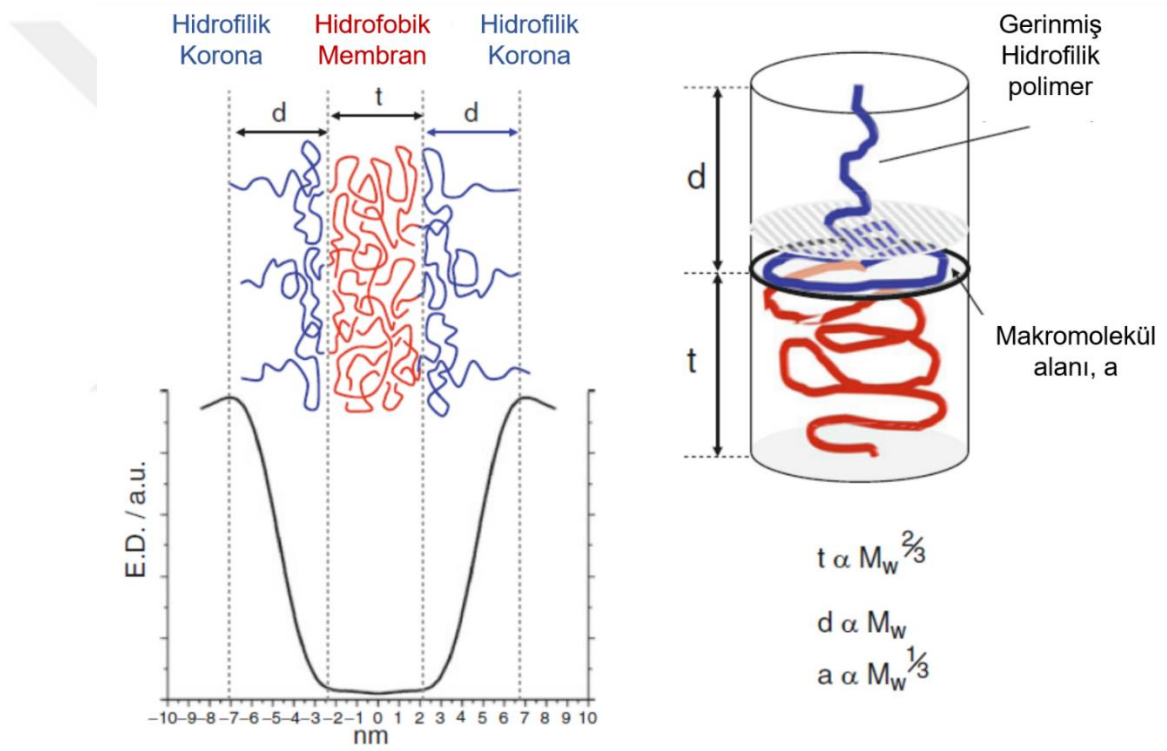
Düşük konsantrasyonlarda çözelti içinde lameller agregatlar oluşur. Bu agregatların boyutlarının büyümesinin ardından, yüzey gerilimi etkilerine bağlı enerji kaybı agregatların veziküler formda kapanmasına neden olur. Kopolimer çifte tabakasının kapalı kabuklar halinde bükülmesinde bir bükülme enerjisi gerekmektedir (E_{bend}). Belirli bir lameller disk alanı için disk yarıçapı, vezikül yarıçapının iki katı kadar olmaktadır ve bu nedenle doğrusal gerilim ve bükülme enerjisinin dengesi ‘minimal vezikül boyutuna’ karşılık gelen minimum agregat sayısını tanımlamaktadır. Dolayısıyla ortaya çıkan vezikül yarıçapı, k ’nın bükülme katsayısı ve γ ’nın yüzey gerilimi olduğu, $R_v = 2k/\gamma$ ile tanımlanır (Şekil 1.6). Veziküller, tercihen kopolimer çifte tabakasının bükülme esnekliğinin düşük yüzey geriliminin yüksek olduğu sistemlerde ortaya çıkmaktadırlar (Malinova ve ark., 2010).



Şekil 1.6. Kopolimer çifte tabakalarının oluşumu ve veziküller halinde kapanmasının şematik gösterimi (Antonietti ve Förster, 2003).

Termodinamik açıdan amfifilik kopolimerlerin kendiliğinden oluşum süreci, sistemin serbest enerjisine etki eden iki faktör ile açıklanabilmektedir. Bunlar hidrofilik / hidrofobik yüzeydeki ara yüzey gerilimi ve polimerik zincirlerin daha düzenli bir yapıya zorlandığında oluşan entropi kaybıdır. Ara yüzey gerilimi ile kopolimer zincirlerinin uzayarak gerinimi sonucunda oluşan entropi kaybı arasındaki bir uyumsuzluk durumunda, kendiliğinden oluşum termodinamiklerini yüzeyler arası alanın minimizasyonu yönetmektedir (Battaglia ve Ryan, 2005a). Güçlü ayrışma limiti (strong segregation limit) olarak bilinen bu noktada hidrofilik ve hidrofobik fazlar birbirinden net bir şekilde ayrılmıştır ve kopolimer zincirleri fazlasıyla gerinmişlerdir. Lameller yapılar ve membranlardaki ayrışma kuvveti, lameller

mesafenin (d) ve ya membran kalınlığının (t), molekül ağırlığı (M_w) ile nasıl değiştiğine dayanarak ölçülebilmektedir. t ile M_w arasında, $t \sim M_w^b$ gibi bir güç yasası olduğu varsayıldığında, üssel b değeri ayrışma kuvvetini göstermek için kullanılabilir (Şekil 1.7.). Amfifil zincirlerinin tamamen gerindiği durumlarda b , 1 değerini alır ve bu fosfolipitlerin yaklaşabileceği teorik limittir. Kopolimerin rastgele sarım konformasyonunda bulunduğu durumlarda $b = 1/2$ değerini almaktadır ve blok kopolimer eriyiklerindeki zayıf ayrışma olarak bilinmektedir. b 'nin $2/3$ olduğu ara koşullarda, güçlü ayrışma durumu söz konusudur ve bu şartlarda polimerzom yapıları gözlemlenebilmektedir.



Şekil 1.7. Dar açılı X-ışını saçılmasından yararlanarak hesaplanmış polimerzom membranının elektron dansite profili ve hidrofofik / hidrofilik blokların konformasyonunu şematize eden şekil (E.D.: elektron dansitesi) (Massignani ve ark., 2010).

Sulu ortamda bulunan kopolimerlerin hidrofofik kısımları saf halde belirli bir yapısal düzeni benimsemiştir. Bu düzenin kendiliğinden oluşum sürecinde sergilediği davranış, sürecin dengeye ulaşma koşullarını doğrudan etkilemektedir. 2013 yılında, polimerzom üretiminde kullanılan farklı kristal yapısındaki kopolimerlerin yapısal

değişimler ve sıcaklık bağımlı kontrollü salım üzerine etkileri değerlendirilmiştir (Hocine ve ark., 2013). Bu amaçla sıvı benzeri polimerler (polibütülaakrilat, polikaprolakton), katı benzeri polimer (polistiren) ve sıvı kristal polimerler (poliakrilat, polimetakrilat) kullanılarak üretilen polimerzomlar arasında kıyaslamalı değerlendirmeler yapılmıştır. Sonuç olarak polimerzomların sıcaklık bağımlı etkin madde salım ve yapısal değişim özelliklerinin sıvı kristal geçişlerinden etkilenmediği (nematik-izotropik ve simektik-nematik geçişler) ancak sıvı kristal yapılarına ve membranın mekanik özelliklerine bağılı oldukları açıklanmıştır.

Yukarıdaki hususlar; kopolimerler, sürfaktanlar, dendronlar, (poli)peptitler, nükleik asitler ve poliiyon kompleksleri gibi esnek olan gruplardaki moleküler yönelmeleri yumuşak moleküler düzenlemeler aracılığıyla eğrilik ve şekil değişiklikleri ile dengeleyebilmesi açısından önemlidir. Dolayısıyla bu maddeler kullanılarak elde edilen polimerzomlar, filomiseller, lameller elipsoidler, kolloidozomlar, polielektrolit kapsülleri, oblatlar, prolatlar, kendiliğinden oluşan polimerik nanotüpler/çubuklar ve miseller “yumuşak madde” (soft matter) çatısı altında sınıflandırılırlar.

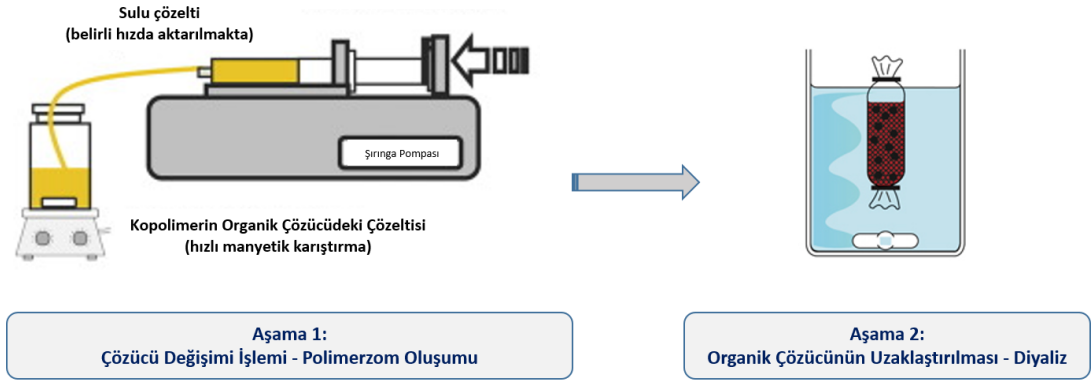
1.4. Polimerzom Hazırlama Yöntemleri

Polimerzom hazırlama yöntemleri “organik çözücü kullanılan yöntemler” ve “organik çözücü kullanılmayan yöntemler” olmak üzere iki sınıfta gruplandırılabilir.

1.4.1. Organik Çözücü Kullanılan Polimerzom Hazırlama Yöntemleri

1.4.1.1. Çözücü Değişimi Yöntemi

“Çözücü Değişimi Yöntemi” ya da bir diğer adıyla ko-solvan yöntemi çoğunlukla suda çözünmeyen kopolimerlerde kullanılan hazırlama yöntemidir (Şekil 1.8). Tipik bir çözücü değişimi yönteminde (Ayen ve ark., 2011) öncelikle, kopolimerler, tetrahidrofuran, dioksan, dimetilformamid veya dimetilsülfoksit gibi kopolimerin tüm bloklarını çözen ortak bir çözücü içerisinde çözündürülür. Ardından, bir blok ile uyuşmayıp sadece diğer blok için seçici bir çözücü, kopolimer çözeltisine yavaş yavaş ilave edilir ya da tersi olarak kopolimer çözeltisi bu çözücü içerisine yavaşça ilave edilir. Yaygın olarak kullanılan bir blok seçici çözücü, hidrofilik bloklar için seçici ve hidrofobik bloklar için uyumsuz bir sulu çözeltidir. Hidrofobik bloklar, veziküle ait membranı oluşturacak şekilde bir araya gelme eğilimi gösterirken çözünmüş haldeki hidrofilik bloklar vezikülü stabilize eden membranın dış kısmını oluştururlar. Organik çözücü ile su arasındaki oran kendiliğinden oluşan yapıların morfolojisini etkileyebilir. Bununla birlikte, vezikül oluşumunu desteklemek için, su içeriği genel olarak kritik su konsantrasyonundan daha yüksek olmalıdır. Bu teknikte, artan su oranı ile daha büyük hidrofob-su arayüzey geriliminin bir sonucu olarak, sulu bir ortamın ilavesiyle küresel misellerden silindirik misellere ve son olarak veziküllere geçiş tetiklenmektedir (Shen ve Eisenberg, 1999). Son olarak, organik çözücü, suya karşı diyaliz edilerek ortamdan uzaklaştırılır. Çözücü değişimi yöntemiyle üretilen polimerzomlar, kullanılan kopolimere bağlı olarak, daha dar partikül büyüklüğü dağılımına ulaşmak için sonikasyon ve ekstrüzyon gibi üretim sonrası işlemlerle maruz bırakılabilmektedirler (Axthelm ve ark., 2008).

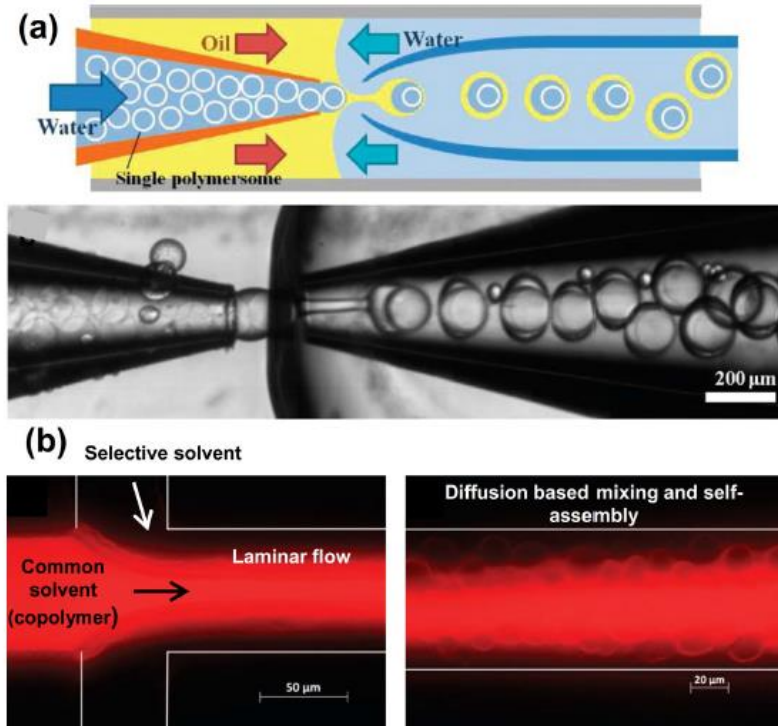


Şekil 1.8. Çözücü değişimi yönteminin şematik gösterilişi.

1.4.1.2. Mikroakışkan Yöntemi

Organik çözücü kullanılan bir diğer polimerzom hazırlama yöntemi ise “Mikroakışkan (Çift Emülsiyon Şablonu) Yöntemi” dir (Şekil 1.9.). Esas olarak mikroakışkan cihazı kanalları içerisinde su içinde yağ içinde su (s/y/s) tipi mikroemülsiyon oluşturma temeline dayanmaktadır (Lorenceanu ve ark., 2005). Prensip olarak, kopolimer bloklarını çözen bir organik çözücü içinde çözünmüş kopolimerin mikroakışkan sistem çipinin mikro kanallarında sulu çözelti ile bir araya gelip çift emülsiyonu oluşturması ve sonrasında da organik çözücünün polimerik çift tabakayı oluşturmak için yapıdan uzaklaştırılması şeklinde özetlenebilir. Bu yöntemde, organik çözücünün seçimi çok önemli bir faktördür. Uygun bir organik çözücü veya bunların bir karışımı, belirli bir buharlaşma hızını karşılayacak şekilde seçilmelidir çünkü böylece oluşan çift emülsiyon buharlaştırma işlemi boyunca dengede kalması istenmektedir (Ho ve ark., 2008). Bununla birlikte, buharlaştırmadan başka, organik fazının çift emülsiyon damlacıklarından manyetik nanopartiküllerin kullanılmasıyla uzaklaştırıldığı yöntemlerde bildirilmiştir (Habault ve ark., 2013). Mikroakışkan yöntemi, çift emülsiyon yaklaşımı ile polimerzom üretimi için son derece hassas bir araçtır. Oluşturulan polimerzomların büyüklük dağılımları ve bileşimi oldukça homojen ve tekrarlanabilir niteliktedir. Bu teknik sayesinde etkin maddeler ve çözücüler doğru seçilirse, % 100 enkapsülasyon etkinliği kolayca elde edilebilir. Bunun nedeni diğer tekniklerde olduğunun aksine, ortaya çıkan yapıların

kendiliğinden oluşum esasına dayanmayan üretim sürecidir. Bununla birlikte, mikroakışkan yönteminin en büyük dezavantajı, şablonun boyut kısıtlamasından dolayı, nanometre ölçeğinde polimerzomların üretilmemesidir. Ancak daha sonra geliştirilen mikroakışkan çiplerde “hidrodinamik akış odaklama” yöntemiyle nanometre büyüklüğünde polimerzomların üretimi gerçekleştirilebilmiştir (Brown ve ark., 2010; Thiele ve ark., 2010). Hidrodinamik akış odaklanmasında, kopolimerin organik çözücündeki çözeltisi ve kopolimer bloklarından birisi için seçici bir çözelti olmak üzere birbirleriyle karışabilen iki sıvı beraber akış halinde olup, difüzyon bağlı karışma ve sonrasında da kendiliğinden oluşum sürecini sağlayan laminar bir akış sağlamaktadırlar. Bu gelişmelere rağmen mikroakışkan yönteminin en büyük problemi hala yüksek verimde polimerzom üretiminin sağlanamamış olmasıdır. Bu problemi aşmak için üretimi paralel hale getirme (Romanowsky ve ark., 2012) üzerinde çalışmalar olsa da, bu çalışmaların yüksek verimde polimerzom üretimi üzerine etkisi henüz gözlemlenmemiştir.



Şekil 1.9. Mikroakışkan teknolojisine ait fotoğraflar. Çift emülsiyon şablonuna dayanan polimerzom üretimi (a) (Ho ve ark., 2008). Hidrodinamik akış odaklı mikroakışkan yöntemiyle polimerzom üretimi (b) (Thiele ve ark., 2010).

1.4.2. Organik Çözücü Kullanılmayan Polimerzom Hazırlama Yöntemleri

1.4.2.1. Film Hidrasyonu Yöntemi

“Film Hidrasyonu Yönteminde” kopolimerler öncelikle bir organik çözücüde çözülürler. Bu çözelti bir vial ya da altı yuvarlak bir balon içerisine konularak organik çözücü uçurulur. Sonrasında, hidrofilik zincir için seçici olan su veya sulu bir tampon film tabakasının üzerine eklenir. Burada polimerzom oluşumunu tetikleyen durum, su içine difüze olan kopolimer fazı ile kopolimere difüze olan su fazı arasındaki konsantrasyon gradyanıdır. Bu gradyan, zamanla orantılı olarak azalmaktadır. Konsantrasyon gradyanı değiştikçe, lameller yapıların tamamen gevşeyerek polimerzomları oluşturmaya zamanı olmayabilir (Battaglia ve Ryan, 2006b). Karşılıklı difüzyonu sağlamak ve konsantrasyon gradyanını sabit tutmak için manyetik karıştırma, vorteks ya da sonikasyon gibi bir harici enerji kaynağı uygulanabilir. Polimerzom oluşumu için kullanılan en yaygın yöntem olan film hidrasyonunda, önceden dökülmüş ince kopolimer filmin mekanik karıştırma altında hidrasyonu bu kinetik engelin üstesinden gelir. Ancak bu yöntemle yaygın büyüklük dağılımına sahip ve metastabil fazları içerebilen bir polimerzom süspansiyonu elde edilir. Bu süspansiyona uygulanacak sonikasyonu takip eden dondur-çöz döngüsü ve sonrasındaki, istenilen por büyüklüğüne sahip ekstrüderden polimerzom süspansiyonunu belirli sayıda geçirme işlemi, partikül büyüklüğünü daraltarak küçültmektedir (Photos ve ark., 2003).

1.4.2.2. Elektroformasyon Yöntemi

Lipozomların elektroformasyonunu (Angelova ve Dimitrov, 1986) adapte eden “elektroformasyon yöntemi”, suyun kopolimere difüzyonunu artıran, bir elektrik alan uygulamasıyla amfifilik kopolimer filminin hidrasyonu esasına dayanmaktadır (James ve ark., 2001). Bu yöntem genellikle tek tabakalı polimerzomların oluşumunu garanti

altına almasına karşın, yüksek miktarda üretime izin vermez ve çoğunlukla deneysel bir araç olarak kabul edilir.

1.4.2.3. Doğrudan Hidrasyon Yöntemi

“Doğrudan Hidrasyon” metodunda, katı haldeki kopolimerin doğrudan su veya sulu tampon çözeltisi içerisinde çöktürülmesi ve takibinde veziküllerin oluşması için kendiliğinden oluşum sürecine izin verilmesi adımları izlenmektedir (O'Neil ve ark., 2009). Sünger fazın, yüksek sıcaklıklarda, hızlı oluşumu ile etkin bir polimerzom üretimi sağlanmıştır. Sonrasında ise karıştırma işlemi ile soğutularak oda sıcaklığına getirilen sisteme aynı sırada, hem kopolimerin hidrofilik kısmı ile uyumlu hem de ortamdaki sulu faz içerisinde çözünebilen diğer bir sulu polimer çözeltisi damla damla eklenmiştir. Amfifilik kopolimerin yavaş hidrasyonu ile Şekil 1.2.'de gösterilen sünger fazından, istenilen disperse haldeki veziküler yapılara geçiş sağlanarak polimerzomlar elde edilmiştir. Bu yöntem hiçbir aşamasında organik çözücü kullanımı içermemektedir. Doğrudan hidrasyonu işleminde kopolimerlerin hidrasyonu, oluşmuş veziküllerin morfolojisini ve boyut dağılımını etkileyebilen, daha uzun süre ve daha yüksek ajitasyon veya karıştırma hızı gerektirmektedir.

1.4.2.4. pH Değişimi Yöntemi

Polimerzomlar, pH duyarlı kopolimerlerin sulu çözeltilerinin pH değeri basit bir şekilde kontrol edilerek hazırlanabilmektedir (Du ve ark., 2005). “pH Değişimi Yönteminde” pH duyarlı kopolimerler öncelikle düşük pH ($\text{pH} \sim 1-2$) değerine sahip sulu bir çözeltide çözülür ve ardından sistemin pH değeri sodyum hidroksit gibi bazik bir maddenin çözeltisinin yavaşça ilavesi ile artırılıp, kopolimerin veziküler yapıları oluşturmaya izin verilir. Bu yöntem sadece pH duyarlı kopolimerlere uygulanabilmektedir.

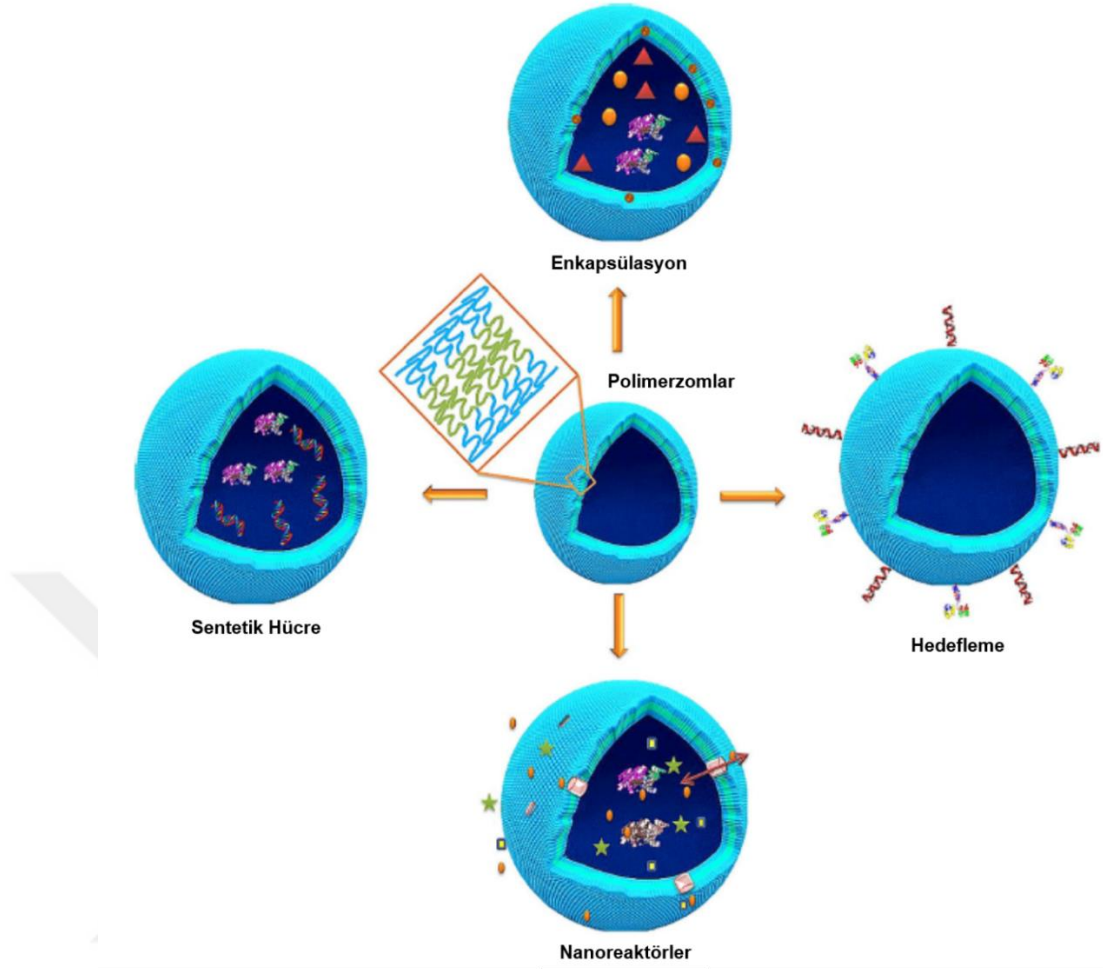
Bu yöntemlerin haricinde, iki farklı yük taşıyan kopolimer karışımının sulu çözelti içerisinde elektrostatik etkileşimler aracılığıyla polimerzom yapılarını oluşturduğu bildirilmiştir (Kishimura ve ark., 2007).

1.4.3. Polimerizasyona Bağlı Kendiliğinden Oluşum

Polimerizasyona bağlı kendiliğinden oluşum (Polymerization Induced Self-Assembly, PISA) (Wan ve ark., 2009), tersinir eklenme-parçalanma zincir transferi (Reversible Addition Fragmentation chain Transfer, RAFT) polimerizasyonu esnasında, polimerizasyon işleminin *in-situ* olarak kendiliğinden oluşan yapıların ortaya çıkmasına izin vermesiyle meydana gelmektedir. RAFT polimerizasyonu için başlatıcılar seçici bir çözücüye ilave edilir ve çözünmeyen blok giderek polimerize edilir, böylece farklı yapıların oluşumu ve geçişine yol açar. Zincir sentezi tamamlanmış bir bloğun, diğer bloğun zincir uzamasında makro başlatıcı olarak kullanılması ve zincir uzaması başlayan bu ikinci bloğun polimerizasyon derecesi kendiliğinden oluşum sürecini yöneterek, ortaya çıkan yapıların morfolojini belirler. Prof. Steven Armes'in grubu 2011 yılında, zwitter iyonik PMPC blok zincirinin, 2-hidroksipropil metakrilat kullanılarak sulu ortamda uzatılmasıyla hidrofobik poli(2-hidroksipropil metakrilat) bloğunun üretimini sağlamışlardır ve böylece *in-situ* olarak kendiliğinden oluşan diblok kopolimer küreleri, solucanları (worms) ya da veziküllerinin oluşumunu tetikleyerek iyi tanımlanmış yapıları elde edilmiştir (Sugihara ve ark., 2011).

1.5. Polimerzomların Uygulama Alanları

Polimerzomlar çoğunlukla medikal alanda, tedavi edici amaçlarla kimyasal etkin madde taşınımı ve hedeflendirilmesinde, gen tedavisinde viral olmayan vektör olarak, vücut / doku / hücre görüntülemelerinde, yapay hücre çalışmaları ve modelinde nanoreaktör olarak veya kendiliğinden çalışan nanomotor (self-propelled nanomotors) uygulamalarında kullanılmaktadır.



Şekil 1.10. Polimerzomların uygulama alanları (Balasubramanian ve ark., 2016).

1.5.1. Kimyasal Etkin Madde / Biyomakromolekül Taşınımı ve Hedeflendirilmesi

1.5.1.1. Kimyasal Etkin Madde Taşınımı

Kimyasal etkin maddelerin *in-vivo* stabilitelerini yükseltmek, etkinlikte artış sağlamak, biyoyararlanımı artırmak, farmakokinetik profili iyileştirmek, salım profilini modifiye etmek gibi nedenlerle polimerzomlar içerisine yüklenebilmektedir. Genel olarak polimerzomlardan kimyasal etkin madde moleküllerinin salım kinetiği, etkin maddenin membrandan difüzyonuna bağlıdır ve bu durumda vezikül lümeni

ile polimerzomu çevreleyen ortam arasındaki konsantrasyon gradyanı aracılığıyla yönetilmektedir. Bununla birlikte, lipitlere kıyasla daha kalın olan polimerik membranlardan difüzyon oldukça sınırlıdır ve dolayısıyla difüzyon ancak membranın bütünlüğünün bozulması veya morfolojik değişiklikleri ile başarılabilmektedir. Poli(laktik asit) (PLA) ve poli(kaprolakton) (PCL) gibi poliester blokları içeren amfifilik kopolimerlerden oluşan polimerzomlar, çoğunlukla bir hidrolitik mekanizma yoluyla bozunmaları nedeniyle, ilaç taşınımı uygulamaları için yaygın şekilde kullanılmaktadırlar. Poli(laktik asit)-*b*-poli(etilen glikol) (PLA-PEG) veya poli(kaprolakton)-*b*-poli(etilen glikol) (PCL-PEG) blok kopolimerlerinin zincir uçlarının hidrolizi, bloğun hidrofobik fraksiyonunun kısılmasına ve dolayısıyla hidrofilik-hidrofobik blok oranının değişmesine neden olur (Ahmed ve Discher, 2004). Bu mekanizma, kopolimerin moleküler şeklinde ve sonuç olarak da veziküllerin morfolojik faz geçişinde değişikliğe neden olur. Bu nedenle, veziküler yapı içerisinde enkapsüle olan hidrofilik veya hidrofobik etkin maddelerin salım profili, blok kopolimerlerin hidrolitik bozunumu ve dolayısıyla agregatların morfolojik faz değişimleriyle yakından ilgilidir (Geng ve Discher, 2006).

Poliesterlerin hidroliz ile bozunması, pH gibi dış koşullardan da etkilenmektedir. Örneğin, asidik pH, hidroliz oranını daha hızlandırıp kopolimerin bozunmasını artırmakta ve dolayısıyla da enkapsüle olmuş etkin maddenin salımının da artmasına neden olur. Ayrıca, biyolojik olarak parçalanmayan kopolimerler (poli(bütadien)-*b*-poli(etilen glikol), PBD-PEG) ve parçalanabilir kopolimerlerin (PLA-PEG veya PCL-PEG) farklı molar oranlarda karışımından üretilmiş polimerzomlardan etkin madde salım oranlarında doğrusal bir artış gözlemlenmiştir (Ahmed ve Discher, 2004). Bununla birlikte, hidrofobik polimerin asit katalizi ile hidrolizi saatler ila günler ve hatta aylarca sürebilmektedir (Guan ve ark., 2015). Polimerzomlardan etkin maddelerin salım oranı, polimerzom membranının permeabilitesine, kopolimerlerin molekül ağırlığına ve hidroliz oranına bağlı olduğu her zaman göz önünde bulundurulmalıdır. Buna bağlı olarak, uygulanan ilaç yüklü polimerzomlardan hızlı bir erken etkin madde salımının sistemik toksisiteye neden olabileceği, buna karşın yavaş salım hızının da etkin maddenin etki alanındaki terapötik etkinliğini engelleyebileceği için polimerzom zarının geçirgenliği, molekül

ağırlığı ve hidroliz oranı, sadece polimerzomlar hedef bölgeye ulaştıktan sonra kontrollü etkin madde salımına izin verecek şekilde tasarlanmalıdır.

Bu açıdan, uyarıcıya duyarlı kopolimerler pH, sıcaklık, ışık, redoks ve manyetik alanlardaki değişiklikler gibi bazı uyarılardan sinyal almak üzere tasarlanır. Bunlar daha sonra polimerzomlara aktarılıp uyarılara cevap verilerek terapötik etkin maddenin salımını tetikler.

Polimerzomların uyarıcıya cevap verme özelliklerini tasarlamak için çeşitli stratejiler geliştirilmiştir ve bunlar şu şekilde gibi özetlenebilir:

- (i) kopolimer zincirinin hidrofobik-hidrofilik dengesinin değiştirilmesi;
- (ii) uyarılara yanıt olarak bir blok kopolimerin çözünürlüğünün değiştirilmesi;
- (iii) terapötik etkin maddenin salımı için polimerzomu çözmek ya da parçalamak;
- (iv) uyarılara karşı kararsız olan kimyasal bağ açılmasının kullanılması ve
- (v) polimerzomların şişmesine veya yıkılmasına yol açmak.

Terapötik maddenin tetiklenmiş salımı, bu maddenin istenilen vücut bölgesindeki spesifik birikimine dayanarak, farmakokinetik ve güvenlik profillerini iyileştiren programlanmış etkin madde salımı sağlar. Bu durum özellikle, kemoterapötik etkin maddeler gibi, dar terapötik pencerele kimyasal etkin maddeler için geçerlidir (Balasubramanian ve ark., 2016).

1.5.1.2. Biyomakromolekül Taşınımı

Protein yapısındaki maddeler kanser, diyabet, kardiyovasküler ve birçok metabolik bozukluklarında dahil olduğu çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılabilen, güçlü terapötik etkiye sahip makromoleküllerdir. Terapötik proteinlerle yapılan tedavi enzimatik bozunma ve böbrek klirensi aracılığıyla hızlı eliminasyon, vücudun farklı bölgelerine spesifik olmayan giriş, immün yanıtın indüklemesi durumu ve hücresel

alım ile ilgili sınırlamalardan dolayı hızla ortadan kaldırılmasından dolayı halen zorlu bir görev olarak değerlendirilmektedir (Torchilin ve Lukyanov, 2003). Bu sorunları gidermek için, terapötik proteinler polimerlere konjuge edilebilmekte, PEG'lenebilmekte ve ayrıca lipozomlara, misellere ve terapötik etki bölgelerine güvenli bir şekilde ulaştırılmalarına yönelik diğer taşıyıcılara yüklenebilmektedirler. Ancak protein taşıyıcılarının kullanımı, hazırlanışlarında organik çözücülerin kullanılmasından kaynaklanan protein denatürasyonu, proteinlerin kimyasal modifikasyonu, düşük protein yüklenmesi ve fizyolojik ortamdaki instabiliteleri gibi bu taşıyıcıları sistemik uygulama için uygun olmayan hale getiren bazı dezavantajları kapsayabilmektedir (Liu ve ark., 2010). Bahsedilen bu çıkmaz noktaların üstesinden gelebilmek için, farklı proteinlerin yüklenmesinde polimerzomlar başarıyla kullanılmıştır.

Polimerzomların sulu lümenine proteinleri yüklemek, sayısız kopolimer ve kompozisyon seçme imkânı ile proteinlere uzatılmış kan dolaşım süreleri ve kontrollü salım profilleri sağlamaktadır. Polimerzomlara, insülin gibi proteinler, süperoksit dismutaz (SOD), yaban turpu peroksidazı (HRP) veya glikoz oksidaz (GOx) gibi büyüme faktörleri veya enzimler enkapsüle edilebilmiştir. Enzim aktivitesinin veziküllerin kapalı sulu bölmesinde daha uzun süre korunması dikkat çekicidir. Ek olarak, kopolimerler ile enzimler arasındaki etkileşim faydalı etkilere sahip olabilir. Polimerzom boyutunun, içerisine yüklenmiş enzimlerin enzimatik aktivitesini de etkilediği bildirilmiştir. Daha küçük veziküllerin daha büyük bir enzim aktivitesi sağladığı gösterilmiştir (Van Dongen ve ark., 2009).

Polimerzomlar ayrıca aşı taşıyıcı araçlar / adjuvanlar olarak da kullanılmaktadır. 2011 yılında yayınlanmış bir çalışmada (Barnier Quer ve ark., 2011), influenza virüsü hemagglütinin antijenini yüklemek için poli(γ -benzil glutamat)-*b*-K (PBLG-K) polimerzomlarının kullanılmasının, enkapsüle olmak yerine vezikül yüzeyine adsorbe olmasına rağmen, viral antijenin *in-vivo* immünojenisitesini artırdığı ortaya çıkmıştır. Poli(etilen glikol)-*bl*-poli(propilen sülfid) (PEG-PPS) esaslı oksidasyona duyarlı polimerzomların, 2009 yılında, dentritik hücre endozomlarına hem antijen hem de adjuvan taşınımı için kullanımı ortaya konulmuştur (Scott ve ark.,

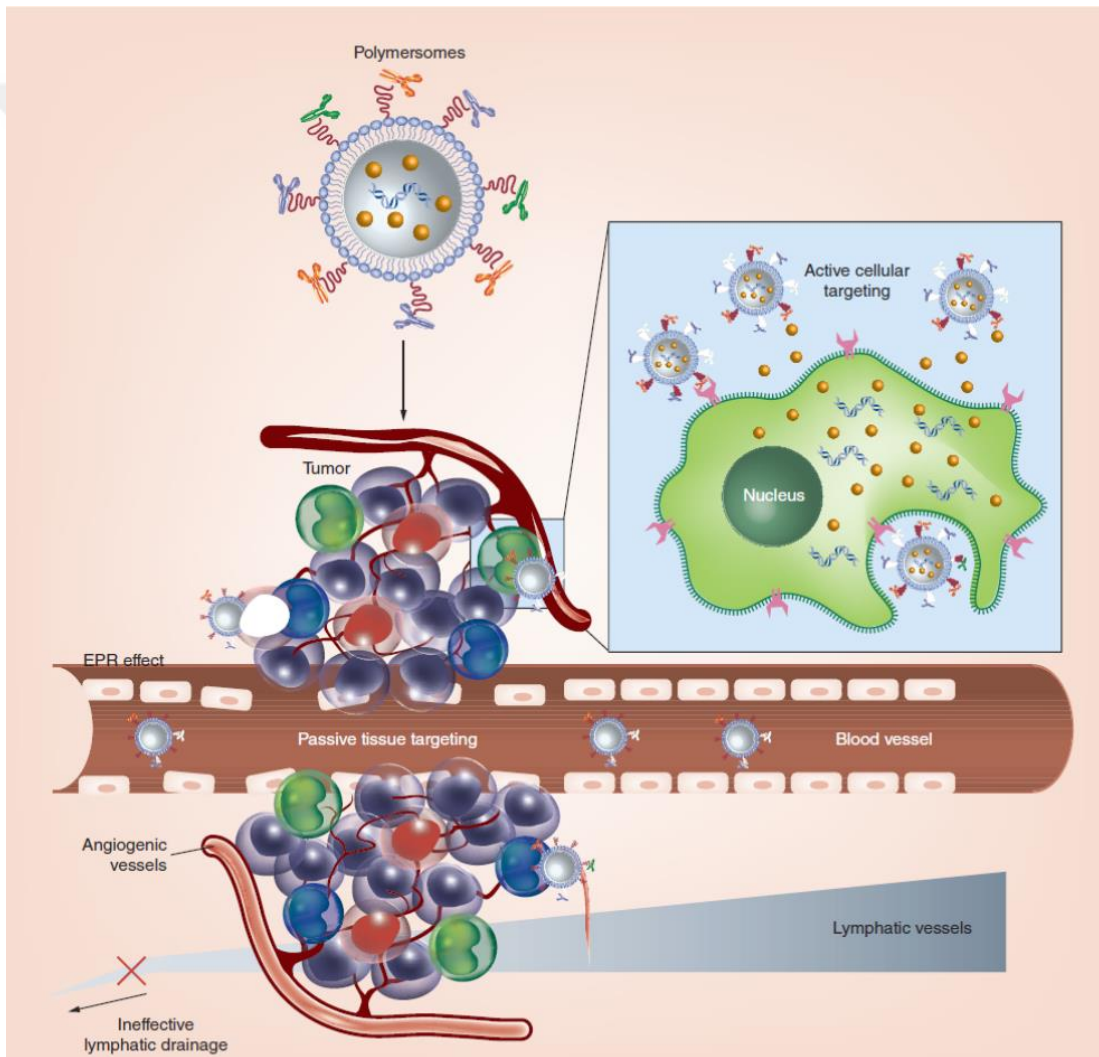
2012). Bu amaçla, toll benzeri reseptör agonisti olan gardikimod enkapsüle edilmiş polimerzomların interlökin-6 ve interlökin-12 sitokin ekspresyonunu 10 kat artırdığı gözlemlenmiştir. Sonuçlar, oksidasyona duyarlı polimerzomların hücre aracılı antijen spesifik bağışıklık yanıtlarını indüklemek için bir aşı taşıyım platformu olarak işlev görebildiğini göstermektedir.

Polimerzomların, yeni oksijen taşıyıcı araçlar olarak kullanımı 2005 yılında ortaya konulmuştur (Arifin ve Palmer, 2005a). PBD-PEG kopolimerinden oluşturulmuş monodispers polimerzomlar film hidrasyonu yöntemi ile üretilerek içerilerine, oksijen taşıyımından sorumlu protein olan hemoglobin yüklenmiştir. Bu çalışmada, PEG ile edilmiş lipozomlara kıyasla, daha küçük ortalama partikül büyüklüğüne sahip polimerzomların daha yüksek konsantrasyonda hemoglobin taşıyabildiği ifade edilmiştir. Polimerzom içerisine alınacak oksijenin, yani oksijen bağlama kapasitesinin ise kopolimer membranın kalınlığı ile ilişkili olduğu ifade edilmiştir. Ayrıca doğal fosfolipitler ile üretilmiş lipozomlara kıyasla polimerzomların, hemoglobin oksidasyonunu tetikleyip artırmadığı gözlemlenmiştir. Aynı grubun 2008 yılında (Rameez ve ark., 2008) yayınladığı bilgilerde ise hemoglobin taşıyan PEG-PLA / PEG-PCL bazlı polimerzomların iskemik dokuları oksijence zenginleştirebileceği sonucuna varılmıştır.

1.5.1.3. Polimerzomların Hedeflendirilmesi

Polimerzomlar, kimyasal etkin maddeler / biyomakromoleküllerin terapötik etkilerini arttırmak ve toksisitelerini azaltmak için, farklı aktif hedefleme mekanizmaları vasıtasıyla terapötik kargonun spesifik dokulara veya hücrelere taşıyımını amacıyla, küçük moleküllerden (Pang ve ark., 2011) polisakkaritlere (Huang ve ark., 2012), antikorlara (Lee ve ark., 2011), peptitlere (Pangburn ve ark., 2012), proteinlere (Egli ve ark., 2011) veya bunların kombinasyonuna (Chen ve ark., 2014; Robbins ve ark., 2010) kadar değişen farklı hedefleme ligandları ile işlevsel hale getirilebilmektedir. Bu anlamda, farklı patolojik durumlar için spesifik olan hücresel reseptörleri veya sinyal yollarını tanımak ve etkileşimde bulunmak için hedeflenmiş

polimerzomlar tasarlanmıştır. Bunun haricinde özellikle kanser teşhisli hastalardaki tümör gelişen bölgelerdeki vasküler damar yapısının bozulması ve bu bozuk endotel aracılığıyla tümör dokusunda nanopartiküllerin birikim durumu (Artırılmış Geçirgenlik ve Alıkoyma, Enhanced Permeation and Retention, EPR), pasif hedeflendirme olarak adlandırılmaktadır (Şekil 1.11). Dikkat çeken uygulamalar hâlihazırda mevcut olan kemoterapinin iyileştirilmesi ve kanser hedeflemesine yönelik olmakla birlikte, nörodejeneratif bozukluklar, iltihaplanma ve işitme kaybı dâhil diğer bazı hastalıkları hedeflemek için de polimerzomların kullanımı araştırılmıştır.



Şekil 1.11. Hedeflendirilmiş polimerzomların tümör bölgelerinde EPR etkisinin aracılığıyla pasif hedeflendirilmesi (Guan ve ark., 2015).

Polimerzomların yüzeyini, çeşitli bağlanma kimyası stratejileri kullanılarak, hedefleyici gruplar / moleküller ile işlevselleştirmek için iki genel yaklaşım kullanılmaktadır. Bunlardan ilki hedefleyici ligandın kopolimere, kendiliğinden oluşum süreci ile polimerzom yapısı üretilmeden önce bağlanmasıdır. İkinci strateji ise hâlihazırda üretilmiş polimerzomların yüzeyini hedefleyici ligandlar ile işlevselleştirmektir. Konjugasyon yolunun seçimi, genellikle, bağlanacak hedefleme grubun fizikokimyasal özelliklerine bağlıdır. Küçük moleküller ve peptitler de dâhil olmak üzere küçük ligandlar ile polimerzomların dekorasyonu, her iki yaklaşımı kullanarak mümkün görünsede, genellikle proteinler veya antikorlar gibi daha büyük biyomoleküllerle işlevselleştirme tercihen polimerzomların sulu ortamda kendiliğinden oluşmasından sonra gerçekleştirilir. Bu gerçek, sadece bu blok kopolimerleri çözündürmek için rutin olarak kullanılan organik çözücülerdeki biyomakromoleküllerin konformasyonel katlanma durumlarına değil aynı zamanda bu büyük ligandlar önceden bağlantılı olduğu zaman polimerzomların oluşumunda kendiliğinden oluşma sürecini düzenleyen parametrelerden polimerik blokların hidrofilik / hidrofobik dengesinin ve yükünün değiştirilmesine de dayanmaktadır. Dahası, yukarıda belirtilen konjugasyon stratejilerinin her biri avantaj ve dezavantajları da beraberinde getirmektedir. Vezikül oluşumundan önce hedefleyici ligandların kopolimer molekülleri ile reaksiyonu, elde edilen konjugatların kimyasal karakterizasyonu ve reaksiyon veriminin tayinine olanak sağlar. Bu bilgi kendiliğinden oluşma işlemi sırasında, hedefleyici ligandlar ile konjuge edilmiş ve konjuge edilmemiş kopolimer blokları arasındaki oranı kontrol etmek ve sonuç olarak polimerzom yüzeyindeki ligand yoğunluğunu hassas bir şekilde ayarlamak için kullanılabilir. Buna karşın, kendiliğinden oluşum işlemi sonrasında gerçekleştirilen polimerzom yüzeyinin işlevselleştirilmesi, nihai nano-yapıların saflaştırılması ve kimyasal karakterizasyonu ile ilgili bazı kısıtlamaları ortaya koymaktadır.

2011 yılında, tümörlerde aşırı eksprese olan epidermal büyüme faktörü reseptörünü (EGFR) hedeflemek için kombine hedeflenmiş polimerzomlara dayalı bir sistem geliştirilmiştir (Lee ve ark., 2011). PDLLA-PEG blok kopolimeri, bu bloklar arasındaki bir bağlantı olarak, lizozomal enzim katepsin B (Cath B) ile ayrılabilir bir peptit sekansı (Gly-Phe-Leu-Gly-Phe, GFLGF) ile tasarlanmıştır. Bir anti-EGFR

antikoru, lizozomal enzim ile parçalanabilir polimerzomların yüzeyine konjuge edilip, blok kopolimer birimleri arasındaki bağlayıcı peptidin, Cath B enzimi aracılığıyla bölündüğü gösterilmiştir. SKBR3 hücreleri ile yapılan *in-vitro* deneyler, anti-EGFR antikoru ile konjuge polimerzomların hücresel alımlarının, hedeflendirilmemiş muadillerine kıyasla daha yüksek olduğunu ortaya konulmuştur.

Yakın zamanda yayınlanan diğer bir araştırmada, beyin kanseri hedeflemesi için des-oktanoil grelin (ghrelin) ve folat ile dekore edilmiş, doksorubisin yüklenmiş polimerzomların etkinliği gösterilmiştir (Chen ve ark., 2014). Yazarlar, des-oktanoil grelin ve folat konjuge edilmiş poli(etilen glikol-*g*-glutamat)-*ko*-poli(distearin-*g*-glutamat) (folat-PEGGM-PDSGM ve des-oktanoil-PEGGM-PDSGM) kopolimer kombinasyonlarını kullanarak doksorubisin yüklenmiş polimerzomları hazırlamışlardır. Penetre edici ligand olarak işlev gören des-oktanoil grelin, polimerzomların kan beyin bariyeri (BBB) yoluyla beyine taşınmasını sağlamış ve folat ise glioma hücreleri için kanser hücresi hedefleme ligandı olarak kullanılmıştır. *In-vitro* ve *in-vivo* deneyler, doksorubisin yüklü polimerzomların hem des-oktanoil grelin hem de folat ile dekore edildiğinde, hedeflendirilmemiş eşdeğerlerine kıyasla, BBB'den geçişi ve glioma büyümesinin engellenmesini önemli ölçüde artırdığını göstermiştir.

2012 yılında, ilaçların iç kulağa kontrollü olarak verilmesini ve hedef alınmasını sağlayan, sinirsel işitme kaybını etkili bir şekilde tedavi etmeyi sağlayan yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesi için güncel bir ihtiyaca yönelik polimerzom esaslı yeni bir strateji geliştirilmiştir (Zhang ve ark., 2012). Bununla ilgili olarak, PCL-PEG polimerzomları, spesifik olarak spiral gangliyon hücrelerinde ve kohlear sinirde ifade edilen GT1b reseptörlerini hedef alan Tet-1 peptidi ile fonksiyonelize edilmiştir. Hem hedeflendirilmiş hem de hedeflendirilmemiş polimerzomlar sıçanlara kokleostomi (iç kulağa pençe açılması) ile verilmiştir. Kokleostomi ile uygulandığında yapıldığında, hem spiral gangliyon sinirleri hem de nörofilamentler içinde, hedeflendirilmiş ve hedeflendirilmemiş nano-taşıyıcıların önemli ve benzer bir birikimi gözlemlenmiştir. Tet-1 peptidi aracılığıyla hedeflendirilmiş polimerzomlar hedeflendirilmemiş muadillerine kıyasla, gangliyon hücrelerinin aksonal bölümünde

daha yüksek birikim sergilemiştir. Bu nedenle de aksonal hedefleme ve ilaç verme uygulamaları için Tet-1 ile dekore edilmiş nano-taşıyıcıları kullanmanın mümkün olduğu ifade edilmiştir.

1.5.2. Gen Terapisi Amaçlı Viral Olmayan Vektör / Sentetik Virüs Olarak Polimerzom Kullanımı

Uluslararası insan genomu projesinin sonuçları, genetik mühendisliği ve gen tedavisi yöntemleri ile birçok hastalığın iyileştirilebilmesi ihtimalini ortaya çıkartmıştır. Hâlihazırda 4000'den fazla genetik kaynaklı insan hastalığı olduğu bilinmektedir ve pratik olarak da her hastalık genetik faktörlerden temelde etkilendiği için, gen tedavisinin insanoğlunun hastalıklara kalıcı bir çözüm bulabilmesi açısından gen tedavisi çok önem taşımaktadır. Bu amaçla genler, eksik veya kusurlu bir genin yerini almak veya arızalı bir bloğu bloke etmek için hücrelere dâhil edilir.

Gen tedavisinde günümüzde genellikle genetik olarak modifiye edilmiş adenovirüsler ve/veya retrovirüsler kullanılmaktadır. Gen tedavisinde kullanılan modifiye edilmiş virüsler “viral vektörler” olarak anılmaktadır. Örneğin kistik fibrozda, kusurlu geni değiştirmek için DNA'nın hedef hücrelerdeki belirli bölgelere yerleştirildiği gen tedavisi ürünleri bulunmaktadır. Virüsler, genomlarını yaşam döngüsünün bir parçası olarak konakçı hücrenin genetik materyaline entegre ederek transfeksiyona neden olur. Viral vektörler ile genetik tedavinin dezavantajlarını yüksek antijen reaksiyonu, vahşi tip virüslerle rekombinasyon riski ve viral vektörlerin neden olduğu hücre hasarı oluşturmaktadır. Bu nedenle bilim insanları, modern fermantasyon teknolojisi ile üretilebilen ve konak hücrede bağımsız olarak çoğalabilen küçük, dairesel ekstra kromozomal DNA molekülleri olan plazmid DNA'nın (pDNA) kullanıldığı, viral olmayan (viral olmayan vektörler) gen aktarım sistemleri arayışı içerisine girmişlerdir. Bununla birlikte, viral olmayan vektörler ile aktarılan genlerin geçici ifadesi ve düşük transfeksiyon etkinliği bu sistemlerde karşılaşılan iki büyük zorluk olarak kalmaktadır. Geleneksel olarak, bu vektörler, lipidik (lipopleksler), polimerik (polipleksler) veya her ikisinin bir kombinasyonu (lipopoli-kompleksler)

olabilen, katyonik bir taşıyıcı ile kompleksleşmiş negatif yüklü bir genetik materyali (yani DNA, siRNA vb.) kapsamaktadır. Bu açıdan, sulu lümeninin yüksek yükleme kapasitesi ve lipidik taşıyıcı sistemlere kıyasla membranının sızdırmazlığı açısından sağlamlıklarına bağlı olarak çeşitli kopolimerlerden oluşan polimerzomlar hayli ilgi çekici gen tedavi vektörü olarak ortaya çıkmaktadır. Bununla birlikte, etkin bir gen transfeksiyonu elde etmek için, enkapsüle edilmiş genetik materyalin kontrollü salınmasını da sağlanmaktadır.

Battaglia araştırma grubu, pDNA'nın yapısı bozulmadan PDPA bazlı polimerzomlar ile enkapsülasyonunu ve taşınmasını detaylı olarak göstermiş ve pDNA yüklü polimerzomların piyasada bulunan transfeksiyon ürünleri ile kıyaslamalı olarak çeşitli hücre hatları üzerindeki transfeksiyon etkinliklerini değerlendirmiştir. Grubun 2007 yılındaki çalışmasında, poli(2-(metakriloiloksi)etil fosforilkolin)₂₅-ko-poli(2-(diisopropilamino)etil metakrilat)₇₀ (PMPC₂₅-PDPA₇₀) polimerzomlarının transfeksiyon aracı olarak kullanımı test edilmiştir. (Lomas ve ark., 2007). Bu amaçla, insan derisi fibroblast (HDF) hücreleri ile çin hamster'ı yumurtalık (CHO) hücreleri üzerinde yaptıkları transfeksiyon çalışmalarında PMPC₂₅-PDPA₇₀ polimerzomlarının, lipofektamin / kalsiyum fosfat partikülleri gibi piyasada kullanılan ürünlere göre daha yüksek transfeksiyon etkinliği gösterdiğini saptamışlardır. Aynı grubun 2010 yılında yayınlanmış çalışması ise (Lomas ve ark., 2010), PDPA blok uzunluğunun pDNA'ya bağlanma afinitesi ve enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisi değerlendirilmiş olup, PMPC₂₅-PDPA₇₀ polimerzomlarına % 50-60 oranında pDNA'nın başarıyla yüklendiği belirtilmiştir. PDPA bloğunun pH hassasiyeti, tersiyer amin gruplarının fizyolojik ortamdaki 6,2 olan pK_a değeri altındaki pH değerlerinde protonlanması sonucunda, bu blok kopolimerlerinin endositik pH'daki nükleik asitler ile elektrostatik etkileşimini sağladığı vurgulanmıştır. PDPA bloğunun bu özelliği, polimerzomlara yüklenen genetik materyalin sitozole salınmasını da beraberinde getirmektedir. Hücre içine endositoz ile alınan polimerzomlar öncelikle endozomal membran ile çevrelenirler ve daha sonra erken endozomlar yoluyla sitozolik yolculuk başlar. Bu arada, erken endozomların lümeninin asitliği (pH ~ 6), polimerzomların hızla parçalanmasını sağlar (PDPA pK_a = 6,2). Fizyolojik ortamın tuz konsantrasyonuna ek olarak, bir vezikülün monomer bloklarına ayrılmasından kaynaklanan tür sayısındaki çarpıcı artış, ozmotik

bir şok oluşturur. Bu durum, endozomal membranın geçici olarak parçalanmasına ve ardından sitoplazma içine herhangi bir enkapsüle olmuş genin salımına neden olmaktadır (Tian ve ark., 2015). Literatürdeki gen taşıyıcı vektörlerinin birçoğu, PDPA bazlı polimerzomların aksine, nükleik asidi vektörden serbest bırakmak için endozomal pH da bozunabilir bağların kullanımını ve / veya endositik yoldan kurtulabilmek için endo-ozmotik ajanların kullanımını gerektirmektedir. Bu nedenlerden dolayı, PDPA esaslı polimerzomların hücre içerisine ilaç / gen / biyomakromolekül taşınımında kullanımı hayli umut verici bir yaklaşım olarak değerlendirilmektedir.

Viral olmayan diğer bir gen taşıyıcı sistem, poli (amino asit) bazlı amfifilik triblok kopolimerlerinin kendiliğinden oluşum süreci ile geliştirilmiştir (Brown ve ark., 2000). Bu kopolimerler hem metoksi poli (etilen glikol)'ün (mPEG) hem de palmitik asidin hidrofobik kısmının, bir poli-*l*-lisin veya poli-*l*-ornitin polimer zincirlerine konjuge edilmesi ile üretilmiştir. Polimerzomların kendiliğinden oluşum süreciyle oluşması bu üç bileşenin belirli bir oranda bulunmasıyla gerçekleşmiş ve polimer: DNA oranı da gen vektörlerinin yüzeyini belirleyen faktör olarak bulunmuştur. Bu gen taşıyıcı sistem, kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında, iki farklı hücre hattında üstün DNA transfeksiyonu sunmuştur. Dahası, DNA enkapsüle edilmiş kısmen anyonik polimerzomlar, benzer DNA-polimer konjugatlarına kıyasla daha az sitotoksikite ile karaciğer ve akciğerlerde başarılı bir *in-vivo* gen aktarımı göstermiştir (Brown ve ark., 2003).

A ve C nükleer proteinleri (lamin A / C) için sorumlu olan geni susturan siRNA ve antisens oligonükleotidleri (AON), PLA-PEG polimerzomları (OLA olarak adlandırılır) içine sırasıyla % 30 ve % 20 enkapsülasyon etkinliği ile enkapsüle edilmiştir (Christian ve ark., 2009). Dahası, A549 hücrelerinde siRNA yüklü OLA'nın *in-vitro* inkübasyonu, etkili gen transfeksiyonunu ve sonuç olarak Lipofectamine 2000 için elde edilen seviyeye kıyasla 72 saat sonra lamin A / C'nin yaklaşık % 40 susturulmasıyla sonuçlanmıştır. Yine de, her iki vektörün *in vivo* olarak uygulanması göz önüne alındığında, siRNA içeren polimerzomların PEG'lenmiş nötr yüzeyi, bilinen

uzun sistemik dolaşım süreleri ve üstün biyouyumluluk özelliklerinden ötürü lipopleks ve polipeptit gibi alternatiflerine açık bir avantaj oluşturmaktadır.

1.5.3. Polimerzomların Görüntüleme Alanında Kullanımı

Mükemmel bir kargo taşıyıcı sistem olan polimerzomların görüntüleme uygulamaları için de hayli kullanışlı sistemler olduğu, son araştırmalar ışığında yayınlanan makaleler ile ortaya çıkmaktadır. Örnek olarak, Peter Ghoroghchian ve ark. kısa süre önce poli(etilen oksit)-*b*-poli (ϵ -kaprolakton) (PEO-*b*-PCL) ve poli(etilen oksit)-*b*-poli(γ -metil- ϵ -kaprolakton) (PEO-*b*-PMCL) kopolimerlerinden hareketle özel ışık absorblayıcı özelliklere sahip polimerzomlar oluşturmayı başarmışlardır (Ghoroghchian ve ark., 2007). Bu, polimerik membrana porfirin esaslı floresans veren maddelerin dahil edilmesiyle elde edilebilmektedir. Ortaya çıkan son yapı, görünür bölgeden kızılötesi bölgesine kadar, kuantum noktacıklarına benzer optik özellikler göstermektedir. Bu çalışmalar, poli(etilen oksit)-*b*-poli(etil etilen) (PEO-*b*-PEE) kopolimeri uygulamalarına da yansıtılmıştır. Hücresel alımı artıran bir peptit ile konjuge edilmiş NearInfraRed polimerzomları (NIRpolimerzomları), bu optik problemlerle gelecekteki dendritik hücre izlemede etkin hücre içi taşınımı sağlamak için Christian ve ark. tarafından kullanılmıştır (Christian ve ark., 2007).

Benzer bir amaçla, PMPC-PDPA polimerzomları aracılığıyla floroforların taşınımı Battaglia araştırma grubu tarafından incelenmiştir (Massignani ve ark., 2010). Detayına bakıldığında, amfifilik floresan molekülleri polimerzom membranının içinde olacak şekilde formüle edilmiş ve sitotoksik / immünojenik olmayan bir hücresel takip sistemi üretmek için hücre içine taşınmıştır. Dolayısıyla, bu tür floroforlar ile yüklü polimerzomlar, "nanometre boyutundaki görüntüleme ajanları" olarak kullanılmak için umut vadeden adaylardır (Duncan ve ark., 2008). Floroforların polimerzomlar içine enkapsülasyonuna ilaveten bu taşıyıcının görüntüleme alanında kullanım potansiyeli, gözenekli PEO-PBD polimerzomları içine manyetik rezonans (MR) kontrast ajanlarının enkapsüle edilmesiyle, Cheng ve Tsourkas tarafından yürütülen araştırmalarda örneklenmiştir (Cheng ve Tsourkas, 2008). Polimerzomlar, 1-palmitoil-

2-oleoil-sn-glisero-3-fosfokolin (POPC) fosfolipidi ile PEO-PBD blok kopolimerinin 85:15 molar oranındaki karışımından hareketle film hidrasyonu yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır. Bir dendrimere kovalan olarak tutturulmuş şelat halindeki gadolinyum (Gd), polimerzom lümeni içine yüklenmiş ve daha sonra polimerzom membranının stabilitesini arttırmak için bir kimyasal başlatıcı eklenerek serbest radikal polimerizasyonu ile diblok kopolimerin çapraz bağlanması sağlanmıştır. Triton X-100 gibi bir sürfaktan ilave edildikten sonra, polimerzom membranından fosfolipit bileşeni uzaklaştırılmış ve suyun kolay akışı için membran içerisine delikler oluşturulmuştur. Görüntüleme amacıyla Gd iyonları tarafından sağlanan sinyalin kuvveti, Gd'ye bağlı su molekülleri ile bunları çevreleyen su arasındaki hızlı değişim kinetiklerine bağlıdır ve bu durum da polimerzom membranındaki gözeneklerin varlığı ile kolaylaştırılmıştır (Cheng ve Tsourkas, 2008). Polimerzom membranındaki gözeneklerden olası kaçış, Gd şelatlarının dendrimerler ile konjugasyonu ile engellenmiştir. Polimerzom içerisine enkapsüle edilmiş Gd serbest Gd'ye kıyasla, Gd iyonları tarafından üretilen sinyal yoğunluğunu büyük ölçüde artırma avantajına sahiptir, çünkü ortalama her bir polimerzom içerisine neredeyse 44000 Gd iyonu yüklenmiştir.

Benzer bir şekilde Yang ve ark., amfifilik folat-poli(etilen glikol)-poli (D,L-laktit) (folat-PEG-PDLLA) ve NH₂-PEG-PDLLA kopolimerlerinin ikili karışımını kullanarak, hidrofilik süperparamanyetik demir oksit nanopartikülleri (SPIONs) yüklü polimerzomları çift emülsiyon yoluyla elde etmişlerdir (Yang ve ark., 2009). Sonuçlar, enkapsülasyonun, SPION partiküllerinin yüksek bir yükleme seviyesine ve ardından sulu çekirdeğin içinde kümelenmesine imkân verdiğini göstermektedir. Bu veriler, kanser teşhisi ve tedavisi için etkili bir kontrast probunun ortaya çıkarıldığını göstermektedir.

PEO-PBD kopolimerlerinin başka bir görüntüleme uygulaması, polimerzom membranı içindeki kuantum noktacıklarının uygulamasını kapsar ve Maskos araştırma grubu tarafından bulunmuştur (Mueller ve ark., 2009). Kuantum noktacığın nanokristalleri geniş görüntüleme uygulamaları nedeniyle şimdiye kadar büyük oranda incelenmiştir. Kuantum noktacıklarının bu inorganik özellikleri, daha biyoyumlu

olan organik bazlı floroforlara kıyasla biyolojik uygulamalarını sınırlayan hücresel toksisiteye neden olmaktadır (Duncan ve ark., 2008).

1.5.4. Polimerzomların Yapay Hücre / Nanoreaktör Olarak Kullanımı

Sentetik biyoloji, hücre fonksiyonları için gerekli temel biyolojik süreçler (yaşamın kökeni) ve daha derin anlayışlara sahip olmak için heyecan verici potansiyel imkânları sunmaktadır (P. Stano, 2010). Canlı hücrelerden ilham alan bilim insanları, hayatın devamıyla ilgili karmaşık biyolojik süreçleri anlamak için sentetik hücresel yapılar yaratmayı düşünmüşlerdir. Bu sentetik hücresel sistemler, “yapay hücreler / sentetik hücreler” (protocells) olarak isimlendirilmektedir (Dzieciol ve Mann, 2012). Tanım olarak ideal yapay hücreler, bilgi materyallerini (DNA, RNA, Protein) bölümlendirerek yerleştirme, büyüme ve kendini onarma, kendini kopyalama süreci aracılığıyla evrim ve maddelerin/bilgilerin transferi gibi temel hücre fonksiyonlarını gösteren biyotik, abiyotik materyallerden veya bunların kombinasyonundan üretilen sentetik hücre benzeri sistemlerdir (Szostak ve ark., 2001). Yapay hücreler, hücresel işlevleri incelemek veya biyoteknolojik biyoreaktörler / ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılmak üzere biyolojik hücrelerin özelliklerini taklit etmeyi amaçlayan yapay yapılardır. Su bazlı bir bölümde belirli biyolojik süreçler için tasarlanmış sentetik sistemi içeren bu yapay hücreler, dışarı kısım ile iletişim sağlamak için tercihen yarı geçirgen veya seçici olarak geçirgen olması gereken bir membran ile sınırlandırılmıştır. Bu yapay hücrelerden, biyolojik bir süreci istenmeyen dış faktörlerden izole etmek üzere veya biyolojik bir sürecin unsurlarını birbirine yakın tutmak üzere ya da bazı moleküllerin tasarlanan mikro çevreye girip çıkmasını düzenlemek üzere yararlanılmaktadır.

Prensipte ilkel hücreler, karmaşık biyolojik sistemlerden (makinelere) yoksun hücrelerin temel birimleri olup, esas olarak bileşenlerinin kendiliğinden oluşum özelliklerine dayanmaktadır ve hücre iletişimi, büyümesi ve bölünmesi de dâhil olmak üzere temel hücre fonksiyonlarını elde etmek için çevre ile etkileşimdedirler (Hanczyc ve Szostak, 2004). Bu nedenle, kendiliğinden oluşan

veziküler yapılar, ilkel hücrelerin ana bileşenleri oldukları için, yapay hücre geliştirmek için ideal adaydır. Yapısal blokların yağ asitleri, fosfolipitler, protein-polimer konjugatları, polielektrolitler veya polimerler olduğu kendiliğinden oluşu veya mikro faz ayırımına dayanan sentetik hücre modelleri inşası için çeşitli stratejiler araştırılmıştır (örneğin: Kendiliğinden oluşan blok kopolimerler). Yapay hücrelerin oluşumu için, polimerzomlar (Martino ve ark., 2012), kolloidozomlar (Huo ve ark., 2014), koaservatlar (Williams ve ark., 2014), lipit esaslı veziküller (Adamala ve Szostak, 2013), membransız peptit / nükleotid yapay hücreleri (Tang ve ark., 2013), proteinozomlar (Huang ve ark., 2014) ve bunların kombinasyonları (Tang ve ark., 2014; Huang ve ark., 2013) gibi çok çeşitli moleküler oluşumlar uygulanmıştır. Bugüne kadar, rapor edilen model yapay hücre bölmelerinin biyolojik fonksiyonları, (i) bölümlendirilmiş yapay hücreler, (ii) gen ve protein ifade eden yapay hücreler ve (iii) kendiliğinden çalışan motorlar (otonom hareketli nanoreaktörler), olarak sınıflandırılabilir (Balasubramanian ve ark., 2016).

1.5.4.1. Polimerzomların Bölümlendirilmiş Yapay Hücreler Olarak Kullanımı

Biyo-bölümlendirme, çeşitli proteinlerin ve enzimlerin hücrenin işlevleri için gerekli olan çeşitli metabolik (biyokimyasal) reaksiyonları gerçekleştirmek için molekülleri ve sinyalleri kolayca iletebildikleri hücrelerin temel gereksinimidir. Doğanın bölümlendirme stratejisini taklit etmek amacıyla polimerzomlar, iç sulu lümeninde ve polimer membran ile dış kısım arasındaki ara yüzeyde bulunan reaksiyon alanı nedeniyle büyük ilgi görmektedir. Polimerzomlar belirli biyokimyasal reaksiyonlar için proteinleri ve enzimleri belirli bir mikro / nano alana kapatıp, dışarıyla iletilişi sağlamak için de bir membran ile çevreleyebilmektedirler.

Hücrelerin bölümlendirme stratejilerini taklit etmek için geliştirilen model yapay hücreler, polimerzom alanında yaygın olarak incelenen kavramlardan biridir (Palivan ve ark., 2012; Roodbeen ve Van Hest, 2009). Çoğu durumda, bölümlendirme stratejilerini temsil etmek üzere geliştirilen polimerzom esaslı yapay hücreler, nanoreaktörler olarak değerlendirilmektedir. Nanoreaktörlerin kendini onarma ve

kendini kopyalama özelliklerine sahip olmalarına rağmen, hücrelerin bazı biyolojik özelliklerini / işlevlerini taklit edebilmeleri noktalarında yapay hücre tanımını yerine getirdikleri görülmektedir. Bu nedenle, yapay hücreler ile nanoreaktörler eş anlamlı olarak kullanılabilmektedir.

Polimerzom esaslı nanoreaktörler, sulu bölümlerindeki enzimatik reaksiyonları sağlamak için çeşitli enzimleri enkapsüle eden ve bu enzimlerin kopolimer membrandan salımına izin vermeyen polimerzomlardır. Bu şekilde, nanoreaktörlerin tasarımı hassas enzimleri proteolitik bozulmadan korumakta ve aynı zamanda sulu lümendeki katalitik reaksiyonlara veya reaksiyon sonu ürünlerden istenilen bileşiklerin polimerzom dışarısına taşınmasına izin vermektedir. Genel olarak nanoreaktörler, polimerzomların membran geçirgenliğine bağlı olarak iki sınıfa ayrılabilirler: (i) seçici veya yarı geçirgen nanoreaktörler ve (ii) kanal donanımlı nanoreaktörler.

1.5.4.1.1. Nanoreaktör Olarak Seçici ve Yarı Geçirgen Polimerzomlar

Seçici / yarı geçirgen polimerzom nanoreaktörlerde kopolimer membran; oksijen türleri, glukoz, tetrametilbenzidin, pirogallol, glukonolakton ve laktonlar gibi çok küçük moleküllere karşı geçirgendir (Axthelm ve ark., 2008; Tanner ve ark., 2013). Basit oksijen geçirgen nanoreaktörler, PBD-PEO ve PCL-PEO'dan hareketle üretilmiş ve hemoglobin enkapsüle edilmiş polimerzomların kullanımıyla elde edilebilmektedir (Arifin ve Palmer, 2005b; Rameez ve ark., 2008). Bu örneklerden ikincisinde oksijen geçirgenliği, polimerzomların (~ 8 ve 18 nm) artan membran kalınlığı ile % 57'ye kadar düşmüştür. Hemoglobinin enkapsülasyonunun oksijen bağlama kapasitesini değiştirmedigini, ancak nanoreaktörlerin azalmış aktivitesinin esasen sınırlı membran geçirgenliğinden kaynaklandığı belirtilmiştir.

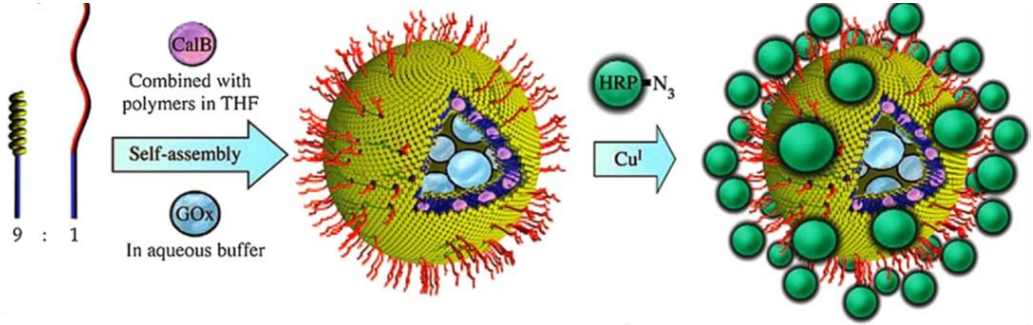
Süper oksit dismutaz (SOD) enkapsüle edilmiş poli(2-metil oksazolin)-*b*-poli(dimetil siloksan)-*b*-poli(2-metil oksazolin) (PMOXA-PDMS-PMOXA) dan oluşan polimerzomlar, antioksidan nanoreaktörler olarak bildirilmiştir (Axthelm ve

ark., 2008). Kopolimer membranın süperoksit radikallerine geçirgen olduğu, böylece hidrojen peroksit halinde detoksifikasyonun sağlandığı gösterilmiştir. Stabilitate ve bozunmaya karşı korumaya ek olarak, enkapsüle edilmiş SOD'un birkaç hafta boyunca etkinliğini koruduğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, nihai ürün olan H₂O₂ hala biyolojik koşullarda zararlı etkilere neden olabilecek bir reaktif oksijen türüdür.

Alternatif bir stratejide hem SOD hem de, peroksidazı taklit eden çifte enzim görevi yapabilen, küçük bir molekül (metal kompleksi) enkapsüle edilmiş benzer PMOXA-PDMS-PMOXA polimerzomlarının kullanımını incelemiştir. Bu yolla süperoksit radikalleri, polimerzom membranına nüfuz ederek öncelikle H₂O₂'ye ve daha sonra toksik olmayan bir nihai ürün olan suya detoksifiye edilebilmektedir (Balasubramanian ve ark., 2011). Bununla birlikte, PMOXA-PDMS-PMOXA membranı, suya geçirgen değildir (Kumar ve ark., 2007) ve bu durum belirli bir süre sonra, bir nihai ürün olarak suyun sürekli birikimi üzerine nanoreaktörlerin ozmolizine yol açabilir. Süperoksit radikallerinin PMOXA-PDMS-PMOXA triblok kopolimer membrandan geçebilmesinin, kopolimerin hidrofobik bölümünün blok uzunluğuna oldukça bağımlı olduğu bildirilmiştir.

Poli(stiren)-*b*-poli(izosiyano alanin (2-tiyofen-3-il-etil) amit) (PS-PIAT) bazlı polimerzomlardan oluşan nanoreaktörleri geliştirmek için GOx, at HRP'si, kloroperoksidaz (CPO) ve kandida antarktika lipaz B (CalB) gibi farklı enzimler kullanılmıştır (de Hoog ve ark., 2009; Kuiper ve ark., 2008; Tanner ve ark., 2013; Van Dongen ve ark., 2009; Vriezema ve ark., 2007). Enzim enkapsüle edilmiş PS-PIAT polimerzomları, enzim reaksiyonları için gerekli olan bir dizi küçük moleküle karşı seçici olarak geçirimlidir. Nanoreaktörlerdeki enzimatik kaskad reaksiyonları, öncelikle ayrı olarak hazırlanmış GOx ve HRP içeren nanoreaktörlerin karıştırılması ile gösterilmiştir. Substratın ve ürünün membrandan geçebilmesi, bu iki farklı nanoreaktör bölmesi arasında başarılı kaskad reaksiyonlarının gerçekleştiğini göstermiştir. Daha karmaşık üç aşamalı kaskad reaksiyonları, ilk enzimin (GOx) polimerzom içine enkapsüle edildiği, ikinci enzimin (CalB) kopolimer membranın yapısına katıldığı ve üçüncü enzimin de (HRP) polimerzom yüzeyine sabitlendiği,

farklı konumlandırılmış üç farklı enzimden oluşan PS-PIAT nanoreaktörleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 1.12) (Van Dongen ve ark., 2009).



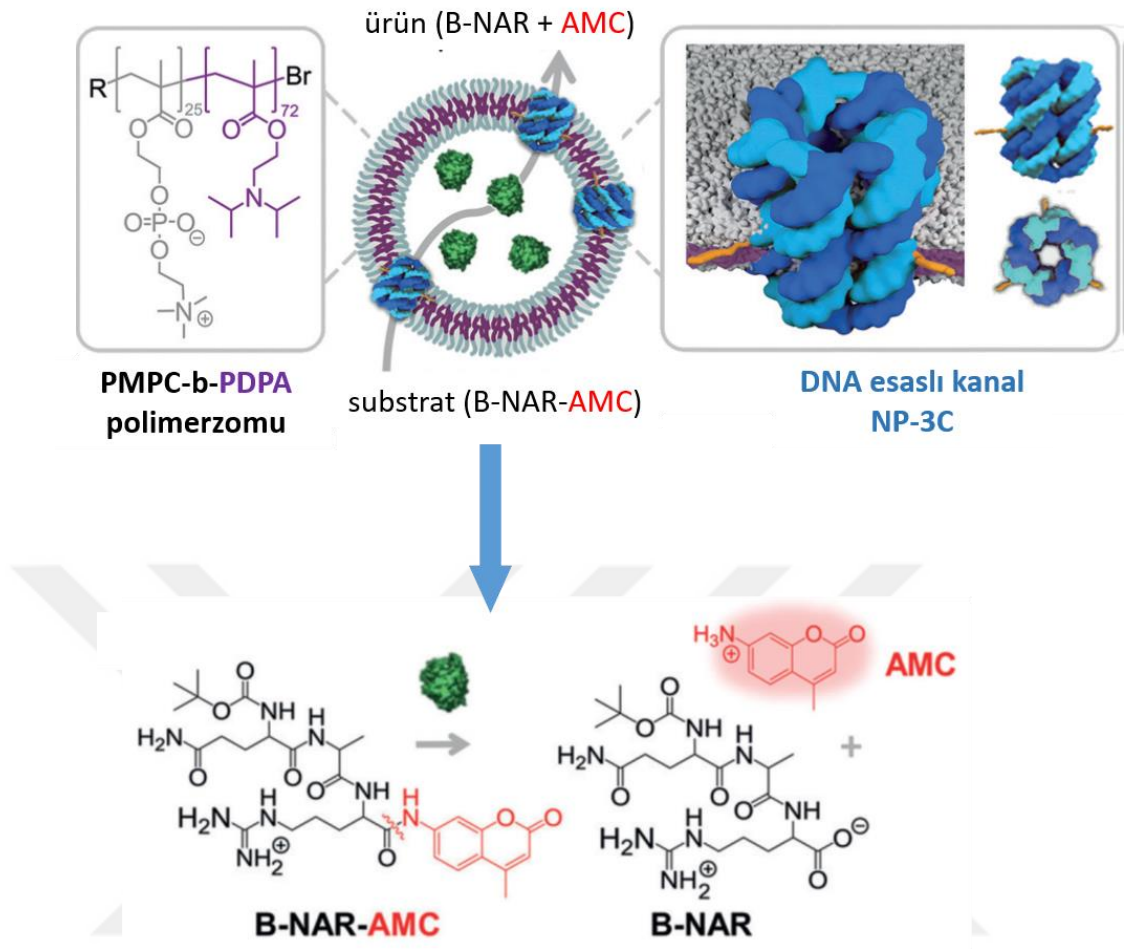
Şekil 1.12. Üç basamaklı kaskad reaksiyonunu gerçekleştirmek amacıyla tasarlanmış PS-PIAT polimerzomları (Van Dongen ve ark., 2009).

Üç aşamalı kaskad şu şekilde gerçekleşmektedir: İlk olarak substrat, yani glikoz asetat, CalB tarafından glikoza dönüştürülür ve daha sonra GOx tarafından oksitlenir. İkinci aşamadaki H_2O_2 reaksiyonunun nihai ürünü de daha sonrasında 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS)'yi, ABTS(+) 'e oksitlemek için kullanılır. İlginç olarak, planlandığı gibi ilk iki enzim reaksiyonu gözlemlenmiş ancak HRP, muhtemelen polimerzomların dış yüzeyindeki konumundan ötürü, genel enzim kinetiğini etkilememiştir. Nanoreaktörlerdeki üç aşamalı basamaklı reaksiyonun enzim aktivitesi, üç enzimin karışımından daha düşük olmasına rağmen, polimerzom membranının substrat geçirgenliği sınırlamaları, enzimlerin polimer bölmelerine hapsedilmesi ve organik çözücünün (tetrahidrofuran) varlığı gibi faktörlerin hepsi enzimatik aktiviteyi etkilemiştir.

1.5.4.1.2. Nanoreaktör Olarak Membranı Kanallar ile Donatılmış Polimerzomlar

Battaglia araştırma grubu tarafından 2016 yılında yapılan çalışmada, seçici geçirgenliğe sahip olan ve 1,5 nm boyutundaki organik moleküllerin taşınmasına izin

veren hibrid nano-taşıyıcılar geliştirilmiştir (Messenger ve ark., 2016). Boyutça büyük enzimlerin (yaklaşık 5 nm), bu veziküllerin içine enkapsüle edilebilip, işlemden sonrada katalitik olarak aktif kalabilecekleri ve bu hibrid yapıların yeni bir enzimatik nanoreaktör türünü oluşturduğu ifade edilmiştir. Araştırmanın temelinde, membran yapısında DNA nano-gözenekleri olan PMPC-PDPA esaslı polimerzomlar geliştirilmesi amaçlanmıştır. Polimerik veziküllerin ve DNA gözeneklerinin amaçlanan hedef doğrultusunda yüksek ayarlanabilirliği; ilaç taşınımı, biyolojik görüntüleme, biyo-kataliz ve yapay hücre uygulamaları için nano-taşıyıcıların hazırlanmasında anahtar olduğu gösterilmiştir. Öncelikle polimerzomlar ve DNA nano-gözenekleri ayrı ayrı hazırlanıp, sonrasında bir arada inkübe edilerek, ortalama her bir polimerzomun 7 DNA nano-gözeneği taşıyacağı şekilde, nano-gözeneklerin polimerzom membranına eklenmesi gerçekleştirilmiştir. Nano-gözenekler ile dekore edilmiş polimerzomların işlevselliği, hibrid taşıyıcıların enzimatik nanoreaktörlere dönüştürülebileceğini gösteren bir enzimatik deneyle gösterilmiştir. Deney, florojenik enzim substratı B-NAR-AMC'nin DNA gözenekleri boyunca taşınması ve polimerzom içerisine enkapsüle edilmiş tripsin ile floresan ürün AMC'ye bölünmesine dayanmaktadır (Şekil 1.13). Enzim substratının uzunluğu 1,5 nm olup yükü pozitifdir ve özellikle 2 nm'lik DNA nano-gözeneğinden geçip geçemeyeceğinin saptanması amacıyla seçilmiştir. Çünkü pozitif yüklü, 1 nm'lik organik moleküllerin gözenek boyunca nüfuz ettiği bilinmektedir. DNA nano-gözeneği taşıyan polimerzomlardaki enzimatik aktivitenin, taşımayanlara oranla 10 kat daha hızlı olduğu belirtilerek hem sistemin başarıyla çalıştığı hem de PMPC-PDPA membranının substrata karşı tamamen geçirimsiz olmadığı bulunmuştur.



Şekil 1.13. DNA nano-gözeneği taşıyan PMPC-PDPA polimerzomlarının şematize ifadesi (Messenger ve ark., 2016).

1.5.4.2. Gen ve Protein İfade Eden Yapay Hücreler

Yapay hücrelerin yaratılmasında önemli olan hücrelerin yaşamı bakımından gerekli olan bilgilendirme bileşiklerini, replikasyon süreci boyunca üretmektir. Hücresinin kendini onarması ve çoğalması için, enzimatik reaksiyonların aracılık ettiği gen (DNA / RNA) ve protein ifade etme yetenekleri, hayati önem taşımaktadır. Çeşitli

sentetik hücresel sistemlerde RNA replikasyonu, DNA çoğaltılması (polimeraz zincir reaksiyonu), DNA transkripsiyonu ve mRNA translasyonu gibi biyolojik işlemleri taklit eden model yapay hücreler farklı araştırma grupları tarafından kapsamlı olarak incelenmiştir (Hammer ve Kamat, 2012; Kamat ve ark., 2011; Li ve ark., 2014; Roodbeen ve Van Hest, 2009; Stano ve Luisi, 2010). Genel olarak protein ekspresyon süreci, bir proteine dönüşen mRNA üretimi ile sonlanan DNA transkripsiyonundan oluşur. Bu işlem, DNA, RNA, nükleotidler, enzimler (polimerazlar), fosfatlar, vb. gibi bileşenlerin bir havuzunu gerektirir. Dolayısıyla, komple bir biyolojik makinelerin tek bir yapay hücreye dâhil edilmesi oldukça karmaşıktır. Bununla birlikte, piyasada bulunan protein sentez kitleri, bu bileşenlerin yapay hücrelere dâhil edilmesini sıradan hale getirmektedir. Ancak, tüm bu maddelerin karışımının geleneksel yöntemlerle enkapsülasyonunda karşılaşılan karmaşıklık, yapay hücreler ile protein sentezinin verimliliğini etkileyen sınırlayıcı faktördür. Alternatif olarak, yüksek enkapsülasyon etkinliğini sağlayan mikroakışkan teknolojisi, enkapsülasyon sürecini kontrol etmek için kullanılmaktadır. Model yapay hücrelerin çoğu, protein sentezi için gerekli biyolojik sisteminin enkapsüle edilmesinden (biyolojik makinenin çalışması için gerekli yem bileşenleri) oluşan bir protein ifade sistemi olarak geliştirilmiştir. Bu sistemin beslenmesinde kullanılan tüm bileşenler protein sentezi için kullanıldıktan sonra, yem bileşenlerinin dışarıya transferine izin vermeyen geçirimsiz sentetik membranlar nedeniyle zamanla protein üretimi doygunluğa ulaşır. Bu nedenle, yapay hücrelere kontrollü membran geçirgenliği kazandırmak, daha uzun süre sürekli protein üretilmesini sağlamaktadır.

Lipozom tabanlı yapay hücreler ile karşılaştırıldığında, gen ekspresyonu ve protein sentezi için polimerzom esaslı yapay hücrelerin geliştirildiği örnek sayısı hayli azdır. 2012 yılında PLA-PEG'den oluşan polimerzomlar içerisine, bakteri membranı ilişkili hücre iskeleti aktin benzeri proteinin (MreB) hücresiz olarak ekspresyonu için gerekli bütün biyolojik gereksinimler (örneğin E. coli'den elde edilmiş ribozomal ekstre ve pDNA) başarıyla enkapsüle edilmiştir (Martino ve ark., 2012). Bu çalışmada, polimerzomlara ilişkin genel bir sınırlama olan polidispers büyüklük dağılımı ve düşük enkapsülasyon etkinliği, % 100 enkapsülasyon etkinliği ile beraber oldukça monodispers polimerzomların edilebildiği mikroakışkan teknolojisi kullanılarak

geliştirilmiştir. Dev boyutlu polimerzomlar (126 μm) içinde MreB-kırmızı floresan proteininin (RFP) birkaç saat içindeki yüksek verimli hücre dışı ifadesi, 32°C'deki floresans ile kanıtlanmıştır. Protein ekspresyon kinetiği, istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir şekilde on adet polimerzoma dayalı olarak gösterilmiştir. Yine de, hassas olarak kontrol edilen ve tekdüze edilmiş enkapsülasyondan ötürü bu polimerzom popülasyonundaki ifade seviyelerinin benzer olduğu kabul edilmiştir. İlginç bir şekilde, yarı geçirgen kopolimer membrandan ötürü, sürekli bir şekilde ozmotik olarak tetiklenen protein salımı gösterilmiştir. Aynı zamanda, ozmotik basınç, polimerzomların iç ve dış tarafları arasında eşitlendiğinde, hidrolitik gözenekler iyileşmeye (kapanmaya) başlamış ve proteinlerin polimerzomlardan tamamıyla serbest bırakılmamasına yol açmıştır.

1.5.4.3. Kendiliğinden Çalışan Motorlar

Hücrelerin otonom hareketi, diğer hücreler ile iletişim kurmak ve kendi aralarında koordine olmak için gerektiği kadar, çevresel değişikliklere tepki olarak, ya belirli bir bölgeye doğru ya da bu bölgeden uzaklaşarak hücre göçünü düzenlemek için de vazgeçilmez bir işlemdir. Bu nedenle, bilim adamları hücre içi ve hücresel motiliteyi anlamak ve otonom olarak hareket eden biyolojik motorlar olarak işlev görebilecek yapay hücreleri tasarlamak için kendiliğinden hareket eden hücrelerin hareketini taklit etmek için çaba göstermektedirler. Ortam sinyallerine cevap olarak herhangi bir dış kuvvet olmadan göç etmeye yönlendirilebilen kendiliğinden hareket özellikleri, tamamıyla sentetik polimerzom esaslı nanoreaktörlerin oluşturulmasında önemli bir adımdır (Balasubramanian ve ark., 2016).

Temel olarak hücresel motilite, hücresel iskelet polimerleri ve motor proteinlerin birleştirilmesi ve ayrılması ile yönetilmektedir. Bu bağlamda sentetik hücresel sistemlerde membran hareketini oluşturmak için aktin filamentleri ve mikrotübüllerin dinamik olarak birleşmesini ve ayrılmasını gösteren az çalışma bulunmaktadır. Örneğin, aktin filamentleri, hücrenin motilitesinde önemli bir rol oynayan membran çıkıntılarına yol açan kuvveti oluşturur (Pollard ve Borisy, 2003).

Daha erken aşamalarda, proteinlerle kaplı polistiren mikroküreler, aktin polimerizasyonunu katalize ederek aktin filamentlerinin simetrik olarak düzenlenmesine yol açmıştır. Bu simetrinin kendiliğinden kırılmasının ardından, mikroküreler tek yönlü hareket göstermiştir (van Oudenaarden ve Theriot, 1999). Lipozomlar içerisindeki aktin polimerizasyonu, yapay hücre hareketliliğinin gelişimi için gerekli olan, hücre iskeletine benzer ağlar oluşturmak için araştırılmıştır (Cortese ve ark., 1989; Stachowiak ve ark., 2009).

Son zamanlarda, membranın ileri doğru itilmesini sağlayan membrandaki aktin polimerizasyonunu taklit etmek için, membranın lamellipodium (Lamellipodium: Hücrenin hareketini sağlayan, yüzeylerindeki aktin proteini içerikli hücre iskeleti uzantısıdır.) uzantısının hücresel mekanizması ile benzer, hücre boyutunda lipozomlar geliştirilmiştir (Lemi re ve ark., 2015).

Otonom hareket, sadece aksiyon polimerizasyonu ve motor proteinler gibi biyolojik ilkeler kullanılarak elde edilmemektedir. Asimetrik ortamlardaki brownian hareketler ve difüzyonel etki gibi tamamen abiyotik fiziksel prensipler, sentetik hücresel sistemlerin hareketliliğini yönlendirmek için itici güç üretmek üzere ayarlanabilmektedir. Yapay hücrelerde yönlendirilmiş hareketi başarmak için iyon gradyanının, çeşitli kimyasal reaksiyonların ve adezyonun kullanımı gibi farklı yaklaşımlar önerilmektedir (Kamat ve ark., 2011).

1.6. Kargo Enkapsülasyon Yöntemleri

Polimerzom esaslı formülasyonlar aracılığıyla taşınabilen kimyasal etkin maddeler, proteinler ve genetik materyaller gibi çeşitli terapötik etkisi olan maddeler “kargo molekülü” olarak adlandırılmaktadır. Kargo molekülü, ya polimerzom oluşturma işlemi sırasında ya da polimerzomlar oluşturulduktan sonra enkapsüle edilebilmektedir.

1.6.1. Polimerzom Oluşumu Esnasında Kargo Enkapsülasyonu

Kargonun enkapsülasyonu polimerzom oluşumundaki iki ana stratejiden yola çıkarak başarılabilmektedir: yığın polimerlerden hareketle (top-down yaklaşım) ya da unimerlerden yani tekli blok kopolimer zincirlerinden hareketle (bottom-up yaklaşım).

İlk geliştirilmiş strateji top-down yaklaşımı olarakta değerlendirilebilen, bir polimer yığınının veya film tabakasının, sulu bir çözeltiyle süspande edilmesidir. Tipik olarak su veya tampon çözeltisi, kayma hızı (örneğin karıştırma), ultrason veya elektrik akımı gibi bir enerji kaynağının varlığında polimerik film tabakasına ilave edilir. Filmin hidrasyonu üzerine polimerik parçacıklar aşamalı olarak ayrılır ve yüksek polimer konsantrasyonunda görülen lameller fazlardan düşük polimer konsantrasyonunda görülen veziküllere kadar değişen fazlar bildirilmiştir (Battaglia ve Ryan, 2006b). Bu işlemi kullanarak suda çözünür bileşikler, bu bileşikleri içeren bir sulu çözeltinin polimerik filmine eklenmesiyle enkapsüle edilebilmektedir. Örneğin, sulu çözelti doksorubisin hidroklorürün polimerzomlar içerisine enkapsüle edilebildiği bildirilmiştir (Colley ve ark., 2014). Diğer yandan hidrofobik bileşiklerin, polimerik film tabakası içine eklenebilmesi için organik bir çözücü içinde kopolimer ile önceden karıştırılmalıdır. Organik çözücülerin kullanımı hassas biyoaktif bileşiklerin enkapsülasyonunda uyumlu olmasa bile, paklitaksel, flutaks veya kamptotesin polimerzom membranı içerisinde enkapsüle edilebilmiştir (Lee ve Feijen, 2012; Li ve ark., 2007; Thambi ve ark., 2012). Bu formülasyonların oda sıcaklığı altında aylarca stabil kaldığı da gösterilmiştir.

Yaygın olarak kullanılan ve bottom-up yaklaşımı olarak değerlendirilen ikinci stratejide ise, kopolimer zincirlerinin tek tek bulunduğu çözeltisinden kendiliğinden oluşum sürecinin tetiklenmesini kapsamaktadır. Genel olarak, kopolimer ilk önce yapısındaki her iki blok için uygun bir çözücü içinde çözülür ve daha sonra bu çözücü sistemi, yalnızca hidrofilik blok için uygun olan bir çözücü ile değiştirilir. Bu değişimin ardından sistemdeki organik çözücü, buharlaştırma veya diyaliz yöntemleri kullanılarak ortamdan uzaklaştırılmaktadır. Bu değişim ya çözücünün başka bir

çözücü ile fiziksel bir değişimi (Zhang ve Eisenberg, 1995) ya da çözücü koşullarındaki (örneğin pH veya sıcaklık) bir değişiklik şeklinde olabilmektedir (Brown ve ark., 2010; Lomas ve ark., 2010). Çözücü değişimi aracılı enkapsülasyondan şimdiye kadar yapılan çalışmalarda hem hidrofobik (örneğin: Lipofilik anti kanser bileşikler) hem de hidrofilik etkin maddeler polimerzomlara enkapsüle edilebilmiştir (Du ve ark., 2012; Van Dongen ve ark., 2009). pH veya sıcaklık değişimi yöntemi kullanıldığında (örneğin pH duyarlı bir kopolimer varsa), formülasyon tüm süreç boyunca sulu bir çözeltide kaldığı için polimerzom oluşumu sırasında DNA ve proteinler gibi suda çözünür bileşiklerin yüksek verimli enkapsülasyonu mümkün olmaktadır (Lomas ve ark., 2007; Matini ve ark., 2014).

Çözücü değişimi ve pH değişimi yöntemleri, bir emülsiyon şablonu kullanılarak daha da geliştirilmiştir. Örneğin, çözücü değişiminin gelişmiş bir versiyonu emülsiyon-santrifüj yöntemiyle polimerzom oluşumunu temel alır. Bu yaklaşımda, membran tabakalı olacak şekilde oluşturulmuştur (Pautot ve ark., 2003). Kısaca, sulu bir sükröz çözeltisi öncelikle blok kopolimer zincirlerini içeren organik bir çözelti ile emülsiyon haline getirilir. Blok kopolimer zincirleri, yağ içinde su ara yüzünü kaplar ve böylece, iç polimerzom katmanı oluşturulur. Bu emülsiyon daha sonra sulu glikoz çözeltisi ve blok kopolimer zincirlerinin organik çözeltisinden oluşan çift fazlı bir karışıma aktarılarak santrifüj edilir ve böylece de dış polimerzom katmanının oluşumu sağlanır. Bu yöntem, stabilitenin kontrol edilmesi ve salım özellikleri açısından zorlayıcı olabilecek, birçok bölmeli yapının tek bir bölme içine enkapsülasyonu imkânı sunmaktadır. Bu stratejiyi kullanan Marguet ve ark., doksorubisin içeren polimerzomları, yüksek enkapsülasyon etkinliği ile dev polimerzomlar (“vezozom” olarakta adlandırılır) içerisine enkapsüle etmeyi başarmıştır (Marguet ve ark., 2012). Böylece doksorubisinin bu dev çoklu kompartımanlardan salımı kontrollü bir şekilde uzatılmıştır.

Çözücü değiştiriminin oldukça gelişmiş bir diğer yolu ise vezikül oluşumunu ve kargo bileşiği enkapsüle etmeyi aynı anda sağlama avantajını sunan mikroakışkan sistemlerdir. Sürekli bir işlem olduğundan endüstriyel ölçekte, partikül büyüklüğü ve tekrarlanabilirlik açısından çok iyi bir kontrol imkanı sunan, polimerzom üretimi

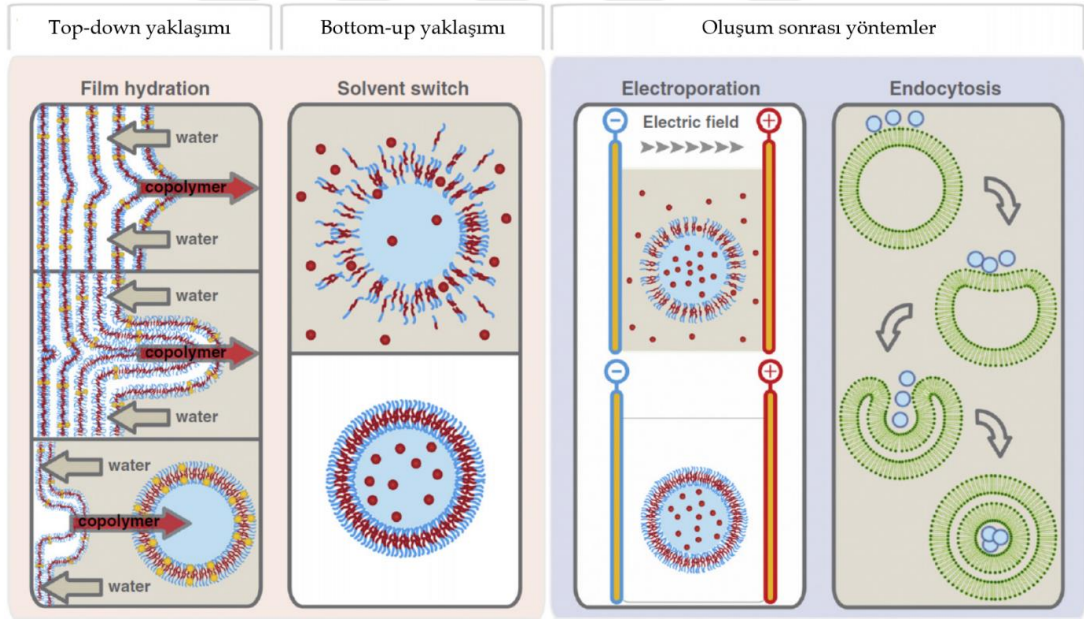
potansiyeli sağlamaktadır. İlk olarak Weitz ve arkadaşları, Förster ile beraber çözücü değişimi yöntemi ile PEG-PLLA polimerzomlarını (Thiele ve ark., 2010) ve Battaglia araştırma grubu ise pH değişimi yöntemi ile PMPC-PDPA polimerzomlarını (Brown ve ark., 2010), mikroakışkan teknolojisini kullanarak elde edebilmişlerdir. Brown ve ark. küçük bir model etkin maddenin (pH indikatörü) ve model bir protein olarak sığır serum albümininin (BSA) (Brown ve ark., 2010), Kim ve ark. ise PEG-PLLA sistemini kullanarak hidrofobik boyaların ve örnek hidrofilik moleküllerin (Kim ve ark., 2011) aynı yöntem ile enkapsülasyonunu göstermişlerdir. Bununla birlikte, mikroakışkan yöntemi kullanılarak polimerzomların içerisine tıbbî uygulamalara yönelik etkin madde enkapsülasyonu üzerinde yoğun çalışma olmayan bir alandır. Bu tekniği kullanmanın bir diğer önemli özelliği, veziküllerin boyutunu 200 nm'den birkaç mikrometreye (dev polimerzomlar) kadar ayarlama yeteneğidir (Kim ve ark., 2013; Thiele, Abate ve ark., 2010). Bu sonuçların ardından Kim ve arkadaşları çapı 5 µm olan vezikülleri, 30 µm'lik dev veziküller içine enkapsüle etmeyi başarmışlardır (Kim ve ark., 2013). Bu yöntemin hücre iskeletinin enkapsülasyonu için potansiyel kullanımı araştırılmıştır (Martino ve ark., 2012).

1.6.2. Polimerzom Oluşumu Sonrasında Kargo Enkapsülasyonu

Kargo bileşikleri polimerzomlara yüklemenin farklı bir yolu önceden oluşturulmuş boş vezikülleri sonradan doldurmaktır. Böyle bir enkapsülasyon sürecinin ilk bildirimi, Discher ve arkadaşları tarafından paklitakselin, bir PEG-PLA polimerzom süspansiyonuna enjekte edilmesi suretiyle yerleştirilmesi şeklindendir (Ahmed ve ark., 2006). Battaglia araştırma grubu, morfolojisini ve boyutunu koruyarak çeşitli biyo(makro)molekülleri (örneğin: Proteinler, DNA, mRNA veya biyoaktif ilaçlar) polimerzomlar içinde enkapsüle etmek için elektroporasyon (elektropermeabilizasyon) işlemini kullanmayı önermiştir (Wang ve ark., 2012). Elektroporasyon, harici moleküllerin hücrelere sokulması için geliştirilmiş olan ve moleküler biyolojide sıklıkla kullanılan bir tekniktir. Bu teknikte temel olarak, elektrik iletkenliğinde sürekli bir artış sağlayan ve dolayısıyla membranın geçirgenliğini

arttıran harici bir elektrik alanı uygulanmaktadır (Ho ve Mittal, 1996; Neumann ve ark., 1982).

Etkin maddeleri polimerzomlar içerisine enkapsüle etmek için fiziksel olarak yönlendirilmiş yolların yanı sıra, doğada hücrelerin molekülleri nasıl aldığına ilişkin yollara da bakmak gerekmektedir. Bu bağlamda, bir membranla çevrili bölme içine enkapsülasyondan oluşan bir endositoz tarafından yönlendirilen mekanizma, ilgi konusu haline gelmiştir. Kroeger ve ark. PDMS-PMOXA polimerzomlarını kullanarak bu prensibi taklit etmeye çalışmıştır (Jaskiewicz ve ark., 2012). Çalışmalarına göre, küçük polistiren veya silisyum dioksit nanopartikülleri, bir eğriliği zorlayacak ve daha sonra bir endositoz benzeri verim sağlayacak şekilde membran ile etkileşime geçebilmektedirler. Sonuç olarak nanopartiküller iki katmanla çevrelenip enkapsüle edilerek küçük polimerzomlar elde edilmiştir (Jaskiewicz ve ark., 2012).

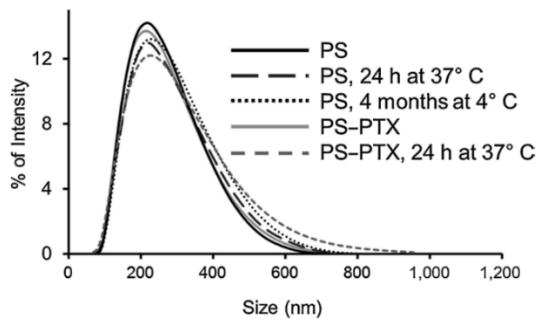


Şekil 1.14. Kargo bileşiklerin polimerzomlar içerisine enkapsüle edilme yöntemlerinin şematize edilmiş hali (Messenger ve ark., 2014).

1.7. Polimerzomların Stabilitesi

Polimerzom esaslı kargo taşıyıcı sistemlerin, özellikle alternatifi olarak görüldükleri lipozomlara göre en büyük üstünlükleri kolloidal stabilitelerinin daha iyi olması ve içerisindeki kargo bileşiği zamanla sızdırma dezavantajını göstermemeleridir. Bu üstün özelliklerin esasında temel nedeni lipozomlardaki lipidik membranlara (3-5 nm) kıyasla polimerzomların polimerik membranlarının (3-15 nm) daha kalın olmalarıdır. Bu durumun en büyük nedeni ise bilim adamlarının gelişen polimerizasyon teknikleri üzerindeki artan kontrolüdür ve hedeflenen veziküler yapının elde edilmesine yönelik olarak, lipitlere göre çok daha büyük uzunluklarda kopolimerik zincirlerin üretilebilir olmasıdır.

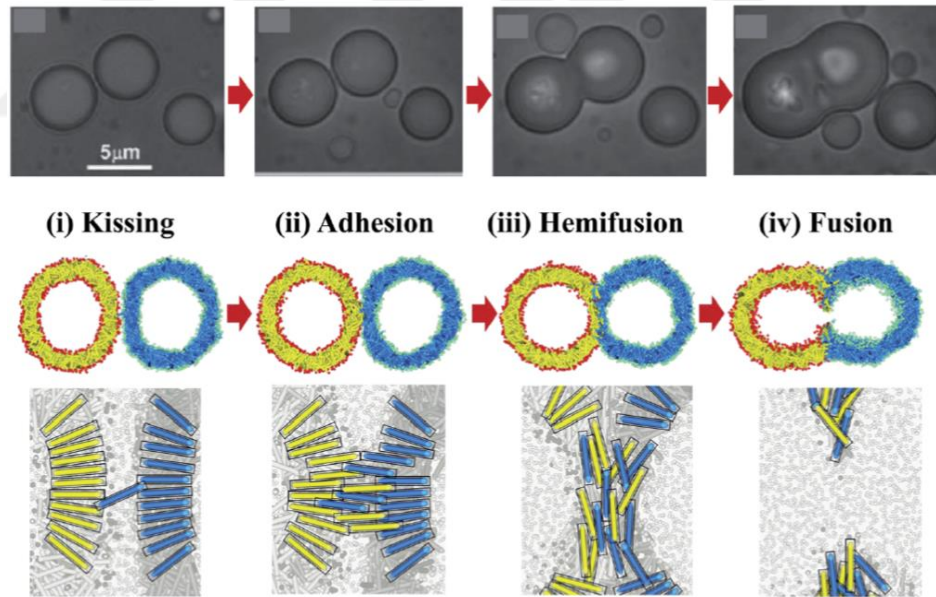
Film hidrasyonu ile hazırlanmış POEGMA-PDPA polimerzomlarının stabilitesi, Simon-Garcia ve ark. tarafından incelenmiştir (Simon-Gracia ve ark., 2016). Herhangi bir bileşik yüklenmemiş boş polimerzom (PS) dispersiyonunun +4°C'deki 4 aylık ve 37°C'deki 24 saatlik stabiliteleri ile paklitaksel yüklü polimerzom dispersiyonunun (PTX-PS) 37°C'deki 24 saatlik stabilitesi incelenmiştir. Şekil 1.15'deki veriler doğrultusunda, polimerzomların ilaç taşınımında kullanılabilecek stabil bir taşıyıcı oldukları anlaşılmaktadır. Aynı grubun 2008 yılındaki çalışmasında ise PMPC-PDPA polimerzom dispersiyonunun oda sıcaklığında kolloidal stabilitesini 3 ay süresince koruduğu belirtilmiştir (Lomas ve ark., 2008).



Sample	Size (nm)	PDI
PS	219	0.19
PS, 24 h at 37° C	226	0.19
PS, 4 months at 4° C	221	0.2
PS-PTX	225	0.2
PS-PTX, 24 h at 37° C	231	0.2

Şekil 1.15. POEGMA-PDPA polimerzomlarının boş ve paklitaksel yüklü haldeki stabiliteleri (Simon-Gracia ve ark., 2016).

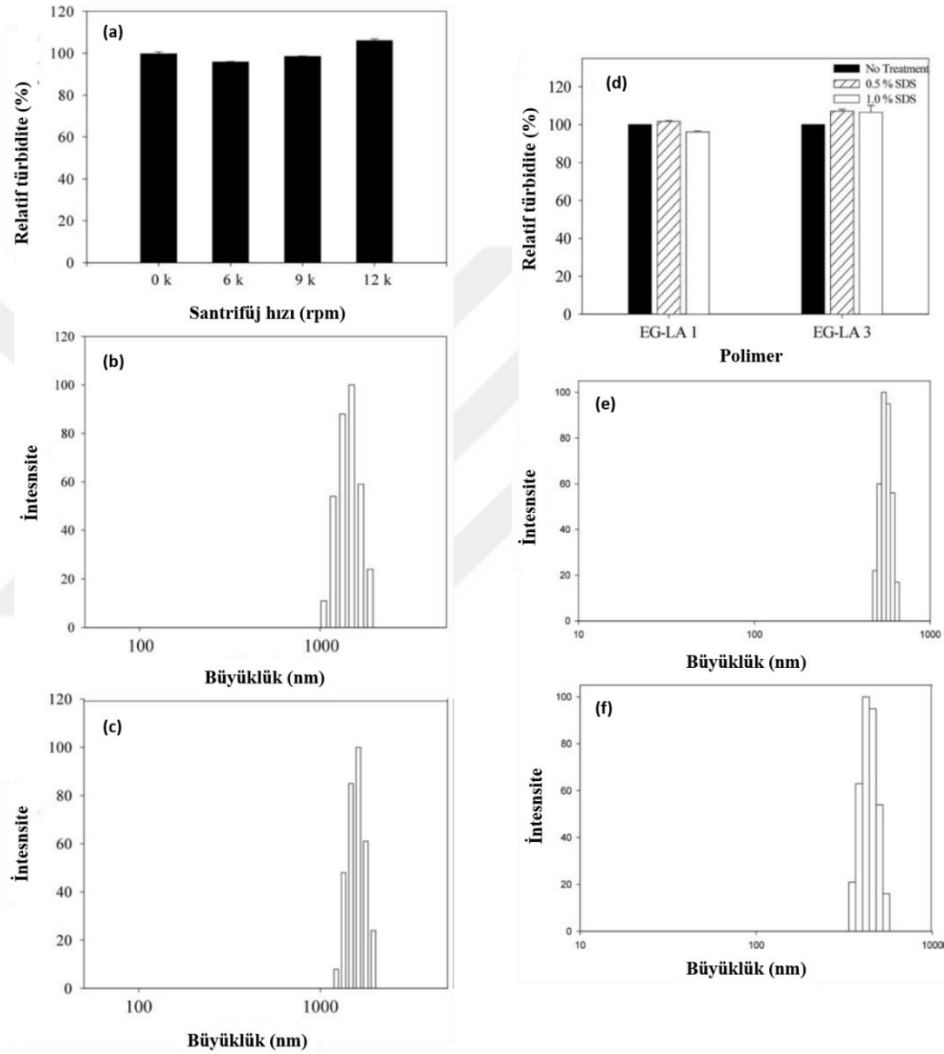
Battaglia araştırma grubunun 2016 yılında yayınladığı araştırmada ise PEO-PBD polimerzomları, su veya fizyolojik koşulları taklit etmesi açısından tuzlu fosfat tamponu (PBS) kullanılarak film hidrasyonu yöntemi ile hazırlanmıştır (Bartenstein ve ark., 2016). Polidispers olan bu polimerzom dispersiyonlarının partikül büyüklüğü dağılımı, boyut dışlama kromatografisi veya ekstrüzyon yöntemi ile daha monodispers hale getirilmeye çalışılmıştır ve dispersiyon halindeki stabiliteyi 3 ay süresince hem oda sıcaklığında hem de +4°C’de test edilmiştir. Sonuç olarak şu veriler ortaya çıkmıştır: (i) düşük sıcaklıklarda saklanan örnekler, oda sıcaklığında saklanan örneklerle göre daha stabil bulunmuşlardır, (ii) su ile hazırlanan örneklerin stabilitesi, PBS ile hazırlanan örneklerle göre daha düşüktür ve bu durumun muhtemel nedeni ise PEO bloğu ile fosfat moleküllerinin etkileşiminin polimerzomların birleşerek füzyona uğramasını engellemesi olduğu düşünülmüştür, (iii) polimerzom dispersiyonunun seyreltilmesi stabilitesini azaltmakta ve polimerzom füzyonunu desteklemektedir. Polimerzomların füzyon mekanizması ise Şekil 1.16’te gösterilmektedir.



Şekil 1.16. Polimerzomların füzyon mekanizmasının şematize edilmesi (Chang ve ark., 2014).

Polimerzomların stabilitesinde zaman haricinde, partikül boyutu üzerine etkili bir diğer faktör ise mekanik ve kimyasal dayanıklılıktır. Bu amaçla Lee ve ark., hazırladıkları farklı blok uzunluklarına sahip PEG-PLLA polimerzomlarının (PEG₄₅-

PLLA₂₆₄: EG-LA1; PEG₁₁₄-PLLA₅₅₆: EG-LA3) mekanik dayanıklılığını santrifüj gibi bir mekanik stres kaynağı kullanarak ve kimyasal stabilitelerini ise ortama % 1 oranında sodyum dodesil sülfat (SDS) ekleyerek değerlendirmişlerdir (Lee ve ark., 2006). Şekil 1.17.'den de anlaşılacağı üzere elde ettikleri sonuçlar, lipozomların aksine polimerzomların mekanik dayanıklılıklarının çok daha fazla olduğunu göstermektedir.



Şekil 1.17. a) Polimerzomların farklı santrifüj hızlarından sonraki türbidite değerleri, b) Polimerzomların 14000 rpm santrifüjden önceki boyut dağılımı, c) Polimerzomların 14000 rpm santrifüjden sonraki boyut dağılımı, d) Polimerzomların SDS ilavesinden önce ve sonra ölçülen türbidite değerleri, e) Polimerzomların SDS eklenmeden önceki boyut dağılımları, f) Polimerzomların SDS ilavesinden sonraki boyut dağılımları (Lee ve ark., 2006).

1.8. Polimerzomlardan Kargo Bileşiklerinin Salımı

Enkapsülasyon polimerzomlar açısından önemli bir konu olmakla birlikte, tüm ilaç taşıyıcı sistemlerin nihai hedefi olması bakımından, salım mekanizmalarından ayrı olarak tartışılmaz. Bu bağlamda, polimerzomların lipozomlara göre yüksek membran sağlamlıkları, kargo bileşiklerin hücrelere taşınımı için aşılması gereklidir. Literatürde şu anda üç genel salım mekanizması bulunmaktadır. Bunlardan en belirgin olanı, daha önce açıklanan bottom-up oluşumu yaklaşımını tersine çevirmek ve polimerzomları bir kimyasal reaksiyon ile parçalanmaya zorlamaktır. Bir başka yol da membranı gevşetmek ve etkin maddenin salımını tetiklemek için fiziksel bir uyarının kullanılmasıdır. Enkapsüle edilmiş bir etkin maddenin salımının yanı sıra salım profilinin de kontrol edilebilmesi için, ayarlanabilir salım özellikli polimerzomlar geliştirilmiştir. Son zamanlarda polimerzom membranı geçirgen hale getirilmeye çalışılmaktadır ve bu tür bir sistem substrata doğru yönlenebilir hale getirilerek enzimlerin taşınımında kullanılabilmektedir (Messenger ve ark., 2016).

- Kimyasal Olarak Tetiklenmiş Salım:

Kargo molekülün polimerzomlardan salımını sağlamak için kullanılan en yaygın yaklaşım polimerzomun parçalanmasını tetiklemektir. Oluşum sürecinin tersine çevrilmesi, spesifik polimerlerin birbirinden ayrılmasının harici tetikleyicisi olarak pH (Lomas ve ark., 2007), sıcaklık (Qiao ve ark., 2013), CO₂ (Yan ve ark., 2013) veya oksidatif ajanlar (Stano ve ark., 2013) kullanılarak yaygın şekilde incelenmiştir (Şekil 1.18.). Bu harici tetikleyicinin uygulanması üzerine, blok kopolimerin hidrofobik bloğu hidrofilik hale gelerek membranla olan güçlü hidrofobik etkileşimlerin koparılmasıyla vezikül yapısının bozulmasına ve dolayısıyla da kargonun salımına yol açar. pH'ya duyarlı polimerlerden yapılmış polimerzomlar, endozomal alım esnasında parçalanırken, sıcaklığa duyarlı veziküller kullanılan polimere bağlı olarak önemli ölçüde daha soğuk veya daha sıcak bölgelere ulaştığında parçalanırlar (Akinc ve Battaglia, 2013; Canton ve Battaglia, 2012). Bir blokun çözünürlüğünün değiştirilmesinin yanı sıra, polimerlerin hidrofilik ve hidrofobik

bloklarının bir ışık kaynağı (Cabane ve ark., 2010) veya disülfid bağı (Cerritelli ve ark., 2007) ile ayrılması da kullanılabilir.

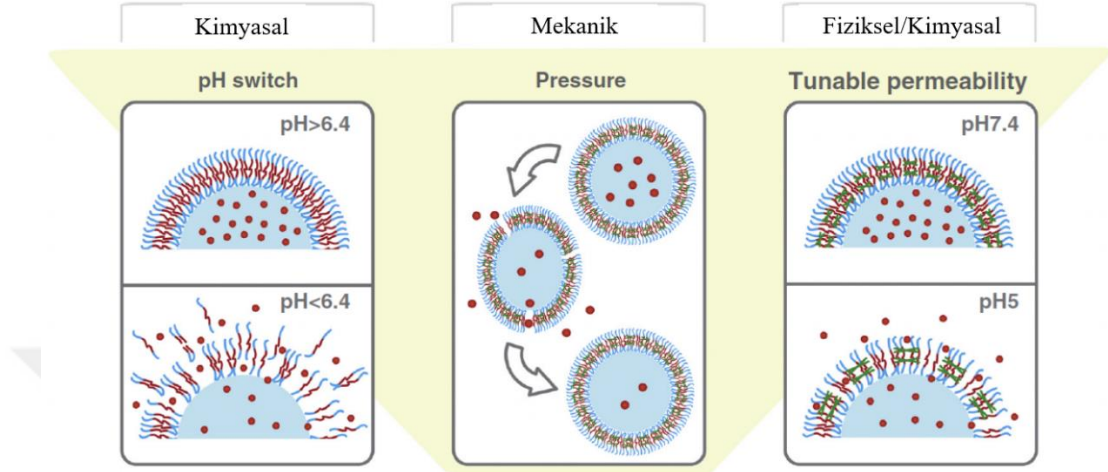
- Fiziksel Uyarıcı Aracılı Salım:

pH değişiminin yanı sıra, biyolojik açıdan önemli bir salım mekanizması, kan damarlarında olduğu kayma kuvvetlerinin kullanılması olacaktır. Voit ve ark. hem çapraz bağlı hem de çapraz bağlanmamış veziküllerin basınca bağımlı salımını araştırmışlardır (Huang ve ark., 2013; Yassin ve ark., 2012). Bu mekanizma, nanopartiküllerin yanı sıra kimyasal etkin maddelerin salımı ile de ilgilidir. Polimerzomlar mekanik olarak stabil olmalarına rağmen, kayma kuvveti uygulandığında membran üzerinde geçici kırılmalar meydana gelebilmektedir ve bu işlem enkapsüle edilmiş moleküllerin sıkışmasını beraberinde getirir. Sonuç olarak, boyuta bağlı etkin madde salımı, moleküller sünger benzeri bir etki ile membrana doğru sıkıştırıldığında spesifik kayma hızları ve çapraz bağlanma durumu altında tetiklenebilir (Gaitzsch ve ark., 2012). Ayrıca, enkapsüle edilmiş bir etkin maddenin salımını sağlayan, geçirgen bir membran oluşturmak için UV radyasyonu da kullanılabilir (Wang ve ark., 2014). Bu örnekte, membranı çapraz bağlamak ve geçirgenliğini bir adımda değiştirmek için UV radyasyonu kullanılmıştır. Ayrıca, Blasco ve ark. membrandaki konformasyonel bir kayma sayesinde, ışığa duyarlı polimerzomların ışınlama sonrasında geçirgen olduklarını göstermişlerdir (Blasco ve ark., 2013).

- Ayarlanabilir Salım:

Kargonun ilk çıkış etkisiyle salımı yerine, belirli bir zaman gecikmeli salım profilinin polimerzomlara kazandırılması da mümkündür. Bu bağlamda, fiziksel (Yu ve ark., 2009) veya kimyasal çapraz bağlama (Chambon ve ark., 2012) ile birlikte pH veya sıcaklık duyarlı polimerlerin kullanımı (Şekil 1.18) uygulanmıştır. Böyle bir özellik kombinasyonu, veziküllerin harici uyarıcı değişimi üzerine parçalanmasını önler ancak polimerzomların geri dönüşümlü olarak şişmesine neden olur.

Polimerzomlar bir kez şiştikten sonra, enkapsüle edilmiş kargo vezikülü, çapraz bağlanma yoğunluğu ile kontrol edilebilen bir difüzyon hızıyla terk etmektedir (Yassin ve ark., 2012).



Şekil 1.18. Polimerzomların taşıdıkları kargoları salım mekanizmaları (Messenger ve ark., 2014).

1.9. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kopolimer, Peptit ve pDNA Hakkında Bilgiler

1.9.1. Prostat Kanseri

Deneysel çalışmalarda kullanılan polimerler ve terapötik bileşiklerden önce bu materyallerin neden kullanıldığını anlayabilmek için öncelikle mevcut ihtiyacı doğuran kanser vakaları ve kanser hakkında genel bir bilgi verilmesi uygun olacaktır.

Prostat kanseri her 100.000 kişi arasında 25 bireyde görülme oranına sahip olan ve genellikle 50 yaşından sonra görülmekte olup, ülke ya da popülasyona göre de görülme sıklığı değişmektedir. Risk faktörleri, genetik yapı ve çevre koşulları görülme

sıklığını etkilemektedir (Siegel ve ark., 2012). Günümüzde prostat kanseri tedavisi için geliştirilmiş pek çok metot bulunmaktadır. Tek başına radyoterapi, kemoterapi ya da operasyon başarılı olmazken, tedavi metotlarının kombine edilmesi başarılı sonuçlar elde edilmesini sağlamaktadır. Kanser, prostat dokusu içine hapsolmuş durumda ise operasyon ile çıkarılması mümkündür (Fournier ve Narayan, 1993). Tümör dokusunun çıkarılması sonrasında radyoterapi ya da kemoterapi kullanılarak ek bir tedavi yapılması gerekmektedir. Hormon seviyelerinin azaltılması için hormon agonist ya da antagonistlerinin tatbiki ve testislerin operasyonla çıkarılması işlemleri uygulanmaktadır.

Prostat kanserinde kemoterapi, kombinasyon terapisi kadar etkili bir tedavi metodu değildir. Hormon bağımsızlığı kazanmış prostat kanserinde kemoterapi etkili olamamaktadır ve sadece rahatlatıcı tedavi metodu olarak uygulanmaktadır (Yagoda ve Petrylak, 1993). Hormon seviyelerinin düşürülmesine yönelik uygulanan tedaviler sonrasında kemoterapi uygulaması yapılabilmektedir. Prostat kanseri heterojen hücrelerden oluşmuş bir kanser türüdür ve her hücrenin kanser ilacına karşılık verdiği cevap farklı olduğu için tek başına kemoterapi uygulaması yapmak işe yaramamaktadır (Beer ve Raghavan, 2000). Geliştirilen pek çok kanser ilacı içerisinde prostat kanserinde etkili olduğu belirlenen kemoterapik ilaçlar taksan grubuna aittir. Dosetaksel ve paklitaksel taksan grubuna ait olan ve etkileri en iyi bilinen kanser ilaçlarıdır. Her ikisi de hücre iskelet molekülleri olan mikrotübülleri stabilize ederek hücre bölünmesini durdurmaktadır. Mikrotübüller ile ilişkili olan proteinlere bağlanarak mikrotübülleri inhibe eden bu iki ilaç, farklı başka bazı kemoterapik ilaçlar (estramusin) ile kombine edilerek kullanılabilir (Dahllöf ve ark., 1993). Dosetaksel de, kemoterapik ilaçlar içinde prostat kanserine karşı en etkili olan ilaçtır ve estramusin ile kombine edilerek kullanılabilir (Pienta, 2001). Dosetakselin genel etki mekanizması mikrotübül depolimerizasyonunun engellenmesi şeklinde gerçekleşmektedir. Tubulin β alt ünitelerine bağlanarak mikrotübülleri polimerize düzeyde tutar. Ayrıca anti-apoptotik proteinleri (bcl-2) fosforlayarak apoptozdan korunma mekanizmalarını ortadan kaldırmakta ve hücre ölümünü hızlandırmaktadır (Kraus ve ark., 2003).

1.9.2. BikDDA Geni

Programlı hücre ölümünden (apoptozdan) kaçınmak kanser hücrelerinin hayatta kalma mekanizmalarının başında gelmektedir (Hanahan ve Weinberg, 2000). Apoptoz sinyal platformu, hücre ölümünü indükleyici olgunun geldiği kaynak olarak içsel (intrinsik) ve dışsal (ekstrinsik) yolak olarak ikiye ayrılır. Dışsal yolak Tümör Nekroz Faktörü (TNF), FAS ligantı ve TNF-ilintili apoptoz-indükleyici ligant (TRAIL)ların ölüm reseptörlerine bağlanmaları ile tetiklenir. Aktive olan ölüm reseptörleri kaspaz 8 proteazını aktive eder; aktive olan kaspaz 8 hücre ve çekirdek iskeletini parçalayan ve hücre DNA'sının parçalanmasına neden olan DNase enzimlerini aktive eden cellat kaspaz zincirinin aktive olmasını sağlar (Mehmet, 2000). İçsel yolda ise DNA hasarı, oksidatif stres ve onkogen aktivasyonundan dolayı pro-apoptotik bcl-2 proteinleri Bax/Bak'ı aktive olarak mitokondri membranında Bax/Bak gözenekleri açılmasına neden olur. Açılan bu gözeneklerden çıkan sitokrom-c proteinin sitoplazmadaki apoptoz uyarıcı faktör (AIF) ve kaspaz-9 ile apoptozom kompleksini oluşturarak cellat kaspaz zincirinin aktivasyonuna neden olur (Youle ve Strasser, 2008). Bax/Bak proteinlerini aktive ederek mitokondri membran geçirgenliğini arttıran proteinlerden biri de Bik proteinidir (Chinnadurai ve ark., 2009). İçsel gelen bir apoptotik sinyal sonucunda aktive olan kazein benzeri kinaz-II tarafından fosfatlanan Bik (Thr(33) ve Ser(35)) proteinin meskeni olan endoplazmik retikulumdan ayrılarak mitokondriye giderek orda bulunan anti-apoptotik Bcl-2 ve Bcl-xL proteinlerine bağlanır. Bcl-2 ve Bcl-xL proteinleri sağlıklı hücrelerde Bax ve Bak proteinlerine bağlanarak bu proteinlerin bir araya gelip mitokondri üzerinde gözenek oluşturmalarına engel olmaktadır. Apoptotik sinyalin gelmesi sonucu Bik proteininin Bcl-2 ve Bcl-xL proteinlerine bağlanması ile özgür kalan Bax ve Bak proteinleri bir araya gelerek Bax/Bak gözeneklerini oluştururlar. Bu nedenle Bik aktivasyonunun apoptozu tetikleyici bir etkisi vardır. İlk defa Li ve ark. (Li ve ark., 2003) tarafından tespit edilen bir mutant Bik formu olan BikDD'nin (T33D, S35D) Bik proteininin fosfatlı formunu taklit ederek Bcl-2 ve Bcl-xL proteinlerine bağlandığı ve dolayısı ile apoptoz yolağını aktive ettiği gösterilmiştir. Takibinde yapılan çalışmalarda BikDD'nin kanserli hücrelere aktarımı sonucu pankreas (Xie ve ark., 2007), akciğer (Sher ve ark., 2009)

ve meme (Lang ve ark., 2011) kanseri tümörlerinin eradikasyonuna sebebiyet verdiği gösterilmiştir.

Özetlemek gerekirse, Bcl-2 pro-apoptotik gen ailesi üyesi olan Bik geni, diğer pro-apoptotik Bcl-2 genlerinin aktivitesini indükleyerek veya anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerini inhibe ederek işlev görür. Bu nedenle insan kanserlerinde apoptozu güçlendirici bir terapötik gen olarak önerilmiştir. Bik proteininin mutant bir formu olan BikDD proteini, anti-apoptotik üyelere arttırılmış bağlanma afinitesi ile, Bik proteininin yapısal olarak fosforile edilmiş ve aktif hali gibi davranır. İnsan kanseri hücrelerinde aşırı eksprese edildiğinde, BikDD vahşi tipteki muadili ile kıyaslandığında daha büyük bir pro-apoptotik aktivite gösterir ve bu da in-vivo deneylerde tümör büyümesinde 2 kat azalmaya yol açmıştır (Lang ve ark., 2011; Y. M. Li ve ark., 2003). BikDD sadece apoptozu kuvvetlice indüklemekle kalmaz aynı zamanda göğüs, pankreas, karaciğer ve prostat kanserinde eksprese edildiğinde hücre proliferasyonunu da inhibe eder (Xie ve ark., 2014). BikDD proteininin yarı ömrünü arttırmak için, BikDDA geni, BikDD'nin 124 numaralı serinini değiştirerek üretilmiştir, böylece üçlü negatif meme kanserinde BikDD'den daha etkili bir terapötik gen elde edilmiştir (Jiao ve ark., 2014). Yakın tarihli bir çalışmada, erkek nude farelerin BikDD'yi eksprese eden prostat kanseri hücreleri ile aşılması, tümör büyümesinde bir azalmaya ve düşük toksisite ile yaşam süresinin uzatılmasına yol açmıştır (Xie ve ark., 2014). BikDD'nin mutasyona uğramış bir biçimi olan BikDDA, vahşi tipteki BikDD6 tarafından kodlanan üründen daha uzun bir yarılanma ömrüne sahiptir ve daha yüksek terapötik etkinlik sergileyen bir proteini ifade etmektedir.

1.9.3. Dosetaksel Trihidrat

Dosetaksel, paklitaksel benzeri yarı sentetik bir taksan türevidir. Avrupa porsuk ağacı *Taxus baccata*'nın iğnelerinden elde edilmiş taksan başlatıcısından hareketle üretilmektedir. Dosetaksel, ileri seviye veya metastatik prostat/meme kanserinde kullanılmaktadır. Aynı zamanda lokal olarak cerrahi olarak alınamayan akciğer kanserinin teşhisinde sisplatin ile birlikte veya önceden uygulanmış platinyum

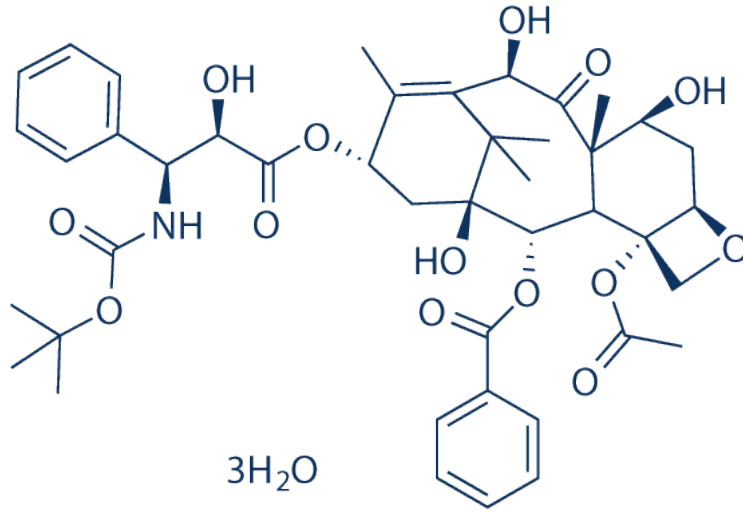
esaslı kemoterapinin başarısız olduğu durumlarda kullanılabilir. Hormona dayanlı metastatik prostat kanserinde prednizon veya prednizolon ile beraber kullanılabilir. Gastrik adenokarsinomanın tedavisinde sisplatin ve fluorourasil ile beraber kullanılmaktadır. Bu kombinasyon lokal olarak ileri seviyedeki baş ve boyun skuamöz hücre karsinomasına sahip hastaların tedavisinde kullanılabilir.

Dosetaksel % 5 glikoz çözeltisi veya % 0,9 sodyum klorür (NaCl) çözeltisi içinde, 0,74 mg/mL konsantrasyonu geçmeyecek şekilde intravenöz (iv) infüzyon olarak verilmektedir. İnfüzyon normalde 1 saati geçkin sürede gerçekleştirilmektedir. Dosetaksel kullanımından 1 gün önce başlanılan oral kortikosteroid ön tedavisi gerekmektedir. Örneğin günlük 16 mg dozdaki deksametazon uygulamasına, dosetaksel uygulanmasından 1 gün önce başlanır ve 3 gün süresince devam edilir.

Prostat kanserindeki dosetaksel kullanım dozu, günde iki kez 5 mg oral olarak kullanılan prednizon veya prednizolon ile beraber, 3 haftada bir 75 mg/m²'dir. Prednizon veya prednizolon kullanımı, ön tedavi olarak deksametazon gibi kortikosteroidlerin kullanımına olan ihtiyacı azaltmaktadır.

İntravenöz uygulamanın ardından dosetaksel hızlı bir şekilde vücut dokularına dağılmaktadır. Dosetaksel % 95 oranında plazma proteinlerine bağlanmaktadır. Çoğunlukla hepatik sitokrom P450 izoenzimi olan CYP3A4 ile metabolize edilmektedir ve metabolitleri vücuttan feçes ile atılmaktadır. Uygulanan dozun sadece % 6'sı üre ile atılmaktadır. Terminal eliminasyon yarı ömrü yaklaşık 11 saattir. Hepatik bozukluklarda klirensi azalmaktadır (Moffat ve ark., 2011; Sweetman, 2009).

Dosetakselin çalışmada kullanılan trihidrat tuzu ise (DTX) kloroform, metanol ve etanol gibi organik çözücülerde çözünür olup molekül ağırlığı 861,93 g/mol'dür.



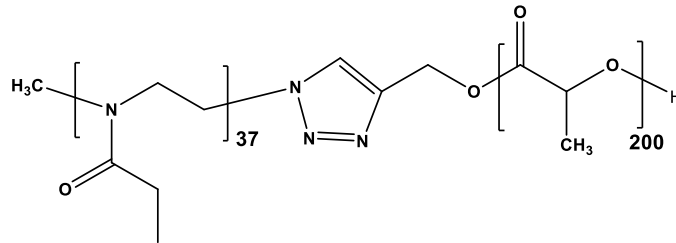
Şekil 1.19. Dosetaksel trihidratın kimyasal yapısı.

1.9.4. Üzerinde Araştırma Yapılan Kopolimerler

Günümüzde üzerinde en çok çalışma yapılan ve kanser tedavisinde umut verici olan yaklaşım, etkin maddelerin Nanoteknolojinin faydaları kullanılarak, ilaç taşıyıcı sistemler ile taşınmasıdır. Polimerzomlar, lipozomlar, miseller ve polimerik nanopartikülleri içeren çeşitli nano-taşıyıcılar bu amaçla kullanılmaktadır (van Rooy ve ark., 2011). Nano-taşıyıcılar ilaç taşıyıcı sistem olarak pek çok avantaja sahip olmakla birlikte, sistemik uygulandıklarında hızla (yaklaşık 30 dakika içinde) başta karaciğer olmak üzere retikülo endotelial sistem (RES) organlarında opsonin olarak adlandırılan plazma proteinleri tarafından tutulurlar. Bu durum RES dışındaki organlara ilaç taşınmasında ilaçtan beklenen etkinin sağlanamamasına neden olmaktadır. Nano-taşıyıcıların dolaşımda kalış sürelerini uzatmak için uygulanan en önemli yaklaşımlardan birisi, nano-taşıyıcıların yüzeyinin hidrofilik bir polimer ile kaplanmasıdır. Nano-taşıyıcıların yüzeyini modifiye ederek dolaşımda kalış sürelerini artırmak amacıyla polietilen glikol (PEG), poli(2-etil-2-oksazolin) (PEtOx), POEGMA, kitozan, ipekfibroin, polivinil alkol (PVA) gibi doğal veya sentetik kaynaklı hidrofilik polimerler kullanılmıştır. PEG bu amaçla en yaygın olarak

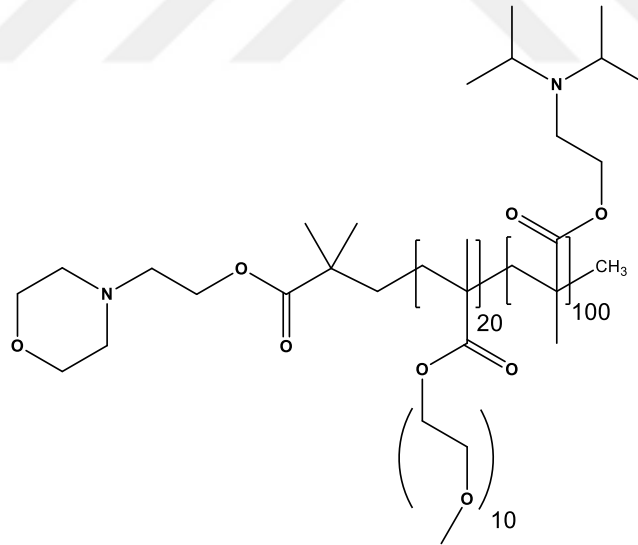
kullanılan hidrofilik polimer olmakla birlikte oksidasyona uğraması en önemli dezavantajını oluşturmaktadır. PEtOx ve POEGMA birimleri, PEG ile yaşanan sorunları ortadan kaldırmak için, istenilen özellikleri ile olası bir aday olarak düşünülmektedir. Yüksek biyoyumluluk, görünmezlik (stealth) etkisi, düşük ortalama moleküler dağılım, yanıt oluşturma, yüksek fonksiyonelleştirme özelliği ve kopolimerizasyon ile çok yönlülük özellikleri ile biyomedikal uygulamalar için yeni bir polimerik platform oluşturmaktadır.

Üzerinde araştırma yapılan poli(2-etil-2-oksazolin)₃₇-*b*-poli(laktik asit)₂₀₀ (PEtOx₃₇-*b*-PLA₂₀₀) kopolimerinin (Şekil 1.20.) hidrofilik ve hidrofobik blokları öncelikle ayrı ayrı olarak halka açılma polimerizasyonu ile üretilmiş ve ardından klik kimyası ile birleştirilmiştir. Bu kopolimerin hidrofobik bloğu olarak seçilen poli(laktik asit) polimeri, FDA tarafından biyomedikal uygulamalar için onay almış bir polimerdir. Polyester türevidir. Bu polimer, sağlık sektöründe özellikle biyomedikal mühendislik uygulamalarının gelişmesi ile günümüzde çoğunlukla vücutta rezorbe olabilen suture malzemesi olarak kliniklerde tercih edilmektedir. Ayrıca ilaç taşıyıcı sistemlerin önem kazanmasının ardından biyoyumlu ve biyoparçalanır polimerlerin önem kazanmasının ardından üzerinde en çok araştırma yapılan polimerlerin başında gelmektedir. Yoğun hidrofobik yapısı, vücutta (pH ~ 7,4) uzun süre bütünlüğünün bozulmadan kalma özelliğini getirmektedir. Ancak daha düşük pH değerlerinde (pH ~ 5,5) asidik ortam ester bağlarının hidrolizini tetikler ve polimerin bütünlüğü bozulmaya başlar (Discher ve Ahmed, 2006).

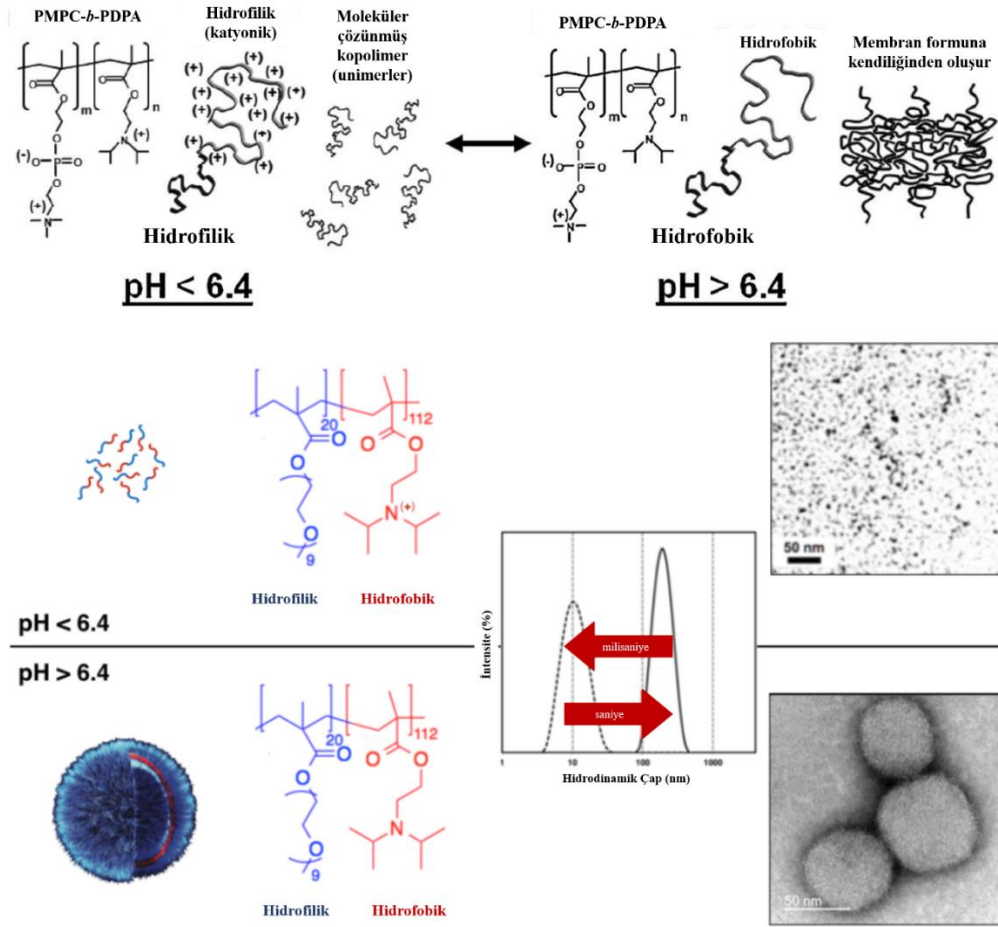


Şekil 1.20. PEtOx₃₇-*b*-PLA₂₀₀ kopolimerinin kimyasal yapısı.

Çalışmada kullanılan diğer bir polimer olan ve atom transferi radikal polimerizasyonu (ATRP) ile sentezlenen $P(\text{OEG}_{10}\text{MA})_{20}\text{-ko-PDPA}_{100}$ kopolimerinin (Şekil 1.21.) biyouyumlu PDPA bloğu, polimerzomlara pH duyarlılığı kazandırmaktadır ve pK_a değerinin yaklaşık 6,4'ün üstünde olduğu durumlarda bu blok hidrofobiktir. Bu pK_a değerinin altında, tersiyer amin gruplarının deprotonasyonu normalde hidrofobik PDPA bloğunun hidrofilik hale gelmesine neden olur ve böylece şekil 1.22.'de gösterildiği gibi moleküller arası kuvvetlerdeki bir değişime bağlı olarak polimerzomların hızlı bir şekilde parçalanmasına neden olur. Polimerzomlar hücreler tarafından alındığında, endolizozomal trafiğe maruz kalırlar. Endozomların asidik pH'sı (5,5-6,1) pK_a 'da bir düşüşe neden olur ve bu da pH'ya duyarlı polimerzomların hızlı bir şekilde ayrılmasını sağlar. Endozomal kompartıman içerisindeki unimerlerin konsantrasyonunda meydana gelen artış, ozmotik bir şoka neden olur ve geçici olarak endozomal membranı parçalayıp unimerlerin ve kargonun hücre sitozolüne salınmasına izin verir (Lomas ve ark., 2008).



Şekil 1.21. $P(\text{OEG}_{10}\text{MA})_{20}\text{-ko-PDPA}_{100}$ kopolimerinin kimyasal yapısı.



Şekil 1.22. PDPA esaslı çeşitli kopolimerlerin pH duyarlı kendiliğinden oluşum ve ayrılma süreci (Lomas ve ark., 2010; Lomas ve ark., 2008).

1.9.5. Hedefleyici Peptit Sekansı

Bugüne kadar prostat kanseri için belirlenen spesifik ajanlar arasında prostat spesifik antijen (PSA), prostatein, prostat kök hücre antijeni (PSCA), prostatik asit fosfataz (PAP) ve prostat-spesifik membran antijeni (PSMA) yer almaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda PSMA reseptörüne karşı geliştirilen radyoaktivite ile etiketlenmiş monoklonal antikorların prostat kanserini görüntülemeye başarılı

sonuçlar vermesi PSMA'yı diğer prostat kanseri spesifik ajanlara kıyasla öne çıkarmıştır (Shen ve ark., 2013). İlk defa Kawakami ve ark. tarafından keşfedilen ve prostat kanseri dokusunda overeksprese olan Prostat-Spesifik-Membran antijeni (PSMA) ilk defa 1997 yılında tanımlanmıştır. Prostat kanserinin erken teşhisinde prostat spesifik antijen (PSA) görüntülenmesi mortalitenin azalmasını sağlamıştır. Ancak PSA seviyesi kanserli hasta ve negatif biyopsiye sahip olanları ayırmak için kesin sonuç verememektedir. Aksine prostat kanseri hastalarında tüm aşama ve derecelerde yüksek sıklıkta prostat spesifik membran antijeni (PSMA) overekspresyonu vardır. Bu nedenle PSMA diagnostik biomarker olarak PSA'ya alternatiftir. PSMA folat hidrolaz aktivitesine ve NAALADaz (N-asetil-L-aspartil-L-glutamat peptidaz) aktivitesine sahip bir 100 kDa transmembran glikoproteindir. Sadece normal prostat epitelinde bulunmayıp aynı zamanda santral sinir sistemi ve proksimal gastrointestinal kanalda da bulunur.

Shen ve ark. (2013) PSMA'ya yüksek afiniteye sahip peptit sekansları geliştirmiş ve nanopartiküllere konjugasyon için uygun olduğunu belirtmiştir. Aggarwal ve ark. (Aggarwal ve ark., 2006) antikör bazlı anti-PSMA terapilerine alternatif olarak, PSMA üreten hücrelere seçici olarak bağlanan küçük peptitlerin malignan bölgelere seçici verilmesi için kullanılabileceğini belirtmiştir. Bu amaçla çalışmada 12 aminoasitten oluşan bir peptit kullanılmıştır. Bir seri monomerik peptit arasından SIRLLRGTTGGTLFRG (Peptit563) sekansına sahip olan peptidin PSMA'ya bağlandığı belirtilmiştir. Bu peptidin dimerik versiyonu PSMA'ya bağlanmasını önemli derecede artırmıştır. Floresans ajanlarla işaretledikleri dimerik peptit PSMA üreten prostat kanser hücrelerine (LNCaP, CWR22R) *in-vitro* ortamda spesifik olarak bağlanmış, PSMA üretmeyen hücrelere (PC-3, DU-145) önemsiz derecede bağlanma göstermiştir. DiPaola ve ark. (DiPaola ve ark., 2002) tarafından prostat kanseri hastalarında PSMA'yı hedefleyen peptit-doksorubisin konjugatının etkinlik, güvenilirlik ve farmakokinetiği incelenmiştir. Gerekli doz belirlenerek, konvansiyonel dozdan 1,5 kat fazla doz uygulaması yapılabilmüş, bu küçük miktardaki doz artışı bile önemli derecede etki artışı (4,9 kat) sağlamıştır.

Bu çalışmada hedefleme ajanı olarak kullanılması dışınulen, PSMA'yı hedefleyen, peptidin prostat kanseri hücrelerine karşı spesifik olarak bağlanması ve literatürde var olan klinik çalışmasında olumlu sonuçlar vermesi nedeniyle bu peptit ile dekore edilecek polimerzomların prostat kanseri hücreleri tarafından, normal prostat hücrelerine göre daha fazla oranda alınabileceği ve daha yüksek bir etkinlik göstereceği fikrini ortaya çıkartmıştır.



2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

BikDDA	: Yeditepe Ü. Biyomühendislik Bölümü
Dosetaksel trihidrat	: Koçak Farma
PEtOx- <i>b</i> -PLA	: Tübitak-MAM
Bakır (I) bromür	: Sigma Aldrich
2,2'-bipiridin	: Sigma Aldrich
Metanol, Etanol, Kloroform, 1,4-Dioksan	: Sigma Aldrich
OEGMA	: Sigma Aldrich
Trifenilfosfin	: Sigma Aldrich
Silika Jel	: Sigma Aldrich
Trifluoroasetik asit	: Sigma Aldrich
4-[N-maleimidometil]sikloheksan-1-karboksilat (SMCC)	: ThermoFisher
Rejenere selüloz diyaliz membran	: SpectraPor
Malemid uçlu peptit sekansı	: Proteogenix
Malemid uçlu Siyanin3 (Cy3)	: Lumiprobe
Label IT Tracker Kit	: Mirus
PNT1A hücreleri	: American Type Culture Collection
LNCaP hücreleri	: American Type Culture Collection
RPMI 1640, DMEM	: Invitrogen
Vivaspin	: Sartorius
X-tremeGENE HP reajanı	: Roche
PBS tableti	: ThermoFisher
Aminoasitler	: Sigma Aldrich
TEM gridleri	: Agar Scientific
DNA merdiveni	: Sigma Aldrich

2.1.2. Kullanılan Cihazlar

HPLC (DAD dedektörlü)	: Agilent 1100
HPLC (DAD+Floresans dedektörlü)	: Dionex 3000
HPLC (preperatif)	: Varian ProStar
GPC (triple dedektör)	: Viscotek GPCmax
NMR 600 MHz	: Bruker Avance III
Maldi-TOF	: Waters Micromass Maldi-TOF
TEM	: Tecnai 10, Philips
Dinamik Işık Saçılımı Cihazı	: Malvern Zetasizer
Nanodrop 6000	: Thermo Fisher
Glow Discharge	: Quorum
Florimetre	: Varian Carry Eclipse
Peptit Sentezleme Cihazı	: Syro-I Peptide Synthesizer
Şırınga Pompası	: World Precision Instruments
pH Metre	: Mettler Toledo
Elektroporasyon cihazı	: Eppendorf Electroporator 2510

2.2. Yöntemler

2.2.1. P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ Polimeri ile Yapılan Çalışmalar

POEG₁₀MA-PDPA polimeri ile yapılan çalışmalar, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik araştırma Kurumu (TÜBİTAK) Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı (BİDEB), doktora sırası yurt dışı araştırma bursu (2214-A) ile desteklenmiş ve bir kısmı University College London (UCL) Kimya Departmanı laboratuvarında, bir kısmı Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi laboratuvarlarında ve hücrel araştırmalar ise Yeditepe Üniversitesi Biyomühendislik ve Genetik Bölümü laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

Önceden yapılmış optimizasyon çalışmalarında, hidrofilik POEG₁₀MA bloğunun 20 tekrarlayan birimde ve hidrofobik bloğun ise 100 tekrarlayan birimde bulunduğu durumlarda polimerzom yapısına ulaşılabilirdiğİ bilgisinden hareketle çalışmalara başlanmıştır.

2.2.1.1. BikDDA Geninin Floresans Ajan İle İşaretlenmesi ve Kalibrasyonu

BikDDA geninin miktar tayini için, yapısı floresans ajan ile işaretlenmiştir. Bunun için Siyanin5 (Cy5) esaslı *Label IT*[®] Tracker ajanı kullanılmıştır.

İşaretleme prosedürü şu şekilde gerçekleştirilmiştir:

- Aşağıda belirtilen miktarlar ile işaretleme reaksiyonu gerçekleştirilmiştir:

Steril H ₂ O	: 404,3 µL
10× İşaretleme Tamponu	: 50 µL
1506 µg/mL pDNA Çözeltisi	: 33,2 µL (50 µg)
<i>Label IT</i> [®] Tracker İşaretleme Ajanı (Cy5)	: 12,5 µL

- Yukarıda belirtilen miktarlardaki maddeler bir ependorf tüpe yine yukarıdaki sıra ile eklenir. Tüp alüminyum folyo ile sarılır ve 37°C de 1,5 saat süresince inkübe edilir. (Bu reaksiyon işlemi esnasında tüp ilk 30 dakika sonrasında mini santrifüjde çevrilir. Böylece buharlaşıp tüp duvarına tutunan maddeler yeniden reaksiyon ortamına alınır)

- 1,5 saat sonrasında reaksiyona girmemiş ajanı ortamdan uzaklaştırmak için etanol presipitasyonu yapılır. Bu amaçla, 50 µL 5 M NaOH ve 1 mL buzda soğutulmuş saf etanol çözeltinin üzerine eklenip birkaç defa pipetlenir. Bu karışım -80°C de 2 saat süresince inkübe edilir.

- Bu işlemin ardından ise tüp soğutmalı santrifüjün en yüksek devirinde 10 dakika süresince santrifüj edilir. Ardından tüpün dibindeki pellet 500 µL % 70'lik etanol ile yıkanıp yine 10 dakika süresince santrifüj edilir.

- Son olarak bir mikropipet yardımıyla süpernatant ortamdan alınır ve geriye kalan pellet laminar kabin altında 1- 1,5 saat süresince kurumaya bırakılır.

- Final aşama olarak tampon veya su ile, işaretlenmiş BikDDA pelleti, istenilen konsantrasyona seyreltilir ve DNA gibi biyomakromoleküllerin tayini için spesifik olarak üretilen mikro spektrofotometre (Nanodrop) cihazı ile konsantrasyonu tayin edilir.

- Bu çözelti -20°C de ve ışıktan uzakta saklanır.

İşaretleme reaksiyonu ardından, floresans spektroskopisi ile, 0,39 – 50,00 µg/mL konsantrasyon aralığında kalibrasyonu gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2.1. Floresans spektroskopisinin işlem ayrıntıları.

Değişken	Uygulanan Değer
Eksitasyon Dalga Boyu (nm)	635.00
Emisyon Dalga Boyu (nm)	674.00
Başlangıç (nm)	650.00
Bitiş (nm)	770.00
Voltaj (V)	Medium
Hız	Medium

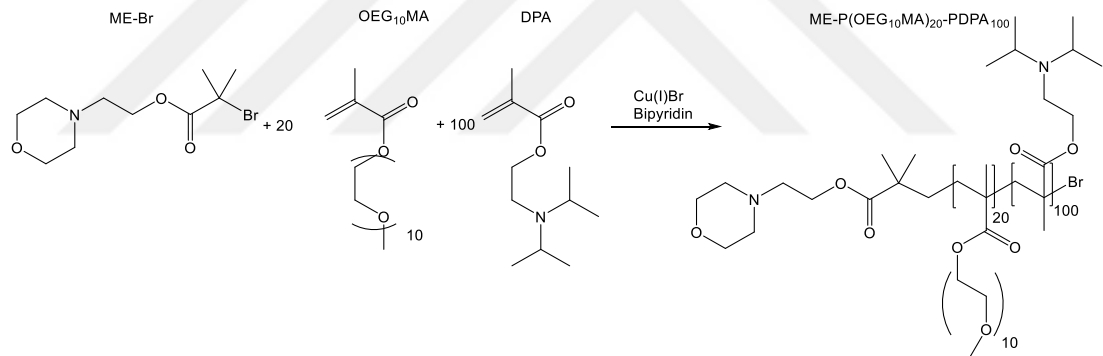
Bu yöntemin validasyonu yapılamamaktadır çünkü her bir işaretleme reaksiyonu farklı verimde gerçekleştiği için, her bir ayrı reaksiyondan elde edilen floresans işaretli BikDDA için her seferinde yeniden kalibrasyon yapılmaktadır.

2.2.1.2. P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ Kopolimerinin Sentezi ve Karakterizasyonu

Şekil 2.1’de şematize edildiği üzere, ATRP başlatıcısı 4-(2-bromoizobütil etil)morfolin (ME-Br) (0,194 mmol, 1 ekivalan) ve OEGMA (1,940 g, 3,88 mmol, 20 ekivalan) bir reaksiyon balonuna yerleştirilir. 1,5 mL metanol eklenmesiyle tamamen çözünme sağlanır ve N₂ gazı ile 1 saat süresince ortam, oksijeninden arındırılır. Sonrasında katalizör olarak CuBr (27,83 mg, 0,194 mmol) ve ligand olarak 2,2’-bipiridin (bpy) (60,6 mg, 0,388 mmol) karışımı hazırlanır ve üstteki çözeltiye eklenip bir gece boyunca 30 °C’de karıştırılır. Viskoz POEG₁₀MA polimerizasyon karışımından örnek alınarak, polimerizasyonun aşamasını görebilmek için ¹H-NMR analizi gerçekleştirilir. Ayrı bir reaksiyon balonunda ise DPA (4,13 g, 19,4 mmol) 3,5 mL etanolde çözülür ve N₂ gazı ile 1 saat süresince ortamın oksijeninden arındırılır. Degaze edilen DPA çözeltisi, elde edilen viskoz çözeltiye damla damla eklenir. 24 saat sonrasında reaksiyon balonunun ağzı açılıp metanol ile

seyreltilerek reaksiyon sonlandırılır. Bu karışımın rengi bakır katalizörünün okside olması nedeniyle zamanla yeşile döner. Ardından 100 mL etanol eklenerek saydam bir çözelti elde edilir. Bu çözelti silika kolondan geçirilerek bakır ortamdan uzaklaştırılır. Elde edilen çözelti döner buharlaştırıcıda konsantre edilir ve 1 kDa MWCO rejenere diyaliz membran kullanılarak 2 kez kloroform/metanol'e (3:1, v/v) karşı, 3 kez metanole karşı ve 4 kez ise suya karşı diyaliz edilir. Diyaliz işleminde her bir değişimin arasında en az 4 saat bulunmaktadır.

Elde edilen dispersiyon liyofilize edilerek beyaz toz halindeki kopolimere ulaşılmış olunur. Toz halinde kopolimerin bileşimi, kloroform/metanol (3:1, v/v) de çözülerek (1mg/mL) $^1\text{H-NMR}$ analizi ile tayin edilmiştir. Polidispersite indeksi ise, % 0,25 trifloroasetik asit (TFA) içinde çözülerek GPC de analiz edilmiştir.



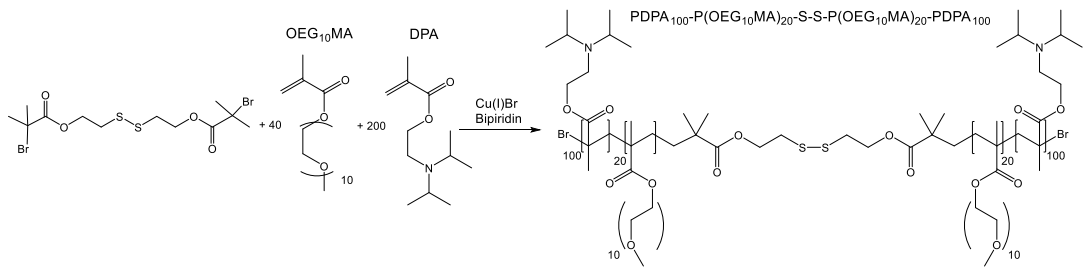
Şekil 2.1. P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ kopolimerinin sentez şeması.

2.2.1.3. PDPA₁₀₀-P(OEG₁₀MA)₂₀-S-S-P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ Kopolimerinin Sentezi ve Karakterizasyonu

Şekil 2.2'de şematize edildiği üzere, bis[2-(2'-bromoizobutiriloksi)etil]disülfid (0,34 g, 0,075 mmol, 1 ekivalan) ve OEGMA (1,5 g, 3 mmol, 40 ekivalan) bir reaksiyon balonuna yerleştirilir. 1,5 mL metanol

eklenmesiyle tamamen çözünme sağlanır ve N₂ gazı ile 1 saat süresince ortam oksijeninden arındırılır. Sonrasında katalizör olarak CuBr (21,52 mg, 0,15 mmol) ve ligand olarak bpy (49,2 mg, 0,32 mmol) karışımı hazırlanır ve üstteki çözeltiye eklenip bir gece boyunca 30 °C’de karıştırılır. Viskoz POEG₁₀MA polimerizasyon karışımından örnek alınarak, polimerizasyonun aşamasını görebilmek için ¹H-NMR analizi gerçekleştirilir. Aynı bir reaksiyon balonunda ise DPA (3,4 g, 15 mmol, 200 ekivalan) 3,5 mL etanolde çözülür ve N₂ gazı ile 1 saat süresince ortam, oksijeninden arındırılır. Degaze edilen DPA çözeltisi, elde edilen viskoz çözeltiye damla damla eklenir. 24 saat sonrasında reaksiyon balonunun ağzı açılıp metanol ile seyreltilerek reaksiyon sonlandırılır. Bu karışımın rengi bakır katalizörünün okside olması nedeniyle zamanla yeşile döner. Ardından 100 mL etanol eklenerek saydam bir çözelti elde edilir. Bu çözelti silika kolondan geçirilerek bakır ortamdan uzaklaştırılır. Elde edilen çözelti döner buharlaştırıcıda konsantre edilir ve 1 kDa MWCO rejenere diyaliz membran kullanılarak 2 kez kloroform/metanol’e (3:1, v/v) karşı, 3 kez metanole karşı ve 4 kez ise suya karşı diyaliz edilir. Diyaliz işleminde her bir değişimin arasında en az 4 saat bulunmaktadır.

Elde edilen dispersiyon liyofilize edilerek beyaz toz halindeki kopolimere ulaşılmış olunur. Toz halinde kopolimerin bileşimi, kloroform/metanol (3:1, v/v) de çözülerek (1mg/mL) ¹H-NMR analizi ile tayin edilmiştir.

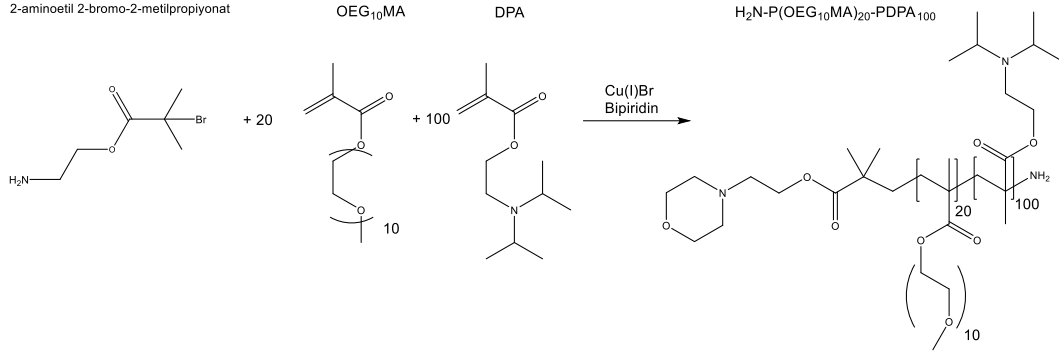


Şekil 2.2. PDPA₁₀₀-P(OEG₁₀MA)₂₀-S-S-P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ kopolimerinin sentez şeması.

2.2.1.4. $H_2N-P(OEG_{10}MA)_{20}-PDPA_{100}$ Kopolimerinin Sentezi ve Karakterizasyonu

Şekil 2.3'te şematize edildiği üzere, 2-aminoetil 2-bromo-2-metilpropanoat (0,194 mmol, 1 ekivalan) ve OEGMA (1,940 g, 3,88 mmol, 20 ekivalan) bir reaksiyon balonuna yerleştirilir. 1,5 mL metanol eklenmesiyle tamamen çözünme sağlanır ve N_2 gazı ile 1 saat süresince ortam, oksijeninden arındırılır. Sonrasında katalizör olarak CuBr (27,83 mg, 0,194 mmol) ve ligand olarak bpy (60,6 mg, 0,388 mmol) karışımı hazırlanır ve üstteki çözeltiye eklenip bir gece boyunca 30 °C'de karıştırılır. Viskoz POEG₁₀MA polimerizasyon karışımından örnek alınarak, polimerizasyonun aşamasını görebilmek için ¹H-NMR analizi gerçekleştirilir. Aynı bir reaksiyon balonunda ise DPA (4,13 g, 19,4 mmol, 100 ekivalan) 3,5 mL etanolde çözülür ve N_2 gazı ile 1 saat süresince ortamın oksijeninden arındırılır. Degaze edilen DPA çözeltisi, elde edilen viskoz çözeltiye damla damla eklenir. 24 saat sonrasında reaksiyon balonunun ağzı açılıp metanol ile seyreltilerek reaksiyon sonlandırılır. Bu karışımın rengi bakır katalizörünün okside olması nedeniyle zamanla yeşile döner. Ardından 100 mL etanol eklenerek saydam bir çözelti elde edilir. Bu çözelti silika kolondan geçirilerek bakır ortamdan uzaklaştırılır. Elde edilen çözelti döner buharlaştırıcıda konsantre edilir ve 1 kDa MWCO rejenere diyaliz membran kullanılarak 2 kez kloroform/metanol'e (3:1, v/v) karşı, 3 kez metanole karşı ve 4 kez ise suya karşı diyaliz edilir. Diyaliz işleminde her bir değişimin arasında en az 4 saat bulunmaktadır.

Elde edilen dispersiyon liyofilize edilerek beyaz toz halindeki kopolimere ulaşılmış olunur. Toz halinde kopolimerin bileşimi, kloroform/metanol (3:1, v/v) de çözülerek (1mg/mL) ¹H-NMR analizi ile tayin edilmiştir.



Şekil 2.3. H₂N-P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ kopolimerinin sentez şeması.

2.2.1.5. CGRFLTGGTGRLLRIS Peptit Sekansının Sentezi ve Karakterizasyonu

Peptit sekansının (CGRFLTGGTGRLLRIS, 1707 g/mol) sentezi, Syro-I Peptide Synthesizer cihazı aracılığıyla, standart HBTU kenetlenme reaksiyonu (Kenetlenme süresi: 40 dakika; florenilmetiloksikarbonil (Fmoc) deproteksiyonu: 3 dakika % 40 piperidin, 10 dakika % 10 piperidin) ile 150 mg sistein reçinesinden hareketle 2 gün süresince gerçekleştirilmiştir (Mustapa ve ark., 2009). 2 günün sonrasında elde edilen ürün sırası ile 3 kez metanol, 3 kez diklorometan ve 3 kez de dietileter ile yıkanır. Ardından, TFA:Su:Triizopropilsilan (95:2,5:2,5) dan oluşan 2 mL ayırma çözeltisi ile 3 (tam bir ayrılmayı sağlamak için, sekansta bulunan her bir arjinin amino asiti için bu süreye 1 saat eklenmelidir) saat süresince karışmaya bırakılır.

Sentezlenen ürünün saflaştırılması preparatif HPLC ile, Reprosil-Gold 200 C8, 5 µm, 150x10mm kolon aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Öncelikle, her seferinde 250 µL ürün enjekte edilerek bütün piklerin ayrımı, Çizelge 2.2'deki şekilde optimize edilen gradient metodu ile sağlanmış ve her bir pike ait fraksiyon toplanmıştır. Ürünün kromatogramında bulunan 100 mAu üzerindeki her bir pik öncelikle LC-MS ile tayin edilmeye çalışılmıştır. Ancak yaklaşık 1700 g/mol'lük molekül ağırlığına sahip peptit sekansının, LC-MS'in teorik dedeksiyon sınırı olan 2000 g/mol'lük sınırına yakın olması nedeniyle yüksek kesinlikte bir analiz gerçekleştirilememiştir. Bu durumu ortadan kaldırmak için Micromass MALDI-TOF (matrixs assisted laser desorbition

ionization-time of flight, matriks aracılı lazer desorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi) cihazı kullanılıp her bir kromatogram piki analiz edilerek istenilen peptit sekansı elde edilmiştir. Son olarak, saflaştırılan peptit sekansının saflığı analitik HPLC ile tayin edilmiştir.

Saflaştırılmış peptit sekansı liyofilize edilerek toz halinde elde edilmiş ve -80 °C’de saklanmıştır.

Çizelge 2.2. Preperatif HPLC’nin detayları.

Zaman (dakika)	Akış Hızı (mL/dakika)	Çözücü A (%)	Çözücü B (%)
15,00	8,00	65,00	35,00
16,00	8,00	12,00	88,00
20,00	8,00	12,00	88,00
21,00	8,00	96,00	4,00
25,00	8,00	96,00	4,00
Çözücü A: Su (0.1% TFA, v/v), Çözücü B: Asetonitril (0.1% TFA, v/v).			

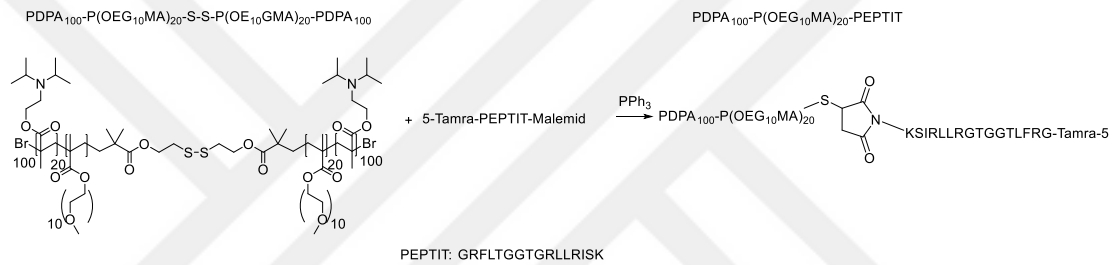
2.2.1.6. Peptit ile Kopolimerin Farklı Stratejiler ile Konjugasyonu ve Karakterizasyonu

Peptit ile kopolimerin konjugasyonunda iki farklı strateji izlenmiştir. İlk strateji olarak malemid ile modifiye edilmiş peptit ile tiyol taşıyan kopolimerin konjugasyonu gerçekleştirilmiştir. İkinci stratejide ise amino grubu taşıyan kopolimer ile tiyol grubu taşıyan peptit sekansı, bifonksiyonel çapraz bağlayıcı 4-[N-malemidometil]sikloheksan-1-karboksilat (SMCC) kullanılarak reaksiyona sokulmuş ve konjugasyon gerçekleştirilmiştir.

İlk strateji olarak şekil 2.4’te gösterildiği üzere, malemid uçlu hedefleyici peptit sekansı (2,0 mg, 0,00087 mmol, 2 ekivalan) ile PDPA₁₀₀-P(OEG₁₀MA)₂₀-S-S-P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ kopolimeri (27,0 mg, 0,00044 mmol, 1 ekivalan) bir

reaksiyon balonuna konarak etanol içerisinde çözülür ve 1 saat süresince N₂ gazı akışı altında karıştırılarak ortam, oksijeninden arındırılır. Sonrasında ortama PPh₃ (0,2 mg, 0,00076 mmol, 1,5 ekivalan) eklenir ve çözelti oda sıcaklığında 48 saat boyunca karıştırılır. Sonrasında bu çözelti 10 kDa MWCO rejenere diyaliz membran kullanılarak 2 kez etanole karşı, 3 kez de suya karşı diyaliz edilmiştir.

Elde edilen dispersiyon liyofilize edilerek beyaz toz halindeki kopolimere ulaşılmış olur.



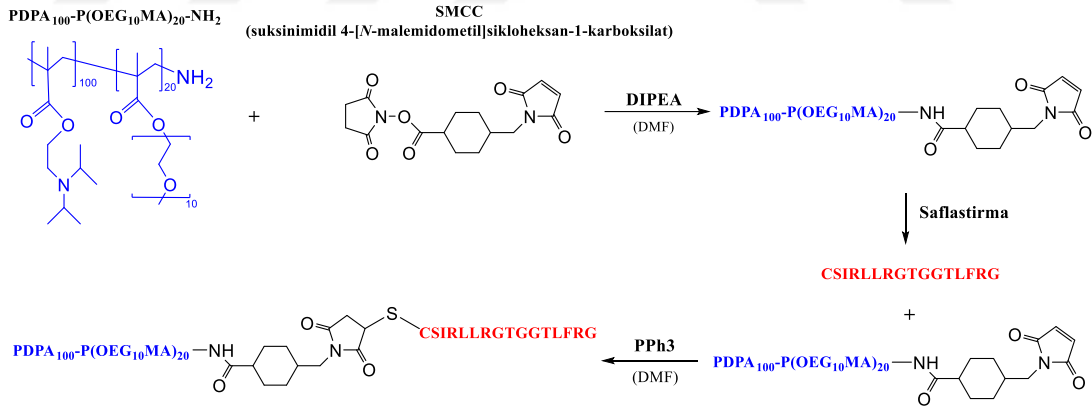
Şekil 2.4. Hedefleyici peptit sekansı ile PDPA₁₀₀-P(OEG₁₀MA)₂₀-S-S-P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ kopolimerinin konjugasyon şeması.

İkinci peptit kopolimer konjugasyonu stratejisinde kullanılmak üzere öncelikle sistein aminoasidi ile sonlanmış hedefleyici peptit sekansının sentezlenip saflaştırılması, bölüm 2.2.1.5'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

Şekil 2.5'te şematize edildiği üzere, ilk olarak amino uçlu P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ kopolimeri SMCC ile reaksiyona sokularak uç grubu maleimid ile fonksiyonelleştirilir. Bu amaçla, ilk adım olarak, H₂N-P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ (0,0075 mmol, 1 ekivalan), 2 mL DMF içerisinde çözülür ve 1 saat süresince N₂ gazı akışı altında karıştırılarak ortam, oksijeninden arındırılır. 0,5 mL DMF içerisinde çözülüp taze olarak hazırlanan SMCC çözeltisi (0,015 mmol, 2 ekivalan), kopolimer çözeltisi üzerine eklenir ve 30 dakika daha N₂ gazı akışına maruz bırakılır. Bu çözelti

üzerine birkaç damla N,N-diizopropiletilamin (DIPEA) eklenir ve 2 saat süresince 25°C’de reaksiyona devam edilir. Sonrasında 1 kDa’lık diyaliz membran kullanılarak, DCM’ ye karşı diyaliz işlemi en az 4 değişim yapılarak gerçekleştirilerek, reaksiyona girmeyen SMC ve DIPEA ortamdan uzaklaştırılıp saflaştırma işlemi tamamlanır. Son olarak DCM döner buharlaştırıcıda uçurulup, elde edilen ürün tekrar DMF içinde çözülür.

İkinci adımda ise malemid ile fonksiyonelleştirilmiş kopolimer, hedefleyici peptit sekansı ile konjuge edilmiştir. Bu amaçla, toz halde elde edilmiş peptit (2 ekivalan), SMCC-H₂N-P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ (1 ekivalan) kopolimerinin DMF içerisindeki çözeltisine eklenir ve 1 saat süresince N₂ gazı akışı altında karıştırıldıktan sonra ortama PPh₃ (1,5 ekivalan) eklenir. Reaksiyon 48 saat süresince N₂ gazı akışı altında gerçekleştirilir. Peptit konjuge edilmiş kopolimer, pH’ı 7,4’e ayarlanmış suya karşı 10 kDa’lık diyaliz membran kullanılarak ve en az 4 değişim gerçekleştirilerek saflaştırılır. Sonuç ürün liyofilize edilerek toz halinde elde edilir.



Şekil 2.5. Hedefleyici peptit sekansı ile P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ kopolimerinin SMCC aracılığıyla konjugasyon şeması.

2.2.1.7. P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ Kopolimerinin Kalibrasyon Doğrusunun Oluşturulması

Saflaştırma işlemleri sonrasında elde edilen polimerzom dispersiyonunun konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ kopolimerinin kalibrasyonu yapılmıştır. P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ kopolimeri pH 2,0 PBS içerisinde çözülmüş ve seri dilüsyon yöntemi ile farklı konsantrasyonlardaki (0,089-10,14 mg/mL) çözeltileri hazırlanmıştır. 220 nm dalga boyunda Nanodrop 8000 cihazı kullanılarak analizler gerçekleştirilmiş ve konsantrasyona karşılık absorbans değeri grafiğe geçirilerek kalibrasyon doğrusu ve denklemi elde edilmiştir.

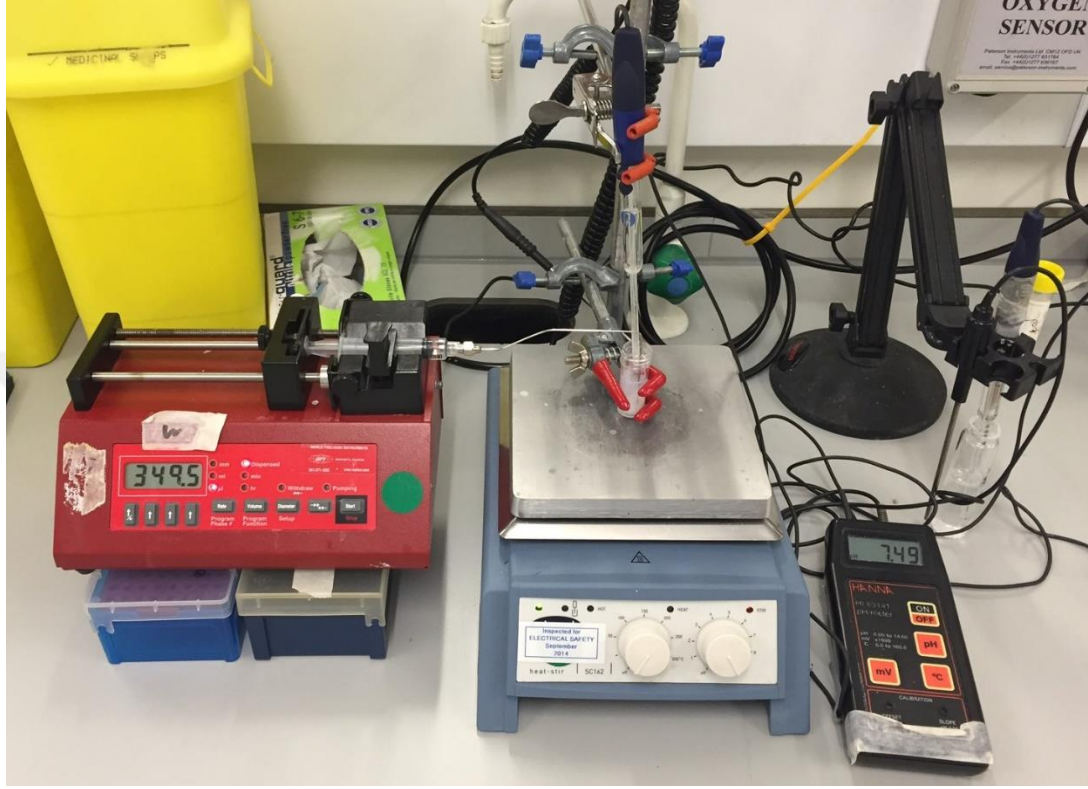
2.2.1.8. P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ Polimerzomlarının Formülasyonu, Saflaştırılması ve BikDDA Yüklenmesi

P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ polimerzom formülasyonları pH değişimi (Tian ve ark., 2015) ve film hidrasyonu (Lomas ve ark., 2008) yöntemleri ile hazırlanmıştır.

Film hidrasyonu yönteminde, P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ kopolimeri kloroform:metanol (3:1) içerisinde 10 mg/mL konsantrasyonunda, cam bir vial içerisinde çözülmüştür. Bu çözelti vakumlu etüvde ~ 400 mbar basınçta 4 saat süresince ve sonrasında 1 gün boyunca ~ 50 mbar basınçta bekletilerek çözücünün tamamen uçması sağlanarak vialin duvarlarının kopolimer ile kaplanması sağlanmıştır. Vakumlu etüvden alınan vialde, 10 mg/mL konsantrasyon sağlanacak şekilde pH 7,4 PBS eklenip ~ 800 – 1000 rpm de 4 hafta süresince manyetik olarak karışması sağlanır. Belirli aralıklarla alınan örnekler ile kopolimerin geçirdiği morfolojik evrimler ve farklı geometrik yapılar incelenip değerlendirilmiştir.

pH değişimi yönteminde öncelikle kopolimer, pH 2,0 PBS tamponu içerisinde 10 mg/mL konsantrasyonunda çözülmüştür. pH, 0,5 M NaOH çözeltisinin bir şırınga pompası yardımıyla 10 µL/dakika hızında ilavesi ile yükseltilir. pH'nın 6,0'a

yükselmesinin ardından NaOH'ın akış hızı 10 µL/dakika'ya düşürülür ve pH 7,4'e kadar bu hızda devam edilir (Şekil 2.6). Bu işlemin ardından dispersiyon 1 gün boyunca, veziküllerin stabilize olması için karıştırılmaya devam edilir.



Şekil 2.6. pH değişimi yöntemi ile polimerzom hazırlanmasına ait deney düzeneği.

Gerek film hidrasyonu gerek ise çözücü değişimi yöntemi ile hazırlanmış polimerzom formülasyonları sonucunda elde edilen bulanık dispersiyon, 45 dakikalık yatak sonikasyonu işlemine maruz bırakılarak tübüler yapıların küresel veziküllere parçalanması sağlanır. Sonikasyonun ardından 750 G de 10 dakikalık santrifüj işlemi ile büyük partiküller ve agregatlar ortamdan uzaklaştırılır. Elde edilen nanopartiküler dispersiyonda bulunan miseller yapılar, Sepharose 4B ile paketlenmiş kolon kullanılarak boyut dışlama kromatografisi (Size Exclusion Chromatography, SEC) ile, veziküler yapılardan ayrılır. Böylece sadece nanometre boyutundaki saf polimerzomlardan oluşan dispersiyon elde edilmiş olur.

Hedeflendirilmiş polimerzomların hazırlanmasında 9:1 oranında P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ / peptit563-P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ kopolimer karışımı kullanılmıştır

BikDDA geninin polimerzomların içerisine yüklenmesi Battaglia araştırma grubu tarafından önceden optimize edilen elektroporasyon yöntemi (L. Wang ve ark., 2012) ile gerçekleştirilmiştir. Herhangi bir madde enkapsüle edilmemiş boş polimerzom dispersiyonu (6 mg/mL, 133 µL), PBS çözeltisi (187 µL) ve Cy5 ile işaretlenmiş BikDDA geni (80 µL) 400 µL'lik elektroporasyon küvetine eklenip birkaç defa pipetlenir. Sonrasında, 2500 V'luk akım 5 defa uygulanır. Her uygulamanın arasında 30 saniye beklenir. İşlem bittikten sonra en az 1 saat, polimerzomların yüzeyindeki deliklerin kapanması için beklenilir.

Enkapsüle olmamış BikDDA geni, DNA parçalanması ile ortamdan uzaklaştırılır. Bu yöntemde kısaca, 65 µL 10× reaksiyon tamponu [100 mM Tris HCl (pH 7,5), 25 mM MgCl₂ ve 5 mM CaCl₂], 18 µL DNase I (90 IU) ve 167 µL DPBS (Ca²⁺/Mg²⁺ içermeyen PBS) ile elektropore edilen polimerzom dispersiyonu (400 µL, 0.045 mg/mL BikDDA) karıştırılır. Bu karışım 37 °C de 10 dakikalığına inkübe edilerek DNA sarmalının iskeletindeki fosfodiester bağlarının parçalanması sağlanır. Sonrasında ise enkapsüle olmayan BikDDA kalıntıları, Sepharose 4B ile paketlenmiş kolondan geçirilerek uzaklaştırılır.

Saflaştırılmış ve BikDDA enkapsüle edilmiş polimerzom dispersiyonu, gerekli analizler için 4 °C de saklanmıştır.

2.2.1.9. P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ Polimerzom Formülasyonlarının Karakterizasyonu

Üretilen polimerzom formülasyonları üzerinde ortalama partikül büyüklüğü ve dağılımı, yüzey yükü, elektron mikroskopu aracılı morfolojik incelemeler ve enkapsülasyon etkinliği açısından karakterizasyonlar gerçekleştirilmiştir.

Ortalama partikül büyüklüğü analizleri dinamik ışık saçılımı yöntemi ile tayin edilmiştir. Üretilen polimerzom formülasyonları 0,5 mg/mL konsantrasyona, pH 7,4 PBS ile seyreltildikten sonra 6 tekrar halinde ölçümler gerçekleştirilmiştir. Yüzey yükü tayini ise 5 tekrar olarak, 0,5 mg/mL konsantrasyonda elektroforetik ışık saçılımı yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

Polimerzomların morfolojik incelemesi geçirimli elektron mikroskopu (TEM) ile 80 kV de gerçekleştirilmiştir. Polimerzomların membranı görüntüleme öncesinde negatif boyama yöntemi ile, fosfotungustik asit (PTA) ile boyanmıştır. TEM numunesi hazırlanmasının kısaca prosedürü şu şekildedir: Öncelikle TEM grid'leri akkor boşaltma (glow discharge) yöntemi ile hidrofilik hale dönüştürülmüştür; Ardından 0.5 mg/mL konsantrasyondaki polimerzom dispersiyonundan 5 µL alınarak, karbon kaplı grid'in üzerine 1 dakikada kaplanır; Kaplanmış grid 0,75% (a/h) PTA çözeltisine maruz bırakılır; Fazla PTA çözeltisi filtre kağıdı ile silinerek uzaklaştırılır ve örnek vakum altında kurutulup analize hazır hale getirilir.

Polimerzomların içerisine enkapsüle edilen Cy5 işaretli BikDDA miktarı florimetre yardımıyla analiz edilmiştir. Polimerzom membranı floresans ışımayı analiz etmede herhangi bir engel teşkil etmediği için, Cy5 işaretli BikDDA enkapsüle edilmiş polimerzom formülasyonları herhangi bir parçalama işlemine maruz bırakılmadan, doğrudan floresans ölçümüne tabi tutulmuştur. Enkapsüle edilen miktar, elektroporasyona eklenen ilk miktara, denklem 2.1.'de olduğu şekilde oranlanarak, yüzde cinsinden enkapsülasyon etkinliği ortaya konulmuştur.

$$\text{Enkapsülasyon Etkinliği (\%)} = \frac{\text{Polimerzomlara enkapsüle edilmiş BikDDA miktarı}}{\text{Elektroporasyonda kullanılan toplam BikDDA miktarı}} \times 100$$

Denklem 2.1. BikDDA'nın enkapsülasyon etkinliğinin % olarak gösterilmesinde kullanılan denklem.

2.2.1.10. P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ Polimerzomlarının Hücrelerde Yapılan Çalışmaları

PNT1A (sağlıklı prostat dokusu hücresi) ve LNCaP (kanserli prostat dokusu hücresi) hücreleri % 10 fetal sıgır serumu içeren RPMI 1640 ortamında, HUVEC (insan umbilikal ven endotel hücresi) hücreleri ise % 10 fetal sıgır serumu (FBS) içeren DMEM ortamında çoğaltılmıştır.

Hücre canlılığı MTS reajanı (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum) yardımıyla kolorimetrik olarak, 25, 50, 75 and 100 µg/mL polimerzom konsantrasyonları ile muamele edilmiş LNCaP, PNT1A ve HUVEC hücrelerinde tayin edilmiştir. Yöntemin esası, canlı hücrelerin mitokondrisindeki dehidrojenaz enziminin, tetrazolyum halkasını indirgeyerek kırması ve formazan olarak adlandırılan renkli bileşiklerin oluşumuna yol açmasına dayanmaktadır. Bu bilgilerden hareketle her bir kuyucuğunda 5×10^3 sayıda hücre içeren 96 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğu belirlenen süre boyunca kopolimer/polimerzom çözeltisi/dispersiyonu ile inkübe edilmiştir. Ardında ise MTS reajanı uygulanarak 4 saat süresince karanlık inkübatörde bekletildikten sonra, kolorimetrik olarak 490 nm dalga boyunda analiz edilmiştir.

Transfeksiyon etkinliği deneylerinde kullanılan floresans mikroskopi analizleri için LNCaP ve PNT1A (1×10^4 hücre/kuyucuk) hücre hatları 25, 50, 75 ve 100 µg/mL konsantrasyonlardaki polimerzom formülasyonları ile muamele edilmiş ve piyasada transfeksiyon ajanı olarak yer alan X-tremeGENE HP DNA transfeksiyon reajanı kullanılarak 0,1 µg BikDDA ile transfekte edilmiştir. Hücre görüntüleri (100 hücre/alan konsantrasyonunda hücre içeren en az dört farklı rastgele alandan elde edilen) Zeiss Axio Vert.A1 floresans mikroskop kullanılarak 20× büyütmede 24, 48 ve 72inci saatlerde çekilmiştir.

Konfokal mikroskopi ve akış sitometrisi analizleri içinse, LNCaP ve PNT1A (3×10^6 hücre/m²) hücreleri % 1 FBS RPMI 1640 de 60 µg/mL konsantrasyondaki polimerzom formülasyonları ile muamele edilmiştir. 72 saatlik inkübasyon sonunda,

konfokal mikroskop tek tabakaları serum içermeyen ortam ile yıkayıp % 2 formaldehit ile fikse edilmiş ve 5 µg/mL DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) ile boyanarak Zeiss LSM 700 konfokal mikroskop ile görüntülenmiştir. Akış sitometrisi analizleri için, inkübasyon sonrası hücreler tripsinizasyon ile substratından ayrılmış ve hızlıca BD FACS Calibur akış sitometrisi cihazı ile analiz edilmiştir.

2.2.2. PEtOx-*b*-PLA Polimeri ile Yapılan Çalışmalar

PEtOx-*b*-PLA polimeri ile yapılan çalışmalar, 213M760 numaralı TÜBİTAK 1003 projesi kapsamında desteklenerek gerçekleştirilmiştir. Polimerin sentezi TÜBİTAK-MAM laboratuvarlarında gerçekleştirilerek tarafımıza teslim edilmiş, saflaştırılması ise Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi laboratuvarlarında ve hücresel araştırmalar ise Yeditepe Üniversitesi Biyomühendislik ve Genetik Bölümü laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

2.2.2.1. Dosetaksel İçin Yapılan Kalibrasyon ve Validasyon

Öncelikle DTX'in pH 7,4 asetonitril içerisinde 100 µg/mL konsantrasyona sahip stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiden hareketle hazırlanan ve seyreltmede fosfat-salin tamponu kullanılarak 10 µg/mL konsantrasyondaki çözeltinin 200-400 nm aralığında UV spektrumu taranmış ve maksimum absorbansın karşılık geldiği dalga boyu (λ_{max}) tayin edilmiştir.

pH 7,4 fosfat-salin tampon çözeltisi hazırlanırken 2,38 g disodyum hidrojen fosfat, 0,19 g potasyum dihidrojen fosfat ve 8 g sodyum klorür distile su içerisinde çözülmüştür. Çözelti 1000 ml'lik balon jöjeye alınarak distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır. Elde edilen çözeltinin pH'sı ölçülerek 7,4'e ayarlanır.

Kalibrasyon için DTX'in asetonitril içinde 100 µg/mL konsantrasyonda çözeltisi hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiden alınan numuneler, PBS ile seyreltilerek 3 µg /mL ve 10 µg /mL konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlanmış ve HPLC'de mobil faz oranları, akış hızı, enjeksiyon hacmi gibi parametreler değiştirilerek çalışmamıza en uygun pik belirlenerek, analiz şartları optimize edilmiştir. Sonrasında 0,4 - 30 µg/mL aralığında 9 farklı konsantrasyonda hazırlanan çözeltiler HPLC'de analiz edilmiştir. Bilinen konsantrasyonlara (x) karşı elde edilen alan (y) değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon doğrusu çizilmiştir. Aynı işlem aynı konsantrasyona sahip üç farklı stok çözelti üzerinde tekrarlanmış ve elde edilen sonuçların ortalaması alınmıştır.

Analitik yöntemin validasyonu, tasarlanan analitik uygulamalar için istenen şartları sağlayan metodun performans karakteristiklerinin laboratuvar çalışmalarıyla belirlendiği bir işlemdir. Performans karakteristikleri analitik parametrelere dayanarak açıklanır. Miktar tayininin validasyonunda ICH Q2(R1) kılavuzunda yer alan parametreler incelenmiştir.

2.2.2.1.1. Doğruluk

Bir analitik yöntemin doğruluğu, o yöntemle elde edilen test sonuçlarının gerçek değere yakınlığıdır. Gerçek / teorik değerlerin, pratikte bulunan değerlere yakınlığını doğruluğu saptamamızı sağlar. Doğruluk, belirli aralığı kapsayan en az üç konsantrasyon noktasında en az üçer kez hazırlanan numune miktarlarının yüzde geri elde değerlerinin belirlenmesiyle tayin edilmektedir. Bu amaçla DTX'in 1 µg/mL, 3 µg/mL ve 10 µg/mL konsantrasyonlarında çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin HPLC analizi sonucunda elde edilen alanlardan hareketle pratik konsantrasyon ve yüzde geri elde değerleri hesaplanmıştır. Ortalama yüzde geri elde, standart sapma ve yüzde bağıl sapma değerleri belirlenmiştir.

2.2.2.1.2. Kesinlik

Bir analitik yöntemin kesinliği, aynı homojen örnekten çoklu örneklemeyle elde edilen ölçüm serileri arasındaki yakınlığı ifade eder. Kesinlik, normal işlem koşulları altında, yöntemin tekrarlanabilirliğinin, ara kesinliğinin ve tekrar elde edilebilirliğinin ölçümüdür.

2.2.2.1.2.1. Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik, kısa zaman aralıklarında aynı işlem koşulları altındaki kesinliği tanımlamaktadır. Belirli aralığı kapsayan en az üç konsantrasyon noktasında en az üçer kez ya da test konsantrasyonunun % 100'ünde en az altı ölçümle belirlenir. Bu amaçla DTX'in 1 µg/mL, 3 µg/mL ve 10 µg/mL konsantrasyonlarında çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerden HPLC analizi sonrası elde edilen alanlardan hareketle pratik konsantrasyon değerleri hesaplanmıştır. Ortalama, standart sapma ve yüzde bağıl sapma değerleri belirlenmiştir.

2.2.2.1.2.2. Ara Kesinlik

Ara kesinlik; farklı günler, farklı analistler, farklı teknik donanımlar gibi laboratuvar varyasyonlarının incelenmesini ifade eder. Bu etkilerin her birinin incelenmesinin gerekli olmadığı belirtilmiştir.

DTX'in PBS içerisindeki ara kesinliğinin belirlenmesi amacıyla 1 µg/mL, 3 µg/mL ve 10 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan üç farklı çözelti birbirini takip eden üç farklı günde HPLC analizleri yapılarak konsantrasyonlara karşılık gelen alanlar bulunmuştur. Alan verilerinin kalibrasyon denkleminde yerine konmasıyla elde edilen pratik konsantrasyonlardan hareketle, her bir farklı konsantrasyon için anova testi yapılarak, % 95 güven sınırları içinde üç günlük veriler karşılaştırılmıştır.

2.2.2.1.2.3. Tekrar Elde Edilebilirlik

Tekrar elde edilebilirlik, laboratuvarlar arasındaki kesinliği ifade eder (İşbirliği ile yapılan çalışmalar, genelde yöntemin standardizasyonu için uygulanır).

2.2.2.1.3. Seçicilik

Seçicilik, analiz edilen maddeyi diğer bileşenler varlığında tayin edebilme özelliğidir. Seçicilik testi için formülasyonda kullanılan maddelerin tek başına ve etkin madde ile hazırlanan karışımları HPLC ile analiz edilmiş, piklerde herhangi bir girişimin olup olmadığı kontrol edilmiştir.

2.2.2.1.4. Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ)

Teşhis sınırı, belirli koşullar altında örnek içinde analiz edilen maddenin teşhis edilebilen fakat tayin edilemeyen en düşük konsantrasyonudur. Tayin sınırı ise örnekteki analiz edilen maddenin kabul edilebilir doğruluk ve kesinlikle kantitatif olarak tayin edilebilen en düşük miktardır. Teşhis ve tayin sınırı ICH kılavuzunda verilen formüllere göre kalibrasyon denkleminin eğim ve keşişim değerleri kullanılarak hesaplanmıştır.

2.2.2.1.5. Doğrusallık

Bir analitik yöntemin doğrusallığı, verilen bir aralıktaki örnek içindeki analiz edilen maddenin konsantrasyonu ile doğrudan orantılı olan test sonuçlarının elde edilebilmesidir. Eğer lineer bir ilişki varsa, test sonuçları, en küçük kareler yöntemiyle regresyon doğrusunun hesaplanması gibi uygun istatistiksel yöntemler ile

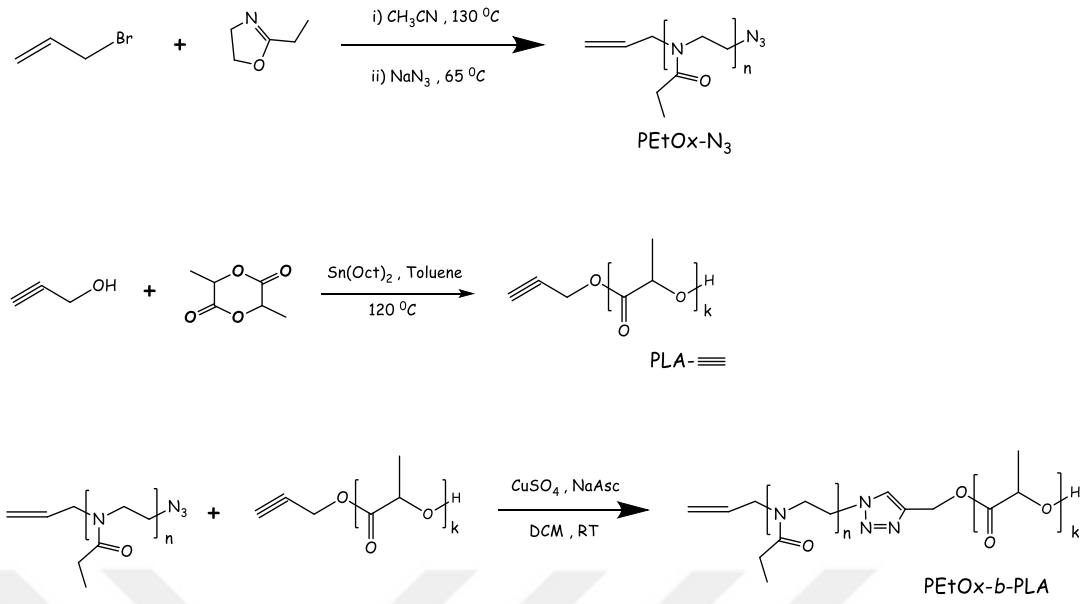
değerlendirilebilir. Korelasyon katsayısı, kesişim, regresyon doğrusunun eğimi ve artık kareler toplamı hesaplanmalıdır. Buna ek olarak regresyon doğrusundan gerçek veri noktalarının sapma analizi doğrusallığı hesaplamak için yararlı olabilir. Doğrusallığın saptanmasında en az 5 konsantrasyon gereklidir.

DTX'in PBS içerisindeki miktar tayini yönteminin doğrusallığının belirlenmesi amacıyla 1 - 10 µg/mL konsantrasyon aralığında 9 farklı konsantrasyonda çözeltileri hazırlanmış ve değerlendirilmiştir.

2.2.2.2. Kopolimerin Blok Uzunluklarının Belirlenmesi ve Saflaştırma Çalışmaları

Lineer diblok kopolimer olan PEO-*b*-PLA ile literatürde şimdiye kadar veziküler yapıların çalışması yapılmadığı için, bu polimerden hareketle polimerizasyonların elde edilmesine yönelik gerek formülasyon çalışmaları gerek ise de formülasyon çalışmalarının geri bildirimleri ile yürütülen polimer sentez çalışmalarının optimizasyonu hayli uzun sürmüş ve bilime yeni veriler kazandırılmıştır.

PEO-*b*-PLA polimerinin sentezi, şekil 2.7 de görüleceği üzere, öncelikle hidrofilik PEO bloğunun ve hidrofobik PLA bloğunun halka açılma polimerizasyonu ile ayrı ayrı sentezlenmesi ve daha sonrasında ise bu blokların klik kimyası (azid-alkin siklokatalım reaksiyonu) ile blok haline getirilmesi ile elde edilmiştir.



Şekil 2.7. PEOx-*b*-PLA blok kopolimerinin sentez şeması.

PEOx-*b*-PLA polimerinden hareketle veziküler sistemlerin oluşumuna dair herhangi bir bilgi bulunmadığı için, benzer olarak kabul edilebilecek PEG-*b*-PLA polimerzomların hangi blok uzunluklarında olduğu araştırması yapılmıştır. Bununla beraber, polimerzomların oluşumdaki en önemli parametrelerden birisi olan *f* değerinin (hidrofilik blok uzunluğunun toplam kopolimerin uzunluğuna oranının yüzdesi) PEG-*b*-PLA polimerzomları için hangi aralıkta olduğu araştırması yapıp, ulaşılan bilgiler doğrultusunda PEOx-*b*-PLA polimerinin uzunluklarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yapılan araştırmalarda *f* değerinin, $\sim 2\text{-}20$ kDa molekül ağırlığına sahip PEG-*b*-PLA polimeri için $\% 35\pm 10$ olduğu durumlarda polimerzom yapılarına ulaşıldığı Discher araştırma grubu tarafından ortaya konulmuş (D. E. Discher ve Ahmed, 2006) ve *f* değerinin $\% 25$ 'ten küçük olduğu durumlarda evrik mikro yapıların gözlemlendiği bildirilmiştir. Bunun yanı sıra $\sim \%$ 10'luk bir *f* değerine sahip 45-50 kDa molekül ağırlığındaki PEG-*b*-PLA polimerlerinin de polimerzom oluşturduğu Feijen araştırma grubu tarafından bildirilmiştir (Meng ve ark., 2005).

Bu bilgiler ışığında yaklaşık 30 adet, araştırması yapılan kopolimerlere benzer blok uzunluklarına sahip PEtOx-*b*-PLA kopolimerler sentezlenmiş ve üzerlerinde ön çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar sonunda çizelge 2.3'te görülen polimer serisi üzerinde çalışmalar yoğunlaştırılmış ve hangi morfolojik yapılara ulaşıldığı incelenmiştir.

Çizelge 2.3. Sentezlenen PEtOx-*b*-PLA polimerlerinin listesi.

Kopolimer Bileşimi	<i>f</i> Değeri (%)
PEtOx ₂₀₀₀ - <i>b</i> -PLA ₅₈₀₀	25
PEtOx ₂₇₀₀ - <i>b</i> -PLA ₅₈₀₀	32
PEtOx ₄₄₀₀ - <i>b</i> -PLA ₅₈₀₀	45
PEtOx ₃₀₀₀ - <i>b</i> -PLA ₉₀₀₀	20
PEtOx ₄₀₀₀ - <i>b</i> -PLA ₉₀₀₀	25
PEtOx ₇₅₀₀ - <i>b</i> -PLA ₉₀₀₀	45
PEtOx ₃₆₀₀ - <i>b</i> -PLA ₁₄₄₀₀	20
PEtOx ₄₆₀₀ - <i>b</i> -PLA ₁₄₄₀₀	24
PEtOx ₆₂₀₀ - <i>b</i> -PLA ₁₄₄₀₀	30

Tübitak-MAM'da sentezlenmiş bu kopolimerler ile çalışılmadan önce saflaştırma işlemi yapılmıştır. Saflaştırma işlemi diyaliz yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Tipik bir saflaştırma işlemi şu şekilde gerçekleştirilmiştir: Öncelikle kopolimer DCM içerisinde 3 saat süresince tamamen çözülmüştür; Ardından bu kopolimer çözeltisi uygun por büyüklüğüne sahip diyaliz membranın içerisine konulmuştur (PEtOx bloğunun uzunluğuna göre 3,5 kDa ya da 6-8 kDa'lık membranlar kullanılmıştır.); Membran içerisine konulan çözelti öncelikle DCM'ye karşı, her bir değişimin arasında en az 4 saatte olacak şekilde 3 kez diyaliz edilmiştir; Sonrasında diyaliz işlemi metanole karşı yapılmaya başlanmıştır ve yine her bir değişimin arasında en az 4 saatte olacak şekilde 3 kez diyaliz edilmiştir; Son olarak önceki diyaliz şartları ile aynı şekilde olarak suya karşı diyaliz edilmiştir (her diyaliz işlemi yaklaşık 1 litre çözücü içerisinde gerçekleştirilmiştir). Elde edilen sulu

kopolimer dispersiyonu dondurularak 4 gün boyunca liyofilize edilerek kuru toz halinde elde edilmiş ve kullanıma hazır bir şekilde + 4°C’de saklanmıştır.

2.2.2.3. PEtOx-*b*-PLA Polimeri ile Yapılan Polimerzom Formülasyonu Çalışmaları

Polimerzom formülasyonu çalışmalarında film hidrasyonu yöntemi ve çözücü değişimi yöntemi üzerinde araştırmalar gerçekleştirilmiştir. Bu ön çalışmaların tamamında sulu faz olarak PBS kullanılmıştır çünkü elde edilmesi amaçlanan polimerzom dispersiyonunun hücresel çalışmaları gerçekleştirileceğinden, fizyolojik pH ve konsantrasyon ile aynı özelliklere sahip PBS’in, sulu faz olarak kullanılması uygun görülmüştür.

Film hidrasyonu yönteminde farklı polimer konsantrasyonlarına sahip (1 mg/mL, 3 mg/mL, 7 mg/mL, 10 mg/mL) farklı çözücüler ve çözücü karışımları (dioksan, tetrahidrofur, DCM, DCM:Metanol, Kloroform:Metanol) cam bir vialin içerisine konulmuştur. Bu vialleri vakumlu etüve konarak çözücülerini kademeli olarak 1 gün içerisinde uçurulmuştur. Elde edilen, iç duvarı kopolimer tabakası kaplı viallere, yukarıdaki konsantrasyonlar ile aynı olacak şekilde PBS eklenmiştir. Bu vialler belirli süre (1 gün, 3 gün, 5 gün, 1 hafta, 2 hafta, 3 hafta) ile manyetik karıştırıcıda 800-1000 rpm hızında karıştırılmıştır. Bu sürelerde alınan örnekler TEM analizine tabi tutularak ulaşılan morfolojik yapılar belirlenmiştir.

Film hidrasyonu ile elde edilen nano yapıların analizi sonucunda tek tür bir yapı yerine genellikle farklı yapıların aynı anda bulunduğu sistemlere ulaşıldığı belirlenmiştir. Ayrıca elde edilen nano yapıların, partikül büyüklüğü açısından oldukça geniş bir dağılım verdiği için üretim sonrasında bu dağılımı daraltmak amacıyla sonikasyon ya da homojenizasyon gibi ekstra bir fiziksel stres uygulanması gereksinimi bulunmaktadır. Partikül büyüklüğü dağılımını daraltmak için uygulanabilecek diğer bir yöntem ise ekstrüzyondur. Polimerzomlar, lipozomlar gibi veziküler yapılar oldukları için, belirli por büyüklüğüne sahip (100-200 nm) bir

membrandan belirli sayıda geçirme işlemi ile partikül büyüklüğü dağılımının daraltılması, polimerik membrandan sızıntıya neden olabilmektedir. Bu durum ise enkapsüle olan maddenin vezikül dışarsına çıkmasına ve enkapsülasyon etkinliğinde dşe neden olabilmektedir. retilecek polimerzomlara BikDDA gibi, fiziksel stres koşullarında stabilitesinin bozulma ihtimali olan bir biyomakromolekül yükleneceği için, film hidrasyonu yöntemi ile enkapsülasyon çalışmaları yapılmasından vaz geçilmiştir. Ancak bu yöntemle elde edilen morfolojik yapılar ileride değerlendirilecektir.

Partikül büyüklüğü dağılımının dar bir yelpazede elde edilmesinden dolayı, film hidrasyonu yöntemine alternatif olarak çözücü değişimi yöntemi seçilmiştir. Bu yöntemde temel olarak PEOx-*b*-PLA polimeri öncelikle su ile karışabilen bir organik çözücüde çözülür. Sonrasında bu polimer çözeltisi, su fazı olan PBS ile farklı oranlarda ve hızlarda birbirleri ile karıştırılır ve polimerzom yapısı elde edilir. Sonrasında organik faz diyaliz ya da buharlaştırma ile ortamdan uzaklaştırılarak PBS içerisindeki polimerzom dispersiyonuna ulaşılır. Bu dispersiyonda gerekli analizler için + 4°C’de saklanmıştır.

Yapılan n çalışmalarda, çözücü değişimi yöntemi açısından en önemli faktörlerin “organik fazdaki kopolimer konsantrasyonu”, “kopolimerin zldğ znn seçimi”, “sulu fazın hacminin organik fazın hacmine oranı” ve “iki fazın birbirine karıştırılma hızı” olduğu gözlemlenmiştir. Bu faktörlerin farklı değerlerde kullanıldığı denemeler gerçekleştirilerek hangi aralık veya değerlerde polimerzom yapısına ulaşılabileceği belirlenmiştir.

n denemeler sonucunda elde edilen bilgiler ışığında polimerzom formülasyonları çözücü değişimi yöntemi ile şu adımlar takip edilerek üretilmiştir:

1) 12,5 mg PEOx-*b*-PLA kopolimeri 1 mL dioksan içerisindeki manyetik olarak 1 gece süresince 500 rpm hızında karıştırılarak çözülmüştür (DTX içeren formüllerde, DTX bu faza eklenerek formülasyon gerçekleştirilir).

- 2) Hazırlanan kopolimer çözeltisi önceden dioksan ile ıslatılmış 0,2 μm 'lik teflon membrandan süzülerek 10.3 mm ϕ 'ındaki cam şırıngaya, içerisinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde doldurulur ve bu şırınga bir şırınga pompası cihazına yerleştirilir.
- 3) 19 mm ϕ 'a sahip cam bir vial, 0,2 μm 'lik membran süzölmüş 1 mL pH 7,4 PBS ve 13mm $\times$ 5mm boyutlarındaki O halkalı bir manyetik bar konularak 800-1000 rpm hızında karıştırılır (BikDDA içeren formüllerde BikDDA bu faza eklenerek formülasyon gerçekleştirilir).
- 4) Kopolimer çözeltisi, 1000 rpm de karışan PBS'in üzerine, 0,5 mm iç ϕ 'a sahip teflon bir boru yardımıyla 50 μL /dakika hızında aktarılır.
- 5) Aktarma işlemi, aktarılan hacim 0,4 mL' ye ulaşınca durdurulur (aktarma işlemi sırasında teflon borunu ucu PBS çözeltisinin içerisinde, tabana yakın bir pozisyonda olmalıdır) ve manyetik karıştırıcı kapatılır.
- 6) Böylece polimerzom yapısı elde edilir. Elde edilen polimerzomların membranını dondurmak için cam vial 1,5 mL PBS çözeltisi hızlıca eklenir.
- 7) Vialin içeriği diyaliz membrana konulup içerisinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde kapatılır.
- 8) Diyaliz işlemi 1 litre suya karşılık gerçekleştirilir. İlk 2 saatin ardından ve sonraki her 4 saatte bir diyaliz ortamı su değiştirilerek dioksan ve enkapsüle olmayan DTX ortamdan uzaklaştırılır.
- 9) Diyaliz sonrasında, diyaliz membranının içerisindeki polimerzom dispersiyonu 1,5 mL'lik altı konik santrifüj tüplerine konulur ve büyük partiküllerin / agregatların uzaklaştırılması için 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant alınır. Böylece polimerzom dispersiyonu saflaştırılmış olunur.

10) Bütün bu üretim süreci 25 ± 5 °C’de gerçekleştirilir. Hazırlanan polimerzom dispersiyonu gerekli analizlerde kullanım için + 4°C’de saklanır.

11) BikDDA enkapsüle edilen polimerzom formülasyonlarında, 8 numaralı basamağın ardından, yani diyaliz işlemi sonrasında diyaliz membranının içeriği bir cam vialle alınıp üzerine BikDDA ile aynı miktarda DNaseI ile birlikte $10\times$ reaksiyon tamponu ve DPBS ilave edilip 37°C’de 10 dakika inkübe edilir. Ardından ise bu karışım 100 kDa’lık diyaliz membrana konulup 1 L pH 7,4 PBS’e karşı 2 saat süresince iki kez diyaliz edilir. Böylece kalıntı BikDDA ve DNaseI ortamdan uzaklaştırılmış olunur.

Hedeflendirilmiş polimerzomların formülasyonu için peptit konjuge edilmiş PEOx-*b*-PLA ve hücresel alım çalışmalarında kullanılmak üzere sentezlenmiş kumarin konjuge PEOx-*b*-PLA içeren polimerzom formülasyonları üretilmiştir ve sonuçları bulgular kısmında sunulmuştur.

Formülasyonun nasıl oluşturulduğu ve değişkenlerinin nasıl seçildiği tartışma bölümünde anlatılmaktadır.

2.2.2.4. PEOx-*b*-PLA Polimerzom Formülasyonlarının Karakterizasyonu

Üretilen polimerzom formülasyonları üzerinde ortalama partikül büyüklüğü ve dağılımı, yüzey yükü, elektron mikroskopu aracılı morfolojik incelemeler, enkapsülasyon etkinliği ve üretim yönteminin tekrarlanabilirliği açısından karakterizasyonlar gerçekleştirilmiştir.

2.2.2.4.1. Polimerzomların Ortalama Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyeli Ölçümleri

Ortalama partikül büyüklüğü analizleri dinamik ışık saçılımı yöntemi ile tayin edilmiştir. Üretilen polimerzom formülasyonları 0,5 mg/mL konsantrasyona, pH 7,4 PBS ile seyreltikten sonra 6 tekrar halinde ölçümler gerçekleştirilmiştir. Yüzey yükü tayini ise 5 tekrar olarak, 0,5 mg/mL konsantrasyonda elektroforetik ışık saçılımı yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

2.2.2.4.2. Geliştirilen Polimerzom Formülasyonunun Tekrarlanabilirliğinin Tayin Edilmesi

Polimerzom formülasyonunun tekrarlanabilirliği için 3 adet formülasyon için gerekli çözeltiler ve maddeler ayrı ayrı olarak hazırlanmış ve üretim gerçekleştirilmiştir. PEtOx-*b*-PLA polimerzom formülasyonların tekrarlanabilirliği ayrı ayrı üretilen bu üç formülasyonun ortalama partikül büyüklükleri ve DTX enkapsülasyon etkinlikleri kıyaslanarak gösterilmiştir.

2.2.2.4.3. Polimerzom Formülasyonlarının Morfolojik Değerlendirilmesi

Polimerzomların morfolojik incelemesi geçirimli elektron mikroskopu (TEM) ile 80 kV de gerçekleştirilmiştir. Polimerzomların membranı, görüntüleme öncesinde negatif boyama yöntemi kullanılarak fosfotungustik asit (PTA) ile boyanmıştır. TEM numunesi hazırlanmasının kısaca prosedürü şu şekildedir:

- Öncelikle 0.5 mg/mL konsantrasyondaki polimerzom dispersiyonundan 5 µL alınarak, karbon kaplı TEM grid'inin üzerine 1 dakika süresince kaplanır;
- Kaplanmış grid 0,75% (a/h) PTA çözeltisine maruz bırakılır;

- Fazla PTA çözeltisi filtre kağıdı ile silinerek uzaklaştırılır ve örnek vakum altında kurutulup analize hazır hale getirilir.

2.2.2.4.4. Polimerzom Formülasyonlarının BikDDA Enkapsülasyonu Açısından Değerlendirilmesi

Polimerzomların içerisine enkapsüle edilen BikDDA miktarı, DNA tayini için özelleştirilmiş mikrospektrofotometre cihazı (MultiskanGO, ThermoFisher Scientific) ile tayin edilmiştir. Bu amaçla, BikDDA yüklenmiş polimerzom formülü (0,5 mL) ile DCM (0,5 mL) bir vial içerisinde 30 dakika süresince vortexlenir. Sonrasında iki fazın birbirinden ayrılması için bir süre beklenilir. İki fazlı sistemin sulu kısmından (üstteki kısım) alınan 5 µL'lik örnek cihaza uygulanır ve µg/mL cinsinden konsantrasyon okunur. Enkapsüle edilen miktar, formülasyona eklenen ilk miktara, denklem 2.2.'de gösterildiği şekilde oranlanarak, yüzde cinsinden BikDDA enkapsülasyon etkinliği ortaya konulmuştur.

$$\text{Enkapsülasyon Etkinliği (\%)} = \frac{\text{Polimerzomlara enkapsüle edilmiş BikDDA miktarı}}{\text{Formülasyonda kullanılan toplam BikDDA miktarı}} \times 100$$

Denklem 2.2. BikDDA'nın enkapsülasyon etkinliğinin % olarak gösterilmesinde kullanılan denklem.

2.2.2.4.5. Polimerzom Formülasyonlarının Dosetaksel Enkapsülasyonu Açısından Değerlendirilmesi

Polimerzomlara enkapsüle edilmiş DTX miktarının tayini için ise diyaliz edilip ardından saflaştırılmış polimerzom formülasyonundan 0,5 mL alınıp liyofilize edilir. Toz haline gelmiş polimerzom formülasyonu üzerine 0,5 mL asetonitril eklenip bir gece 500 rpm de manyetik olarak karıştırılır ve 0,45 µm'lik membrandan süzüldükten

sonra üzerine 1,5 mL PBS eklenip karıştırılarak HPLC analiz gerçekleştirilir. Enkapsüle edilen DTX miktar formülasyona eklenen ilk miktara, denklem 2.3.'te olduğu şekilde oranlanarak, yüzde cinsinden enkapsülasyon etkinliği ortaya konulmuştur.

$$\text{Enkapsülasyon Etkinliği (\%)} = \frac{\text{Polimerzomlara enkapsüle edilmiş DTX miktarı}}{\text{Formülasyonda kullanılan toplam DTX miktarı}} \times 100$$

Denklem 2.3. DTX'in enkapsülasyon etkinliğinin % olarak gösterilmesinde kullanılan denklem.

2.2.2.4.5. Polimerzom Formülasyonlarının Stabilitesi

Geliştirilen polimerzom formülasyonlarının stabilitesinin değerlendirilmesi amacıyla, kolloidal haldeki polimerzom dispersiyonu +4°C'de 3 ay süresince saklanmıştır. Ayrıca kolloidal halde 37°C'de ki 24 saatlik stabilitesi de değerlendirilmiştir. Bu iki koşuldaki partikül büyüklüğü verileri, formülasyonun taze üretimi sonrasındaki partikül büyüklüğü ve partikül büyüklüğü dağılımı profili ile kıyaslanarak gösterilmiştir.

Ayrıca enkapsüle edilen BikDDA geninin enkapsülasyon işleminden etkilenip etkilenmediği ve 37°C'de 24 saatlik bekletilmenin ardından yapısında herhangi bir değişiklik olup olmadığı agaroz jel elektroforez yöntemi ile tayin edilmiştir. Bu amaçla % 1'lik agaroz jel Trizma Baz-Borik Asit-EDTA tamponu içerisinde hazırlanmıştır. Sonrasında ortama 12,5 µL etidyum bromür çözeltisi eklenmiştir. Elde edilen çözelti jel düzeneğine dökülerek dondurulmuş ve jelin katılaşmasını ardından yan destekler ve kullanılan tarak düzeneği dikkatlice kaldırılmıştır. İlgili örnekler yükleme tamponu ile karıştırıldıktan sonra (17 µL örnek + 3 µL yükleme tamponu), taraklar vasıtasıyla açılan kuyucuklara uygulanmıştır. Böylece hazırlanan jel, elektroforez tankına koyularak koyulmuş ve üzeri kaplanacak şekilde, 16 µL etidyum bromür çözeltisi içeren Trizma Baz-Borik asit-EDTA tamponu eklenmiştir. Tanka uygulanan 100 V'lık

akım ile jele uygulanan örnekler 35 – 40 dakika süresince sürüklenmiştir. Jel distile su ile yıkanarak UV ışığı altında görüntülenmiştir.

Agaroz jelin kuyucuklarına saf haldeki BikDDA geni, BikDDA enkapsüle edilmiş polimerzom formülasyonu, polimerzom formülasyonunun dioksan ilavesi ile parçalanmasıyla açığa çıkarılmış BikDDA geni çözeltisi ve 37°C’de 24 saat süresince bekletilen polimerzom formülasyonunun parçalanması ile açığa çıkan BikDDA geni çözeltisi uygulanmıştır.

Elektroforezde kullanılan tampon ve çözeltiler:

Trizma Baz-Borik Asit-EDTA (TBE) Tamponu (10×):

Trizma baz (MA:121,1 g/mol).....	108 g
Borik asit (MA: 61,83 g/mol).....	57 mL
EDTA (MA: 372,24 g/mol).....	100 mL
NaOH (MA: 39,9 g/mol).....	0,5 g
Saf su.....y.m.....	1000 mL

* pH, NaOH ile 8,3’e ayarlanmıştır.

Yükleme tamponu:

Bromfenol mavisi.....	% 0,25
Gliserol.....	% 30

Boyama çözeltisi (Etidyum bromür çözeltisi):

Etidyum bromür.....	% 10 (a/h)
Saf su.....	10 mL

Hazırlanan jele uygulanan etidyum bromür, elektrik akımı uygulaması ile yürütülen DNA fraksiyonlarının UV ışığı altında tayin edilmesini sağlamaktadır.

2.2.2.4.6. Polimerzom Formülasyonlarına Enkapsüle Edilen Materyalin Açığa Çıkışının İncelenmesi

PEtOx₃₇-*b*-PLA₂₀₀ polimerzomlarına yüklenen bileşiklerin farklı sıcaklıkta açığa çıkış profillerinin incelenmesi için, 0,5 mg/mL DTX içeren polimerzom formülasyonları kullanılmıştır. Bu amaçla 2014'te Koopaei ve ark. tarafından yayınlanan makaledeki in-vitro salım prosedürü modifiye edilerek kullanılmıştır (Noori Koopaei ve ark., 2014).

Bu doğrultuda, 0,5 mg/mL DTX içeren 2 mL polimerzom formülasyonu 6-8 kDa'luk diyaliz membrana konulur ve hiç boşluk/kabarcık kalmayacak şekilde klipslenir. Ardından bu diyaliz membran, 0,2 µm'lik filtreden süzölmüş 50 mL pH 7,4 PBS tamponu içerisine konulur. Sıcaklığın 37°C'ye ayarlandığı 50 rpm de karışan inkübatöre konulan bu düzeneğten 0,25., 0,5., 1., 2., 4., 6., 8., 12. ve 24. saatlerde 1 er mL numune alınarak viallerine konulur. Alınan her numunenin ardından yine aynı hacimde ve sıcaklıktaki salım ortamı sisteme ilave edilmiştir. Toplanan örnekler HPLC de analiz edilmiştir.

37°C'ye ek olarak, aynı konsantrasyondaki formülasyonun salım profili +4°C'de (buzdolabında) de analiz edilmiştir. Sonuçlar zamana karşılık % açığa çıkan DTX miktarının grafiğe geçirilmesi ile sunulmuştur.

2.2.2.4.7. Laminar Kabin Altında Aseptik Şartlarda Polimerzom Formülasyonu Üretimi

Geliştirilen polimerzom formülasyonlarının, ileride yapılacak hücresel çalışmalarda kullanılabilmesi için steril olması gerekmektedir. Üretim sonrası liyofilizasyon işlemini takiben hücresel uygulama öncesinde toz halindeki polimerzomları PBS ya da serum içermeyen medium da disperse ederek 0,2 µm'lik

şırınga ucu filtrede süzme işlemi, genellikle nanopartiküllerin hücresel ve *in-vivo* uygulamalar öncesi steril edilme şeklidir. Ancak bu durum, partiküllerin ortalama partikül büyüklüğü her ne kadar 0,2 µm'den küçük olsa bile, filtreden tutulma nedeniyle doz değişimine neden olmaktadır.

Bu nedenle tez kapsamında üretilen bütün polimerzom formülasyonları laminar kabin altında üretilmiştir. Kullanılan PBS, cam malzemeler, polipropilen tüpler, şırınga ucu filtreler, mikropipet ve tipleri otoklavda 121 °C'de 30 dakika süresince sterilize edilmiş ve sonrasında kabin altında kullanılmıştır. Üretim esnasında kullanılan diyaliz membranlar, cam şırıngalar, teflon borular ise % 70 (h/h)'lik etanol çözeltisi ile 1 gün süresince temas edilerek sterilize edilmiş ve kullanım öncesinde steril distile su ile 3 kez yıkanarak etanol artıklarından kurtarılmıştır.

Kullanılan polimer çözeltisi 1 gece boyunca karıştırılarak moleküler seviyede çözünme sağlanmış ve polimerzom formülasyonu üretimi öncesinde laminar kabin altında steril 0,2 µm'lik şırınga ucu filtreden süzülerek mikroorganizmalardan kurtarılmış ve steril hale getirilmiştir.

Böylece kullanılan bütün malzemeler steril edilerek üretilen polimerzom formülasyonunda steril olması sağlanmıştır.

2.2.2.5. PEtOx-b-PLA Polimerzomlarının Hücrelerde Yapılan Çalışmaları

PNT1A (sağlıklı prostat dokusu hücresi) ve LNCaP (kanserli prostat dokusu hücresi) hücreleri % 10 fetal sıgır serumu içeren RPMI 1640 ortamında çoğaltılmıştır.

Hücre canlılığı WST-1 reajanı (suda çözünür tetrazolyum tuzu) yardımıyla kolorimetrik olarak, 0, 0,5, 1,0, 2,5 ve 5,0 µg/mL DTX enkapsüle edilmiş ve 0, 0,5, 2,0 ve 5,0 µg/mL BikDDA enkapsüle edilmiş, prostat kanserine spesifik hedeflendirici peptit taşıyan polimerzom formülasyonları ile muamele edilerek, LNCaP ve PNT1A

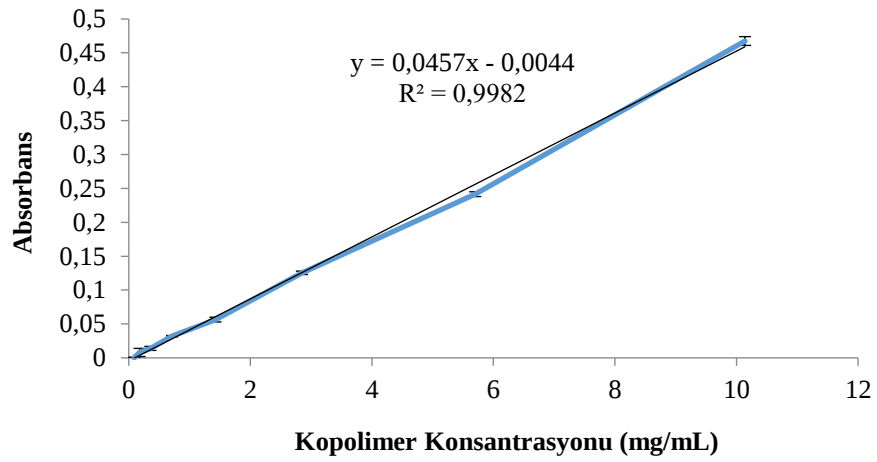
hücrelerinde tayin edilmiştir. Her bir kuyucuğunda 10×10^3 sayıda hücre içeren 96 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğu 490 nm dalga boyunda analiz edilmiştir.

Konfokal mikroskop i analizleri için öncelikle, molar olarak %10 peptit563 konjuge edilmiş kopolimerin kullanıldığı PEO₃₇-b-PLA₂₀₀ polimerzomları içerisine floresein (FITC) yüklenerek floresans ışıma kazandırılmıştır. Ardından, LNCaP ve PNT1A (24×10^3 hücre/kuyucuk) hücreleri % 1 FBS RPMI 1640 ve 60 µg/mL konsantrasyonda polimerzom formülasyonu içerecek şekilde inkübe edilmiştir. 4 saatlik inkübasyon sonunda, konfokal mikroskop tek tabakaları serum içermeyen ortam ile 3 kere 5 dakika süresince yıkanıp % 2 formaldehit ile fikse edilmiş ve 5 µg/mL DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) ile boyanarak Zeiss LSM 700 konfokal mikroskop ile görüntülenmiştir.

3. BULGULAR

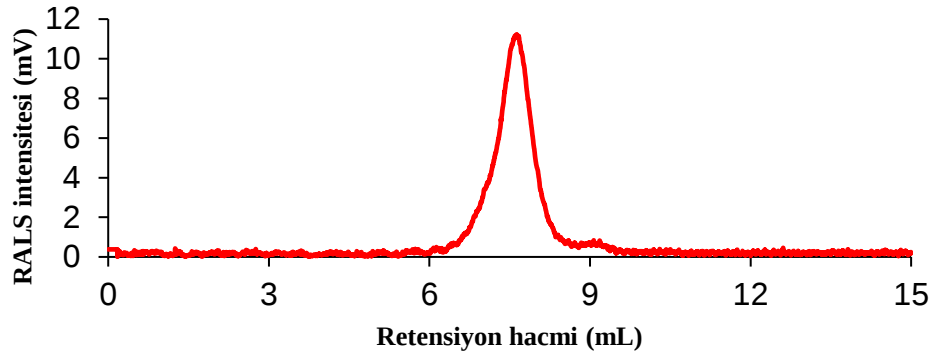
3.1. P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ Polimeri ile Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular

3.1.1. Sentezlenen P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ Esaslı Kopolimerlere Ait Karakterizasyon Bulguları



Şekil 3.1. P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ kopolimerinin, pH 2,0 PBS içerisindeki kalibrasyonu (n=3).

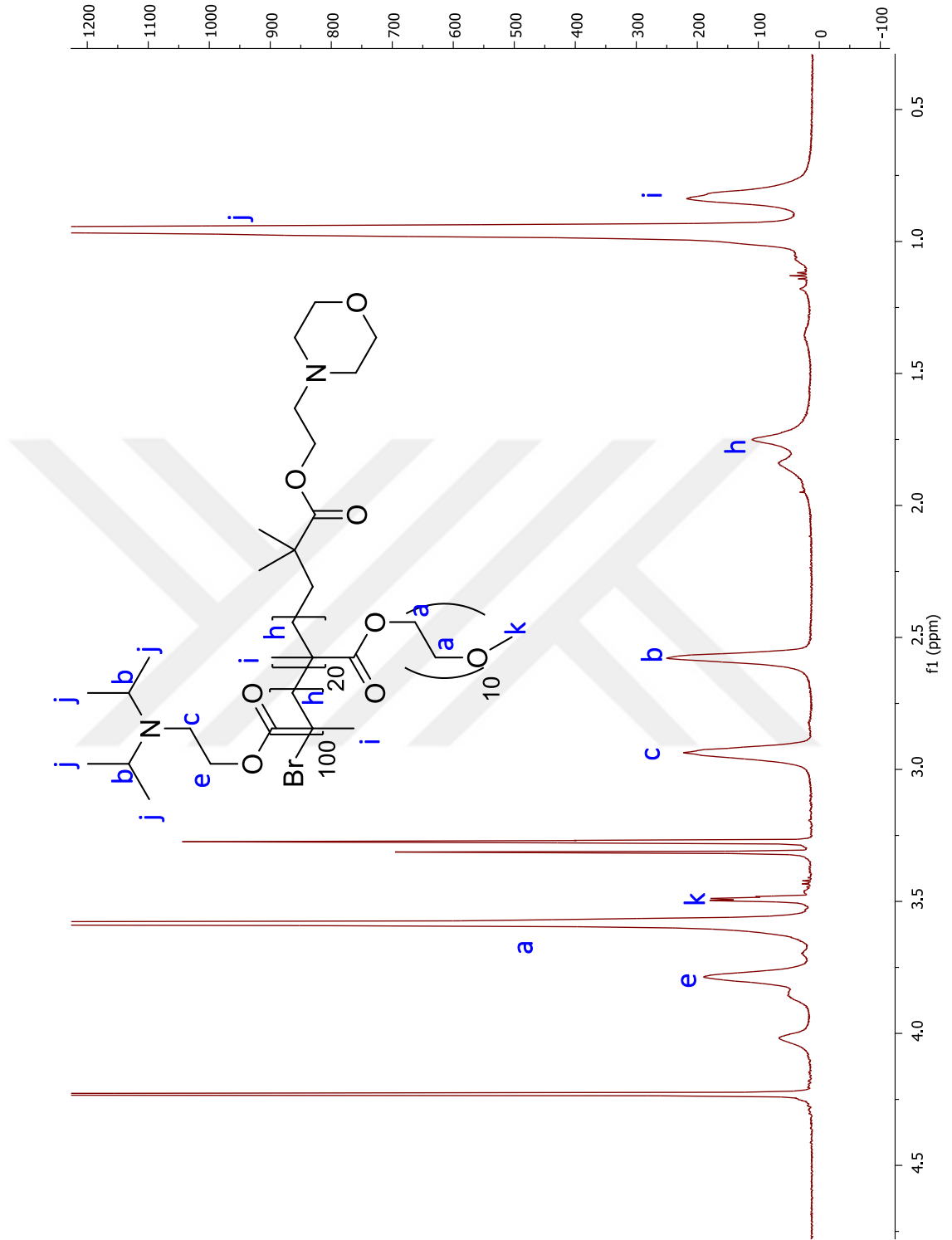
Şekil 3.1.'de sunulan P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ kopolimerinin kalibrasyon denkelimindeki R^2 değerinin 1'e yakın bulunması, elde edilen kalibrasyon denklemini kullanarak ulaşılabilecek kopolimer konsantrasyonunun yüksek doğrulukta olduğunu göstermektedir.



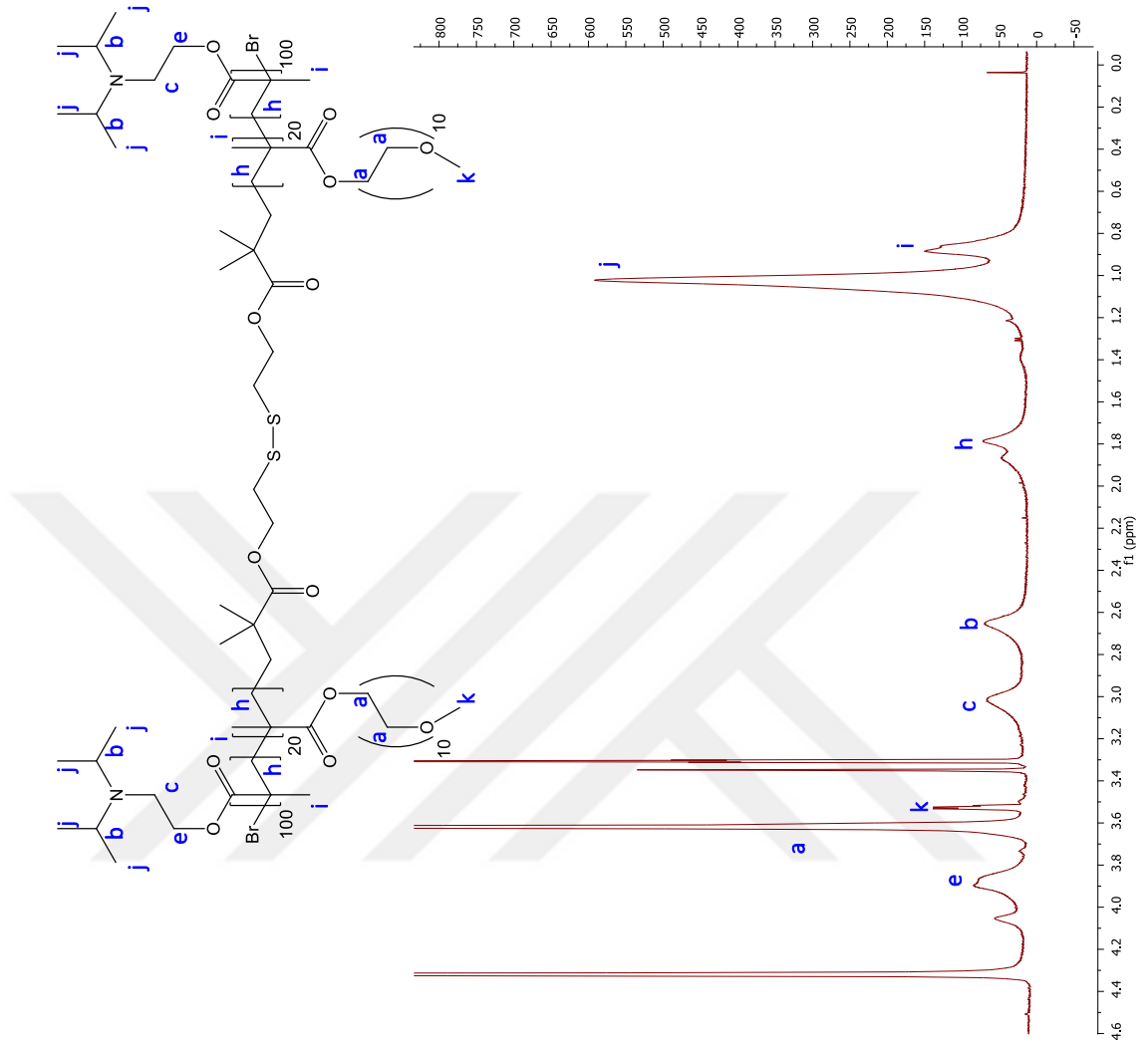
Şekil 3.2. P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ kopolimerine ait GPC analizi sonucu (PDI=1,2).

P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ kopolimerine ait, Şekil 3.2.'de sunulan GPC (Gel Permeation Chromatography, Jel Permeasyon Kromatografisi) analizi sonucu, kopolimerin molekül ağırlığı dağılımını göstermektedir. Elde edilen 1,2'lik PDI değeri, sentezlenen kopolimerin molekül ağırlığı dağılımının hayli dar olduğunu belirtmektedir.

Molekül ağırlığı dağılımının ardından, P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ kopolimerinin yapısındaki protonlara ait piklerin tanımlanması ile kopolimer yapısı aydınlatılmıştır. Bu amaçla Şekil 3.3.'te P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀'ün, Şekil 3.4.'te PDPA₁₀₀-P(OEG₁₀MA)₂₀-S-S-P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀'ün ve Şekil 3.5.'te ise . H₂N-P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀'ün yapısı ¹H-NMR ile aydınlatılmıştır.

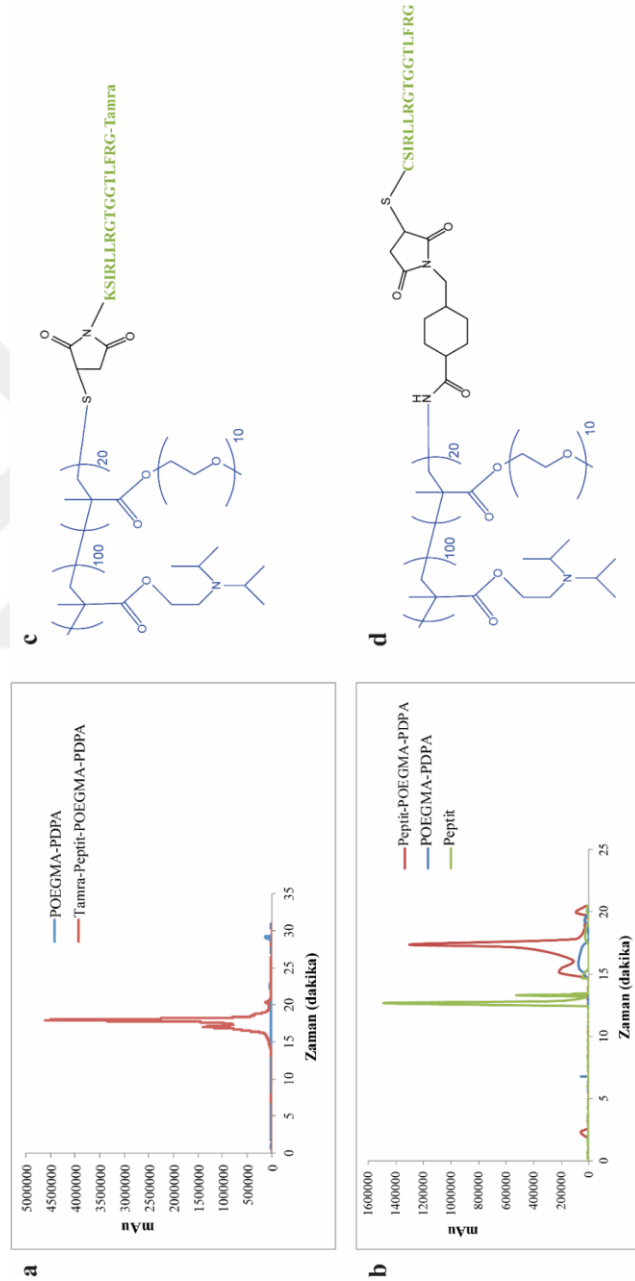


Şekil 3.3. $\text{P}(\text{OEG}_{10}\text{MA})_{20}\text{-PDPA}_{100}$ kopolimerine ait ^1H -NMR kromatogramı.



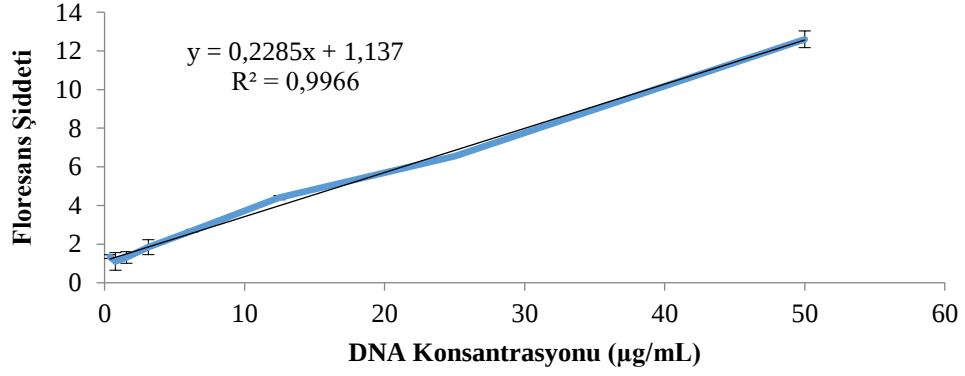
Şekil 3.4. PDPA₁₀₀-P(OEG₁₀MA)₂₀-S-S-P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ kopolimerine ait ¹H-NMR kromatogramı.

Yapı aydınlatılması sonrasında, farklı stratejiler ile konjuge edilen kopolimer-peptit konjugatının analizi için kopolimer, peptit ve kopolimer-peptit konjugatlarının HPLC ile tayini yapılmıştır. Elde edilen peptit-kopolimer konjugatlarının (kırmızı renkli pikler), kullanılan peptit ve kopolimere kıyasla farklı zamanda pikler verdiği tespit edilmiştir ve bu durum konjugasyonu ispatlamaktadır.



Şekil 3.6. P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ kopolimeri ile floresans Tamra etiketli maleimid-peptit 563 ve sistein-peptit563 konjugatlarının HPLC kromatogramları (a,b) ve kimyasal yapıları (c,d).

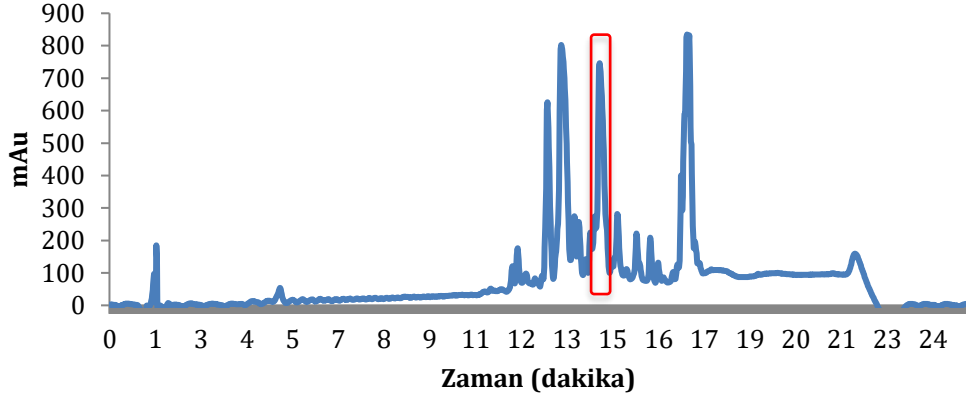
3.1.2. BikDDA Geninin Kalibrasyon Grafiği



Şekil 3.7. Cy5 ile işaretlenmiş BikDDA geninin, pH 7,4 PBS içerisindeki florimetrik kalibrasyonu (n=3). R² değerinin 1'e yakın bulunması, elde edilen kalibrasyon denklemini kullanarak ulaşılabilecek BikDDA konsantrasyonunun yüksek doğrulukta olduğunu belirtmektedir.

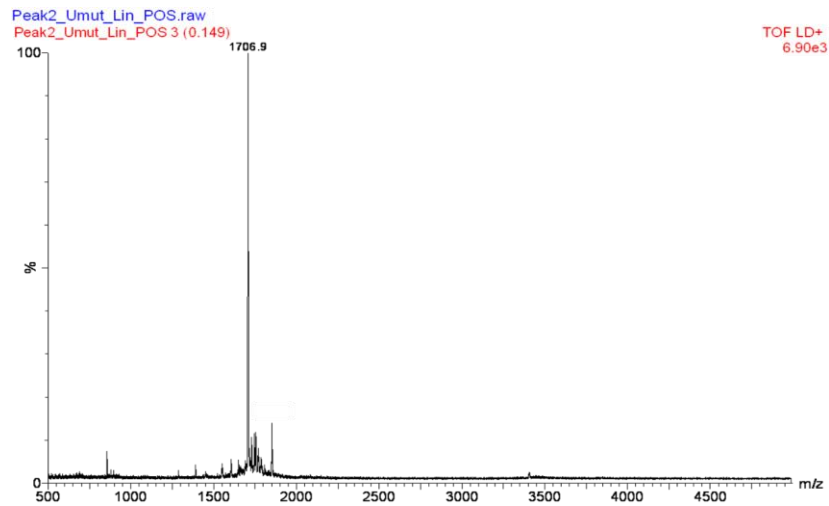
Şekil 3.7.'de sunulan, Cy5 ile işaretlenmiş BikDDA geninin kalibrasyon denkelimindeki R² değerinin 1'e yakın bulunması, elde edilen kalibrasyon denklemini kullanarak ulaşılabilecek BikDDA konsantrasyonunun yüksek doğrulukta olduğunu göstermektedir.

3.1.3. Sentezlenen Hedeflendirici Peptit Sekansına Ait Karakterizasyonuna ait Bulgular



Şekil 3.8. Sentezi gerçekleştirilen, saflaştırılmamış sistein uçlu peptit563'ün, üretim sonrasında ait preparatif HPLC pikleri.

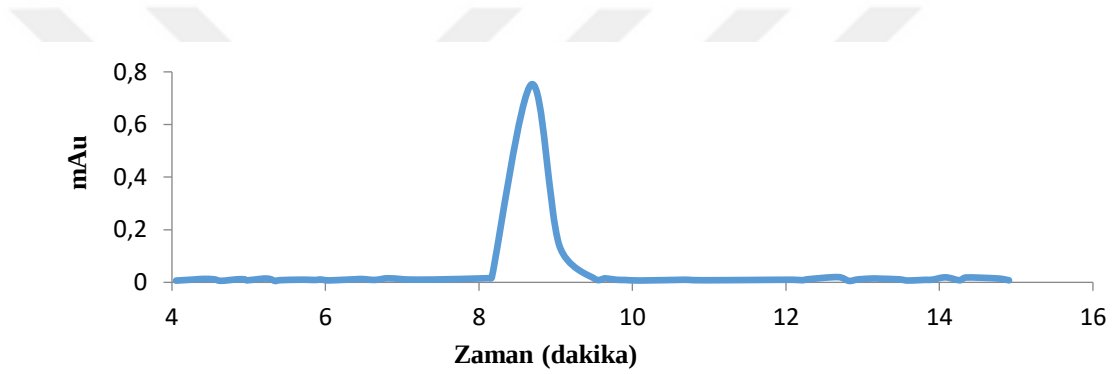
Konjuge edilecek, sistein uçlu peptit563'ün sentezi sonrasında yapılan preparatif HPLC analizi sonucuna ait kromatogram Şekil 3.8.'de sunulmuştur. Kromatogramda görülen her bir pike ait molekül büyüklüğü tayini yapılmış ve kırmızı ile işaretlenmiş pikin istenilen sekansa ait olduğu bulunmuş ve bu pike ait fraksiyonlar toplanmıştır.



Şekil 3.9. Sentezlenen sistein uçlu peptit563'ün molekül ağırlığını gösteren MALDI-TOF kromatogramı.

Şekil 3.9.'da Elde edilen pikin gösterdiği molekül ağırlığı, peptit563'ün molekül ağırlığı olan 1707 gram/mol ile uyduğu için istenilen peptit sekansının elde edildiği kabul edilmiştir.

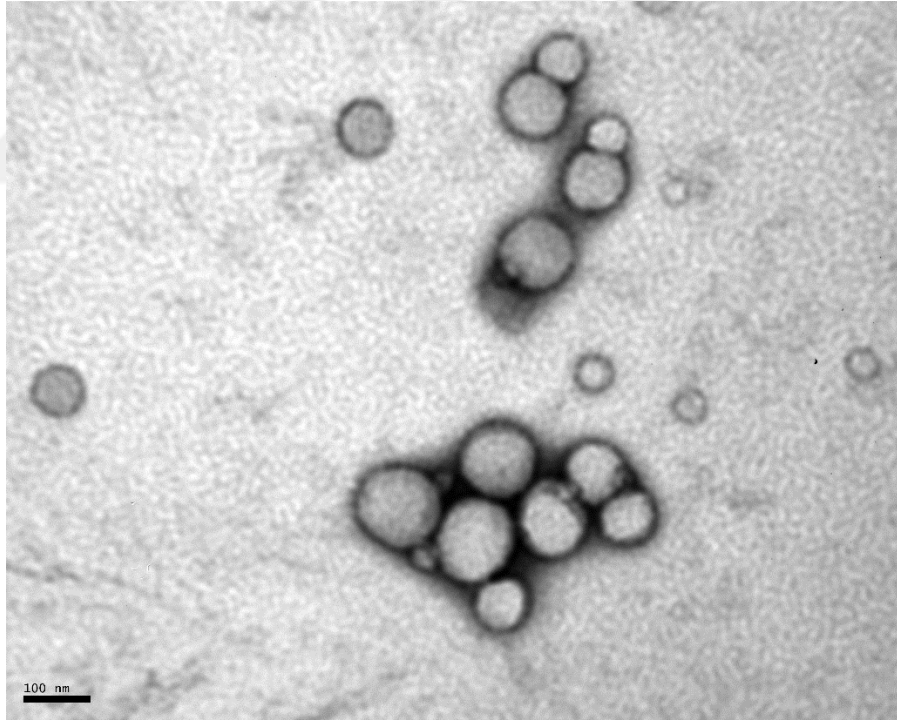
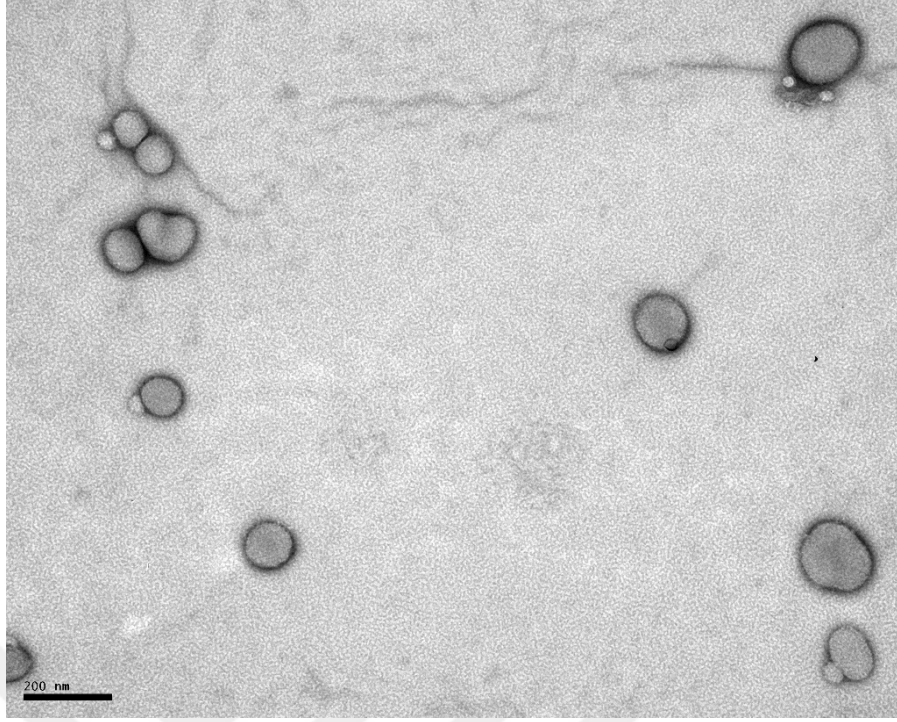
Bölüm 2.2.1.5.'te anlatıldığı şekilde preparatif HPLC ile saflaştırılarak elde edilen sistein uçlu peptit563'ün saflığının kontrol edilmesi için ise analitik HPLC analizi gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.10.'da sunulan analiz sonucunda tek bir pik gözlemlenmesi, kütle analizi sonuçları ile beraber yorumlandığında, sentezlenen peptit sekansının yüksek saflıkta olduğunu göstermektedir.



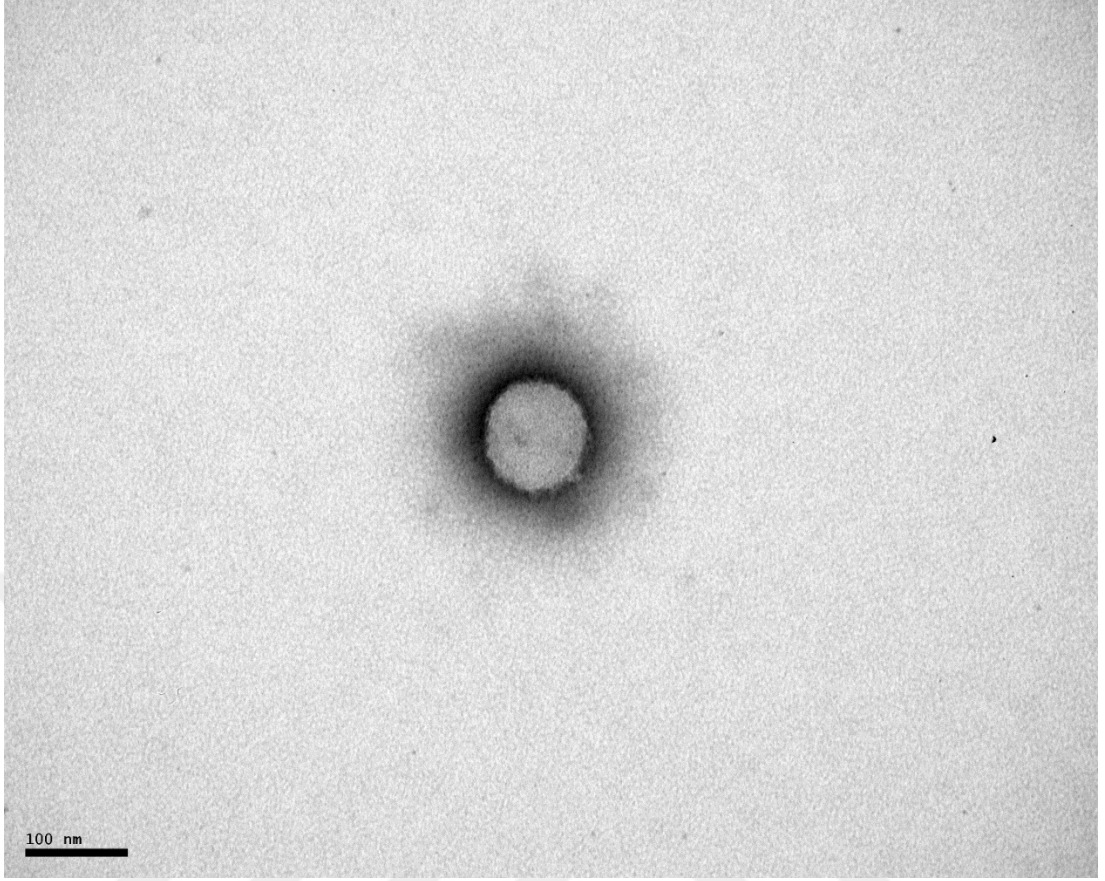
Şekil 3.10. Saflaştırma sonrası analitik HPLC ile saflığı kontrol edilen sistein uçlu peptit563'e ait kromatogram (280 nm).

3.1.4. P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ Esaslı Polimerzom Formülasyonlarına Ait Karakterizasyon Bulguları

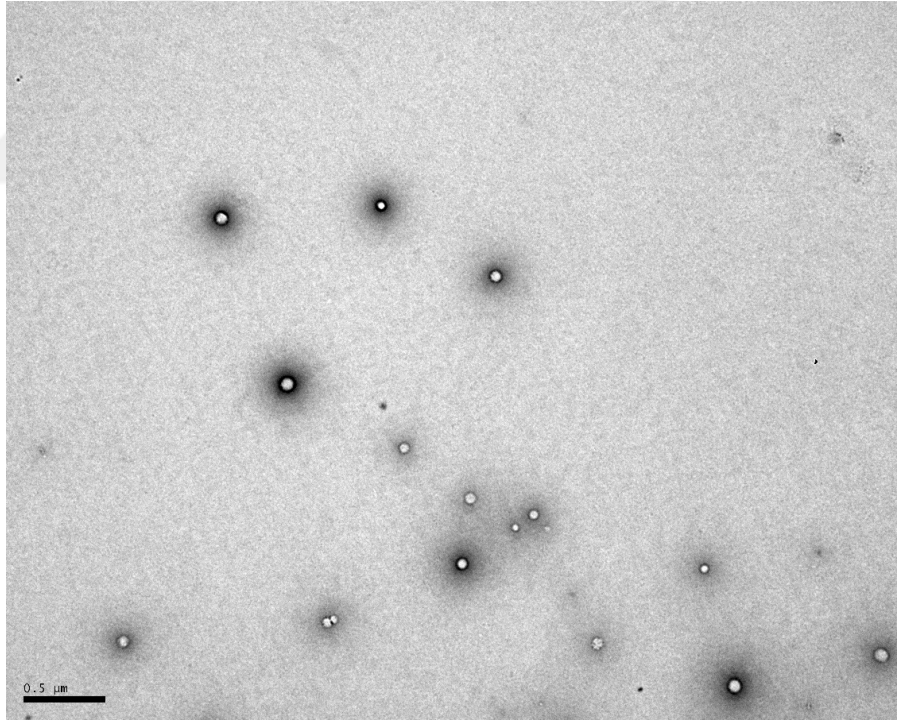
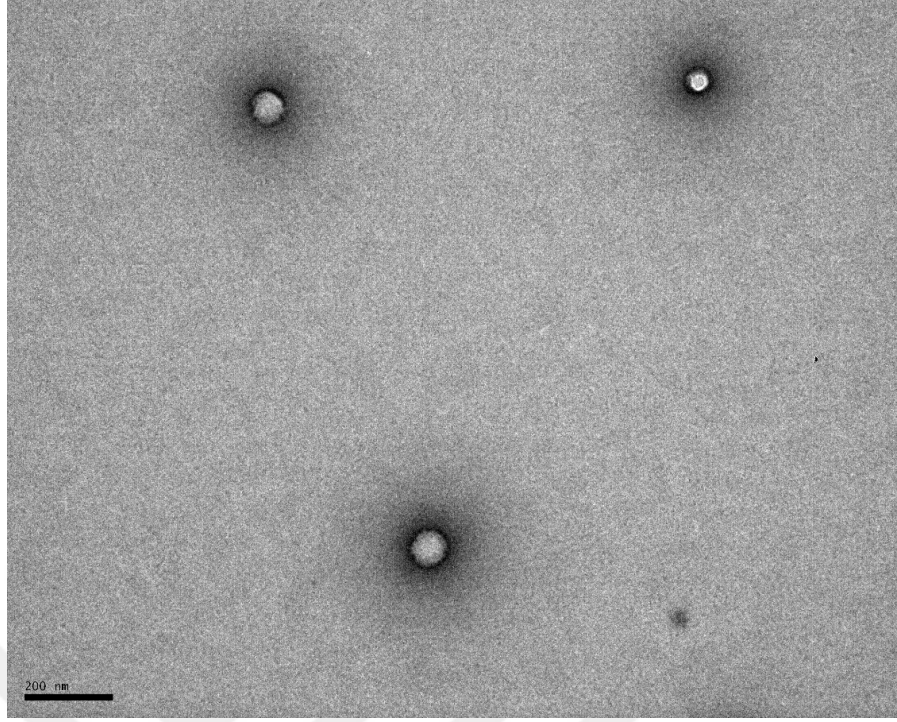
P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ kopolimerinden hareketle, pH değişimi yöntemi kullanılarak elde edilen yapıların küresel olduğu görülmüş (Şekil 3.11., Şekil 3.12 ve Şekil 3.13.) ve polimerzomların membran yapıları ise, PTA boyaması sonucu siyah renk ile kontrast elde edilerek gösterilmiştir.



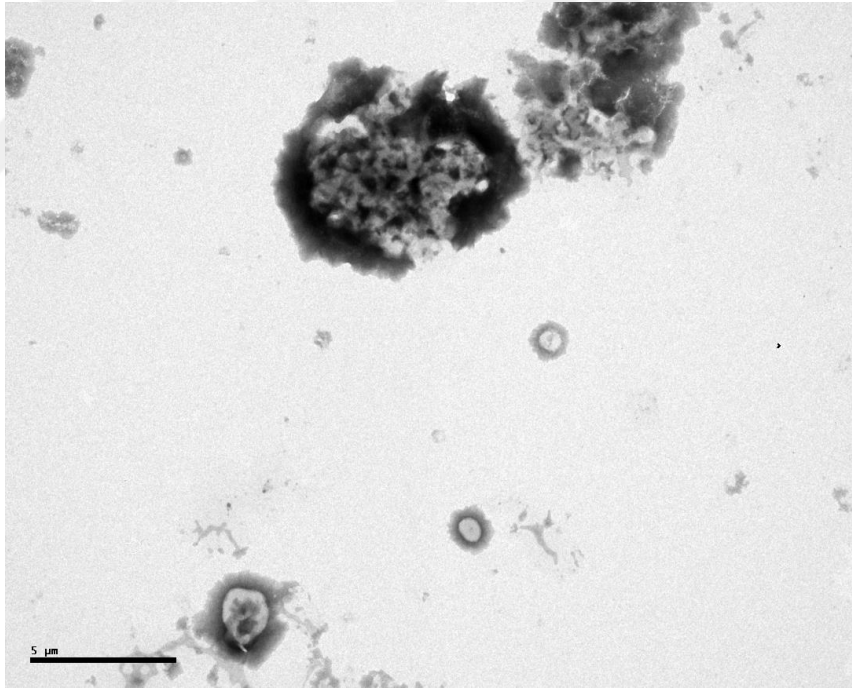
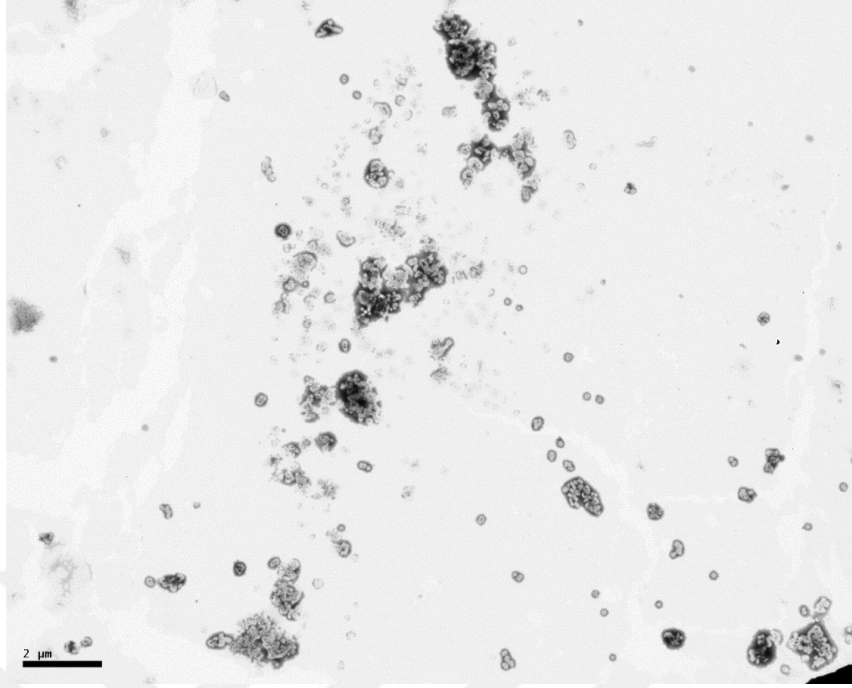
Şekil 3.11. pH değişimi yöntemiyle üretilmiş, boş $P(\text{OEG}_{10}\text{MA})_{20}\text{-PDPA}_{100}$ polimerzomlarına ait TEM görüntüleri.



Şekil 3.12. pH değışimi yöntemiyle üretilen BikDDA yüklenmiş $P(\text{OEG}_{10}\text{MA})_{20}\text{-PDPA}_{100}$ polimerzomuna ait TEM görüntüsü.

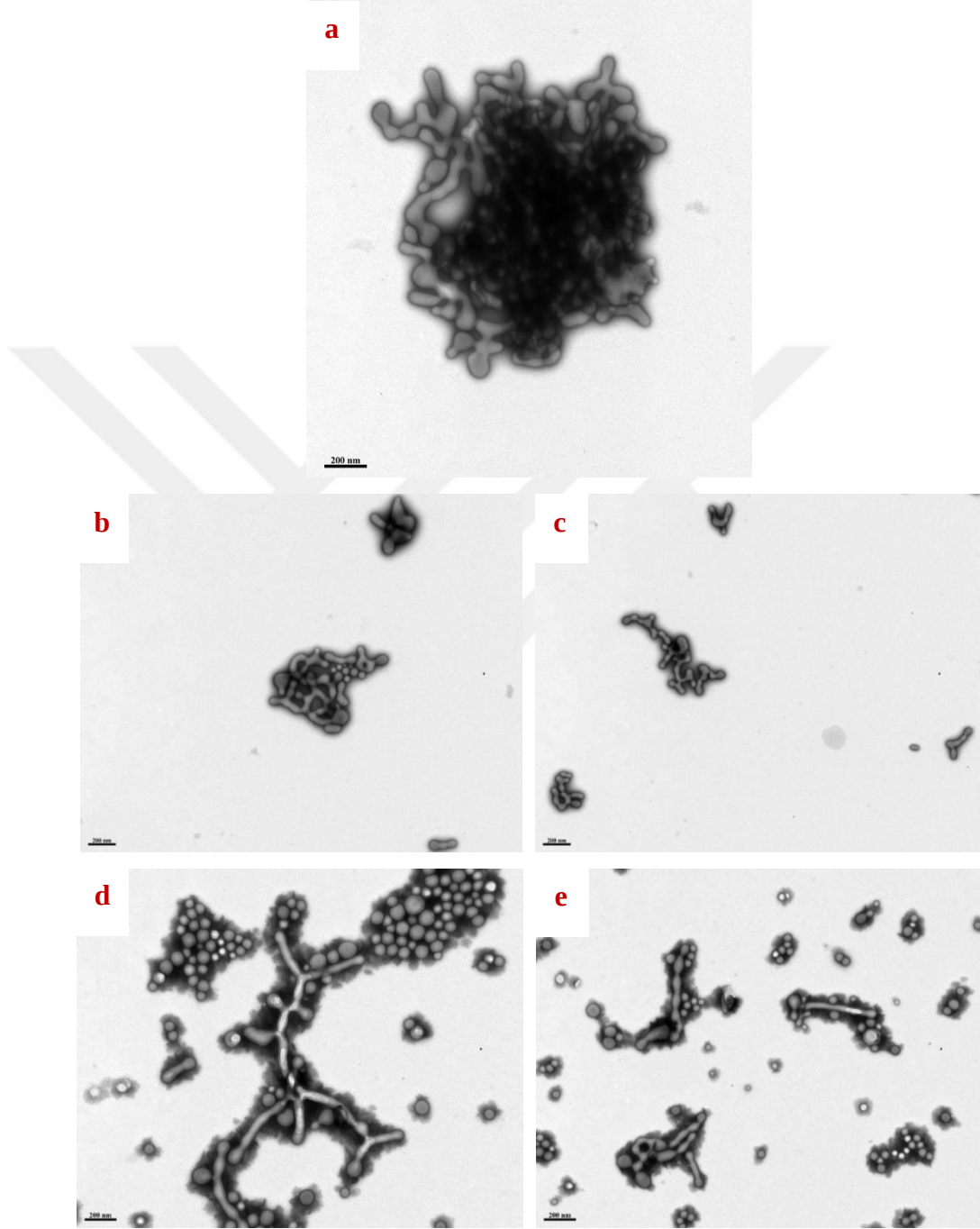


Şekil 3.13. pH değişimi yöntemiyle üretilen, peptit563 ile konjuge edilmiş $P(OEG_{10}MA)_{20}$ -PDPA₁₀₀ ile üretilen polimerzomlara ait TEM görüntüleri.



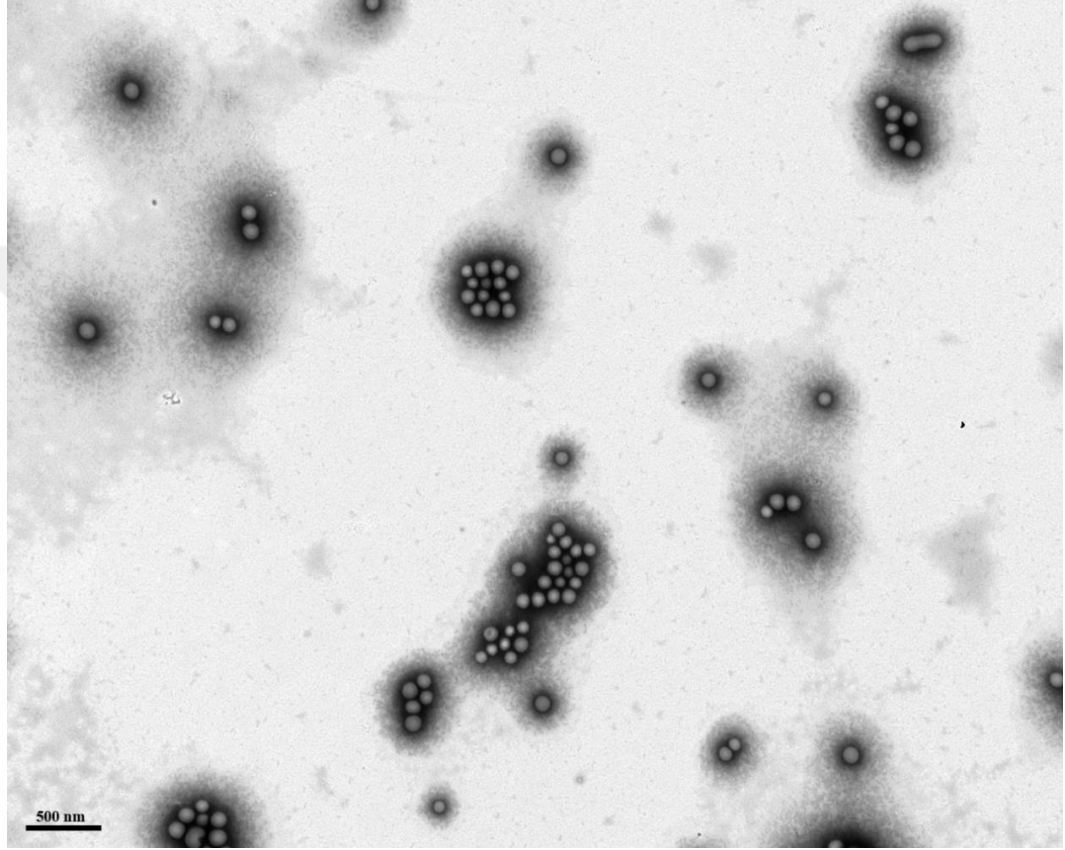
Şekil 3.14. P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₈₈ kopolimeri kullanılarak pH değişimi yöntemiyle elde edilen evrik yapılara ait TEM görüntüleri.

P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₈₈ kopolimerinden hareketle, pH değişimi yöntemi kullanılarak elde edilen yapıların küresel olmadığı görölmüş, aksine iç içe geçmiş halka görünömlü (high-genus) yapılara ve evrik yapılara ulaşıldığı tespit edilmiştir.



şekil 3.15. P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ kopolimeri kullanılarak film hidrasyonu yöntemi ile elde edilen yapılara ait TEM görüntöleri (a: 4 günlük manyetik karışırma sonrası, b: 6 günlük manyetik karışırma sonrası, c: 8 günlük manyetik karışırma sonrası, d: 10 günlük manyetik karışırma sonrası, e: 12 günlük manyetik karışırma sonrası).

Şekil 3.15.'te $P(OEG_{10}MA)_{20}$ -PDPA₁₀₀ kopolimerinden hareketle, film hidrasyonu yöntemi kullanılarak elde edilen yapıların morfolojisi gösterilmektedir. Elde edilen TEM görüntüleri, kopolimer film tabakasının hidrasyonu ile öncelikle çubuk yapılarının elde edildiği, karıştırma süresinin uzaması ile bu çubukların zamanla veziküler yapılara evrildiği ispatlanmıştır.



Şekil 3.16. $P(OEG_{10}MA)_{20}$ -PDPA₁₀₀ kopolimeri kullanılarak film hidrasyonu yöntemi ile elde edilen yapılara ait TEM görüntüsü (4 haftalık manyetik karıştırma sonrası).

Şekil 3.16.'da, 4 haftalık film hidrasyonu sonucunda elde edilen yapıların küresel olduğu görülmüş ve polimerzomların membran yapıları ise, PTA boyaması sonucu siyah renk ile kontrast elde edilerek gösterilmiştir.

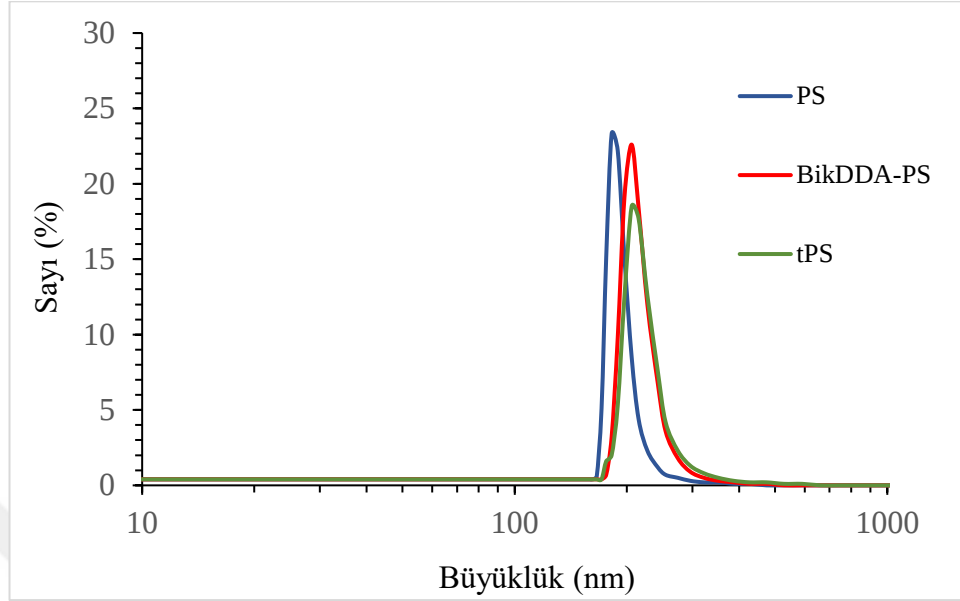
Çizelge 3.1. P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ kopolimeri kullanılarak pH değişimi yöntemi ile elde edilen polimerzom formülasyonlarına ait ortalama partikül büyüklüğü ve dağılımı verileri.

	Ortalama Partikül Büyüklüğü (nm)	Partikül Büyüklüğü Dağılımı (Polidispersite İndeksi)
Boş POEGMA-PDPA polimerzom formülasyonu (PS)	181.6±3.351	0.277±0.019
BikDDA yüklü POEGMA-PDPA polimerzom formülasyonu (BikDDA-PS)	191.5±4.424	0.426±0.011
Peptit563 ile hedeflendirilmiş POEGMA- PDPA polimerzom formülasyonu (tPS)	205.8±2.501	0.285±0.003

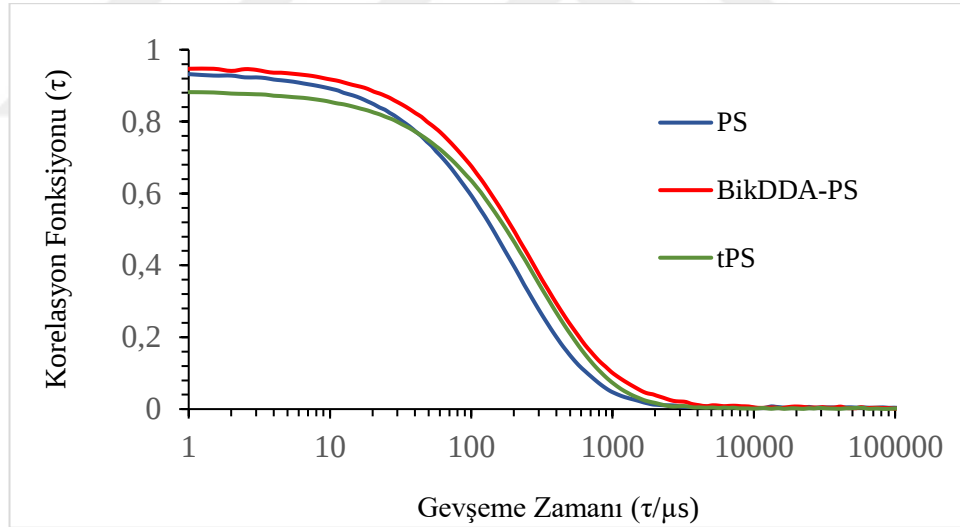
Çizelge 3.1.'de sunulmuş partikül büyüklüğü verileri, peptit563'ün P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀'e konjuge edilmesinden sonra toplam molekülün boyutunun artması sonucunda, elde edilen polimerzomların da daha büyüdüğü gözlemlenmiştir.

P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀'dan hareketle elde edilen boş BikDDA yüklü ve peptit563 aracılığıyla hedeflendirilmiş polimerzomlara ait ortalama partikül büyüklüğü dağılımı profillerini gösteren grafikler, Şekil 3.17.'de sunulmuştur. Elde edilen grafiklerden, polimerzomların hayli dar bir partikül büyüklüğü dağılımı gösterdiği anlaşılmaktadır.

a)



b)



Şekil 3.17. P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ kopolimeri kullanılarak pH değişimi yöntemi ile elde edilen polimerzom formülasyonlarına ait ortalama partikül büyüklüğü (a) ve korelasyon fonksiyonu (b) grafikleri.

Çizelge 3.2. P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ kopolimeri kullanılarak pH değişimi yöntemi ile elde edilen polimerzom formülasyonlarına ait enkapsülasyon etkinliği ve kopolimer konsantrasyonu verileri.

	BikDDA Konsantrasyonu (µg/mL)	Enkapsülasyon Etkinliği (%)	Kopolimer Konsantrasyonu (mg/mL)
BikDDA-PS	1,75±0,11	3,9±0,04	1,14±0,03
tPS	3,43±0,19	7,6±0,07	1,95±0,04

Çizelge 3.2’den de anlaşılacağı üzere, peptit563 konjuge kopolimerlerin, polimerzom formülasyonundan kullanılması ile enkapsülasyon etkinliğinin bir miktar arttığı gözlemlenmiştir.

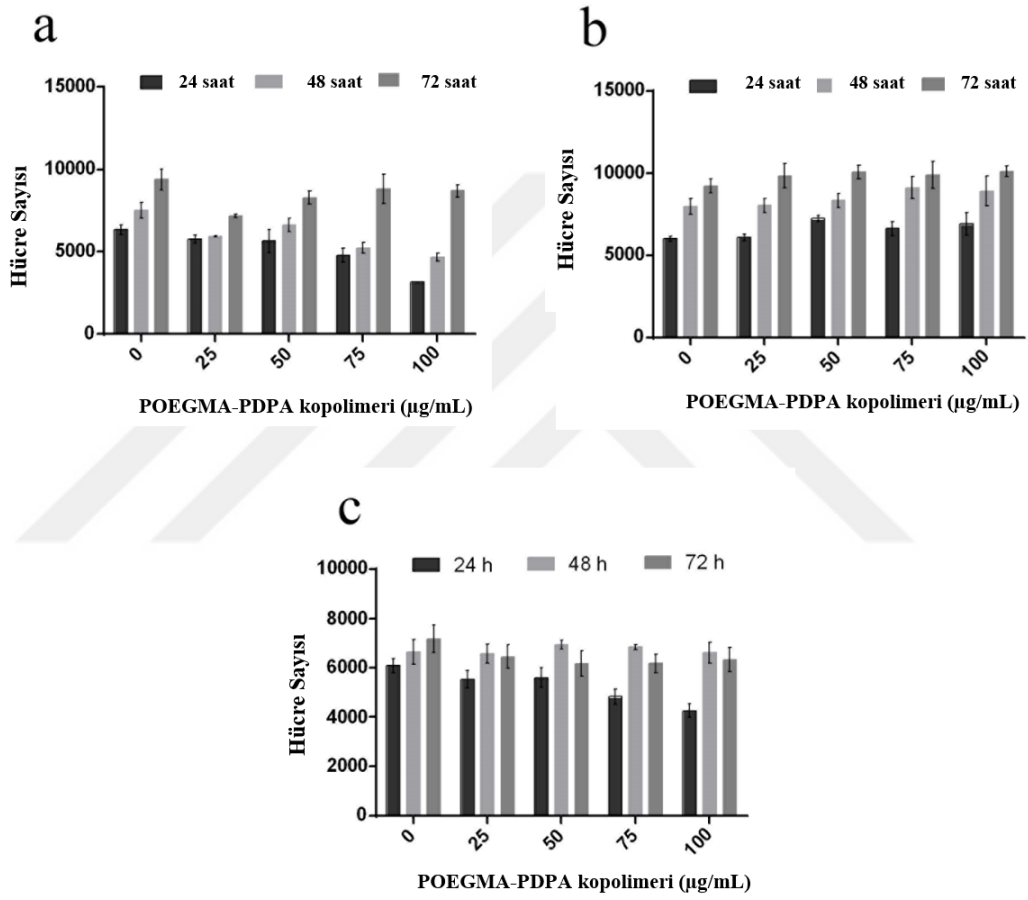
Çizelge 3.3.’te ise, polimerzomların tespit edilen zeta potansiyeli değerlerinin BikDDA enkapsülasyonu veya peptit563 modifikasyonu ile çok değişmediği görülmektedir.

Çizelge 3.3. P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ kopolimeri kullanılarak pH değişimi yöntemi ile elde edilen polimerzom formülasyonlarına ait zeta potansiyeli verileri.

	Zeta Potansiyeli (mV)
PS	-1,54±0,31
BikDDA-PS	-1,75±0,27
tPS	-2,49±0,18

3.1.4. P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ Esaslı Polimerzom Formülasyonlarının Hücrelerde Yapılan Çalışmalarına Ait Bulgular

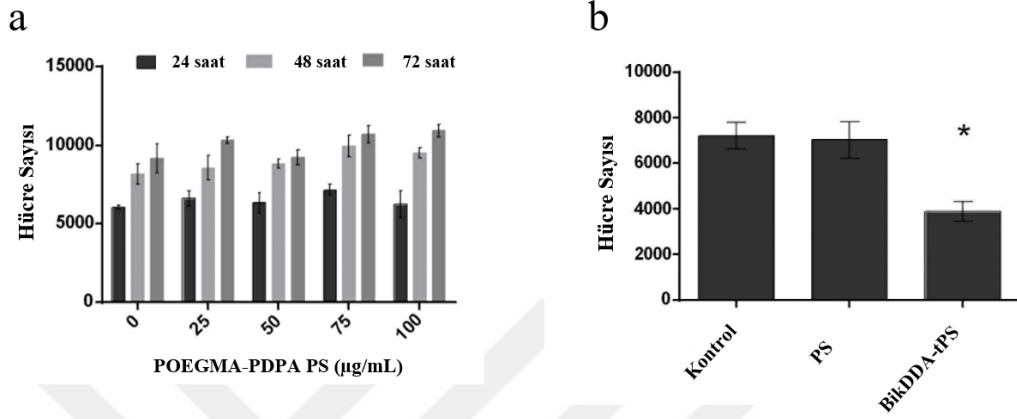
Öncelikle, polimerzom üretimi için sentezlenen kopolimerin hücreler üzerinde herhangi bir toksik etkisinin olup olmadığını anlayabilmek için, hücre canlılığı analizleri yapılmıştır.



Şekil 3.18. PNT1A (a), LNCaP (b) ve HUVEC (c) hücrelerinde MTS analizi aracılığıyla yapılan, P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ kopolimerine ait hücre canlılık testi sonuçları.

Şekil 3.18.'deki grafikler incelendiğinde, P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ kopolimerinin, hücreler üzerinde toksik etki yaratıp canlılıklarını azaltmadığı tespit edilmiştir.

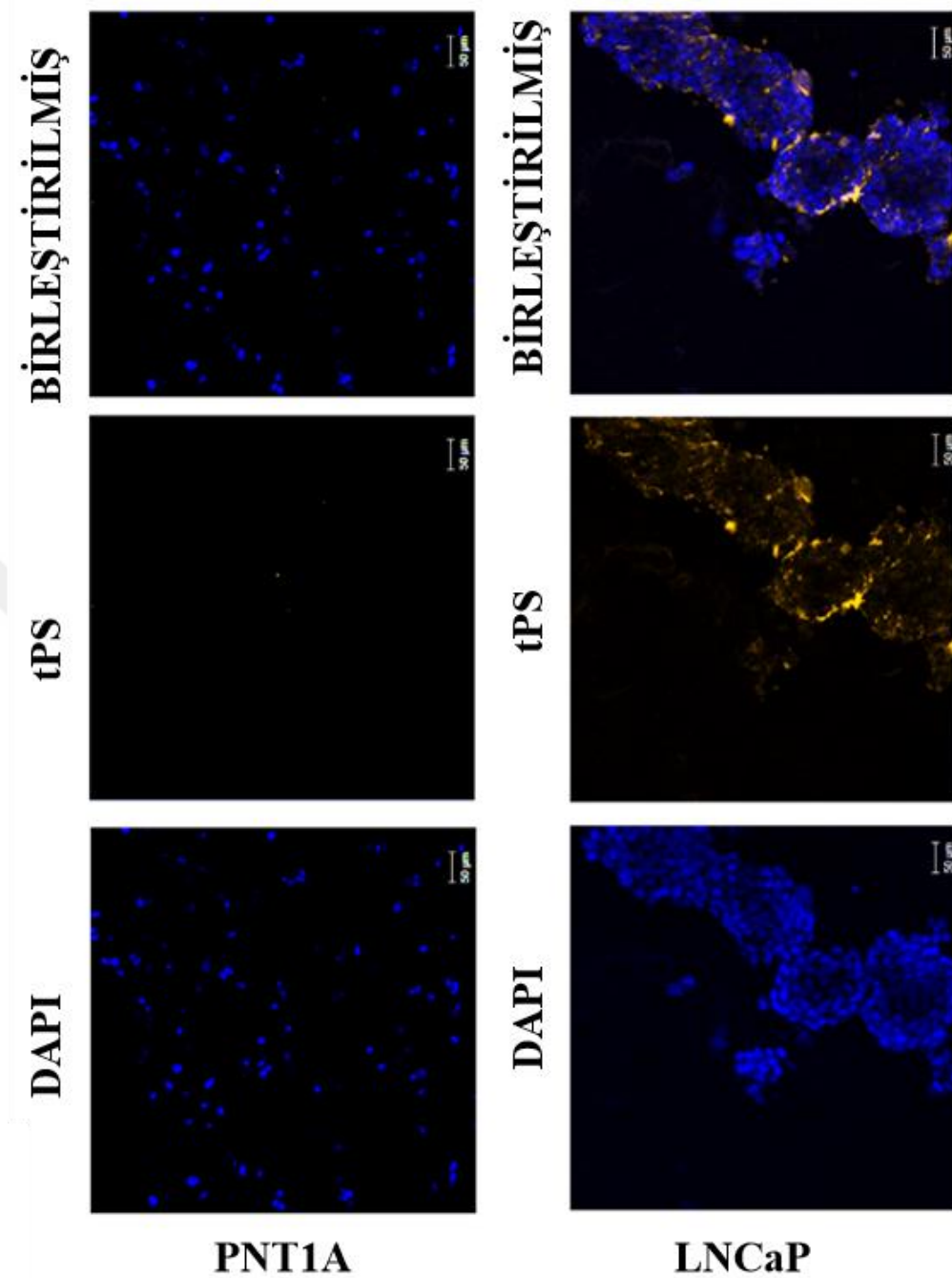
Sonrasında ise, P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀'den hareketle üretilen hedeflendirilmiş ve BikDDA yüklenmiş polimerzom formülasyonunun LNCaP hücreleri üzerindeki canlılık testi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.19. Hedeflendirmenin yapılacağı LNCaP hücrelerinde MTS analizi aracılığıyla yapılan, P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ polimerzom formülasyonuna ait hücre canlılık testi sonuçları (a). BikDDA yüklü hedeflendirilmiş polimerzomların LNCaP hücreleri üzerindeki hücre canlılığı testi sonuçları (b) (* anlamlı farkı göstermektedir P<0,05).

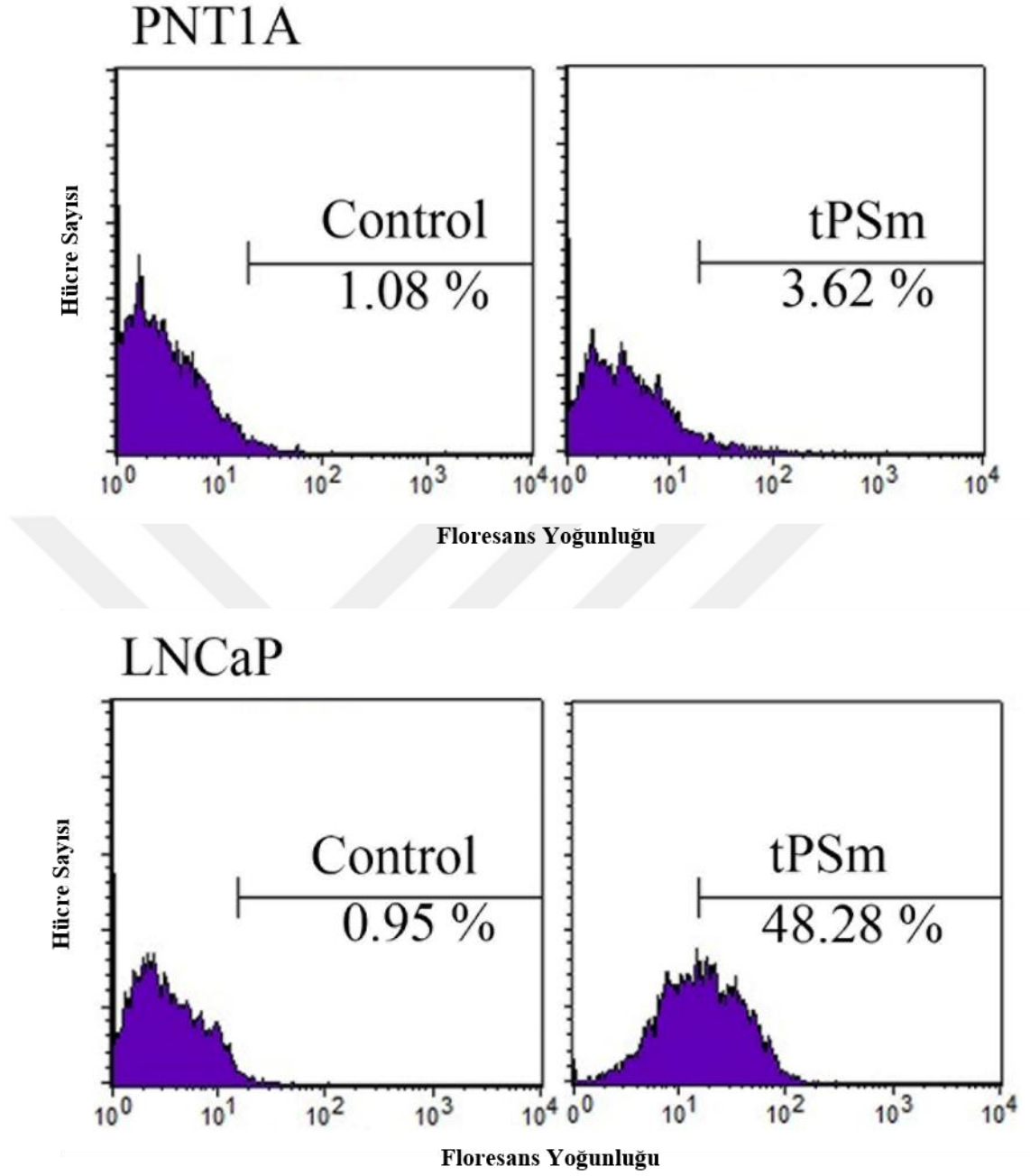
Şekil 3.19.'da, üretilen polimerzomların, P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ kopolimeri gibi hücre canlılığı üzerinde toksik etki göstermediği ancak BikDDA yüklü hedeflendirilmiş polimerzomların ise hücre canlılığını neredeyse yarıya indirdiği gözlemlenmiştir.

Üretilen hedeflendirilmiş polimerzomların, kanser hücreleri tarafından spesifik alımının gösterilmesi amacıyla, Şekil 3.20'de sonuçları verilen konfokal mikroskopi analizi ve Şekil 3.12.'de sonuçları verilen akış sitometrisi ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.20. Peptit563 ile prostat kanserine spesifik hedeflendirilmiş $P(OE_{10}GMA)_{20}-PDPA_{100}$ polimerzomlarının, 72 saatlik inkübasyon sonrasında PNT1A ve LNCaP hücreleri tarafından alınımını gösteren konfokal mikroskop görüntüleri.

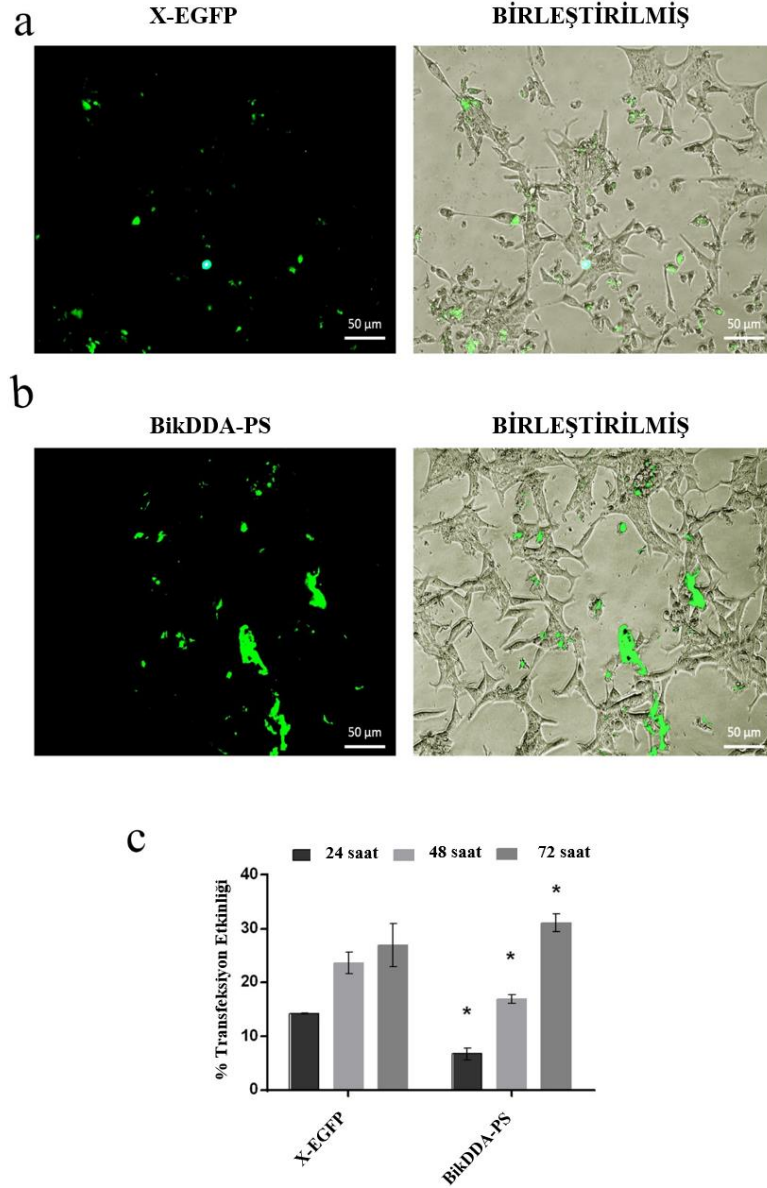
Elde edilen mikroskop görüntüleri, hedeflendirilmiş polimerzomların (sarı renkli) sağlıklı hücrelere kıyasla, kanserli hücreler tarafından daha fazla miktarda hücre içine alındığını göstermektedir.



Şekil 3.21. Peptit563 ile prostat kanserine spesifik hedeflendirilmiş $P(OE_{10}GMA)_{20}$ -PDPA₁₀₀ polimerzomlarının PNT1A ve LNCaP hücreleri tarafından alımını gösteren akış sitometrisi verileri.

Akış sitometrisi değerleri, konfokal mikroskop görüntüleri ile uyuşmakta ve LNCaP hücrelerinin, peptit563 aracılığıyla hedeflendirilmiş $P(OEG_{10}MA)_{20}$ -PDPA₁₀₀ polimerzomlarını, PNT1A hücrelerine göre çok daha fazla miktarda hücre içine aldığını göstermektedir.

P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ polimerzomları ile ilgili son olarak, üretilen polimerzomların transfeksiyon etkinliği, piyasada transfeksiyon ajanı olarak kullanılan X-tremeGENE ile, Şekil 3.22.'de sonuçları sunulduğu şekilde kıyaslanmıştır. Sonuç olarak P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ polimerzomlarının, X-tremeGENE'den daha etkili transfeksiyon sağladığı görülmüştür.

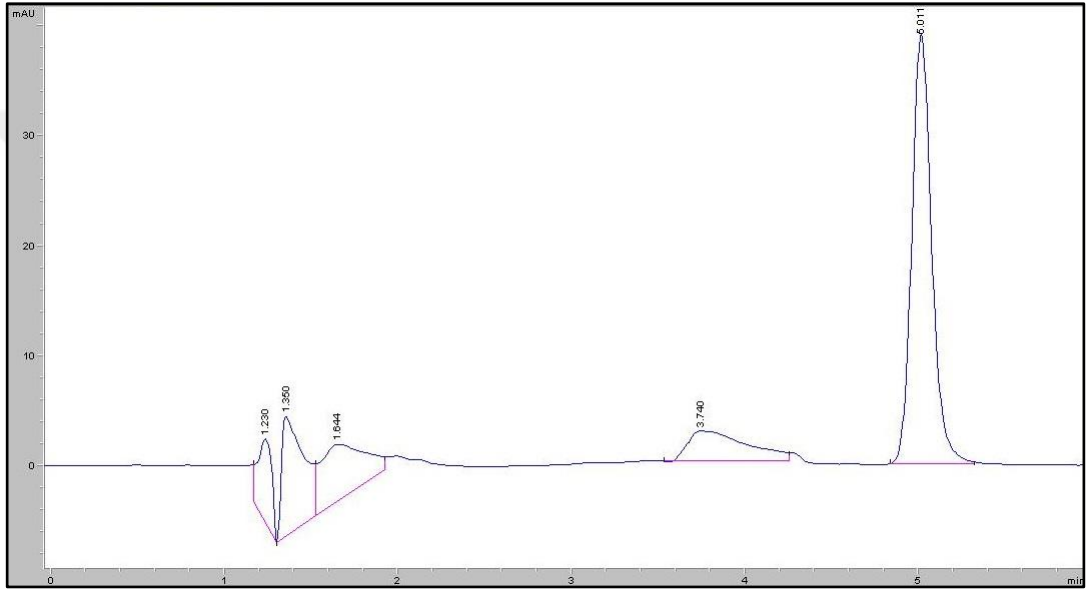


Şekil 3.22. Piyasada transfeksiyon ajanı olarak kullanılan X-tremeGENE-GFP reajanı ile EGFP kodlanmış BikDDA yüklü P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ polimerzomlarının LNCaP hücreleri üzerindeki transfeksiyon etkinliği verileri (* anlamlı farkı göstermektedir P<0,05) (Görüntüler 20× objektif ile floresans mikroskop ile elde edilmiştir).

3.2. PEtOx₃₇-PLA₂₀₀ Polimeri ile Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular

3.2.1. Dosetakselin Kalibrasyonu ve Validasyonuna Ait Bulgular

Öncelikle DTX'in HPLC ile analiz yöntemi geliştirilmiş ve elde edilen kromatogram Şekil 3.23.'te sunulmuştur.

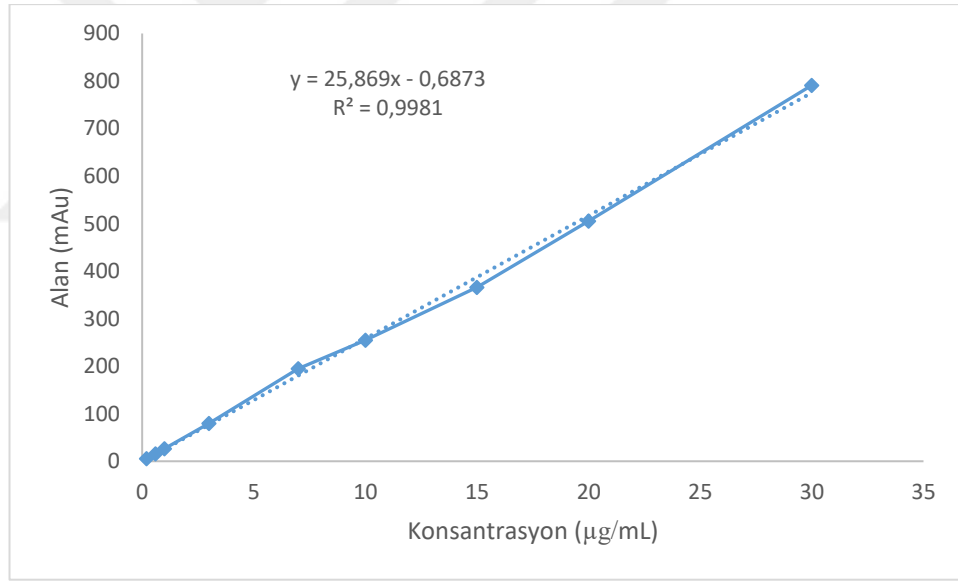


Şekil 3.23. Dosetaksel trihidratın HPLC kromatogramı (5. dakikadaki pik DTX'e aittir).

Elde edilen DTX pikinin yakınında bir pikin görülmemesi, yöntemin ayırma özelliğine işaret etmektedir. Elde edilen bu DTX pikinin tayin yöntemine ait parametrelerin değerleri Çizelge 3.4.'te sunulmuştur.

Çizelge 3.4. Dosetaksel trihidratın HPLC ile yapılan miktar tayini çalışmasına ait parametreler.

HPLC Bileşeni	Kullanılan Bileşen
Mobil faz	Asetonitril : Su (54:46) (h/h)
Akış hızı	0,7 mL/dakika
Enjeksiyon hacmi	20 µL
Kolon	ACE 5 C18 5µm 3x250mm HPLC kolonu
Dedektör	DAD dedektör, 229 nm
Sıcaklık	25°C



Şekil 3.24. Dosetaksel trihidratın pH 7,4 PBS içindeki kalibrasyon grafiği.

Şekil 3.24.'te sunulan, DTX'e ait kalibrasyon denkelimindeki R^2 değerinin 1'e yakın bulunması, elde edilen kalibrasyon denklemi kullanılarak ulaşılabacak DTX konsantrasyonunun yüksek doğrulukta olduğunu göstermektedir.

Bu aşamadan sonra ise, DTX'in miktar tayini yönteminin validasyonuna ait çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.5. Dosetaksel trihidratın kalibrasyon doğrusuna ait parametreler.

Ortam	pH 7,4 PBS Tamponu
Eğim	25,869
Kesişim	0,6873
Doğru Denklemi	$y=25,869x-0,6873$
Determinasyon katsayısı (r^2)	0,9981

Çizelge 3.5.'te 1'e çok yakın bir r^2 değerinin bulunması, kalibrasyon denkleminin yüksek doğrulukta sonuçlar verdiğine işaret etmektedir.

Çizelge 3.6. Dosetaksel trihidratın pH 7,4 PBS içerisindeki LOD ve LOQ değerleri.

	pH 7,4 PBS
Teşhis Sınırı (LOD) ($\mu\text{g/mL}$)	0,127
Tayin Sınırı (LOQ) ($\mu\text{g/mL}$)	0,386

Çizelge 3.6.'da sunulan LOD ve LOQ değerlerinin, kalibrasyon denkleminde kullanılan konsantrasyon aralığında olduğu tespit edilmiştir.

Sonrasında ise, Çizelge 3.7., Çizelge 3.8. ve Çizelge 3.9.'da sonuçları sunulduğu şekilde, yöntemin doğruluğu, tekrar edilebilirliği ve kesinliğine dair analizler gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.7. Dosetaksel trihidratın tayin yöntemine ait doğruluk bulguları.

1 µg/mL		3 µg/mL		10 µg/mL	
Konsantrasyon (µg/mL)	% Geri Elde	Konsantrasyon (µg/mL)	% Geri Elde	Konsantrasyon (µg/mL)	% Geri Elde
1,008438672	100,8438672	3,103610499	103,4536833	10,32074297	103,2074297
1,012304302	101,2304302	3,080416715	102,6805572	10,07720824	100,7720824
1,016169933	101,6169933	3,092013607	103,0671202	10,32847424	103,2847424
1,008438672	100,8438672	3,061088562	102,0362854	10,27435541	102,7435541
1,004573041	100,4573041	2,99537284	99,84576134	10,28208667	102,8208667
1,00070741	100,070741	2,983775948	99,45919827	9,984433105	99,84433105
Ortalama	100,8438672	Ortalama	101,7571009	Ortalama	102,1121677
% Geri Elde		% Geri Elde		% Geri Elde	
Standart	0,546682733	Standart	1,700519532	Standart	1,443214805
Sapma		Sapma		Sapma	
% Bağlı	0,542108061	% Bağlı	1,67115564	% Bağlı	1,413362224
Sapma		Sapma		Sapma	

Çizelge 3.7.'de bağlı standart sapmaların % 2'den az bulunduğu ve buna bağlı olarakta yöntemin doğruluğunun yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 3.8. Dosetaksel trihidratın tayin yöntemine ait tekrarlanabilirlik bulguları.

1 µg/mL		3 µg/mL		10 µg/mL	
Konsantrasyon (µg/mL)	Alan (mAu)	Konsantrasyon (µg/mL)	Konsantrasyon (µg/mL)	Alan (mAu)	% Geri Elde
1,008438672	79,6	3,103610499	1,008438672	79,6	103,2074297
1,012304302	79	3,080416715	1,012304302	79	100,7720824
1,016169933	79,3	3,092013607	1,016169933	79,3	103,2847424
1,008438672	78,5	3,061088562	1,008438672	78,5	102,7435541
1,004573041	76,8	2,99537284	1,004573041	76,8	102,8208667
1,00070741	76,5	2,983775948	1,00070741	76,5	99,84433105
1,008438672	Ortalama	3,052713028	1,008438672	Ortalama	102,1121677
	% Geri Elde			% Geri Elde	
0,005466827	Standart	0,051015586	0,005466827	Standart	1,443214805
	Sapma			Sapma	
0,542108061	% Bağlı	1,67115564	0,542108061	% Bağlı	1,413362224
	Sapma			Sapma	

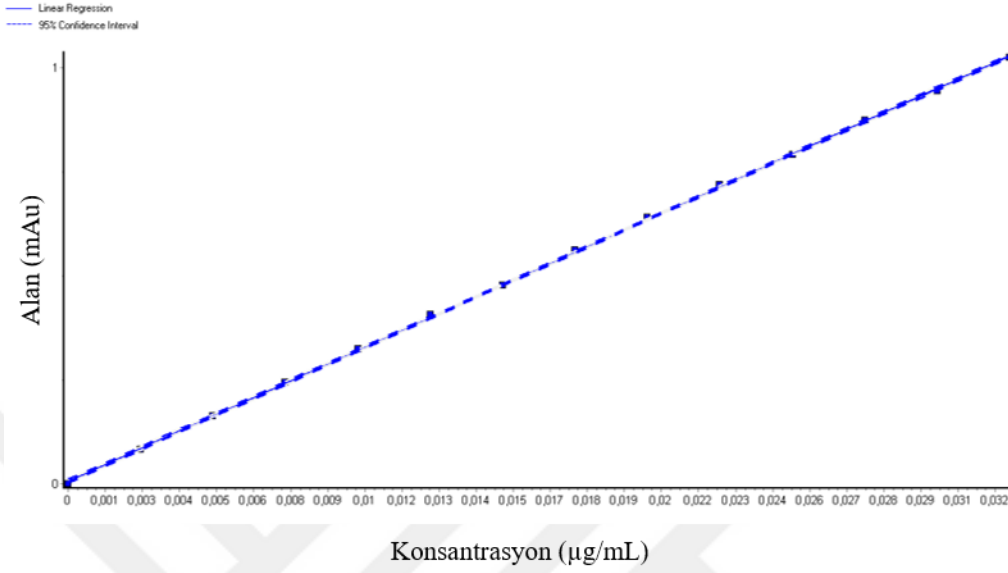
Çizelge 3.8.'de bağıl standart sapmaların % 2'den az bulunduğu ve buna bağlı olarakta yöntemin doğruluğunun yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 3.9. Dosetaksel trihidratın tayin yöntemine ait ara kesinlik bulguları.

Gün	Alan (mAu)	Kons. (µg/mL)	Gün	Alan (mAu)	Kons. (µg/mL)	Gün	Alan (mAu)	Kons. (µg/mL)
1,00	25,40	1,01	1,00	79,60	3,10	1,00	266,30	10,32
1,00	25,50	1,01	1,00	79,00	3,08	1,00	262,00	10,15
1,00	25,60	1,02	1,00	79,30	3,09	1,00	266,50	10,33
1,00	25,40	1,01	1,00	78,50	3,06	1,00	265,10	10,27
1,00	25,30	1,00	1,00	76,80	3,00	1,00	265,30	10,28
1,00	25,20	1,00	1,00	76,50	2,98	1,00	257,60	9,98
2,00	25,40	1,01	2,00	79,40	3,10	2,00	265,40	10,29
2,00	25,30	1,00	2,00	79,60	3,10	2,00	266,30	10,32
2,00	25,60	1,02	2,00	79,20	3,09	2,00	265,30	10,28
2,00	25,40	1,01	2,00	78,50	3,06	2,00	266,00	10,31
2,00	25,50	1,01	2,00	76,70	2,99	2,00	265,30	10,28
2,00	25,20	1,00	2,00	76,40	2,98	2,00	257,60	9,98
3,00	25,40	1,01	3,00	79,30	3,09	3,00	265,40	10,29
3,00	25,50	1,01	3,00	78,50	3,06	3,00	266,30	10,32
3,00	25,60	1,02	3,00	76,80	3,00	3,00	265,30	10,28
3,00	25,40	1,01	3,00	76,50	2,98	3,00	257,60	9,98
3,00	25,30	1,00	3,00	79,40	3,10	3,00	265,40	10,29
3,00	25,20	1,00	3,00	79,60	3,10	3,00	266,30	10,32
Ortalama		1,01	Ortalama		3,05	Ortalama		10,24
Standart		0,01	Standart		0,05	Standart		0,12
Sapma			Sapma			Sapma		
% Bağlı		0,51	% Bağlı		1,63	% Bağlı		1,20
Sapma			Sapma			Sapma		

Çizelge 3.9.'da bağlı standart sapmaların % 2'den az bulunduğu ve buna bağlı olarakta yöntemin doğruluğunun yüksek olduğu tespit edilmiştir.

DTX miktar tayini yönteminin validasyonuna dair gerçekleştirilen son analiz, yöntemin doğrusallığının tespit edilmesine yönelik olmuştur.



Şekil 3.25. DTX'in pH 7,4 PBS tamponu içerisindeki miktar tayinine ilişkin doğrusallık grafiği.

Çizelge 3.10. DTX'in miktar tayini yöntemine ait doğrusallık parametreleri.

Parametre	Değer
Eğim	25,302
Kesişim	-0,9261
Korelasyon katsayısı (r)	0,9992
Determinasyon katsayısı (r ²)	0,9986
Regresyon doğrusundan sapmaların standart hatası (Sy.x)	0,0064

Çizelge 3.10.'da sunulan r ve r² değerlerinin 1'e yakın oluşu ve regresyon doğrusundan sapmaların standart hatasının düşük olması, yöntemin doğrusallığına işaret etmektedir.

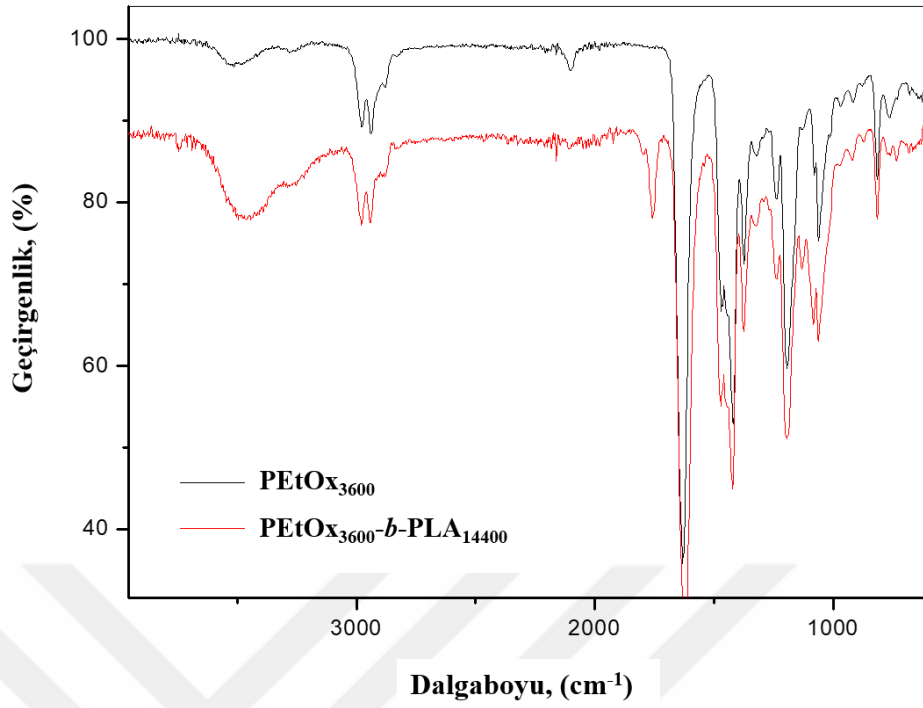
3.2.2. PEtOx-*b*-PLA Kopolimerinin Karakterizasyonu ve Blok Uzunluklarının Belirlenmesine Ait Bulgular

PEtOx-*b*-PLA kopolimerleri ile ilk olarak farklı molekül ağırlığı ve farklı blok uzunluklarında çalışmalar yapılmış ve hangi molekül ağırlığı ve blok uzunluklarında hangi morfolojideki yapıların elde edildiği, sonuçları Çizelge 3.11.'de sunulduğu şekilde tespit edilmiştir.

Çizelge 3.11. Farklı blok uzunluklarındaki PEtOx-*b*-PLA kopolimerinden elde edilen yapılar.

Kopolimer Bileşimi	<i>f</i> Değeri (%)	Elde Edilen Yapı
PEtOx ₂₀₀₀ - <i>b</i> -PLA ₅₈₀₀	25	Misel-Evrik Yapılar
PEtOx ₂₇₀₀ - <i>b</i> -PLA ₅₈₀₀	32	Misel-Çubuk-Evrik Yapılar
PEtOx ₄₄₀₀ - <i>b</i> -PLA ₅₈₀₀	45	Evrik Yapılar
PEtOx ₃₀₀₀ - <i>b</i> -PLA ₉₀₀₀	20	Çubuk-Misel
PEtOx ₄₀₀₀ - <i>b</i> -PLA ₉₀₀₀	25	Misel-Çubuk-Evrik Yapılar
PEtOx ₇₅₀₀ - <i>b</i> -PLA ₉₀₀₀	45	Misel-Çubuk-Evrik Yapılar
PEtOx ₃₆₀₀ - <i>b</i> -PLA ₁₄₄₀₀	20	Polimerzom
PEtOx ₄₆₀₀ - <i>b</i> -PLA ₁₄₄₀₀	24	Polimerzom
PEtOx ₆₂₀₀ - <i>b</i> -PLA ₁₄₄₀₀	30	Polimerzom

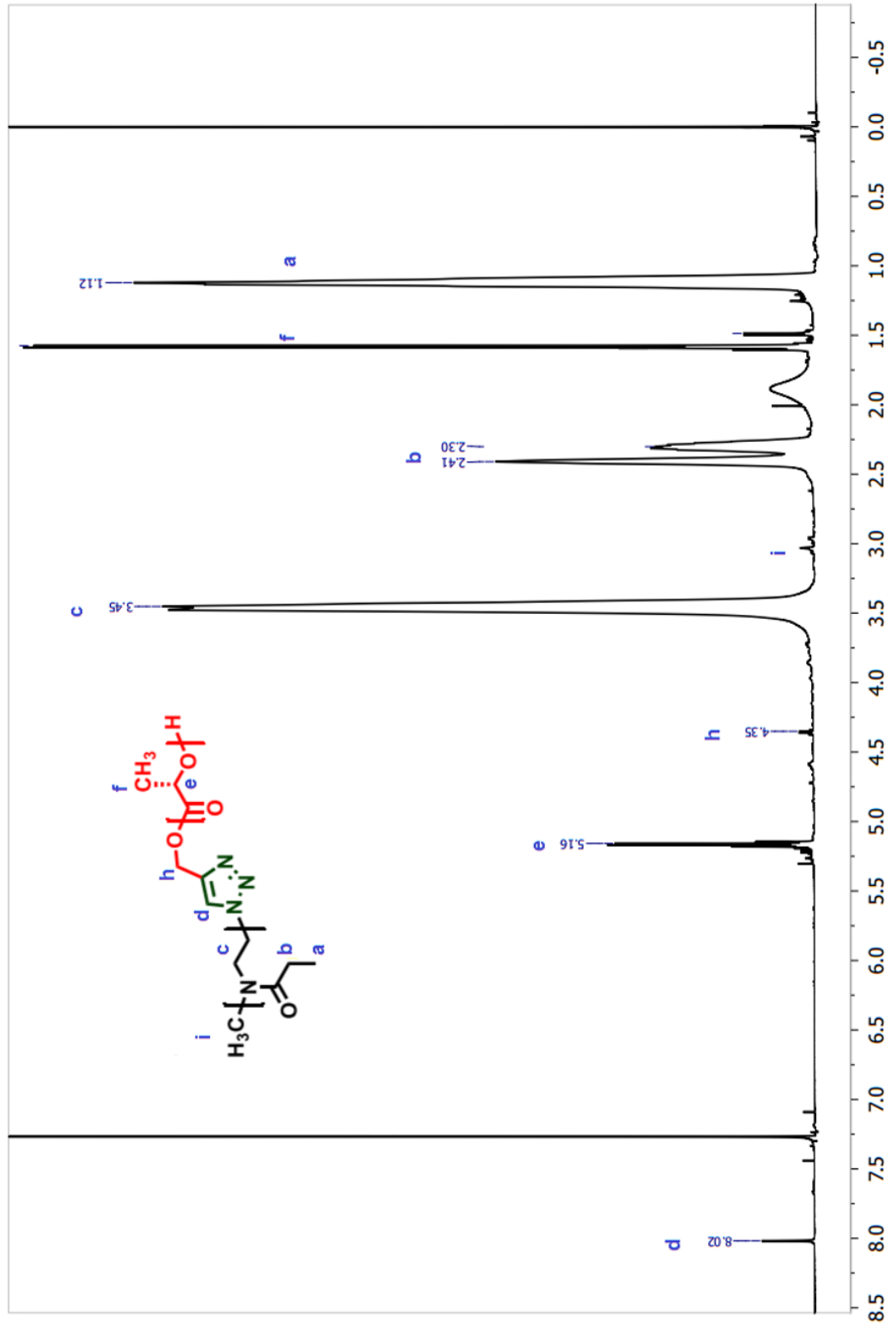
PEtOx₃₆₀₀-*b*-PLA₁₄₄₀₀ (PEtOx₃₇-*b*-PLA₂₀₀) kopolimerleri ile bundan sonraki çalışmalara devam edilmesine karar verilmiştir. Dolayısıyla PEtOx₃₇-*b*-PLA₂₀₀ kopolimerinin yapısının aydınlatılması çalışmaları yapılmıştır. Bu kapsamda, sonuçları Şekil 3.26.'da sunulmuş FTIR ve sonrasında ise, sonuçları Şekil 3.27.'de sunulan ¹H-NMR çalışmaları gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.26. PEOx₃₇-b-PLA₂₀₀ kopolimerine ait FTIR spektrumu.

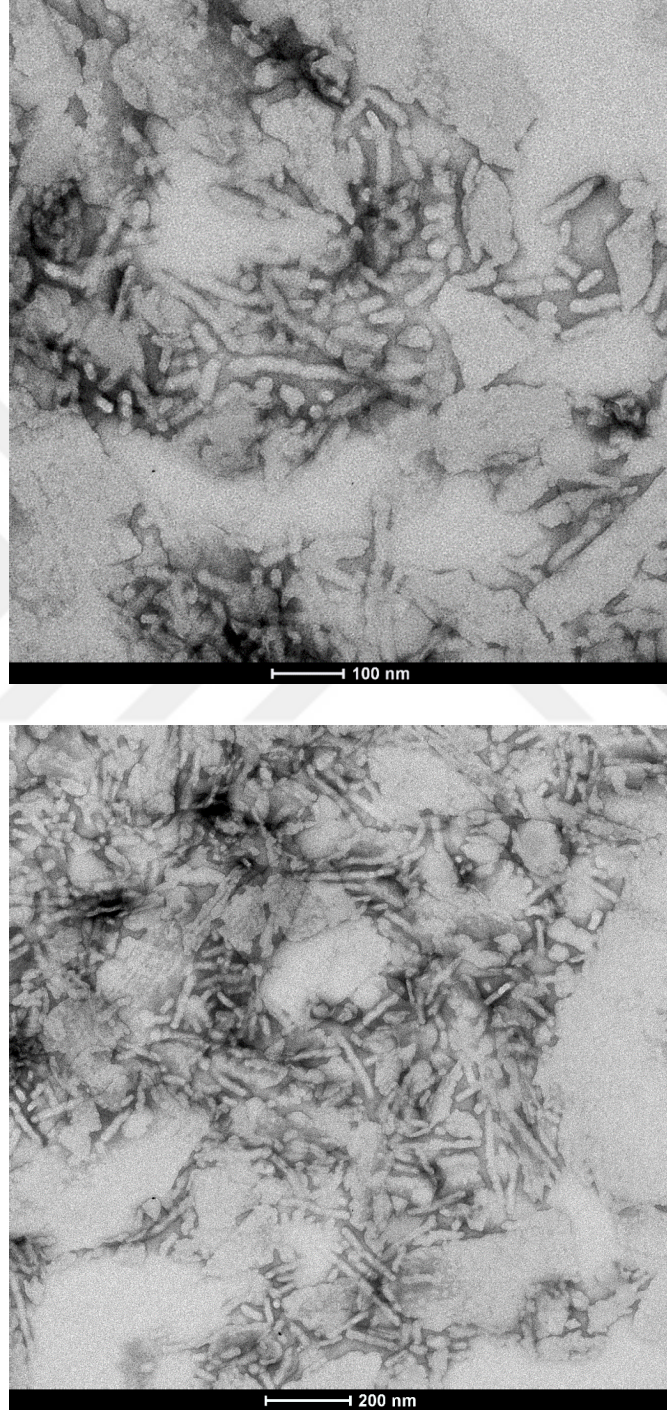
Şekil 3.26.'da görüleceği üzere, kopolimerin en dominant FTIR piki, beklenen üzere yaklaşık 1700 cm^{-1} 'de gözlemlenen C=O bağına ait piktir. PEOx polimerindeki N3 grubuna ait $\sim 2200\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlemlenen pik, PEOx₃₇-b-PLA₂₀₀ kopolimerine ait kırmızı renkli spektrumda, konjugasyon sonrası kaybolmuştur. Bu durum, PEOx bloğu ile PLA bloğunun konjugasyonun başarısını göstermektedir.

Şekil 3.27.'de ise PEOx₃₇-b-PLA₂₀₀ kopolimerinin yapısındaki protonlara ait piklerin tanımlanması ile kopolimer yapısı aydınlatılmıştır.



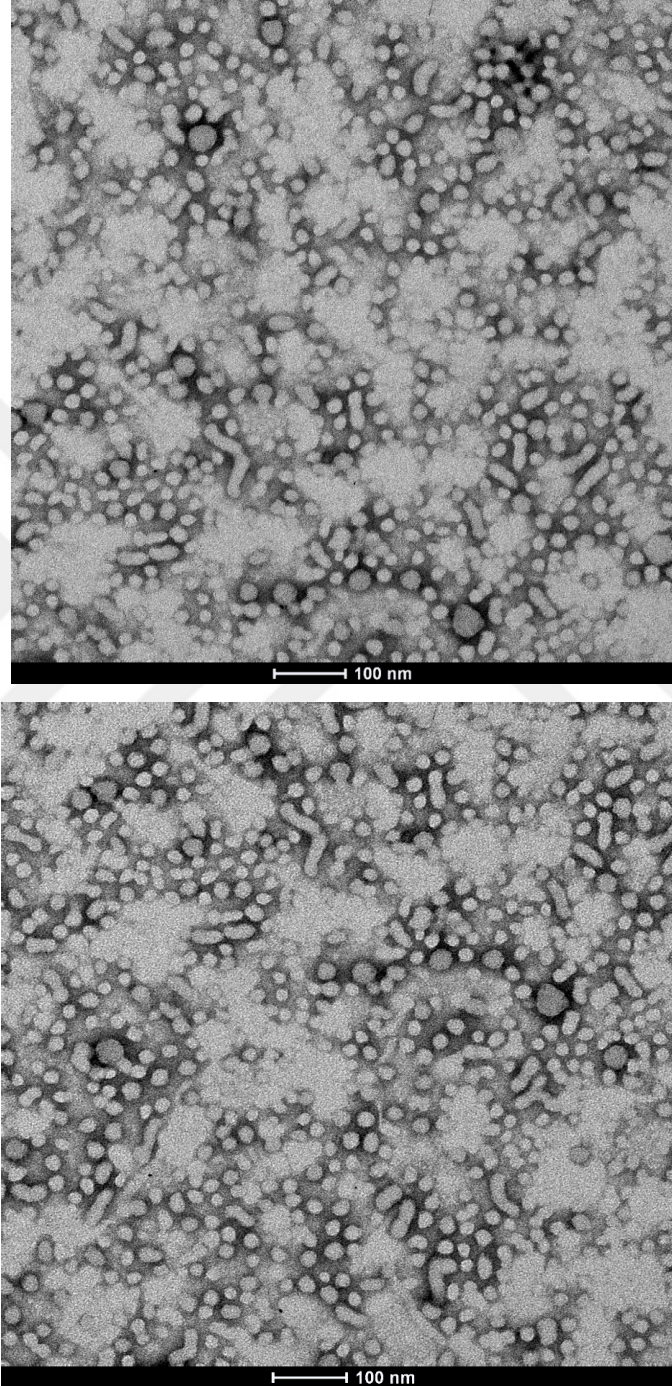
Şekil 3.27. PETox-*b*-PLA kopolimerine ait ^1H -NMR kromatogramı.

PEtOx₃₀₀₀-*b*-PLA₉₀₀₀ kopolimerinden hareketle, çözücü değişimi yöntemi kullanılarak elde edilen yapıların neredeyse tamamının çubuk şeklinde olduğu görülmüştür (Şekil 3.28.).



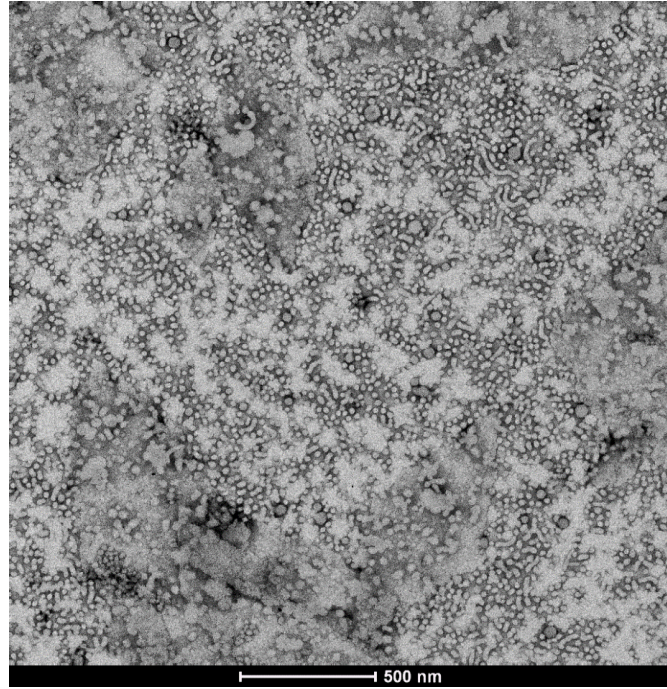
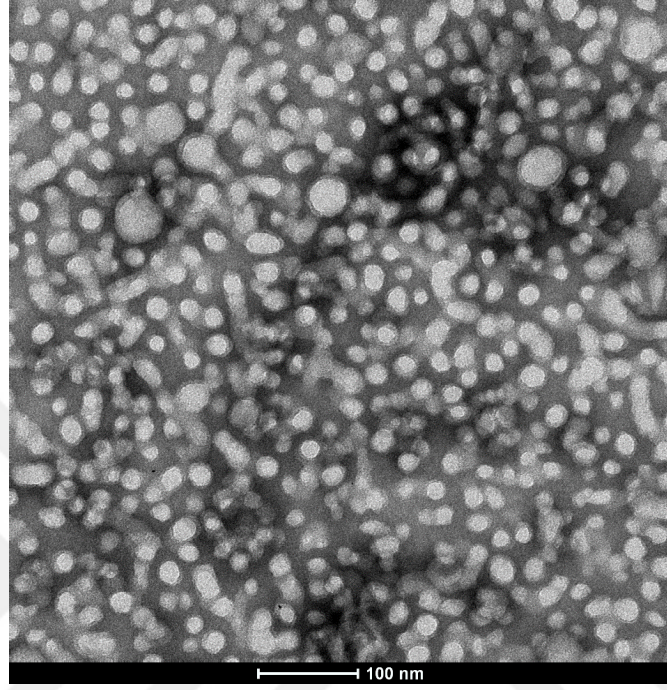
Şekil 3.28. PEtOx₃₀₀₀-*b*-PLA₉₀₀₀ kopolimeri ile elde edilen yapıların TEM görüntüleri.

PEtOx₄₀₀₀-*b*-PLA₉₀₀₀ kopolimerinden hareketle, çözücü değişimi yöntemi kullanılarak elde edilen yapıların bir kısmının çubuk bir kısmının ise misel yapısında olduğu görülmüştür (Şekil 3.29.).



Şekil 3.29. PEtOx₄₀₀₀-*b*-PLA₉₀₀₀ kopolimeri ile elde edilen yapıların TEM görüntüleri.

PEtOx₇₅₀₀-*b*-PLA₉₀₀₀ kopolimerinden hareketle, çözücü değişimi yöntemi kullanılarak elde edilen yapıların bir kısmının çubuk bir kısmının ise misel yapısında olduğu görülmüştür (Şekil 3.30.).



Şekil 3.30. PEtOx₇₅₀₀-*b*-PLA₉₀₀₀ kopolimeri ile elde edilen yapıların TEM görüntüleri.

3.2.4. PEtOx₃₇-b-PLA₂₀₀ Polimerzom Formülasyonlarının Karakterizasyon Bulguları

PEtOx₃₇-b-PLA₂₀₀ kopolimerinden hareketle hazırlanan polimerzomların formülasyon geliştirme ve geliştirilen formülasyonların karakterizasyonlarına ait bilgiler bu bölümde sunulmaktadır.

Öncelikle, polimerzom formülasyonundan kullanılan sulu PBS fazının miktarının, elde edilen yapıların üzerindeki etkisi Çizelge 3.12.'de değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.12. Çözücü değişimi yönteminde kullanılan PBS miktarının formülasyon sonucu üzerine etkisinin optimizasyonu.

Üzerine Polimer Çözültisi Eklenilen PBS Hacmi (mL)	Elde Edilen Sistemin Görünüşü
0,25	Çökelti oluşumu
0,45	Çökelti oluşumu
0,75	Çökelti oluşumu
1,00	Homojen dispers sistem
1,50	Homojen dispers sistem
2,00	Homojen dispers sistem
3,00	Homojen dispers sistem
4,50	Homojen dispers sistem

Sulu faz olarak PBS'nin 1 mL altındaki hacimlerde kullanıldığı formülasyonlarda çökelti şeklinde agregasyonlar olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle 1 mL'nin altındaki PBS hacimi, formülasyon geliştirme kapsamından çıkartılmıştır.

Çizelge 3.13. Çözücü değişimi yönteminde kullanılan PBS miktarının formülasyonun partikül büyüklüğü üzerine etkisi (n=3).

Üzerine Polimer Çözeltisi Eklenilen PBS Hacmi (mL)	Formülasyonun Ortalama Partikül Büyüklüğü (nm)
1,00	90,35 ± 0,860
1,50	86,37 ± 1,129
2,00	80,38 ± 0,625
4,50	60,82 ± 0,382

Çizelge 3.13.'te sunulduğu üzere, kullanılan PBS hacmi arttıkça elde edilen yapılar veziküllerden misellere doğru geçiş gözlemlenmiştir. PBS hacmi arttıkça azalan ortalama partikül büyüklüğü bu durumu gösteren en önemli belirteçtir. Bu tespitlerden sonra, üretilecek bütün polimerzom formülasyonlarında 1 mL hacminde PBS kullanılmasına karar verilmiştir.

PEtOx₃₇-*b*-PLA₂₀₀ esaslı polimerzomların geliştirilmesinde, DTX enkapsülasyonu sürecinin optimizasyonunda, üç farklı DTX miktarı denenmiştir. Elde edilen sonuçların morfolojik değerlendirilmesi Çizelge 3.14.'te sunulmuştur.

Çizelge 3.14. Polimerzom formülasyonlarına yüklenecek DTX miktarının seçiminde, elde edilen formülasyonun morfolojik değerlendirilmesi.

Kopolimer:DTX Oranı	Elde Edilen Yapı
10:1 (5mg:0,5mg)	Homojen Veziküler Dispersiyon
10:2 (5mg:1mg)	Homojen Veziküler Dispersiyon
10:4,5(5mg:1,5mg)	Homojen Veziküler Dispersiyon

Çizelge 3.14.'te görüleceği üzere kullanılan bütün DTX oranlarında veziküler yapıya ulaşılmıştır.

Çizelge 3.15. Polimerzom formülasyonlarına yüklenecek DTX miktarının seçiminde, elde edilen formülasyonun kopolimer konsantrasyonu açısından kıyaslanması (n=3).

Kopolimer:DTX Oranı	Saflaştırma Sonrası Kopolimer Konsantrasyonu (mg/mL)
10:1	0,89 ± 0,05
10:2	1,23 ± 0,09
10:4,5	1,33 ± 0,10

Polimerzom formülasyonunda kullanılan DTX miktarı arttıkça daha fazla oranda kopolimer monomeri veziküler yapıyı oluşturmak için polimerzom membranına katılmış ve elde edilen kopolimer konsantrasyonunun bu nedenle arttığı düşünülmüştür.

Çizelge 3.16. Polimerzom formülasyonlarına yüklenecek DTX miktarının seçiminde, elde edilen formülasyonun partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve enkapsülasyon etkinliği açısından kıyaslanması (n=3).

Kopolimer:DTX Oranı	Ortalama Partikül Çapı (nm)	PDI	Enkapsülasyon Etkinliği (%)
10:1	90,09 ± 0,51	0,14 ± 0,002	12,5 ± 0,05
10:2	93,74 ± 0,79	0,13 ± 0,02	17,9 ± 0,11
10:4,5	99,92 ± 0,91	0,16 ± 0,01	15,8 ± 1,00

Çizelge 3.16.'da sunulduğu üzere, polimerzom formülasyonunda kullanılan DTX miktarı arttıkça elde edilen polimerzomların büyüklüğü artmıştır. En yüksek enkapsülasyon etkinliği 10:2 kopolimer:DTX oranında elde edilmiştir. Bu nedenle 10:2 kopolimer:DTX oranı ile çalışmalara devam edilmesine karar verilmiştir.

10:2 kopolimer:DTX oranında üretilen polimerzom formülasyonunun zeta potansiyeli değeri Çizelge 3.17.'de sunulmuştur.

Çizelge 3.17. 10:02 oranında kopolimer:DTX kullanılan polimerzom formülasyonunun zeta potansiyeli değerlendirilmesi (n=3).

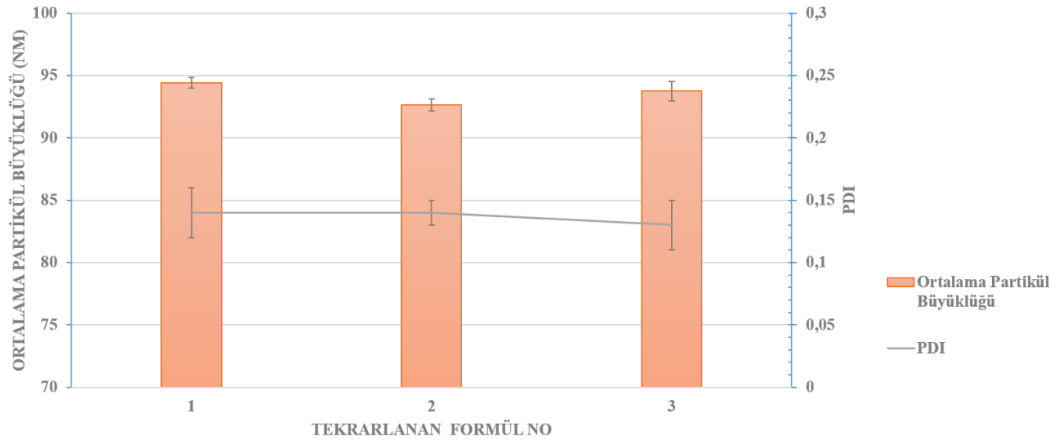
Kopolimer:DTX Oranı	Polimerzomların Yüzey Yükü (mV)
10:2	-4,84 ± 0,16

Geliştirilen PEOx₃₇-b-PLA₂₀₀ esaslı polimerzom formülasyonunun tekrarlanabilir olduğunun ortaya konması için gerçekleştirilen, ayrı ayrı olarak aynı şartlarda hazırlanmış üç polimerzom formülasyonuna ait veriler Çizelge 3.18.'de sunulmuştur.

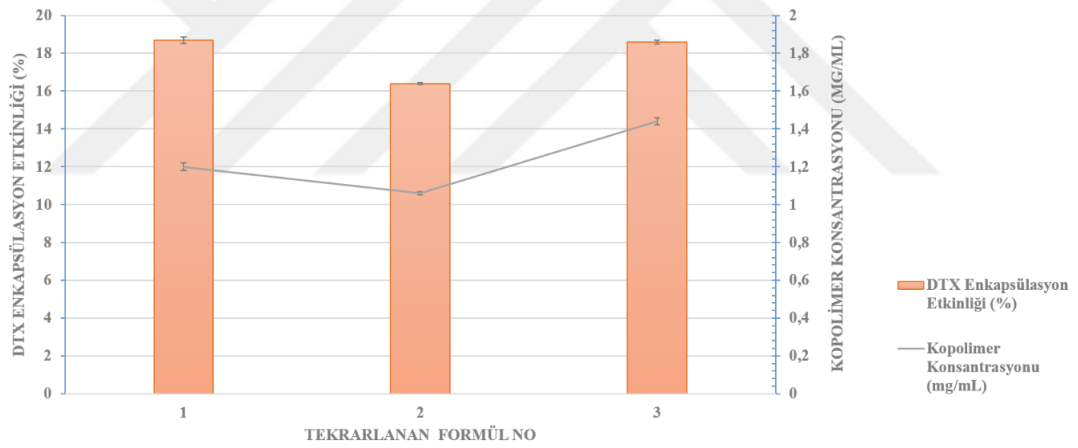
Çizelge 3.18. Enkapsülasyon gerçekleştirilmiş polimerzom formülasyonunun tekrarlanabilirliğine dair formülasyon değişkenlerinin değerlendirildiği tablo (n=3).

		1.Formül	2. Formül	3. Formül
Kopolimer:Etkin Madde Oranı 10:2 (5mg:1mg)	Ortalama Partikül Büyüklüğü:	94,39 ± 0,42	92,63 ± 0,50	93,74 ± 0,79
	nm			
	PDI:	0,14 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,13 ± 0,02
	Kopolimer Konsantrasyonu:	1,2	1,06 mg/mL	1,44
	mg/mL			
	DTX Enkapsülasyon Etkinliği:	% 18,7 ± 0,17	% 16,4 ± 0,06	% 18,6 ± 0,11

Elde edilen benzer sonuçlar, geliştirilen PEOx₃₇-b-PLA₂₀₀ esaslı polimerzom formülasyonunun tekrar edilebilir olduğunu ortaya koymaktadır.



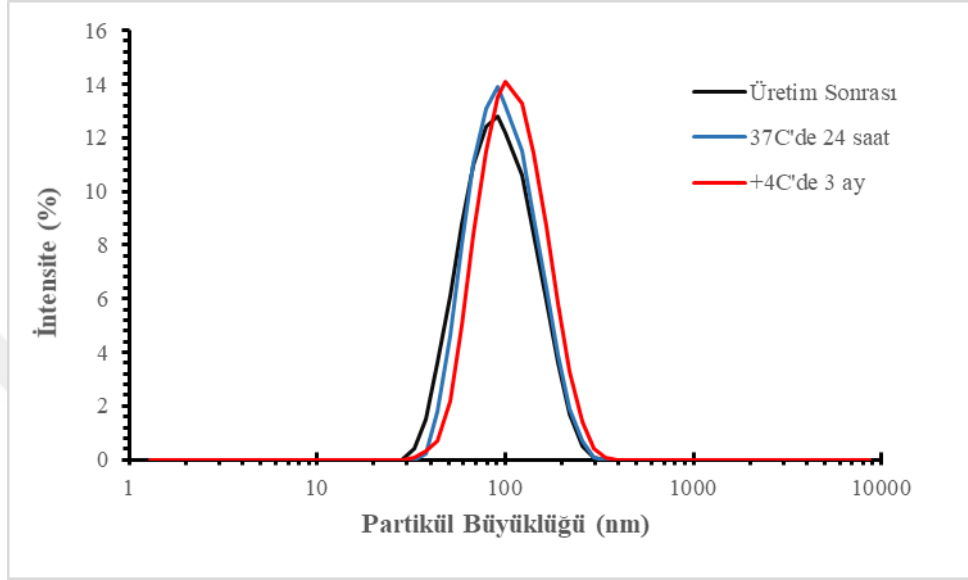
Şekil 3.31. Tekrarı yapılan formülasyonlara ait ortalama partikül büyüklüğü ve PDI verilerinin grafiksel ifadesi.



Şekil 3.32. Tekrarı yapılan formülasyonlara ait ortalama DTX enkapsülasyon etkinliği ve kopolimer konsantrasyonu verilerinin grafiksel ifadesi.

Geliştirilen PEO_{x37}-*b*-PLA₂₀₀ esaslı polimerzom formülasyonunun Çizelge 3.18.'de ortaya konulan tekrarlanabilirliğine ait bilgiler, Şekil 3.31. ve 3.32.'de grafikler halinde sunulmuştur.

Geliştirilen PEtOx₃₇-b-PLA₂₀₀ esaslı polimerzom formülasyonunun stabilitesini araştırmak için, +4°C’de 3 aylık ve +37°C’de 24 saatlik stabilite testleri gerçekleştirilmiştir. Bu şartlardaki partikül büyüklüğü dağılımı profilleri Şekil 3.33.’te sunulmuştur.



Şekil 3.33. Optimize edilen çözücü değişimi yöntemi ile üretilen polimerzom formülasyonlarının, koloidal haldeki +4°C’de 3 aylık ve +37°C’de 24 saatlik stabilite sonuçlarına işaret eden partikül büyüklüğü dağılımı grafiği.

Şekil 3.33.’teki grafikte görüldüğü üzere, partikül büyüklüğü dağılımına ait profilin değişmemesi, polimerzomların yukarıda incelenmiş süre ve sıcaklıklarda stabil olduğunu göstermektedir. Bu grafikteki partikül büyüklüğü dağılımı profilleri sunulan formüle ait sayısal büyüklük değerleri Çizelge 3.19.’da sunulmuştur.

Çizelge 3.19. Kolloidal haldeki polimerzom formülasyonlarına ait haldeki +4°C’de 3 ay ve +37°C’de 24 saat sonrasında ölçülen partikül büyüklüğü sonuçları (n=3).

Polimerzom Formülasyonu	Ortalama Partikül Büyüklüğü (nm)	PDI
Üretim Sonrası (kolloidal halde)	90,35 ± 0,86	0,15 ± 0,014
37°C’de 24 saat sonrasında (kolloidal halde)	98,4 ± 0,46	0,15 ± 0,014
+4°C’de 3 ay sonrasında (kolloidal halde)	93,6 ± 0,71	0,14 ± 0,023

PEtOx₃₇-*b*-PLA₂₀₀ esaslı polimerzom formülasyonlarına DTX enkapsülasyonunun karakterizasyonu ve optimizasyonu ardından ikinci olarak, pro-apoptotik BikDDA geni enkapsüle edilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla öncelikle, DTX enkapsülasyonunda yapıldığı üzere, enkapsülasyon sürecinin optimizasyonu amacıyla üç farklı BikDDA miktarı denenmiştir. Elde edilen sonuçların morfolojik değerlendirilmesi Çizelge 3.20.’de sunulmuştur.

Çizelge 3.20. Polimerzom formülasyonlarına yüklenecek BikDDA miktarının seçiminde, elde edilen formülasyonun morfolojik değerlendirilmesi (n=3).

Kopolimer:BikDDA Oranı	Elde Edilen Yapı
10: 0,004 (5mg:20µg)	Homojen Veziküler Dispersiyon
10: 0,008 (5mg:40µg)	Homojen Veziküler Dispersiyon
10: 0,014 (5mg:70µg)	Homojen Veziküler Dispersiyon

Çizelge 3.20.’de görüleceği üzere kullanılan bütün BikDDA oranlarında veziküler yapıya ulaşılmıştır.

Çizelge 3.21. Polimerzom formülasyonlarına yüklenecek BikDDA miktarının seçiminde, elde edilen formülasyonun kopolimer konsantrasyonu açısından kıyaslanması (n=3).

Kopolimer:BikDDA Oranı	Saflaştırma Sonrası Kopolimer Konsantrasyonu (mg/mL)
10:0,004	0,68 ± 0,04
10:0,008	0,63 ± 0,07
10:0,014	0,55 ± 0,06

Polimerzom formülasyonunda kullanılan DTX miktarı arttıkça polimerzom yapılarının oluşmasında azalma olduğu (sulu lümende enkapsüle edilebilecek miktardan çok daha yüksek oranda BikDDA bulunması nedeniyle) ve bununla bağlantılı olarak kopolimer konsantrasyonunun azaldığı görülmüştür.

Çizelge 3.22. Polimerzom formülasyonlarına yüklenecek BikDDA miktarının seçiminde, elde edilen formülasyonun partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve enkapsülasyon etkinliği açısından kıyaslanması (n=3).

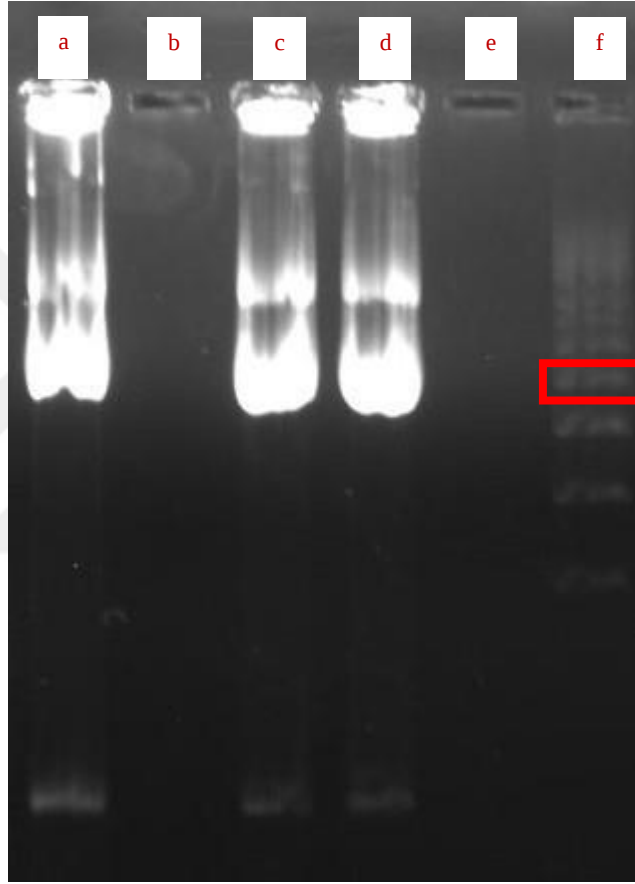
Kopolimer:BikDDA Oranı	Ortalama Partikül Çapı (nm)	PDI	Enkapsülasyon Etkinliği (%)
10:0,004	101,1 ± 0,71	0,14 ± 0,02	75,1 ± 5,84
10:0,008	104,3 ± 0,60	0,13 ± 0,01	65,03 ± 7,43
10:0,014	109,5 ± 1,45	0,13 ± 0,01	62,65 ± 6,23

Çizelge 3.22.'de sunulduğu üzere, polimerzom formülasyonunda kullanılan BikDDA miktarı arttıkça elde edilen polimerzomların büyüklüğü artmıştır. En yüksek enkapsülasyon etkinliği 10:0,004 kopolimer:BikDDA oranında elde edilmiştir ancak polimerzomların içine yüklenen BikDDA miktarının 10:0,014 kopolimer:BikDDA oranında çok daha yüksek değerde olması nedeniyle, 10:0,014 oranı ile çalışmalara devam edilmesine karar verilmiştir.

10:0,014 kopolimer:BikDDA oranında üretilen polimerzom formülasyonunun zeta potansiyeli değeri Çizelge 3.23.'te sunulmuştur.

Çizelge 3.23. 10:0,014 oranında kopolimer:BikDDA kullanlan polimerzom formülasyonunun zeta potansiyeli değerlendirilmesi (n=3).

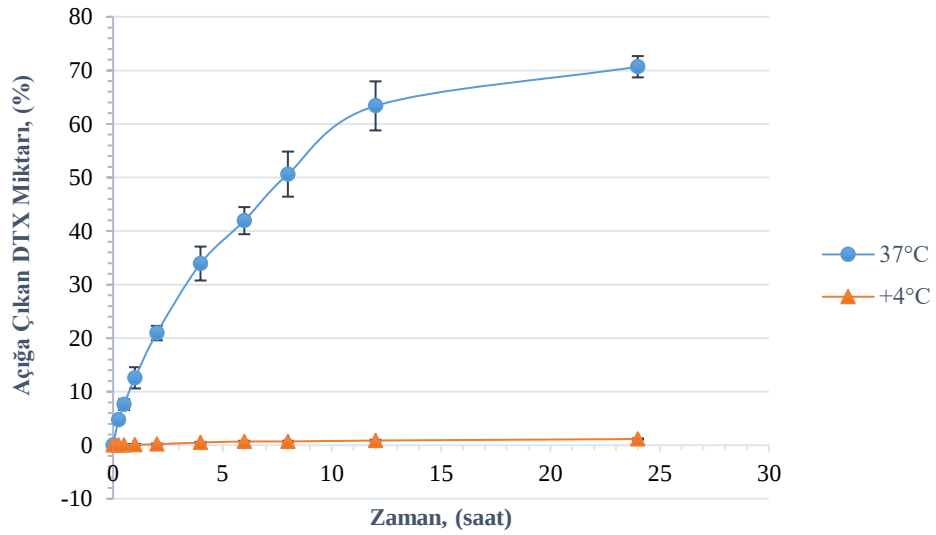
Kopolimer:BikDDA Oranı	Polimerzomların Yüzey Yükü (mV)
10:0,014	-6,91 ± 0,50



Şekil 3.34. BikDDA geni ve BikDDA yüklü polimerzomlara ait agaroz jel görüntüleri (a: 2,54 mg/mL BikDDA geni, b: 0,2 µg/mL BikDDA içeren polimerzom formülasyonu, c: taze olarak hazırlanmış 1,02 mg/mL BikDDA içeren polimerzom formülasyonunun içerisindeki BikDDA, d: 37°C’de 24 saat bekletilmiş 1,02 mg/mL BikDDA içeren polimerzom formülasyonunun içerisindeki BikDDA, e: boş polimerzom formülasyonu, f: 2067-16210 baz çifti aralığındaki DNA merdiveni (kırmızı dikdörtgen ile işaretli bant ~ 5100 baz çiftine işaret etmektedir)).

Şekil 3.34.'te polimerzom formülasyonlarına enkapsüle edilen BikDDA'nın, enkapsüle haldeki stabilitesi değerlendirilmiştir. c ve d kuyucuklarında sürüklenmiş bantların gözlemlenmesi, polimerzom formülasyonu ile enkapsüle edilen BikDDA'nın stabil kaldığını göstermektedir. Boş polimerzom formülasyonu uygulanmış b kuyucuğunda ve enkapsüle edilip saflaştırılmış BikDDA enkapsüle edilmiş polimerzom formülasyonu uygulanmış e kuyucuğunda, BikDDA ya ait bir pik gözlenmemiştir.

Geliştirilen PEtOx₃₇-b-PLA₂₀₀ esaslı polimerzom formülasyonlarının membran bütünlüğünün (ya da stabilitesinin) sıcaklığa göre nasıl değiştiğinin anlaşılması amacıyla etkin madde çıkışı analiz gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.35. 500 µg/mL DTX içeren PEtOx-b-PLA polimerzom formülasyonlarının 37°C ve +4°C'deki etkin madde çıkış grafiği.

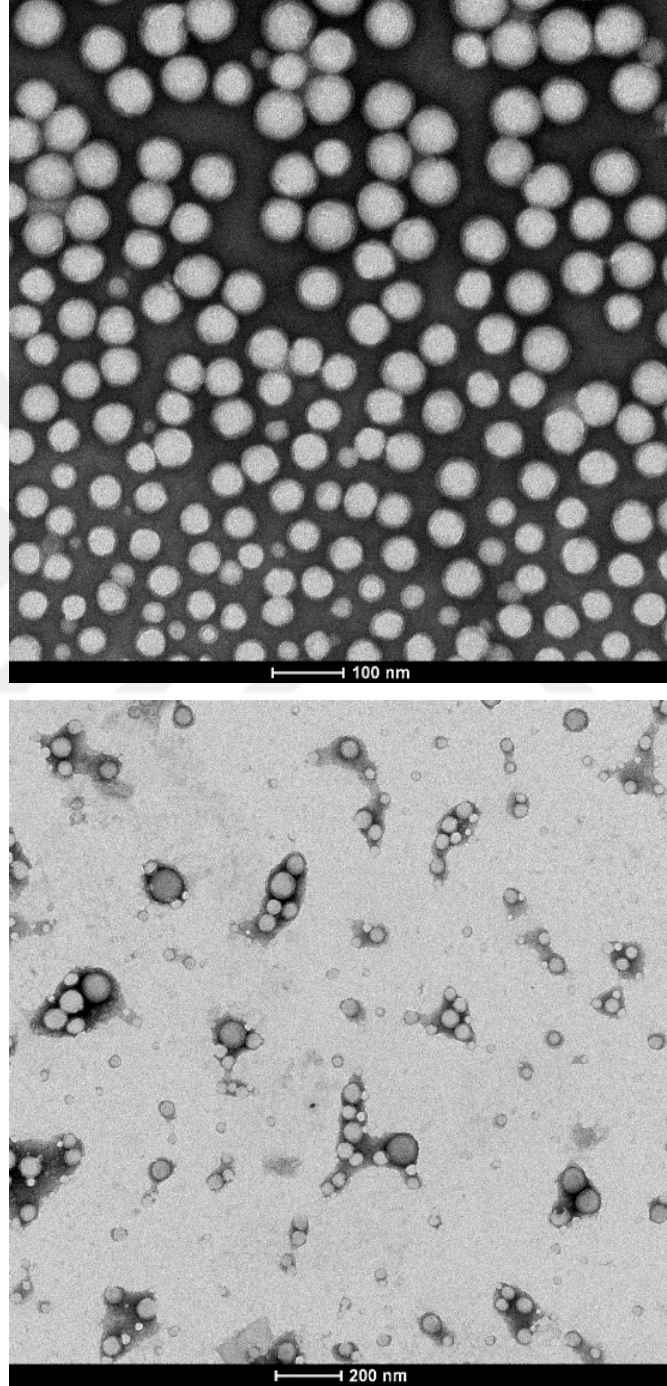
Şekil 3.35.'te sunulan, PEtOx₃₇-b-PLA₂₀₀ polimerzomlarından farklı sıcaklıklardaki etkin madde çıkışı grafiğinde +4°C'de salım gözlenmemiş bu nedenle de polimerzomların membran yapısında, +4°C'de 24 saat sonunda porların oluşmadığı ve bütünlüğünü koruyarak DTX salımına izin vermediği görülmüştür. 37°C'de ise yavaşça oluşan porlardan DTX salımı gözlenmiştir.

Geliştirilen PEtOx₃₇-*b*-PLA₂₀₀ esaslı polimerzom formülasyonlarının, peptit563 ve/veya kumarin konjuge edilmiş PEtOx₃₇-*b*-PLA₂₀₀ kopolimerinin % 10 molar oranda kullanılması ile yeniden formüle edilip karakterize edilmesi sonucunda Çizelge 3.24.'deki bilgilere ulaşılmıştır.

Çizelge 3.24. Hedeflendirici peptit ve kumarin ile fonksiyonelleştirilmiş polimerzomların ortalama partikül büyüklüğü, PDI ve enkapsülasyon etkinliği verilerinin sunumu.

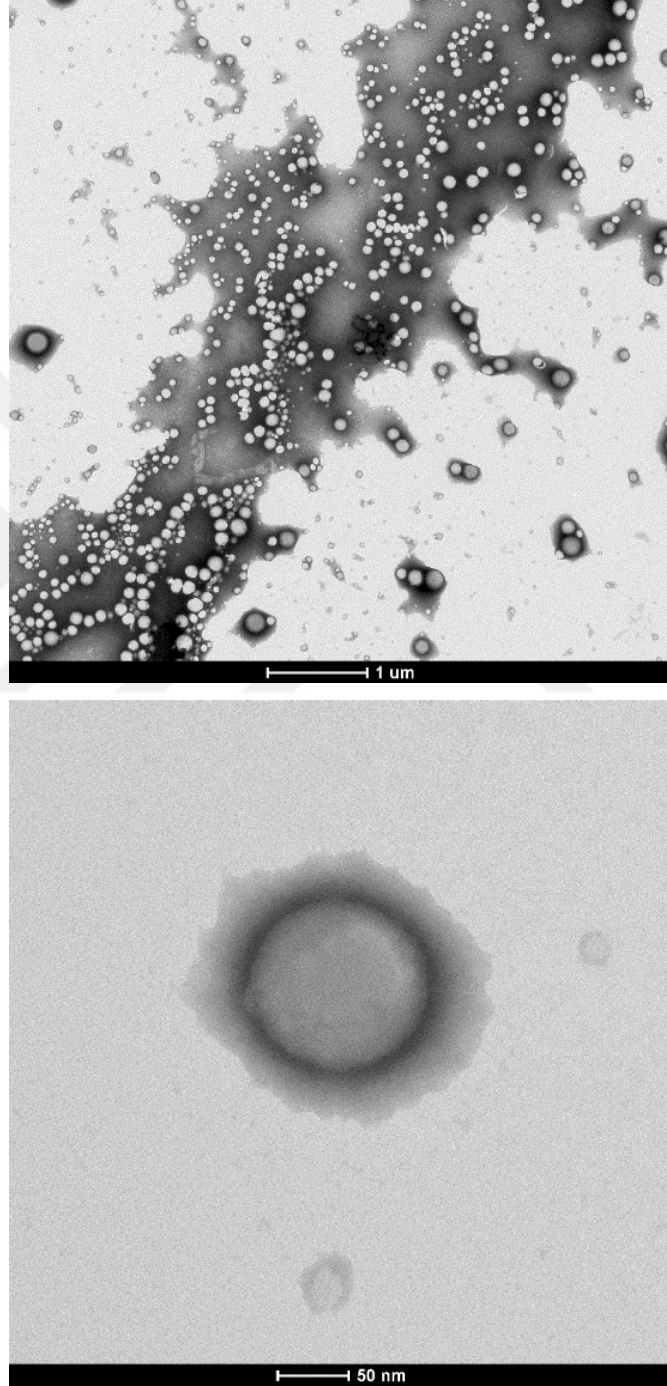
Formülasyon			Ortalama Partikül Büyüklüğü (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)	Enkapsülasyon Etkinliği (%)
Kumarin taşıyan polimerzom formülasyonu			97,57 ± 1,64	0,12 ± 0,02	-7,29 ± 0,75	-
BİkDDA enkapsüle edilmiş kumarin taşıyan polimerzom formülasyonu			110,45 ± 1,32	0,16 ± 0,03	-8,51 ± 0,69	60,92 ± 4,17
DTX enkapsüle edilmiş kumarin taşıyan polimerzom formülasyonu			100,20 ± 0,2,02	0,13 ± 0,02	-5,81 ± 0,73	10,5 ± 0,14
Kumarin ve hedeflendirici peptit taşıyan polimerzom formülasyonu			100,90 ± 0,99	0,12 ± 0,02	-5,30 ± 0,90	-
BİkDDA enkapsüle edilmiş kumarin ve hedeflendirici peptit taşıyan polimerzom formülasyonu			118,1 ± 1,40	0,13 ± 0,01	-4,80 ± 0,64	63,81 ± 3,93
DTX enkapsüle edilmiş kumarin ve hedeflendirici peptit taşıyan polimerzom formülasyonu			111,00 ± 2,75	0,15 ± 0,01	-5,89 ± 0,91	12,4 ± 1,22

PEtOx₃₆₀₀-*b*-PLA₁₄₄₀₀ kopolimerinden hareketle, çözücü değişimi yöntemi kullanılarak elde edilen yapıların küresel olduğu görülmüş ve polimerzomların membran yapıları ise, PTA boyaması sonucu siyah renk ile kontrast elde edilerek gösterilmiştir (Şekil 3.36.).



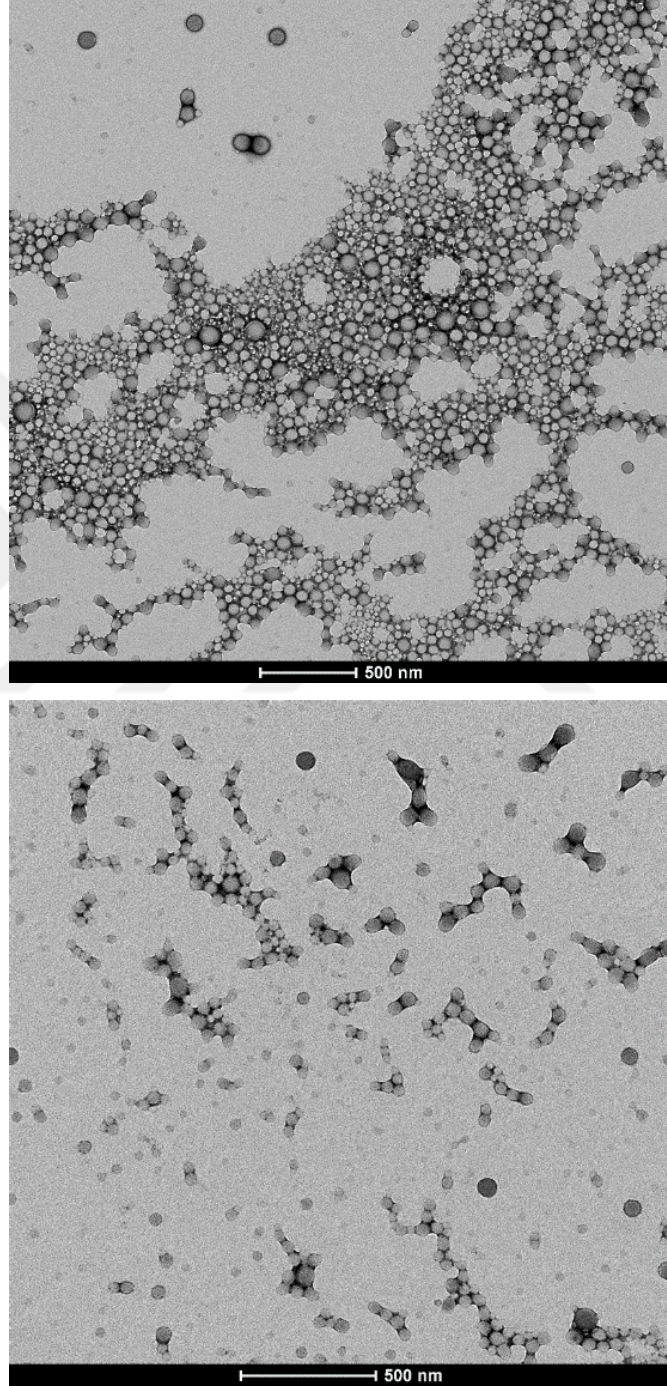
Şekil 3.36. PEtOx₃₆₀₀-*b*-PLA₁₄₄₀₀ kopolimeri ile elde edilen polimerzom yapılarına ait TEM görüntüleri.

PEtOx₄₆₀₀-*b*-PLA₁₄₄₀₀ kopolimerinden hareketle, çözücü değişimi yöntemi kullanılarak elde edilen yapıların küresel olduğu görülmüş ve polimerzomların membran yapıları ise, PTA boyaması sonucu siyah renk ile kontrast elde edilerek gösterilmiştir (Şekil 3.37.).



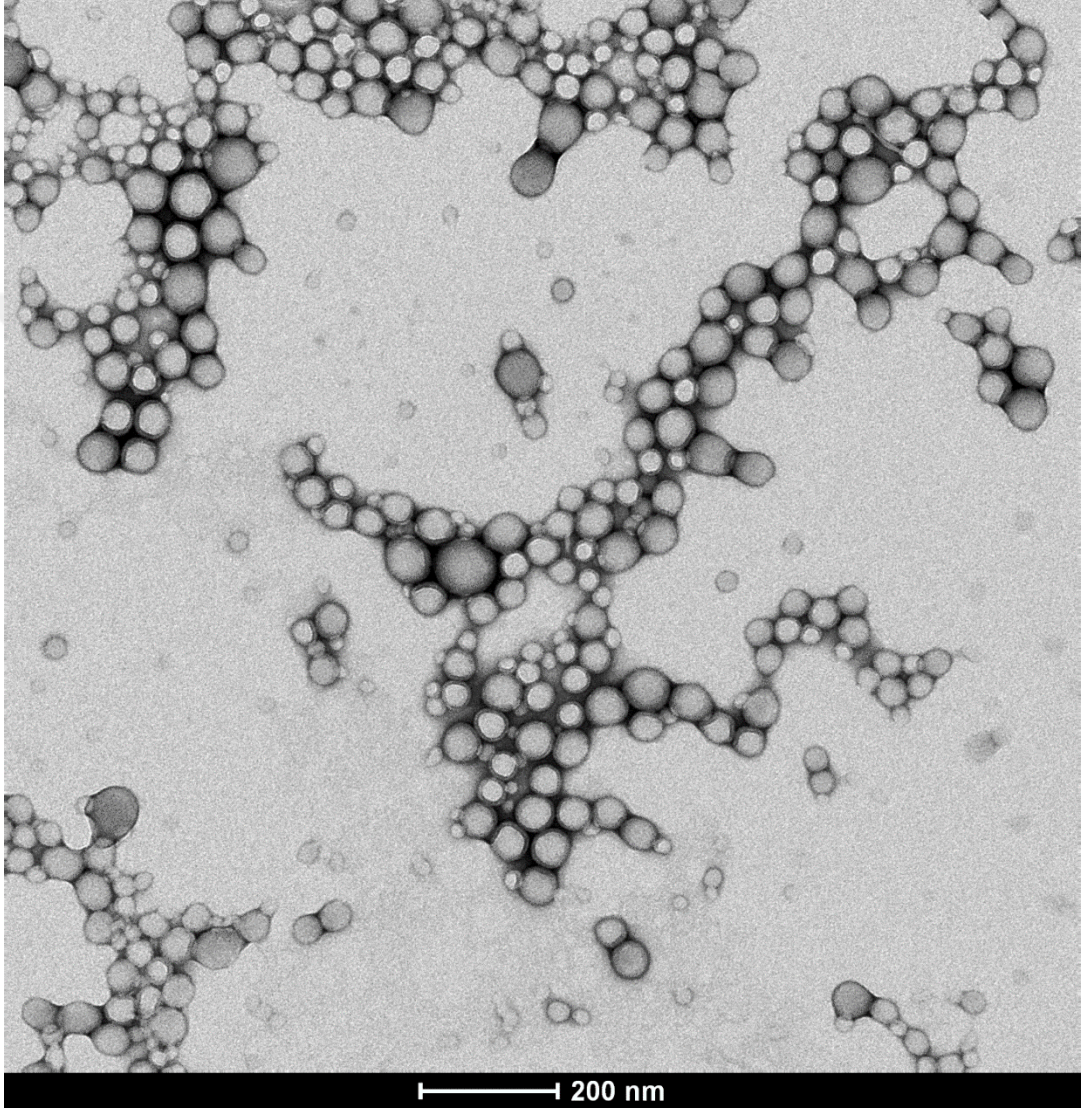
Şekil 3.37. PEtOx₄₆₀₀-*b*-PLA₁₄₄₀₀ kopolimeri ile elde edilen polimerzom yapılarına ait TEM görüntüleri.

PEtOx₆₂₀₀-*b*-PLA₁₄₄₀₀ kopolimerinden hareketle, çözücü değişimi yöntemi kullanılarak elde edilen yapıların küresel olduğu görülmüş ve polimerzomların membran yapıları ise, PTA boyaması sonucu siyah renk ile kontrast elde edilerek gösterilmiştir (Şekil 3.38.).



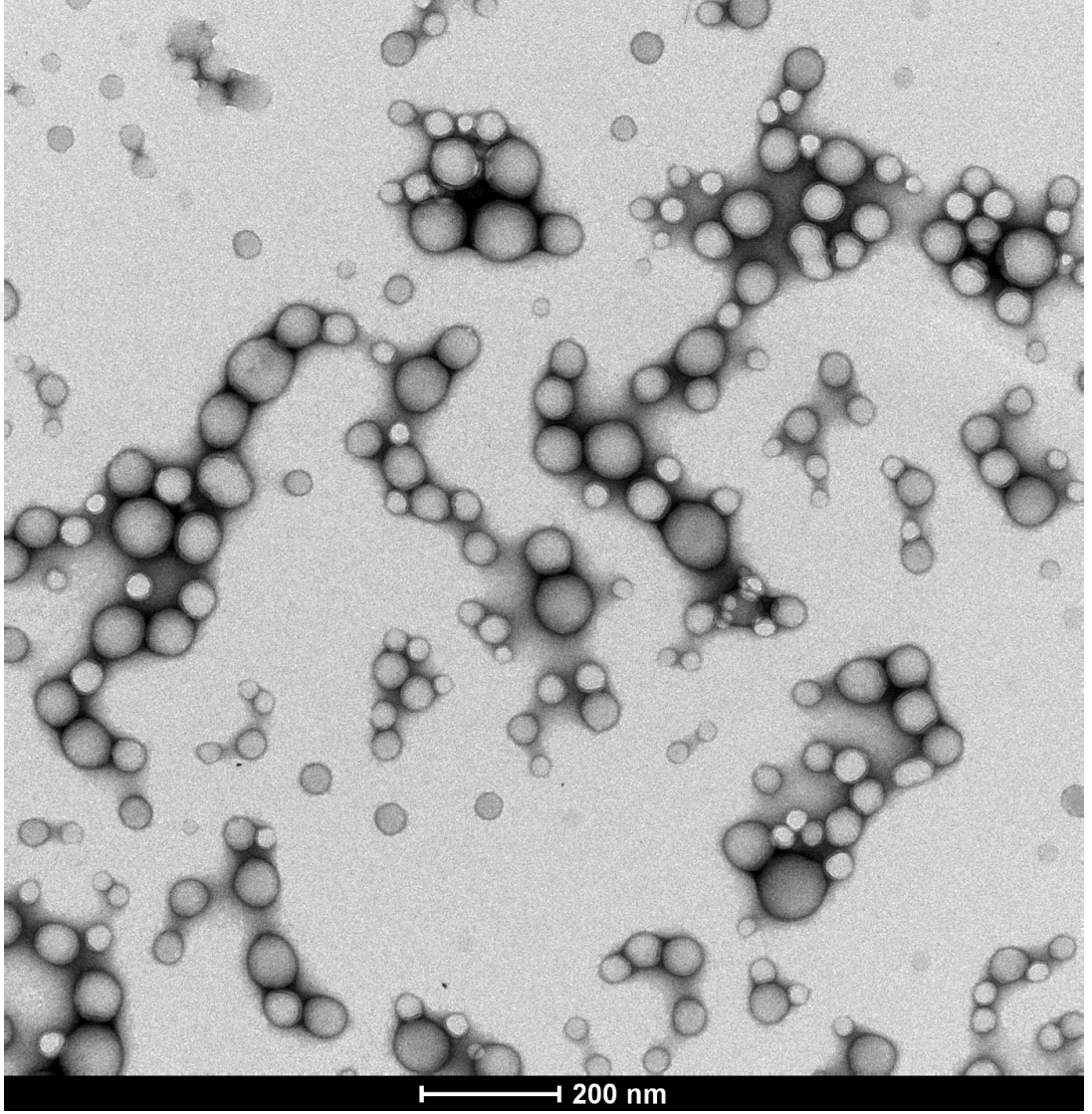
Şekil 3.38. PEtOx₆₂₀₀-*b*-PLA₁₄₄₀₀ kopolimeri ile elde edilen polimerzom yapılarına ait TEM görüntüleri.

PEtOx₃₆₀₀-*b*-PLA₁₄₄₀₀ kopolimerinden hareketle, çözücü değişimi yöntemi kullanılarak elde edilen DTX yüklü polimerzomların morfolojik analizi, TEM görüntülemesi ile yapılmıştır (Şekil 3.39.).



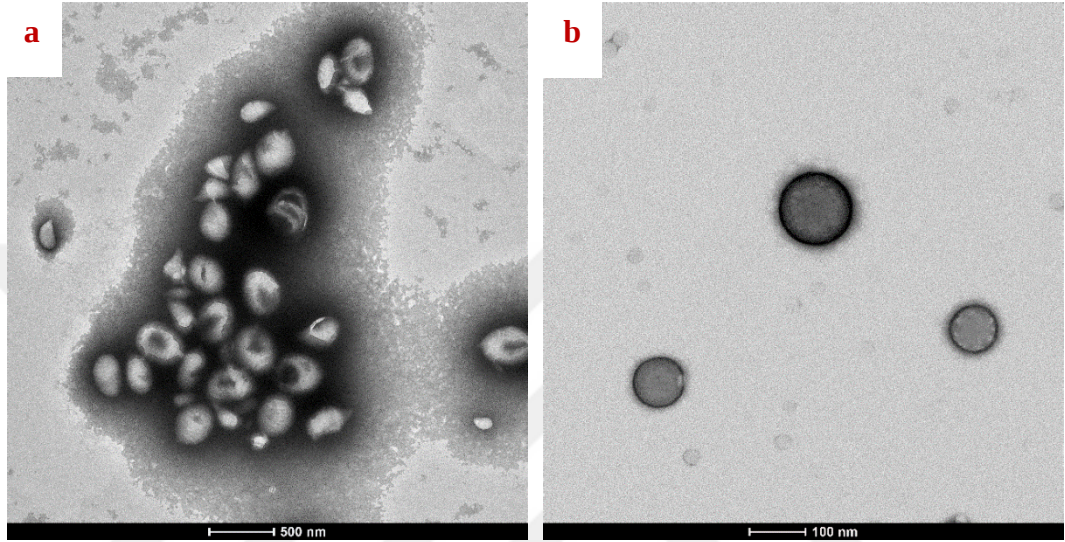
Şekil 3.39. DTX yüklü PEtOx₃₆₀₀-*b*-PLA₁₄₄₀₀ polimerzomlarına ait TEM görüntüleri.

PEtOx₃₆₀₀-*b*-PLA₁₄₄₀₀ kopolimerinden hareketle, çözücü değişimi yöntemi kullanılarak elde edilen BikDDA yüklü polimerzomların morfolojik analizi, TEM görüntülemesi ile yapılmıştır (Şekil 3.40.).



Şekil 3.40. BikDDA enkapsüle edilmiş PEtOx₃₆₀₀-*b*-PLA₁₄₄₀₀ polimerzomlarına ait TEM görüntüleri.

Polimerzom formülasyonu üretimi öncesinde, kullanılan kopolimerlerin diyaliz ile saflaştırılmasının, ortaya çıkan yapının üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi için, sonuçları Şekil 3.41.'de sunulan TEM analizi gerçekleştirilmiştir.

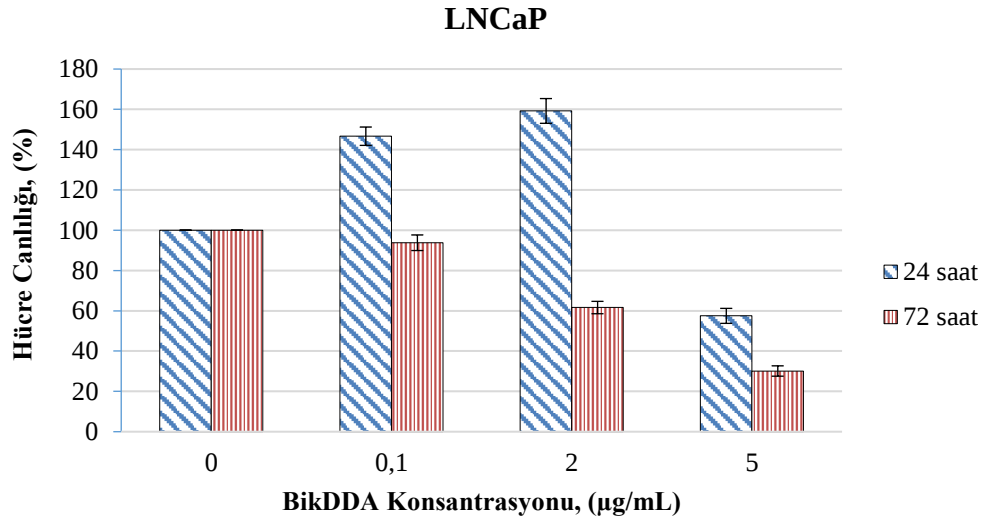


Şekil 3.41. Diyaliz saflaştırılması yapılmamış (a) ve yapılmış (b) $\text{PEtOx}_{37}\text{-}b\text{-PLA}_{200}$ kopolimeri ile yapılan polimerzom önformülasyonlarına ait TEM görüntüleri.

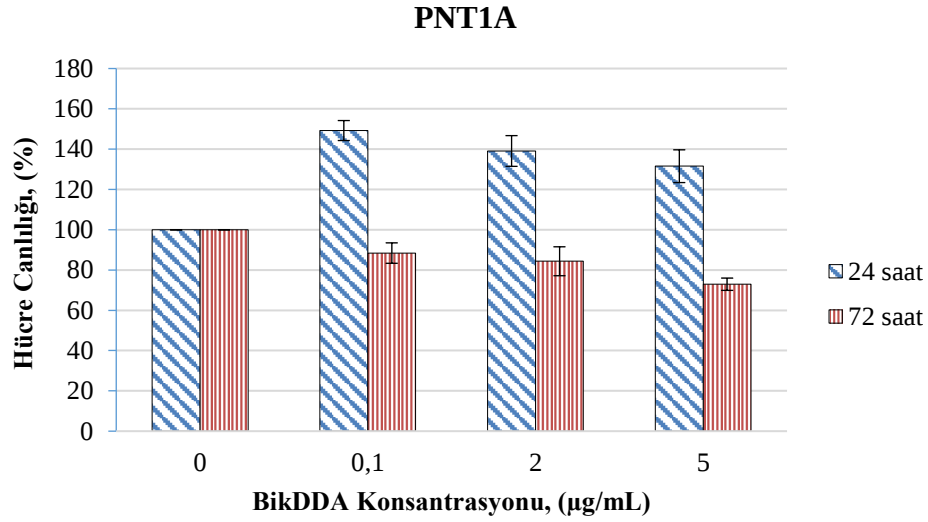
Diyaliz ile saflaştırma öncesinde küresel olmayan, farklı morfolojide yapılar elde edilirken, saflaştırma sonrasında pürüzsüz küresel yapılar elde edildiği tespit edilmiştir.

3.2.5. $\text{PEtOx-}b\text{-PLA}$ Polimerzom Formülasyonlarının Hücrelerde Yapılan Çalışmalarına Ait Bulgular

Peptit 563 aracılığıyla hedeflendirilmiş $\text{PEtOx}_{37}\text{-}b\text{-PLA}_{200}$ polimerzom formülasyonlarına BikDDA ve DTX yüklenmesinin ardından, geliştirilen bu taşıyıcı sistemlerin prostat kanserini hedefleme etkinlikleri, sağlıklı (PNT1A) ve kanserli (LNCaP) prostat kanseri hücreleri üzerinde yapılan hücre canlılığı testleri ile gerçekleştirilmiştir.



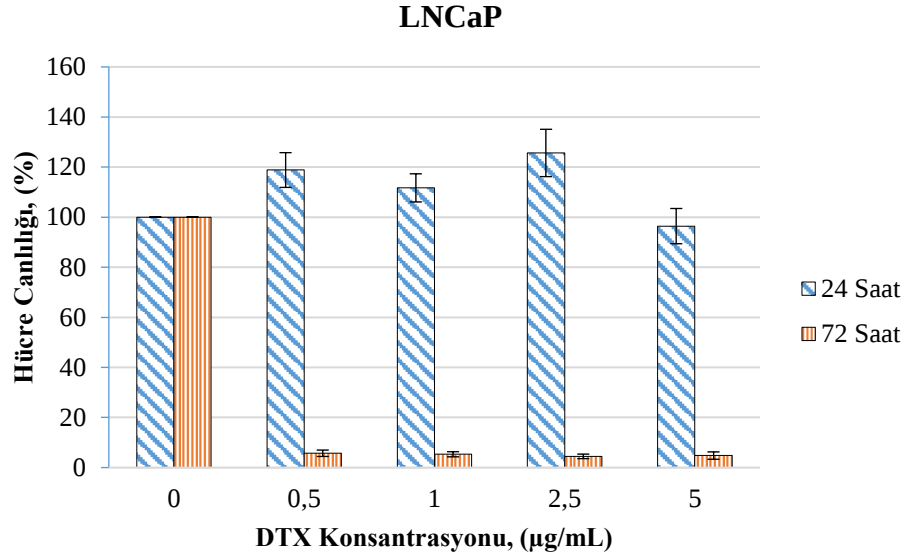
Şekil 3.42. BikDDA enkapsüle edilmiş PEtOx-*b*-PLA polimerzom formülasyonunun LNCaP hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.



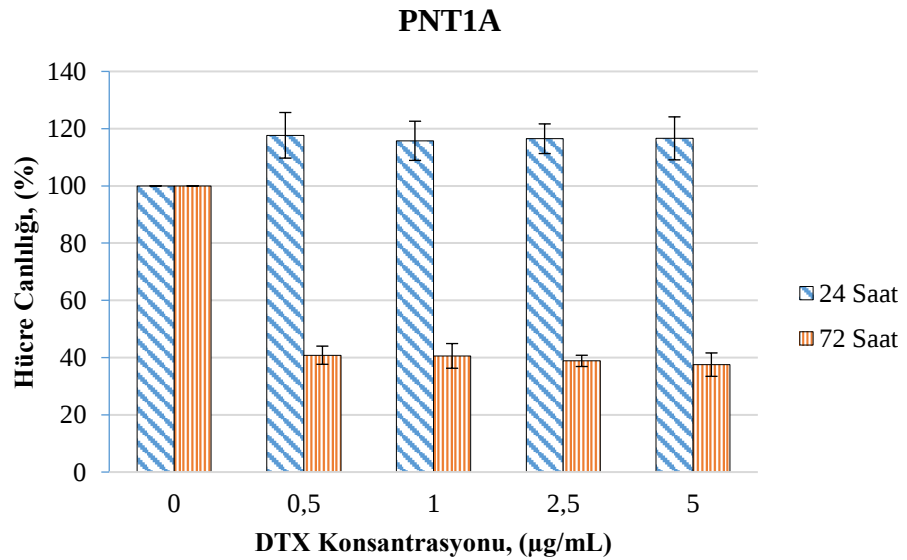
Şekil 3.43. BikDDA enkapsüle edilmiş PEtOx-*b*-PLA polimerzom formülasyonunun PNT1A hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.

Hedeflendirilmiş, BikDDA yüklü PEtOx₃₇-*b*-PLA₂₀₀ polimerzomlarının, LNCaP ve PNT1A hücreleri üzerinde ki canlılık analizleri sırasıyla Şekil 3.42. ve 3.43.'te görülmektedir. LNCaP hücrelerinde 72 saatlik inkübasyon sonrasında, 5 µg/mL konsantrasyonda BikDDA içeren polimerzomların hayli sitotoksik etki gösterdiği gözlenmiştir. Ancak aynı formülasyonun PNT1A hücreleri üzerinde,

LNCaP hücrelerine kıyasla daha düşük seviyede sitotoksosite gösterdiği tespit edilmiştir. Bu durum, hedeflendirilmiş polimerzomların büyük oranda kanserli hücreler tarafından alındığını göstermektedir.



Şekil 3.44. DTX enkapsüle edilmiş PEtOx-*b*-PLA polimerzom formülasyonunun LNCaP hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.

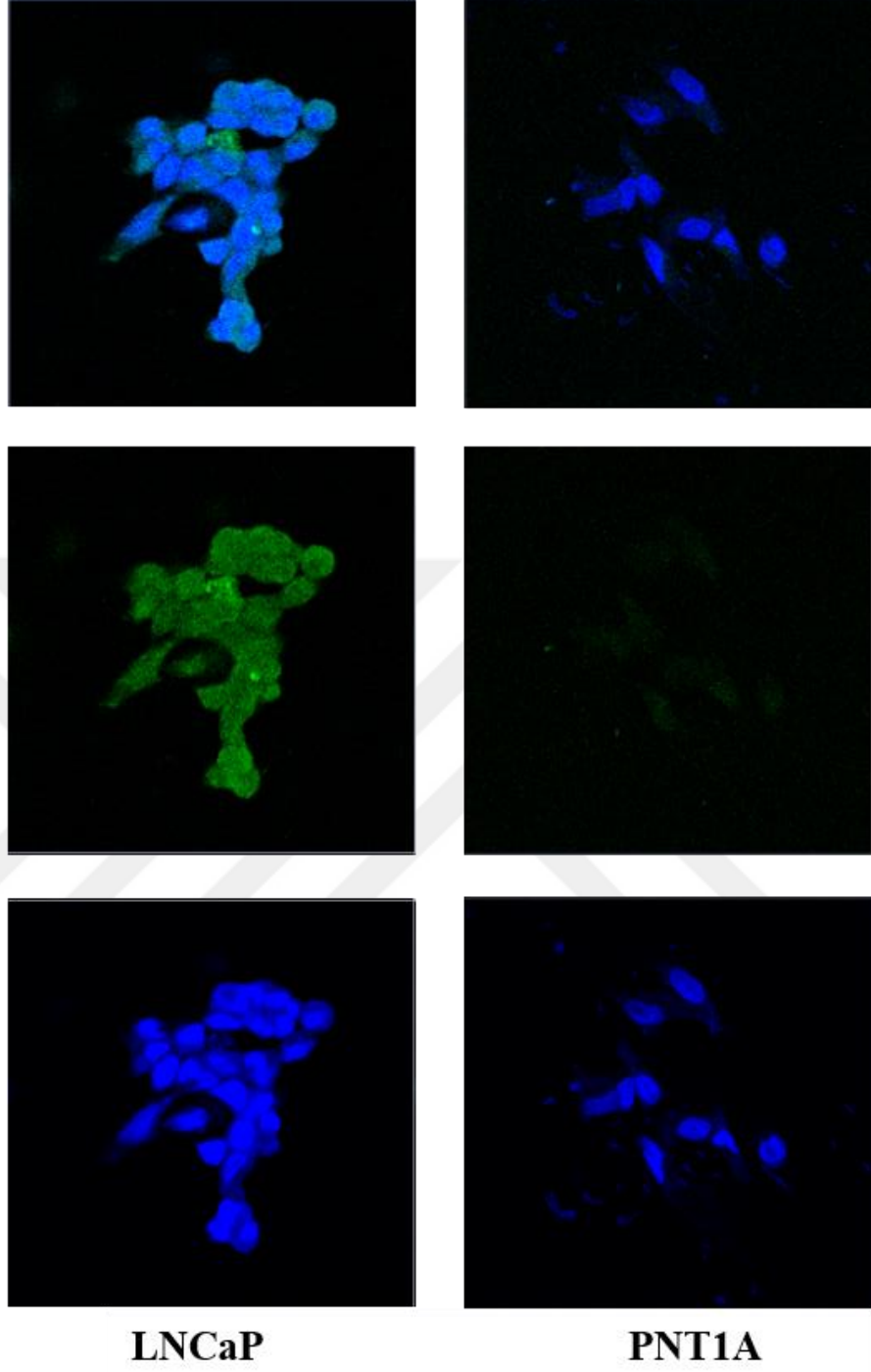


Şekil 3.45. DTX enkapsüle edilmiş PEtOx-*b*-PLA polimerzom formülasyonunun PNT1A hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi.

Hedeflendirilmiş, DTX yüklü **PEtOx₃₇-b-PLA₂₀₀** polimerzomlarının, LNCaP ve PNT1A hücreleri üzerinde ki canlılık analizleri sırasıyla Şekil 3.44. ve 3.45.'te görülmektedir. 72 saat sonrasında LNCaP hücrelerinde, PNT1A hücrelerine kıyasla yaklaşık 5 kat daha sitotoksikite gözlemlenmiştir. Bu durum, hedeflendirilmiş polimerzomların yüksek oranda, kanserli hücreler tarafından alındığını göstermektedir.

Hücrel canlılık deneylerinden elde edilen sonuçlar ışığında, hedeflendirilmiş polimerzomların sağlıklı PNT1A hücrelerine kıyasla kanserli LNCaP hücreleri tarafından çok daha fazla oranda alındığı yorumu konfokal mikroskopi deneyi ile doğrulanmak istenmiştir. Elde edilen mikroskop görüntüleri (Şekil 3.46.), hedeflendirilmiş polimerzomların (yeşil renkli) sağlıklı hücrelere kıyasla, kanserli hücreler tarafından daha fazla miktarda hücre içine alındığını göstermektedir.

BİRLEŞTİRİLMİŞ
Peptid563-PEtOX₃₇-b-PLA₂₀₀
DAPI



Şekil 3.46. Peptit563 ile prostat kanserine spesifik hedeflendirilmiş PEtOX₃₇-b-PLA₂₀₀ polimerzomlarının, 4 saatlik inkübasyon sonrasında PNT1A ve LNCaP hücreleri tarafından alınımı gösteren konfokal mikroskop görüntüleri.

4. TARTIŞMA

4.1. P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ Kopolimeri ile Yapılan Çalışmalar

4.1.1. BikDDA Geninin Floresans Ajan İle İşaretlenmesi ve Kalibrasyonuna Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Üretilen POEGMA-PDPA polimerzomlarına yüklenecek BikDDA geninin yüksek hassasiyet ve kesinlikte tayinini sağlamak için, BikDDA geni Cy5 floresans boyası ile işaretlenmiştir. Polimerzom membranının içindeki sulu lümene yüklenecek BikDDA geninin Cy5 ile işaretlenmesi spektrofotometrik analizlere kıyasla yaklaşık 1000 kat daha düşük konsantrasyonları tayin etme avantajı sağlamayıp, aynı zamanda da polimerzomların parçalanmasına gerek duyulmaksızın enkapsüle halde miktar tayinini mümkün kılmaktadır. Böylece enkapsülasyon etkinliği ve polimerzomlara yüklenen BikDDA dozunu hesaplamada harcanan ürün kaybı yaşanmamıştır.

Bu şekilde yapılan miktar tayini için gereksinim duyulan, BikDDA ile Cy5 arasındaki işaretleme reaksiyonu ihtiyacı yöntemin dezavantajı olarak değerlendirilebilir. Hayli uzun ve dikkat isteyen bu reaksiyonun gerçekleştirilmesinde ihtiyaç duyulan insan gücüne ek olarak reaksiyonun veriminin yaklaşık % 35-50 arasında olması da diğer bir dezavantajdır.

Yöntemin uygulanmasında ihtiyaç duyulan reaksiyonda her seferinde DNA'nın farklı bölgelerindeki heteroatomlar ile kovalan olarak bağlanma durumu söz konusu olduğu için farklı verim değerinde reaksiyonlar gerçekleşmektedir. Bu nedenle her bir reaksiyon sonucunda elde edilen işaretlenmiş DNA ürününü kullanmadan önce kalibrasyon tekrarlanmaktadır.

Ancak yöntemin avantaj ve dezavantajları kıyaslandığında, hem yenilikçi bir yaklaşım içermesi hem de üretilen polimerzom formülasyonunun herhangi bir

parçalama, ekstraksiyon gibi ekstra bir işleme gereksinim olmadan doğrudan florimetrede analiz edilebilir olması, her ne kadar bir reaksiyon gereksinimine ihtiyaç olmasına rağmen avantajlı bir yöntem olarak öne çıkmaktadır.

4.1.2. Sistein Uçlu Hedeflendirici Peptit Sekansının Sentezi ve Saflaştırılmasına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Sistein uçlu hedeflendirici peptidin sentez reaksiyonları peptit sentezleyici cihazda gerçekleştirildikten sonra elde edilen karışımın saflaştırılması uzmanlık gerektiren ve zaman alıcı bir süreçtir.

Bu sürecin doğasında birbiri ucuna eklenen ve sırası belirlenmiş aminoasitlerin oluşturdukları yan ürünler, toplam ürün kütlesi içerisinde büyük yer tutmaktadır ve saflaştırmayı zorlaştıran temel neden budur. Bu açıdan saflaştırmanın en önemli basamağı istenilen aminoasit sekansına sahip kütlenin bu karışımın içerisinde seçilerek alınmasıdır. Dolayısıyla, bu karışımı oluşturan bütün maddelerin birbirinden tamamen ayrılması preparatif HPLC ile sağlanmıştır. Optimize edilen preparatif HPLC şartları sonucunda karışımı oluşturan bütün maddelere ait piklerin ayrılması ve her bir pikin analiz edilmesi gerekmiştir. Elde edilen bütün piklere ait fraksiyonlar toplanmış ve kütleli tayin açısından LC-MS sistemi ile analiz edilmeye çalışılmıştır. LC-MS'in dedeksiyon üst limiti olan 2000 g/mol'e hayli yakın olan hedeflendirici peptit sekansının molekül ağırlığı 1707 g/mol olduğu için LC-MS sisteminden piklerin analizi açısından cevap alınamamıştır. Bu nedenle de MALDI-TOF ile her bir fraksiyon kütleli olarak analiz edilmiş ve Şekil 3.8'de kırmızı olarak işaretlenmiş pikin istenilen hedeflendirici peptit sekansına ait olduğu bulunmuştur.

Peptit sekansının tespitinin ardından, bu ürünün saflığı analitik HPLC ile kontrol edilmiştir. Bu amaçla, MALDI-TOF ile kütleli ayrımın ispatlandığı (Şekil 3.9) preparatif HPLC fraksiyonu, analitik HPLC'ye enjekte edilmiş ve kromatogramdaki pikler incelenmiştir. Elde edilen pikin Şekil 3.10.'da izlendiği gibi sadece tek tip olması saflığın yaklaşık % 99 olduğunu göstermektedir.

4.1.3. P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ Esaslı Kopolimerlerin Sentezi ve Hedeflendirici Peptit Sekansı ile Konjugasyonlarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

POEGMA-PDPA esaslı polimerzomların formülasyonunda kullanılan P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ kopolimerinin sentezi, bir kontrollü serbest radikal polimerizasyon yöntemi olan, atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP) aracılığı ile gerçekleştirilmiştir. ATRP yöntemi genellikle stiren, akrilat veya metakrilat esaslı monomerlerin polimerizasyonunda kullanılmaktadır ve polidispersite aralığının hayli dar olduğu, moleküler ağırlığın çok iyi kontrol edildiği kopolimerlerin üretiminde kullanılmaktadır (Patten ve ark., 1996).

Polimerzomların üretiminde kullanılan kopolimerin sahip olması gereken blok uzunluklarının, Bölüm 1.3'te anlatıldığı üzere hayli dar bir aralıkta olması gerekmektedir. Dolayısıyla zaten dar bir alanda elde edilmesi hedeflenen kopolimer uzunluğunun, kopolimer sentezinden kaynaklı geniş bir molekül büyüklüğü dağılımı göstermesi, polimerzom elde edilmesinde istenilen en son durumlardan biridir. Bu nedenle polimerzom formülasyonunda kullanılacak, metakrilat bazlı bir kopolimer olan POEGMA-PDPA'nın üretiminde ATRP yönteminin uygulanmasının uygun olacağı düşünülmüştür. ATRP yönteminin esas avantajı çok yönlü bir polimerizasyon yöntemi olması ve kullanılan katalizör ile bağlantılı olarak farklı amaçlara yönelik ihtiyaçların karşılanabilir olmasıdır. Bununla birlikte ATRP yöntemini sınırlayan etmenler, polimerizasyon reaksiyonunda kullanılan ligand ile kompleks oluşturarak, halojen içeren başlatıcı molekülden halojen atomunu kopartarak, monomerin bu başlatıcıya eklenip zincir uzamasının başlamasını sağlayan Cu⁺¹, Cu⁺² gibi geçiş metallerinin kullanılması ve reaksiyon değişkeni sayısının fazla olmasıdır (Matyjaszewski ve Xia, 2001). Bu sınırlayıcıların, çalışmada gerçekleştirilen reaksiyon sonucunda elde edilecek bakır içeriği, yan reaksiyon ürünlerinin oluşması, zincir uzunluklarının kontrol edilebilir olması gibi kopolimer özelliklerini her bir reaksiyon işleminde etkilememesi için, tek potada sentez yöntemi kullanılmış ve hidrofilik blok olan POEGMA grubunun sentezi ile hidrofobik blok olan PDPA ile kopolimerizasyonu aynı reaksiyon ortamı içinde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sonrasında ortamda bulunan metal iyonlarının uzaklaştırılması için ise daha ilkel ve

etkisiz olan anti-      de          saflaştırma işlemi yerine, hem silikajel kolondan geçirerek saflaştırma hem de diyaliz membran saflaştırması uygulanmış ve ortamda bakır iyonlarının kalmadığı garanti altına alınmıştır. Bu durum   ekil 3.18.  deki hücre canlılığı sonuçlarından da anlaşılabilmektedir. POEGMA-PDPA kopolimerinin PNT1A, LNCaP ve HUVEC hücreleri üzerinde herhangi bir sitostatik veya sitotoksik etkisi olmadığı anlaşılmıştır. Bu durum, ortamdaki herhangi bir metal molekülünün kalıntısının bulunmadığının göstergesi olarak yorumlanabilir.

ATRP yöntemiyle tek potada sentezlenen POEGMA-PDPA bazlı kopolimerlerin molekül büyüklüğü dağılımı GPC ile tayin edilmi  tır. Işık saçılımı dedektörü (Sa   A  ılı Işık Saçılımı – Right Angle Light Scattering) kullanılarak analiz edilen dağılım   ekil 3.2  de grafiksel olarak g  sterilmi  tır. Sentezlenen POEGMA-PDPA kopolimerlerinin, kopolimer molekül büyüklüğü dağılımı için hayli dar bir aralık olarak kabul edilen 1,2  lik bir PDI değerine sahip olduğu bulunmuş ve kopolimer sentez reaksiyonu ve sonrasındaki saflaştırmanın etkinliği böylece ortaya konulmuştur. 2002 yılında araştırmacılar, ATRP ile sentezledikleri polimerlerin polidispersite indekslerinin 1,1-1,4 arasında olduğunu tespit etmiş ve bu aralığı hayli dar bir aralık olarak belirtmişlerdir (Carlmark ve ark., 2002). Bu bilgiden hareketle, sentezlenen POEGMA-PDPA kopolimerinin 1,2  lik PDI değeri de, kopolimerin molekül büyüklüğü dağılımının dar bir alanda olduğuna işaret etmektedir.

Kopolimerin molekül ağırlığı dağılımının tespitinde geçmişte en çok tercih edilen yöntem vizkozimetrik analizlerdir. Ancak bu yöntemle elde edilen bilgilerin kesin olmadığı ve yöntemin kendisinin hayli empirik olması nedeniyle (analizde hayli viskoz polimer     ltilerinin kullanılması kesin bir analizi engellemektedir) (Radke ve M  ller, 2005), günümüzde artık çok keskin sonuçların elde edilebildiği, çok daha seyreltik polimer     ltileri ile yüksek hassasiyette sonuçlar elde edilen kütle spektroskopisi ve ışık saçılımı yöntemleri tercih edilmektedir. POEGMA-PDPA kopolimerlerinin molekül büyüklüğü dağılımının tespitinde ışık saçılımı dedektörlü jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) kullanılmıştır. Yöntemin uygulanmasındaki sınırlama olarak nitelendirilebilecek etken ise halen pahalı bir yöntem olarak değerlendirilmesidir.

Sentezlenen POEGMA-PDPA esaslı kopolimerlerin $^1\text{H-NMR}$ kromatogramları, Şekil 3.3. - 3.5. de görüleceği üzere, hayli saf bir kopolimer ürünü elde edildiğini göstermiştir ve kopolimer yapısının detaylı olarak aydınlatılarak tanımlanmasında kullanılmıştır. Elde edilen kromatogramdaki hidrojen pikleri, 2015 yılında yayınlanan POEGMA-PDPA kopolimerinin kromatogramındaki pikler ile örtüşmektedir (Tian ve ark., 2015).

Elde edilen POEGMA-PDPA kopolimerlerin, malemid uçlu hedeflendirici peptit ile konjugasyon reaksiyonu malemid-tiyol reaksiyonu esas alınarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla öncelikle tiyol uçlu kopolimer sentezlenmiş ve satın alınan malemid uçlu peptit sekansı ile etanol içerisinde reakte edilerek konjuge edilmiş ve konjuge olmayan peptit moleküllerinden saflaştırılmıştır. Şekil 3.6.a'da görülen HPLC kromatogramındaki floresans dedektör sinyaline ait veriler ışığında peptit ile konjuge edilmemiş POEGMA-PDPA'nın herhangi bir floresans ışıma vermediği ancak malemid uçlu ve floresans Tamra grubu taşıyan hedeflendirici peptit konjuge edilmiş kopolimerin ise yaklaşık 17. dakikada kuvvetli floresans sinyal verdiği gözlemlenmiştir. Bu durum konjugasyonun başarılı bir şekilde yapıldığını göstermektedir.

Peptit kopolimer konjugasyonu amacıyla ayrıca ikinci bir strateji geliştirilmiştir. Şekil 2.5'te özetlenen şekilde gerçekleştirilen bu yeni yaklaşım, NH_2 uçlu POEGMA-PDPA'nın SMCC bifonksiyonel çapraz bağlayıcısı ile malemid fonksiyonel haline getirilmesi ve ardından ise sentezlenen tiyol uçlu hedeflendirici peptit sekansı ile DMF içerisinde konjugasyonuna dayanmaktadır. Şekil 3.6.b'de görülen floresans HPLC kromatogramında kopolimerden, hedeflendirici peptit sekansından ve peptit-kopolimer konjugatından elde edilen floresans veriler sunulmuştur. Peptit sekansındaki floresans özellikteki fenilalanin amino asitinin (F) yaptığı floresans ışımadan yararlanılarak gerçekleştirilen bu analizde, tek başına kopolimerin herhangi bir floresans sinyal vermediği gözlemlenmiştir. Buna karşılık kendi başına peptidin yaklaşık 13. dakikada verdiği sinyalin, peptit-kopolimer konjugatında 17. dakikaya kayması, konjugasyon işleminin başarı ile gerçekleştirildiğini göstermektedir. Bu yeni yaklaşımın sağladığı en önemli avantaj,

malemid uçlu peptit tedariği gereksinimini ortadan kaldırması ve malemid uçlu peptit sekansının kopolimer ile konjugasyonu için gerekli olan disülfid taşıyan kopolimer sentezine olan ihtiyacı ortadan kaldırmasıdır. Bu yöntemin tek dezavantajı ise ancak iki aşamada konjugasyon işleminin gerçekleştirilebilmesidir.

4.1.4. P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ Polimerzomlarının Formülasyonu, Saflaştırılması ve BikDDA Yüklenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ esaslı polimerzomların üretilmesinde iki farklı yöntem kullanılmıştır. Öncelikle kullanılan film hidrasyonu yöntemi, sadece polimerzom elde edilmesi açısından hayli avantajlı olarak değerlendirilmiştir. Hidrasyon süresine bağlı olarak farklı morfolojideki polimerzomlara ait TEM görüntüleri Şekil 3.15.'te sunulmuştur. TEM görüntülerinde elde edilen sonuçlar, P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ kopolimerinin morfolojik evriminin çubuklardan (silindirik polimerzomlar) küresel polimerzomlara doğru olduğunu açıkça göstermektedir. Yaklaşık 8 günlük bir hidrasyonun ardından nano boyuttaki çubuklar elde edilirken, 4 haftalık hidrasyon ile küresel şekilli polimerzomlara ulaşıldığı ispatlanmıştır.

Ancak peptit aracılı hedeflendirilmiş polimerzomların üretilmesinde bu 4 haftalık hidrasyon süresinin, peptidin yapısında katlanmalara neden olabileceği, sonuç olarak PSMA reseptörlerine yeterli afinite göstermeyeceği düşünülmüştür. Dolayısıyla bu yöntem ile polimerzom üretiminden vaz geçilmiş ve daha kısa sürede gerçekleşen pH değişimi yöntemiyle polimerzom eldesi fikri ön plana çıkmıştır.

pH değişimi yöntemi, film hidrasyonu yöntemine göre çok daha hızlı gerçekleşmektedir (yaklaşık 1,5 gün). Hedeflendirilmiş polimerzomların üretimi esnasında, polimerzom yüzeyinde bulunacak olan peptit moleküllerinin katlanma ihtimalini ortadan kaldırmak/en aza indirmek için bu yöntem ile çalışmalara devam edilmiştir. Ancak bu yöntemin dezavantajı, polimerzom yapıları ile beraber miseller yapılarında elde edilmesidir. Dolayısıyla üretim sonrasında bir saflaştırma işlemi gereksinimi ortaya çıkmıştır. Saflaştırma için küçük boyutlu miselleri (~ 5-30 nm) daha büyük boyutlu polimerzomlardan ayırabilmek için boyut dışlama kromatografisi

(SEC) uygulanmıştır. Bu işlem sonrasında hayli dar bir partikül büyüklüğüne sahip polimerzom dispersiyonu elde edilmiştir (Şekil 3.17.a). Fakat SEC işlemi sonrasında polimerzom dispersiyonu önemli oranda seyrelmiştir. Fakat P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ esaslı polimerzomların üretiminde kullanılan başlangıç konsantrasyonu hayli yüksek olduğu için (~ 10 mg/mL) seyrelme durumu final ürünün elde edilmesinde bir sorun teşkil etmemiştir.

pH değişimi yöntemi, film hidrasyonu yönteminde olduğu gibi organik çözücülerin kullanılmadığı bir yöntem olduğu için biyomakromoleküllerin enkapsülasyonunda güvenle kullanılabilecek bir yöntem olarak ortaya çıkmaktadır.

BikDDA geninin polimerzomların içerisine enkapsülasyonunda, moleküler biyolojide istenilen moleküllerin hücrelerin içine sokulmasında sıklıkla kullanılan elektroporasyon yöntemi (Wang ve ark., 2012) uygulanmıştır. Bu yöntem kapsamında BikDDA çözeltisi, önceden hazırlanmış polimerzom dispersiyonu ile karıştırılıp 2500 V'luk bir elektrik voltaj uygulanır. Uygulanan voltaj DNA'nın yapısında herhangi bir değişim oluşturmaz iken, polimerzom membranında geçici delikler meydana getirmektedir. Ortamda bulunan BikDDA molekülleri ise bu delikler aracılığıyla polimerzomların sulu lümenine doğru hareket ederler. Bu işlemin, DNA'nın yapısında hasar meydana getirmeyecek belirli sayıda tekrar edilmesi ile polimerzomların içerisine giren DNA molekülü sayısı artırılır. Son olarak ise polimerzom membranında meydana gelen deliklerin iyileşmesi/kapanması için, ilerleyen kullanım öncesinde polimerzom formülasyonu belirli süre hareketsiz bekletilmiştir.

Elektroporasyon sonrasında ortamda bulunan enkapsüle olmamış DNA moleküllerinin uzaklaştırılması için yenilikçi bir yöntem uygulanmıştır. DNA moleküllerinin sulu ortamda polimerzom büyüklüğüne yakın büyüklükte kendiliğinden oluşum süreci ile büyük oluşumlar meydana getirmesi, saflaştırma işleminde doğrudan SEC'in, ultrafiltrasyonun veya diyaliz işleminin uygulanmasını engellemektedir. Dolayısıyla, bölüm 2.2.1.8.'de anlatıldığı üzere, öncelikle DNaseI ile fosfodiester bağları kırılan BikDDA, ortamdaki SEC işleminin uygulanması ile uzaklaştırılmıştır. Hayli kalın ve sağlam polimerzom membranından içeri girme

ihtimali olmayan DNaseI'in sadece 10 dakika süresince polimerzomlar ile muamele edilmesi bu çok küçük ihtimali de ortadan kaldırmıştır.

Elektroporasyon sonrasındaki saflaştırmanın ardından BikDDA enkapsülasyon etkinliği değerleri hesaplanmış ve hedeflendirilmemiş polimerzomlar için % 3,9, hedeflendirilmiş polimerzomlar için ise % 7,6 olarak bulunmuştur. Hedefleyici peptit sekansının hidrofilik yapısı, kopolimerin hidrofilik-hidrofobik dengesini hidrofilik tarafa kaydırmıştır. Dolayısıyla da elektroporasyon sırasında polimerzom membranında oluşan geçici porlardan geçen BikDDA moleküllerinin, hidrofilik dengesi artmış bir yapıdan geçmesi daha kolay olduğu için, hedeflendirilmiş polimerzomların sulu lümenine daha fazla sayıda BikDDA molekülü geçmiş ve sonuç olarakta enkapsülasyon etkinliği, hedeflendirilmemiş olanlara kıyasla daha yüksek bulunmuştur (Çizelge 3.2.).

2010 yılında bir araştırma ekibi, PMPC-PDPA polimerzomlarına % 50 - 60 enkapsülasyon etkinliği ile pDNA yükleyebilmişlerdir. Ancak pDNA'yı yüklerken polimerzom dispersiyonunun pH'sını ~ 6.0 düşürüp veziküler yapıyı deforme ederek enkapsülasyon işlemi gerçekleştirmiş, sonrasında ise pH'yı tekrar 7,3 düzeyine getirmişlerdir (Lomas ve ark., 2007). pH 6,0 değerinde PDPA bloğu, pH duyarlı doğası gereği kısmi pozitif yük kazanmış ve negatif yüklü pDNA ile polimerin tersiyer amin grupları elektrostatik etkileşime geçmiştir. Bu etkileşim polimerzom membranının iç sulu lümen tarafında olduğu kadar, dış tarafında da gerçekleşmiştir. Dolayısıyla, pH'nın 7,3'e yükseltilmesinin ardından elde edilen pDNA yüklü polimerzom yapısının dış yüzeyinde, membrana elektrostatik olarak bağlanmış pDNA molekülleri de bulunmuştur. Bu nedenle elde edilen enkapsülasyon etkinliği değerleri sadece polimerzom içerisine enkapsüle olan miktarı yansıtmamaktadır. 2012 yılında yapılan bir çalışmada ise pDNA, PMPC-PDPA polimerzomları içerisine elektroporasyon yöntemi ile yapısı bozulmadan enkapsüle edilerek % 5 - 9 arasında bir enkapsülasyon etkinliği değerine ulaşılmıştır (Wang ve ark., 2012) ki bu değerler tez kapsamında ulaşılan sonuçlar ile örtüşmektedir. Elektroporasyon yöntemi ve arkasından uygulanan saflaştırma işlemi ile elde edilen enkapsülasyon etkinliği verileri her ne kadar düşük olarak görünse de, sadece P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ polimerzomlarının iç sulu

lumenine BikDDA yüklenmesi hem de organik çözücü kullanımına gerek duyulmaması açısından avantaj sağlamaktadır.

4.1.5. P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ Esaslı Polimerzomların Karakterizasyon Bulgularının Değerlendirilmesi

Çalışma kapsamında, P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ kopolimerinden hareketle, film hidrasyonu yöntemi kullanılarak hem nano boyuttaki silindirik polimerzomlar (nano-çubuklar) hem de küresel polimerzomlar üretilmiş ve Şekil 3.16.'de TEM görüntülemeleri ile ispatlanmıştır.

Üretilen kopolimerin blok uzunluklarının, elde edilecek nano yapının morfolojisi üzerine doğrudan etkisinin olduğu tespit edilerek TEM görüntülemeleri ile ispatlanmıştır. P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₈₈ kopolimerinin kullanıldığı, pH değişim ile üretilen formülasyona ait görüntüler Şekil 3.14'te sunulmuştur. Görüntülerde gözlemlenen yapılar literatürde high-genus olarak adlandırılan ve pretzel görünümüne sahip evrik yapılardır (Pearson ve ark., 2013). Ancak P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ kopolimerinin yine aynı koşullardaki pH değişimi yöntemiyle formüle edilmesi ile ulaşılan küresel, tek tabakalı polimerzom yapıları Şekil 3.11. – 3.13.'te rahatlıkla gözlemlenebilmektedir. Bu durum bölüm 1.3.'te anlatılan, polimerzomların dar bir f değeri alanındaki kopolimerler ile elde edilebildiği bilgisi ile uyusmaktadır.

pH değişimi yöntemiyle üretilen BikDDA yüklü polimerzomlara ait partikül büyüklüğü verileri, BikDDA enkapsülasyonunun ortalama polimerzom büyüklüğünü yaklaşık 10 nm artırdığını göstermektedir (Çizelge 3.1.). Benzer şekilde BikDDA yüklü polimerzomlara kıyasla, hedeflendirici peptit sekansı taşıyan polimerzom formülasyonlarının ortalama partikül büyüklüğü ise yaklaşık 14 nm artmıştır. Bu durum peptit konjugasyonunun bir diğer göstergesi olarak değerlendirilebilir. Elde edilen bu ortalama partikül büyüklüğü verileri, kansere yönelik hedeflendirilmiş nanopartiküllerin sahip olması gereken ~ 200 nm'lik partikül büyüklüğü kıstasını karşılamaktadır ve amaçlanan hedefin sağlandığına işaret etmektedir.

Şekil 3.17.b.'de bulunan korelasyon fonksiyonu grafiği, benzer partikül büyüklüğüne sahip polimerzom formülasyonlarının yine benzer moleküler hareketler sergilediğini, eksponansiyel olarak azalan grafik şekli ile göstermektedir ve ortalama partikül büyüklüğü verileri ile uyumaktadır. Bu durum TEM görüntüleri ile eşleştirildiğinde, dinamik ışık kırınımı cihazı ile elektron mikroskopu görüntülerinin birbirini tamamlaması şeklinde yorumlanabilir.

4.1.6. P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ Esaslı Polimerzom Formülasyonlarının Hücrelerde Yapılan Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Sentezlenen kopolimerlerin ve bu kopolimerlerden hareketle üretilen polimerzom formülasyonlarının hücre çalışmalarında kullanılacak konsantrasyonlarını belirlemek amacıyla, MTS testi aracılığıyla hücre canlılık analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla sağlıklı prostat epitel hücresi olan PNT1A, prostat adenokarsinoma hücre hattı olan LNCaP ve sağlıklı kontrol hücre hattı olarak ise HUVEC hücreleri kullanılmıştır. Bu hücre hatları 25 µg/mL, 50 µg/mL, 75 µg/mL ve 100 µg/mL konsantrasyonlarında P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ kopolimeri ile muamele edilmiştir. Şekil 3.18.'de grafikler halinde sunulan veriler sentezlenen kopolimerin, hücre hatları üzerinde denenen tüm konsantrasyon ve zaman aralıklarında toksik olmadığını göstermiştir. Biyouyumlu olan P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ kopolimerinin bu verileri, aynı zamanda sentez sonrasında yapılan saflaştırmanın etkinliğini de ispatlamaktadır.

Polimerzom üretim yönteminde herhangi bir organik çözücü ya da toksik bir madde kullanılmadığı için, sentezlenen kopolimerler ile bu kopolimerlerden hazırlanan polimerzomların hücre canlılıkları üzerinde benzer etkiler göstermesi beklenmektedir. Ancak bu durumun ortaya koyulması için, üretilen polimerzom formülasyonunun, hedeflendirme yapılacak hücre hattı olan LNCaP hücreleri üzerindeki hücre canlılığı analizi yapılmıştır (Şekil 3.19.a.). Bu iddianın kanıtı olarak Şekil 3.18.b ile Şekil 3.19.'daki benzer hücre canlılık profilleri gösterilebilir. Çalışmanın esas amacı olan BikDDA yüklü hedeflendirilmiş P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ polimerzomlarının geliştirilmesi sonucunda elde edilen ürünün prostat kanseri

hücreleri üzerindeki etkinliği ise Şekil 3.19.b.'de görülmektedir. Kontrol grubu ve hedeflendirilmemiş polimerzom formülasyonuna göre kanserli hücre sayısını yaklaşık % 47 oranında azaltması, hedeflendirilmiş polimerzom formülasyonunun, pro-apoptotik BikDDA genini başarıyla kanserli hücelere taşıdığını ve BikDDA geninin ise bu hücreleri apoptoza sürükleyerek öldürdüğü sonucuna varılmıştır.

Prostat kanserine hedeflendirilmiş olarak üretilen POEGMA-PDPA polimerzomlarının kanser hücrelerine spesifik alımları konfokal mikroskop analizi ve akış sitometrisi ile hem görsel hem de kantitatif olarak ortaya koyulmuştur. Şekil 3.20.'de LNCaP ve PNT1A hücreleri üzerinde yapılan hücre içine alım çalışmaları göstermiştir ki, prostat kanseri hücrelerine alınan peptit563 aracılığıyla hedeflendirilmiş polimerzom miktarı, sağlıklı prostat hücrelerine göre çok daha fazladır. Mikroskop görüntülerindeki turuncu renk, polimerzomların yüzeyindeki peptit563 e bağlı olan Tamra floresans boyasına aittir. Dolayısıyla turuncu rengin ifadesinin artması, hücre içerisine alınan polimerzom miktarının belirtecidir.

Hedeflendirmenin kantitatif analizi için ise akış sitometrisi yöntemi kullanılmıştır. Şekil 3.21.'deki akış sitometrisi verileri, konfokal mikroskop verileri ile uyularak, hedeflendirilmiş polimerzomların sağlıklı prostat hücrelerinden ziyade kanserli prostat hücreleri tarafından alındığını ortaya koymaktadır. Hedeflendirilmiş polimerzom formülasyonlarının sadece % 3,62'si sağlıklı PNT1A hücreleri tarafından alınırken, kanserli LNCaP hücreleri polimerzomların % 48,28'ini hücre içine almaktadır. Bu veriler göstermiştir ki, PSMA'ya spesifik olarak bağlanan peptit563 aracılığıyla prostat kanserine hedeflendirilmiş POEGMA-PDPA polimerzomları, prostat kanseri hücrelerinin yüzeyindeki PSMA tarafından tanınarak alınmaktadır. Polimerzomların hücre içine alımının ise reseptör aracılı endositoz mekanizması ile gerçekleştiği düşünülmektedir (Tian ve ark., 2015).

2016 yılında yapılan bir çalışmada, bizim bulduğumuz veriler ile uyumlu olarak, PSMA hedefli polimerzomlar geliştirilmiş ve hedeflendirilmemiş olanlara kıyasla çok daha fazla miktarda prostat kanseri hücreleri tarafından alınmış ve bu

durum floresans ışımanın şiddetinin sunulması ile kanıtlanmıştır (Karandish ve ark., 2016).

Prostat kanserine yönelik geliştirilen PSMA hedefli tedavi adayların gösterdiği bu sonuçlar, ileride prostat kanserinin tedavisinde diğer dokulara zarar vermeden gerçekleştirileceğinin habercileri olarak değerlendirilebilir.

2007 yılında PMPC-PDPA polimerzomlarının gen transfeksiyon etkinlikleri eski nesil bir transfeksiyon ajanı olan lipofektamin ile kıyaslanmış ve daha yüksek olarak tespit edilmiştir (Lomas ve ark., 2007). Buradan hareketle, yukarıda anlatıldığı üzere, hedeflendirilmiş P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ polimerzomlarının pro-apoptotik BikDDA genini kanserli hücelere başarıyla taşıdığının tespitinin ardından, bu taşıyıcı sistemin transfeksiyon etkinliğinin piyasada ticari olarak kullanılan son jenerasyon transfeksiyon ajanlarından birisi olan X-tremeGENE ile kıyaslanması planlanmıştır. Polimerzomlara enkapsüle edilmiş BikDDA ile eşit konsantrasyonda BikDDA içeren bu transfeksiyon ajanının etkinlikleri LNCaP hücreleri üzerinde test edilmiş ve hücrelerin ürettiği GFP miktarları floresans mikroskop altında gözlemlenmiştir. Şekil 3.22.a'da X-tremeGENE transfeksiyon ajanı aracılığıyla transfekte edilen LNCaP hücrelerini ürettiği yeşil proteinler ve Şekil 3.22.b'de ise P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ polimerzomları aracılığıyla transfekte edilen LNCaP hücrelerinin ürettiği yeşil proteinler sunulmuştur. Bu resimlerden ve Şekil 3.22.c.'de sunulan, üretilen yeşil proteinlerin verdiği floresans şiddetlerinin kantitatif olarak kıyaslanması sonucunda, 72 saatlik bir inkübasyonu takiben P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ polimerzomlarının, X-tremeGENE ajanına göre daha iyi bir transfeksiyon ajanı olduğu görülmektedir. Her ne kadar 24. ve 48. saatlerde X-tremeGENE'e göre daha az transfeksiyon etkinliği görülmüşse de, transfeksiyon sonucunda protein üretimi için ihtiyaç duyulacak zamanın 72 saat olduğu 2009'da yayınlanan çalışmada ortaya konmuştur (D. A. Christian ve ark., 2009).

Elde edilen transfeksiyon verilerinden hareketle, P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ polimerzomlarının, en az piyasada kullanılan transfeksiyon ajanları kadar başarılı olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

4.2. PEtOx-b-PLA Kopolimeri ile Yapılan Çalışmalar

4.2.1. Dosetakselin Kalibrasyonu ve Validasyonuna Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Öncelikle, dosetaksel trihidrat (DTX)'ın asetonitril içerisindeki stok çözeltisinden (100 µg/mL) 1 mL alınıp balonjoje içerisinde 10 mL'ye pH 7,4 PBS tamponu ile tamamlanarak hazırlanan çözeltinin maksimum absorbans verdiği dalga boyu UV spektrofotometrede 229 nm olarak tayin edilmiştir. Farklı yıllarda yapılan çalışmalarda (Kim ve ark., 2017; Liu ve ark., 2010) dosetakselin tayininde kullanılan dalga boyunun 230 nm olduğu ve değerin çalışmamızda elde edilen değer ile örtüştüğü tespit edilmiştir.

DTX'in pH 7,4 PBS tamponu içerisinde oluşturulan kalibrasyon grafiğine (Şekil 3.24.) ait denklemin parametreleri Çizelge 3.5.'te sunulmuştur. Elde edilen r^2 değerinin (0,9981) yüksek olması, kesişim değerinin negatif olması, HPLC'deki her bir DTX tayini için elde edilen pik alanından yola çıkılarak bulunan konsantrasyon değerlerinin yüksek hassasiyetli ve güvenilir sonuçlar verdiğini göstermektedir.

Çizelge 3.7., 3.8. ve 3.9.'da DTX'in kalibrasyonuna ait validasyon parametreleri olan doğruluğa ve kesinliğe (tekrarlanabilirlik ve ara kesinlik) ait bilgiler sunulmuştur. Bu çizelgelerdeki bağıl standart sapma değerlerinin % 2'nin altında bulunması, oluşturulan kalibrasyon grafiğine bağlı kalibrasyon denkleminin doğru ve kesin sonuçlar verdiğini ortaya koymaktadır. Tayin yöntemi validasyonunun seçiciliği, ortamda bulunabilecek diğer yardımcı maddeler ile etkin maddenin pikinin girişim yapmaması nedeniyle, bu yöntemin DTX için seçici olduğunu doğrulamıştır.

DTX'in pH 7,4 PBS tamponu içerisindeki, kullanılan miktar tayini yöntemine ilişkin hesaplanan teşhis sınırı (LOD: 0,127 µg/mL) ve tayin sınırı (LOQ: 0,386 µg/mL) verilerinin, kalibrasyon denklemini oluşturulurken kullanılan en küçük konsantrasyon değeri olan 0,4 µg/mL'den küçük olması, kalibrasyon aralığının DTX'in bu yöntem ile tayin edilebildiği aralıkta olduğunu göstermektedir. Doğrusallık

parametresinin analizi gerçekleştirile çalışma sonucunda elde edilen grafik Şekil 3.25.'te ve bu grafiğe ait veriler ise Çizelge 3.10.'da sunulmuştur. Elde edilen doğrunun r^2 değerinin 1'e hayli yakın olması ve regresyon doğrusundan sapmaların standart hatasının düşük olması, kalibrasyon denklemi ile ulaşılan konsantrasyon değerlerinin güvenilirliğini göstermektedir.

4.2.2. PEtOx-*b*-PLA Kopolimerinin Blok Uzunluklarının Belirlenmesi, Saflaştırılmasına ve Sentezine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Lineer alifatik bir blok kopolimer olan PEtOx-*b*-PLA'nın, su/sulu tampon içerisindeki morfolojik değişimleri daha önceden literatürde incelenmemiş bir alandır. Dolayısıyla hangi molekül ağırlığında ve hangi blok uzunluğu oranlarında nasıl bir yapıya ulaşılacağı bilinmemektedir. Önceden yapılmış bir araştırma PEtOx-*b*-PLA kopolimerinden hareketle sadece miseller yapılar elde edildiğini ortaya koymaktadır (Lee ve ark., 1999). Bu nedenden ötürü, hem lineer hem de alifatik bir kopolimer olan PEG-*b*-PLA'dan hareketle, hangi molekül ağırlığı ve blok uzunluklarında polimerzom yapısına ulaşıldığı çalışmanın başlangıcında kriter olarak alınmıştır. Literatürde bu amaçla belirtilen genel kanı, f değerinin (hidrofilik bloğun ağırlığının toplam kopolimer ağırlığına oranı) % 35 ± 10 olduğu ve kopolimer ağırlığının ~ 2-20 kDa aralığında olduğu durumlarda veziküler polimerzom yapılarına ulaşıldığı yönündedir (Discher ve Ahmed, 2006).

Bu bilgilerden hareketle toplam molekül ağırlığı ~ 6-20 kDa aralığında olan PEtOx-*b*-PLA kopolimerlerinin sentezlenmesi sonrasında, polimerzom yapısına ulaşabilmek amaçlı ön çalışmalar yapılmıştır (Çizelge 2.3.). Öncelikle PEtOx bloğunun 3 kDa ($f \sim \% 20$), 4 kDa ($f \sim \% 25$) ve 7,5 kDa ($f \sim \% 45$) olduğu ve PLA bloğunun ise sabit olarak 9 kDa olduğu, yani toplam molekül ağırlığının 12 kDa ile 16,5 kDa arasında değiştiği blok kopolimerler üzerinde çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Film hidrasyonu yöntemi ile elde edilen morfolojik yapıların TEM görüntüleri Şekil 3.28. – 3.30.'da sunulmuştur. Bu görüntülerden hareketle f değerinin % 20'den % 45'e yükselmesiyle beraber, elde edilen nano-yapıların morfolojisinin çubuktan miseller yapılara kaydığı açıkça görülmüştür. Bu durum f değerinin, blok kopolimer

morfolojisini yönlendiren en önemli etmenlerden olduğu kanıtlanmış ve daha önce yayınlanmış bilgiler ile örtüşmektedir (Shen ve Eisenberg, 2000).

f değerinin kopolimer morfolojisini yönlendirdiği bilgisi her ne kadar literatür bilgileri ile örtüşse de, bu değerin $\% 35 \pm 10$ olduğu durumlarda polimerzom yapıları gözlemlenir iddiasını destekleyecek bulgular elde edilememiştir. Bu durumun nedeni olarak ise kopolimerin molekül ağırlığının, ortaya çıkan agregat morfolojisini misellerden veziküllere ya da çubuklardan veziküllere geçiş açısından yeterli olmadığını düşündürmüştür. Bu nedenle daha az ve daha yüksek molekül ağırlığına sahip kopolimerler ile denemelerin yapılması amaçlanmıştır.

Elde edilen bu bilgiler ışığında PEtOx bloğunun 2 kDa ($f \sim \% 25$), 2,7 kDa ($f \sim \% 32$) ve 4,4 kDa ($f \sim \% 45$) olduğu ve PLA bloğunun ise sabit olarak 5,8 kDa olduğu, yani toplam molekül ağırlığının 7,8 kDa ile 10,2 kDa arasında değiştiği blok kopolimerler üzerinde araştırmalara geçilmiştir. Aynı zamanda bu kopolimerlere göre daha yüksek molekül ağırlığına sahip olan, PEtOx bloğunun 3,6 kDa ($f \sim \% 20$), 4,6 kDa ($f \sim \% 24$) ve 6,2 kDa ($f \sim \% 30$) olduğu ve PLA bloğunun ise sabit olarak 14,4 kDa olduğu, yani toplam molekül ağırlığının 18 kDa ile 20,6 kDa arasında değiştiği blok kopolimerler üzerinde çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Çizelge 2.3.).

Üzerinde çalışma yapılan kopolimerlerden elde edilen sonuçlar göstermiştir ki, PEtOx-*b*-PLA kopolimerinin molekül ağırlığı azaldıkça ($\sim 7,8 - 10,2$ kDa), f değeri her ne kadar $\% 35 \pm 10$ sınırları içerisinde de olsa, ortaya çıkan yapılar çoğunlukla evrik, misel ve bir miktarda çubuklardan oluşan morfolojiler sergilemektedir. Molekül ağırlığının nispeten artırılması ise ($\sim 12-16,5$ kDa), elde edilen morfolojilerin çoğunlukla misel ve çubuk olmak üzere daha düzenli olduğu ancak yine de veziküler yapılara ulaşamadığı tespit edilmiştir. Bunun üzerine kopolimerin molekül ağırlığının daha da artırılmasına karar verilmiş ve 18 kDa ile 20,6 kDa arasında molekül ağırlığına sahip PEtOx-*b*-PLA kopolimeri üzerinde çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Molekül ağırlığı, önceden çalışılan PEtOx-*b*-PLA kopolimerlerine göre daha yüksek olan bu kopolimerlerin bütün hepsinde veziküler polimerzom yapılarına ulaşılmıştır (Şekil 3.36.-3.38.).

Böylece literatürde daha önce araştırılmamış bir konu olan PEOx-*b*-PLA esaslı kopolimerlerin morfolojik değişimleri incelenmiş ve değerlendirilmiştir. Ayrıca literatürde, lineer alifatik kopolimerlerin hangi f değerlerine sahip olduğunda polimerzom yapılarını verdiğine dair genel geçer kural olan % 35±10 kuramının PEOx-*b*-PLA kopolimeri için bütünüyle geçerli olmadığı ortaya çıkartılmıştır. Ayrıca, $f < \% 25$ olduğu durumlarda evrik yapıların ortaya çıkacağı teoremi de (Discher ve Ahmed, 2006) ortadan kaldırılmıştır. Elde ettiğimiz veriler, PEOx-*b*-PLA kopolimerlerinin f değerinin 25±5 olduğu durumlarda veziküler polimerzom yapılarına dönüştüğünü ispatlamıştır.

Sonradan yapılacak peptit aracılı hedeflendirilmiş polimerzomların geliştirilmesi ve formülasyonu için yapılacak çalışmalarda kullanılacak peptit konjuge PEOx-*b*-PLA kopolimerlerinin kullanımı sırasında, hidrofilik peptit sekansının PEOx-*b*-PLA kopolimerinin hidrofilik-hidrofobik blok dengesini değiştireceği öngörüldüğü için ve bu durumun polimerzom yapısının elde edilmesinde problem yaratabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle polimerzom yapısına ulaşılan 3,6 kDa ($f \sim \% 20$), 4,6 kDa ($f \sim \% 24$) ve 6,2, kDa ($f \sim \% 30$) oranlarında PEOx ve 14,4 kDa büyüklüğünde PLA içeren kopolimerler arasından 3,6 kDa ($f \sim \% 20$) büyüklüğünde PEOx içereni seçilmiştir. Böylece yaklaşık 1,7-2,0 kDa büyüklüğündeki hedeflendirici peptitlerin kopolimere konjugasyonu ile değişecek hidrofilik-hidrofobik blok dengesinin ($f \sim \% 27 - \% 28$) polimerzom elde edilen aralıkta ($f \sim \% 25\pm 5$) kalacağı öngörülmüştür.

PEOx₃₇-*b*-PLA₂₀₀ kopolimerlerinin tanımlanması ve yapısal olarak aydınlatılması için FTIR ve ¹H-NMR yöntemleri kullanılmıştır. Şekil 3.26.'da sunulan PEOx ve PEOx₃₇-*b*-PLA₂₀₀ polimerinin FTIR spektrumları, bu polimerlerin yapısını aydınlatmak için kullanılmıştır. Kırmızı siyah renk ile çizilen PEOx polimerine ait spektrumda, polimerin en dominant grubu olan C=O bağına ait piki, yaklaşık 1700 cm⁻¹'de gözlemlenmiştir. Aynı şekilde PLA bloğundaki en dominant grupta C=O bağıdır (Lizundia ve ark., 2016). Dolayısıyla sadece PEOx polimerine göre PEOx₃₇-*b*-PLA₂₀₀ kopolimerindeki C=O pikinin daha şiddetli olması beklenmektedir. Bu beklentiye karşılayan Şekil 3.26.'daki spektrum PEOx ile PLA bloklarının

konjugasyonuna işaret etmektedir. Ayrıca PEtOx polimerindeki N3 grubuna ait yaklaşık 2200 cm^{-1} 'de gözlemlenen pikin, PEtOx₃₇-b-PLA₂₀₀ kopolimerine ait kırmızı renkli spektrumda kaybolması, konjugasyonun en önemli göstergesidir.

PEtOx₃₇-b-PLA₂₀₀ kopolimerinin yapısının tamamen aydınlatılması için ise, ¹H-NMR spektroskopisi kullanılmıştır. Kopolimerin yapısındaki, farklı yerlerde bulunan karbon atomlarına bağlı hidrojen atomları, Şekil 3.27.'deki spektrum ile aydınlatılmış ve literatür ile uyumlu olduğu gözlemlenmiştir (Gaspar ve ark., 2014). PEtOx ile PLA bloklarının konjugasyonunun göstergesi olarak Şekil 3.27.'deki “d” piki önem taşımaktadır ve PLA'nın varlığını “f” ve “e” pikleri net bir şekilde kanıtlamaktadır. Şekil 3.27.'de, PLA blokunun ucundaki -OH grubuna ait proton piki ise proton NMR'da çok ender görülmektedir. Çünkü H-NMR, karbon atomlarına bağlı protonların manyetik etkileşimi ile sonuç vermektedir. Bu nedenle oksijen ile bağlı protonun, H-NMR'da gözlenmesi yok denecek kadar az gerçekleşmektedir. Ayrıca PEtOx₃₇-b-PLA₂₀₀ kopolimeri yaklaşık 20 kDa'luk oldukça büyük bir molekül yapısına sahip olduğu için molekül ağırlığı yüksek bir polimer zincirinde sadece bir adet bulunan bir fonksiyon genelde gözlenmemektedir. Dolayısıyla hem tekrarlayan ünitelerin oluşturduğu yoğun pikler hem de karbona bağlı olmadığı için, -OH grubunun protonuna ait ¹H-NMR piki beklenen üzere gözlenmemiştir.

PEtOx₃₇-b-PLA₂₀₀ kopolimerinin sentezi için öncelikle PEtOx ve PLA bloklarının halka açılma polimerizasyonu ile ayrı ayrı sentezi yapılmış ve takibinde ise bu iki bloğun azid-alkin siklokatalım reaksiyonu (klik reaksiyonu) ile konjugasyonu şeklinde tamamlanmıştır. PEtOx polimerinin sentezi şimdiye kadar halka açılması polimerizasyonu (ROP) ile gerçekleştirildiği için (Sinai-Zingde ve ark., 1991), PEtOx sentezinde ROP yöntemi tercih edilmiştir. PLA polimerinin sentezinde ise çoğunlukla iki yöntem tercih edilmektedir. Bu yöntemler ROP ve polikondenzasyon yöntemidir. Polikondenzasyon yönteminde laktik asit monomerlerinin birleşmesiyle gerçekleşen reaksiyondan aynı zamanda -COOH ve -OH gruplarının birleşmesiyle yan ürün olarak su oluşmaktadır. Hayli viskoz polimerizasyon ortamından bu yan ürünlerin uzaklaştırılmasının çok zor olması, polikondenzasyon yöntemi ile sadece molekül ağırlığı düşük PLA polimerlerinin elde edilebilmesini ortaya çıkarmıştır.

Polikondenzasyon yönteminin aksine, ROP yöntemi ile spesifik ve arzu edilen özelliklere (örneğin: kırılma indisi, molekül ağırlığı) sahip polimer elde edilebilmektedir ve bu durum, bugün polimer sentezinde çok önemli hale gelmiştir. Polikondenzasyon ile karşılaştırıldığında ROP yönteminin kullanılması, zincir bağlama maddesi veya azeotropik sisteme gereksinim olmaksızın, laktit ve sentez koşullarının saflığının yüksek hakimiyet ile kontrol edildiği ve daha geniş moleküler ağırlık aralığına sahip polimerin elde edilmesinde büyük avantaj sağlamaktadır (Hu ve ark., 2016). Bu nedenle, Cargill Dow (Minnetonka, MN, ABD) ve Shimadzu (Kyoto, Japonya) gibi bazı önde gelen üreticileri PLA üretim yöntemi olarak, daha ilkel olarak kabul edilen polikondenzasyon yerine ROP yöntemini kullanmaktadır (J. Zhang ve ark., 2009). Bu nedenle çalışmamızda PLA sentez yöntemi olarak ROP kullanılmıştır. Sonrasında PETox ve PLA bloklarının birleştirilmesinde ise klik reaksiyonu kullanılmıştır. Klik reaksiyonu şu anda polimer teknolojisinde ve farmasötik alanda kullanılan en seçici yöntemlerin başında gelmekte ve herhangi bir yan reaksiyon ürünü oluşturma potansiyeli bulunmamaktadır (Hein ve ark., 2008). Dolayısıyla peptit, protein ve küçük moleküllu yapıların konjugasyonu için son dönemde sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir. Dezavantaj olarak bakır aracılı katalizasyon gereksinimi duyulduğu için, hücresel uygulamalar öncesinde bakırın ortamda uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu nedenle çalışmamızda kopolimerin sentezinin ardından hem silika jel saflaştırılması hem de diyaliz işlemi uygulanmıştır.

Yapısı aydınlatılmış PETox₃₇-b-PLA₂₀₀ kopolimeri, sentez reaksiyonu sonucunda diklorometanda çözülüp soğuk dietileterde çöktürülerek kısmi anlamda saflaştırma işlemine tabi tutulmuştur. Ancak bu şekilde saflaştırılan kopolimerler ile yapılan çalışmalarda elde edilen formülasyonların TEM görüntülemeleri yapıldığında istenilen yapılardan hayli uzak, küresel ve veziküler olmayan olmayan yapıların elde edildiği ön sonuçlara ulaşılmıştır (Şekil 3.41.a). Ancak aynı kopolimerin Bölüm 2.2.2.2.'de anlatıldığı şekilde ikinci bir detaylı ve uzun saflaştırma işlemine tabi tutulması sonucunda hedeflenen yapılara ulaşıldığı anlaşılmıştır (Şekil 3.41.b). Bu durumun nedeni olarak, dietileter çöktürmesinin sadece ortamda bulunan katalizör ve antioksidanların ortamdaki uzaklaştırılmasını kısmi olarak sağladığı ancak diyaliz ile saflaştırmanın hem kopolimerin molekül büyüklüğü dağılımını daralttığı hem de

reaksiyona girmemiş monomerlerin, reaksiyon katalizörünün ve diğer yan ürünlerin ortamdan uzaklaştırılmasında işe yaradığı tespitine varılmıştır.

4.2.3. PEOx-*b*-PLA Kopolimeri ile Yapılan Polimerzom Formülasyonu Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Kendiliğinden oluşum mekanizması ile elde edilen polimerzomların, sulu sistemler içerisinde kinetik olarak denge halinde bulunan sentetik kopolimer esaslı veziküler yapılar olduğu Bölüm 1.3.'te detaylı olarak anlatılmıştır. Bu sistemlerin üretiminde kullanılan yöntemlere ise Bölüm 1.4.1.'de değinilmiştir. Yapılan araştırmada, P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ polimerzomlarında olduğu gibi film hidrasyonu yöntemi öncelikle denenmiş ve polimerzom üretiminde kullanılacak PEOx-*b*-PLA kopolimerinin blok uzunlukları bu yöntem ile belirlenmiştir. Ancak hedeflendirilmiş polimerzomların üretiminde kullanılacak peptit sekansının, uzun bir hidrasyon süreci sonunda yapısında meydana gelebilecek olası katlanmaların, hedeflendirme etkinliğini değiştirebileceği üzerine film hidrasyonu yöntemi ile seçilen uzunluktaki PEOx₃₇-*b*-PLA₂₀₀ kopolimeri ile çözücü değişimi yöntemi kullanılarak hedeflendirilmiş polimerzomların üretimi gerçekleştirilmiştir.

Çözücü değişimi yöntemi ile polimerzom üretiminde, elde edilecek morfolojik yapının geometrisini belirleyen en kritik formülasyon bileşenlerinin; kopolimer oranı, organik ve sulu faz miktarları ve iki fazın nasıl ve hangi hızda karıştırıldığı olduğu tespitinde bulunulmuştur. Bu amaçla öncelikle PEOx₃₇-*b*-PLA₂₀₀'ün hangi çözücülerde çözündüğü tespit edilmiştir. DCM, kloroform, THF ve 1,4,-dioksan (dioksan) içinde tamamen çözündüğü görülmüştür. Ancak bu çözücülerden DCM ve kloroform su ile karışmadığı için THF ve dioksan çözünürlükleri değerlendirilmiştir. Daha polar doğası nedeniyle PEOx₃₇-*b*-PLA₂₀₀'ü daha iyi çözen dioksan ile çalışmalara devam edilmesine karar verilmiştir.

Polimerzom formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılacak organik çözücü içerisindeki kopolimer konsantrasyonunun seçiminden önce, PEOx₃₇-*b*-PLA₂₀₀'ün

PBS içerisindeki kritik agregasyon konsantrasyonunun, piren floresans prob yöntemi (Topel ve ark., 2013) kullanılarak 0,052 mg/mL olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla, polimerzom formülasyonlarında kullanılacak kopolimer konsantrasyonlarının tamamı bu konsantrasyondan daha yüksek olacak şekilde seçilmiştir. Çünkü kendiliğinden oluşum süreci ile polimerzomların oluşumu, kritik agregasyon konsantrasyonunun üzerinde gerçekleşmektedir.

Poliester esaslı kopolimerlerden hazırlanan polimerzom literatürleri incelendiğinde kopolimerin organik çözeltideki konsantrasyonunun genellikle 5 mg/mL (Nahire ve ark., 2014) veya 10 mg/mL (Lee ve ark., 2011) olarak kullanıldığı görülmüştür. Bu bilgiden hareketle PEO₃₇-*b*-PLA₂₀₀'ün dioksan içerisindeki 5 ve 10 mg/mL konsantrasyondaki çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözeltiler, farklı hacimlerdeki PBS pH 7,4 tampon çözeltisi üzerine eklenmiş ve elde edilen sistemler gözlenmiştir. Organik faz ile sulu fazın karışımı esnasında görülecek bulanıklık, kendiliğinden oluşum sürecinin başlangıcı olarak değerlendirilmiştir. 5 mg/mL konsantrasyonundaki kopolimer çözeltisinden hareketle değişik hacimlerdeki PBS'in karışımının sonucunda, sistemde herhangi bir bulanıklık/turbidite gözlenmemiştir. Dolayısıyla, konsantrasyon 10 mg/mL'a artırılarak ön denemeler gerçekleştirilmiştir. 10 mg PEO₃₇-*b*-PLA₂₀₀ içeren 1 mL dioksan çözeltisi damla damla olacak şekilde, manyetik karıştırıcıda karışan 2 mL PBS çözeltisi üzerine eklendikten sonra elde edilen yapılar incelendiğinde polimerzomların ağırlıklı olarak gözlemlendiği bulunmuştur. Bu bilginin devamı olarak, literatürde sık rastlanmayan, 12,5 mg/mL, 15 mg/mL ve 20 mg/mL konsantrasyonlarındaki kopolimer çözeltileri ile polimerzom çalışmaları gerçekleştirilmiş ancak 20 mg/mL konsantrasyonda gerçekleştirilen çalışma sonucunda büyük kopolimer agregatları elde edilmiştir. 15 mg/mL konsantrasyonun ise yine kısmi çökelti ile sonuçlandığı gözlenmiştir. Elde edilen bu bilgiler, polimerzom formülasyonunda kullanılan kopolimer miktarının artmasına bağlı olarak elde edilecek partiküllerin giderek daha büyük olacağı ve bir noktadan sonra kopolimer parçacıkları olarak agregasyona uğrayacağı bilgisi ile uyusmaktadır (Sanson ve ark., 2010). 12,5 mg/mL konsantrasyonda yapılan çalışmada ise veziküller polimerzom yapılarının, incelenen formülasyonun bütünü oluşturduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle, literatürdeki sınırların aksine PEO₃₇-*b*-PLA₂₀₀'ün dioksan

içerisindeki 12,5 mg/mL konsantrasyonundaki çözeltisi ile çalışmalara devam edilmesine karar verilmiştir.

Polimerzom formülasyonundan kullanılacak organik faz ve sulu faz miktarları, yapılan literatür taraması ile sınırlandırılarak ön çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Yapılan araştırmada, çözücü değişimi yöntemi ile üretilen polimerzom formülasyonlarındaki organik fazın hacminin sulu fazın hacmine oranının 0,02 (Lee ve ark., 2011), 0,05 (Li ve ark., 2015), 0,11 (Sanson ve ark., 2010), 0,22 (Debets ve ark., 2013), 0,25 (Georgieva ve ark., 2012) olduğu durumlara rastlanmıştır. Çözünürlük çalışmasından elde edilen bilgiler ışığında ve PEtOx₃₇-*b*-PLA₂₀₀ üzerinde yapılan polimerzom yapılarının elde edilmesine yönelik kullanılacak konsantrasyon belirlendikten sonra, 5 mg PEtOx₃₇-*b*-PLA₂₀₀'ün 0,4 mL dioksan içerisindeki çözeltileri hazırlanmış ve manyetik karıştırıcıdaki 0,25 mL, 0,45 mL, 0,75 mL, 1,0 mL, 1,5 mL, 2,0 mL, 3,0 mL ve 4,5 mL hacmindeki pH 7,4 PBS tamponu çözeltileri üzerine eklenmiştir (Çizelge 3.12.). Üst limit olarak 4,5 mL'nin seçilmesinin nedeni ise alifatik polyester esaslı kopolimerlerden elde edilen polimerzomların final kopolimer konsantrasyonunun, literatürde genellikle 1 mg/mL olmasıdır. Elde edilen ilk sonuçlar, 0,25 mL ve 0,45 mL hacmindeki PBS üzerine eklenen polimer çözeltisinin agregasyon ile sonuçlandığı, polimer çözeltisinin 3,0 mL ve 4,5 mL PBS üzerine eklendiğinde ise miseller sistemlerin gözlemlendiği tespit edilmiştir (Çizelge 3.13.). Dolayısıyla formülasyon çalışmalarında kullanılacak PBS hacminin çalışma aralığı olarak 0,5 mL – 2,0 mL seçilmiştir. Bu hacimlerde elde edilen nano-yapılar incelendiğinde, kullanılan PBS hacminin artışı ile miseller yapıların ortaya çıkmaya başladığı görülmüştür. Bu nedenle, polimerzom yapısına ulaşılan en düşük PBS hacminin seçilmesi uygun bulunmuştur ve 1 mL PBS kullanımına karar verilmiştir.

1 mL PBS kullanılarak hazırlanan polimerzom formülasyonları, dioksanın ortamdaki uzaklaştırılması için diyaliz işlemine tabi tutulmuştur. Literatürde organik çözücülerin ortamdaki uzaklaştırılması için manyetik karıştırma ile buharlaştırma veya azot gazı akışı uygulanması gibi yöntemler kullanılabilmektedir ancak bu yöntemler ile üretilen polimerzomların partikül büyüklüğü dağılımı hayli geniş olmaktadır (Jain ve Kumar, 2010; Nahire ve ark., 2014). Sonrasında, üretilen polimerzomların diyaliz

işlemi sırasında kısmi olarak büyük agregatlar şeklinde çökme eğilimi gösterdiği tespit edilmiştir. Bunun nedeni olarak ise kendiliğinden oluşum süreci sonunda meydana gelen kopolimer esaslı sıvı kristal polimerzom membranının yeterince stabil olmadığı şeklinde yorumlanmıştır. Bunun üzerine, formülasyon aşamasındaki organik fazın sulu fazın üzerine eklenmesi tamamlandıktan sonra elde edilen polimerzom dispersiyonunun üzerine, polimerzom membranlarının donmasını sağlayarak stabil hale getirecek PBS eklenmesi görüşü üzerinde hemfikir olunmuştur. Bu doğrultuda, fazların karışımının ardından, 0,5 mL, 1,0 mL ve 1,5 mL hacminde PBS çözeltileri hazırlanan polimerzom dispersiyonlarının üzerine eklenerek denemeler yapılmıştır. Ön denemesi yapılan bu hacimlerden 1,5 mL'nin kullanılması uygun görülmüştür. Bunun nedeni ise 1,0 mL PBS eklenmesin ardından diyaliz aşamasında sınırlı olsa bile, yine çökeltilere rastlanmasıdır. 1,5 mL PBS eklenmesi ile herhangi bir çökelti gözlenmemiştir.

Polimerzom formülasyonlarında diğer bir önemli parametre ise organik ve sulu fazların karışım hızlarıdır. Bu hızın oranı organik çözücü içerisindeki blok kopolimer monomerlerinin, sulu faz ile karşılaşmasından sonra su molekülleri ile temasları sonrası, çekirdek oluşumu şeklinde düzenlenmeleri ve bu çekirdeğin veziküler geometride büyümesi (nucleation and growth) olarak özetlenebilecek kendiliğinden oluşum işlemini doğrudan etkilemektedir. Yukarıda anlatıldığı şekilde tespit edilen, 5 mg PEtOx₃₇-b-PLA₂₀₀'ün 0,4 mL dioksan içerisindeki çözeltisinin, manyetik olarak karışmakta olan 1 mL PBS üzerine üzerine aktarım hızının optimize edilmesi, her seferinde aynı özellikteki polimerzom formülasyonlarının elde edilmesi açısından çok önemli bir noktadır. Ön denemelerde sulu PBS fazının üzerine damla damla olarak eklenen organik fazın oluşturduğu polimerzomların, tekrar edilebilir sonuçlar vermediği tespit edilmiştir. Damla damla ekleme yöntemi ile bir üretimde elde edilen ~ 90 nm ortalama partikül büyüklüğüne sahip polimerzom formülasyonunun bir diğer üretimde ~110 nm olarak elde edilmesi, üretilecek formülasyonları tekrar edilebilir olmaktan çıkartmaktadır. Bu durumun nedeni olarak, damlatma sırasındaki damlacığın büyüklüğünün, damlatma esnasındaki açının değişimi sonucunda boyutunun değiştirmesi nedeniyle her damlacıkta ve her üretim tekrarında farklı boyutlarda damlacıkların sulu faz ile karışması sonucunda, hayli değişken aralıkta partiküllerin

elde edilmesi şeklinde yorumlanmıştır. Dolayısıyla, sulu fazın içerisine, her seferinde sabit miktarda ve sabit hızda kopolimer çözeltisi aktarabilecek şırınga pompası sistemi tercih edilmiştir. Sitemin seçiminin ardından farklı hızlarda aktarımlar denenmiştir. Bu amaçla literatürde, 6 mL/dakika . (Sanson ve ark., 2010), 0,5 mL/dakika (Georgieva ve ark., 2012), 0,6 mL/dakika (Upadhyay ve ark., 2010) ve 4,16 μ L/dakika (Yu ve ark., 2012) gibi birbirinde çok farklı hızların kullanıldığı gözlemlenmiştir. Bu bilgilerden hareketle, 1 μ L/dakika, 10 μ L/dakika, 50 μ L/dakika, 250 μ L/dakika, 500 μ L/dakika, 1 mL/dakika, 5 mL/dakika ve 10 mL/dakika gibi geniş bir aralıkta, fazların karıştırılma hızının tespitine ait ön çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Üretilen formülasyonlardan, 1 - 10 μ L/dakika hızı kullanılarak oluşturulanlarda miseller yapılara görüldü için bu aralıkta çalışmaların yapılmamasına karar verilmiştir. 500 μ L/dakika - 10 mL/dakika aralığında ise kısmi agregasyon ve mikron seviyesindeki polimerzom oluşumları gözlenmiş ve bu nedenle bu aralığında çalışma kapsamından çıkartılması uygun bulunmuştur. 50 μ L/dakika ve 250 μ L/dakika hızlarının kullanıldığı formülasyonların her ikisinde de nano boyutlu polimerzom yapılarına ulaşılmıştır. Ancak 250 μ L/dakika hızının kullanıldığı formülde elde edilen ortalama partikül büyüklüğü dağılımının genişliği daha yüksek olarak bulunmuştur (PDI ~ 0,7). Dolayısıyla standart bir polimerzom formülasyonu için, kopolimer çözeltisini içeren organik fazın sulu fazın üzerine eklenme hızının 50 μ L/dakika olarak seçilmesine karar verilmiştir.

Çalışmaların tamamında sulu faz olarak pH 7,4 PBS tamponunun kullanılmasının nedeni ise, steril şartlarda üretilecek polimerzom formülasyonunun saflaştırma işleminin ardından *in-vitro* hücre çalışmalarında veya *in-vivo* çalışmalarda, PBS'in vücudun fizyolojik konsantrasyonunu ve pH'ını taklit etmesi nedeniyle doğrudan kullanımının mümkün olmasıdır.

Hedeflendirilmiş polimerzomlarda % 20 molar oranda kullanılan peptit konjuge kopolimerin miktarının belirlenmesinde, yine literatür çalışması yapılmıştır. 2012 . (Stojanov ve ark., 2012) ve 2015 (Li ve ark., 2015)'te yapılan farklı çalışmalarda polimerzom formülasyonunda % 10 molar oranında kullanılan hedeflendirici peptidin, seçici taşınımında etkili olduğu, 2016 yılında yapılan çalışmada

ise % 25 oranında hedeflendirici peptit kullanılmış ve başarı elde edilmiştir (Simón-Gracia ve ark., 2016). Bu verilerden hareketle, geliştirdiğimiz polimerzom formülasyonlarında, peptit konjuge kopolimer sentezinin maliyetli ve çok düşük miktarlarda gerçekleştirilebildiği düşünüldüğünde, % 10 molar oranda peptit563 içeren kopolimer kullanılmasına karar verilmiştir.

Yukarıda, takip edilen bilgiler sonucunda alınan kararlar şeklinde anlatılan aşamalar halinde geliştirilen PEOx₃₇-b-PLA₂₀₀ esaslı polimerzom formülasyonunun, Farmasötik Teknoloji açısından en önemli kısmı ise tekrar edilebilir olmasıdır. Bu sayede, belirlenen üretim protokolünün takip edilmesi ile her seferinde aynı kalite ve özellikteki formüllerin üretimi sağlanmaktadır. Geliştirilen polimerzom formülasyonunun tekrarlanabilirliğinin ortaya konması için, formülasyonun en önemli kalite parametreleri olan ortalama partikül büyüklüğü, partikül büyüklüğü dağılımı, kopolimer konsantrasyonu ve etkin madde (DTX) enkapsülasyon oranları değerlendirilmiştir. Bölüm 2.2.2.4.2.'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilen çalışmada, birbirinden bağımsız olarak üretilen üç polimerzom formülasyonunun ortalama partikül büyüklüklerinin 92,6 nm – 94,3 nm arasında değiştiği, polidispersite değerlerinin ise 0,13 – 0,14 arasında olduğu Şekil 3.31.'de sunulmuştur. Yapılan varyans analizi çalışmasında bulunan değerler arasındaki farkın anlamlı olmadığı bulunmuştur (P<0,05). Şekil 3.32.'de, üç farklı formülün DTX enkapsülasyon etkinliklerinin %16,4 - % 18,7 arasında değiştiği gösterilmiş ve bu değerlerin arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir (P<0,05). Bu sonuçlar değerlendirildiğinde, geliştirilen PEOx₃₇-b-PLA₂₀₀ polimerzomu formülasyonunun tekrar edilebilir olduğu sonucuna varılmıştır.

4.2.4. PEOx-b-PLA Polimerzom Formülasyonlarının Karakterizasyon Bulgularının Değerlendirilmesi

Geliştirilen PEOx₃₇-b-PLA₂₀₀ esaslı polimerzom formülasyonları öncelikli olarak partikül büyüklüğü açısından değerlendirilmiştir. Boş polimerzomların dinamik ışık saçılımı yöntemi ile ölçülen ortalama partikül büyüklüğü ~ 90 nm olarak tespit

edilmiştir. DTX veya BikDDA enkapsülasyonu ile beraber ortalama partikül büyüklüğünün arttığı gözlenmiştir. DTX yüklü polimerzomların formülasyonunda kullanılan DTX miktarı arttıkça elde edilen polimerzomların daha büyük olarak elde edildiği, ortalama polimerzom büyüklüğünün ~ 99 kadar yükseldiği Çizelge 3.16. ile ortaya konmuştur. DTX'in hidrofobik yapısı nedeniyle, polimerzomların membran yapısına katılarak enkapsüle edilmektedir. Bu nedenle artan DTX miktarı ile beraber, partiküllerin de çapında artış meydana gelmiştir. Benzer şekilde, BikDDA enkapsüle edilen formülasyonlarda, kullanılan BikDDA miktarının artışı ile partikül büyüklüğünün ~ 109 nm'ye kadar yükseldiği Çizelge 3.22.'de görülmektedir. BikDDA enkapsüle edilmiş polimerzomların ortalama partikül büyüklüğünün, DTX enkapsüle edilen polimerzomlara göre daha yüksek olmasının nedeninin, BikDDA'nın polimerzom yapısının sulu lümeni içerisine hapsedilerek enkapsüle edilmesi olarak yorumlanmıştır. Polimerzomların sulu lümeninin, membranlarına göre çok daha fazla hacim işgal etmeleri nedeniyle, hidrofobik moleküllere göre çok daha fazla oranda hidrofilik molekül enkapsüle ettikleri bilinmektedir (Discher ve ark., 1999). Bu nedenle, içerisine miktar olarak daha fazla sayıda molekül enkapsüle edildiği için, BikDDA yüklenmiş polimerzomların büyüklükleri de, DTX yüklü olanlara göre daha büyük olarak bulunmuştur.

Kumarin konjuge edilmiş ve peptit563 aracılığıyla hedeflendirilmiş polimerzomlarının partikül büyüklükleri değerlendirildiğinde, kumarin konjugasyonunun boş polimerzomların büyüklüğünü yaklaşık 7 nm artırarak 97 nm yaptığı Çizelge 3.24.'te görülmektedir. Bu formülasyona hedeflendirici peptit563 konjuge edilmiş kopolimerlerinde dahil edilmesiyle partikül büyüklüğü ~ 100 nm olarak tespit edilmiştir. Bu veriler, kopolimer uzunluğunun kumarin ve daha büyük olan peptit563'ün konjugasyonu ile artması ile, bu konjugatların kullanıldığı polimerzomların büyüklüklerinin artması ile sonuçlandığı şeklinde yorumlanmıştır. DTX veya BikDDA enkapsüle edilmiş hedeflendirilmiş polimerzom formülasyonlarının partikül büyüklüklerinin kıyaslanmasında ise, hedeflendirilmemiş polimerzom formülasyonlarında bulunan değerler ile örtüşecek şekilde, BikDDA yüklü polimerzomlar (118,1 nm) DTX yüklü olanlara (111 nm) göre daha büyük olarak elde edilmiştir (Çizelge 3.24.). DTX yüklü polimerzom formülasyonuna ait

TEM görüntüsü Şekil 3.39.'da, BikDDA yüklü polimerzom formülasyonuna ait TEM görüntüsü ise Şekil 3.40.'da sunulmuştur. TEM görüntüleri ile dinamik ışık saçılımı yöntemi ile elde edilen partikül büyüklüğü verileri birbiri ile örtüşmektedir.

Polimerzom formülasyonlarının ortalama partikül büyüklüğü ile beraber değerlendirilmesi gereken diğer bir değerlendirme parametresi ise partikül büyüklüğü dağılımıdır. Çizelge 3.16., 3.18., 3.19., 3.22. ve 3.24. değerlendirildiğinde, üretilen bütün formülasyonlardaki partikül büyüklüğü dağılımının, 0,12 ile 0,16 arasında değiştiği gözlenebilmektedir. Bu değerlerin 0'a hayli yakın olması, polimerzom formülasyonlarının dar bir partikül büyüklüğü dağılımı sergilediğini ortaya koymaktadır.

Polimerzomlar, formülasyonlarında kullanılan kopolimerlerin modifikasyonuna gerek duymaksızın, aynı formülasyon yöntemi ve bileşenleri ile hidrofilik ve/veya hidrofobik moleküllerin enkapsülasyonu için kullanılabilir. Yukarıda anlatıldığı üzere, hidrofobik molekülleri membranları içerisinde ve hidrofilik molekülleri ise büyük sulu lümenlerinde enkapsüle edebildikleri için, hidrofilik molekülleri miktar olarak enkapsüle edebilme yeteneklerinin, miktar olarak hidrofobik molekülleri enkapsüle edebilme yeteneklerinden, teorik olarak, daha fazla olması beklenmektedir.

Bu bakış açısından hareketle, PEtOx₃₇-*b*-PLA₂₀₀ polimerzomlarına yüklenen DTX miktarı incelendiğinde, % enkapsülasyon etkinliklerinin % 10,5 (Çizelge 3.24.) ile % 17,9 (Çizelge 3.16.) arasında değiştiği görülmektedir. Formülasyonda farklı değerlerde kullanılan kopolimer:DTX oranının 10:2 olduğu durumda en yüksek enkapsülasyon etkinliğinin elde edildiği gözlenmiştir. Bu bilgi, 2010 yılında yayınlanan (Upadhyay,Bhatt,Castro ve ark., 2010) ve polimerzom formülasyonunda kullanılan kopolimer:DTX oranının 10:1 olduğu durumda en yüksek enkapsülasyon etkinliğinin elde edildiği bilgisi ile birebir olmasa da, uyuşmaktadır. Çizelge 3.24.'te kumarin konjuge edilmiş kopolimerlerin kullanıldığı polimerzom formülasyonundaki enkapsülasyon etkinliğinin ~ % 10 olarak bulunduğu görülmektedir. Bu formülasyonda enkapsülasyon etkinliğinin ~ % 17'den ~ % 10'a azalmasının nedeni,

hidrofobik kumarin molekülünün kendiliğinden oluşum sürecinde polimerzom membranının yapısına katılması ve membranda, DTX moleküllerinin enkapsüle olabileceği hacmin azalması olarak açıklanabilmektedir. Peptit563 konjuge edilmiş kopolimerin kullanıldığı formülasyonda ise DTX enkapsülasyonu etkinliğinin ~ % 12’de olduğu gözlenmektedir. Bu formülasyonda da kumarin konjuge edilmiş kopolimer kullanıldığı için enkapsülasyon etkinliğinin daha düşük bulunması doğal karşılanmıştır. Ancak peptit563 konjuge edilmiş kopolimer ile beraber kullanıldığında, ~ % 10 olan enkapsülasyon etkinliğinin ~ % 12’ye yükseldiği görülmüştür. Bu durumun nedeni, peptit563 moleküllerinin, kopolimerin uç kısmında bulunan kumarin moleküllerinin membran yapısına katılacak şekilde yönlendirilmesini kısmi olarak etkileyip azaltması olarak gösterilebilir.

BikDDA enkapsülasyonu için, yine farklı kopolimer:BikDDA oranları ile formülasyon çalışması yapılmıştır. Formülasyonda kullanılan BikDDA miktarının artışı ile beraber enkapsülasyon etkinliğinin ~ % 75’ten ~ % 62’ye düştüğü Çizelge 3.22.’de sunulmuştur. Elde edilen bu enkapsülasyon etkinliği sonuçları, PMPC-PDPA polimerzomlarına ~ % 50 – 60 oranında pDNA’nın yüklendiği çalışmanın sonuçları ile örtüşmektedir (Lomas ve ark., 2007). Enkapsülasyon etkinliğinde gözlemlenen bu düşüş profili bizi daha düşük miktarlarda BikDDA kullanmaya yöneltse de, formülasyonlarda DTX’e göre çok daha düşük konsantrasyonlarda BikDDA ile çalışıldığı için ve birim polimerzom başına yüklenen BikDDA miktarı kopolimer:BikDDA oranının yüksek olduğu formülasyonlarda çok daha fazla olduğu için, en yüksek kopolimer:BikDDA oranı olan 10:0,014’nın seçimine karar verilmiştir. Kumarin taşıyan polimerzomlardaki BikDDA enkapsülasyon etkinliği (~ % 60) değerlendirildiğinde ise, DTX’te karşılaşılan durumun aksine, formülasyonda kumarin konjuge kopolimer kullanılmasının BikDDA enkapsülasyonu üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı Çizelge 3.24.’te görülmektedir. Bu durumda, yukarıda, kumarinin kendiliğinden oluşum sürecinde polimerzom membranının yapısına katıldığı yorumunun doğruluğuna işaret etmektedir, çünkü BikDDA molekülleri polimerzomun membranına değil sulu lümeni içerisine enkapsüle olmaktadır. Peptit563 aracılı hedeflendirilmiş polimerzomların BikDDA enkapsülasyon değeri (~ % 63) ise, DTX enkapsülasyonunda olduğu gibi bir miktar artış gözlenmiştir.

Geliştirilen polimerzom formülasyonlarının stabilitesinin değerlendirilmesi için, taze olarak hazırlanan kolloidal polimerzomların, hazırlandıktan sonra 24 saat süresince 37°C’de kolloidal halde bekletilmiş polimerzomların ve 3 ay süresince +4°C’de kolloidal halde bekletilmiş polimerzomların partikül büyüklüğü profilleri ve ortalama partikül büyüklüğü değerleri kıyaslanmıştır. Şekil 3.33.’te partiküler stabilitesi incelenmiş polimerzom formülasyonlarının partikül büyüklüğü profilleri görülmektedir. Şekil 3.33. incelendiğinde, polimerzom formülasyonunun partikül büyüklüğü profilinde, ne 24 saat süresince 37°C’de ne de 3 ay süresince +4°C’de inkübasyon sonucunda herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Bu formülasyonların ortalama partikül büyüklükleri incelendiğinde ise, taze hazırlanmış polimerzomların büyüklüğünün ~ 90 nm olduğu, 3 ay süresince +4°C’de kolloidal halde bekletilen polimerzomların büyüklüğünün ise ~ 94 nm’ye yükseldiği gözlemlenmiştir. Bununla beraber 24 saat süresince 37°C’de bekletilen polimerzomlar ise, ~ 98 nm’lik bir ortalama büyüklüğe ulaşmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda sıcaklığın, PEO₃₇-b-PLA₂₀₀ polimerzomlarının partiküler stabilitesi üzerinde hayli etkili bir faktör olduğu görülmüştür. Bu bilgilerin, 2016 yılında yapılan çalışmada (Simon-Gracia ve ark., 2016) gösterilmiş, polimerzomların partikül stabilitesi içeren çalışmanın sonuçları ile örtüştüğü tespit edilmiştir.

Polimerzom formülasyonlarından etkin made salımı profilinin tespiti için DTX yüklü polimerzomlar kullanılmıştır. 37°C’de ve +4°C’de yapılan salım çalışmalarının sonuçları Şekil 3.35.’te sunulmuştur. Elde edilen salım profilleri, stabilite test sonuçları ile örtüşmektedir. +4°C’de yapılan DTX salımı çalışmasında, 24 saatin ardından neredeyse hiçbir salımın gözlemlenmediği tespit edilmiştir. Bu durum, +4°C’de bulunan polimerzomların membranında 24 saatin sonucunda herhangi bir deformasyonun meydana gelmediği tespit edilmiştir. 37°C’deki salım sonuçları ise, daha sıcak bir ortamda bulunan polimerzomların membranında zamana bağlı porlar/deformasyonlar olduğunu göstermektedir. Elde edilen bu veriler, 2006 yılında PEG-PLA ve PEG-PCL polimerzomları ile yapılan çalışmada (Fariyal Ahmed ve ark., 2006), geliştirdiğimiz PEO₃₇-b-PLA₂₀₀ polimerzomlarının salım sonuçları ile uyuşan sonuçların bulunduğu tespit edilmiştir.

DNA gibi biyomakromoleküllerin, daha küçük yapıli kimyasal etkin maddelere göre kimyasal stabilitesinin daha az olduğu ve pH, çözücü, sıcaklık, iyonik şiddet gibi değişkenlerden çok daha fazla etkilendiği bilinmektedir. Bu noktadan hareketle, polimerzom formülasyonlarının içerisine enkapsüle edilen BikDDA'nın formülasyon işleminde ya da polimerzom içerisinde enkapsüle edilmiş haldeki sıcaklık bağlantılı stabilitesi, agaroz jel elektroforezi ile aydınlatılmıştır. Bu amaçla, BikDDA geninin kendisi, BikDDA enkapsüle edilmiş polimerzom formülasyonu, polimerzom formülasyonu içerisine enkapsüle edilen BikDA'nın polimerzom yapısı parçalanıp ekstrakte edilerek hazırlanan çözeltisi, 37°C'de 24 saat bekletilmiş polimerzom formülasyonunun içine enkapsüle edilmiş BikDA'nın polimerzom yapısı parçalanıp ekstrakte edilerek hazırlanan çözeltisi, boş polimerzom formülasyonu ve DNA merdiveni'nin % 1'lik agaroz jeldeki sürüklenmelerine ait bantların görüntüleri Şekil 3.34.'te sunulmuştur. BikDDA'nın kendisine ait bantın, DNA merdiveni ile kıyaslanması sonucunda 5208 baz çifti büyüklüğündeki BikDDA'nın, DNA merdiveninin 4. bantı (~ 5100 baz çiftini işaret etmektedir) ile çok yakın mesafede sürüklendiği görülmüştür ve hem büyüklük olarak hem de yapısal olarak bütünlüğüne işaret etmektedir. Taze olarak hazırlanmış polimerzom formülasyonunun içindeki (3.34.c.) ve 37°C'de 24 saat bekletilmiş polimerzom formülasyonunun içindeki (3.34.d.) BikDDA'nın sürüklenmesi sonucu elde edilen bantlar, BikDDA'nın kendisine ait bantlar ile karşılaştırıldığında hemen hemen aynı profilin elde edildiği gözlemlenmiştir. Bu bulgu, hem polimerzom formülasyonunun hazırlanması sürecinde BikDDA'nın yapısını koruyarak stabil kaldığına hem de formülasyonun 37°C'de 24 saat bekletilmesinin ardından da BikDDA'nın stabilitesini koruduğuna işaret etmektedir. BikDDA yüklü polimerzom (3.34.b.) ve boş polimerzom formülasyonlarının (3.34.e.) sürüklenmesi ile herhangi bir bantın teşhisi mümkün olmamıştır. Bu bilgi, BikDDA enkapsülasyonunun ardından DNaseI ile yapılan saflaştırma işleminin sonucunda, polimerzom formülasyonu içinde enkapsüle olmamış BikDDA molekülünün kalmadığını ve etkin bir saflaştırma işlemi yapıldığını göstermektedir. Buna rağmen formülasyonun uygulandığı kuyucuğun sınırlarında bir miktar ışıma beklenmiştir. Ancak ışımanın görülmemesinin nedeni olarak, jelin sürüklenme süresi boyunca (~ 35 dakika) etidyum bromürün polimerzom membranından içeriye geçememesi ya da kuyucuğa uygulanan formülasyondaki

BikDDA miktarının diğer kuyucuklara uygulanan miktarlardan daha seyreltik olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Üretilen bütün PEtOx₃₇-b-PLA₂₀₀ polimerzomu formülasyonlarında (Çizelge 3.17., Çizelge 3.23. ve Çizelge 3.24) yapılan zeta potansiyeli analizi sonuçlarının incelenmesinin ardından elde edilen değerlerin -4,80 mV ile -8,51 mV arasında olduğu gözlemlenmiştir. Bu değerlerin, kolloidal sistemlerin stabil olarak bulunduğu aralık olarak kabul edilen ± 30 mV aralığında olduğu tespit edilmiştir. Zaten yapılan stabilite testlerinde herhangi bir agregasyon sorunu ile karşılaşılmamıştır. Bunun haricinde, negatif yüklü BikDDA'nın enkapsülasyonu sonucunda polimerzomların zeta potansiyelinde, beklenildiği üzere, negatif tarafa kayma tespit edilmiştir (Çizelge 3.24.).

4.2.5. PEtOx₃₇-b-PLA₂₀₀ Polimerzomlarının Hücrelerde Yapılan Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Geliştirilen PEtOx₃₇-b-PLA₂₀₀ polimerzomu formülasyonunun prostat kanserine seçici olarak hedeflendirilmesi için, PSMA'yı tanıyarak bağlanan peptit563 ile PEtOx₃₇-b-PLA₂₀₀ kopolimeri konjuge edilmiş ve polimerzom formülasyonundan % 10 molar oranda kullanılmıştır. Hedeflendirilmiş bu polimerzom formülasyonunun, prostat kanseri hücrelerine seçici olarak alındığını göstermek için hücre canlılığı analizleri ve konfokal mikroskopi ile hücresel alım görüntülemeleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla öncelikle, DTX veya BikDDA enkapsüle eden hedeflendirilmiş polimerzom formülasyonlarının, hem sağlıklı prostat epiteli hücreleri (PNT1A) üzerindeki hem de kanserli prostat hücreleri (LNCaP) üzerinde canlılık analizleri gerçekleştirilmiştir.

BikDDA yüklenmiş, peptit563 aracılı hedeflendirilmiş polimerzom formülasyonlarının PNT1A ve LNCaP hücreleri ile 24 ve 72 saatlik inkübasyonu sonucunda analiz edilen hücre canlılık seviyeleri Şekil 3.42. ve Şekil 3.43.'de sunulmuştur. 5 µg/mL konsantrasyonda BikDDA içeren hedeflendirilmiş polimerzom formülasyonu, LNCaP hücre canlılığını 24 saat sonucunda ~ % 57'ye düşürüp

sitotoksik etki gösterirken, PNT1A hücrelerinin canlılığı üzerinde herhangi bir azalma görülmemiştir. Benzer şekilde, 72 saatlik inkübasyon sonucunda 5 µg/mL konsantrasyondaki hücre canlılığı ~ % 30 olarak tespit edilmiştir. Ancak PNT1A hücrelerinde 72 saat sonrasında, BiKDDA konsantrasyonunun artması ile hücre canlılığında önemli bir düşüş gözlemlenmemiştir. Sonuç olarak 72 saatin ardından, peptit563 aracılı hedeflendirilmiş ve BiKDDA yüklenmiş PEtOx₃₇-b-PLA₂₀₀ polimerzomlarının prostat kanseri hücre canlılığını ~ % 30'a düşürürken sağlıklı prostat kanseri hücre canlılığının ~ % 75 seviyesinde korunduğu tespit edilmiştir. Bu tespitler, BiKDDA'nın prostat kanseri hücrelerine spesifik olarak taşındığını ve beklendiği üzere kanser hücrelerini apoptoza sürükleyerek ölümlerine neden olduğu tespitinde bulunulmuştur.

DTX yüklü hedeflendirilmiş polimerzom formülasyonlarının LNCaP ve PNT1A hücreleri üzerindeki 24 saatlik hücre canlılığı analizi sonucunda ise canlı hücre sayısında anlamlı bir azalma görülmemiştir. Ancak, 5 mg/mL konsantrasyonda DTX içeren formülasyonların LNCaP hücrelerindeki sitostatik etkisi, PNT1A hücrelerinde gözlemlenmemiştir. Sonrasında, hücrelerin polimerzom formülasyonları ile 72 saat boyunca inkübe edilmelerinin ardından canlılık seviyelerinde azalma gözlemlenmiştir. 72 saatlik inkübasyonun ardından, 0,5 µg/mL konsantrasyonda DTX içeren polimerzom formülasyonunun LNCaP hücre canlılığını ~ % 8'e düşürdüğü, PNT1A hücre canlılığını ise ~ % 40'a düşürdüğü tespit edilmiştir. Artan DTX konsantrasyonunun ise her iki hücre hattının canlılığı üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.44. ve Şekil 3.45.). Buradan yola çıkarak, polimerzom esaslı hedeflendirilmiş taşıyıcı sistemin LNCaP hücreleri tarafından, PNT1A hücrelerine kıyasla yaklaşık 5 kat daha fazla alındığı görülmüştür. Sağlıklı hücrelerde de görülen hücre canlılığındaki azalmanın nedeni ise DTX'in kuvvetli sitotoksik etkisinden kaynaklandığını düşündürmektedir.

Konfokal mikroskopi çalışması ile Şekil 3.46.'da gösterilen, hedeflendirilmiş polimerzomların kanser hücrelerine spesifik olarak alımını gösteren görüntüler, hücre canlılığı sonuçları ile örtüşmektedir. Yeşil renkli floresein yüklenmiş hedeflendirilmiş polimerzom formülasyonları, LNCaP hücreleri (mavi renkli) tarafından yüksek oranda

alınırken PNT1A hücreleri (mavi renkli) tarafından hücre içerisine alınmamış/çok az miktarda alınmıştır.



5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu doktora tezi kapsamında gerçekleştirilen çalışmaların amacı, son 18 yılda ilaç taşıyıcı sistem olarak büyük ilgi çeken polimerzomların, prostat kanserine aktif hedeflendirilmiş kimyasal etkin madde /biyomakromolekül taşınımı için geliştirilmelerini, karakterizasyonlarını ve hücresel etkileşimlerini incelemektir. Kanser tedavisinin en büyük problemi, kemoterapi ve radyoterapi gibi mevcut tedavilerin kanserli hücreler ile beraber sağlıklı hücrelere de zarar vermesidir. Tez kapsamında yapılan çalışmalar sonucunda hedeflenen başarı kriteri, geliştirilen polimerzom esaslı hedeflendirilmiş tedavi formülasyonlarının kanserli hücreler tarafından alınırken sağlıklı hücreler tarafından alınmamasıdır. Kapsamı bu doğrultuda belirlenen çalışma sonunda elde edilen sonuçlar, öneriler ve ileride yapılması planlanan çalışmalar şu şekilde özetlenebilir:

- Polimerzom formülasyonlarının üretiminde gerekli olacak $P(OEG_{10}MA)_{20}$ -PDPA₁₀₀, PDPA₁₀₀- $P(OEG_{10}MA)_{20}$ -S-S- $P(OEG_{10}MA)_{20}$ -PDPA₁₀₀ ve H_2N - $P(OEG_{10}MA)_{20}$ -PDPA₁₀₀ kopolimerleri sentezlenip saflaştırılarak karakterizasyonları yapılmıştır. Sonrasında ise, film hidrasyonu ve pH değişimi yöntemleri ile $P(OEG_{10}MA)_{20}$ -PDPA₁₀₀ polimerzomları üretilip, santrifüj ve SEC yöntemlerinin kullanımı ile saflaştırılmıştır.

- Sentezlenen PDPA₁₀₀- $P(OEG_{10}MA)_{20}$ -S-S- $P(OEG_{10}MA)_{20}$ -PDPA₁₀₀ kopolimeri ile peptit563 konjuge edilip saflaştırılmış ve elde edilen konjugatın kromatografik tayini gerçekleştirilmiştir. Benzer şekilde, H_2N - $P(OEG_{10}MA)_{20}$ -PDPA₁₀₀ ile sistein uçlu peptit563'ün konjugasyonu için yeni bir reaksiyon yaklaşımı geliştirilmiş ve SMCC kullanımı ile bu konjugasyon da başarı ile gerçekleştirilip saflaştırılarak, kromatografik olarak tayin edilmiştir.

- BikDDA geni, Cy5 ile floresans olarak işaretlenmiş, $P(OEG_{10}MA)_{20}$ -PDPA₁₀₀ polimerzomlarının içerisine elektroporasyon yöntemi ile enkapsüle edilmiş ve enkapsüle olmayan kısmı ise SEC yöntemi ile ortamdan uzaklaştırılmıştır. Peptit 563

aracılığıyla hedeflendirilmiş P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ polimerzomlarına da BikDDA geni aynı yöntemle yüklenmiş ve karakterize edilmiştir.

- Sentezlenen P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ kopolimerinin ve bu kopolimerden hareketle üretilen polimerzomların hücresel canlılık testlerinde herhangi bir toksik etkisine rastlanmamıştır. Bununla beraber peptit563 aracılı hedeflendirilmiş P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ polimerzomlarının, LNCaP hücrelerinin canlılığını ciddi miktarda düşürdüğü tespit edilmiştir.

- Hedeflendirilmiş P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ polimerzomlarının, PNT1A hücreleri tarafından alınımının çok düşük seviyede olduğu (~ % 4), bunun aksine LNCaP hücreleri tarafından ~ % 50 oranında alındığı tespit edilmiştir. Bu sonuç çalışmanın amaçlanan hedef doğrultusunda sonuç verdiğiine işaret etmekte ve üretilen hedeflendirilmiş P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ polimerzomlarının sağlıklı hücrelerden ziyade sadece kanserli hücreler tarafından alındığı ortaya konmuştur.

- Böylece literatürde ilk defa, hedeflendirilmiş polimerzomlar aracılığıyla gen taşınımı gerçekleştirilmiş ve etkili sonuçlar bulunmuştur.

- Ayrıca, P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ polimerzomlarının gen transfeksiyon ajanı olarak kullanımı da çalışma kapsamında değerlendirilmiştir. P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ polimerzomlarının transfeksiyon etkinliği, ticari olarak kullanılan X-tremeGene transfeksiyon ajanı ile kıyaslanmıştır ve daha yüksek transfeksiyon seviyeleri tespit edilmiştir. Bu sonuç, üretilen P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ polimerzomlarının transfeksiyon ajanı olarak kullanım potansiyelinin olduğunu göstermektedir.

- P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ polimerzomlarının yanı sıra PEtOx-*b*-PLA kopolimeri esaslı polimerzom formülasyonlarının geliştirilmesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, PEtOx ve PLA blok uzunlukları oranı ile kopolimerin molekül ağırlığının hangi değerde olduğunda veziküler polimerzom yapısına ulaşıldığı tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda literatürde ilk defa PEtOx-*b*-PLA

kopolimeri esaslı polimerzomlar üretilmiştir. Literatürde ilk olması nedeniyle, konu ile ilgili patent başvurusu yapılması planlanmıştır.

- PEtOx₃₆₀₀-*b*-PLA₁₄₄₀₀ (PEtOx₃₇-*b*-PLA₂₀₀), PEtOx₄₆₀₀-*b*-PLA₁₄₄₀₀ ve PEtOx₆₂₀₀-*b*-PLA₁₄₄₀₀ kopolimerlerinin kullanımı ile polimerzomların elde edilebildiği bulunmuştur. Bunun haricinde film hidrasyonu ve çözücü değişimi yöntemleri ile miseller yapılar, çubuk şeklindeki nano-yapılar ve veziküler polimerzom yapılarına ulaşıldığı gösterilmiştir. Kopolimerin kullanımı öncesinde uygulanan saflaştırma işleminin, elde edilen yapının geometrisi üzerinde büyük etkisinin olduğu açığa çıkartılmıştır.

- Alifatik lineer kopolimerler için genel kural olarak değerlendirilen, f değerinin $\% 35 \pm 10$ olması durumunda polimerzom yapılarına ulaşılacağı ve $f < \% 25$ durumunda evrik yapıların oluştuğu kuralının bozulduğu, PEtOx-*b*-PLA kopolimeri kullanıldığında f değerinin $\% 25 \pm 5$ olması durumunda polimerzom yapılarına ulaşılabilceği ortaya konmuştur.

- PEtOx₃₇-*b*-PLA₂₀₀ esaslı polimerzom formülasyonu geliştirilmiş ve tekrarlanabilir olduğu ispat edilmiştir.

- Geliştirilen PEtOx₃₇-*b*-PLA₂₀₀ esaslı polimerzom formülasyonunun 37°C de 24 saat süresince ve +4°C de 3 ay boyunca kolloidal halde stabil olduğu bulunmuştur. Polimerzom formülasyonunun agregasyona eğilimli olmadığı ise ölçülen zeta potansiyeli değerlerinin ± 30 mV sınırları içinde olması ile gösterilmiştir.

- PEtOx₃₇-*b*-PLA₂₀₀ polimerzomlarına, literatür ile paralel enkapsülasyon etkinliği değerlerinde, DTX ve BikDDA başarı ile yüklenmiştir. BikDDA geninin yapısını, hem enkapsülasyon işlemi sonrasında hem de polimerzomların içerisinde enkapsüle halde 37°C de 24 saat süresince bekletilmesi sonucunda koruduğu, jel elektroforezi ile ortaya konmuştur. Jel elektroforezinde ayrıca, enkapsüle olmamış BikDDA'nın ortamdan tamamen uzaklaştırıldığı tespit edilmiştir.

- Peptit563 konjuge edilmiş kopolimerler ile hazırlanan, PSMA hedeflendirilmiş PEOx₃₇-b-PLA₂₀₀ polimerzomlarına DTX ve BikDDA başarı ile yüklenmiştir.

- 5 µg/mL BikDDA içeren, peptit563 aracılı hedeflendirilmiş PEOx₃₇-b-PLA₂₀₀ polimerzomlarının LNCaP hücreleri üzerinde 24 saat sonrasında hücre canlılığını ~ % 57'ye düşürdüğü tespit edilirken, aynı konsantrasyonda PNT1A hücreleri üzerinde herhangi bir hücre canlılığını azaltan etki gözlenmemiştir. Aynı konsantrasyonda 72 saatlik çalışmalarda ise LNCaP hücreleri ~ % 30 canlılık gösterirken, PNT1A hücreleri ~ % 75 canlılık sergilemiştir. Buradan hareketle, geliştirilen peptit563 aracılı hedeflendirilmiş PEOx₃₇-b-PLA₂₀₀ polimerzom formülasyonunun prostat kanseri hücreleri tarafından spesifik olarak alındığı ve hedeflendirme stratejisinin PEOx₃₇-b-PLA₂₀₀ polimerzomları ile başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği gösterilmiştir.

- Hedeflendirilmiş PEOx₃₇-b-PLA₂₀₀ polimerzomları ile DTX taşınımı sonucunda ise PNT1A hücrelerinin canlılığı ~ % 40'a düşmüş, LNCaP hücrelerinin canlılığı ise ~ % 8'e düşmüştür. Her ne kadar prostat kanseri spesifik taşınım elde edilmiş olsa da, canlı hücrelerinde zarar gördüğü tespit edilmiştir. Bu nedenle, prostat kanserinin hedeflendirilmiş tedavisinde BiKDDA'nın kullanımının, DTX kullanımına kıyasla, sağlıklı hücrelere çok daha az oranda zarar vermesi açısından tercih edilebileceği sonucuna ulaşılmıştır.

- PEOx-b-PLA kopolimerinden hareketle elde edilen çubuk yapıları gibi farklı geometriye sahip parçacıkların etkin madde ya da biyomakromolekül taşınımındaki kullanım potansiyellerinin, ileride yapılacak çalışmalar ile ortaya çıkarılması amaçlanmaktadır.

- Yapılan çalışmalar, peptit563 aracılığıyla aktif hedeflendirilmiş P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ ve PEOx₃₇-b-PLA₂₀₀ polimerzomlarının prostat kanserinin spesifik tedavisinde, hücresel aşamada, başarı gösterdiği tespit edilmiştir. PEOx-b-PLA kopolimeri, POEG₁₀MA-PDPA kopolimerine kıyasla çok daha camsı bir yapı sergilediği için, PEOx₃₇-b-PLA₂₀₀ polimerzomları (~ 1 mg/mL) P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ polimerzomlarına (~ 7 mg/mL) kıyasla daha seyreltik konsantrasyonda

hazırlanabilmektedir. $P(OEG_{10}MA)_{20}$ -PDPA₁₀₀ polimerzomlarının avantajı, pH duyarlı olarak taşıdığı kargo molekölü hücre içine salabilmesi ve üretim yönteminde organik çözücü kullanımına ihtiyaç duyulmaması iken, $PEtOx_{37}$ -*b*-PLA₂₀₀ polimerzomlarının avantajı ise kopolimerin yapısındaki her iki bloğunda biyoparçalanabilir olması nedeniyle ileride klinik kullanımda yer bulabilme potansiyelinin olmasıdır. Bunun yanı sıra, her iki polimerden hareketle polimerzom üretiminde kullanılan gerek pH değışimi yöntemi ($P(OEG_{10}MA)_{20}$ -PDPA₁₀₀ polimerzomlarının üretiminde kullanılmıştır) gerek çözücü değışimi yöntemi ($PEtOx_{37}$ -*b*-PLA₂₀₀ polimerzomlarının üretiminde kullanılmıştır) endüstriyel boyutta polimerzom üretimine uygun yöntemlerdir.

- Bu çalışmalar sonucunda elde edilen veriler, polimerzomlar ile insan vücuduna özellikle kan dolaşımında stabil olarak kalamayan peptit, protein ve genetik materyal gibi biyomakromoleküllerin verilmesini mümkün kılmaktadır. Ayrıca polimerzomların yapısının ve yüzeyinin kimyasal olarak modifikasyona uygun olması nedeniyle kimyasal etkin maddelerin/biyomakromoleküllerin vücuttaki istenilen dokuya, hücre grubuna hedeflendirilmiş taşınımını mümkün kılmıştır.

ÖZET

Hücre İçine Gen/İlaç Taşımına Yönelik Aktif Hedeflendirilmiş Nano İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi

Kendiliğinden oluşum süreci, canlı sistemlerdeki (biyo)moleküllerin kendileri aralarında ve/veya su ile aralarındaki supramoleküler etkileşimleri yönetip, hassas ve dengeli hiyerarşik düzenlenmeleri ile sonuçlanmasına yol açan en önemli mekanizmadır. Kendiliğinden oluşum sürecinin, gelişen polimerizasyon teknikleri kullanılarak yüksek moleküler kesinlikte üretilen sentetik kopolimerler üzerinde uygulanması ile “polimerzomlar” olarak bilinen sentetik veziküller elde edilebilmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında prostat kanseri hücrelerine spesifik olarak kemoterapötik bir etkin madde olan dosetaksel (DTX)’in ve pro-apoptotik bir gen olan BikDDA’nın, P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ ve PEOx₃₇-b-PLA₂₀₀ polimerzomları ile aktif hedeflendirme stratejisi kullanılarak taşınmıştır. Aktif hedeflendirme stratejisinde prostat spesifik membran antijenine (PSMA) spesifik olarak bağlanan peptit563 ile formüle edilen polimerzomlar geliştirilmiştir. Çalışma kapsamında literatürde ilk defa, P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ polimerzomları kullanılarak, aktif hedeflendirilmiş polimerzomlar ile gen taşınımı gerçekleştirilmiştir. P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ polimerzomları ile yapılan hücresel çalışmalarda, polimerzomların LNCaP hücreleri tarafından yüksek seviyede alımı gözlenirken, PNT1A hücreleri tarafından çok daha az seviyede hücresel alımın gözlenmesi, aktif hedeflendirmenin başarısını ortaya koymaktadır. Ayrıca literatürde ilk defa PEOx-b-PLA kopolimerinden hareketle polimerzom yapıları üretilmiştir. Geliştirilen PEOx₃₇-b-PLA₂₀₀ polimerzomlarına DTX ve BikDDA yüklenerek, peptit563 aracılığıyla hedeflendirilmiştir. Hedeflendirilmiş PEOx₃₇-b-PLA₂₀₀ polimerzomlarının, LNCaP hücrelerinin canlılığını, PNT1A hücreleri canlılığına göre çok daha yüksek oranda azalttığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak bu doktora tezi ile elde edilen bilgilerin, ileride üretilebilecek yan etkisi en aza indirgenen hedeflenmiş tedavilerin hastaların kullanımına sunulacak gelişmiş tedavi ve teşhis ürünlerine yön verici kaynak olacağı düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Gen tedavisi, Hedeflendirilmiş Tedavi, PEOx-PLA, Polimerzom, Prostat Kanseri.

SUMMARY

Development of Active Targeted Nano Drug Delivery Systems for Intracellular Gene/Drug Delivery

The self-assembly process which governs the biomolecules' supramolecular interaction between themselves and/or water resulting with precise and balanced hierarchical organization, is one of the most important mechanisms in living systems. By applying the self-assembly process on synthetic copolymers produced with high molecular precision using developing polymerisation techniques, synthetic vesicles known as polymerzomes can be obtained.

Within the scope of this thesis, docetaxel as a chemotherapeutic drug or BikDDA as a pro-apoptotic gene was specifically delivered to prostate cancer cells via P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ and PEtOx₃₇-*b*-PLA₂₀₀ polymersomes by using active targeting strategy. Polymersomes formulated with peptide563 that specifically binds to prostate-specific membrane antigen (PSMA), have been developed as the active targeting strategy. For the first time in the literature, gene delivery with active targeted polymersomes was performed using P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ polymersomes. The results of P(OEG₁₀MA)₂₀-PDPA₁₀₀ polymersomes' cellular studies revealed the success of active targeting by observation of cellular uptake at much lower levels by the PNT1A cells while high levels of polymersome uptake was observed by the LNCaP cells. In addition, for the first time in the literature, of PEtOx-*b*-PLA based polymersomes have been developed. The developed PEtOx₃₇-*b*-PLA₂₀₀ polymersomes were loaded with DTX or BikDDA and targeted to prostate cancer via peptide563. It has been found that the targeted PEtOx₃₇-*b*-PLA₂₀₀ polymersomes reduced the viability of LNCaP cells much higher than the viability of PNT1A cells.

As a result, it is thought that the information obtained by this doctoral dissertation will be the source of advanced treatment and diagnostic products which will be offered to the use of patients with the most reduced side effects, that can be produced in the future.

Key Words: Gene therapy, PEtOx-PLA, Polymersome, Prostate Cancer, Targeted therapy.

KAYNAKLAR

- ADAMALA K, SZOSTAK JW (2013). Nonenzymatic Template-Directed RNA Synthesis Inside Model Protocells. *Science*, **342(6162)**: 1098.
- AGGARWAL S, SINGH P, TOPALOGLU O, ISAACS JT, DENMEADE SR (2006). A Dimeric Peptide That Binds Selectively to Prostate-Specific Membrane Antigen and Inhibits its Enzymatic Activity. *Cancer Research*, **66(18)**: 9171.
- AHMED F, DISCHER DE (2004). Self-porating polymersomes of PEG-PLA and PEG-PCL: Hydrolysis-triggered controlled release vesicles. *Journal of Controlled Release*, **96(1)**: 37-53.
- AHMED F, PAKUNLU R, BRANNAN A, BATES F, MINKO T, DISCHER DE (2006). Biodegradable polymersomes loaded with both paclitaxel and doxorubicin permeate and shrink tumors, inducing apoptosis in proportion to accumulated drug. *Journal of Controlled Release*, **116(2)**: 150-158.
- AHMED F, PAKUNLU RI, SRINIVAS G, BRANNAN A, BATES F, KLEIN ML, MINKO T, DISCHER DE (2006). Shrinkage of a rapidly growing tumor by drug-loaded polymersomes: pH-triggered release through copolymer degradation. *Molecular Pharmaceutics*, **3(3)**: 340-350.
- AKINC A, BATTAGLIA G (2013). Exploiting Endocytosis for Nanomedicines. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **5(11)**: a016980.
- ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, WALTER P, RAFF M, ROBERTS K. (2002). *Molecular Biology of the Cell 4th Edition: International Student Edition*. (Ed.): Routledge.

- ANGELOVA MI, DIMITROV DS (1986). Liposome electroformation. *Faraday Discussions of the Chemical Society*, **81(0)**: 303-311.
- ANTONIETTI M, FÖRSTER S (2003). Vesicles and Liposomes: A Self-Assembly Principle Beyond Lipids. *Advanced Materials*, **15(16)**: 1323-1333.
- ARANDA-ESPINOZA H, BERMUDEZ H, BATES FS, DISCHER DE (2001). Electromechanical limits of polymersomes. *Physical review letters*, **87(20)**: 208301-208301.
- ARIFIN DR, PALMER AF (2005a). Polymersome Encapsulated Hemoglobin: A Novel Type of Oxygen Carrier. **(C)**: 2172-2181.
- ARIFIN DR, PALMER AF (2005b). Polymersome Encapsulated Hemoglobin: A Novel Type of Oxygen Carrier. *Biomacromolecules*, **6(4)**: 2172-2181.
- AXTHELM F, CASSE O, KOPPENOL WH, NAUSER T, MEIER W, PALIVAN CG (2008). Antioxidant Nanoreactor Based on Superoxide Dismutase Encapsulated in Superoxide-Permeable Vesicles. *The Journal of Physical Chemistry B*, **112(28)**: 8211-8217.
- AYEN WY, GARKHAL K, KUMAR N (2011). Doxorubicin-loaded (PEG)₃-PLA nanopolymersomes: effect of solvents and process parameters on formulation development and in vitro study. *Molecular Pharmaceutics*, **8(2)**: 466-478.
- BALASUBRAMANIAN V, HERRANZ-BLANCO B, ALMEIDA PV, HIRVONEN J, SANTOS HA (2016). Multifaceted Polymersome Platforms: Spanning from Self-assembly To Drug Delivery and Protocells. *Progress in Polymer Science*. **60**: 51-85.
- BALASUBRAMANIAN V, ONACA O, EZHEVSKAYA M, VAN DOORSLAER S, SIVASANKARAN B, PALIVAN CG (2011). A surprising system: polymeric

nanoreactors containing a mimic with dual-enzyme activity. *Soft Matter*, **7(12)**: 5595-5603.

BARNIER QUER C, ROBSON MARSDEN H, ROMEIJN S, ZOPE H, KROS A, JISKOOT W (2011). Polymersomes enhance the immunogenicity of influenza subunit vaccine. *Polymer Chemistry*, **2(7)**: 1482-1482.

BARTENSTEIN JE, ROBERTSON J, BATTAGLIA G, BRISCOE WH (2016). Stability of polymersomes prepared by size exclusion chromatography and extrusion. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **506**: 739-746.

BATTAGLIA G, RYAN AJ (2005a). Bilayers and interdigitation in block copolymer vesicles. *Journal of the American Chemical Society*, **127(24)**: 8757-8764.

BATTAGLIA G, RYAN AJ (2005b). The evolution of vesicles from bulk lamellar gels. *Nat Mater*, **4(11)**: 869-876.

BATTAGLIA G, RYAN AJ (2006a). Effect of amphiphile size on the transformation from a lyotropic gel to a vesicular dispersion. *Macromolecules*, **39(2)**: 798-805.

BATTAGLIA G, RYAN AJ (2006b). Pathways of polymeric vesicle formation. *Journal of Physical Chemistry B*, **110(21)**: 10272-10279.

BEER T, RAGHAVAN D (2000). Chemotherapy for hormone-refractory prostate cancer: Beauty is in the eye of the beholder. *The Prostate*, **45(2)**: 184-193.

BERMUDEZ H, BRANNAN AK, HAMMER DA, BATES FS, DISCHER DE (2002). Molecular weight dependence of polymersome membrane structure, elasticity, and stability. *Macromolecules*, **35(21)**: 8203-8208.

- BLANAZS A, ARMES SP, RYAN AJ (2009). Self-assembled block copolymer aggregates: From micelles to vesicles and their biological applications. *Macromolecular Rapid Communications*, **30(4-5)**: 267-277.
- BLASCO E, BARRIO JD, SANCHEZ-SOMOLINOS C, PINOL M, ORIOL L (2013). Light induced molecular release from vesicles based on amphiphilic linear-dendritic block copolymers. *Polymer Chemistry*, **4(7)**: 2246-2254.
- BROWN L, MCARTHUR SL, WRIGHT PC, LEWIS A, BATTAGLIA G (2010). Polymersome production on a microfluidic platform using pH sensitive block copolymers. *Lab on a chip*, **10(15)**: 1922-1928.
- BROWN MD, GRAY AI, TETLEY L, SANTOVENA A, RENE J, SCHÄTZLEIN AG, UCHEGBU IF (2003). In vitro and in vivo gene transfer with poly(amino acid) vesicles. *Journal of Controlled Release*, **93(2)**: 193-211.
- BROWN MD, SCHÄTZLEIN A, BROWNLIE A, JACK V, WANG W, TETLEY L, GRAY AI, UCHEGBU IF (2000). Preliminary Characterization of Novel Amino Acid Based Polymeric Vesicles as Gene and Drug Delivery Agents. *Bioconjugate Chemistry*, **11(6)**: 880-891.
- CABANE E, MALINOVA V, MEIER W (2010). Synthesis of Photocleavable Amphiphilic Block Copolymers: Toward the Design of Photosensitive Nanocarriers. *Macromolecular Chemistry and Physics*, **211(17)**: 1847-1856.
- CANTON I, BATTAGLIA G (2012). Endocytosis at the nanoscale. *Chemical Society Reviews*, **41(7)**: 2718-2739.
- CARLMARK A, VESTBERG R, JONSSON EM (2002). Atom transfer radical polymerization of methyl acrylate from a multifunctional initiator at ambient temperature. *Polymer*, **43(15)**: 4237-4242.

- CERRITELLI S, VELLUTO D, HUBBELL JA (2007). PEG-SS-PPS: Reduction-Sensitive Disulfide Block Copolymer Vesicles for Intracellular Drug Delivery. *Biomacromolecules*, **8(6)**: 1966-1972.
- CHAMBON P, BLANAZS A, BATTAGLIA G, ARMES SP (2012). How Does Cross-Linking Affect the Stability of Block Copolymer Vesicles in the Presence of Surfactant? *Langmuir*, **28(2)**: 1196-1205.
- CHANG H-Y, SHENG Y-J, TSAO H-K (2014). Structural and Mechanical Characteristics of Polymersomes. *Soft Matter*, **10(34)**: 6373-6381.
- CHAPMAN D (1988). Phospholipid bilayers physical principles and models. *Cell Biochemistry and Function*, **6(2)**: 147-148.
- CHEN Y-C, CHIANG C-F, CHEN L-F, LIAO S-C, HSIEH W-Y, LIN W-L (2014). Polymersomes conjugated with des-octanoyl ghrelin for the delivery of therapeutic and imaging agents into brain tissues. *Biomaterials*, **35(6)**: 2051-2065.
- CHEN YC, CHIANG CF, CHEN LF, LIANG PC, HSIEH WY, LIN WL (2014). Polymersomes conjugated with des-octanoyl ghrelin and folate as a BBB-penetrating cancer cell-targeting delivery system. *Biomaterials*, **35(13)**: 4066-4081.
- CHENG Z, TSOURKAS A (2008). Paramagnetic porous polymersomes. *Langmuir*, **24(15)**: 8169-8173.
- CHINNADURAI G, VIJAYALINGAM S, RASHMI R (2009). BIK, the founding member of the BH3-only family proteins: mechanisms of cell death and role in cancer and pathogenic processes. *Oncogene*, **27(S1)**: S20-S29.

CHRISTIAN DA, CAI S, BOWEN DM, KIM Y, PAJEROWSKI JD, DISCHER DE (2009). Polymersome carriers: From self-assembly to siRNA and protein therapeutics. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **71(3)**: 463-474.

CHRISTIAN NA, MILONE MC, RANKA SS, LI G, FRAIL PR, DAVIS KP, BATES FS, THERIEN MJ, GHOROGHCHIAN PP, JUNE CH, HAMMER DA (2007). Tat-functionalized near-infrared emissive polymersomes for dendritic cell labeling. *Bioconjugate Chemistry*, **18(1)**: 31-40.

COLLEY HE, HEARN DEN V, AVILA-OLIAS M, CECCHIN D, CANTON I, MADSEN J, MACNEIL S, WARREN N, HU K, MCKEATING JA, ARMES SP, MURDOCH C, THORNHILL MH, BATTAGLIA G (2014). Polymersome-mediated delivery of combination anticancer therapy to head and neck cancer cells: 2D and 3D in vitro evaluation. *Mol Pharm*, **11(4)**: 1176-1188.

CORTESE JD, SCHWAB B, FRIEDEN C, ELSON EL (1989). Actin polymerization induces a shape change in actin-containing vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **86(15)**: 5773-5777.

DAHLLÖF B, BILLSTRÖM A, CABRAL F, HARTLEY-ASP B (1993). Estramustine Depolymerizes Microtubules by Binding to Tubulin. *Cancer Research*, **53(19)**: 4573.

DE HOOG HM, NALLANI M, CORNELISSEN JJLM, ROWAN AE, NOLTE RJM, ARENDS IWCE (2009). Biocatalytic oxidation by chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* in polymersome nanoreactors. *Organic & biomolecular chemistry*, **7**: 4604-4610.

DEBETS MF, LEENDERS WPJ, VERRIJP K, ZONJEE M, MEEUWISSEN SA, OTTE-HÖLLER I, VAN HEST JCM (2013). Nanobody-Functionalized

Polymersomes for Tumor-Vessel Targeting. *Macromolecular Bioscience*, **13(7)**: 938-945.

DIPAOLA RS, RINEHART J, NEMUNAITIS J, EBBINGHAUS S, RUBIN E, CAPANNA T, CIARDELLA M, DOYLE-LINDRUD S, GOODWIN S, FONTAINE M, ADAMS N, WILLIAMS A, SCHWARTZ M, WINCHELL G, WICKERSHAM K, DEUTSCH P, YAO S-L (2002). Characterization of a Novel Prostate-Specific Antigen–Activated Peptide-Doxorubicin Conjugate in Patients With Prostate Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, **20(7)**: 1874-1879.

DISCHER BM, WON YY, EGE DS, LEE JCM, BATES FS, DISCHER DE, HAMMER DA (1999). Polymersomes: Tough vesicles made from diblock copolymers. *Science*, **284(May)**: 1143-1146.

DISCHER DE, AHMED F (2006). Polymersomes. *Annual Review of Biomedical Engineering*, **8(1)**: 323-341.

DISCHER DE, EISENBERG A (2002). Polymer Vesicles. *Science*, **297(5583)**: 967-973.

DORA TANG TY, ROHAIDA CHE HAK C, THOMPSON AJ, KUIMOVA MK, WILLIAMS DS, PERRIMAN AW, MANN S (2014). Fatty acid membrane assembly on coacervate microdroplets as a step towards a hybrid protocell model. *Nat Chem*, **6(6)**: 527-533.

DU J, TANG Y, LEWIS AL, ARMES SP (2005). pH-Sensitive Vesicles Based on a Biocompatible Zwitterionic Diblock Copolymer. *Journal of the American Chemical Society*, **127(51)**: 17982-17983.

DU Y, CHEN W, ZHENG M, MENG F, ZHONG Z (2012). pH-sensitive degradable chimaeric polymersomes for the intracellular release of doxorubicin hydrochloride. *Biomaterials*, **33(29)**: 7291-7299.

DUNCAN TV, GHOROGHCHIAN PP, RUBTSOV IV, HAMMER DA, THERIEN MJ (2008). Ultrafast Excited-State Dynamics of Nanoscale Near-Infrared Emissive Polymersomes. *Journal of the American Chemical Society*, **130(30)**: 9773-9784.

DZIECIOL AJ, MANN S (2012). Designs for life: protocell models in the laboratory. *Chemical Society Reviews*, **41(1)**: 79-85.

EGLI S, NUSSBAUMER MG, BALASUBRAMANIAN V, CHAMI M, BRUNS N, PALIVAN C, MEIER W (2011). Biocompatible functionalization of polymersome surfaces: A new approach to surface immobilization and cell targeting using polymersomes. *Journal of the American Chemical Society*, **133(12)**: 4476-4483.

FOURNIER GR, NARAYAN P (1993). Re-evaluation of the Need for Pelvic Lymphadenectomy in Low Grade Prostate Cancer. *British Journal of Urology*, **72(4)**: 484-488.

GAITZSCH J, APPELHANS D, WANG L, BATTAGLIA G, VOIT B (2012). Synthetic bio-nanoreactor: Mechanical and chemical control of polymersome membrane permeability. *Angewandte Chemie - International Edition*, **51(18)**: 4448-4451.

GASPAR VM, GONÇALVES C, DE MELO-DIOGO D, COSTA EC, QUEIROZ JA, PICHON C, SOUSA F, CORREIA IJ (2014). Poly(2-ethyl-2-oxazoline)-PLA-g-PEI amphiphilic triblock micelles for co-delivery of minicircle DNA and chemotherapeutics. *Journal of Controlled Release*, **189**: 90-104.

- GENG Y, DISCHER DE (2006). Visualization of degradable worm micelle breakdown in relation to drug release. *Polymer*, **47(7)**: 2519-2525.
- GEORGIEVA JV, BRINKHUIS RP, STOJANOV K, WEIJERS CAGM, ZUILHOF H, RUTJES FPJT, HOEKSTRA D, HEST JCMV, ZUHORN IS (2012). Peptide-Mediated Blood – Brain Barrier Transport of Polymersomes. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **51**: 1-5.
- GHOROGHCHIAN PP, FRAIL PR, LI G, ZUPANCICH JA, BATES FS, HAMMER DA, THERIEN MJ (2007). Controlling Bulk Optical Properties of Emissive Polymersomes Through Intramembranous Polymer-Fluorophore Interactions. *Chemistry of materials : a publication of the American Chemical Society*, **19(6)**: 1309-1318.
- GUAN L, RIZZELLO L, BATTAGLIA G (2015). Polymersomes and their applications in cancer delivery and therapy. *Nanomedicine (Lond)*, **10(17)**: 2757-2780.
- HABAULT D, DERY A, LENG J, LECOMMANDOUX S, LE MEINS J-F, SANDRE O (2013). Droplet Microfluidics to Prepare Magnetic Polymer Vesicles and to Confine the Heat in Magnetic Hyperthermia. *IEEE Transactions on Magnetics*, **49(1)**: 182-190.
- HAMMER DA, KAMAT NP (2012). Towards an artificial cell. *FEBS Letters*, **586(18)**: 2882-2890.
- HANAHAHAN D, WEINBERG RA (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, **100(1)**: 57-70.
- HANCZYC MM, SZOSTAK JW (2004). Replicating vesicles as models of primitive cell growth and division. *Current Opinion in Chemical Biology*, **8(6)**: 660-664.

- HEIN CD, LIU X-M, WANG D (2008). Click Chemistry, a Powerful Tool for Pharmaceutical Sciences. *Pharmaceutical Research*, **25(10)**: 2216-2230.
- HO CS, KIM JW, WEITZ DA (2008). Microfluidic fabrication of monodisperse biocompatible and biodegradable polymersomes with controlled permeability. *Journal of the American Chemical Society*, **130(29)**: 9543-9549.
- HO SY, MITTAL GS (1996). Electroporation of Cell Membranes: A Review. *Critical Reviews in Biotechnology*, **16(4)**: 349-362.
- HOCINE S, CUI D, RAGER MN, DI CICCIO A, LIU JM, WDZIECZAK-BAKALA J, BRULET A, LI MH (2013). Polymersomes with PEG corona: structural changes and controlled release induced by temperature variation. *Langmuir*, **29(5)**: 1356-1369.
- HU Y, DAOUD AW, CHEUK KK, LIN SC (2016). Newly Developed Techniques on Polycondensation, Ring-Opening Polymerization and Polymer Modification: Focus on Poly(Lactic Acid). *Materials*, **9(3)**.
- HUANG J, BONDUELLE C, THÉVENOT J, LECOMMANDOUX S, HEISE A (2012). Biologically active polymersomes from amphiphilic glycopeptides. *Journal of the American Chemical Society*, **134(1)**: 119-122.
- HUANG WC, CHEN YC, HSU YH, HSIEH WY, CHIU HC (2015). Development of a diagnostic polymersome system for potential imaging delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **128**: 67-76.
- HUANG X, LI M, GREEN DC, WILLIAMS DS, PATIL AJ, MANN S (2013). Interfacial assembly of protein–polymer nano-conjugates into stimulus-responsive biomimetic protocells. *Nature Communications*, **4**: 2239.

- HUANG X, PATIL AJ, LI M, MANN S (2014). Design and Construction of Higher-Order Structure and Function in Proteinosome-Based Protocells. *Journal of the American Chemical Society*, **136(25)**: 9225-9234.
- HUANG Y-C, ARHAM M, JAN J-S (2013). Bioactive vesicles from saccharide- and hexanoyl-modified poly(l-lysine) copolypeptides and evaluation of the cross-linked vesicles as carriers of doxorubicin for controlled drug release. *European Polymer Journal*, **49(3)**: 726-737.
- HUO C, LI M, HUANG X, YANG H, MANN S (2014). Membrane Engineering of Colloidosome Microcompartments Using Partially Hydrophobic Mesoporous Silica Nanoparticles. *Langmuir*, **30(50)**: 15047-15052.
- JAIN JP, KUMAR N (2010). Self Assembly of Amphiphilic (PEG)3-PLA Copolymer as Polymersomes: Preparation, Characterization, and Their Evaluation As Drug Carrier. *Biomacromolecules*, **11(4)**: 1027-1035.
- JASKIEWICZ K, LARSEN A, LIEBERWIRTH I, KOYNOV K, MEIER W, FYTAS G, KROEGER A, LANDFESTER K (2012). Probing bioinspired transport of nanoparticles into polymersomes. *Angewandte Chemie - International Edition*, **51(19)**: 4613-4617.
- JASKIEWICZ K, LARSEN A, SCHAEFFEL D, KOYNOV K, LIEBERWIRTH I, FYTAS G, LANDFESTER K, KROEGER A (2012). Incorporation of nanoparticles into polymersomes: Size and concentration effects. *ACS Nano*, **6(8)**: 7254-7262.
- JIAO S, WU M, YE F, TANG H, XIE X, . , XIE X (2014). BikDDA, a Mutant of Bik with Longer Half-Life Expression Protein, Can Be a Novel Therapeutic Gene for Triple-Negative Breast Cancer. *PLOS ONE*, **9(3)**: e92172.

- KAMAT NP, KATZ JS, HAMMER DA (2011). Engineering Polymersome Protocells. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, **2(13)**: 1612-1623.
- KARANDISH F, HALDAR MK, YOU S, BROOKS AE, BROOKS BD, GUO B, CHOI Y, MALLIK S (2016). Prostate-Specific Membrane Antigen Targeted Polymersomes for Delivering Mocetinostat and Docetaxel to Prostate Cancer Cell Spheroids. *ACS Omega*, **1(5)**: 952-962.
- KIM DW, YOUSAF AM, LI DX, KIM JO, YONG CS, CHO KH, CHOI H-G (2017). Development of RP-HPLC method for simultaneous determination of docetaxel and curcumin in rat plasma: Validation and stability. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **12(1)**: 105-113.
- KIM S-H, NAM J, KIM JW, KIM D-H, HAN S-H, WEITZ DA (2013). Formation of polymersomes with double bilayers templated by quadruple emulsions. *Lab on a chip*, **13(7)**: 1351-1356.
- KIM SH, SHUM HC, KIM JW, CHO JC, WEITZ DA (2011). Multiple polymersomes for programmed release of multiple components. *Journal of the American Chemical Society*, **133(38)**: 15165-15171.
- KISHIMURA A, KOIDE A, OSADA K, YAMASAKI Y, KATAOKA K (2007). Encapsulation of Myoglobin in PEGylated Polyion Complex Vesicles Made from a Pair of Oppositely Charged Block Ionomers: A Physiologically Available Oxygen Carrier. *Angewandte Chemie International Edition*, **46(32)**: 6085-6088.
- KRAUS LA, SAMUEL SK, SCHMID SM, DYKES DJ, WAUD WR, BISSERY MC (2003). The mechanism of action of docetaxel (Taxotere®) in xenograft models is not limited to bcl-2 phosphorylation. *Investigational New Drugs*, **21(3)**: 259-268.

- KUIPER SM, NALLANI M, VRIEZEMA DM, CORNELISSEN JJLM, VAN HEST JCM, NOLTE RJM, ROWAN AE (2008). Enzymes containing porous polymersomes as nano reaction vessels for cascade reactions. *Organic & biomolecular chemistry*, **6(23)**: 4315-4318.
- KUMAR M, GRZELAKOWSKI M, ZILLES J, CLARK M, MEIER W (2007). Highly permeable polymeric membranes based on the incorporation of the functional water channel protein Aquaporin Z. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104(52)**: 20719-20724.
- LANG J-Y, HSU JENNIFER L, MERIC-BERNSTAM F, CHANG C-J, WANG Q, BAO Y, YAMAGUCHI H, XIE X, WOODWARD WENDY A, YU D, HORTOBAGYI GABRIEL N, HUNG M-C (2011). BikDD Eliminates Breast Cancer Initiating Cells and Synergizes with Lapatinib for Breast Cancer Treatment. *Cancer Cell*, **20(3)**: 341-356.
- LEE JAMES CM, BERMUDEZ H, DISCHER BM, SHEEHAN MA, WON YY, BATES FS, DISCHER DE (2001). Preparation, stability, and in vitro performance of vesicles made with diblock copolymers. *Biotechnology and Bioengineering*, **73(2)**: 135-145.
- LEE JS, FEIJEN J (2012). Biodegradable polymersomes as carriers and release systems for paclitaxel using Oregon Green 488 labeled paclitaxel as a model compound. *Journal of Controlled Release*, **158(2)**: 312-318.
- LEE JS, GROOTHUIS T, CUSAN C, MINK D, FEIJEN J (2011). Lysosomally cleavable peptide-containing polymersomes modified with anti-EGFR antibody for systemic cancer chemotherapy. *Biomaterials*, **32(34)**: 9144-9153.
- LEE SC, CHANG Y, YOON J-S, KIM C, KWON IC, KIM Y-H, JEONG SY (1999). Synthesis and Micellar Characterization of Amphiphilic Diblock Copolymers

Based on Poly(2-ethyl-2-oxazoline) and Aliphatic Polyesters. *Macromolecules*, **32(6)**: 1847-1852.

LEE Y, CHANG J-B, KIM HK, PARK TG (2006). Stability studies of biodegradable polymersomes prepared by emulsion solvent evaporation method. *Macromolecular Research*, **14(3)**: 359-364.

LEMIÈRE J, CARVALHO K, SYKES C. (2015). Chapter 14 - Cell-sized liposomes that mimic cell motility and the cell cortex. In: *Methods in Cell Biology* Ed.: Jennifer, R. Wallace, F. M.: Academic Press. Vol. Volume 128, 271-285.

LI M, HUANG X, TANG TYD, MANN S (2014). Synthetic cellularity based on non-lipid micro-compartments and protocell models. *Current Opinion in Chemical Biology*, **22**: 1-11.

LI S, BYRNE B, WELSH J, PALMER AF (2007). Self-Assembled Poly(butadiene)-b-Poly(ethylene oxide) Polymersomes as Paclitaxel Carriers. *Biotechnology progress*, **23(1)**: 278-285.

LI X, YANG W, ZOU Y, MENG F, DENG C, ZHONG Z (2015). Efficacious delivery of protein drugs to prostate cancer cells by PSMA-targeted pH-responsive chimaeric polymersomes. *Journal of Controlled Release*, **220**: 704-714.

LI YM, WEN Y, ZHOU BP, KUO H-P, DING Q, HUNG M-C (2003). Enhancement of Bik Antitumor Effect by Bik Mutants. *Cancer Research*, **63(22)**: 7630.

LIU G, MA S, LI S, CHENG R, MENG F, LIU H, ZHONG Z (2010). The highly efficient delivery of exogenous proteins into cells mediated by biodegradable chimaeric polymersomes. *Biomaterials*, **31(29)**: 7575-7585.

- LIU Y, LI K, PAN J, LIU B, FENG S-S (2010). Folic acid conjugated nanoparticles of mixed lipid monolayer shell and biodegradable polymer core for targeted delivery of Docetaxel. *Biomaterials*, **31(2)**: 330-338.
- LIZUNDIA E, FORTUNATI E, DOMINICI F, VILAS JL, LEÓN LM, ARMENTANO I, TORRE L, KENNY JM (2016). PLLA-grafted cellulose nanocrystals: Role of the CNC content and grafting on the PLA bionanocomposite film properties. *Carbohydrate Polymers*, **142**: 105-113.
- LOMAS H, CANTON I, MACNEIL S, DU J, ARMES SP, RYAN AJ, LEWIS AL, BATTAGLIA G (2007). Biomimetic pH sensitive polymersomes for efficient DNA encapsulation and delivery. *Advanced Materials*, **19(23)**: 4238-4243.
- LOMAS H, DU J, CANTON I, MADSEN J, WARREN N, ARMES SP, LEWIS AL, BATTAGLIA G (2010). Efficient encapsulation of plasmid DNA in pH-sensitive PMPC-PDPA polymersomes: Study of the effect of PDPA block length on copolymer-DNA binding affinity. *Macromolecular Bioscience*, **10(5)**: 513-530.
- LOMAS H, MASSIGNANI M, ABDULLAH KA, CANTON I, LO PRESTI C, MACNEIL S, DU J, BLANAZS A, MADSEN J, ARMES SP, LEWIS AL, BATTAGLIA G (2008). Non-cytotoxic polymer vesicles for rapid and efficient intracellular delivery. *Faraday Discussions*, **139(0)**: 143-159.
- LORENCEAU E, UTADA AS, LINK DR, CRISTOBAL G, JOANICOT M, WEITZ DA (2005). Generation of polymerosomes from double-emulsions. *Langmuir*, **21(20)**: 9183-9186. doi:10.1021/la050797d
- MALINOVA V, BELEGRIPOU S, OUBOTER DB, MEIER WM. (2010). Biomimetic Block Copolymer Membranes. In: *Polymer Membranes/Biomembranes* Ed.: Meier, W. P. Knoll, W., Heidelberg: Springer. 113-196.

- MARGUET M, EDEMBE L, LECOMMANDOUX S (2012). Polymersomes in polymersomes: Multiple loading and permeability control. *Angewandte Chemie - International Edition*, **51(5)**: 1173-1176.
- MARTINO C, KIM SH, HORSFALL L, ABBASPOURRAD A, ROSSER SJ, COOPER J, WEITZ DA (2012). Protein expression, aggregation, and triggered release from polymersomes as artificial cell-like structures. *Angewandte Chemie - International Edition*, **51(26)**: 6416-6420.
- MASSIGNANI M, CANTON I, SUN T, HEARNDEN V, MACNEIL S, BLANAZS A, ARMES SP, LEWIS A, BATTAGLIA G (2010). Enhanced Fluorescence Imaging of Live Cells by Effective Cytosolic Delivery of Probes. *PLOS ONE*, **5(5)**: e10459.
- MASSIGNANI M, LOMAS H, BATTAGLIA G. (2010). Polymersomes: A Synthetic Biological Approach to Encapsulation and Delivery. In: *Modern Techniques for Nano- and Microreactors/-reactions* Ed.: Carusco, F., Heidelberg: Springer. 115-154.
- MATINI T, FRANCINI N, BATTOCCHIO A, SPAIN SG, MANTOVANI G, VICENT MJ, SANCHIS J, GALLON E, MASTROTTO F, SALMASO S, CALICETI P, ALEXANDER C (2014). Synthesis and characterization of variable conformation pH responsive block co-polymers for nucleic acid delivery and targeted cell entry. *Polymer Chemistry*, **5(5)**: 1626-1636.
- MATYJASZEWSKI K, XIA J (2001). Atom transfer radical polymerization. *Chemical Reviews*, **101(9)**: 2921-2990.
- MEHMET H (2000). Apoptosis: Caspases find a new place to hide. *Nature*, **403(6765)**: 29-30.

- MENG F, ENGBERS GHM, FEIJEN J (2005). Biodegradable polymersomes as a basis for artificial cells: Encapsulation, release and targeting. *Journal of Controlled Release*, **101(1-3 SPEC. ISS.)**: 187-198.
- MESSAGER L, BURNS JR, KIM J, CECCHIN D, HINDLEY J, PYNE AL, GAITZSCH J, BATTAGLIA G, HOWORKA S (2016). Biomimetic Hybrid Nanocontainers with Selective Permeability. *Angew Chem Int Ed Engl*, **55(37)**: 11106-11109.
- MESSAGER L, GAITZSCH J, CHIERICO L, BATTAGLIA G (2014). Novel aspects of encapsulation and delivery using polymersomes. *Current Opinion in Pharmacology*, **18(1)**: 104-111.
- MOFFAT AC, OSSELTON MD, WIDDOP B, WATTS J. (2011). Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, 4th. (Ed.: Moffat, A. C.).
- MUELLER W, KOYNOV K, FISCHER K, HARTMANN S, PIERRAT S, BASCHÉ T, MASKOS M (2009). Hydrophobic Shell Loading of PB-b-PEO Vesicles. *Macromolecules*, **42(1)**: 357-361.
- MUSTAPA MFM, GROSSE SM, KUDSIOVA L, ELBS M, RAIBER E-A, WONG JB, BRAIN APR, ARMER HEJ, WARLEY A, KEPPLER M, NG T, LAWRENCE MJ, HART SL, HAILES HC, TABOR AB (2009). Stabilized Integrin-Targeting Ternary LPD (Lipopolyplex) Vectors for Gene Delivery Designed To Disassemble Within the Target Cell. *Bioconjugate Chemistry*, **20(3)**: 518-532.
- NAHIRE R, HALDAR MK, PAUL S, AMBRE AH, MEGHNANI V, LAYEK B, KATTI KS, GANGE KN, SINGH J, SARKAR K, MALLIK S (2014). Multifunctional polymersomes for cytosolic delivery of gemcitabine and doxorubicin to cancer cells. *Biomaterials*, **35(24)**: 6482-6497.

- NEUMANN E, SCHAEFER-RIDDER M, WANG Y, HOFSCHEIDER PH (1982). Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO Journal*, **1(7)**: 841-845.
- NOORI KOOPAEI M, KHOSHAYAND MR, MOSTAFAVI SH, AMINI M, KHORRAMIZADEH MR, JEDDI TEHRANI M, ATYABI F, DINARVAND R (2014). Docetaxel Loaded PEG-PLGA Nanoparticles: Optimized Drug Loading, In-vitro Cytotoxicity and In-vivo Antitumor Effect. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR*, **13(3)**: 819-833.
- O'NEIL CP, SUZUKI T, DEMURTAS D, FINKA A, HUBBELL JA (2009). A novel method for the encapsulation of biomolecules into polymersomes via direct hydration. *Langmuir*, **25(16)**: 9025-9029.
- PALIVAN CG, FISCHER-ONACA O, DELCEA M, ITEL F, MEIER W (2012). Protein-polymer nanoreactors for medical applications. *Chemical Society Reviews*, **41(7)**: 2800-2823.
- PANG Z, GAO H, YU Y, GUO L, CHEN J, PAN S, REN J, WEN Z, JIANG X (2011). Enhanced intracellular delivery and chemotherapy for glioma rats by transferrin-conjugated biodegradable polymersomes loaded with doxorubicin. *Bioconjugate Chemistry*, **22(6)**: 1171-1180.
- PANGBURN TO, BATES FS, KOKKOLIE (2012). Polymersomes functionalized via “click” chemistry with the fibronectin mimetic peptides PR_b and GRGDSP for targeted delivery to cells with different levels of $\alpha 5\beta 1$ expression. *Soft Matter*, **8(16)**: 4449-4449.
- PATTEN TE, XIA J, ABERNATHY T, MATYJASZEWSKI K (1996). Polymers with Very Low Polydispersities from Atom Transfer Radical Polymerization. *Science*, **272(5263)**: 866.

- PAUTOT S, FRISKEN BJ, WEITZ DA (2003). Production of Unilamellar Vesicles Using an Inverted Emulsion. *Langmuir*, **19(7)**: 2870-2879.
- PEARSON RT, WARREN NJ, LEWIS AL, ARMES SP (2013). Effect of pH and Temperature on PMPC – PDPA Copolymer Self- Assembly. *Macromolecules*, **45(4)**: 1400-1407.
- PHOTOS PJ, BACAKOVA L, DISCHER B, BATES FS, DISCHER DE (2003). Polymer vesicles in vivo: Correlations with PEG molecular weight. *Journal of Controlled Release*, **90(3)**: 323-334.
- PIENTA KJ (2001). Preclinical mechanisms of action of docetaxel and docetaxel combinations in prostate cancer. *Seminars in Oncology*, **28**: 3-7.
- POLLARD TD, BORISY GG (2003). Cellular Motility Driven by Assembly and Disassembly of Actin Filaments. *Cell*, **112(4)**: 453-465.
- QIAO ZY, JI R, HUANG XN, DU FS, ZHANG R, LIANG DH, LI ZC (2013). Polymersomes from dual responsive block copolymers: Drug encapsulation by heating and acid-triggered release. *Biomacromolecules*, **14(5)**: 1555-1563.
- RADKE W, MÜLLER AHE (2005). Synthesis and Characterization of Comb-Shaped Polymers by SEC with On-Line Light Scattering and Viscometry Detection. *Macromolecules*, **38(9)**: 3949-3960.
- RAMEEZ S, ALOSTA H, PALMER AF (2008). Biocompatible and biodegradable polymersome encapsulated hemoglobin: A potential oxygen carrier. *Bioconjugate Chemistry*, **19(5)**: 1025-1032.
- ROBBINS GP, SAUNDERS RL, HAUN JB, RAWSON J, THERIEN MJ, HAMMER DA (2010). Tunable leuko-polymersomes that adhere specifically to inflammatory markers. *Langmuir*, **26(17)**: 14089-14096.

- ROMANOWSKY MB, ABATE AR, ROTEM A, HOLTZE C, WEITZ DA (2012). High throughput production of single core double emulsions in a parallelized microfluidic device. *Lab Chip*, **12(4)**: 802-807.
- ROODBEEN R, VAN HEST JCM (2009). Synthetic cells and organelles: Compartmentalization strategies. *BioEssays*, **31(12)**: 1299-1308.
- SANSON C, SCHATZ C, LE MEINS JF, BRÛLET A, SOUM A, LECOMMANDOUX S (2010). Biocompatible and biodegradable poly(trimethylene carbonate)-b-Poly (L-glutamic acid) polymersomes: Size control and stability. *Langmuir*, **26(4)**: 2751-2760.
- SANSON C, SCHATZ C, LE MEINS JFO, SOUM A, TH??VENOT J, GARANGER E, LECOMMANDOUX SB (2010). A simple method to achieve high doxorubicin loading in biodegradable polymersomes. *Journal of Controlled Release*, **147(3)**: 428-435.
- SCOTT EA, STANO A, GILLARD M, MAIO-LIU AC, SWARTZ MA, HUBBELL JA (2012). Dendritic cell activation and T cell priming with adjuvant- and antigen-loaded oxidation-sensitive polymersomes. *Biomaterials*, **33(26)**: 6211-6219.
- SHEN D, XIE F, EDWARDS WB (2013). Evaluation of Phage Display Discovered Peptides as Ligands for Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA). *PLOS ONE*, **8(7)**: e68339.
- SHEN H, EISENBERG A (1999). Morphological Phase Diagram for a Ternary System of Block Copolymer PS310-b-PAA52/Dioxane/H2O. *The Journal of Physical Chemistry B*, **103(44)**: 9473-9487.

- SHEN H, EISENBERG A (2000). Block Length Dependence of Morphological Phase Diagrams of the Ternary System of PS- b -PAA / Dioxane / H₂O. *Macromolecules*: 2561-2572.
- SHER YP, TZENG TF, KAN SF, HSU J, XIE X, HAN Z, LIN WC, LI LY, HUNG MC (2009). Cancer targeted gene therapy of BikDD inhibits orthotopic lung cancer growth and improves long-term survival. *Oncogene*, **28(37)**: 3286-3295.
- SIEGEL R, NAISHADHAM D, JEMAL A (2012). Cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **62(1)**: 10-29.
- SIMÓN-GRACIA L, HUNT H, SCODELLER P, GAITZSCH J, KOTAMRAJU VR, SUGAHARA KN, TAMMIK O, RUOSLAHTI E, BATTAGLIA G, TEESALU T (2016). iRGD peptide conjugation potentiates intraperitoneal tumor delivery of paclitaxel with polymersomes. *Biomaterials*, **104**: 247-257.
- SIMON-GRACIA L, HUNT H, SCODELLER PD, GAITZSCH J, BRAUN GB, WILLMORE AMA, RUOSLAHTI E, BATTAGLIA G, TEESALU T (2016). Paclitaxel-loaded Polymersomes for Enhanced Intraperitoneal Chemotherapy. *Molecular Cancer Therapeutics*, **15(April)**: 670-680.
- SINAI-ZINGDE G, VERMA A, LIU Q, BRINK A, BRONK JM, MARAND H, MCGRATH JE, RIFFLE JS (1991). Polyoxazoline containing copolymers useful as emulsifiers for polymer blends. *Makromolekulare Chemie. Macromolecular Symposia*, **42-43(1)**: 329-343.
- STACHOWIAK JC, RICHMOND DL, LI TH, BROCHARD-WYART F, FLETCHER DA (2009). Inkjet formation of unilamellar lipid vesicles for cell-like encapsulation. *Lab on a chip*, **9(14)**: 2003-2009.

- STANO A, SCOTT EA, DANE KY, SWARTZ MA, HUBBELL JA (2013). Tunable T cell immunity towards a protein antigen using polymersomes vs. solid-core nanoparticles. *Biomaterials*, **34(17)**: 4339-4346.
- STANO P (2010). Synthetic biology of minimal living cells: primitive cell models and semi-synthetic cells. *Systems and Synthetic Biology*, **4(3)**: 149-156.
- STANO P, LUISI PL (2010). Achievements and open questions in the self-reproduction of vesicles and synthetic minimal cells. *Chemical Communications*, **46(21)**: 3639-3653.
- STOJANOV K, GEORGIEVA JV, BRINKHUIS RP, HEST JCV, RUTJES FP, DIERCKX RAJO, VRIES EFJD, ZUHORN IS (2012). In Vivo Biodistribution of Prion- and GM1-Targeted Polymersomes following Intravenous Administration in Mice. *Molecular Pharmaceutics*, **9(6)**: 1620-1627.
- SUGIHARA S, BLANAZS A, ARMES SP, RYAN AJ, LEWIS AL (2011). Aqueous dispersion polymerization: a new paradigm for in situ block copolymer self-assembly in concentrated solution. *J Am Chem Soc*, **133(39)**: 15707-15713.
- SWEETMAN SC. (2009). Martindale: The Complete Drug Reference, 36th. (Ed.: Sweetman, S. C.).
- SZOSTAK JW, BARTEL DP, LUISI PL (2001). Synthesizing life. *Nature*, **409(6818)**: 387-390.
- TANG TYD, ANTOGNOZZI M, VICARY JA, PERRIMAN AW, MANN S (2013). Small-molecule uptake in membrane-free peptide/nucleotide protocells. *Soft Matter*, **9(31)**: 7647-7656.

- TANNER P, BALASUBRAMANIAN V, PALIVAN CG (2013). Aiding Nature's Organelles: Artificial Peroxisomes Play Their Role. *Nano Letters*, **13(6)**: 2875-2883.
- THAMBI T, DEEPAGAN VG, KO H, LEE DS, PARK JH (2012). Bioreducible polymersomes for intracellular dual-drug delivery. *Journal of Materials Chemistry*, **22(41)**: 22028-22028.
- THIELE J, ABATE AR, SHUM HC, BACHTLER S, FÖRSTER S, WEITZ DA (2010). Fabrication of Polymersomes using Double-Emulsion Templates in Glass-Coated Stamped Microfluidic Devices. *Small*, **6(16)**: 1723-1727.
- THIELE J, STEINHAUSER D, PFOHL T, FÖRSTER S (2010). Preparation of Monodisperse Block Copolymer Vesicles via Flow Focusing in Microfluidics. *Langmuir*, **26(9)**: 6860-6863.
- TIAN X, NYBERG S, S SHARP P, MADSEN J, DANESHPOUR N, ARMES SP, BERWICK J, AZZOUZ M, SHAW P, ABBOTT NJ, BATTAGLIA G (2015). LRP-1-mediated intracellular antibody delivery to the Central Nervous System. *Scientific Reports*, **5**: 11990-11990.
- TOPEL Ö, ÇAKIR BA, BUDAMA L, HODA N (2013). Determination of critical micelle concentration of polybutadiene-block-poly(ethyleneoxide) diblock copolymer by fluorescence spectroscopy and dynamic light scattering. *Journal of Molecular Liquids*, **177**: 40-43.
- TORCHILIN VP, LUKYANOV AN (2003). Peptide and protein drug delivery to and into tumors: challenges and solutions. *Drug Discovery Today*, **8(6)**: 259-266.
- UPADHYAY KK, BHATT AN, CASTRO E, MISHRA AK, CHUTTANI K, DWARAKANATH BS, SCHATZ C, LE MEINS JF, MISRA A, LECOMMANDOUX S (2010). In vitro and in vivo evaluation of docetaxel

loaded biodegradable polymersomes. *Macromolecular Bioscience*, **10(5)**: 503-512.

UPADHYAY KK, BHATT AN, MISHRA AK, DWARAKANATH BS, JAIN S, SCHATZ C, LE MEINS J-F, FAROOQUE A, CHANDRAIAH G, JAIN AK, MISRA A, LECOMMANDOUX S (2010). The intracellular drug delivery and anti tumor activity of doxorubicin loaded poly(γ -benzyl l-glutamate)-b-hyaluronan polymersomes. *Biomaterials*, **31(10)**: 2882-2892.

VAN DONGEN SFM, NALLANI M, CORNELISSEN JJLM, NOLTE RJM, VAN HEST JCM (2009). A three-enzyme cascade reaction through positional assembly of enzymes in a polymersome nanoreactor. *Chemistry - A European Journal*, **15(5)**: 1107-1114.

VAN OUDENAARDEN A, THERIOT JA (1999). Cooperative symmetry-breaking by actin polymerization in a model for cell motility. *Nat Cell Biol*, **1(8)**: 493-499.

VAN ROOY I, CAKIR-TASCIOGLU S, HENNINK WE, STORM G, SCHIFFELERS RM, MASTROBATTISTA E (2011). In Vivo Methods to Study Uptake of Nanoparticles into the Brain. *Pharmaceutical Research*, **28(3)**: 456-471.

VRIEZEMA DM, GARCIA PML, SANCHO OLTRA N, HATZAKIS NS, KUIPER SM, NOLTE RJM, ROWAN AE, VAN HEST JCM (2007). Positional Assembly of Enzymes in Polymersome Nanoreactors for Cascade Reactions. *Angewandte Chemie*, **119(39)**: 7522-7526.

WAN WM, HONG CY, PAN CY (2009). One-pot synthesis of nanomaterials via RAFT polymerization induced self-assembly and morphology transition. *Chem Commun (Camb)*(**39**): 5883-5885.

- WANG L, CHIERICO L, LITTLE D, PATIKARNMONTHON N, YANG Z, AZZOUEZ M, MADSEN J, ARMES SP, BATTAGLIA G (2012). Encapsulation of biomacromolecules within polymersomes by electroporation. *Angewandte Chemie - International Edition*, **51(44)**: 11122-11125.
- WANG X, LIU G, HU J, ZHANG G, LIU S (2014). Concurrent Block Copolymer Polymersome Stabilization and Bilayer Permeabilization by Stimuli-Regulated “Traceless” Crosslinking. *Angewandte Chemie International Edition*, **53(12)**: 3138-3142.
- WILLIAMS DS, PATIL AJ, MANN S (2014). Spontaneous Structuration in Coacervate-Based Protocells by Polyoxometalate-Mediated Membrane Assembly. *Small*, **10(9)**: 1830-1840.
- XIE X, KONG Y, TANG H, YANG L, HSU JL, HUNG M-C (2014). Targeted BikDD Expression Kills Androgen-Dependent and Castration-Resistant Prostate Cancer Cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, **13(7)**: 1813.
- XIE X, XIA W, LI Z, KUO H-P, LIU Y, LI Z, DING Q, ZHANG S, SPOHN B, YANG Y, WEI Y, LANG J-Y, EVANS DB, CHIAO PJ, ABBRUZZESE JL, HUNG M-C (2007). Targeted Expression of BikDD Eradicates Pancreatic Tumors in Noninvasive Imaging Models. *Cancer Cell*, **12(1)**: 52-65.
- YAGODA A, PETRYLAK D (1993). Cytotoxic chemotherapy for advanced hormone-resistant prostate cancer. *Cancer*, **71(S3)**: 1098-1109.
- YAN Q, WANG J, YIN Y, YUAN J (2013). Breathing Polymersomes: CO₂-Tuning Membrane Permeability for Size-Selective Release, Separation, and Reaction. *Angewandte Chemie International Edition*, **52(19)**: 5070-5073.
- YANG X, PILLA S, GRAILER JJ, STEEBER DA, GONG S, CHEN Y, CHEN G (2009). Tumor-targeting, superparamagnetic polymeric vesicles as highly

efficient MRI contrast probes. *Journal of Materials Chemistry*, **19(32)**: 5812-5812.

YASSIN MA, APPELHANS D, MENDES RG, RÜMMELI MH, VOIT B (2012). pH-Dependent release of doxorubicin from fast photo-cross-linkable polymersomes based on benzophenone units. *Chemistry - A European Journal*, **18(39)**: 12227-12231.

YOULE RJ, STRASSER A (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9(1)**: 47-59.

YU A, PANG Z, LU W, YIN Q, GAO H, JIANG X (2012). Self-assembled polymersomes conjugated with lactoferrin as novel drug carrier for brain delivery. *Pharmaceutical Research*, **29(1)**: 83-96.

YU S, AZZAM T, ROUILLER I, EISENBERG A (2009). "Breathing" Vesicles. *Journal of the American Chemical Society*, **131(30)**: 10557-10566.

ZHANG J, KRISHNAMACHARI P, LOU J, SHAHBAZI A. (2009). Synthesis of Poly(L(+) Lactic Acid) by Polycondensation Method in Solution. In: *Proceedings of the 2007 National Conference on Environmental Science and Technology* Ed.: Nzewi, E., Reddy, G., Luster-Teasley, S., Kabadi, V., Chang, S.-Y., Schimmel, K., Uzochukwu, G., New York, NY: Springer New York. 3-8.

ZHANG L, EISENBERG A (1995). Multiple Morphologies of "Crew-Cut" Aggregates of Polystyrene-b-poly(acrylic acid) Block Copolymers. *Science*, **268(5218)**: 1728.

ZHANG Y, ZHANG W, JOHNSTON AH, NEWMAN TA, PYYKKÖ I, ZOU J (2012). Targeted delivery of Tet1 peptide functionalized polymersomes to the rat cochlear nerve. *International Journal of Nanomedicine*, **7**: 1015-1022.

ÖZGEÇMİŞ

E-Posta Adresi : umutcanoz@ankara.edu.tr
Telefon (İş) : 03122033166
Telefon (Cep) : 05336320911
Adres : Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik
Teknoloji AbD Tandoğan-ÇANKAYA

Öğrenim Bilgisi

Doktora : Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi/Eczacılık Teknolojisi
Bölümü/Farmasotik Teknoloji Anabilim Dalı (2011-..)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi/Eczacılık Teknolojisi
Bölümü/Farmasotik Teknoloji Anabilim Dalı (2009 - 2011), Tez adı: Diklofenak
Sodyum Yüklü Mikropartiküler Sistemlerden Sulu Dispersiyonların Hazırlanmasına
Yönelik Çalışmalar (2011) Tez Danışmanı:(Prof. Dr. Kandemir Canefe)

Lisans : İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (2003 - 2007)

Görevler

Araştırma Görevlisi : Ankara Üniversitesi / Eczacılık Fakültesi / Eczacılık
Teknolojisi Bölümü/Farmasotik Teknoloji Anabilim Dalı (2014 -)

Projelerde Yaptığı Görevler

1. Prostat Kanseri Tedavisi İçin Spesifik Aktif Hedeflendirilmiş Gen Taşıyıcı
Polimerzomların Geliştirilmesi, Tübitak Projesi, Bursiyer, , 01/08/2015 (Devam
Ediyor)

2. Bifosfonat Yüklü Membran ve in situ Jel Formülasyonlarının Yönlendirilmiş Kemik Rejenerasyonu Üzerine Etkisinin in vitro ve in vivo Değerlendirilmesi, Tübitak Projesi, Bursiyer, , 01/04/2013 - 08/09/2015

Eserler

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. Berrin Küçüktürkmen, Umut Can Öz, Asuman Bozkır (2017). in situ hydrogel formulation for intra articular application of diclofenac sodium loaded polymeric nanoparticles. Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences, 14(1), 56-64.
2. Umut Can Öz, Burcu Devrim, Asuman Bozkır, Kandemir Canefe (2015). Development of reconstitutable suspensions containing diclofenac sodium loaded microspheres for pediatric delivery. Journal of Microencapsulation, 32(4), 317-328.
3. Ceyda Tuba Şengel Türk, Umut Can Öz, Tuğrul Mert Serim, Canan Hasçiçek (2014). Formulation and optimization of nonionic surfactants emulsified nimesulide loaded PLGA based nanoparticles by design of experiments. AAPS Pharmscitech, 15(1), 161-176.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında (proceedings) basılan bildiriler

1. Ongun Mehmet Saka, Umut Can Öz, Sevgi Gülyüz, Özgür Yılmaz, Asuman Bozkır (2017). Comparison Studies on Peptide-18 Conjugated Liposomes. 22nd International Symposium on Biomedical Science and Technology.
2. Burcu Devrim, Ongun Mehmet Saka, Umut Can Öz, Berrin Küçüktürkmen, Asuman Bozkır (2016). Preparation and Evaluation of Zoledronic Acid Loaded PLGA Nanoparticles. 11th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology.

3. Umut Can Öz, Berrin Küçüktürkmen, Ogun Mehmet Saka, Burcu Devrim, Asuman Bozkır (2015). Evaluation of Nanoparticle Production Process Via Central Composite Design for Efficient Zoledronic Acid Delivery. Annual Meeting and Exposition of AAPS.
4. Berrin Küçüktürkmen, Umut Can Öz, Burcu Devrim, Ogun Mehmet Saka, Asuman Bozkır (2015). Optimization of Alendronate Sodium loaded Nanoparticle Formulation for Higher Efficiency. Annual Meeting and Exposition of AAPS.
5. Zeynel Abidin Çankaya, Eray Yılmaz, Berrin Küçüktürkmen, Umut Can Öz, Asuman Bozkır (2015). Polymeric Nanoparticles for Intra Articular Application of Diclofenac Sodium. International Symposium on Pharmaceutical Sciences.
5. Umut Can Öz, Ogun Mehmet Saka, İsmail Murat Palabıyık, Asuman Bozkır (2013). Optimization of Nanoprecipitation Method with Dynamic Taguchi Design. AAPS Annual Meeting and Exposition.
6. Tuğrul Mert Serim, Umut Can Öz, Ceyda Tuba Şengel Türk, Canan Hasçiçek (2013). A Full Factorial Design Study of PLGA Nanoparticles Part II Effect of formulation Variables on Particle Characteristics. FIP World Congress.
7. Umut Can Öz, Tuğrul Mert Serim, Ceyda Tuba Şengel Türk, Canan Hasçiçek (2012). A Full Factorial Design Study of PLGA Nanoparticles Part I Effect of Two Factors on Encapsulation Efficiency. 16th International Pharmaceutical Technology Symposium.
8. Umut Can Öz, Kandemir Canefe, Asuman Bozkır (2012). Investigations on the Formulation Process Variables of Diclofenac Sodium Loaded Optimized Microspheres and Visualising Via Micro Computed Tomography. 10th International Symposium on Pharmaceutical Sciences.

9. Tuğrul Mert Serim, Umut Can Öz, Ongun Mehmet Saka, Burcu Devrim, Asuman Bozkır (2012). Preparation and Evaluation of the Model Protein Loaded Thermosensitive in situ Gelling Systems. 10th International Symposium on Pharmaceutical Sciences.
10. Ceyda Tuba Şengel Türk, Umut Can Öz, Tuğrul Mert Serim, Canan Hasçıçek (2012). Evaluation and Preparation of Nimesulide Loaded PLGA Nanoparticles Using Factorial Design for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. 8th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology.
11. Umut Can Öz, Kandemir Canefe, Asuman Bozkır (2012). Effect of Processing Parameters on in vitro Particle Characteristics in Diclofenac Sodium Loaded Microspheres and Imaging Via Micro Computed Tomography Micro CT. 8th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology.
12. Umut Can Öz, Kandemir Canefe (2011). Residual Organic Solvent Quantification Method Development in Diclofenac Sodium Loaded Microspheres. 17th International Biomedical Science&Technology Symposium.
13. Umut Can Öz, Kandemir Canefe (2011). Effect Of The Microspehere Production Methods On in vitro Particle Characteristics Comparison Of W O W And S O W Emulsion Solvent Evaporation Techniques. 3rd PharmSciFair Congress.
14. Umut Can Öz, Kandemir Canefe (2010). Studies on Preparation of Aqueous Dispersion Forms of Diclofenac Sodium Loaded Microparticulate Systems I Effect of Stabiliser Amount on Microsphere Formation. Quality of Medicines in a Globalised World: Dreams and Reality.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1. Umut Can ÖZ, Kandemir CANEFE (2010). Diklofenak Sodyum Yüklü Eudragit RS 100 Mikrokürelerinde Stabilizör Olarak Kullanılan PVA nın Partikül Görünümü Büyüklüğü Üzerindeki Etkisi. 10. Türkiye Eczacılık Kongresi.

Üniversite Dışı Deneyim

2015 - Kurucu Ortak, BIOART Ar-Ge-Danışmanlık Ltd.Şti., Ankara Üniversitesi Teknokenti, Gölbaşı/ANKARA

2007 - 2013 Eczacı, Umut Eczanesi

Burslar

2015-2016 Doktora Sırası Yurt Dışı Araştırma Bursu 2214/A, University College London, Chemistry Department, Prostat Kanseri Tedavisi İçin Spesifik Aktif Hedeflendirilmiş Gen Taşıyıcı Polimerzomların Geliştirilmesi.