T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

PEPTİT PROTEİN YAPILI ETKİN MADDE İÇEREN LİPİT TEMELLİ İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ

SEVAL OLĞAÇ

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

OCAK 2025


GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Gazi
1926

PEPTİT PROTEİN YAPILI ETKİN MADDE İÇEREN LİPİT TEMELLİ İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ

Seval OLĞAÇ

DOKTORA TEZİ

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OCAK 2025

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dökümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi durumda aleyhime olabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Seval OLĞAÇ

07 / 01 / 2025

PEPTİT PROTEİN YAPILI ETKİN MADDE İÇEREN LİPİT TEMELLİ İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ

(Doktora Tezi)

Seval OLĞAÇ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ocak 2025

ÖZET

Peptit protein yapılı etkin maddelerin oral yoldan verilmesi amacıyla lipit temelli ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilebilmesi için model madde olarak interlökin-2 seçilmiştir. İnterlökin-2 böbrek kanserinin immünolojik tedavisinde kullanılan bir sitokindir. Tez çalışması kapsamında, interlökin-2'nin parenteral kullanımına alternatif olarak oral yolla kullanılması için çoklu nanoemülsiyon formülasyonunun hazırlanması amaçlanmıştır. Çoklu emülsiyonlar, protein yapılı ilaçları yapılarında uzun süre koruma yeteneğine sahiptir. Bu tip formülasyonlarda ilaç salımı yavaş gerçekleşir ve formülasyonda bulunan yardımcı maddeler, protein moleküllerinin biyolojik bariyerlerden geçişini artırarak bu yaklaşımları umut verici bir seçenek haline getirmektedir. Bu doğrultuda, formülasyon bileşenleri arasındaki etkileşimleri moleküler düzeyde incelemek için moleküler dinamik simülasyonlardan yararlanılmış ve interlökin-2 yüklü çoklu nanoemülsiyon formülasyonları in siliko destekli olarak mikroakışkanlaştırıcı kullanılarak geliştirilmiştir. İnterlökin-2 ve farklı yardımcı maddeler arasında simülasyonlar gerçekleştirilerek analiz edilmiştir. Elde edilen in siliko sonuçlara uygun olarak hazırlanan interlökin-2 yüklü nanoemülsiyon formülasyonları damlacık boyutu, polidispersite indeksi, zeta potansiyeli, viskozite, yüzey gerilimi, elektrik iletkenliği, stabilite ve in vitro salım çalışmaları ile değerlendirilmiştir. Formülasyonun sindirimi ise in vitro lipoliz çalışmalarıyla incelenmiştir. Formülasyonda bulunan proteaz inhibitörü, lipoliz çalışmalarında proteoliz oranını azaltarak interlökin-2'nin daha stabil kalmasını sağlamıştır. Formülasyonların antiproliferatif etkinliği, PBMC ile ko-kültüre edilmiş A498 hücre hattı kullanılarak değerlendirilmiştir. İnterlökin-2 yüklü formülasyon, interlökin-2 çözeltisine göre PBMC hücrelerinin hücre canlılığını artırırken, PBMC hücrelerini uyararak A498 hücrelerinin sağ kalım oranını düşürmektedir. Nanoemülsiyon formülasyonunun sferoitlere penetrasyonu, referans çözeltiye göre daha fazla bulunmuş ve hücre kültürü çalışmaları ile bu formülasyonun interlökin-2'nin antikanser etkinliğini artırdığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar, interlökin-2 içeren nanoemülsiyon formülasyonlarının, interlökin-2 çözeltisine kıyasla hem yapısını hem de biyolojik aktivitesini koruyarak kanser hücrelerine karşı etkinliğini artırdığını ortaya koymaktadır.

Bilim Kodu	:	1020
Anahtar Kelimeler	:	Peptit-protein, interlökin-2, antikanser, lipit temelli nano ilaç taşıyıcı sistemler, mikroakışkanlaştırma tekniği, moleküler dinamik, in vitro salım, in vitro lipoliz, antikanser etkinlik
Sayfa Adedi	:	200
Danışman	:	Prof. Dr. Zeynep Şafak TEKSİN

DEVELOPMENT OF LIPID-BASED DRUG DELIVERY SYSTEMS CONTAINING BIOLOGICALLY ACTIVE PEPTIDE PROTEIN

(Ph. D. Thesis)

Seval OLĞAÇ

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

January 2025

ABSTRACT

Interleukin-2 has been chosen as a model compound for the development of lipid-based drug delivery systems for the oral administration of peptide-protein pharmaceutical ingredients. Interleukin-2 is a cytokine used in the immunological treatment of renal cancer. The aim of this thesis is to develop a double nanoemulsion formulation for oral administration as an alternative to the parenteral use of interleukin-2. Double emulsions have the ability to preserve protein-based drugs for an extended period. In these types of formulations, drug release occurs slowly, and the excipients in the formulation enhance the transport of protein molecules through biological barriers, making these approaches a promising option. In this regard, molecular dynamics simulations were used to examine the interactions between formulation components at the molecular level, and interleukin-2-loaded multiple nanoemulsion formulations were developed using a microfluidizer, supported by in silico techniques. Simulations were conducted and analyzed between interleukin-2 and various excipients. According to the results of in silico, interleukin-2-loaded nanoemulsion formulations were developed and evaluated through droplet size, polydispersity index, zeta potential, viscosity, surface tension, electrical conductivity, stability, and in vitro release studies. The digestion of the formulation was investigated by in vitro lipolysis studies. The protease inhibitor present in the formulation reduced proteolysis during lipolysis studies, ensuring that interleukin-2 remained more stable. The antiproliferative activity of the formulations was evaluated using the A498 cell line co-cultured with PBMCs. The interleukin-2-loaded formulation increased the cell viability of PBMCs compared to the interleukin-2 solution, while it reduced the survival rate of A498 cells by stimulating the PBMC cells. The penetration of the nanoemulsion formulation into spheroids was found to be higher than the reference solution, and cell culture studies demonstrated that this formulation enhanced the anticancer activity of interleukin-2. These results indicate that interleukin-2-loaded nanoemulsion formulations enhance anticancer efficacy by maintaining both the structure and biological activity of interleukin-2 compared to the interleukin-2 solution.

Science Code	:	1020
Key Words	:	Peptide-protein, interleukin-2, anticancer, lipid-based nano-drug carrier systems, microfluidization technique, molecular dynamics, in vitro release, in vitro lipolysis, anticancer efficacy
Page Number	:	200
Supervisor	:	Prof. Dr. Zeynep Şafak TEKSİN

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca her konuda yol gösteren, yardımları ve katkılarıyla beni yönlendiren, bilgisini, ilgisini, desteğini ve deneyimlerini asla esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Zeynep Şafak TEKSİN'e, tez izleme komitemde yer alarak bilimsel katkılarıyla tezime yön veren değerli hocalarım Prof. Dr. Füsun ACARTÜRK ve Prof. Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU'na, fikirleri ve duruşuyla örnek aldığım, doğduğum günden beri geçmişten geleceğe her daim yanımda olarak hayatıma önemli dokunuşlar yapan değerli hocam ve abim Dr. Öğr. Üyesi Abdurrahman OLĞAÇ'a, hücre kültürü çalışmalarımda destek olan Dr. Öğr. Üyesi Gamze VARAN'a, bir süre ikinci danışmanlığımı yaparak bana farklı bakış açıları kazandıran Prof. Dr. Tuba İNCEÇAYIR'a, hücre kültürü çalışmalarında kullandığım böbrek kanseri hücrelerini sağlayan Dr. Öğr. Üyesi Seval KORKMAZ ve Prof. Dr. A. Tansu KOPARAL'a, çalışmalarımda yaşadığım problemlerde yardımını esirgemeyen Doç. Dr. Başaran Mutlu AĞARDAN'a, SDS-PAGE çalışmalarında tecrübelerinden yararlandığım Dr. Öğr. Üyesi Ece SALİHOĞLU'na, çalışmalara katkılarından dolayı Dr. Öğr. Üyesi Hasan DEMİRCİ, Prof. Dr. Gizem DİNLER DOĞANAY, Ecz. Emine Yekta YILMAZ, Moleküler Biyolog Cahine KULAKMAN ve Moleküler Biyolog Yağız AKBAŞ'a, lisanstan itibaren iyisiyle kötüsüyle tüm anlarımda yoluma yoldaş olan canım arkadaşım Arş. Gör. Dr. Ayşegül YILDIZ'a, her koşulda beni destekleyen ve motive eden, bir abla ve bir kardeş olarak gördüğüm Dr. Öğr. Üyesi Duygu YILMAZ USTA ve Arş. Gör. Dr. Burcu TİMUR'a, doktora eğitimime katkıları için değerli hocalarım Prof. Dr. Figen TIRNAKSIZ, Prof. Dr. Sevgi TAKKA, Prof. Dr. Sibel İLBASMIŞ TAMER, Prof. Dr. Fatmanur TUĞCU DEMİRÖZ, Doç. Dr. Serdar TORT ve Dr. Öğr. Üyesi Tahir Emre YALÇIN'a, hayatımın her döneminde yanımda olmasını dileyeceğim değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Büşra KARPUZ, Arş. Gör. Eylül Su SARAL ACARCA, Arş. Gör. İlayda BİÇİCİ, Ecz. Aysel YILMAZ ve Arş. Gör. Adnan Altuğ KARA'a, özellikle son dönemde desteklerini gönülden hissettiğim Arş. Gör. Gözde BEBEK ve Arş. Gör. N. Tuğçe ÖZAKSUN başta olmak üzere birlikte çalışmaktan her zaman mutlu olduğum ve yardımlarıyla bana destek olan arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Sinem SAAR, Ecz. Emre TUNÇEL'e ve Fatma ÇELİK'e, bu uzun ve zorlu süreçte her zaman bana destek olan, hayatımdaki en büyük destekçim başta canım annem Dilek SEVAL OLĞAÇ olmak üzere anneannem Azize SEVAL'e ve canım SEVAL ailesi kadınlarına, ruh ikizim sevgili kardeşim Rona Cansu KAVAR AĞCABAY'a, Farmasötik Biyoteknoloji ve İlaç Tasarımı Öncelikli Alanında destek veren 100/2000 YÖK Doktora Bursu Programına, 2211-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı, 2250-Lisansüstü Bursları Performans Programı çerçevesinde eğitimimi ve SBAG-1001 222S478 kodlu proje ile tez çalışmalarımı destekleyen TÜBİTAK'a ve TKA-2023-8761 kodlu KAP projesi ile destekleyen Gazi Üniversitesi'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET iv
ABSTRACT v
TEŞEKKÜR vi
İÇİNDEKİLER vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ xiii
RESİMLERİN LİSTESİ xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR xix
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 5
2.1. Böbrek Kanseri 5
2.2. Sitokinler 5
2.2.1. İnterlökin-2 6
2.2.2. Rekombinant DNA teknolojisiyle interlökin-2 üretimi 11
2.2.3. İnterlökin-2'nin farmakokinetik ve farmakodinamik özellikleri 11
2.2.4. İnterlökin-2'nin tedavideki yeri ve güncel yaklaşımlar 12
2.3. Lipit Temelli Formülasyonlar 15
2.3.1. Nanoemülsiyonlar 17
2.3.2. Kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistemler 21
2.4. Moleküler Dinamik Simülasyonlar 24
2.4.1. Moleküler dinamik simülasyonlarda kullanılan farklı modeller 25
2.5. İn Vitro Sindirim 28
2.6. Hücre kültürü 30
3. GEREÇ VE YÖNTEM 33

Sayfa

3.1. Gereç 33

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler 33

3.1.2. Kullanılan araç, gereç ve cihazlar 34

3.2. Yöntem 36

3.2.1. İn siliko moleküler dinamik çalışmaları 36

3.2.2. İnterlökin-2'nin fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi 42

3.2.3. İnterlökin-2'nin miktar tayini yöntemi ve validasyonu 46

3.2.4. Nanoemülsiyon formülasyonu geliştirme çalışmaları 48

3.2.5. Geliştirilen nanoemülsiyon formülasyonlarında yapılan karakterizasyon çalışmaları 52

3.2.6. İn vitro salım çalışmaları 61

3.2.7. İn vitro sindirim çalışması 64

3.2.8. Hücre kültürü çalışmaları 66

3.2.9. İstatistiksel değerlendirmeler 74

4. BULGULAR 75

4.1. İn Siliko Moleküler Dinamik Çalışmaları 75

4.2. İnterlökin-2 Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi 88

4.2.1. IL-2 üretimi 88

4.2.2. Boyut dışlama kromatografisi (SEC-HPLC) 89

4.2.3. FT-IR analizi 91

4.2.4. DSC analizi 91

4.2.5. Sirküler dikroizm spektroskopisi 94

4.3. İnterlökin-2'nin Miktar Tayini Yöntemi ve Validasyonu 95

4.4. Nanoemülsiyon Formülasyonu Geliştirme Çalışmaları 96

4.5. Geliştirilen Nanoemülsiyon Formülasyonlarında Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları 98

4.5.1. ELISA kiti ile IL-2 yükleme tayini 98

Sayfa

4.5.2. Damlacık boyutu, PDİ ve zeta potansiyeli ölçümleri 98
4.5.3. Morfolojik çalışmalar 99
4.5.4. FT-IR analizi 101
4.5.5. DSC Analizi 106
4.5.6. Viskozite 109
4.5.7. Yüzey gerilimi ölçümleri 112
4.5.8. İletkenlik ölçümleri 114
4.5.9. Termodinamik stabilite çalışmaları 115
4.5.10. Stabilite çalışmaları 124
4.6. İn Vitro Salım Çalışmaları 133
4.7. İn Vitro Sindirim Çalışması 136
4.8. Hücre Kültürü Çalışmaları 136
5. TARTIŞMA 143
5.1. İn Siliko Moleküler Dinamik Çalışmaları 144
5.2. İnterlökin-2 Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi 147
5.3. İnterlökin-2'nin Miktar Tayini Yöntemi ve Validasyonu 150
5.4. Nanoemülsiyon Formülasyonu Geliştirme Çalışmaları 151
5.5. Geliştirilen Nanoemülsiyon Formülasyonlarında Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları 153
5.5.1. ELISA kiti ile IL-2 yükleme tayini 153
5.5.2. Damlacık boyutu, PDİ ve zeta potansiyeli ölçümleri 153
5.5.3. Morfolojik çalışmalar 154
5.5.4. FT-IR analizi 155
5.5.5. DSC analizi 155
5.5.6. Viskozite 156
5.5.7. Yüzey gerilimi ölçümleri 157

Sayfa

5.5.8. İletkenlik ölçümleri 157
5.5.9. Termodinamik stabilite çalışmaları 158
5.5.10. Stabilite çalışmaları 159
5.6. İn Vitro Salım Çalışmaları 162
5.7. İn Vitro Sindirim Çalışması 163
5.8. Hücre Kültürü Çalışmaları 164
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 169
KAYNAKLAR 173
ÖZGEÇMİŞ 195

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 2.1. Literatürde bulunan IL-2 ile yapılmış formülasyon geliştirme ve güncel IL-2 çalışmaları 13

Çizelge 2.2. Sindirim deneylerinde kullanılan ticari lipazlar 30

Çizelge 3.1. İnsan IL-2'nin kristal yapıları 37

Çizelge 3.2. Formülasyon üzerinde in siliko etkileri değerlendirilen yardımcı maddeler 40

Çizelge 3.3. Teknik bilgi formlarına göre yardımcı maddelerin özellikleri 40

Çizelge 3.4. Sirküler dikroizm analiz parametreleri 45

Çizelge 3.5. F1 formülasyonunda kullanılan bileşenler 51

Çizelge 3.6. F2 formülasyonunda kullanılan bileşenler 51

Çizelge 3.7. İn vitro salım çalışmasında kullanılan ortamlar 62

Çizelge 3.8. İn vitro salım yöntemi 63

Çizelge 4.1. IL-2'nin X-ray ile elde edilen IL-2R alt birimleriyle etkileşim bölgeleri ve etkileşim tipleri (PDB kodu: 2ERJ) 76

Çizelge 4.2. Oleik asit ve IL-2 etkileşim analizi 80

Çizelge 4.3. Labrafac™ Lipophile WL 1349 ve IL-2 etkileşim analizi 80

Çizelge 4.4. Maisine® ve IL-2 etkileşim analizi 81

Çizelge 4.5. Peceol™ ve IL-2 etkileşim analizi 81

Çizelge 4.6. Capryol® 90 ve IL-2 etkileşim analizi 81

Çizelge 4.7. Lauroglycol™ 90 ve IL-2 etkileşim analizi 82

Çizelge 4.8. Labrasol® ve IL-2 etkileşim analizi 82

Çizelge 4.9. Transcutol® HP ve IL-2 etkileşim analizi 82

Çizelge 4.10. F1 (su/yağ/su tipi nanoemülsiyon) formülasyonu damlacık boyutu ve PDİ sonuçları (n=3, Ort ± SD). 96

Çizelge 4.11. F2 (su/yağ/su tipi nanoemülsiyon) formülasyonu damlacık boyutu ve PDİ sonuçları (n=3, Ort ± SD). 97

Çizelge 4.12. Formülasyon parametreleri 97

Çizelge 4.13. IL-2 yüklü nanoemülsiyonların yükleme etkinliği(n=3). 98

Çizelge 4.14. Nanoemülsiyonların damlacık boyutu, PDİ ve zeta potansiyeli ölçüm değerleri (n=3). 98

Çizelge 4.15. IL-2 yüklü nanoemülsiyonların damlacık boyutu, PDİ ve zeta potansiyeli ölçüm değerleri (n=3)..... 99

Çizelge 4.16. Farklı kaynaklardan temin edilen IL-2 ile yüklü nanoemülsiyonların karşılaştırılması 99

Çizelge 4.17. F2 formülasyonlarına ait Brookfield DV-III Rheometer viskozite sonuçları..... 109

Çizelge 4.18. F1 ve IL-2 yüklü F1'e ait asılı damla görüntüleri ve yüzey gerilimi sonuçları* 113

Çizelge 4.19. F2, IL-2 yüklü F2 ve Aprotinin içeren IL-2 yüklü F2'ye ait asılı damla görüntüleri ve yüzey gerilimi sonuçlar..... 113

Çizelge 4.20. Farklı kaynaklardan temin edilen IL-2 ile yüklü nanoemülsiyonların karşılaştırılması 113

Çizelge 4.21. Taze hazırlanan IL-2 yüklü olmayan, IL-2 yüklü ve Aprotinin içeren IL-2 yüklü çoklu emülsiyonların iletkenlik ölçümleri..... 115

Çizelge 4.22. IL-2 yüklü ve aprotinin içeren IL-2 yüklü çoklu F2 formülasyonlarının karşılaştırılması..... 132

Çizelge 4.23. IL-2 yüklü F2 formülasyonlarının pH 1,2 ve pH 6,8'deki zamana bağlı salım tablosu 133

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil		Sayfa
Şekil 2.1.	İnsan IL-2'nin yapısı (PDB kodu: 1M47)	7
Şekil 2.2.	IL-2 kristal yapısının ikincil yapısı iki boyutlu olarak gösterilmiştir (PDB kodu: 1M47). Kırmızı renk α-sarmalları göstermektedir.	7
Şekil 2.3.	IL-2'nin ve IL-2 reseptörleriyle etkileşimleri (IL-2R); IL-2Rα, IL-2Rβ, and γc (PDB kodu: 2ERJ).	8
Şekil 2.4.	IL-2'nin sinyal yolağı.	8
Şekil 2.5.	IL-2 farklı reseptör alt tiplerine bağlanarak farklı etkiler ortaya koymaktadır.	9
Şekil 2.6.	Oral peptit ve proteinlerin karşılaştığı bariyerler	16
Şekil 2.7.	Mukus geçirgenlik davranışı	17
Şekil 2.8.	Moleküler modelleme için uygulama aralıkları	25
Şekil 2.9.	pH-stat lipoliz modeli	29
Şekil 2.10.	2B ve 3B hücre kültürü	31
Şekil 3.1.	Tez kapsamında yapılan çalışmaların şematik olarak gösterimi	36
Şekil 3.2.	Rekombinant IL-2 üretim süreci şematik gösterimi	43
Şekil 3.3.	Sandviç ELISA'nın adımları (Elabscience® Human IL-2 ELISA Kit)	47
Şekil 3.4.	a. Çoklu nanoemülsiyonun (F1) ve b. kendiliğinden emülsifiye çoklu nanoemülsiyonun (F2) şematik gösterimi	50
Şekil 4.1.	IL-2R ile etkileşime giren IL-2'nin yüzey aminoasitleri ve etkileşim türleri.....	75
Şekil 4.2.	Yardımcı madde ve IL-2 simülasyonlarından kesitler.	80
Şekil 4.3.	Yardımcı madde ve IL-2 simülasyonlarına ait RMSF grafiği.	84
Şekil 4.4.	Yardımcı madde ve IL-2 simülasyonlarına ait RMSD grafiği.....	85
Şekil 4.5.	Proteaz inhibitörleri ve IL-2 simülasyonlarına ait kesitler	86
Şekil 4.6.	Proteaz inhibitörleri ve IL-2 simülasyonlarına ait RMSF grafiği.....	87
Şekil 4.7.	Proteaz inhibitörleri ve IL-2 simülasyonlarına ait RMSD grafiği	88

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.8. Saflaştırılan rekombinant IL-2 proteinin saflaştırma sonrası SEC-HPLC sonuçları. 90

Şekil 4.9. Farklı kaynaklardan alınan IL-2'nin FT-IR spektrumu 92

Şekil 4.10. Farklı kaynaklardan alınan IL-2'nin DSC termogramı 93

Şekil 4.11. Referans (Elabscience®) IL-2 CD spektrumu 94

Şekil 4.12. B1- IL-2 CD spektrumu 95

Şekil 4.13. Literatürdeki IL-2 CD spektrumları. 95

Şekil 4.14. ELISA kitinin kalibrasyon grafiği 96

Şekil 4.15. F1 formülasyonuna ait IR spektrumları 102

Şekil 4.16. F2 formülasyonuna ait IR spektrumları 103

Şekil 4.17. Aprotinin yüklü F1 nanoemülsiyonunun IR spektrumları 104

Şekil 4.18. Aprotinin yüklü F2 nanoemülsiyonunun IR spektrumları 105

Şekil 4.19. F1 nanoemülsiyonuna ait DSC termogramı 107

Şekil 4.20. F2 nanoemülsiyonuna ait DSC termogramı 108

Şekil 4.21. F2 formülasyonunun a. viskozite-kayma hızı ve b. kayma hızı-kayma gerilimi grafikleri 110

Şekil 4.22. F2-IL-2 formülasyonunun a. viskozite-kayma hızı ve b. kayma hızı-kayma gerilimi grafikleri 111

Şekil 4.23. F2-IL-2-Aprotinin formülasyonunun a. viskozite-kayma hızı ve b. kayma hızı- kayma gerilimi grafikleri 112

Şekil 4.24. F1 ve F2 formülasyonlarının 1 haftalık kondüktivite sonuçları 114

Şekil 4.25. IL-2 yüklü F1 ve IL-2 yüklü F2 formülasyonlarının 1 haftalık kondüktivite sonuçları 114

Şekil 4.26. F1 formülasyonunun başlangıç ve ısıtma-soğutma döngüleri sonrası damlacık boyutu, PDİ ve zeta potansiyeli grafikleri. 117

Şekil 4.27. F2 formülasyonunun başlangıç ve ısıtma-soğutma döngüleri sonrası damlacık boyutu, PDİ ve zeta potansiyeli grafikleri. 117

Şekil 4.28. F1 formülasyonunun başlangıç ve dondurma-çözme döngüleri sonrası damlacık boyutu, PDİ ve zeta potansiyeli grafikleri. 119

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.29. F2 formülasyonunun başlangıç ve dondurma-çözme döngüleri sonrası damlacık boyutu, PDİ ve zeta potansiyeli grafikleri. 119

Şekil 4.30. IL-2 yüklü F1 formülasyonunun başlangıç ve ısıtma-soğutma döngüleri sonrası damlacık boyutu, PDİ ve zeta potansiyeli grafikleri. 121

Şekil 4.31. IL-2 yüklü F2 formülasyonunun başlangıç ve ısıtma-soğutma döngüleri sonrası damlacık boyutu, PDİ ve zeta potansiyeli grafikleri. 121

Şekil 4.32. IL-2 yüklü F1 formülasyonunun başlangıç ve dondurma-çözme döngüleri sonrası damlacık boyutu, PDİ ve zeta potansiyeli grafikleri. 123

Şekil 4.33. IL-2 yüklü F2 formülasyonunun başlangıç ve dondurma-çözme döngüleri sonrası damlacık boyutu, PDİ ve zeta potansiyeli grafikleri. 123

Şekil 4.34. CD ile tekrarlanan ölçüme ait görsel 124

Şekil 4.35. S200 kolon ile gerçekleştirilen SEC-HPLC; Labrafac kromatogramı 128

Şekil 4.36. S200 kolon ile gerçekleştirilen SEC-HPLC; Kolliphor® EL kromatogramı 128

Şekil 4.37. S200 kolon ile gerçekleştirilen SEC-HPLC; Aprotinin kromatogramı 129

Şekil 4.38. S200 kolon ile gerçekleştirilen SEC-HPLC; F2-IL-2 kromatogramı. 129

Şekil 4.39. S200 kolon ile gerçekleştirilen SEC-HPLC; Aprotinin içeren F2-IL-2 kromatogramı 130

Şekil 4.40. S200 kolon ile gerçekleştirilen SEC-HPLC; F2-K-IL-2 kromatogramı 130

Şekil 4.41. S200 kolon ile gerçekleştirilen SEC-HPLC; Aprotinin içeren F2-K-IL-2 kromatogramı 131

Şekil 4.42. S200 kolon ile gerçekleştirilen SEC-HPLC analiz edilen kromatogramların karşılaştırılması 131

Şekil 4.43. IL-2 yüklü F2 formülasyonunun %IL-2 miktarının zamana karşı incelenmesi..... 133

Şekil 4.44. pH 1,2 ‘deki in vitro salıma ait %IL-2-zaman grafiği 134

Şekil 4.45. pH 6,8’deki in vitro salıma ait %IL-2-zaman grafiği 134

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.46. pH 6,5 FaSSIF ortamındaki in vitro salıma ait %IL-2-zaman grafiği 135

Şekil 4.47. pH 6,5 FeSSIF ortamındaki in vitro salıma ait %IL-2-zaman grafiği 135

Şekil 4.48. Sindirim çalışması a. % IL-2 - zaman grafiği, b. % Sindirim - zaman grafiği..... 136

Şekil 4.49. PBMC hücrelerine ait hücre proliferasyonu grafiği..... 137

Şekil 4.50. A498 ve PBMC hücrelerinin ko-kültürü ile yapılan konvansiyonel hücre kültürü çalışmalarında ait hücre canlılığı grafikleri. 138

Şekil 4.51. A498 ve PBMC hücreleri ile yapılan migrasyon çalışmalarında ait mikroskop görüntüleri (x40) (Kristal viyole ile boyama yapılmıştır). 139

Şekil 4.52. A498 insan renal karsinoma hücreleri ile oluşturulan 3B küresel tümörün (sferoit) mikroskobik görüntüsü..... 140

Şekil 4.53. A498 ve PBMC hücrelerinin ko-kültürü ile yapılan 3 boyutlu hücre kültürü çalışmalarında ait sitotoksisite grafikleri. 141

Şekil 4.54. A498 sferoitleri ile yapılan tümöral penetrasyon hücre kültürü çalışmalarında ait mikroskop görüntüleri (x4) 142

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim **Sayfa**

Resim 3.1. Elektroforez cihazında 150 V'da örneklerin yürütülmesi..... 55

Resim 3.2. Diyaliz kaset ile yapılan in vitro salım çalışmaları 61

Resim 3.3. Kapsüle doldurulmuş IL-2 yüklü formülasyon ve palet yöntemi ile gerçekleştirilen in vitro salım çalışmaları..... 63

Resim 3.4. A498 insan renal karsinoma hücrelerinin mikroskop görüntüsü (x40)..... 66

Resim 3.5. PBMC hücrelerinin mikroskop görüntüsü (x40)..... 67

Resim 3.6. Hücre kültürü çalışmaları a) A498 hücre flaskı b) 75 cm2'lik flaska besiyeri ilavesi c) Hücre sayım plakası d) Hücre sayımının yapılması..... 67

Resim 3.7. IL-2 yüklü nanoemülsiyonun ve IL-2 çözeltisinin 96 kuyucuklu plakada PBMC hücrelerine uygulanması. 68

Resim 3.8. 96 kuyucuklu plakada PBMC hücrelerine uygulanan IL-2 yüklü nanoemülsiyonu ve IL-2 çözeltisinin görünümü 69

Resim 3.9. WST-1 ile inkübe edilen plakanın görünümü..... 70

Resim 3.10. 12 kuyucuklu plakada polikarbonat insertler kullanılarak gerçekleştirilen migrasyon çalışması..... 71

Resim 3.11. Migrasyon çalışmasında polikarbonat insertün PBS tampon ile yıkanması işlemi..... 72

Resim 4.1. F1 formülasyonların fiziksel görünümü..... 100

Resim 4.2. F2 formülasyonların fiziksel görünümü..... 100

Resim 4.3. a. F1 formülasyonlarının* ve b. F2 formülasyonlarının TEM görüntüleri..... 101

Resim 4.4. a. F1 formülasyonlarının fiziksel görünümü b. F2 formülasyonlarının fiziksel görünümü..... 115

Resim 4.5. F1 formülasyonunun başlangıç ve ısıtma-soğutma döngüleri sonrası fiziksel görünümü 116

Resim 4.6. F2 formülasyonunun başlangıç ve ısıtma-soğutma döngüleri sonrası fiziksel görünümü 116

Resim 4.7. F1 formülasyonunun başlangıç ve dondurma-çözme döngüleri sonrası fiziksel görünümü 118

Resim **Sayfa**

Resim 4.8. F2 formülasyonunun başlangıç ve dondurma-çözme döngüleri sonrası fiziksel görünümü 118

Resim 4.9. IL-2 yüklü F1'in başlangıç ve ısıtma-soğutma döngüleri sonrası fiziksel görünümü 120

Resim 4.10. IL-2 yüklü F2'nin başlangıç ve ısıtma-soğutma döngüleri sonrası fiziksel görünümü 120

Resim 4.11. IL-2 yüklü F1'in başlangıç ve dondurma-çözme döngüleri sonrası fiziksel görünümü 122

Resim 4.12. IL-2 yüklü F2'nin başlangıç ve dondurma-çözme döngüleri sonrası fiziksel görünümü 122

Resim 4.13. %12'lik akrilamid jelde SDS PAGE çalışma görüntüleri 125

Resim 4.14. Formülasyonların %12'lik akrilamid jelde SDS PAGE çalışma görüntüleri 125

Resim 4.15. F2-IL-2 formülasyonların %12'lik akrilamid jelde SDS PAGE çalışma görüntüleri 126

Resim 4.16. Y-F2-IL-2 formülasyonunun %12'lik akrilamid jelde SDS PAGE çalışma görüntüleri 127

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
°C	Santigrat derece
%	Yüzde
Da	Dalton
kDa	Kilo dalton
g	Gram
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mPa	Milipaskal
M	Molar
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
nm	Nanometre
psi	İnç kare başına uygulanan pound kuvvet
R^2	Determinasyon katsayısı
rpm	Dakika başına düşen devir sayısı

Kısaltmalar	Açıklamalar
A498	İnsan böbrek kanseri hücre hattı
CD	Sirküler dikroizm
CD*	Yüzey farklılaşma antijenleri (Cluster of Differentiation)
CYP	Sitokrom enzim ailesi
dk	Dakika
DMEM	Dulbecco's Modifiye Eagle’s Besiyeri
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetre
EMA	Avrupa İlaç Ajansı
FaSSIF	Açlık durumunu taklit eden ince bağırsak sıvısı
FBS	Fetal sığır serumu
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FeSSIF	Tokluk durumunu taklit eden ince bağırsak sıvısı
FL	Fosfolipit
GIS	Gastrointestinal sistem
GM-CSF	Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör
HLB	Hidrofilik lipofilik denge
IL-2	İnterlökin-2
KL	Kolesterol
LOD	Duyarlılık sınırı
LOQ	Saptama sınırı
LFCS	Lipit formülasyon sınıflandırma sistemi
LTF	Lipit temelli formülasyon
MD	Moleküler dinamik
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
NK	Doğal öldürücü hücreler

NR	Nil kırmızısı
Ort	Ortalama
OP	Yağ fazı
PBS	Fosfat tamponu
PBMC	Periferik kan mononükleer hücreleri
PDB	Protein Veri Bankası
PDİ	Polidispersite indeksi
PGPR	Poligliserol polirisinolat
PVPA	Vezikül temelli permeasyon yöntemi
RMSD	Kök ortalama kare sapması
RMSF	Kök ortalama kare fluktuasyonu
s	Saat
SEDDS	Kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistem
SMEDDS	Kendiliğinden mikroemülsifiye ilaç taşıyıcı sistem
sn	Saniye
SNEDDS	Kendiliğinden nanoemülsifiye ilaç taşıyıcı sistem
SIF	Simüle bağırsak sıvısı
SLS	Sodyum lauril sülfat
SS	Standart sapma
ST	Safra tuzu
TEM	Transmisyon elektron mikroskobu
TG	Trigliserit
TNF-α	Tümör nekroz faktör-α
USP	Amerikan Farmakopesi
UV	Ultraviyole
VK	Varyasyon katsayısı

1. GİRİŞ

Kanser, vücuttaki bazı hücrelerin radyasyon, kanserojenler ve genetik faktörler nedeniyle kontrolsüz bir şekilde büyüdüğü ve vücudun diğer bölgelerine yayıldığı ciddi bir hastalıktır. Kanser, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde en önemli ölüm nedenlerinden biridir (Mahdavifar, Mohammadian, Ghoncheh ve Salehiniya, 2018). 2022 yılı Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı verilerine göre dünyadaki kanser vaka sayısı 19.976.499'dur ve insidansın artacağı öngörülmektedir (IARC, Cancer Fact Sheets- All Cancers Fact Sheet 2024). Dünya çapında her iki cinsiyet için de en sık görülen kanser türleri trakea, bronş ve akciğerin ardından meme kanseridir. Kolorektum kanseri ise en sık görülen üçüncü kanser türü olmuştur (WCRF, Cancer trends - Worldwide cancer data, 2024). Kanser türleri arasında böbrek kanseri idrar yollarının en ölümcül kanseri olarak kabul edilmektedir (Mahdavifar ve diğerleri, 2018; Capitanio ve diğerleri, 2019). Kanser tedavisinde tek bir tedavi yöntemi tercih edilebildiği gibi cerrahi prosedürler ile kemoterapi ve radyoterapi gibi kombine tedavinin tercih edildiği durumlar da söz konusudur. Bunların yanı sıra hormon tedavisi, immünoterapi, hipertermi, fotodinamik tedavi ve kök hücre transplantasyonu gibi çeşitli teknikler de kullanılmaktadır (NCI - Types of Cancer Treatment, 2024). Kanser immünoterapilerinin geliştirilmesi ve tümör immünolojisinin daha derinlemesine anlaşılması kanser tedavisinde önemli bir dönüm noktasıdır. Kanser immünoterapisi, hastanın bağışıklık sistemini tümörlere karşı aktive ederek immünolojik hafızaya yol açmayı, tümör yükünü azaltmayı ve genel sağ kalım oranlarını artırmayı amaçlayan umut verici bir kanser tedavisi stratejisidir (Han ve diğerleri, 2023). Bu yaklaşım, doğrudan tümör hücrelerini hedef almaktan ziyade bağışıklık sisteminin etkili bir şekilde çalışmasını sağlamaya odaklanır ve bağışıklık sisteminin tümör hücrelerini tanımlamasını, saldırmasını ve elimine etmesini mümkün kılar. Son yıllarda, kanser immünoterapisi bağışıklık kontrol noktalarının keşfi, sitokinlerin antitümör mekanizmalarındaki rolünün aydınlatılması ve genetik mühendisliği teknolojilerindeki ilerlemelerle birlikte büyük bir ivme kazanmıştır. Bu gelişmeler, genetiği değiştirilmiş bağışıklık hücrelerinin üretilmesini mümkün kılarak, immünoterapinin kanser tedavisindeki potansiyelini artırmış ve etkili bir tedavi yaklaşımına dönüşmesini sağlamıştır (Hsu ve diğerleri, 2024).

İmmünoterapide, doğal ya da kimyasal yapılı etkin maddelerle kansere karşı doğal bağışıklığı artırmak ve hedeflendirmek amaçlanmaktadır. Bu yöntemlerden biri olan sitokin tedavisinde kullanılan interferon-alfa ve interlökin-2 (IL-2) ile objektif yanıtların indüklediği gösterilmiştir. IL-2, kazanılmış bağışıklık sisteminde önemli rol oynar ve ilk keşfedilen sitokinlerden biridir. IL-2, birçok bağışıklık hücresinin, özellikle lenfositlerin büyümesini ve aktivitesini artırmaktadır. Böylece, lenfositler kanser hücrelerine saldırarak onları öldürebilir (PDQ® Adult Treatment Editorial Board, 2021).

Terapötik peptit/proteinler gibi IL-2 de biyolojik yapısı nedeniyle gastrointestinal kanaldaki proteazlar tarafından hızla metabolize olmaktadır. Bu durumu önlemek için oral enkapsüle nanoformülasyonların tasarımı ve enzim inhibitörleri ile absorpsiyon artırıcıların ilavesi gibi çeşitli formülasyon yaklaşımlarıyla IL-2'nin etkili bir formülasyonunun hazırlanabileceği düşünülmektedir.

Lipit temelli ilaç taşıyıcı sistemler, suda az çözünen bileşiklerin çözünürlüğünü, emilimini, değişken gıda etkisini en aza indirmek ve biyoyararlanımını artırmak için iyi bilinen ve yaygın kullanılan bir formülasyon stratejisidir. Oral uygulama için lipit temelli formülasyonlar basit yağ çözeltilerinden, sürfaktan, kosürfaktan veya yardımcı çözücüler içeren yağ karışımlarına kadar çeşitlilik gösterir. Nanoteknolojik yenilikçi lipit temelli ilaç taşıyıcı sistemlerden biri olan nanoemülsiyonlar, çok küçük damlacık boyutuna sahiptir. Bu özellikleri sayesinde kremalaşma ve flokülasyon gibi stabilite problemleri önlenebilmektedir. Ayrıca, geniş yüzey alanları sayesinde ilaç etkin maddesinin permeabilitesini arttırırlar. Daha az etkin maddeye yani doza ihtiyaç duyulmasını sağlayarak çözünürlüğü ve permeabilitesi düşük etkin maddeler için etkili formülasyonlar geliştirilmesine olanak tanırlar. Bu özellikleriyle nanoemülsiyonlar, ilaç taşıyıcı sistemler arasında avantajlı sistemlerdir (Mason ve diğerleri, 2006). Emülsiyon sistemleri peptit-protein yapılı ilaçların oral biyoyararlanımlarını artırma amacıyla en sık tercih edilen sistemlerdendir (Cheng ve diğerleri, 2008). Nanoemülsiyonlar, oluşturdukları küçük damlacık boyutu ve gastrointestinal kanalda lipoliz sonucu oluşan karışık miseller ile geniş yüzey alanı sağlar, ilaç difüzyonunu ve sürfaktan varlığı nedeniyle mukozal geçirgenliği artırır. Ayrıca, bu sistemler formülasyonda kullanılan uzun zincirli yağlara bağlı olarak lenfatik emilimi artırmaları nedeniyle de yüksek etkinlik göstermektedirler (Gürsoy

ve Benita, 2004). Kanser tedavisinde lenfatik sisteme hedeflendirme, makromoleküler yapıdaki ilaçların oral emilimini iyileştirdiği ve ayrıca mukozal immünitede artış sağladığı için dikkat çekmektedir (Nishioka ve Yoshino, 2001).

Lipit temelli ilaç taşıyıcı sistemler gastrointestinal sistemde sindirime uğrayabilen lipit yapılı yardımcı maddeler içerdiğinden formülasyonların performansı in vitro lipoliz çalışması ile değerlendirilmektedir. Lipoliz çalışmalarıyla gastrik ve intestinal ortamda lipaz/kolipaz enzimleri tarafından metabolize edilip edilmediğini ve formülasyon bileşenlerinin olası sindirimine karşı peptit ve protein yapılı etkin maddelerin proteolitik degredasyona karşı korunup korunmadığı incelenebilmektedir.

“Peptit Protein Yapılı Etkin Madde İçeren Lipit Temelli İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi” başlıklı tez çalışmasında protein yapılı endojen bir molekül olan IL-2 model etkin madde olarak seçilmiştir. Bu kapsamda IL-2’nin oral yolla uygulanacak nanoemülsiyon formülasyonunun in siliko destekli olarak geliştirilmesi, mikroakışkanlaştırıcı kullanılarak hazırlanması ve karakterize edilmesi tez çalışmasının ilk amacını oluşturmaktadır. Ayrıca, geliştirilen ilaç taşıyıcı sistemlerin sindiriminin ve sindirimin IL-2 stabilitesine etkisinin in vitro lipoliz çalışmasıyla incelenmesi hedeflenmektedir. İkinci amaç, IL-2 yüklü nanoemülsiyon formülasyonunun antikanser etkinliğinin hücre kültürü çalışmalarıyla incelenmesidir. IL-2 yüklü oral formülasyonların in siliko destekli olarak geliştirilmesi, bu formülasyonların sindirimi ve in vitro antikanser etkinliği ilk kez incelenmiştir. Tez çalışması SBAG-1001 222S478 kodlu proje ile TÜBİTAK ve TKA-2023-8761 kodlu KAP projesi ile Gazi Üniversitesi tarafından desteklenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Böbrek Kanseri

Dünya Sağlık Örgütü ve Globocan 2022 yılı verilerine göre böbrek kanserinin, diğer kanserler arasında görülme sıklığı 14. sıradadır ve yıllık 434.840 yeni vaka bildirilmektedir. Ölüm oranlarına göre ise 16. sırada olup, 155.953 vaka ölümle sonuçlanmıştır. İstatistiklere göre hastalığın insidansı erkeklerde (277.800) kadınlardan (157.040) daha yüksektir (IARC-Cancer Today, 2024). Böbrek kanseri vakalarının %59'unun daha gelişmiş ülkelerde ortaya çıktığı görülmektedir. Böbrek kanserinin gelişmiş ülkelerde sağ kalım oranları nispeten yüksektir (WCRF, Diet, nutrition, physical activity and kidney cancer).

Tanısal görüntülemenin (manyetik rezonans görüntüleme, bilgisayarlı tomografi ve ultrason) kullanımının artışına bağlı olarak böbrek kanserlerinin tespiti artmıştır. Risk faktörlerinin çeşitliliği insidansı doğrudan etkilemektedir. Yapılan çalışmalara göre cinsiyet, yaş, ırk gibi demografik faktörlerin, obezite, sigara ve alkol kullanımı ve meyve sebze tüketimi gibi yaşam tarzı faktörlerinin, hipertansiyon, diyabet, böbrek hastalıkları ve viral hepatit gibi hastalıkların böbrek kanserleri ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Weikert ve Ljungberg, 2010; Navai ve Wood, 2012; Macleod ve diğerleri, 2013).

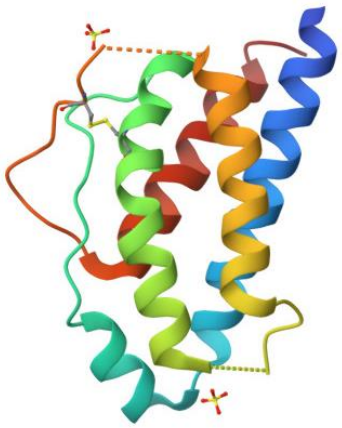
2.2. Sitokinler

Sitokinler, bağışıklık sistemi hücreleri arasında iletişimi sağlar ve kazanılmış bağışıklığın ana düzenleyicileridir. Sitokinler, kısa yarı ömre sahip küçük bir glikoprotein veya polipeptit yapıdadırlar. Bu geniş protein ailesinde interlökinler (IL), interferonlar (IFN), koloni uyarıcı faktörler (CMF), tümör nekroz faktör (TNF) ve transforme edici büyüme faktörü-β (TGF-β) gibi proteinler bulunmaktadır. Sitokinler, tümör mikroçevresindeki bağışıklık ve bağışıklık dışı hücreler arasındaki iletişimi kolaylaştırarak otokrin ve parakrin şekillerde işlev görür. Bazı sitokinler bağışıklık sisteminin hücrelerini ve yapılarını uyarırken, bazıları ise bağışıklık sistemini baskılamakla görevlidir (Baldo, 2014). Bu iletişim de kanser hücrelerinin büyümesini teşvik edebilir veya engelleyebilir (Hsu ve diğerleri, 2024). Antitümör sitokinlerinin

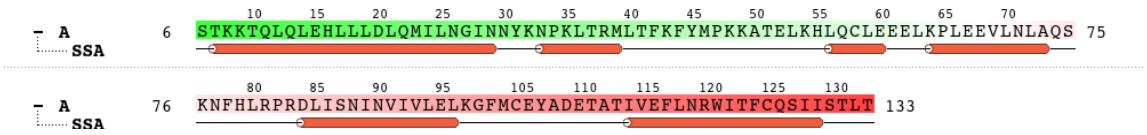
salımı, tümörlere karşı bağışıklık tepkisinin çeşitli yönlerine yardımcı olur. Bunlara tümör antijenlerinin sunumu, T hücrelerinin aktivasyonu ve hazırlanması, T hücrelerinin tümör bölgesine infiltrasyonu ve kanser hücresi ölümünün uyarılması dahildir. Bu süreçler toplu olarak hem doğuştan gelen hem de adaptif bağışıklık tepkilerini güçlendirir. Bu sayede, kanser hastalarının bağışıklık sistemini aktive etmeye yönelik sitokin tedavisi, önemli bir tedavi yöntemi olmuştur ve mevcut klinik kanser araştırmalarına önemli bir katkı sağlamaktadır. IFN-α, cerrahi sonrası yüksek riskli melanom hastalarının ve çeşitli dirençli malignitelerin adjuvan tedavisi için onaylanmıştır. Yüksek doz IL-2, metastatik renal hücre kanseri ve melanom tedavisi için onaylanmıştır. Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör, IFN gama, IL-7, IL-12 ve IL-21 klinik deneylerde değerlendirilmiştir ve bazı deneysel araştırmalara konu olmaktadır (Waldmann, 2018; Conlon ve diğerleri, 2019).

2.2.1. İnterlökin-2

İnterlökin-2 (IL-2), 1976-1983 yılları arasında keşfedilmiş, saflaştırılmış ve moleküler olarak karakterize edilmiştir. 133 aminoasitten oluşan bu küçük sitokinin molekül ağırlığı 15,5-16 kDa'dur ve yapısında 4 tane α-sarmal bulundurmaktadır (Boyman ve Arenas-Ramirez, 2019). İnsan IL-2'nin 3 boyutlu yapısı Şekil 2.1'de ve IL-2 yapısının dizisi ve ikincil yapıları Şekil 2.2 gösterilmektedir. İmmünoterapide kullanılan IL-2, metastatik melanoma ve böbrek kanserinde onaylanmış endikasyonu olan, akciğer metastazı ve immün yetmezlik tanılarında da kullanılan protein yapılı bir maddedir. IL-2, T hücrelerini ve doğal öldürücü (NK) hücrelerini stimüle eder ve interferon γ, granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) ve TNF-α gibi diğer sitokinlerin üretilmesini sağlar ve monosit-makrofaj gibi bağışıklık sistemindeki diğer hücrelerin aktivitesini uyarır (Nelson ve diğerleri, 2006).



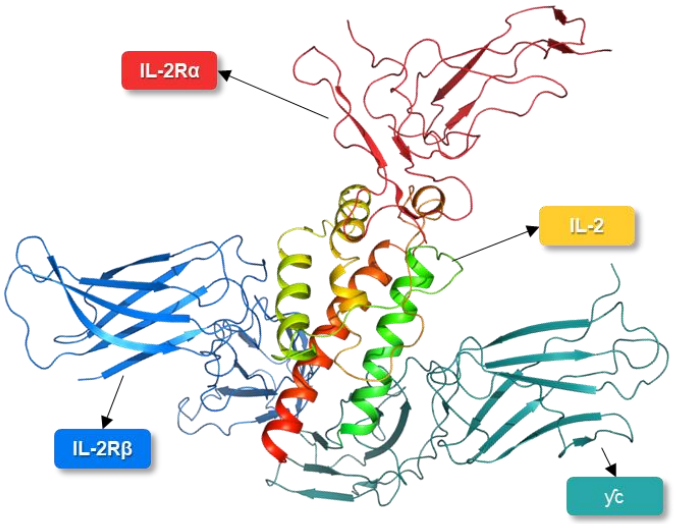
Şekil 2.1. İnsan IL-2'nin yapısı (PDB kodu: 1M47) (Arkin ve diğerleri, 2003).



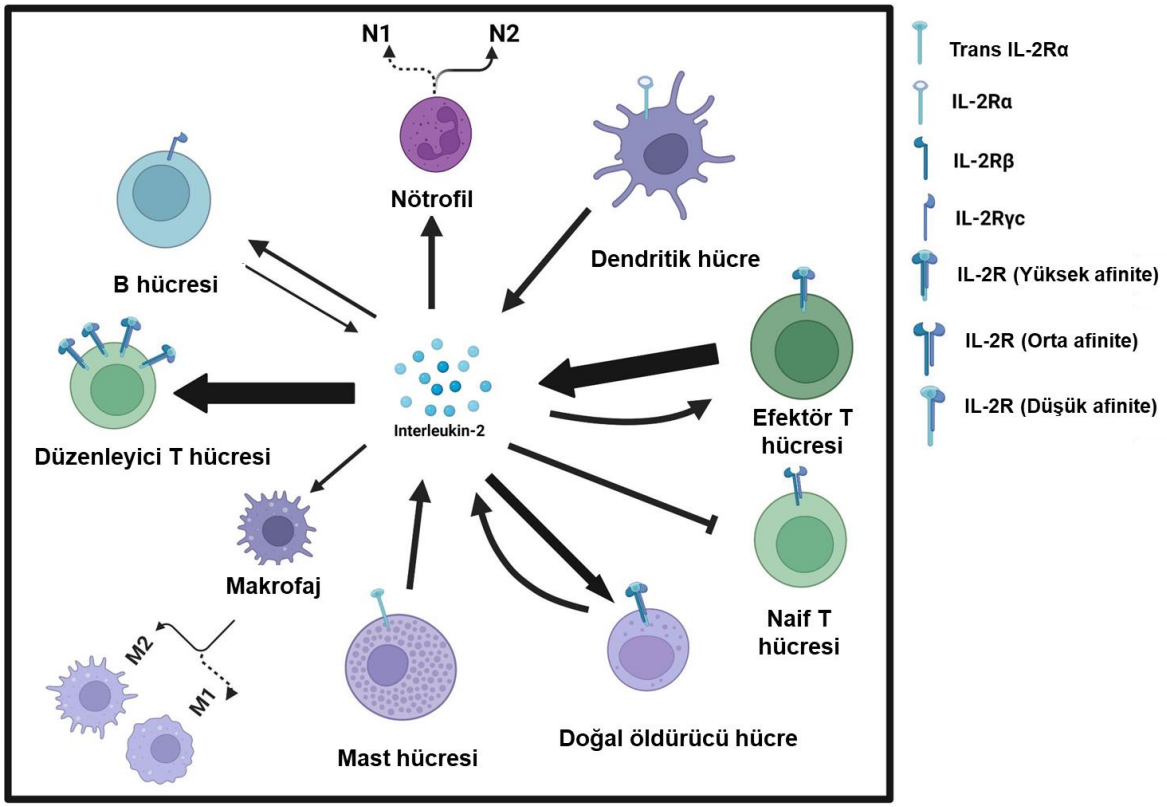
Şekil 2.2. IL-2 kristal yapısının ikincil yapısı iki boyutlu olarak gösterilmiştir (PDB kodu: 1M47). Kırmızı renk α-sarmalları göstermektedir.

IL-2, etkileştiği IL-2 reseptörü (IL-2R) aracılığıyla bağışık yanıtın oluşmasını sağlar. IL-2 reseptörü; IL-2Rα (CD25), IL-2Rβ (CD122) ve IL-2Rγ (CD132) olmak üzere üç alt birimden oluşur (Şekil 2.3 ve Şekil 2.4). αβγ trimerik kompleksi en yüksek afiniteli reseptörü oluşturur. IL-2Rα, IL-2'ye özgüdür ve T düzenleyici hücreler (Treg), aktive edilmiş CD4+ ve CD8+ T hücreleri, B hücreleri, olgun dentritik hücreler, endotel hücreleri ve benzerlerini içeren bir dizi bağışıklık hücresi tarafından eksprese edilmektedir. α zinciri, βγ zincirlerine kıyasla aşırı eksprese edilir (8-10 kat). α zincirinin, başlangıçta IL-2'yi bağlamak, onu hücre yüzeyine lokalize etmek, konsantrasyonunu etkili bir şekilde artırmak ve ayrıca IL-2'de daha sonra hücre yüzeyindeki βγ zincirlerine bağlanan konformasyonel bir değişikliği indüklemek için işlev gördüğü düşünülmektedir. Saf T hücrelerinde IL-2Rα ekspresyonu, T hücresi reseptörü (TCR) ve ortak uyarıcı sinyaller ve ardından pozitif bir IL-2/IL-2Rα geri besleme döngüsü tarafından hızla tetiklenebilir. Saf T hücreleri, NK hücreleri ve hafızanın aksine fenotip CD8+ hücreleri yüksek seviyelerde βγ eksprese eder ve bazı NK hücreleri de IL-2 tarafından uyarıldıktan sonra α zincirini eksprese edebilir. Bağışıklık tepkisini azaltmak için hareket eden Treg'lerin yapısal olarak yüksek

seviyelerde α zinciri eksprese ettiği dikkate alınmalıdır. Bu onların, düşük seviyede bile olsa efektör CD4+, CD8+ ve NK hücrelerinden daha verimli bir şekilde IL-2 tüketmelerini sağlamaktadır (Jiang, Zhou ve Ren, 2016).

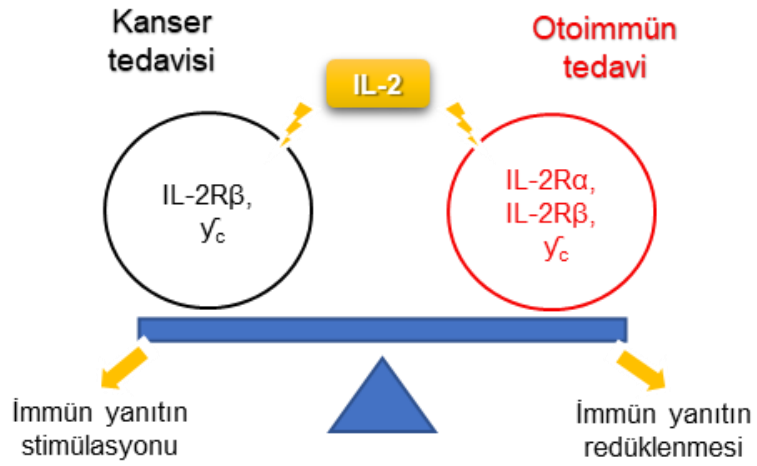


Şekil 2.3. IL-2'nin IL-2 reseptörleriyle etkileşimleri (IL-2R); IL-2Rα, IL-2Rβ, ve IL-2Rγc (PDB kodu: 2ERJ) (Stauber ve diğerleri, 2006).



Şekil 2.4. IL-2'nin sinyal yolağı (Muhammad, Fan, Hai, Gao ve He, 2023).

Ayrıca, IL-2 ile IL-2Rα arasında esnek bir bağlanma söz konusuyken, IL-2Rβ ve IL-2Rγc ile daha sıkı bir bağlanma gerçekleşmektedir. IL-2, IL-2Rα, IL-2Rβ ve IL-2Rγc'ye bağlandığında immün yanıt azalırken, yalnızca IL-2Rβ ve IL-2Rγc'ye bağlandığında immün yanıt artmaktadır (Levin ve diğerleri, 2012). Bu nedenle kanser tedavisinde IL-2Rβ, IL-2Rγc'ya bağlanırken IL-2Rα'ya bağlanmayan böbrek kanserinde etkili olabilecek IL-2 içeren formülasyonların geliştirilmesi hedeflenmektedir. Otoimmün hastalıkların tedavisinde ise tam tersi bir yaklaşım gözetilmektedir. Bahsi geçen bu yaklaşımlar Şekil 2.4'te özetlenmiştir.



Şekil 2.5. IL-2 farklı reseptör alt tiplerine bağlanarak farklı etkiler ortaya koymaktadır.

Piyasada metastatik melanoma ve böbrek kanserinde onaylanmış endikasyonuyla tek bir referans ürün bulunmaktadır. Aldeslökin, Proleukin®'in (Novartis) etkin maddesi olup antineoplastik biyolojik yanıt düzenleyici olarak piyasada bulunmakta ve insan IL-2 geni içeren bir *Escherichia coli* suşu kullanılarak rekombinant DNA teknolojisi ile üretilmektedir. Proleukin® liyofilize toz şeklindedir ve intravenöz infüzyon veya subkütan enjeksiyon yoluyla kullanılmaktadır ve hastanede uygulanır. Sulandırıldığında fiziksel ve kimyasal stabilitesi oda sıcaklığında 48 saattir. Enjeksiyon bölgesinde alerjik reaksiyon, ağrı ve iltihap çok yaygın görülen yan etkilerdir. IL-2 gibi peptit/protein yapılı ilaçlar için en önemli problemlerden biri zayıf oral biyoyararlanımları ve buna bağlı olarak parenteral yolun tercih edilmesidir. IL-2'nin yarılanma ömrü 7 dakikadır (Donahue ve Rosenberg, 1983) ve bu ilaçlar kısa biyolojik yarı ömre sahip olmaları nedeniyle enjeksiyonları sık sık tekrarlanmaktadır (Atkins, 2006; McHugh ve diğerleri, 2015). İlaç piyasasında Proleukin®'e alternatif bir başka ürün veya eşdeğeri bulunmamaktadır. Ülkemizde

124/37 ruhsat numaralı bu ürün 16.07.2019 tarihinde ise askıya alınmıştır (TİTCK, Ruhsatlı Ürünler Listesi- 01.07.2022). Ancak, dünya çapında IL-2'ye yönelik çalışmalar devam etmekte ve önde gelen şirketler IL-2 tedavisine önemli yatırımlar yapmaktadır. Bu çalışmalar aşağıda sunulmaktadır:

- Merck & Co., Pandion Therapeutics'i satın alarak IL-2 alanında yatırım yapmıştır ve yürütülen çalışmalarla otoimmün hastalıkların tedavisinde yeni tedavi seçenekleri geliştirmeyi amaçlamıştır. Pandion'un önde gelen tedavi adayı PT101, IL-2 muteiniyle tasarlanmış olup selektif olarak düzenleyici T hücrelerini (Treg) aktive etmeyi hedeflemektedir. PT101, ülseratif kolit ve diğer otoimmün hastalıkların tedavisinde potansiyel bir aday olarak görülmektedir. Faz 1a klinik denemeleri, ilacın güvenli ve tolere edilebilir olduğunu ortaya koymuştur (Lykhopiy, Malviya, Humblet-Baron ve Schlenner, 2023; Merck & Co., 2021).
- Nektar Therapeutics, IL-2 tedavisi alanında da önemli çalışmalar yapmaktadır. Bu çalışmalardan NKTR-214 (bempegaldesleukin) ve NKTR-358 (rezpegaldesleukin) gibi IL-2 yolak agonistleri üzerinedir. NKTR-214, kanser tedavisi için tasarlanmış bir IL-2 yolak agonistidir ve Nektar, bu bileşikle ilgili klinik ve preklinik verileri sunmuştur (Nektar Therapeutics, 2018). NKTR-358 ise, otoimmün hastalıkların tedavisi için geliştirilen bir başka IL-2 türevidir (Nektar Therapeutics, 2017).
- Sanofi, IL-2 tedavisi alanında SAR444245 adlı PEG-modifiye edilmiş bir IL-2 versiyonu üzerinde çalışmaktadır. Bu tedavi, T efektör hücreleri ve NK hücrelerinin selektif olarak genişlemesini hedeflemekte ve immünoterapötik olarak değerlendirilmektedir. Sanofi, bu tedaviyi Immunocore'un bispeptid proteiniyle kombinasyon halinde, ileri evre deri kanseri hastalarında değerlendirilmesine yönelik çalışmalar yürütmektedir (Immunocore, 2022; Sanofi, 2021).

Mevcut durumda IL-2, intravenöz infüzyon ve subkütan enjeksiyon yoluyla kullanılır. IL-2 gibi peptit/protein yapılı ilaçlar için en önemli problemlerden biri zayıf oral biyoyararlanımları ve buna bağlı olarak parenteral yolun tercih edilmesidir. Terapötik peptit/proteinler, biyolojik yapıları nedeniyle gastrointestinal kanaldaki proteazlar tarafından hızla metabolize olmaktadır. Bu durumu önlemek için oral enkapsüle

nanoformülasyonların tasarımı ve enzim inhibitörleri ile absorpsiyon artırıcıların ilavesi gibi çeşitli formülasyon yaklaşımlarının uygulanması söz konusudur.

2.2.2. Rekombinant DNA teknolojisiyle interlökin-2 üretimi

Rekombinant DNA teknolojisi üretilmesi istenen proteini kodlayan genin bir biyolojik sisteme yerleştirilmesiyle (*Escherichia coli*, memeli hücreleri (HEK 293) vb.) proteinin büyük miktarlarda üretilmesini mümkün kılar ve bu teknoloji protein üretimi açısından oldukça önemli bir stratejidir. *E. coli* kullanılarak protein üretilmesi kolay kültüre edilmesi, kısa yaşam döngüsü, genetiğinin iyi bilinmesi, genetik manipülasyonunun kolay olması ve yüksek verimle üretiminin sağlanması gibi nedenlerle tercih edilmektedir (Gopal ve Kumar, 2013). Onaylanmış rekombinant terapötik proteinlerin yaklaşık %30'unun *E. coli* ile kullanılarak üretildiği bilinmektedir (Huang, Ling ve Yang, 2012). Aldeslökin, rekombinant DNA teknolojisi ile insan IL-2 geninin *E. coli* suşuna aktarılmasıyla üretilmektedir.

2.2.3. İnterlökin-2'nin farmakokinetik ve farmakodinamik özellikleri

IL-2'nin farmakokinetik ve farmakodinamik özellikleri reseptörlerin tipi ve dağılımına bağlıdır. IL-2 reseptörlerinin afinitesi oldukça yüksektir, IL-2'nin çok düşük dozu ile bile bu reseptörler doygunluğa ulaşır. IL-2 küçük bir protein olduğu için kapiller endoteliyal hücreler arasından kolayca geçmektedir. İntravenöz bolus enjeksiyonundan sonra total ekstrasellüler bölgeye dağılır (15 L) (Smith, 2001).

IL-2, i.v. olarak enjekte edildiğinde iki kompartmanlı modele uymaktadır. Başlangıç hızlı dağılım fazını (α, yarı ömrü ~10 dk), yavaş eliminasyon fazı (β, yarı ömrü ~3 saat) takip eder. Yavaş eliminasyon böbreklerden oluşmaktadır. IL-2'nin yaklaşık 16 saat içinde tamamı vücuttan atılmaktadır. Karaciğerden metabolizasyon, IL-2'nin farmakokinetiğinde önemli bir rol oluşturmamaktadır. İnsanlarda ortalama atılma hızı 268 mL/dk'dır. IL-2 böbreklerden ve karaciğerden atılmaktadır. Yüksek doz IL-2 uygulaması ile aşırı yüksek dozda IL-2 uygulanması arasında farmakokinetik açıdan benzerlik bulunmaktadır. Ancak, renal klirens artmaktadır. Eğer, 3-5 gün tedavi aralığından fazla uygulama yapılırsa, serum IL-2 seviyelerinde ilerleyen bir artış oluşur. Bu artış, sistemik inflamasyona neden olabilmektedir, bu da yüksek

dozda ve sık aralıklarla alınan tedavi açısından sınırlayıcı bir faktör oluşturmaktadır (Anderson ve Sorenson, 1994; Skog ve diğerleri, 2001; Smith, 2001).

IL-2 subkütan (s.c.) olarak verildiğinde, serumda hemen görülmektedir. Verildikten sonra yarı ömrü yaklaşık olarak bir saattir. Emilim, lenfatik sistem tarafından olmaktadır. Atılım yarı ömrü, i.v verilişe benzerdir. IL-2 her 12-24 saatte s.c enjekte edildiğinde serumda sürekli olarak IL-2 saptanabilmektedir. Düşük dozda s.c enjekte edildiğinde, t_{maks} değeri 2-3 saat olmaktadır. Ayrıca düşük dozda uygulandığında, sistemik inflamasyon görülmemektedir (1,2 milyon IU/m^2). Ancak, 24 saat içinde enjeksiyon yapılan bölgede gecikmiş tipte hipersensitivite görülebilmektedir (Smith, 2001).

2.2.4. İnterlökin-2'nin tedavideki yeri ve güncel yaklaşımlar

Literatürdeki IL-2 içeren formülasyon geliştirme çalışmaları Çizelge 2.1.'de sunulmaktadır:

Çizelge 2.1. Literatürde bulunan IL-2 ile yapılmış formülasyon geliştirme ve güncel IL-2 çalışmaları

Formülasyon çalışması	Uygulama yolu	Elde edilen bulgular	Referans
Lipozom	İntravenöz	30-50 nm boyutunda DSPC:DSPG (10:1) kullanılarak IL-2 lipozomu hazırlanmıştır. Hazırlanan lipozomlar M5076 karaciğer metastazı oluşturulmuş sıçanlara i.v. olarak (300-10.000 JRU/gün) uygulanmıştır. IL-2 lipozomunun karaciğer metastazlarında kullanılabileceği belirtilmiş ve IL-2 lipozomunun etkinliği IL-2 çözeltisine kıyasla 8 kat yüksek bulunmuştur.	(Kanaoka ve diğerleri, 2001)
Polietilen glikol-polilaktid hidrojelleri	İntratümoral	Biyolojik olarak parçalanabilen polietilen glikol-polilaktid hidrojelleri hazırlanmış ve lenfoma olan farelere intratümoral olarak enjekte edilmiştir. IL-2'nin hidrojellerden 1-2 hafta boyunca salınmıştır ve ayrıca tümör büyüklüğünde azalma olmuştur.	(Hiemstra ve diğerleri, 2007)
Lipozom	İntrapulmoner	IL-2'nin pulmoner yoldan uygulanabilen kontrollü salım sağlayan lipozom formülasyonu geliştirilmiş ve etkinliği farmakokinetik, immünolojik ve histolojik yöntemlerle değerlendirilmiştir. Pulmoner IL-2 lipozomu, uzun süreli immün baskılama etkisi göstererek, sıçanlarda ilacın etkinliğini artırmış ve immün sistem hastalıklarında potansiyel kullanım sunmuştur.	(Çilek, 2008)
Nanoboyutlu lipozomal polimerik jel	İntravenöz/ Subkütan enjeksiyon	Tümör mikroçevresinin immünoinhibitör doğasını aşmak için, küçük hidrofobik moleküller ve suda çözünür sitokinleri taşıyan nanoboyutlu lipozomal polimerik jelleri geliştirilmiştir. TGF-β inhibitörü ve IL-2 salan nanoboyutlu lipozomal polimerik jellerin tümör büyümesini önemli ölçüde geciktirdiği belirtilmiştir. Tümör oluşturulan farelerin hayatta kalma oranını artırdığı ve doğal öldürücü hücrelerin ve tümör içi aktive edilmiş CD8(+) T hücresi aktivitesini artırdığı bulunmuştur.	(Park ve diğerleri, 2012)
Virüs benzeri partikül (VLP)	-	Seçici hedefleme sağlamak için fonksiyonelleştirilmiş virüs benzeri partiküller hazırlanmış ve IL-2 içeren bir yapı oluşturulmuştur. Partiküllerin boyutu 50 nm olup, kanser hücrelerini hedefleyebildiği, makrofajları uyararak tümör nekroz faktörü-α salgıladığı ve bu sayede akıllı bir nano biyomalzeme olarak potansiyel taşıdığı gösterilmiştir.	(Deo ve diğerleri, 2016)
Nanojel	-	Tümör mikroçevresine özgü biyomimetik nanojel geliştirilmiştir. Paklitaksel ve IL-2 ile kombine olarak hazırlanan nanojeller, paklitaksel için pH'ya duyarlı ve IL-2'nin biyoaktivitesini azaltmamak için nanosünger oluşturacak şekilde tasarlanmıştır. İyileştirilmiş ilaç penetrasyonu ve artan antitümör bağışıklığı ile antitümör aktivitesini önemli ölçüde artırdığı bulunmuştur.	(Song ve diğerleri, 2017)
Tümör Hedefli IL-2 Varyantı	-	Çalışmada mutant IL-2 üretilmiş ve bu moleküllerin CD25'e bağlanmazken IL-Rβγ bağlanma özelliklerini koruduğu gösterilmiştir. Bu sayede periferde ve tümör mikroçevresinde IL-2Rβγ aracılığıyla NK ve CD8+ efektör T hücrelerini aktive etme ve genişletme kapasitelerini korudukları gösterilmiştir.	(Klein ve diğerleri, 2013)

Çizelge 2.1. (devam) Literatürde bulunan IL-2 ile yapılmış formülasyon geliştirme ve güncel IL-2 çalışmaları

Nanopartikül	*Subkütan enjeksiyon*	Doksorubisin ve rekombinant insan IL-2'nin toksisitesini azaltmak ve antitümör terapötik etkilerini iyileştirmek için kombine sistemik birlikte iletimini etkili bir şekilde sağlayabilen hidrofilik katyonik polimer bazlı nanokompleksler geliştirilmiş ve yaklaşık 200 nm boyutlu pozitif yüklü (>20mV) küresel nanokompleksler elde edilmiştir. Serbest ilaçlarla karşılaştırıldığında, geliştirilen doksorubisin ve rekombinant insan IL-2 yüklü nanokomplekslerin tümör büyümesini önemli ölçüde geciktirdiği, serum immünoglobulin G seviyesini ve sitotoksik T lenfosit miktarını artırdığı bulunmuştur.	(Wu ve diğerleri, 2017)
Nanopleks	İntravenöz / Oral	Kolerektal kanser tedavisinde kemo-immünoterapi sağlamak amacıyla kemoterapötik bir ilaç olan 5-Fluorourasil ve immünoterapötik bir molekül olan IL-2 yüklü siklodekstrin nanopleks formülasyonları hazırlamışlardır. CD:IL-2 nanoplekslerinin partikül boyutu 100 nm'den küçüktür ve yükleme kapasitesi 5-FU için %40 ve IL-2 için %99,8 bulunmuştur. Yapılan hücre kültürü çalışmalarıyla güvenliliği ve çözelti formuna göre daha yüksek antikanser etkinlik gösterdiği saptanmıştır. Bağırsak geçirgenliği çalışmaları, CD nanoplekslerinin oral kemoterapi için de umut verici bir aday olacağını göstermektedir.	(Akkın ve diğerleri, 2022)
Pegile IL-2 (NKTR-214)	-	Bir ön ilaç olarak tasarlanan ve yapısında 6 salınabilir polietilen glikol (PEG) zinciri bulunan bu pegile edilmiş IL-2 (NKTR-214), pegilasyon nedeniyle vücutta daha uzun bir kalma süresine sahiptir. Organizmada PEG zincirlerini yavaşça serbest bırakarak aktif hale gelmektedir. Bu molekül, tümörün aldeslökin ile karşılaştırıldığında konjuge IL-2'ye daha fazla maruz kalmasını sağlamaktadır. NKTR-214 fare modelinde değerlendirilerek, endojen sitokin IL-2'nin immünolojik, farmakokinetik ve farmakolojik özelliklerinin stratejik polimer konjugasyonuyla önemli ölçüde değiştiği gösterilmiş ve çeşitli tümör tipleri için insanlarda daha fazla değerlendirilmesini destekleyerek, güçlü ve potansiyel olarak iyileştirici kanser immünoterapilerinde etkili olabileceği sonucuna varılmıştır.	(Charych ve diğerleri, 2016)
Biyo-üstün (Neo-2/15)	-	IL-2Rβγc'ye bağlanan ancak IL-2Rα'ya bağlanma bölgesi olmayan merkezi bağışıklık sitokini IL-2'nin taklitlerini tasarlamak amaçlanmıştır. Bu sayede protein taklitleri, protein bazlı terapötikler alanını dönüştürme potansiyeline sahip olur ve iyileştirilmiş terapötik özellikler sağlayarak yan etkileri azaltabilir (Biyo-üstün). Tasarımlar aşırı kararlı bulunmuştur, insan ve fare IL-2Rβγc'ye doğal sitokinlerden daha yüksek afiniteyle bağlanmaktadır ve IL-2Rα ve IL-15Rα'dan bağımsız olarak aşağı akış hücre sinyallemesini ortaya çıkarır. Optimize edilmiş tasarım neoleukin-2/15'in (Neo-2/15) kristal yapıları hem tek başına hem de IL-2Rβγc ile kompleks halinde, tasarlanan modele çok benzer bulunmuştur. Neo-2/15, melanom ve kolon kanseri fare modellerinde IL-2'den daha üstün terapötik aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca, azaltılmış toksisite ve tespit edilemeyen immünojeniteye sahip olduğu belirtilmiştir.	(Silva ve diğerleri, 2019)

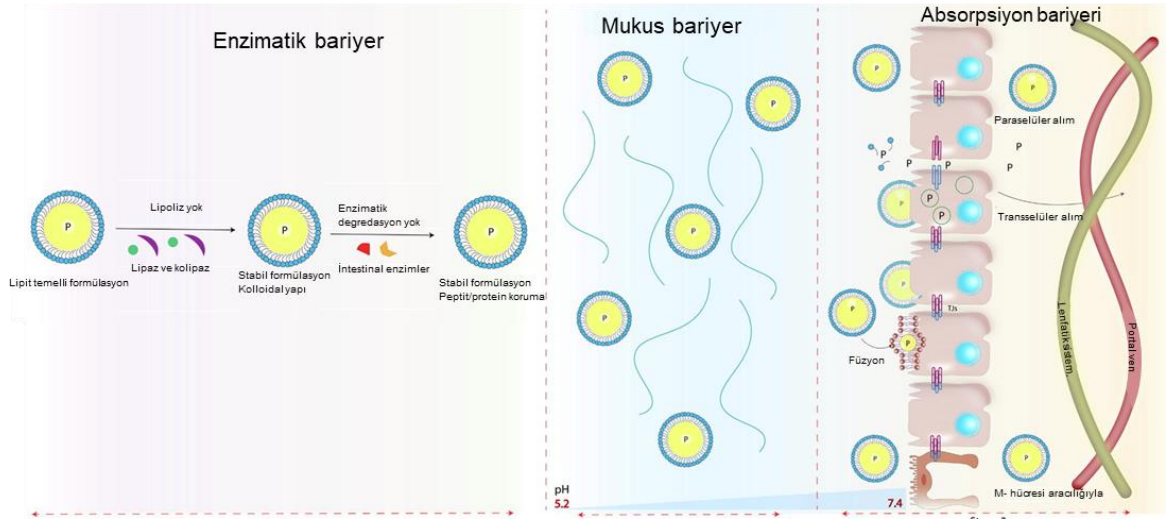
2.3. Lipit Temelli Formülasyonlar

Lipit temelli ilaç taşıyıcı sistemler (LTS), biyoyararlanımı düşük olan etkin maddelerin absorpsiyonunu artırmak ve farmasötik geliştirme sürecini optimize etmek gibi özellikleri nedeniyle oldukça ilgi gören sistemlerdir. Bu sistemler, hidrofobik yapıdaki etkin maddelerin çözünürlüğünü artırırken, biyolojik membranlar ile etkileşimlerini kolaylaştırarak terapötik etkinliği iyileştirir (Feeney ve diğerleri, 2016; Pouton, 2006; Shrestha, Bala ve Arora, 2014). Ayrıca lipitlerin biyolojik olarak parçalanabilir olması, biyouyumlu olmaları, etkin madde yükleme kapasitesinin yüksek olması, yüksek enkapsülasyon etkinliği sağlamaları, etkin maddenin salım profilinin ayarlanabilmesi, etkin maddenin degredasyona karşı korunabilmesi, artırılmış stabilite sağlayabilmeleri, üretimlerinde organik çözücülerin kullanılmaması, düşük sistemik toksisite ve düşük sitotoksisite göstermeleri ve büyük ölçekte üretilebilmeleri gibi avantajları bulunmaktadır (Attama, Momoh ve Builders, 2012; Chakraborty, Shukla, Mishra ve Singh, 2009; Mohsen, Azzazy, Allam ve Basalious, 2020).

Son yıllarda, LTS oral yoldan uygulanması planlanan terapötik peptitler ve proteinler için umut vadetmektedir. Bu sistemler, enzimatik, mukus ve epitel gibi çeşitli bariyerleri aşmayı ve sistemik dolaşıma ulaşmayı hedefler. Bu nedenle, lipit bazlı sistemler ilaçların biyoyararlanımını artırabilir ve peptitlerin ve proteinlerin etkinliğini korumak için koruyucu bir ortam sağlayabilir (Haddadzadegan, Dorkoosh ve Bernkop-Schnürch ve diğerleri, 2022).

LTS ortam bileşimini değiştirerek ilacın intestinal sıvıdaki çözünürlüğünü artırabildikleri gibi ilaç alımı, efluks ve enterositlerde gerçekleşen metabolizasyonu değiştirerek enterosit aracılı taşıma ve metabolizasyon süreçlerini de etkileyebilirler. Ayrıca ilacın dolaşıma geçişini intestinal lenfatik sistem olarak değiştirebilirler. Bu durum, ilk geçiş metabolizmasının etkilerini azaltırken ilaçların biyoyararlanımını artırmada önemli bir stratejidir (Gürsoy ve Çevik, 2011; Porter, Trevaskis ve Charman, 2007). Oral verilen formülasyonların çoğu portal ven ile sistemik dolaşıma geçmektedir. Ancak ekzojen olarak verilen lipit temelli sistemler enterositlerde bulunan CYP450 metabolizmasını azaltarak, Peyer plakları ile ilk geçiş etkisini elimine ederek ve bağırsak duvarından paraselüler ve transelüler yol ile emilimi

artırarak lenfatik sistem ile sistemik dolaşıma katılabilir (Patel, Lalani, Bardoliwala, Ghosh ve Misra, 2018; Yılmaz Usta, 2022). Şekil 2.6.'da oral peptit ve proteinlerin karşılaştığı bariyerler sunulmaktadır.



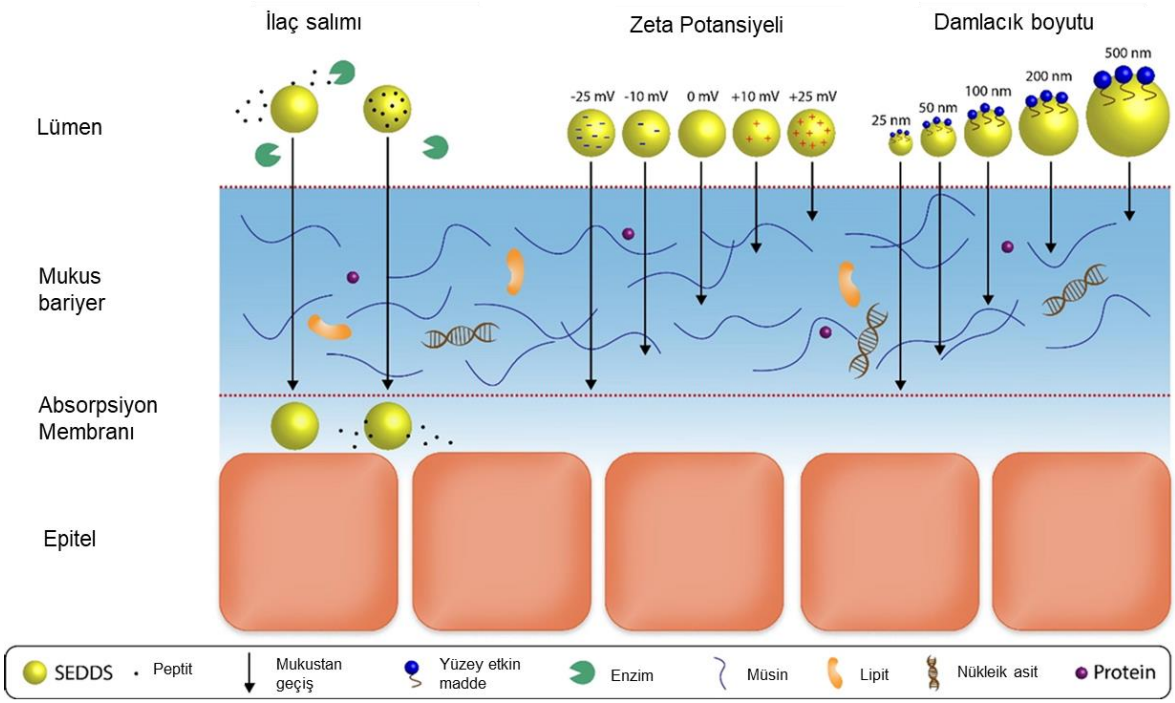
Şekil 2.6. Oral peptit ve proteinlerin karşılaştığı bariyerler (Haddadzadegan ve diğerleri, 2022).

Lipit temelli ilaç taşıyıcı sistemler arasında basit bir veya iki yardımcı maddeli lipit çözeltiler, kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistemler, kompleks mikro veya nano boyuta sahip kolloidler ve miseller sistemler de dahil olmak üzere farklı fiziksel yapıya sahip sistemler sayılabilmektedir (Kalepu, Manthina ve Padavala ve diğerleri, 2013; Müllertz, Ogbonna, Ren ve Rades, 2010). Çoğunlukla yağ, sürfaktan ve kosürfaktan karışımı halinde bulunmalarına rağmen bazen tek yardımcı maddeden de oluşabilirler (Kuentz, 2012).

Emülsiyonlar, mikro ve nanoemülsiyonlar, lipozomlar, kendiliğinden mikro ve nanoemülsifiye ilaç taşıyıcı sistemler ve katı lipit nanopartikülleri bu kapsamda örnek olarak verilebilir.

Lipit temelli ilaç taşıyıcı sistemlerin (Şekil 2.7'de örnek olarak kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistemler (SEDDS) verilmiştir) mukus geçirgenlik davranışı; peptit ve protein ilaçlarını bağırsak duvarındaki emilim membranına sağlam bir biçimde taşıyabilmek için lipit temelli nanotaşıyıcıların yükleriyle mukus jel tabakasına nüfuz etmesi gerekir; mukus negatif bir net yük sergilediğinden, negatif zeta potansiyeline sahip SEDDS, pozitif yüklü olanlardan daha fazla oranda mukus

jel tabakasına nüfuz edebilir. Ayrıca, lipit bazlı nanotaşıyıcılar ne kadar küçükse, yayılma kabiliyetleri de o kadar yüksektir. Mukus mikro yapısının gözenek boyutu 100-200 nm aralığındadır ve daha küçük boyuta sahip lipit bazlı nanotaşıyıcılar için geçiş daha kolaydır. Ancak daha büyük yapıların geçişi de mukus tabakasının sahip olduğu heterojen yapı dolayısıyla mümkündür (Haddadzadegan ve diğerleri, 2022).



Şekil 2.7. Mukus geçirgenlik davranışı (Haddadzadegan ve diğerleri, 2022).

2.3.1. Nanoemülsiyonlar

Nanoemülsiyonlar 10-1000 nm arasında damlacık boyutuna sahip emülsiyonlar olarak bilinmektedir. Nanoemülsiyon formülasyonları genellikle yağ fazı, su fazı ve yüzey aktif maddeden oluşmaktadır ve formülasyonda bulunan yüzey aktif maddelerin seçimi nanoemülsiyonun oluşması ve stabilitesi açısından önemli bir parametredir (Wilson, Li, Yang ve Zhao, 2022). Nanoemülsiyonlar genellikle güvenilir olarak kabul edilen (GRAS-Generally Recognised As Safe) yüzey aktif maddeler ile hazırlanabilmektedir. Yüzey aktif maddeler su ve yağ fazı arasında adsorbe olarak ara yüzey gerilimini azaltarak nanoemülsiyon oluşumunu sağlamaktadır (Mehrdadi, 2024). Nanoemülsiyonlar kinetik olarak kararlı ancak termodinamik olarak kararsız sistemlerdir. Dolayısıyla zamana bağlı olarak nanoemülsiyonlarda faz ayrımı görülebilmektedir.

Nanoemülsiyonların düşük çözünürlüğe sahip ilaçların çözünürlüğünü artırması, ilaçları hidroliz ve enzimatik bozulmadan koruması gibi avantajlara sahip olması bu sistemlerin ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılmasının önemli nedenlerindendir.

Nanoemülsiyonların Avantajları

- Nanoemülsiyonlar, içerdikleri küçük damlacık boyutları sayesinde, etkin maddelerin çözünürlüğünü artırabilir. Bu, özellikle suda çözünürlük sorunu olan ilaçların emilimini ve biyoyararlanımını önemli ölçüde iyileştirir.
- Nanoemülsiyonlar, küçük damlacık boyutları nedeniyle büyük bir yüzey alanı sunar. Bu, etkin maddelerin hızlı ve verimli bir şekilde difüzyonunu sağlar, böylece ilaçlar daha hızlı etkisini gösterir.
- Nanoemülsiyonlar, özellikle ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanıldığında, etkin maddelerin hedef bölgelere daha verimli bir şekilde iletilmesine yardımcı olabilir. Bu durum, tedavi etkinliğini artırabilir ve yan etkileri azaltabilir.
- Nanoemülsiyonlar, çok küçük damlacık boyutlarına sahip oldukları için, hücre zarlarından geçebilme yetenekleri artar. Bu özellik, özellikle biyolojik bariyerlerin aşılmasında ve ilaçların hedeflenen bölgelerde etkili olmasında önemli bir avantaj sağlar.
- Nanoemülsiyonlar genellikle biyolojik olarak uyumlu malzemelerle formüle edilir, bu da onları güvenli ve tolere edilebilir kılar. Ayrıca, düşük dozlarda bile etkin olabilirler, bu da tedavi sırasında daha az yan etki anlamına gelir.
- Nanoemülsiyonlar, sıvı formülasyonlarda kullanıldığında, daha kolay uygulanabilirler. Aynı zamanda oral, dermal ve parenteral olarak da uygulanabilmesi sözkonusudur (Niu, Conejos-Sánchez, Griffin, O'Driscoll, ve Alonso, 2016; Ujhelyi ve diğerleri, 2018; Wilson ve diğerleri, 2022).

Nanoemülsiyonların Dezavantajları

- Nanoemülasyonlar hazırlanırken damlacık boyutunun küçültülmesi için özel aletler ve işlemler gerekmektedir.
- Nanoemülsiyonlarda damlacık boyutunun çok küçük olmasından dolayı Ostwald olgunlaşması görülebilmektedir. Bu da nanoemülsiyonların stabilitesini etkilemektedir.
- Nanoemülsiyonların stabilitesi pH ve sıcaklık gibi çevre koşullarından kolaylıkla etkilenebilmektedir.

- Nanoemülsiyonların üretimi, özellikle yüksek enerjili yöntemler kullanıldığında, genellikle pahalıdır. Yüksek enerjili homojenizasyon, ultrasonikasyon gibi işlemler ekipman gereksinimi ve enerji tüketimi açısından maliyetli olabilir.
- Nanoemülsiyonlar genellikle yüksek miktarda su içerir, bu da bazı uygulamalar için istenmeyen bir durum olabilir. Ayrıca, su içeriği bazı ilaçların veya bileşenlerin stabilitesini etkileyebilir.
- Nanoemülsiyonların formülasyonu, doğru sürfaktan ve yardımcı bileşenlerin seçilmesini gerektirir. Bu bileşenlerin geçimsiz olması formülasyonun etkinliğini etkileyebilir.
- Özellikle su içeren nanoemülsiyonlar, uygun koruma sağlanmadığı takdirde mikrobiyolojik kontaminasyona eğilimli olabilir. Bu durum, ürünün güvenliğini ve kullanım ömrünü sınırlayabilir.
- Nanoemülsiyonlarda damlacık boyutunun doğru şekilde kontrol edilmesi önemlidir. Damlacık boyutunun fazla büyümesi veya heterojen olması, ürünün etkinliğini azaltabilir. Bu nedenle, üretim sırasında damlacık büyüklüğü dağılımının çok iyi kontrol edilmesi gerekir (Wilson ve diğerleri, 2022).

Nanoemülsiyonların üretimi

Nanoemülsiyonlar düşük ve yüksek enerji gerektiren yöntemlerle hazırlanabilmektedir. Her iki yöntemle de stabil nanoemülsiyonlar elde edilebilmektedir.

Yüksek enerji gerektiren emülsifikasyon yöntemlerinde yüksek basınçlı homojenizasyon, mikrofluidizasyon ve ultrasonikasyon yöntemleriyle nanoemülsiyon hazırlanabilmektedir. Faz değişim sıcaklığı ve emülsiyon dönüşüm noktası ise nanoemülsiyon hazırlanma yöntemlerinden düşük enerji gerektiren yöntemleri temsil etmektedir.

Yüksek enerji gerektiren teknolojilerde, homojen bir dağılım gösteren damlacıklar oluşturmak için yüksek mekanik kuvvet gerekmektedir.

Yüksek basınçlı homojenizasyon, kaba bir emülsiyon sistemine 100 MPa'dan fazla basınç uygulanmasıyla nanoemülsiyonların oluşturulduğu bir teknolojidir. Bu sistemde kaba emülsiyon damlacık boyutunun azaltılması için yüksek türbülans ve kayma gerilimi altında dar kanallardan geçirilerek akmaya zorlanır.

Mikroakışkanlaştırmada damlacık/partikül boyutu küçültmek için aynı anda hidrolik kesme, çarpma, aşınma, çarpma, yoğun türbülans ve kavitasyon kullanmaktadır. Cihaz, kaba emülsiyonu yüksek hızlara ulaştırarak etkileşim kazanına iletir ve emülsiyon damlacık boyutunu düşüren yüksek kayma kuvvetleri oluşturur. Bunun için çalışılacak kaba emülsiyonu, yüksek basınçlı bir yer değiştirme pompasının (500-50.000 psi) etkisi altında mikro kanallardan oluşan bir etkileşim odası boyunca mikrokanallar içinde zorlayarak akan kaba emülsiyonların çok yüksek hızda çarpışmaları sonucunda çok ince damlacıklara bölünerek nanoemülsiyonlar oluşturup sistemden çıkmasına neden olur. Çalışılan kaba emülsiyon, istenen boyut ve dağılım elde edilene kadar mikroakışkanlaştırıcıdan tekrar tekrar geçirilebilmektedir. İstenen damlacık boyutuna ve dağılıma sahip nanoemülsiyonlar, basınç ve geçiş sayısının değiştirilmesiyle elde edilebilmektedir (Tayeb ve Sainsbury, 2018; Wilson ve diğerleri, 2022). Özellikle peptit/protein yapılı etkin maddeler içeren ilaç taşıyıcı sistemler ile çalışırken sıcaklık önemli bir parametre olduğundan mikroakışkanlaştırıcıya sıcaklığı 20°C altında tutacak şekilde soğutma haznesi ve soğutma aparatı (cooling coil) modifikasyonu yapılabilmektedir.

Yapılan çalışmalarda, mikroakışkanlaştırıcıda 5000 psi ile 30.000 psi arası basınçlarda farklı homojenizasyon döngülerinde (1, 2, 3, 4, 5 veya daha fazla) su içinde yağ (yağ/su) veya yağ içinde su (su/yağ) nanoemülsiyon eldesi sağlanmıştır (Salvia-Trujillo, Rojas-Graü, Soliva-Fortuny ve Martín-Belloso, 2014; Trujillo-Cayado, Santos, Ramírez, Alfaro ve Muñoz, 2018). Burada, etkileşim kazanı Y veya Z tipi olabilmektedir. Z-tipi kazanda, hazırlanan kaba dispers sistemlerde partikül veya damlacıkların çarpışmasına ve kayma gerilimine yol açacak şekilde birkaç kez akış yönü değiştirilir. Y-tipi kazanda dispersiyon sistemin akışı, iki akış yönüne ayrılarak cepheden çarpışma sağlanır. İşleyiş mekanizmaları göz önüne alındığında Y-tipi kazan, nanoemülsiyon üretilmesinde daha az homojenizasyon döngüsü ve daha düşük basınçlarda daha homojen ve küçük damlacık büyüklüğü dağılımı oluşturduğundan üstünlük sağlamaktadır. Hazırlanan kaba emülsiyonlar Y ve Z-tipi

kazanların kombine kullanılması ile de nanoemülsiyon haline getirilebilir (Persson, Blute, Mira ve Gustafsson, 2014). Mikroakışkanlaştırma işleminin arkasından nanoemülsiyonlar olduğu gibi kullanılabilir veya uygun bir filtreden süzülebilir (Shi ve diğerleri, 2017). Nanoemülsiyonların üretilmesinde formülasyon parametreleri olan sulu faz, yağ fazı ve sürfaktan tip ve miktarının seçiminin yanı sıra basınç ve homojenizasyon döngüsü işlem parametrelerinin belirlenmesi ve optimize edilmesi oldukça önemlidir (Microfluidics, 2010).

Çoklu nanoemülsiyonlar

Çoklu nanoemülsiyonlar, birden fazla fazın (yağ ve su) bir araya gelerek kompleks yapılar oluşturduğu emülsiyon sistemleridir. Bu tür sistemler, genellikle su içinde yağ (su/yağ/su) veya yağ içinde su (yağ/su/yağ) yapılarına sahip olabilir. Çoklu nanoemülsiyonlar, içerdikleri mikro ve nanometre boyutlarındaki damlacıklar sayesinde, etkin madde taşıma kapasitesini artırırken, ilaçların kontrollü salımını sağlama potansiyeline sahiptir. Bu sistemlerde, dış faz genellikle su ve iç faz yağdır, ancak her iki fazda da aktif bileşenler bulunabilir. Çift katmanlı yapıları sayesinde, çoklu nanoemülsiyonlar, birden fazla etkin maddeyi aynı anda taşıyabilme özelliği gösterir. Bu yapılar, özellikle suda çözünmeyen ilaçların biyoyararlanımını artırmak ve gastrointestinal sistemde uzun süre dayanaklı kalmalarını sağlamak amacıyla kullanılır.

2.3.2. Kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistemler

Kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistemler (SEDDS), yağlar, sürfaktanlar, yardımcı çözücüler ve ilaç bileşenlerinden oluşan, su ile bir araya geldiklerinde kendiliğinden yağ/su mikroemülsiyonları oluşturabilen sistemlerdir. Bu sistemler, izotropik bir yapıya sahiptir ve termodinamik olarak kararlıdır. Vücut içinde, özellikle gastrointestinal sıvılar gibi sulandırıcı ortamlarda seyreltildiklerinde, hafif hareketlerle mikroemülsiyon damlacıkları meydana gelir.

SEDDS'ler, damlacık boyutlarına göre iki temel kategoriye ayrılmaktadır: 50-300 nm arasında damlacık boyutlarına sahip sistemler "kendiliğinden nano emülsifiye sistemler" (SNEDDS) olarak adlandırılırken, 50 nm'den küçük damlacık boyutlarına

sahip, şeffaf görünümlü sistemler "kendiliğinden mikro emülsifiye sistemler" (SMEDDS) olarak bilinir. Nano boyutlu emülsiyonlar için submikron emülsiyonlar, nano-emülsiyonlar veya miniemülsiyonlar gibi çeşitli terimler kullanılmasına rağmen, ortalama 50-300 nm boyutundaki kinetik olarak kararlı emülsiyonlar için "nanoemülsiyon" terimi yaygın olarak tercih edilmektedir.

SEDDS sistemleri, küçük damlacık boyutları ve gastrointestinal ortamda lipoliz sonucu oluşan karışık miseller aracılığıyla geniş bir yüzey alanı sağlar. Bu durum, ilacın difüzyon hızını artırırken, sürfaktan içeriği sayesinde mukozal geçirgenliği de destekler. Ayrıca, uzun zincirli yağların içeriği lenfatik emilimi teşvik ederek formülasyonun biyoyararlanımını artırır. Bu özellikler, çözünürlüğü düşük olan etkin maddelerin (BCS Sınıf II ve BCS Sınıf IV) formülasyonlarının geliştirilmesinde bu sistemlerin tercih edilmesini sağlar.

Lipofilik ilaçların oral biyoyararlanımını artırmak için kullanılan SEDDS formülasyonları, geniş yüzey alanı oluşturarak emilimi kolaylaştırma, karışmamış su tabakasını aşma, P-gp inhibisyonu sağlama ve ilk geçiş etkisini azaltma gibi avantajlar sunar. Ayrıca, bu sistemler birçok oral ilaç için uygun olup, birey içi ve bireyler arası değişkenliği en aza indirir, gıda etkisini azaltır ve termodinamik stabilite gösterir. Aynı zamanda yüksek ilaç yükleme kapasitesine sahiptir, üretim ve ölçek büyütme süreçlerini kolaylaştırır ve ilaçları enzimatik bozulmaya karşı koruyabilir (Sarpal, Pawar ve Bansal, 2010; Yılmaz-Usta, 2022).

SEDDS, peptit veya protein yapısındaki ilaçlar dahil olmak üzere çözünürlük ve biyoyararlanım problemlerine çözüm üretmek için etkili bir formülasyon seçeneği olarak sıkça kullanılmaktadır. Bu formülasyonların lenfatik sistem üzerindeki olumlu etkileri, uzun zincirli yağ asitlerinin lipoprotein sentezini ve buna bağlı olarak lenfatik emilimi artırmasıyla açıklanabilir. Ayrıca, lenfatik sistem yoluyla ilaç alımı, hepatik ilk geçiş etkisini azaltarak ilacın biyoyararlanımını daha da iyileştirmektedir.

Kendiliğinden emülsifiye çoklu nanoemülsiyonlar

Kendiliğinden emülsifiye çoklu nanoemülsiyonlar, hem su içinde yağ (su/yağ/su) hem de yağ içinde su (yağ/su/yağ) yapılarına sahip olabilen, dinamik ve karmaşık

sistemlerdir. Bu sistemler, yağ fazı, sürfaktan, yardımcı sürfaktan ve etkin maddelerden oluşur ve su ile temas ettiğinde kendiliğinden çoklu emülsiyonlar oluşturabilir. Nano boyutlu damlacıkların oluşturduğu bu emülsiyonlar, geniş yüzey alanı, yüksek biyoyararlanım ve kontrollü ilaç salımı gibi avantajlar sunar. Özellikle, lipofilik ve hidrofobik ilaçların aynı anda taşınmasını mümkün kılmaları, gastrointestinal ortamda stabil kalmaları ve bağırsak emilim süreçlerini iyileştirmeleri ile dikkat çekerler. Çoklu nanoemülsiyonlar, ilaç taşıyıcı sistem olarak hem terapötik etkinliği artırmak hem de hedefe yönelik ilaç iletimini sağlamak amacıyla farmasötik alanda oldukça fazla çalışılan sistemlerdir.

Kendiliğinden emülsifiye çoklu nanoemülsiyonların üretimi, genellikle iki ana yöntemle gerçekleştirilir: Düşük enerjili ve yüksek enerjili yöntemler. Düşük enerjili yöntemler, sıvı bileşenlerin bir araya getirilmesiyle, sürfaktan ve yardımcı bileşenlerin etkileşimleri sayesinde emülsiyonun kendiliğinden oluşmasına dayanır. Bu yöntemler arasında çözücü buharlaştırma ve ultrasonikasyon yer alır. Düşük enerji kullanarak emülsiyonun oluştuğu bu süreç, genellikle daha az ısı ve mekanik iş gerektirir, bu da sıcaklığa duyarlı bileşenlerin korunmasına yardımcı olur. Diğer taraftan, yüksek enerjili yöntemler, mekanik kuvvetler kullanarak, emülsiyon damlacıklarının boyutunu küçültmek amacıyla yüksek hızda karıştırma veya yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemlerini içermektedir. Bu yöntemler ile daha hızlı ve istenilen özelliklere sahip emülsiyonlar üretilebilir, ancak daha fazla enerji ve ekipman gerekmektedir. Yüksek enerjili yöntemler, nanoemülsiyonların daha stabil ve homojen olmasını sağlar.

Yüksek enerjili yöntemler, emülsiyonların damlacık boyutlarını küçültmek ve daha homojen bir dağılım sağlamak amacıyla mekanik kuvvetler kullanan tekniklerdir. Bu yöntemler, genellikle daha hızlı sonuçlar verir ve nanoemülsiyonların stabilitesini artırabilir. Yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi, yüksek basınç altında sıvıların çok ince damarlar veya nozul deliklerinden geçirilmesi ile emülsiyon damlacıklarının küçültülmesini sağlar. Yüksek hızda gerçekleşen bu işlem, damlacık boyutunu nanometre seviyelerine indirebilir ve nanoemülsiyonların homojenliğini artırabilir. Bu yöntem, genellikle sıvı formülasyonlar için kullanılır. Ultrasonikasyonda, yüksek frekansta ses dalgalarının sıvı bir ortamda yayılması ile oluşan mikro hava kabarcıklarının patlaması sonucu yüksek enerji açığa çıkar. Bu enerji, emülsiyon

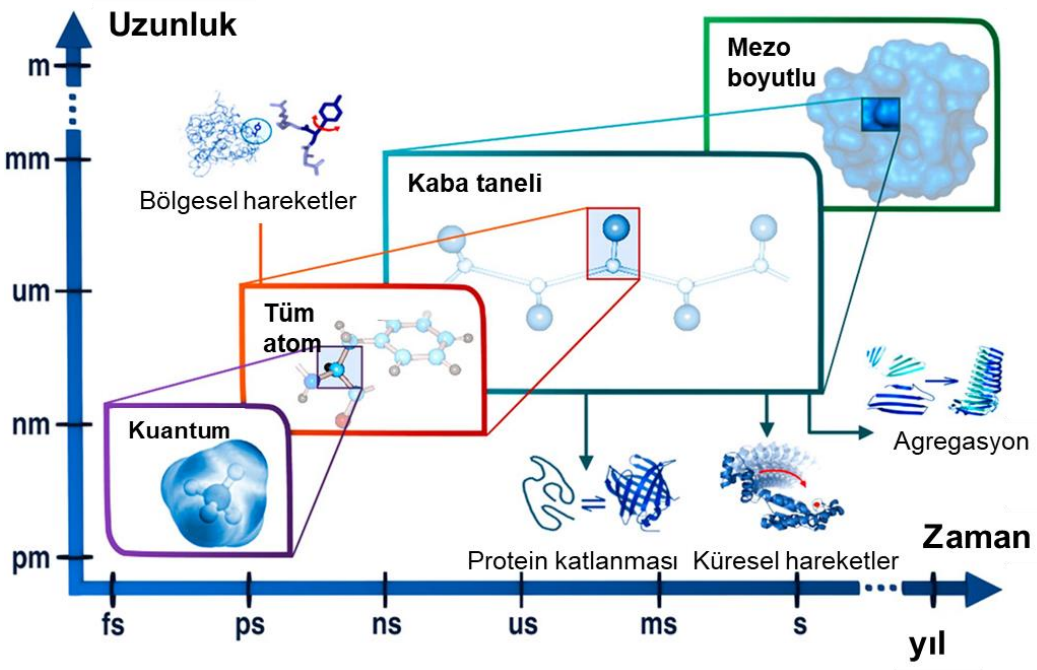
damlacıklarını kırar ve küçültür. Bu yöntem, özellikle mikroemülsiyon ve nanoemülsiyon üretiminde yaygın olarak kullanılır. İki aşamalı homojenizasyon işleminde, emülsiyon çok yüksek hızda karıştırılır veya pompalanarak yüksek hızda bir rotor-stator sisteminden geçirilir. Böylece, büyük damlacıklar parçalanarak küçük ve homojen boyutlu damlacıklar elde edilmesi sağlanır.

Yüksek enerjili yöntemler, genellikle daha hızlı ve etkili sonuçlar verirken, daha fazla enerji ve ekipman gerektirebilir. Bu nedenle, tercih edilen yöntem, üretim miktarına, maliyete ve hedeflenen ürünün özelliklerine bağlı olarak değişebilmektedir.

2.4. Moleküler Dinamik Simülasyonlar

Moleküler dinamik (MD) simülasyonları, atomların ve moleküllerin zamanla nasıl hareket ettiğini ve etkileştiğini inceleyen güçlü bir bilgisayar simülasyon yöntemidir. Milyonlarca atom içeren daha büyük sistemler için geçerli olan Newton'un fizik yasalarına göre atomların ve moleküllerin fiziksel hareketini taklit eder. MD simülasyonu, atomlar arasındaki etkileşimleri kuvvet alanlarıyla modelleyen moleküler mekaniğe dayanmaktadır (Arsiccio, Paladini, Pattarino ve Pisano, 2019; Chen ve diğerleri, 2019; Moghaddasi ve diğerleri, 2018). Moleküler dinamik, oluşturulan biyomoleküler simülasyon sistemlerinde zamana bağlı dinamik değişimleri sıcaklık, basınç, solvan, iyon gibi parametrelerin ve ortama eklenebilecek diğer bileşenlerin etkisinin simülasyon sistemlerinde üç boyutlu olarak görülmesini moleküler mekanik veya kuantum mekaniğine dayalı yaklaşımlarla sağlayan simülasyon tekniğidir (Ouyang ve Smith, 2015). İlaç moleküllerinin ve formülasyonlarının geliştirme süreci zahmetli, zaman alıcı ve yüksek maliyetlidir. Bu nedenle, deneysel çalışmalarda formülasyon geliştirmenin kolaylaştırılması, deney sayısını ve maliyeti bilimsel temellere dayandırarak azaltmak günümüzde giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Son zamanlarda bilgisayar teknolojileri, hesaplamalı kimya ve biyoloji teorileri ile moleküler modelleme yazılımlarına yönelik algoritmalarda hızlı ve önemli gelişmeler meydana gelmiştir. Doğrudan deney yoluyla ölçülmesi veya izlenmesi zor, maliyetli ve hatta pratik olmayan karmaşık sistemleri, moleküler düzeyde simülasyonlarla modelleyebilmek mümkün olmaktadır. Özellikle, biyoteknolojik ilaç formülasyonlarında bu amaçla moleküler modelleme tekniklerinden sıklıkla faydalanılmaktadır (Arsiccio ve diğerleri, 2019).

Oluşturulan sistemin simülasyon sonuçlarının kalitesi temel olarak verilen kuvvet alanlarına ve örnekleme yöntemlerine bağlıdır. Uygulanabilir zaman ölçeklerinin belirlemesi ve sistem boyutlarındaki farklılıklar nedeniyle farklı modeller kullanılabilmektedir (Şekil 2.8). Bu modeller; Kuantum mekanik, tüm atom (All-atom), kaba taneli (Coarse-grained) ve Monte Carlo MD simülasyonlarıdır (Kmiecik ve diğerleri, 2016; Chen ve diğerleri, 2019; Salo-Ahen ve diğerleri; 2020). Tüm atom MD'de klasik atomistik modellerde her atom bir boncuk olarak gösterilir ve aralarındaki kimyasal bağ bir bağlantı yayı olarak temsil edilebilir. Atomistik moleküler modeller için kuvvet alanları, moleküller içi ve moleküller arası etkileşimlerin nasıl hesaplanacağını tanımlar. Her biri farklı doğruluk ve hesaplama maliyeti seviyeleri sunar ve çeşitli durumlar için farklı avantajlar sağlamaktadır.



Şekil 2.8. Moleküler modelleme için uygulama aralıkları (Kmiecik ve diğerleri, 2016)

2.4.1. Moleküler dinamik simülasyonlarda kullanılan farklı modeller

All-atom simülasyonları

All-atom simülasyonlar, bir sistemdeki her bir atomun konumunu ve hareketini açıkça modelleyen simülasyonlardır. Bu tür simülasyonlar, yüksek çözünürlüklü

detaylı bilgi sağlar ve moleküller arasındaki atomik düzeydeki etkileşimleri tam olarak yakalayabilmektedir.

Bu tür simülasyonlar tüm atomları ayrı ayrı içerdiği için, moleküler yapıların en ince detaylarını bile yakalamaktadır. Atomların bireysel hareketleri ve aralarındaki etkileşimler detaylı bir şekilde incelenebilmektedir bu sayede yüksek çözünürlük sağlamaktadır. Ayrıca, atomik ve moleküler düzeyde yüksek doğruluk sağlar, bu da biyomoleküler dinamiklerin ve kimyasal süreçlerin ayrıntılı incelenmesi için idealdir. Ancak her bir atomun simüle edilmesi, sistemin boyutunu ve hesaplama maliyetini önemli ölçüde artırmaktadır. Bu nedenle, all-atom simülasyonları genellikle daha küçük sistemler veya kısa zaman dilimleri için uygun olmaktadır. Ayrıca atomlar arasındaki kuvvetleri modellemek için kapsamlı potansiyel fonksiyonlar (örneğin, Van der Waals, elektrostatik etkileşimler) kullanılmaktadır (Ouyang ve Smith, 2015).

Bu simülasyonlar, proteinlerin katlanması, fonksiyonları ve etkileşimlerinin incelenmesi, hücre zarlarının davranışlarının ve özelliklerinin anlaşılması, ilaç moleküllerinin hedef proteinlerle etkileşimlerinin detaylı olarak incelenmesi ve moleküller arası reaksiyon mekanizmalarının detaylı olarak çalışılması amacıyla kullanılmaktadır.

Coarse-grained simülasyonlar

Coarse-grained simülasyonlar, bir sistemin daha büyük ölçekli davranışlarını incelemek için atom gruplarını tek bir "bead" veya parçacık olarak temsil eden daha basitleştirilmiş simülasyonlardır. Bu yöntem, hesaplama maliyetini azaltmak ve daha büyük sistemlerin veya daha uzun zaman dilimlerinin simülasyonunu mümkün kılmak amacıyla kullanılmaktadır (Ouyang ve Smith, 2015).

Coarse-grained simülasyonlar, atomik detayları kaybeder ancak sistemin genel davranışını ve büyük ölçekli özelliklerini yakalamaktadır. Bu da daha uzun süreler ve daha büyük sistemler için simülasyon yapmayı sağlamaktadır. Atom gruplarının tek bir parçacık olarak temsil edilmesi, simülasyonun hesaplama yükünü de önemli ölçüde azaltmaktadır. Bu simülasyonlar, all atom simülasyonlara kıyasla çok daha

hızlıdır, bu da geniş zaman ölçeklerinde ve büyük sistemlerde etkili olmasını sağlayabilir.

Genellikle büyük biyolojik komplekslerin (örneğin, ribozomlar ve virüsler) genel dinamiklerinin incelenmesi, polimer sistemlerin geniş ölçekli davranışlarının modellenmesi, hücre zarlarının ve lipit yapıların daha büyük ölçekte incelenmesi ve biyomoleküler süreçlerin (örneğin, protein agregasyonu) uzun zaman dilimlerinde incelenmesi amacıyla kullanılmaktadır.

Monte Carlo simülasyonları

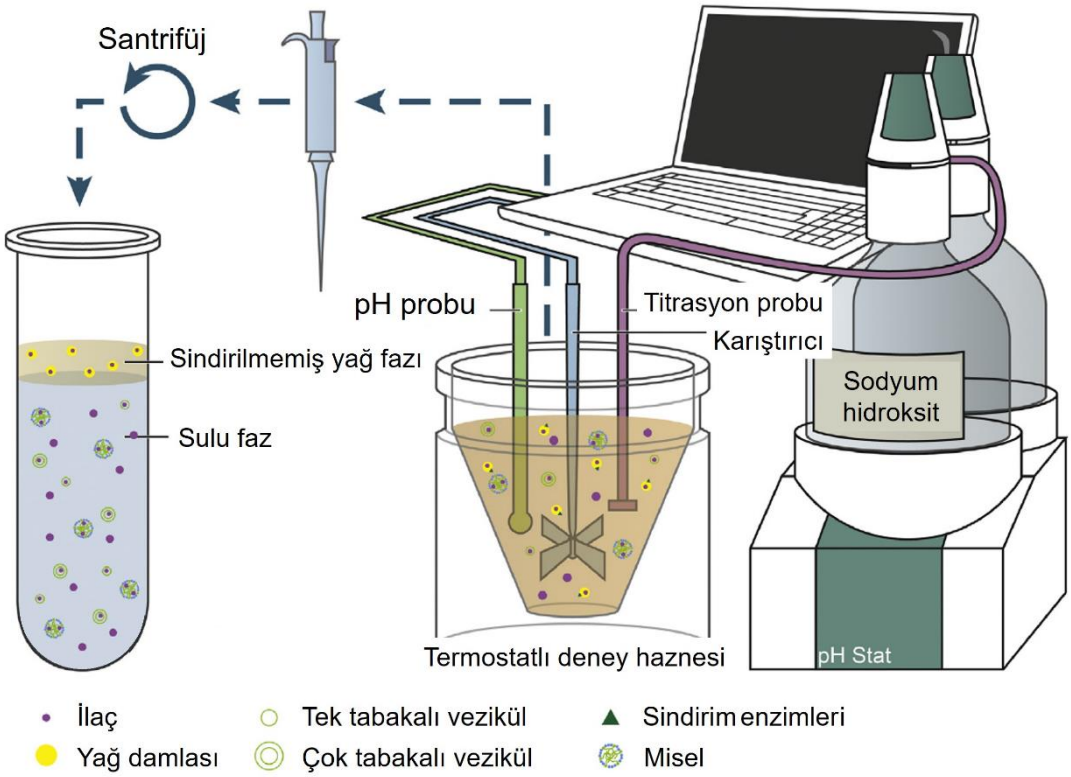
Monte Carlo simülasyonları, olasılıksal problemleri çözmek ve sistemlerin davranışlarını anlamak için rastgele örnekleme tekniklerini kullanan güçlü bir hesaplama yöntemidir. Bu yöntem, fizik, mühendislik, ekonomi ve daha birçok alanda geniş bir uygulama yelpazesine sahiptir.

Rastgele örnekleme ile Monte Carlo yöntemleri, çözülmek istenen problemle ilgili rastgele örnekler oluşturur. Bu örnekler, sistemin olası durumlarını veya giriş değişkenlerini temsil eder. Bu rastgele örneklerden elde edilen sonuçlar, istatistiksel yöntemler kullanılarak analiz edilir. Bu, sistemin genel davranışını veya problemin çözümünü tahmin etmek için kullanılır. Sonuçların güvenilir olması için genellikle çok sayıda rastgele örnekleme veya simülasyon gerekmektedir. Örnekleme sayısı arttıkça, sonuçların doğruluğu ve güvenilirliği de artacaktır.

Özetle; all -atom simülasyonları, yüksek doğruluk ve detay gerektiren çalışmalar için uygundur, ancak daha yüksek hesaplama maliyeti vardır. Coarse-grained simülasyonlar, daha düşük çözünürlük sunar, ancak daha büyük sistemler veya daha uzun zaman dilimlerinde etkili bir şekilde çalışabilmektedir. Monte Carlo simülasyonlar ise belirsizlik ve rastgelelik içeren problemlerin analizi için güçlüdür. Olasılıksal süreçlerin modellenmesinde esneklik sağlar, ancak zaman bağımlı dinamikleri doğrudan modelleyememektedir. Bu simülasyon türleri, belirli araştırma ihtiyaçlarına ve hesaplama kaynaklarına bağlı olarak birbirlerini tamamlayıcı araçlar olarak kullanılabilmektedir.

2.5. İn Vitro Sindirim

Peptit ve protein yapısındaki ilaçlar için oral verilişe uygun ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmesindeki en büyük zorluklardan biri peptitlerin gastrointestinal sindirime karşı yüksek duyarlılığa sahip olmasıdır. IL-2 gibi peptitlerin stabilitelerini korumak ve proteazlar tarafında parçalanmasını önlemek amacıyla su/yağ/su tipi emülsiyonlar kullanılan taşıyıcı sistemlerden biridir. Bu LTS'in peptit yapılı ilaçlar için uygunluğunu formülasyon geliştirme çalışmalarının erken aşamasında göstermek önemlidir. Bu amaçla, incelenen gastrointestinal bölme sayısı veya ortamı içeren in vitro sindirim modelleri geliştirilmiştir. Bu modeller pH-stat modeli, yüksek verimli lipoliz modeli, dinamik gastrik model ve TNO gastrointestinal model olmak üzere temelde dörde ayrılmaktadır (Timur, 2024). Bu modeller, LTS'in karakterizasyonu için in vivo koşulları daha yakında simüle etmek için tasarlanmıştır. LTS'leri karakterize etmek için en yaygın kullanılan in vitro sindirim yöntemi pH-stat yöntemidir (Şekil 2.9). Bu yöntemde sindirim ortamının pH'ı, LTS'in sindirimi nedeniyle oluşan serbest yağ asitlerini nötralize etmek için sodyum hidroksit eklenerek deney boyunca sabit pH'da tutulur. Harcanan sodyum hidroksit miktarından hareketle LTS'nin sindirim oranı hesaplanır (Williams ve diğerleri, 2012). pH-stat modelin ortam koşulları ve ortamın temel bileşenleri olarak sindirim enzimleri, safra tuzları, fosfolipitler, kalsiyum ve ortam pH'ı sayılabilir (Larsen, Sassene ve Müllertz, 2011).



Şekil 2.9. pH-stat lipoliz modeli (Berthelsen ve diğerleri, 2019)

Lipazlar, trigliseritlerin digliseritlere, monogliseritlere, serbest yağ asitlerine ve gliserole hidrolizini katalize eden enzimlerdir. Mikrobiyal, bitki ve hayvanlar alemindeki çoğu mikroorganizmada bulunabilir (Aloulou ve diğerleri, 2006). Yakın zamanda saflaştırılmış sıvı lipazlar, enzim denatürasyonunu önlemek için bir stabilizatör ve mikrobiyal üremeyi engellemek için koruyucu içeren sulu çözelti halinde ticari olarak temin edilebilir hale gelmiştir. Ayrıca immobilize lipazlar da ticari olarak bulunmaktadır. Bu lipaz enzimleri, enzimi daha stabil hale getirme ve sindirimi durdurmak için lipaz inhibitörleri eklemeye gerek kalmadan ortamdan örnek almayı kolaylaştırma avantajına sahiptir. Bir taşıyıcı üzerinde aktive edilmiş formda fiziksel veya kimyasal olarak bağlanmıştır (Phan ve diğerleri, 2015). Bu amaçla in vitro sindirim çalışmalarında kullanılan lipazlar Çizelge 2.2'de sunulmuştur.

Çizelge 2.2. Sindirim deneylerinde kullanılan ticari lipazlar (Ejskjær ve diğerleri, 2024)

Lipaz	**Kaynak**	**Tür**	**Etki yeri**
Domuz pankreatini	Domuz	Sıvı ekstre	Sn-1,3
Novozym® 435	*Candida Antarctica* B	İmmobilize	-
Lipozyme® RM	*Rhizomucor Miehei*	İmmobilize	Sn-1,3
Lipozyme® CALB L	*Candida Antarctica* B	Sıvı	-
Palatase® 20000 L	*Rhizomucor Miehei*	Sıvı	Sn-1,3
Lipozyme® TL 100 L	*Thermomyces Lanuginosus*	Sıvı	Sn-1,3
NovoCor® AD L	*Candida Antarctica* A	Sıvı	-

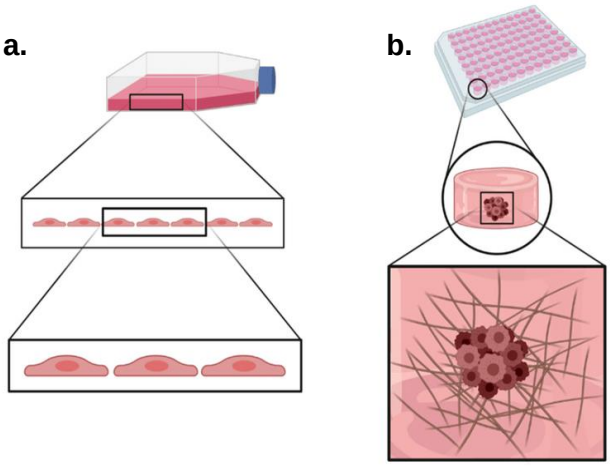
2.6. Hücre kültürü

Hücre kültürü, hücrelerin bir doku (hayvan veya bitki) veya organdan izole edilerek in vitro koşullarda üretilmesi ve fizyolojilerinin izin verdiği ölçüde devamlılıklarının sağlanmasıdır. Hücreler bahsi geçen kaynaklardan enzimatik veya mekanik yöntemlerle ayrılarak elde edilir ve in vitro kültüre hazır hale getirilir. Hücre kültürü, biyomedikal araştırmalarda sıklıkla kullanılan bir araçtır ve kanser araştırmaları için de önemli bir yere sahiptir. Bu sistemlerin, hücreler üzerindeki etkinin doğrudan doğruya gözlenmesi, kimyasal maddelerin etkilerinin her cins doku veya hücrelerde ayrı ayrı araştırılabilmesi, organizmadaki karşılıklı etkileşimler nedeniyle yapılamayan araştırmaların in vitroda yapılabilmesi, istatistik olarak hayvan deneyleriyle karşılaştırılamayacak kadar fazla hücre kullanılabilmesi, çok sayıda hayvanın sakrifiye edilmesinin önlenmesi ve hayvan deneylerine kıyasla daha ekonomik olması gibi avantajları vardır. Kimyasal maddelerin davranışlar üzerine olan karmaşık etkilerinin incelenememesi, hücreleri uzun süre dondurmanın biyokimyasal ve genetik değişikliklere sebep olabilmesi, normal dokulardan elde edilen hücre soylarının yavaş yavaş çoğalma potansiyellerini kaybedebilmesi, in vivo koşullarında sahip oldukları ekstraselüler matriks etkileşimlerinin ve bazal lamina bileşenlerinin yoksunluğu, tamamlanmamış farklılaşmaya sebep olduğundan tam morfolojilerini sergileyememeleri ise dezavantajları arasında sayılabilmektedir.

Bunlar göz önüne alındığında özellikle kanser araştırmalarında 3 boyutlu (3B) hücre kültürü teknolojileri, geleneksel 2 boyutlu (2B) hücre kültürlerine göre hücrelerin daha doğal bir ortamda büyümesini ve etkileşime girmesini sağlayabildiği için önem kazanmaktadır (Jensen ve Teng, 2020; Fitzgerald ve Weiner, 2020). Şekil 2.10'da 2B ve 3B hücre kültürü modelleri sunulmaktadır.

Hücre kültürü çalışmaları kanser hücrelerinin büyüme, farklılaşma, metastaz ve ilaç direnci gibi davranışları incelemek ve belirli kanser türlerinin biyolojik özelliklerini ve nasıl yayıldığını anlayabilmek için kullanılmaktadır. Ayrıca, yeni kanser ilaçlarının etkinliğini ve toksisitesini test etmek için de kullanılmaktadır. İlaçların hücre içi hedeflerine nasıl ulaştığını ve hücre üzerinde nasıl etki ettiğini anlamak için ideal modellerdir.

Kanserin genetik ve epigenetik değişikliklerini, kanserin moleküler patolojisini ve hücresel sinyal yolaklarını incelemek için de hücre kültürü çalışmaları yapılmaktadır.



Şekil 2.10. 2B ve 3B hücre kültürü: **a.** 2B geleneksel hücre kültüründe hücreler düz yüzeye tutunma eğilimindedir. **b.** 3B hücre kültüründe hücreler in vivoya benzer bir mikro ortamda bulunur (Saydé ve diğerleri, 2021).

2B hücre kültürü ve sınırlamaları

Geleneksel 2B hücre kültürü, biyofiziksel ve biyokimyasal uyarımları ve buna karşı hücresel tepkileri incelemek için model olarak yıllardır kullanılmaktadır. Yöntem, elde edilen bulgular sayesinde hücre davranışı anlayışımızı önemli ölçüde geliştirmiştir. 2B hücre kültürü, hücrelere mekanik destek sağlamak için cam veya polistiren petri kabına gibi düz bir yüzeye yapışmaya dayanır ve böylece hücreler tek bir düzlem üzerinde büyütülmektedir. 2B tabakalardaki hücre büyümesi, benzer

miktarda besine ve besi yerinde bulunan büyüme faktörlerine erişim izni verir, bu da homojen büyüme ve çoğalma sağlayabilmektedir. Bu yöntem, hücrelerin büyümesinin yanısıra araştırma kolaylığı açısından da avantajlıdır. Ancak, tümör mikroçevresi 3 boyutlu olduğundan 2B hücre kültürlerinin sınırlı hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimleri doğal ortamı yansıtamamaktadır. Hücrelerin farklılaşma ve büyüme paternleri, 2B kültürlerde normalden farklı olabilmektedir.

3B hücre kültürü

3B hücre kültürü, hücrelerin doğal in vivo ortamlarına daha yakın koşullarda büyümesini sağlamaktadır. Bu yöntem, kanser araştırmalarında birçok avantaja sahiptir. Hücreler 3B ortamda, doğal tümör mikroçevresini daha iyi taklit edebilmektedir. Hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimleri, tümörlerin davranışlarını ve ilaçlara yanıtlarını daha doğru yansıtmaktadır. Ayrıca hücrelerin oksijen, besin ve metabolik ürünler gibi faktörlere daha doğru bir şekilde maruz kalmasını sağlar. Hücrelerin doğal tümör yapısını ve heterojenliğini daha iyi korumaktadır ve hücrelerin morfolojisi ve büyüme paternleri bu ortamlarda fizyolojik olarak daha iyi temsil edilmektedir. Bu sayede, bu yöntemle daha güvenilir ilaç tarama ve etkinlik değerlendirmesi sağlanmaktadır (Jensen ve Teng, 2020).

Sonuç olarak, 3B hücre kültürü teknikleri, kanser araştırmalarında hücrelerin doğal ortamlarında nasıl davrandıklarını ve tedavilere nasıl yanıt verdiklerini anlamak için vazgeçilmezdir. Bu teknolojiler, daha etkili tedavi stratejileri geliştirilmesine ve kanserin biyolojisinin daha derinlemesine anlaşılmasına olanak tanımaktadır. Her modelin kendine göre avantaj ve dezavantajları vardır ve bu model de tüm uygulamalar için uygun değildir (Koçancı ve Aslım, 2019; Polat, 2020).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Akrilamid/Bisakrilamid (%30)	Sigma Aldrich, ABD
Amonyum persülfat	Sigma Aldrich, ABD
Aprotinin	Sigma Aldrich, ABD
Bromofenol mavisi	Sigma Aldrich, ABD
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Merck, Almanya
Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4)	Merck, Almanya
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco, ABD
Etanol	Sigma Aldrich, Almanya
Forbol 12-miristat 13-asetat (PMA)	Cayman, ABD
Glasiyel asetik asit	Sigma Aldrich, ABD
Gliserol	Isolab, Almanya
Glisin	Sigma Aldrich, Amerika
İzopropil alkol	Merck, Almanya
Hidroklorik asit (HCl)	Merck, Almanya
Kalsiyum klorür dihidrat	Sigma Aldrich, ABD
Kolliphor® EL	Sigma-Aldrich, Almanya
Kristal viyole	Sigma-Aldrich, Çin
Labrafac Lipophile® WL1349	Gattefosé, Fransa
Laktat Dehidrogenaz (LDH) test kiti	BioVision, İngiltere
Matrigel® Matrix	Corning, ABD
Metanol	Merck, Almanya
Nil kırmızısı	Sigma-Aldrich, Almanya
Oleik asit	Zag kimya, Türkiye
Pankreatin	Sigma Aldrich, ABD
Poligliserol polirisinolat	Smart Kimya, Türkiye
Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4)	Merck, Almanya
Potasyum fosfat monobazik	Merck, Almanya
Propilen glikol	Sigma Aldrich, ABD

Rekombinant insan interlökin-2	Elabscience®, Çin
RPMI-1640	Gibco, ABD
SIF® Powder	Biorelevant, İngiltere
Slide-A-Lyzer ™ Diyaliz kasedi 20 K MWCO	Thermo Scientific™, ABD
Sodyum dodesil sülfat	Isolab, Almanya
Sodyum fosfat dibazik	Merck, Almanya
Sodyum fosfat monobazik dihidrat	Merck, Almanya
Sodyum hidroksit	Merck, Almanya
Sodyum klorür	Merck, Almanya
Spectra/Por® Biotech CE Diyaliz MWCO 20K	Spectrum, Yeni Zelanda
Teksoll	Tekkim, Türkiye
Tetrametiletilnediamin (TEMED)	Sigma Aldrich, ABD
Transwell® insert (5 µm)	Corning, ABD
Tris base	Sigma Aldrich, ABD
Tween® 80	Merck, Almanya
Triton X- 100	BioShop, Kanada
WST-1	Roche, Almanya

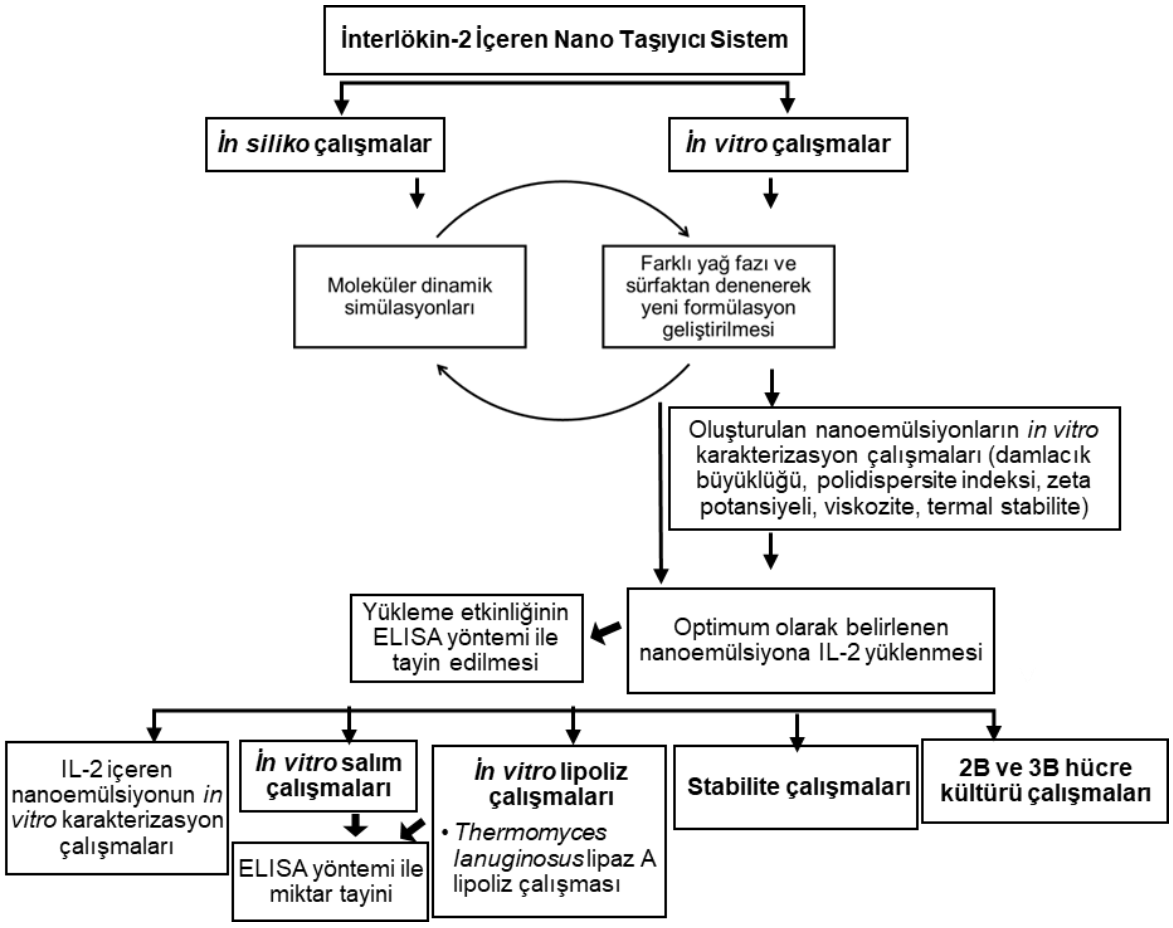
3.1.2. Kullanılan araç, gereç ve cihazlar

0,22 µm naylon filtre	Sartorius, Almanya
0,45 µm naylon filtre	Sartorius, Almanya
Alüminyum pan	Shimadzu, Japonya
Alüminyum sıvı pan	Shimadzu, Japonya
Çözünme hızı cihazı	Agilent 708-DS, ABD
Damlacık büyüklüğü ölçüm cihazı	Malvern Zetasizer, İngiltere
Diferansiyal taramalı kalorimetre	DSC 60, Shimadzu, Japonya
Dijital terazi	Shimadzu, Japonya
Distile su cihazı	Nüve NS112, İngiltere
Elektroforez güç kaynağı	Biorad, ABD
Eppendorf tüp	Isolab, Almanya
FT-IR Spektrofotometre	Perkin Elmer Spectrum, FT-NIR
Hassas terazi	Phoenix Instrument, Almanya

Hücre kültürü flaskı (75 ve 25 cm^2)	Corning, ABD
Hücre sayıcı	Biorad, ABD
Işık mikroskobu	Leica DM6B, Almanya
İnsan interlökin-2 ELISA kit	Elabscience®, Çin
İnsülin enjektörü	Beybi, Çin
İklimlendirme dolabı	TK252, Nüve, Türkiye
Kuyucuklu hücre kültürü plakası(12 ve 96'lı)	Nest, Çin
Lipoliz cihazı	Metrohm 902 Titrando, İsviçre
Manyetik karıştırıcı	Thermo Scientific, Almanya
Manyetik karıştırıcı	Four E's Scientific, Çin
Mikroakışkanlaştırma cihazı	Microfluidics®, ABD
Mikroplaka okuyucu (SpectraMax i3x)	Molecular Devices, ABD
Mikroplaka okuyucu (SpectraMax iD3)	Molecular Devices, ABD
Mikroplaka inkübatörü	Hangzhou Ruicheng Ins., Çin
Otomatik pipet	Eppendorf, Almanya
pHmetre	Ohaus, ABD
Santrifüj (Allegra X-30)	Beckman Coulter, ABD
Sert jelatin kapsül (00el)	Capsugel®, Belçika
Sirküler dikroizm (Jasco J-815)	Jasco, Japonya
Su banyosu	Nüve, Türkiye
TEM	FEI Tecnai G2 Spirit, ABD
Ultrasonik banyo	Bandelin, Almanya
Ultra-Turrax	IKA, Almanya
Viskozimetre	Brookfield DV III+, ABD
Viskozimetre (MicroVISC™)	Rheo Sense, ABD
Vorteks	Firlabo, Fransa
Zeta potansiyeli ölçüm küveti	Malvern, İngiltere

3.2. Yöntem

Tez kapsamında yapılan çalışmalar in siliko, in vitro ve hücre kültürü çalışmaları olmak üzere üç ana bölüme ayrılmıştır. IL-2'nin fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi, IL-2 içeren oral yolla uygulanabilecek en uygun enzim inhibitörünü içeren nanoemülsiyon formülasyonunun geliştirilmesi için MD simülasyonuna dayalı in siliko formülasyon geliştirilmesi, formülasyonların karakterizasyon çalışmaları, in vitro salım, in vitro lipoliz ve hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalar Şekil 3.1'de gösterildiği gibi özetlenmiştir.



Şekil 3.1. Tez kapsamında yapılan çalışmaların şematik olarak gösterimi

3.2.1. İn siliko moleküler dinamik çalışmaları

Önformülasyon çalışmaları kapsamında IL-2 için en uygun nanoemülsiyonun hangisi olduğunu belirlemeye yönelik MD simülasyonlarını gerçeğe en yakın koşullarda simüle etmek adına primer emülsiyon sistemi için tüm atom simülasyonları gerçekleştirilmiştir. İnsan IL-2'nin farklı kristal yapıları Protein Veri

Bankası'ndan (PDB) incelenerek Çizelge 3.1'de sunulmuştur. MD simülasyonlarında kristalleşen IL-2'nin doğal formlarından PDB kodları 1M47 veya 1M4C'nin (Arkin ve diğerleri, 2003) kullanılmasına karar verilmiştir. 1M47'nin çözünürlüğü daha iyi olduğundan ve daha iyi temsil edeceği için simülasyonlarda bu kristal yapı kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. İnsan IL-2'nin kristal yapıları

Tanımlayıcı	Yöntem	Sekans Aralığı	Detay		Kaynak
1M47	**X-ray**	**21-153**	**İnsan IL-2'nin kristal yapısı (Doğal 1)**		(Arkin ve diğerleri, 2003)
1M48	X-ray	21-153	Bileşik 1 ile IL-2 kompleksinin kristal yapısı		
1M49	X-ray	21-153	SP-1985 ile insan IL-2 kompleksi kristal yapısı		
1M4A	X-ray	21-153	(1H-İndol-3-il)-(2-merkapto-etoksiimino)-asetik asit ile C31'de kovalent modifiye insan IL-2 Y31C'nin kristal yapısı		
1M4B	X-ray	21-153	2-[2-(2-Sikloheksil-2-guanidino-asetilamino)-asetilamino]-N-(3-merkapto-propil)-propionamid ile C43'te kovalent modifiye insan IL-2 K43C'nin kristal yapısı		
1M4C	**X-ray**	**21-153**	**İnsan IL-2'nin kristal yapısı (Doğal 2)**		
1NBP	X-ray	21-153	3-Merkapto-1-(1,3,4,9-tetrahidro-B-karbolin-2-il)-propan-1-on ile C31'de kovalent olarak değiştirilmiş insan IL-2 Y31C'nin kristal yapısı Bağlanma bölgeleri aydınlatılmış (F42, R38, L72)		(Hyde ve diğerleri, 2003)
1PW6	X-ray	21-153	IL-2'nin düşük mikromolar küçük molekül inhibitörü	• IL-2 ile IL-2Rα bağlanmasındaki kritik sıcak bölgeleri (bağlanma bölgeleri; F42, E62) aydınlatılmış	(Thanos ve diğerleri, 2003)
1PY2	X-ray	21-152	IL-2'de bir sıcak noktaya bağlı 60 nm küçük molekülün yapısı		
1QVN	X-ray	21-152	IL-2 V69A'ya bağlı SP4160'ın yapısı		(Thanos ve diğerleri, 2006)

Çizelge 3.1. (devam) İnsan IL-2'nin kristal yapıları

1Z92	X-ray	21-153	IL-2 ve IL-2Rα arasındaki kompleksin kristal yapısı	(Rickert ve diğerleri, 2005)
2B5I	X-ray	21-153	IL-2, IL-2Rα'nın yanısıra IL-2Rβ ve γ_c ile kompleks	(Wang ve diğerleri, 2005)
2ERJ	X-ray	21-153	IL-2 ile kompleks halinde heterotrimerik IL-2 reseptörünün kristal yapısı	(Stauber ve diğerleri, 2006)
5M5E	X-ray	8-153	IL-2 varyantı ile IL-2R kompleksinin kristal yapısı (CEA-IL2v)	(Klein ve diğerleri, 2017)
1ILM	Model	26-153	IL-2 ve IL-2Rα kompleksi / Revize edilmiş iki alternatif IL2R kompleks modeli, A ve B zinciri	(Bamborough ve diğerleri, 1994)
1ILN	Model	26-153		
1IRL	NMR	21-153	F42A mutantı IL-2'nin üç boyutlu yapısı, iki boyutlu NMR ve X-ışını kristalografisi ile belirlenerek doğal IL-2 yapısıyla karşılaştırılması	(Mott ve diğerleri, 1995)
3INK	X-ray	21-153	C125A yerleştirilmiş insan rekombinant IL-2 yapısı	(McKay, 1992)
3QAZ	X-ray	21-153	IL-2 mutant D10 üçlü kompleksi	(Levin ve diğerleri, 2012)
3QB1	X-ray	21-153	IL-2 mutantı D10	
4NEJ	X-ray	24-153	IL-2'nin kristal temas arayüzüne bağlı küçük moleküler fragman	(Brenke ve diğerleri, 2014)
4NEM	X-ray	24-153		
5LQB	X-ray	22-153	Fab fragmanlı NARA1 antikoru ile insan IL-2 mutantı Proleukinin karmaşık yapısı	(Arenas-Ramirez ve diğerleri, 2016)
5UTZ	X-ray	21-153	İnsan IL-2/Fab kompleksi	(Trotta ve diğerleri, 2018)
6LX3	EM	1-21	İnsanda salgılanan doğal immünoglobulin A'nın Cryo-EM yapısı	(Wang ve diğerleri, 2020)
6LXW	EM	1-21	SpsA'nın N-terminal alanıyla kompleks halindeki insanda salgılanan doğal immünoglobulin A'nın Cryo-EM yapısı	
6VWU	X-ray	-	ALKS 4230'un X-ışını yapısı, dairesel permütasyonlu insan IL-2 ve IL-2Rα füzyonu	(Lopes ve diğerleri, 2020)

Çizelge 3.1. (devam) İnsan IL-2'nin kristal yapıları

6YE3	X-ray	21-153	UFKA-20'den bir Fab fragmanı ile kompleks IL-2	(Karakus ve diğerleri, 2020)
7DR4	X-ray	21-153	İnsan IL-2 ile kristalleştirilen anti-insan IL-2 antikoru	(Kim ve diğerleri, 2021)
7M2G	X-ray	21-153	İnsan IL-2 mutantı P65K, C125S	(Ptacin ve diğerleri, 2021)
7RAA	X-ray	21-153	StabIL-2 seq15 olarak adlandırılan tasarlanmış IL-2	(Ptacin ve diğerleri, 2021)
7RA9	X-ray	21-153	StabIL-2 seq1 olarak adlandırılan tasarlanmış IL-2	
7ZMZ	X-ray	20-153	Hedef CD25 reseptörüne bağlanan tasarlanmış IL-2	(Ren ve diğerleri, 2022)
7YZJ	X-ray	84-92	IL-2 antijenik peptiti ile kristalleştirilen FAB kompleksi	(Goryacheva ve diğerleri, 2023)
AF-P60568-F1	Tahmin edilen	1-153	IL-2 AlphaFold yapı tahmini	(Jumper ve diğerleri, 2021; Varadi ve diğerleri, 2024)

IL-2 ile MD simülasyonları gerçekleştirilmeden önce Şekil 2.3'te gösterilen IL-2 ve etkileştiği, IL-2Rα, IL-2Rβ ve IL-2Ry reseptörleri ile etkileşimleri moleküler düzeyde incelenmiştir.

IL-2 ile gerçekleştirilen MD simülasyonlarında kullanılan yardımcı maddeler, lipit temelli sistemlerle ilgili literatürlerde en sık kullanılan yardımcı maddeler arasından seçilmiştir ve Çizelge 3.2'de sunulmuştur. Seçilen yardımcı maddelerin bileşenleri teknik bilgi formlarına göre özetlenerek Çizelge 3.3'te sunulmuştur. Yardımcı maddelerle simülasyonlar 100 nanosaniye (ns) olarak oluşturulmuştur. Simülasyonlar dört kopya olarak gerçekleştirilmiştir. Bu simülasyonlarla, geri dönüşümlü etkileşimlerin varlığının gözlemlenmesi, hedef reseptör ile hangi bağlanma bölgelerinde etkileştiği ve etkileşimin türü, etkileşim bölgesinde bulunma süresi, proteinin çevresindeki polar ve apolar yüzey alanlarının maskelenip

maskelenmediği, hangi aminoasitlerle etkileşimin gerçekleştiği ve bunların çözünürlüğe ve tedavideki etkisine olası etkileri moleküler seviyede değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.2. Formülasyon üzerinde in siliko etkileri değerlendirilen yardımcı maddeler

Uzun zincirli yağ asitleri	**Orta zincirli trigliseritler**	**Uzun zincirli mono ve digliserit karışımları**	**Propilen glikol esterleri**	**Suda çözünen yüzey etkin maddeler**	**Yardımcı yüzey etkin maddeler**
Oleik asit	Labrafac™ Lipophile WL 1349	Maisine®	Capryol® 90	Labrasol®	Transcutol® HP
		Peceol™	Lauroglycol™ 90		

Çizelge 3.3. Teknik bilgi formlarına göre yardımcı maddelerin özellikleri

	Bileşenler	**Oran (%)**
Labrafac™ Lipophile WL 1349	Kaproik asit (C6)	≤2,0
	Kaprilik asit (C8)	50,0 - 80,0
	Kaprik asit (C10)	20,0 - 50,0
	Laurik asit (C12)	≤3,0
	Miristik asit (C14)	≤1,0
Labrasol® ALF	Kaproik asit (C6)	≤2,0
	Kaprilik asit (C8)	50,0 - 80,0
	Kaprik asit (C10)	20,0 - 50,0
	Laurik asit (C12)	≤3,0
	Miristik asit (C14)	≤1,0
Lauroglycol™ 90	Kaprilik asit (C8)	≤0,5
	Kaprik asit (C10)	≤2,0
	Laurik asit (C12)	≥95,0
	Miristik asit (C14)	≤3,0
	Palmitik asit (C16)	≤1,0
Transcutol® HP	Dietilen glikol monoetil eter	≥99,900
Maisine® CC	Palmitik asit (C16)	4,0 - 20,0
	Stearik asit (C18)	≤6,0
	Oleik asit (C18:1)	10,0 - 35,0
	Linoleik asit (C18:2)	≥50,0
	Linoleik asit (C18:3)	≤2,0
	Araşidik asit (C20)	≤1,0
	Eikosenoik asit (C20:1)	≤1,0

Çizelge 3.3. (devam) Teknik bilgi formlarına göre yardımcı maddelerin özellikleri

Peceol™	Palmitik asit (C16)	≤12,0
	Stearik asit (C18)	≤6,0
	Oleik asit (C18:1)	≥60,0
	Linoleik asit (C18:2)	≤35,0
	Linoleik asit (C18:3)	≤2,0
	Arachidic asit (C20)	≤2,0
	Eikosenoik asit (C20:1)	≤2,0
Capryol® 90	Kaprilik asit (C8)	>= 90,0
	Kaprik asit (C10)	<= 3,0
	Laurik asit (C12)	<= 3,0
	Miristik asit (C14)	<= 3,0
	Palmitik asit (C16)	<= 1,0

** Simülasyon sistemleri kurulurken %10 ve üzeri oranlar dikkate alınmıştır.*

Protein yapısındaki ilaçların asidik mide ortamında peptidaz enzimlerinin etkisiyle metabolize olması nedeniyle bu ilaçların etki yöresine ulaşamadan deaktive olmaları söz konusu olmaktadır. Bu da peptit/protein yapısındaki ilaçların oral yoldan uygulanabilmeleri açısından, yeterli potensin görülememesi nedeniyle klinikte kullanılmasına engel teşkil etmektedir. Bu durumu aşabilmek adına nanoemülsifiye sistemleri geliştirme ve böylelikle IL-2'nin emülsiyon formunda bifazik lipit kürecikleri içerisinde hapsedilerek korunma stratejisi benimsenmiştir. Buna ek olarak, formülasyona proteaz enzim inhibitörü ilave edilerek gastrointestinal kanalda korumak amaçlanmış, uygun proteaz inhibitörünü belirlemek için literatür araştırmasından sonra MD simülasyonlar oluşturulmuştur. Simülasyon süresi, yardımcı maddelerle gerçekleştirilenlerden farklı olarak proteaz inhibitörlerinin yapısal olarak daha büyümesine bağlı artan kompleksite nedeniyle verilerin güvenilirliğini arttırmak amacıyla 500 ns olarak çalışılmıştır.

Tez kapsamındaki formülasyon tasarımı süreçlerinde, IL-2'nin etki yöresine ulaşması ve IL-2R ile etkileşime girdiğinde ortaya çıkabilecek senaryoları dikkate alabilmek için, ilaç etken maddesinin etkisini farklı şekillerde değiştirebilecek yardımcı maddelerin de farklı simülasyon sistemlerine dahil edilmesiyle, geniş perspektifte, ilacın etkisini nasıl gösterebileceği moleküler dinamik simülasyonlarıyla ortaya konulmuştur. Elde edilen sonuçlar, seçilen formülasyonların oral yoldan uygulamasının sağlayabileceği avantajlar ile olası dezavantajları birlikte

değerlendirme olanağı sunmuştur. Yapılan çalışmaların sonuçları aynı zamanda stabilite veya geçimsizlik gibi potansiyel problemler hakkında da ön bilgi sağlamıştır. Böylelikle, yapılacak çalışmaların moleküler seviyede ne gibi etkileri olabileceğinin değerlendirilmesine ve başarı şansının artırmasına yönelik değerlendirme yapılmasına olanak sağlanmıştır.

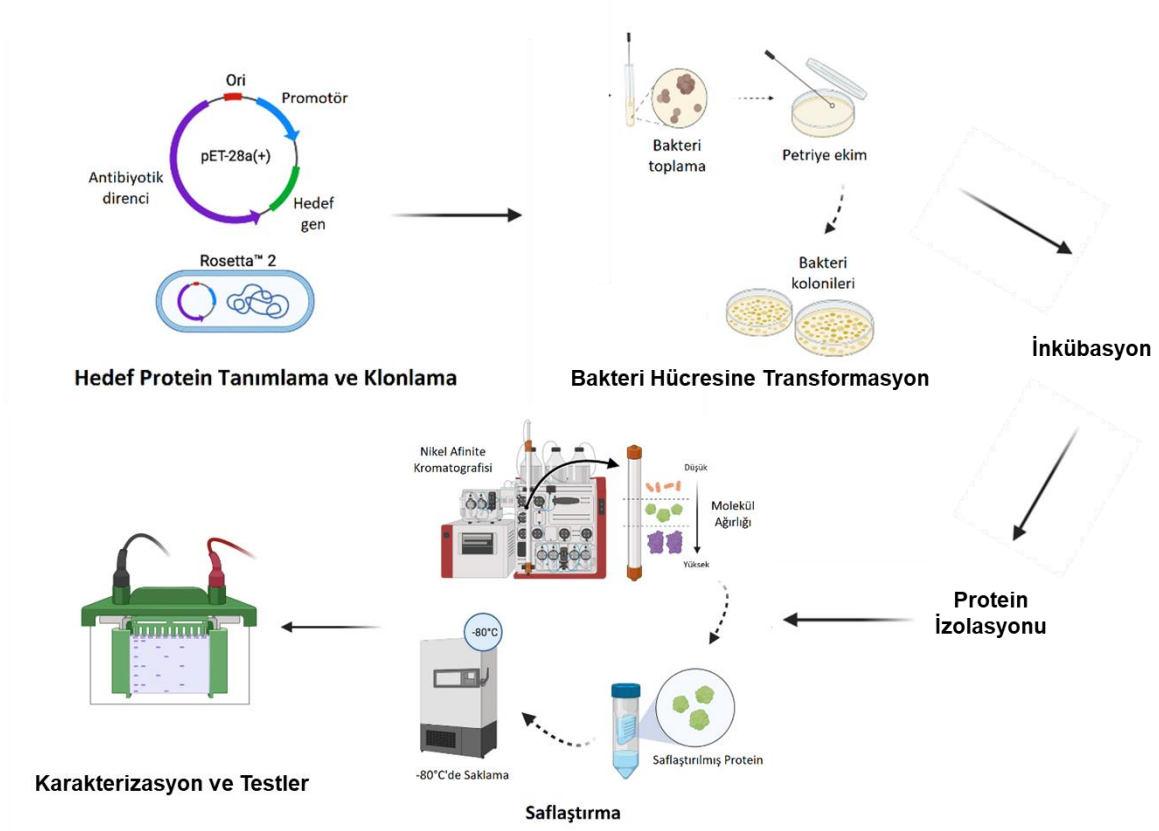
Simülasyonlar için formülasyon bileşenleri Maestro ara yüzü (Schrödinger Release 2021-3: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021) kullanılarak çizilmiştir. Kimyasalları hazırlamak için pH 7,4 ± 1,0'da LigPrep (Schrödinger Release 2021-3: LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021) rutini kullanılmıştır. Simülasyonlarda belirtildiği gibi PDB kodu 1M47 olan IL-2 kullanılmıştır. IL-2'nin eksik yan zincirlerinin tahmin edilen pozisyonlarını eklemek ve proteini gevşetmek için Protein Preparation Wizard (Schrödinger Release 2021-3: Schrödinger Suite 2021-3 Protein Preparation Wizard; Epik, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021; Impact, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021; Prime, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021) kullanılmıştır. Tüm atom tipleri ve protonasyon durumları OPLS4 kuvvet alanı ile tanımlanmıştır. Simülasyon sistemleri, Desmond (Schrödinger Release 2021-3: Desmond Molecular Dynamics System, D. E. Shaw Research, New York, NY, 2021. Maestro-Desmond Interoperability Tools, Schrödinger, New York, NY, 2021) ile MD simülasyonlarını çalıştırmak için System Builder yardımcı programı ile oluşturulmuştur. Simülasyon sistemi TIP3P su molekülleri ile ortam doldurulmuştur. Simülasyon sistemi gevşeme protokolü olarak, yazılımın varsayılan protokolü kullanılmıştır. Simülasyon süresi 100 ns ve 500 ns olarak çalışılmış olup simülasyonlar 4 kopya olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. İnterlökin-2'nin fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi

Önformülasyon çalışmaları kapsamında IL-2'nin FT-IR analizi, DSC analizi, sirküler dikroizm spektroskopisi gibi fizikokimyasal özellikleri tespit edilmiştir. IL-2'nin pahalı ve sınırlı miktarda olması nedeniyle çözünürlük çalışması yerine moleküler dinamik simülasyonları planlanmıştır. Ayrıca, tez çalışmasında, yürütülen KAP projesi kapsamında farklı kaynaklardan IL-2 üretimi gerçekleştirilmiş ve karşılaştırılmaları yapılmıştır.

IL-2 üretimi

IL-2 üretimi Koç Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü ve İstanbul Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü laboratuvarlarında yürütülmüştür. Rekombinant DNA teknolojisiyle üretilen insan IL-2'nin üretimi için kodon tasarımı yapılmış ve gen tasarımı esnasında üretilecek proteinin daha çözünür olmasını sağlayacak SUMO-Tag SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) eklenmiştir. Satın alınan SUMO-Tag etiketli genler pET-28a (+) vektörüne klonlanarak çalışılmış, diğer bir üretimde ise IL-2-pET30a plazmidi Escherichia coli Rosetta 2 suşuna transforme edilerek üretim işlemleri gerçekleştirilmiştir (Akgün, 2022). Şekil 3.2'de rekombinant DNA teknolojisiyle protein üretim süreci şematik olarak özetlenmiştir:



Şekil 3.2. Rekombinant IL-2 üretim süreci şematik gösterimi

Boyut dışlama kromatografisi (SEC-HPLC)

Bu yöntem, monomer, dimer ve multimer formdaki proteinlerin ayrılması ve miktarlarının tayini için optimize edilmiştir. Boyut dışlama kromatografisi (SEC-

HPLC), biyolojik ve farmasötik analizlerde, özellikle protein temelli ilaçların karakterizasyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmalar, Koç Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmada dimerizasyon ve oligomerizasyon durumlarını test etmek için saflaştırılmış rhIL-2 proteini, saflaştırma sonrası SEC-HPLC ile değerlendirilmiştir. Bir Biosuite Yüksek çözünürlüklü SEC kolonu 250'de (Waters Corp., Milford, MA), toplam 10 µg saf protein enjekte edilmiştir ve örnekler izokratik bir gradyan kullanılarak 20 dakika işlenmiştir. Mobil faz olarak PBS (pH 7,4) kullanılmıştır.

SEC-HPLC ayrıca farklı tampon ortamlarında proteinlerin stabilitesini ve saflığını incelemek için de kullanılabilmektedir. İn vitro çalışmalarda kullanmak üzere; metanol, asetonitril, %0,5 SLS çözeltisi ve %0,5 SLS içeren PBS tamponu ortamlarında IL-2 için mobil faz oranları, akış hızı ve enjeksiyon hacmi gibi parametreler değiştirilerek en uygun çalışma koşulları elde edilmiştir. Mobil faz koşulları, en uygun protein çözünürlüğü ve kararlılığını sağlamak için optimize edilmiştir. Çalışmada kullanılan tamponlar 50 mM NaCl ve 20 mM Tris-HCl'dir. İzokratik akış koşulları, Superdex S200 (10/300) veya S75 kolonlarında kullanılarak proteinlerin ayrımı gerçekleştirilmiştir. Çalışma, her iki kolonun ayrım aralığına uygun olarak proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrılmasını sağlamaktadır. Çalışmada S200 kolon için akış hızı 1 mL/dk, S75 kolon için akış hızı 0,5 mL/dk olarak çalışılmıştır.

FT-IR analizi

IL-2'nin Fourier Dönüşümü Kızılötesi (FT-IR) spektrumu, Perkin Elmer Spectrum-400 cihazı kullanılarak 4000-600 cm^{-1} dalga boyu aralığında sulu çözeltisi halinde belirlenmiştir. FT-IR analizinde gönderilen kızılötesi ışığı çeşitli dalga boylarında absorbe etmesi sonucu numunenin moleküler yapısı aydınlatılır. Moleküler yapı ve fonksiyonel gruplara bağlı olarak her numuneye özgü spektrum elde edilmektedir.

DSC analizi

Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) yöntemi, termal olayların detaylı analizini yapabilmek için kullanılan hassas bir tekniktir. Bu yöntemle, örnek ve referans malzemelerin sıcaklıklarını aynı seviyede tutabilmek için gereken ısı enerjisi ölçülür. Örneğin erimesi gibi endotermik bir süreç meydana geldiğinde, örneğin sıcaklığını referansın sıcaklığı ile eşit tutmak için daha fazla ısı enerjisi sağlanması gerekecektir. Bu süreçte, örnek ve referans arasında ısı akışında bir farklılık ortaya çıkar. IL-2'nin karakterize edilmesi amacıyla, DSC ölçümleri Shimadzu DSC-60 diferansiyel taramalı kalorimetre ile yapılmıştır. DSC analizleri alüminyum pan kullanılarak azot gazı altında 90°C'ye kadar 1°C/dk artacak şekilde ölçüm gerçekleştirilmiştir (Vrikkis, 2013; Potong, Sookkumnerd ve Rattanaphanee, 2011). Etkin madde ve formülasyon numuneleri 25-90°C sıcaklık aralığında taranarak termogramları alınmış ve elde edilen termogram yorumlanmıştır.

Sirküler Dikroizm Spektroskopisi

Sirküler dikroizm (CD) cihazı ile protein ikincil yapı analizi yapılmıştır. IL-2'nin ikincil yapısındaki alfa helix ve beta sheet yapılarının varlığı Bilkent Uluslararası Nanoteknoloji Merkezi'ndeki (UNAM) CD cihazı (Jasco J-815) ve 10 mm kuartz küvet kullanılarak analiz edilmiştir. Üretilen IL-2'nin analizleri İstanbul Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir (Jasco J-1500). Sirküler Dikroizm cihazında kullanılan parametreler aşağıda belirtilmiştir (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. Sirküler dikroizm analiz parametreleri

Sirküler dikroizm cihazı	*Jasco J-815*
Dalga Boyu Aralığı	190-260 nm
Adım Büyüklüğü	10 nm
Bant Genişliği	2,0 nm
Tarama Hızı	50 nm/dk hız
Okuma Sayısı	3
Ortam Sıcaklığı	25°C

Çizelge 3.4. (devam) Sirküler dikroizm analiz parametreleri

Sirküler dikroizm cihazı	*Jasco J-1500*
Dalga Boyu Aralığı	200-250 nm
Adım Büyüklüğü	10 nm
Bant Genişliği	2,0 nm
Tarama Hızı	50 nm/dk hız
Okuma Sayısı	3
Ortam Sıcaklığı	25°C

3.2.3. İnterlökin-2'nin miktar tayini yöntemi ve validasyonu

IL-2'nin miktar tayini enzime bağlı immünoabsorbant test (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA) ile yapılmıştır. ELISA ile antijen veya antikor tayini yapılabilmektedir. Özgül antijen-antikor arasındaki reaksiyona dayanan bu yöntemde, antijen-antikor kompleksine, enzim ile işaretli anti-gammaglobulin bağlanarak bir kompleks oluşturmaktadır. Bu enzimin etkilediği bir substratın eklenmesi ile oluşan renk, ELISA plak okuyucu ile okunarak değerlendirilmektedir. İnsan IL-2 miktar tayinlerinde Elabscience® Human IL-2 ELISA Kit ve ELISA plak okuyucu olarak Molecular Devices SpectraMax i3x kullanılmıştır.

ELISA kitinin çalışma prensibi

ELISA kiti Sandviç-ELISA prensibini kullanmaktadır. Bu kitteki mikro ELISA plakası, insan IL-2'ye spesifik bir antikor ile önceden kaplanmıştır. Örnekler (standartlar) mikro ELISA plaka kuyularına eklenir ve spesifik antikor ile birleştirilir. Daha sonra İnsan IL-2'ye spesifik bir biyotinlenmiş tespit antikoru ve Avidin-Horseradish Peroksidaz (HRP) konjugatı her bir mikro plaka küvetine art arda eklenir ve inkübe edilir. Serbest bileşenler yıkanarak uzaklaştırılır. Substrat çözeltisi her bir küvete eklenir. Sadece İnsan IL-2, biyotinlenmiş tayin antikoru ve Avidin-HRP konjugatı içeren küvetler mavi renkte görünmektedir. Enzim-substrat reaksiyonu stop çözeltisi eklenerek sonlandırılır ve renk sarıya döner. Optik dansite (OD) 450 ± 2 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür. OD değeri insan IL-2 konsantrasyonu ile orantılıdır. Numunelerdeki insan IL-2 konsantrasyonu, numunelerin OD değeri standart eğri ile karşılaştırılarak hesaplanmaktadır.

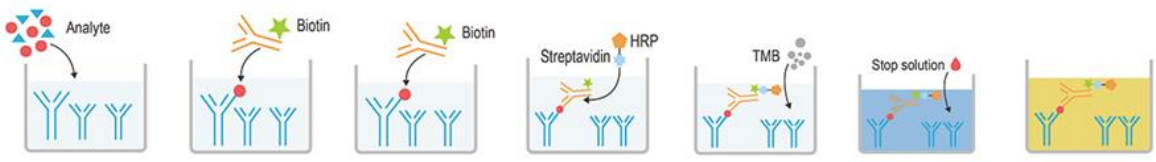
İnsan IL-2 ELISA kitine ait validasyon parametreleri aşağıda verilmiştir:

Duyarlılık: 4,69 pg/mL
Ölçüm Aralığı: 7,81-500 pg/mL
Tekrarlanabilirlik: Varyasyon katsayısı <%10
Spesifiklik: Kit numunelerdeki İnsan IL-2'yi tespit etmektedir. İnsan IL-2 ve analogları arasında önemli bir çapraz reaktivite veya girişim gözlenmemektedir.

İnsan IL-2 ELISA kitinin çalışma protokülü aşağıda özetlenmiştir:

1. IL-2 standardı, konsantrasyonu 500 pg/mL olacak şekilde seyreltilmiş ve bu 500 pg/mL standart IL-2 çözeltisinden hareketle 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,63, 7,81, 0 pg/mL IL-2 içeren çözeltiler hazırlanarak kuyucuklara 100 µL bu standartlardan eklendi. Kuyucuklara 100 µL numune eklendi ve 37°C'de 90 dakika boyunca inkübe edildi.
2. Sıvı kısmı atılıp hemen her bir kuyucuğa 100 µL biyotinlenmiş tayin Ab çözeltisi eklendi ve 37°C'de 60 dakika boyunca inkübe edildi.
3. Mikroplakadaki sıvı uzaklaştırılarak yıkama tamponuyla 3 kez yıkandı.
4. 100 µL HRP konjugat çözeltisi eklendi ve 37°C'de 30 dakika boyunca inkübe edildi.
5. Mikroplakadaki sıvı uzaklaştırılarak yıkama tamponuyla 5 kez yıkandı.
6. 90 µL yüzey reaktifi eklendi ve 37°C'de 15 dakika inkübe edildi.
7. 50 µL durdurma çözeltisi eklendi.
8. Plaka hemen mikroplaka okuyucuya yerleştirilerek kuyucuklarda oluşan sarı rengin optik yoğunluğu 450nm'de okundu. Kalibrasyon doğrusu çizilerek sonuçlar hesaplandı.

Bu süreç şematik olarak Şekil 3.3'te sunulmaktadır.



Şekil 3.3. Sandviç ELISA'nın adımları (Elabscience® Human IL-2 ELISA Kit)

3.2.4. Nanoemülsiyon formülasyonu geliştirme çalışmaları

IL-2'nin oral kullanılacak dozaj şekli, uzun süreli stabilite sağlayabilmek, permeabilitesini ve oral biyoyararlanımını artırabilmek amacıyla lipit temelli formülasyon şeklinde planlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, suda kolayca çözünen insan IL-2'nin yüklenebileceği formülasyon tipleri tercih edilmiş ve Microfluidizer cihazında Z tip etkileşim kazanı (G10Z) ile ön formülasyon çalışmaları kapsamında denemeler yapılmıştır. Literatüre göre mikroakışkanlaştırıcı kullanılarak hazırlandığı bilinen ilaç taşıyıcı sistemler olan yağ/su tipi nanoemülsiyonlar, su/yağ/su tipi nanoemülsiyonlar ve nanoyapılı lipit taşıyıcılar (NLC) olmak üzere farklı formülasyonlar denenmiştir.

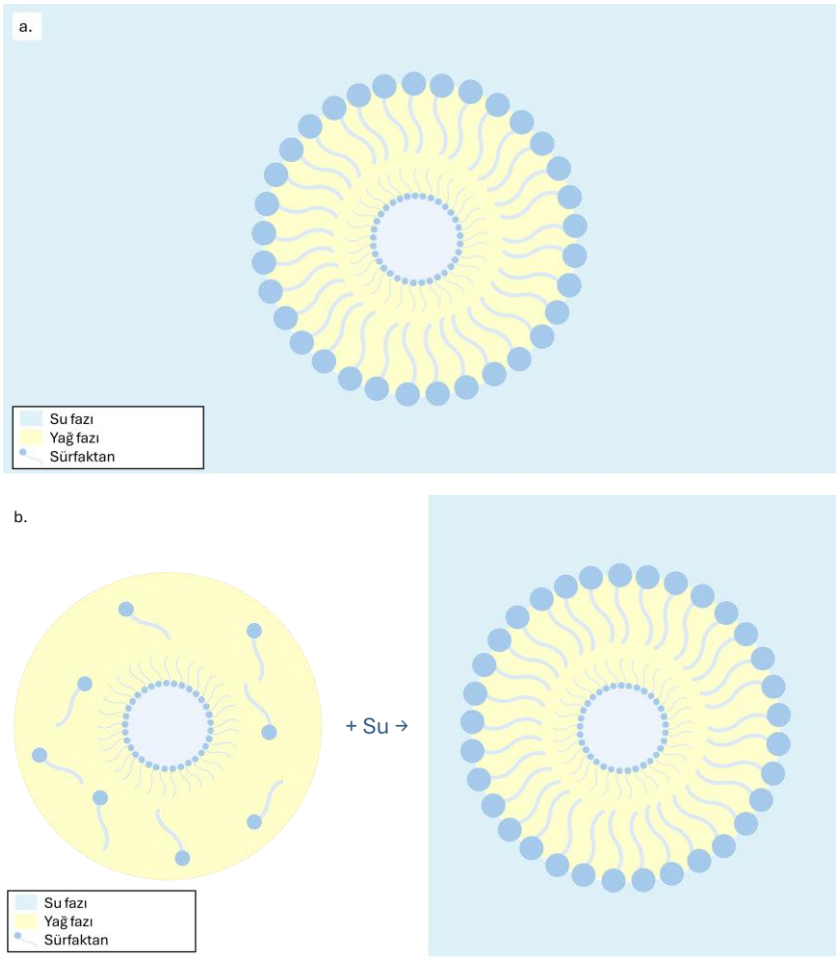
Ön denemelerde yapılan çalışmalarda F-A formülasyonunda yağ fazında Span 80 ve Labrafac WL 1349, su fazında ise gliserol ve Tween 20 kullanılarak yağ/su tipi emülsiyon oluşturulmuştur. Manyetik karıştırıcı üzerinde 600 rpm'de homojen olana dek karıştırıldıktan sonra mikroakışkanlaştırıcıdan 15.000 psi'da 5 geçiş sonrası damlacık boyutu ve PDİ sırasıyla 114,7-127,8 nm ve 0,217-0,228 olarak bulunmuştur. IL-2'nin yağ fazındaki çözünürlüğü bilinmediğinden yağ/su tipi emülsiyon tercih edilmemiştir.

F-B formülasyonunda yağ olarak Capryol 90, sürfaktan karışımı olarak Gelucire 44/14 : Transcutol kullanılarak yağ/su tipi emülsiyon oluşturulmuştur. Sürfaktan karışımı (S_{mix}) ve yağ/S_{mix} için 2 farklı oran belirlenmiştir. Mikroakışkanlaştırıcıdan 12.750 psi'da 8 kez geçirilmiş, her geçiş sonunda alınan örnekler seyreltilerek damlacık boyutu ve PDİ sırasıyla; 1. formülasyonunda, 20,66-1065 nm ve 0,199-0,903 olarak, 2. formülasyonunda ise sırasıyla 1002-3793 nm ve 0,084-1,0 olarak ölçülmüştür. Formülasyon bileşenlerinden Gelucire 44/14'ün oda sıcaklığında yarı katı özellik göstermesi nedeniyle ve sabit oda sıcaklığında çalışılması da mümkün olamadığından ve homojen sonuçlar elde edilmediğinden bu formülasyondan vazgeçilmiştir.

F-C formülasyonu, nanoyapılı lipid taşıyıcı (NLC) formülasyonudur. Capryol 90 ve Precirol ATO 5, manyetik karıştırıcı üzerinde 70 °C 400 rpm'de 10 dk karıştırıldıktan sonra 70°C'deki su ve Cremophor RH 40 ile Ultra-Turrax'ta 11.000 rpm'de 70°C

sıcaklıkta 3 dk tutulmaktadır. Formülasyon, mikroakışkanlaştırıcıdan 7.250 psi'da 5 kez geçirildikten sonra manyetik karıştırıcı üzerinde buz içerisinde 400 rpm'de karıştırılmıştır. Damlacık boyutu ve PDİ sırasıyla 152,3-1029 nm ve 0,308-0,522 olarak ölçülmüştür. DSC sonuçlarına göre referans IL-2 için 70°C yüksek sıcaklıkta çalışılmamasının gerekmesi ve cihazda kontrollü sıcaklık sağlanamıyor olması gibi nedenlerle bu formülasyon tercih edilmemiştir.

Yapılan önformülasyon çalışmaları sonucunda çoklu nanoemülsiyon formülasyonları sağladığı avantajlar ve üretim koşulları nedeniyle tercih edilmiştir. Formülasyondaki sıcaklık, basınç ve geçiş sayıları gibi işlem parametreleri literatürler doğrultusunda belirlenmiştir. Su/yağ/su tipi nanoemülsiyonlar seçilerek literatür bilgisi doğrultusunda farklı sayılarda basınç ve geçiş sayıları denenerek damlacık boyutu ve PDİ ölçümlerine göre en stabil olduğu parametreler belirlenmiştir. Seçilen **F1 çoklu nanoemülsiyon** ve **F2 kendiliğinden emülsifiye çoklu nanoemülsiyon formülasyonları** Şekil 3.4'te şematik olarak gösterilmiştir. Formülasyon çalışmaları kapsamında yapılan çalışmalar aşağıda ayrıntılı olarak sunulmuştur.



Şekil 3.4.**a.** Çoklu nanoemülsiyonun (F1) ve **b.** kendiliğinden emülsifiye çoklu nanoemülsiyonun (F2) şematik gösterimi.

F1 nanoemülsiyonunun hazırlanması

Primer su/yağ tipi emülsiyonun %5'i a/a poligliserol polirisinolat (PGPR) içerecek şekilde %80 oleik asit tartılıp ilave edilmiştir. Sonrasında aynı sıcaklığa getirilmiş yağ fazı ve su fazı (40°C) 350 rpm'de 10 dk karıştırılmıştır. Sonrasında ultra-turrax cihazında 10.000 rpm'de 3 dk, sonrasında ise ultrasonik banyoda 35 kHz'de 5 dk karıştırılmıştır. Hazırlanan primer emülsiyonun üzerine Tween 80 ve distile su ilave edilip ultra-turrax cihazında 10.000 rpm'de 2 dk boyunca karıştırılmıştır. Hazırlanan emülsiyon 10.000-30.000 psi altında mikroakışkanlaştırma cihazından 3-5 defa geçirilerek incelenmiştir (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5. F1 formülasyonunda kullanılan bileşenler

F1	Bileşen	Miktar (g)
Primer Emülsiyon	Oleik asit	0,76
	PGPR	0,04
	Distile su	0,2
Çoklu Emülsiyon	Primer Emülsiyon	1
	Tween 80	0,04
	Distile su	3,96

F2 nanoemülsiyonunun hazırlanması

Labrafac™ tartılıp üzerine PGPR (7:1) ilave edilmiştir (yağ fazı). Daha sonra aynı sıcaklığa (50°C) getirilmiş %90 yağ fazı ve %10 su fazı 1000 rpm'de 3 dk karıştırılmıştır. Sonrasında ultra-turrax cihazında 24.000 rpm'de 3-4 dk karıştırılmıştır. Mikroakışkanlaştırma cihazından 10.000 psi'de 1-5 defa geçirilmiştir. Hazırlanan primer emülsiyon üzerine %40 Kolliphor EL ilave edilerek oda sıcaklığı koşullarında final nanoemülsiyon formülasyonu düşük enerji metoduyla karıştırılarak hazırlanmıştır (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6. F2 formülasyonunda kullanılan bileşenler

F2	Bileşen	Miktar (g)
Primer Emülsiyon	Labrafac™ Lipophile WL1349	7,88
	PGPR	1,12
	Distile su	1
Çoklu Emülsiyon	Primer Emülsiyon	2
	Kolliphor EL	1,332
	Distile su	3,96

Optimum formülasyon parametrelerini belirlemek için hazırlanan formülasyonlar 1:250 oranında distile su ile seyreltilmiş damlacık boyutu ve PDİ ölçülmüştür.

İnterlökin-2 yüklü nanoemülsiyon formülasyonunun hazırlanması

IL-2 yüklü nanoemülsiyon hazırlamak için su/yağ/su nanoemülsiyonların primer emülsiyondaki su fazı olarak 2,5 x 10^5 IU/mL IL-2 yüklü olacak şekilde IL-2 çözeltisi kullanılmıştır. Temin edilen Elabscience® Rekombinant insan interlökin-2 proteinin biyoaktivite bilgilerine göre 10^7 IU/mg IL-2 vardır ve bu doğrultuda gereken hesaplamalar yapılmıştır. Buna göre 1 g (yaklaşık 1 mL) emülsiyonda olması istenen 250.000 IU IL-2, 0,025 mg IL-2'ye eşit olmaktadır. Liyofilize protein, uygun seyreltmelerle steril suyla hazırlanıp porsiyonlanarak -80°C'de saklanmaktadır.

Proteaz inhibitörünün yüklü olduğu nanoemülsiyonun oluşturulması

Optimum olarak belirlenen nanoemülsiyonun iç su fazına tedavi edici dozu sağlayacak şekilde 2,5 x 10^5 IU/mL IL-2, dış su fazına 3000 KIU/mL aprotinin (Yetkin, Çelebi, Özer, Gönül ve Özoğul, 2004), 10 mM basitrasin (Yamamoto ve diğerleri, 1994), 0,125 ng/mL kimostatin (Çelik-Tekeli, 2020) veya 0,125 ng/mL pepstatin eklenmesi planlanmıştır. Formülasyon hazırlanırken farklı olarak en dış faza yapılan moleküler dinamik simülasyon sonuçlarına göre seçilen proteaz inhibitörü olan aprotinin eklenerek nanoemülsiyonlar hazırlanmıştır.

3.2.5. Geliştirilen nanoemülsiyon formülasyonlarında yapılan karakterizasyon çalışmaları

ELISA kiti ile IL-2 yükleme tayini

ELISA kitinin ölçüm aralığı belirtildiği gibi 7,81-500 pg/mL'dir. 1 g (yaklaşık 1 mL) emülsiyonda olması istenen IL-2 miktarının 0,025 mg olduğu belirtilmiştir. ELISA kiti ile IL-2 yükleme tayini yapabilmek için formülasyonun uygun madde ile seyreltilerek ölçüm aralığına uygun konsantrasyona getirilmesi gerekmektedir. ELISA kitine uygun seyreltici ajanı bulabilmek için farklı oranlarda distile su, metanol, etanol, %5'lik Triton X-100 ve %10'luk Triton X-100 ile seyreltmeler denenmiştir. Sonuç olarak bulanıklıkları da göz önünde bulundurularak %5'lik Triton X-100 ile seyreltme yapılması uygun bulunarak çalışmalara bununla devam edilmiştir.

Nanoemülsiyonun üzerine farklı oranlarda %5'lik Triton X-100 ilave edilerek yağ damlacıklarının parçalanması amaçlandı. Formülasyonun üzerine %5'lik Triton X-100 ilave edildikten sonra 2 dk boyunca vortekslendikten sonra IL-2 miktar tayini ELISA kiti ile yapılmıştır. Tüm çalışmalar n=3 şeklinde tekrarlı olarak yürütülmüştür.

Damlacık boyutu ve PDİ

Oluşan nanoemülsiyon formülasyonlarının damlacık boyutu (250 nm'den küçük) ve PDİ (0,1-1 arasında) ölçümleri dinamik ışık saçılım yöntemine göre Malvern Zetasizer Nano ZS ile 25±0,5°C'de gerçekleştirilmiştir. Çalışmada formülasyon: distile su, 1:250 oranında karıştırılmış ve tek kullanımlık küvetler kullanılarak 3 paralel olarak ölçümler yapılmıştır. Bu çalışma hazırlanan formülasyonların stabilitesini ve tek düzeliğini açıklamaktadır (Alhamdany, Saeed ve Alaayedi, 2021). Polidispersitenin değeri ne kadar yüksekse, formülasyondaki damlacık boyutu o kadar heterojendir. PDİ'nin düşük değerleri ise seçilen sistemlerin damlacık boyutunun iyi bir dağılıma sahip olduğunu göstermektedir.

Zeta potansiyeli

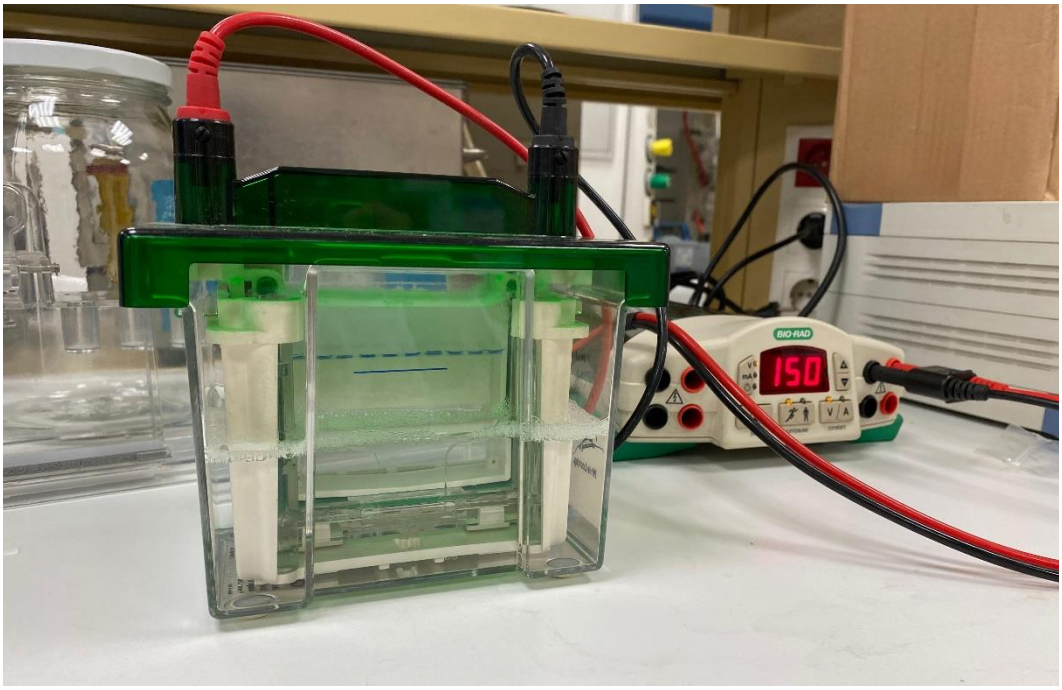
Zeta potansiyeli, nanoemülsiyonların yüzey yükünü ölçmek için kullanılan bir yöntemdir. Zeta potansiyeli nanoemülsiyonların stabilitesini tahmin etmek için kullanılan önemli bir parametredir. Negatif veya pozitif bir zeta potansiyeli, nanoemülsiyonun stabilitesini belirler. Negatif zeta potansiyeli, elektrostatik itme kuvvetleri tarafından damlacıkların birbirinden uzaklaşmasını sağlar, böylece aglomerasyonu önler ve dispersiyon stabilitesini artırır. Pozitif zeta potansiyeli ise damlacıklar arasında elektrostatik çekme kuvvetlerine neden olarak aglomerasyon eğilimini artırabilir ve stabiliteyi azaltabilir.

Ölçümler, Malvern Zetasizer Nano ZS ile 3 paralel olarak 25±0,5°C'de gerçekleştirilmiştir. Zeta potansiyelini ölçmek için nanoemülsiyon seyreltilmekte ve değeri yağ damlacıklarının elektroforetik hareketliliğinden tahmin edilmektedir. Nanoemülsiyonun fiziksel stabilitesini sağlamak için zeta potansiyelinin ±30 mV'luk olması yeterlidir (Gurpreet ve Singh, 2018).

Sodyumdodesilsülfat Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile IL-2 stabilitesinin değerlendirilmesi

Sodyumdodesilsülfat (SDS) ile muamele olan protein yapıları (ikinci, üçüncü, dördüncü) bozulur. Sonuç olarak protein yalnız primer yapı halinde negatif yüklü bir hale gelir. Bu yöntemde, molekül ağırlığına ve yüküne bağlı olarak moleküller anottan katoda doğru ilerlemektedir. Molekül ağırlığı büyük olan moleküllerin jel üzerinde ilerlemeleri zor olur ve jelin daha üst kısımlarında bulunurlar.

Nanoemülsiyon hazırlanırken ve nanoemülsiyon içerisindeki IL-2'nin yapısal bütünlüğünün korunup korunmadığını ve stabilitesini değerlendirmek için SDS-PAGE çalışmaları yapıldı. Gerçekleştirilen çalışmalarda önce %15 akrilamid jelde numuneler yürütülmüştür. Örnek seyreltme tamponunda β-merkaptoetanol kullanılan bu çalışmalarda protein bantları gözlenememiştir. Bu çalışmalarda örnek seyreltme tamponu ile muamele edildikten sonra hem kaynatılarak hem de kaynatılmadan jele yüklenmiştir (150 V, 15 dakika, 250 V 30 dakika). Çalışma daha sonra %12'lik akrilamid jel kullanılarak tekrarlanmıştır. Farklı bir örnek seyreltme tamponu kullanılmıştır. Aynı örnekler 1. jelde 150 V 15 dk, 250 V 30 dk; 2. jelde ise 150 V 25 dk, 200 V 45 dk yürütülmüştür. Bu çalışma sonucunda 150 V 25 dk, 200 V 45 dk uygun bulunmuştur ve IL-2'ye ait bant gözlenmiştir (Resim 3.1). Çalışmada, moleküler ağırlık belirleyici yerine IL-2 çözeltisi kullanılmıştır. Örneklerin oluşturduğu bant ile IL-2 çözeltisinin oluşturduğu bantlar karşılaştırılmıştır. Eğer örnekte bulunan proteinin yapısında parçalanma oluşmuşsa, jel üzerinde farklı molekül ağırlığını gösteren bantlar oluşması beklenmektedir. Bu sayede, örneğin içindeki IL-2'nin molekül ağırlığı ve yapısal bütünlüğünün koruyup korumadığı belirlenebilecektir.



Resim 3.1. Elektroforez cihazında 150 V'da örneklerin yürütülmesi

SDS-PAGE Yönteminde Kullanılan Çözeltiler

1. Jel Çözeltisi

Akrilamid……29,2 g

N.N metilen bis akrilamid……...0,8 g

Deiyonize su……..ym. 100 mL

Kullanıma hazır %30'luk akrilamid/bisakrilamid çözeltisi kullanılmıştır.

2. Ayırma Jeli Tamponu

Tris base……..8,5 g

Distile Su……ym.100 mL

10 M HCl ile pH 8,8'e ayarlanmıştır.

3. Yükleme Jeli Tamponu

Tris base……. 6 g

Distile Su……ym.100 mL

10 M HCl ile pH 6,8'e ayarlanmıştır.

4. SDS (%10)

1 g Sodyum dodesil sülfat suyun içinde çözülüp 10 mL hacme tamamlanmıştır.

5. APS çözeltisi

Amonyum persülfat….100 mg

Distile su……1 mL

Kullanılmadan önce taze hazırlanarak kullanılmıştır.

6. TEMED

Tetrametiletilendiamin kullanıma hazır olarak satılmaktadır.

7. Örnek Tamponu

Deiyonize su…….3,55 mL

Yükleme jeli tamponu…….1,25 mL

Gliserol……..2,5 mL

SDS (%10)……2 mL

Bromofenol Blue (% 0,5)….0,2 mL

Total Hacim……...9,5 mL

8. Elektrot Tamponu

Tris Base……30,3 g

Glisin…….144 g

SDS…….10 g

Distile su…….1000 mL

100 mL hazırlanıp 1 L'ye seyreltilerek kullanılmıştır.

9. Boyama Çözeltisi

Coommasie Brilliant Blue….0,25 g

Metanol…….40 mL

Asetik asit……10 mL

Distile su……...50 mL

10. Yıkama Çözeltisi

Metanol……..…….250 mL

Distile Su……250 mL

Asetik asit……..50 mL

11. Ayırma Jeli (%12'lik)

Deiyonize Su…… 3,4 mL

Jel Çözeltisi……... 4 mL

Ayırma Jeli Tamponu……2,5 mL

SDS (%10)……..…0,1 mL

APS Çözeltisi……..50 µL

TEMED……5 µL

12. Yükleme Jeli

Distile su……6,1 mL

Yükleme Jeli Tamponu …...2,5 mL

SDS (%10)……100 µL

Jel Çözeltisi……1,3 mL

APS Çözeltisi…….50 µL

TEMED……..10 µL

SDS-PAGE çalışma protokolü aşağıda özetlenmiştir:

1. Camlar temizlendikten sonra jel dökme standına sızdırmayacak şekilde yerleştirilmiştir. Taraklar jel dökülmeden önce takılarak 1 cm altı işaretlenip taraklar çıkarıldıktan sonra hazırlanan ayırma jeli çözeltisi belirlenen seviyeye kadar hızlıca camların arasına dökülmüştür.
2. Jelin üzerine örtecek kadar metanol ilave edilip jelleşmesi için beklenmiştir. Bu esnada artan ayırma jeli çözeltisi takip edilerek jelleşme izlenmiştir.
3. Ayırma jeli donduktan sonra, metanol uzaklaştırılmış ve distile su ile yıkama işlemi yapılmıştır. Filtre kâğıdı kullanılarak kuruması sağlanmıştır.
4. Yükleme jeli çözeltisi, jelleşmesi tamamlanan ayırma jelinin üzerine bir miktar taşacak şekilde doldurulmuştur. Kuyucukları oluşturmak için hızlıca taraklar takılmıştır. Jelleşme tamamlandıktan sonra tarak dikkatli bir biçimde çıkarılmıştır.
5. Örnekleri koyacağımız jel üzerindeki kuyucuklardaki sıvı kuyucuklara dikkat edilerek kurutulmuştur.

6. Camlar stand ile dikkatlice elektroforez hücresine yerleştirilmiştir.
7. Moleküler ağırlık belirleyicisi yerine referans IL-2 çözeltisi ve örnek tamponu 1:1 oranında karıştırılarak 10 µL en baştaki kuyucuğa konulmuştur.
8. 30 µL örnek tamponu ile 30 µL örnek ile karıştırılarak bu örnekten 10 µL jel üzerindeki kuyucuklara mikropipet yardımı ile konulmuştur.
9. Hücrenin içine 125 mL, dışına 375 mL tampon konulduktan sonra güç kaynağına bağlanarak elektroforez işlemi başlatılmıştır.
10. Elektroforez işlemi bittikten sonra, jel dikkatlice camların arasından çıkarılarak boya çözeltisine konulmuştur. Bir saat sonra boya çözeltisinden çıkarılarak yıkama çözeltisine konulmuş ve 24 saat kadar renginin açılması için bekletilmiştir. Rengi açılan jelin fotoğrafı çekilmiştir.

Morfolojik çalışmalar

Formülasyonların morfolojik özelliklerini incelemek için transmisyon elektron mikroskobu (TEM) kullanılmıştır. Bakır grid üzerine önce 1:250 oranında distile su ile seyreltilen 10 µL formülasyon sonra 10 µL %1 a/h fosfotungustik asit çözeltisi damlatılmıştır. Grid oda sıcaklığında kuruduktan sonra 120 kV FEI Technai G2 S TWIN (ABD) ile görüntülenmiştir (TEM görüntülemeleri Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'nda yapılmıştır). Ayrıca formülasyonlar fiziksel olarak da değerlendirilmiştir.

FT-IR analizi

IL-2'nin, formülasyonda kullanılan yağ, sürfaktan, etkin madde içermeyen ve IL-2 yüklü nanoemülsiyon formülasyonların FT-IR analizi ATR yöntemi ile oda sıcaklığında, 4 tekrarlı taramayla elmas yüzeye damlatarak 4000-600 cm^{-1} dalga boylarında Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi yapılmıştır.

DSC analizi

DSC analizi Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi F1 ve F2 formülasyonları için yapılmıştır. IL-2 ve IL-2 içeren formülasyon içermeyen formülasyon ile karşılaştırılmıştır. Etkin

madde ve formülasyon numuneleri 25-90°C sıcaklık aralığında taranarak termogramları alınmıştır. Elde edilen termogram yorumlanmıştır.

Viskozite

Viskozite ölçümlerinde tek noktalı ve çok noktalı ölçüm yapabilen viskozimetreler kullanılmaktadır. Tez çalışmasında viskozite ölçümleri Rheo Sense firmasına ait MicroVisc cihazı ve Brookfield DV-III Rheometer ile yapılmıştır. MicroVisc cihazında sıvıların viskozitesini ölçmek için mikroakışkanlık prensibini kullanılmaktadır. Bu yöntem özellikle küçük hacimde numunelerle çalışmaya olanak sağlaması ve viskozitesi çok düşük olduğu için Brookfield rotasyonel koni viskozimetresi kullanılarak F1 formülasyonunun viskozitesi ölçülemediğinden tercih edilmiştir. 0,5-1 mL arasında formülasyon cihazın özel enjektörüyle alınarak bölmesine yerleştirilmiştir ve viskozite ölçümü oda sıcaklığında yapılmıştır (mPa.s). F2 formülasyonunun viskozimetre ölçümlerinde kullanılan Brookfield rotasyonel dönen mil viskozimetresi Newtonian ve non-Newtonian sıvıları ölçebilmektedir. Örneğe uygun olarak mil seçilmiştir (CP52). Ölçümler 0,5 mL örnek 25±0,1ºC'de su banyosuna bağlanmış plakaya yerleştirilerek gerçekleştirilmiştir (n=3). Ölçüm için cihazın % dönme momenti (% torque) 10'dan küçük olmayacak şekilde ayarlanmıştır. Cihazın yazılım programının (Rheocalc V2.4) verdiği kayma hızına karşı kayma gerilimi sonuçlarına göre viskozite grafikleri çizilerek akış tipi belirlenmiştir.

Yüzey gerilimi ölçümleri

Hazırlanan formülasyonlar için yüzey gerilimi ölçümleri asılı damla (pendant drop) yöntemi kullanılarak Attension® Theta Lite cihazı (Biolin Szientific, Finland) ile gerçekleştirilmiştir. Deney oda sıcaklığında yapılmıştır. Cihazın enjektörüne formülasyon doldurulduktan sonra enjektörün ucu aşağıda olacak şekilde yerleştirilmektedir. Kamera görüntüsü kontrol edilerek enjektör ucunda damla oluşturulmuştur. Oluşturulan damlanın en büyük olabileceği noktada kayıt yapılırken ölçüm yapılmaktadır. Yapılan ölçümler cihaz tarafından Young Laplace denklemi kullanılarak hesaplanmaktadır (Żarska, Dzida ve Apelblat, 2017).

İletkenlik ölçümleri

Elektriksel iletkenliğin belirlenmesi, nanoemülsiyonların karakterizasyonu için basit ve ekonomik bir tekniktir. İletkenlik değeri nanoemülsiyonun sürekli fazının tipini ortaya koymaktadır (Ali ve diğerleri, 2022). Çoklu emülsiyon için hazırlandıktan hemen sonra ve 4-8°C'de saklanan numuneler için dijital kondüktivite (Mettler Toledo Seven2Go Cond meter) kullanılarak iletkenlik testleri yapılmıştır. Çoklu emülsiyonlar için iletkenlik testleri hazırlanır hazırlanmaz, 2. ve 7. gün tekrarlanmıştır. Hazırlanan emülsiyonların iletkenliklerini ölçmek için formülasyon kondüktivite cihazının probunun sığabileceği büyüklükte bir tüpe alınmıştır. Daha sonra kondüktivimetre cihazının probu tüpe daldırılmıştır. Deneyler oda sıcaklığında yapılmıştır. Cihaz kullanılarak µS/cm cinsinden kondüktivite değerleri ölçülerek kaydedilmiştir.

Termodinamik stabilite çalışmaları

Santrifüj testi

Formülasyonlar, 3500 rpm'de 30 dk santrifüj edilmiştir. Bu testi geçen ve monofazik durumu koruyan bu formülasyonlara ısıtma-soğutma döngüsü ve dondurma–çözme döngüsü (freeze thaw) testi uygulanmıştır (Ali ve Hussein, 2017).

Isıtma-Soğutma testi

Formülasyonlar, 4°C ile 40°C arasındaki sıcaklıklara maruz bırakılarak, her biri 48 saatten az olmamak kaydıyla üç döngü boyunca test edilmiştir. Her döngünün sonunda faz ayrışması olup olmadığı kontrol edilerek fotoğrafı çekilmiş, damlacık boyutu, PDİ ve zeta potansiyeli ölçümleri yapılmıştır.

Dondurma-Çözme testi

Santrifüj çalışmasından başarı ile geçen formülasyonlar her bir döngü 48 saatten az olmamak kaydı ile 3 döngü boyunca -20°C ila 25°C arasındaki sıcaklığa maruz bırakılır. Bu döngü sonucunda faz ayrışması olup olmadığı kontrol edilmiş, formülasyonların dayanıklılıkları değerlendirilmiştir.

Ayrıca etkin madde içermeyen ve etkin madde içeren formülasyonların damlacık büyüklükleri döngü öncesi ve sonrasında 250 mL su ile seyreltildikten sonra damlacık boyutu, PDİ ve zeta potansiyeli açısından da incelenmiştir.

Stabilite çalışmaları

Nanoemülsiyonun in vitro stabilitesinin incelenmesi amacıyla formülasyonlar, IL-2 soğuk zincirde saklandığından saklama ortamı olarak seçilen 5°C ± 3°C saklanmıştır. Belirli zaman aralıklarında fiziksel stabilite çalışmalarının da yapılması planlanmıştır ancak analiz yöntemlerinde karşılaşılan problemler dolayısıyla gerçekleştirilememiştir. Formülasyonlarda damlacık boyutları, PDİ ve zeta potansiyel ölçülerek stabilite değerlendirilmesi yapılmıştır. Ayrıca, IL-2 yüklü formülasyonlarda karakterizasyon ve miktar tayini çalışmaları yürütülmüştür.

3.2.6. İn vitro salım çalışmaları

İn vitro salım ortamı olarak çalışmalarda pH 1,2 ve pH 6,8 fosfat tamponu (fizyolojik pH) USP 40'a göre hazırlanarak kullanılmıştır. Slide-A-Lyzer™ Diyaliz kasedi 20 K MWCO (Thermo Scientific™) hazırlanan tampon çözeltisi ile hidrate edilmiştir ve 1 g formülasyon kasetlere enjektör yardımıyla doldurulmuştur. Kasetler 250 mL 37±0,5˚C'de ortamda Resim 3.2'deki gibi yerleştirilerek pH 1,2'de 2 saat ve pH 6,8'de 3 saat tekrarlı (n=3) çalışmalar yapılmıştır.



Resim 3.2. Diyaliz kaset ile yapılan in vitro salım çalışmaları

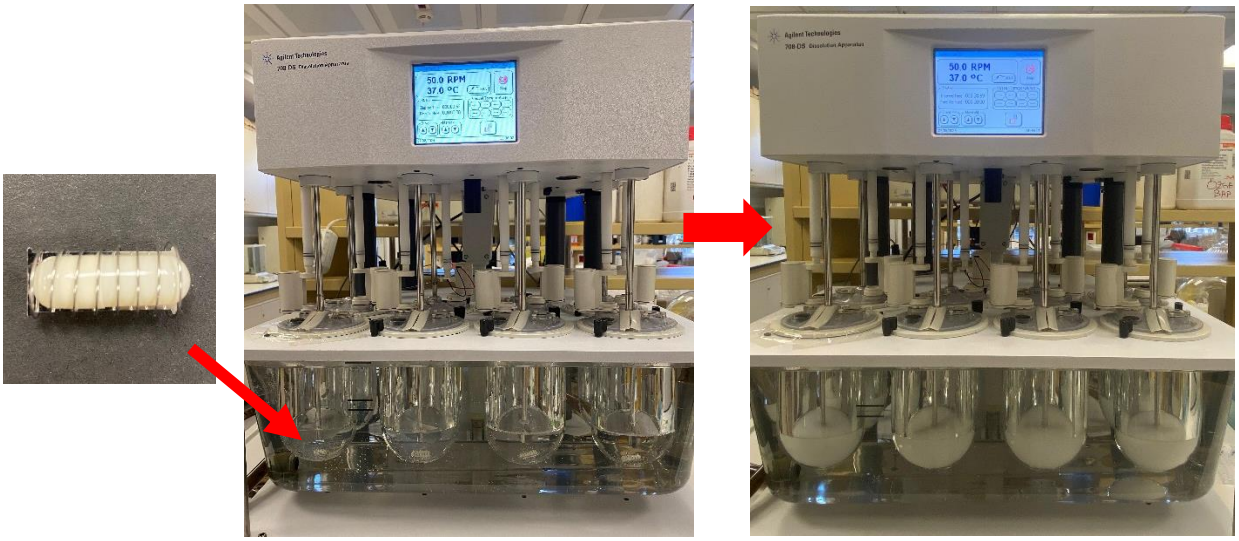
Sonuçlar anlamlı bulunmadığından in vitro salım çalışmaları pH 1,2 ve pH 6,8 tamponu ortamlarına ek olarak pH 6,5 açlık durumunu taklit eden ince bağırsak sıvısı (FaSSIF) ve tokluk durumunu taklit eden ince bağırsak sıvısı (FeSSIF) ortamları da kullanılarak Agilent 708-DS çözünme hızı cihazı ile yeniden gerçekleştirilmiştir. Daha sonra planlanan in vitro salım çalışmalarında, 1 g formülasyon kapsüle (Capsugel Coni-Snap® Size: 00EL) doldurulmuş ve sinker kullanılarak 250 mL ortamda palet yöntemi ile 50 rpm hızında ve 37±0,5˚C'de tekrarlı (n=3) çalışmalar yürütülmüştür (Resim 3.3). İn vitro salım çalışmasında kullanılan ortamlar Çizelge 3.7'de, in vitro salım yöntemi ve koşulları Çizelge 3.8'de sunulmuştur.

Çizelge 3.7. İn vitro salım çalışmasında kullanılan ortamlar

Salım Ortamı	*pH 1,2 tamponu*
KCl	3,73 g
Derişik HCl	8,39 mL
Distile su	ym 1000 mL
Salım Ortamı	pH 6,8 fosfat tamponu
KH_2PO_4	6,8 g
NaOH	0,9 g
Distile su	ym 1000 mL
Salım Ortamı	*FaSSIF (pH 6,5)**
NaOH	0,42 g
$NaH_2PO_4.2H_2O$	2,47 g
NaCl	6,19 g
SIF tozu	2,24 g
Distile su	ym 1000 mL
Salım Ortamı	*FeSSIF (pH 6,5)**
NaOH	0,42 g
$NaH_2PO_4.2H_2O$	2,47 g
NaCl	6,19 g
SIF tozu	2,24 g
Distile su	ym 1000 mL

*Sodyum hidroksit, sodyum fosfat monobazik dihidrat, sodyum klorür gerekli miktarda tartılmış ve 900 mL distile su içerisinde çözünmüştür. Bu çözeltinin pH'ı

ölçülerek gerekli ise 1 M sodyum hidroksit veya 1 M hidroklorik asit çözeltisi ile pH 6,5'e ayarlanmıştır. Tampon hacmi 1 L'ye distile su ile tamamlanmıştır. SIF tozundan gerekli miktar tartılarak pH 6,5 tamponunda çözünmüştür. İki saat bekleme süresinden sonra ortamlar kullanılmıştır.



Resim 3.3. Kapsüle doldurulmuş IL-2 yüklü formülasyon ve palet yöntemi ile gerçekleştirilen in vitro salım çalışmaları

Çizelge 3.8. İn vitro salım yöntemi

Yöntem	USP Cihaz II (Palet yöntemi)
Hız	50 rpm
Salım ortamı	pH 1,2 tamponu, pH 6,8 fosfat tamponu, pH 6,5 FaSSIF ve pH 6,5 FaSSIF
Ortam hacmi	250 mL
Örnek alma noktaları	5, 15, 30, 60, 90, 120, 180 ve 240. Dk
Sıcaklık	37 ± 0,5°C
Analiz yöntemi	ELISA
Dalga boyu	450 nm
Kapsül cinsi	Capsugel® Coni-Snap® 00EL
Kapsül sayısı	3

İn vitro salım ortamları, çözünme hızı cihazına ait cam kaplara doldurulmuş ve 37 ± 0,5°C sıcaklığa getirilmiştir. F2 formülasyonu 1 g tartılarak 00EL sert jelatin kapsüllere (Capsugel® Coni-Snap®) konulmuştur. Paletler cam kabın tabanından 2,5 cm yüksekte olacak şekilde ayarlanarak çalışma başlatılmıştır. Çalışma süresince

5, 15, 30, 60, 90, 120, 180 ve 240. dakikalarda çözünme ortamından 500 µL örnek alınmıştır. Alınan her örnek için 500 µL çalışılan çözünme ortamı ilave edilmiştir. Örnekler %5 Triton-X ile seyreltilerek ELISA kiti ile analiz edilmiştir (Aktas, Celik-Tekeli ve Celebi, 2020). Elde edilen sonuçlar zamana karşı %kümülatif çözünen IL-2 miktarı olarak grafiklenmiştir.

3.2.7. İn vitro sindirim çalışması

İn vitro sindirim (lipoliz) çalışması pH-stat modeli kullanılarak Titrando 902, Metrohm® ototitratör cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Cihaz Titrando 802 karıştırıcı, Ti 804 stant, ısıtma ceketli cam deney haznesi, pH elektrodu ve 800 Dosino dozlama ünitesinden oluşmaktadır. Cihaz Tiamo V2 yazılımı ile kontrol edilmektedir. İn vitro sindirim çalışması ile aprotinin içeren IL-2 yüklü F2 nanoemülsiyon formülasyonunun sindirimi incelenmiştir. Ayrıca formülasyondaki lipit yapılı maddelerin sindirimleri sonucu kolay erişilebilir hale gelen IL-2'nin stabilitesi miktar tayini ile incelenmiştir.

İn vitro sindirim çalışmasında 0,75 mM fosfolipit ve 3 mM sodyum taurokolat içeren tampon ortamı kullanılmıştır Tampon ortamı 10,5 mM sodyum hidroksit, 29 mM sodyum dihidrojen fosfat dihidrat, 106 mM sodyum klorür, 1,4 mM kalsiyum klorür dihidrat içermektedir. Tampon ortamını hazırlamak için gerekli bileşenler istenen miktardaki distile suyun bir kısmında çözülmüş, pH 6,5 için ayarlama 1 M NaOH veya 1 M HCl çözeltisi ile yapılmıştır. Tampon istenen hacme tamamlandıktan sonra gerekli miktar SIF tozu eklenerek 0,75 mM fosfolipit ve 3 mM sodyum taurokolat içeren sindirim ortamı iki saat bekleme süresinin ardından hazır hale gelmiştir (Timur ve diğerleri, 2022).

Sindirim ortamından 40 mL Titrando 902, Metrohm® ototitratör cihazının cam haznesine yerleştirilmiş ve 37 ± 0,5°C sıcaklığa kadar ısıtılmıştır. Çalışmaya başlanmadan önce sindirim ortamının pH'ı 1 M NaOH ile cihaz tarafından otomatik olarak pH 7,5'e ayarlanmıştır (Berben ve diğerleri, 2019). Kullanılan enzim (*Thermomyces lanuginosus* lipaz A) için optimum pH 11 olarak belirtilmiştir (Mogensen, Sehgal ve Otzen, 2015). Ancak bu değer gastrointestinal sistemi taklit eden bir pH değeri değildir. Yapılan literatür araştırmalarına göre ortam pH'ının 7,5

olarak ayarlanması uygun görülmüştür (Ejskjær ve diğerleri, 2024). Sindirim ortamına 0,1 g (25.000 IU; 2,5 µg) IL-2 yüklü nanoemülsiyon formülasyonu eklenerek 30 dakika boyunca disperse edilmiştir. Aynı ortama 571 U/mL aktiviteye sahip olacak şekilde *Thermomyces lanuginosus* lipaz A (Lipaz A, Lipozyme® TL 100 L, Strem Chemicals) eklenmesi ile sindirim başlatılmıştır. Formülasyon sindirimi sonucu açığa çıkan yağ asitleri ototitratör tarafından 0,1 M NaOH ile titre edilerek ortam pH'ı pH 7,5'te sabit tutulmuştur. Sindirim boyunca harcanan NaOH miktarı kaydedilmiş ve lipoliz oranı hesaplanmıştır. Lipoliz oranının hesaplanması için aşağıdaki Eş. 3.1 ve Eş. 3.2 kullanılmıştır.

$$Teorik\ yağ\ asidi\ (mmol) = \frac{Yardımcı\ maddenin\ saponifikasyon\ değeri\ (mg\ KOH/g)}{56{,}1056\ (g/mol)} \quad (3.1)$$

$$Sindirim\ oranı\ (\%) = \frac{V_{NaOH}\ x\ M_{NaOH}}{Formülasyondaki\ toplam\ teorik\ yağ\ asidi\ (mmol)}\ x\ 100 \quad (3.2)$$

Formülasyonda kullanılan yardımcı maddeler için teorik yağ asidi miktarları ayrı ayrı olacak şekilde yardımcı maddenin teknik veri dosyasında sunulan ortalama saponifikasyon değeri kullanılarak hesaplanmıştır (Arnold, Imanidis ve Kuentz, 2012).

Sindirim ortamında Lipaz A eklenmeden hemen önce (0. dk) ve 1, 3, 5, 7, 10, 12, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120. dakikalarda 100 µL örnek alınmıştır. Örneklere 1 µL 1 M HCl ilave edilerek örnek pH'ının 6'ya düşmesi sağlanmış ve Lipaz A aktivitesi pH'a bağlı olarak durdurulmuştur (Skjold-Jørgensen, Vind, Svendsen ve Bjerrum, 2014). Örnekler vortekslendikten sonra %5 Triton-X ile uygun seyreltmeler yapılarak ELISA kiti ile analiz edilmiştir. Zamana karşı %IL-2 miktarı ve sindirim oranı (%) grafiklenmiştir.

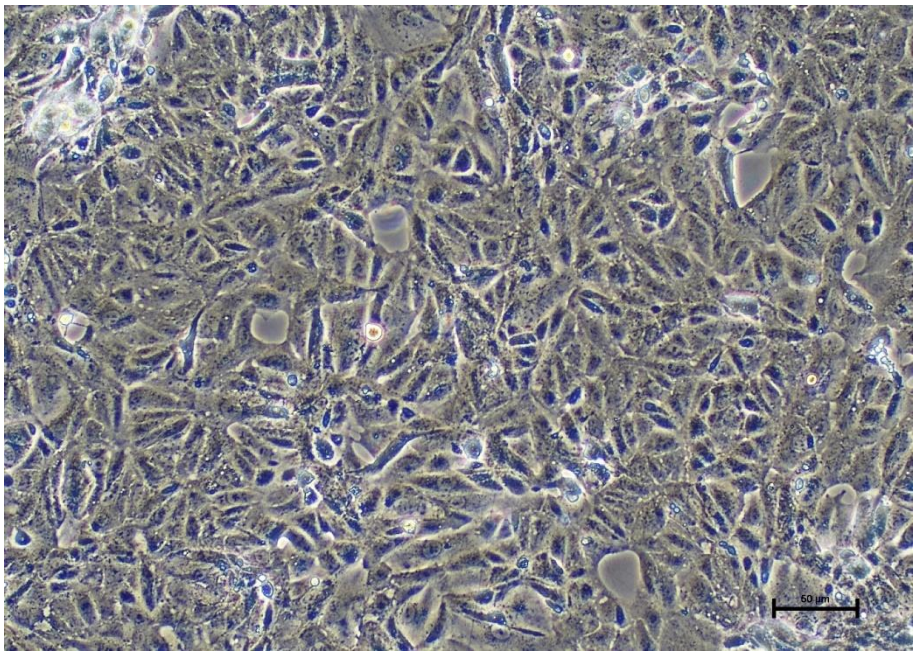
Formülasyon içermeyen sindirim ortamı kullanılarak kör titrasyon yapılmıştır. Kör titrasyonda sindirim ortamındaki fosfolipit ve sodyum taurokolattan kaynaklı harcanan 0,1 M NaOH değeri belirlenmiştir. Bu değer formülasyon sindiriminde kaydedilen 0,1 M NaOH değerinden çıkarılarak sindirim oranı hesaplarında

kullanılmıştır (Yılmaz-Usta, Timur ve Teksin, 2022). Tüm çalışmalar 3 paralel olarak yürütülmüştür.

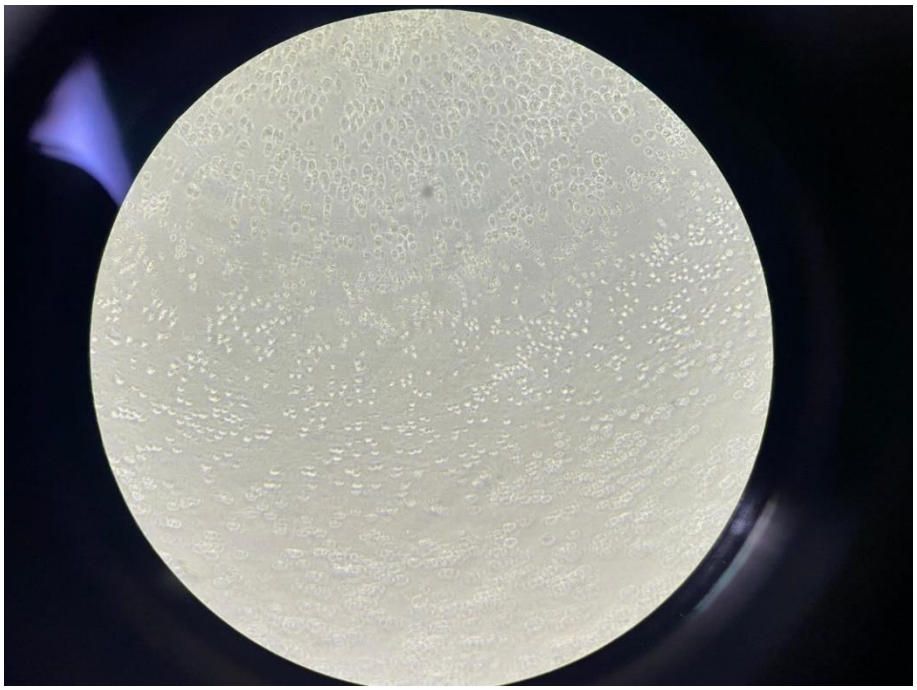
3.2.8. Hücre kültürü çalışmaları

Hücre kültürü çalışmaları kanser araştırmalarında önemli bir yere sahiptir. Deney hayvanları kullanmadan antitümoral aktiviteyi değerlendirmek için halihazırda kullanılan 60'tan fazla böbrek kanseri hücre hattı bulunmaktadır (Sobczuk ve diğerleri, 2020). Tez kapsamında hazırlanan nanoemülsiyon formülasyonların etkililik ve güvenliliklerini belirlemek amacıyla 2B ve 3B hücre kültürü çalışmaları yapılarak sonuçlar değerlendirilmiştir. Hücre kültürü çalışmaları Hacettepe Üniversitesi Aşı Enstitüsü Aşı Ar-Ge Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Hücre kültürü çalışmaları, A498 insan renal karsinoma hücre hattı ve PBMC insan periferik kan mononükleer hücresi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Resim 3.4 ve Resim 3.5). A498 hücreleri %10 fetal sığır serumu (FBS) ve %1 penisilin/streptomisin içeren Dublecco' s Modified Eagle Medium (DMEM) içinde, PBMC hücreleri ise %10 FBS, %1 Penisilin/streptomisin ve RPMI-1640 içinde %5 CO_2 ve 37°C'de kültüre edilmiştir. Hücre kültürü çalışmalarında sadece besiyeri içeren hücreler kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

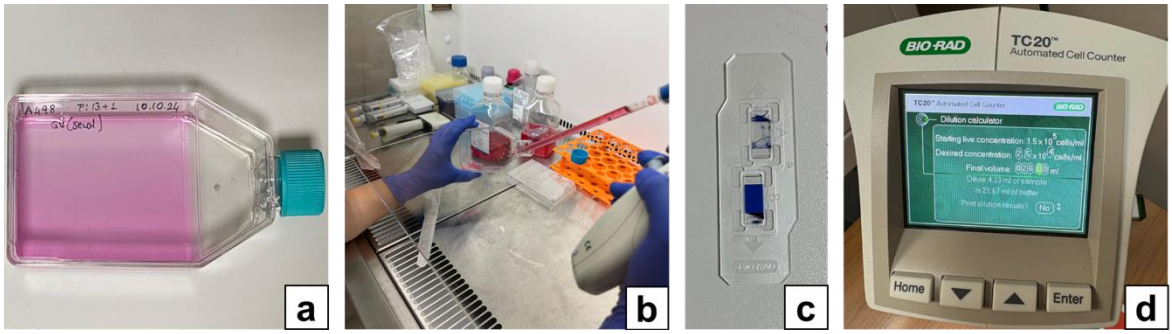


Resim 3.4. A498 insan renal karsinoma hücrelerinin mikroskop görüntüsü (x40)



Resim 3.5. PBMC hücrelerinin mikroskop görüntüsü (x40)

Yapılan çalışmalarda 75 cm^2'lik flasktaki hücre sayısını belirlemek için canlı hücre zarından geçemeyen ancak ölü hücre zarından geçerek maviye boyayan tripan mavisi ile hücreler 1:1 oranında karıştırılmıştır. Boyama sonucu ölü hücreler boyanırken canlı hücreler şeffaf halde görünmektedir. 1:1 oranındaki karışım hücre sayım plakasına dolacak şekilde eklenmiştir. Plaka, Bio-Rad TC20™ hücre sayım cihazına yerleştirilerek mL'deki hücre sayısı cihaz tarafından gerçekleştirilmiştir (Resim 3.6).

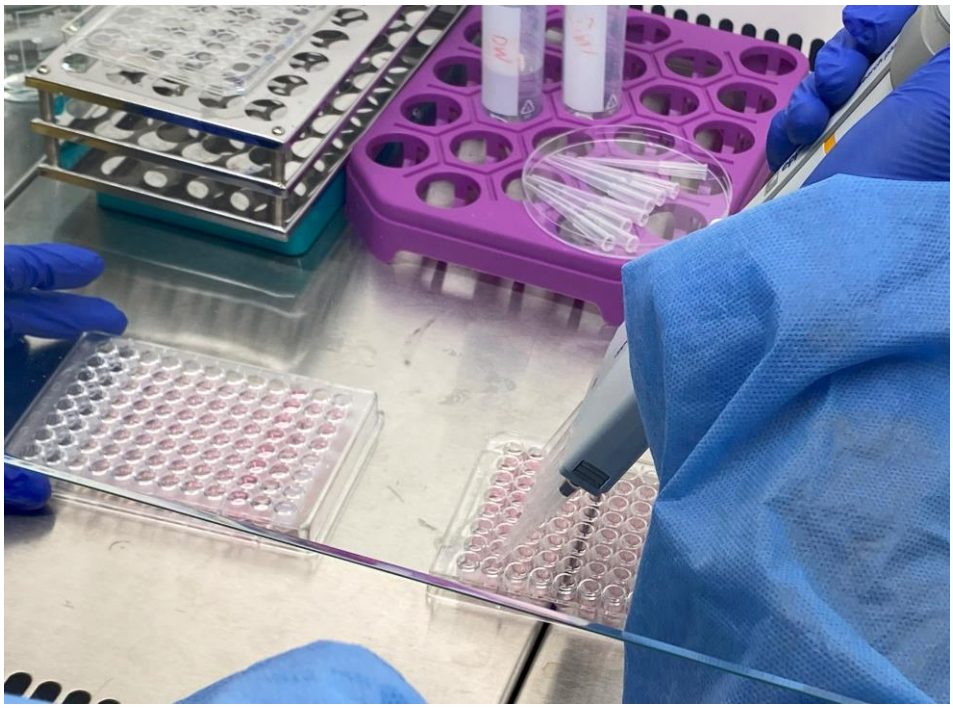


Resim 3.6. Hücre kültürü çalışmaları a) A498 hücre flaskı b) 75 cm^2'lik flaska besiyeri ilavesi c) Hücre sayım plakası d) Hücre sayımının yapılması.

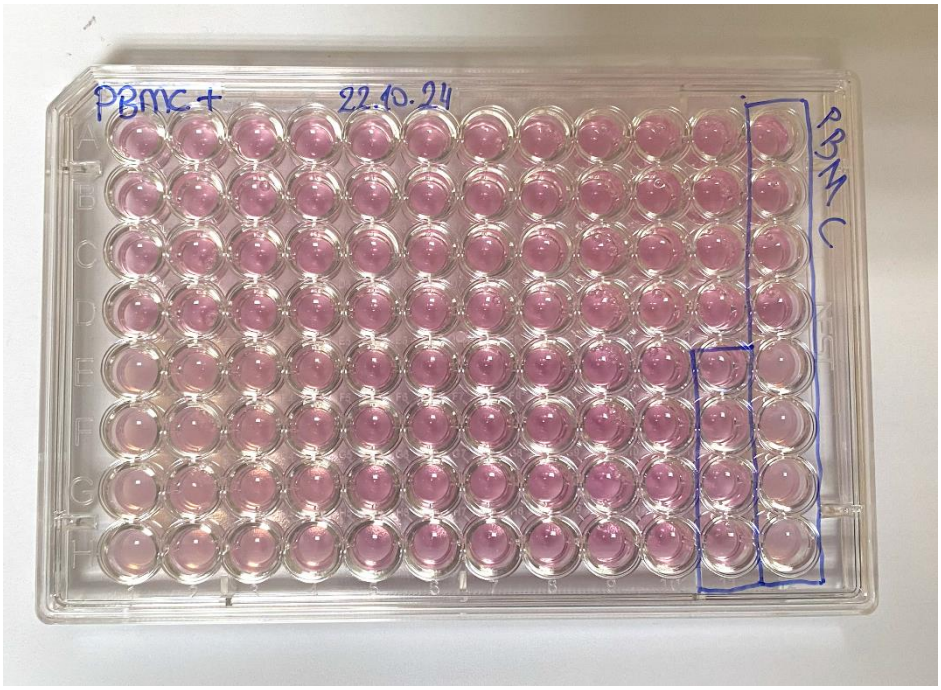
Okunan değere bağlı olarak gerekli hesaplamalar yapılarak 75 cm^2 flasktan gereken miktarda hücre alınıp besiyeri ile gerekli hacme tamamlanmıştır. Hazırlanan stok hücre çözeltisinden 100 µL alınarak, hücreler 96 kuyucuklu plakalara her bir kuyucuğa ekilmiş ve hücrelerin tutunması için 24 saat inkübe edilmiştir.

Nanoemülsiyon formülasyonlarındaki IL-2'nin biyolojik aktivitesinin belirlenmesi

Nanoemülsiyon hazırlanması sırasında IL-2'nin biyolojik aktivitesinde azalma olup olmadığını belirlemek amacıyla PBMC hücrelerinde proliferasyon çalışması yapılmıştır. Bu amaçla, PBMC yukarıda belirtilen RPMI-1640 besiyeri içinde her bir kuyuda 2 x 10^4 hücre olacak şekilde U-tabanlı 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına ekilmiştir. Hazırlanan nanoemülsiyonlardan salınan IL-2 ve normal IL-2 çözeltileri 0,01 nM - 10 µM aralığında seri dilüsyonlar yapılarak hücrelere eklenmiş ve hücreler 37°C'de %5 CO_2'de 48 saat inkübe edilmiştir (Resim 3.7- 3.8).



Resim 3.7. IL-2 yüklü nanoemülsiyonun ve IL-2 çözeltisinin 96 kuyucuklu plakada PBMC hücrelerine uygulanması.



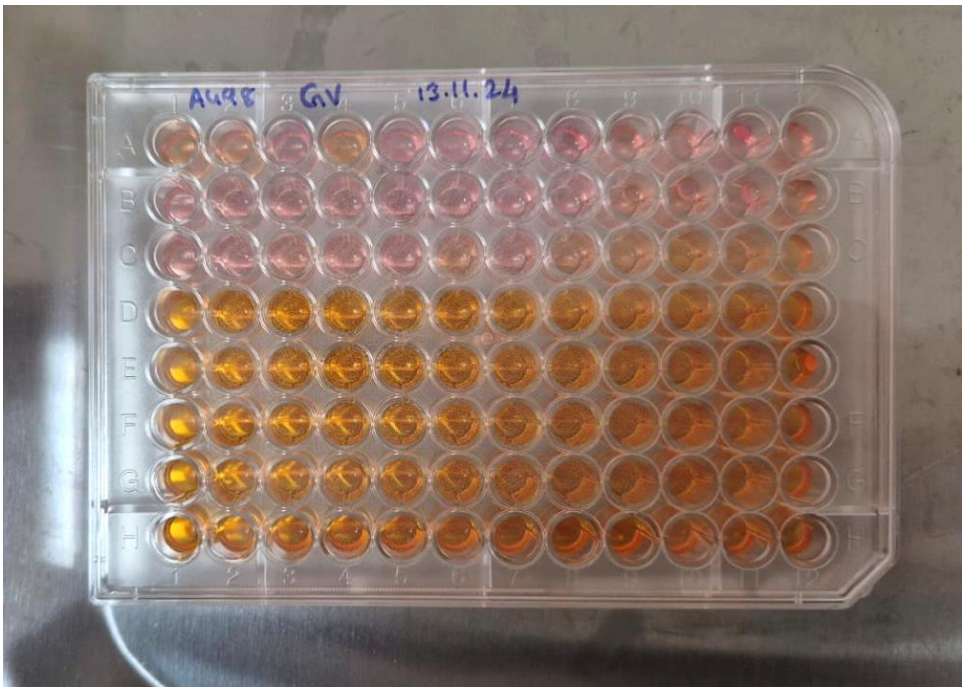
Resim 3.8. 96 kuyucuklu plakada PBMC hücrelerine uygulanan IL-2 yüklü nanoemülsiyonu ve IL-2 çözeltisinin görünümü

İnkübasyon sonrası hücre canlılığı, proliferasyonu ve sitotoksisite değerlendirmelerinde kullanılan WST-1 testi (2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolyum) uygulanmıştır. Bu test hücre metabolizmasının bir göstergesi olan mitokondriyal dehidrojenazların aktivitesine bağlı olarak tetrazolyum tuzu WST-1'in suda çözünür bir formazan boya haline indirgenmesini temel almaktadır. Bu reaksiyon, sadece metabolik olarak aktif hücrelerde meydana gelir ve oluşan boya miktarı, hücre sayısı veya canlılık düzeyiyle doğru orantılıdır. İnkübasyon sonunda kuyucuklara protokole göre WST-1 eklenerek 3 saat inkübe edilmiş ve hücre canlılığı mikroplaka okuyucu ile 450 nm'de analiz edilmiştir (Dehghan ve diğerleri, 2022). Nanoemülsyonlara yüklenen ve serbest IL-2'nin PBMC hücrelerinin proliferasyonuna etkisi doz bağımlı etkisi karşılaştırmalı olarak belirlenmiş ve nanoemülsiyonlardaki IL-2'nin biyolojik aktivite bütünlüğü belirlenmiştir.

<u>Konvansiyonel hücre kültürü çalışmalarında antikanser etkinliğin belirlenmesi</u>

Hazırlanan nanoemülsiyon formülasyonunun antikanser etkinlikleri ilk olarak PBMC ve A498 hücrelerinin ko-kültürü ile yapılan çalışmayla belirlenmiştir. Ko-kültür çalışmalarında PBMC hücreleri efektör hücre, A498 hücreleri ise hedef hücre olarak

kullanılmıştır. PBMC'ler nanoemülsiyon formülasyonlarındaki IL-2'nin biyolojik aktivitesinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmalarda belirlenen oranlarda IL-2 içeren nanoemülsiyon ve IL-2 çözeltileri ile 48 saat boyunca inkübe edilerek uyarılmıştır. Ardından 1 x 10^6 hücre/mL A498 hücresi ve nanoemülsiyon veya serbest IL-2 çözeltisi ile uyarılan PBMC'ler, 1:1, 1:5 ve 1:10 (A498:PBMS) oranında 96 kuyucuklu düz tabanlı hücre kültürü plakalarındaki A498 hücrelerine eklenerek 24 saat boyunca ko-kültürasyon yapılmıştır. Çalışmada sadece besiyeri ile inkübe edilen hücreler ise kontrol grubu olarak kullanılmış ve canlılıkları %100 olarak kabul edilerek nanoemülsiyon veya serbest IL-2 çözeltisi ile inkübe edilen gruplardaki hücre canlılığı WST-1 ile boyama yapılarak 3 saat inkübasyondan sonra 450 nm'de mikroplaka okuyucu ile deteksiyonuna göre belirlenmiştir (Dehghan ve diğerleri, 2022) (Resim 3.9).



Resim 3.9. WST-1 ile inkübe edilen plakanın görünümü

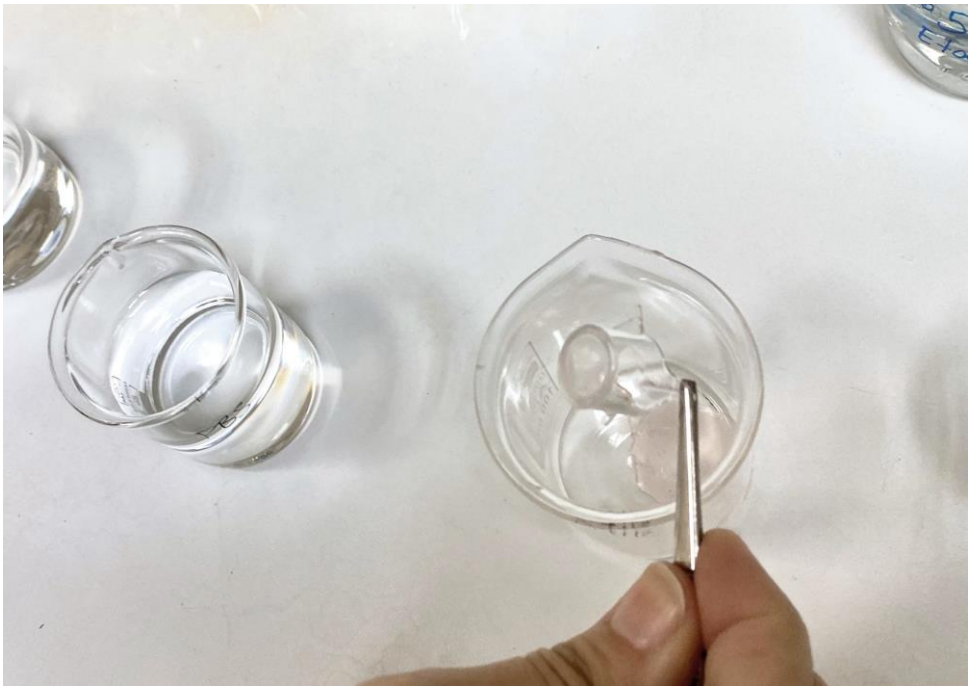
Migrasyon çalışması

Hazırlanan formülasyonların immün hücrelerin kanser hücrelerine göçü üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla transwell migrasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla, 12 kuyucuklu hücre kültür plakalarına kanser hücrelerinin ($4x10^4$) ekimi gerçekleştirilmiştir. Ardından hazırlanan formülasyonlarla veya serbest IL-2 çözeltisiyle uyarılan veya uyarılmamış PBMC hücrelerinin ($1,5x10^5$ hücre) ekiminin

yapıldığı 5 µm por açıklığına sahip polikarbonat insertler kuyucuklara yerleştirilmiştir. 37 °C'de 24 saat inkübasyon sonrası transwell dikkatlice kaldırılarak uygulanan formülasyon ve çözelti dökülmüş ve PBS ile 2 defa yıkanmıştır. Göç eden hücreler %4 paraformaldehit ile 2 dk oda sıcaklığında inkübe edilerek sabitlenmiş ve paraformaldehit uzaklaştırılarak tekrar PBS ile 2 defa yıkanmıştır. Hücreler metanol ile 20 dk oda sıcaklığında fikse edilmiştir ve metanol uzaklaştırılarak tekrar PBS ile 2 defa yıkanmıştır. %0,1 kristalviyole ile boyanarak 15 dk oda sıcaklığında ışıktan korunarak inkübe edilmiştir. Süre sonunda transwell üzerindeki kristal viyole dökülmüş ve tekrar PBS ile 2 defa yıkanmıştır. Bu aşamadan sonra kalan boya pamuklu çubuk yardımı ile uzaklaştırılarak sonra mikroskopta görüntülenmiştir (Liu ve diğerleri, 2020; Pramil ve diğerleri, 2021) (Resim 3.10 ve Resim 3.11).



Resim 3.10. 12 kuyucuklu plakada polikarbonat insertler kullanılarak gerçekleştirilen migrasyon çalışması



Resim 3.11. Migrasyon çalışmasında polikarbonat insertün PBS tampon ile yıkanması işlemi

3B hücre kültürü çalışmalarında antikanser etkinliğin belirlenmesi

Konvansiyonel hücre kültürü yöntemlerinde, kültürdeki hücreler tümör mikroçevresinden ve diğer hücre tipleri ile etkileşimden yoksun kaldığı ve bu nedenle karsinogenez veya metastaz aşamalarını incelemeye izin vermediğinden 3B hücre kültürü gibi yeni tekniklerin kullanımı gerekmektedir. 3B hücre kültürü yöntemleri kullanılarak büyütülen 3B tümör hücreleri, bir tümör hücresinin in vivo ortamını in vitro olarak yansıtabilme yetenekleri nedeniyle tümör hücresi biyolojisi araştırmalarında büyük önem kazanmıştır (Jensen ve Teng, 2020). 3B hücre kültürünün, 2B hücre kültürüne göre artmış hücre-hücre etkileşimi, doğal hücre morfolojisi ve gerçekçi hücresel cevap gibi üstünlükleri vardır. Formülasyonun antitümoral aktivitesini değerlendirmek için deney hayvanlarında tümör geliştirmek yerine hücre serileriyle bu çalışmaları yaparak kullanılacak deney hayvanı sayısını azaltmayı ve deney sonuçlarına göre sonraki çalışmalarda tümör modeli geliştirme ihtiyacının değerlendirilmesi düşünülmektedir. Bu kapsamda, A498 ve PBMC hücrelerinin Matrigel varlığında ko-kültürü ile 3B küresel tümör modeli çalışmaları yapılmıştır. Ardından bu ortama uygulanan nanoemülsiyon formülasyonlarının antitümöral etkisi belirlenmiştir. 3B küresel tümör modeli hazırlamada ekstrasellüler matriksi taklit etmek için Matrigel basement membrane matrix kullanılmıştır.

Matrigel, hücre kültürlerinde hücrelerin büyümesini, farklılaşmasını ve organoidlerin oluşumunu desteklemek için kullanılan bir ekstraselüler matriks modelidir. Genellikle, fare tümör proteinleri açısından zengin bir tümör olan Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) fare sarkomundan elde edilen çözündürülmüş standardize bir bazal membran preparatıdır (Corning Incorporated, 2024).

İlk olarak A498 hücrelerinin ekiminin yapılacağı U-tabanlı plakalar poli-Hema ile kaplanarak adheren olmayan bir yüzey hazırlanmıştır. Bu sayede hücrelerin birbirleriyle ve PBMC hücreleriyle etkileşimi artırılmıştır. %95'lik etanol içinde 30 mg/mL poli-HEMA çözeltisi hazırlanarak plakaların herbir kuyucuğuna 50 µL eklenerek gece boyunca steril olarak laminar flow altında etanolün uçması için kapakları açık bekletilmiştir. Ardından A498 hücreleri %3 (h/h) Matrigel içeren besiyeri içinde kuyucuklara ekimi yapılmıştır ($5x10^3$ hücre/ 200 µL). Plaka rotorlu santrifüjde 1000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek hücrelerin bir araya toplanması desteklenmiş ve sferoit oluşumu için 7 gün süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinden sonra 0,01 nM - 10 µM aralığında önceden belirlenen 3 farklı konsantrasyonda uygulanmak üzere IL-2 içeren nanoemülsiyon formülasyonu ve serbest IL-2 çözeltisi ile uyarılmış PBMC hücreleri (1:1, 1:5 ve 1:10 oranında) A498 sferoitlerine ilave edilmiş ve 48 saat süreyle inkübe edilmiştir (Rausch, Blanc,De Souza Silva, Dormond, Griffioen Nowak-Sliwinska, 2021; Varan, Patrulea, Borchard ve Bilensoy, 2018; Varan ve diğerleri, 2021a,b). Sadece besiyeri ve uyarılmamış PMBC içeren grup kontrol grubu olarak kullanılmıştır. IL-2 yüklü nanoemülsiyonların sitotoksisite potansiyeli böbrek kanseri hücre hattında Laktat Dehidrogenaz (LDH) Aktivitesi tayini ile belirlenmiştir. LDH, hücre plazma zarı hasarını değerlendirmek için kullanılan bir yöntemidir. Bu yöntem, hasarlı hücrelerden salınan LDH aktivitesinin ölçümüne dayalı olarak sitotoksisiteyi hızlı ve basit bir şekilde nicelleştirme sağlar. LDH, tüm hücre tiplerinde bulunan ve plazma zarının hasar görmesi üzerine hücre kültürü ortamına hızla salınan stabil bir enzimdir. LDH aktivitesi, birleşik bir enzimatik reaksiyonla belirlenebilir: LDH, laktatı pirüvata okside eder ve bu da tetrazolyum tuzu INT ile reaksiyona girerek formazan oluşturur. Kültür süpernatantında üretilen formazan miktarındaki artış, doğrudan liziz edilmiş hücrelerin sayısındaki artışla orantılıdır (Eurodiagnostico, 2024). Bu çalışma için ticari olarak temin edilen kit kullanılarak IL-2 yüklü nanoemülsiyonlarla ve IL-2 çözeltisi ile muamele edilmiş hücrelerin LDH salımı sadece besiyeri ile inkübe

edilmiş kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak belirlenmiştir. Çalışma sırasında pozitif kontrol grubu olarak sitotoksik olduğu bilinen %1 Triton X-100 ile muamele edilen hücre grubu kullanılmıştır (Varan ve diğerleri, 2021b). Elde edilen sonuçlara göre LDH aktivitesine bağlı olarak nanoemülsiyon formülasyonlarının sitotoksisitesi belirlenmiştir. Bu kapsamda n=4 tekrarlı olarak çalışılmış ve elde edilen bulgular istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

3B hücre kültürü çalışmalarında tümöral penetrasyon özelliklerinin belirlenmesi

Antikanser etkinlik çalışmasında kullanılan yöntemle hazırlanan 3B sferoitlerde nanoemülsiyon formülasyonlarının tümöral penetrasyon özelliklerini belirlemek amacıyla nil kırmızısı yüklü emülsiyonlar hazırlanmıştır. Sferoitler, IL-2 yerine nil kırmızısı yüklü nanoemülsiyonlar ve nil kırmızısı çözeltisi ile inkübe edildikten sonra floresans mikroskobu ile görüntülenmiştir (Varan ve diğerleri, 2018; Varan ve diğerleri, 2021b).

3.2.9. İstatistiksel değerlendirmeler

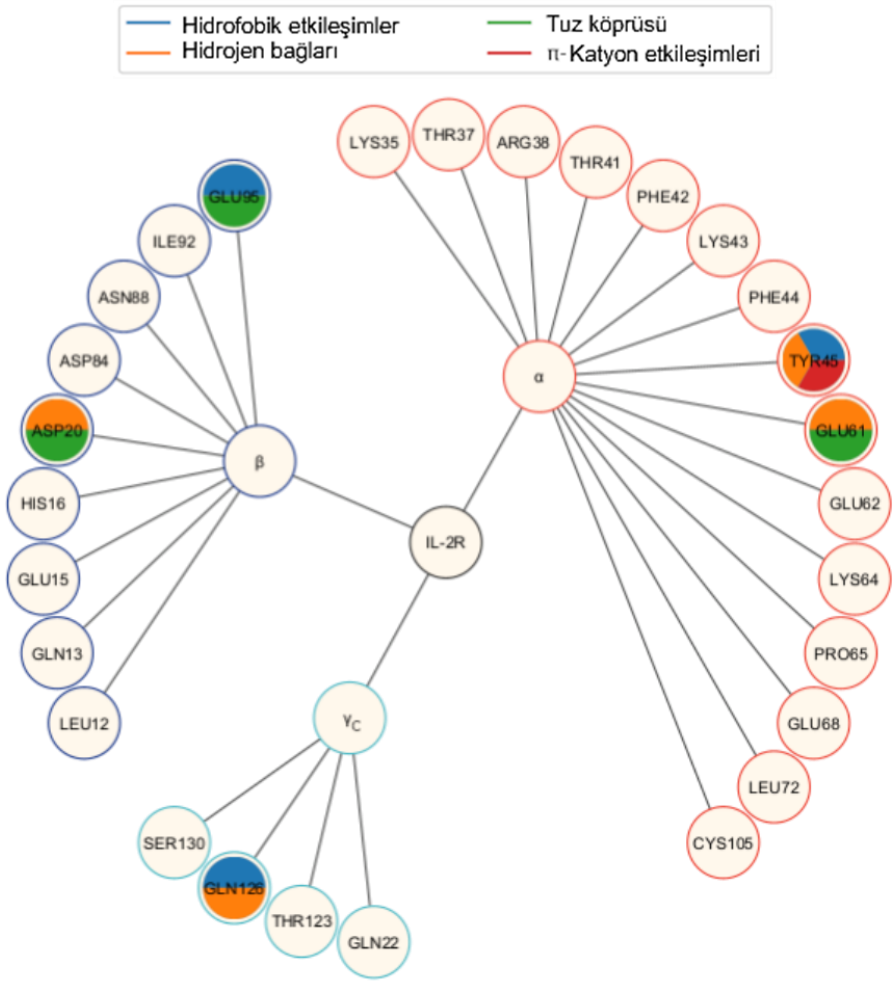
İstatistiksel analizler GraphPad Prism 9 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmalardan elde edilen verilerde, iki grup arasındaki karşılaştırmalar için Student t testi, birden fazla grup arasındaki karşılaştırmalar için ise tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulanmıştır. Gruplar arasındaki farklılıkları belirlemek amacıyla Tukey HSD post-hoc testi kullanılmıştır. Anlamlılık düzeyi $\alpha = 0,05$ olarak belirlenmiş olup, $p<0,05$ olduğunda gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. İn Siliko Moleküler Dinamik Çalışmaları

İn siliko moleküler dinamik çalışmaları Bölüm 3.2.1'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

IL-2'nin IL-2R'lere bağlanma bölgeleri 2ERJ (Şekil 2.3) yapısı üzerinde incelenmiştir. Bu analizde, etkileşimde yer alan ilgili yüzey amino asitleri ve bu amino asitler ile IL-2 reseptörleri arasında oluşan bağ tipleri belirlenerek ilgili yüzey amino asitlerinin ayrıntılı listesi ve karşılık gelen bağ tipleri de dahil olmak üzere sonuçlar Şekil 4.1 ve Çizelge 4.1'de sunulmuştur.

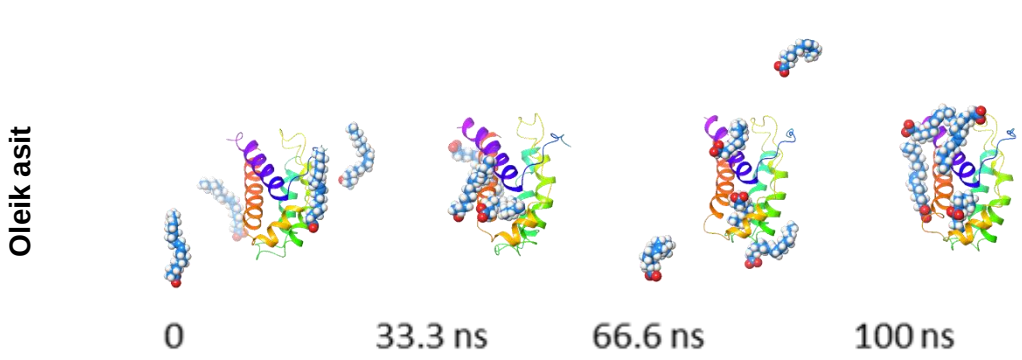


Şekil 4.1. IL-2R ile etkileşime giren IL-2'nin yüzey aminoasitleri ve etkileşim türleri

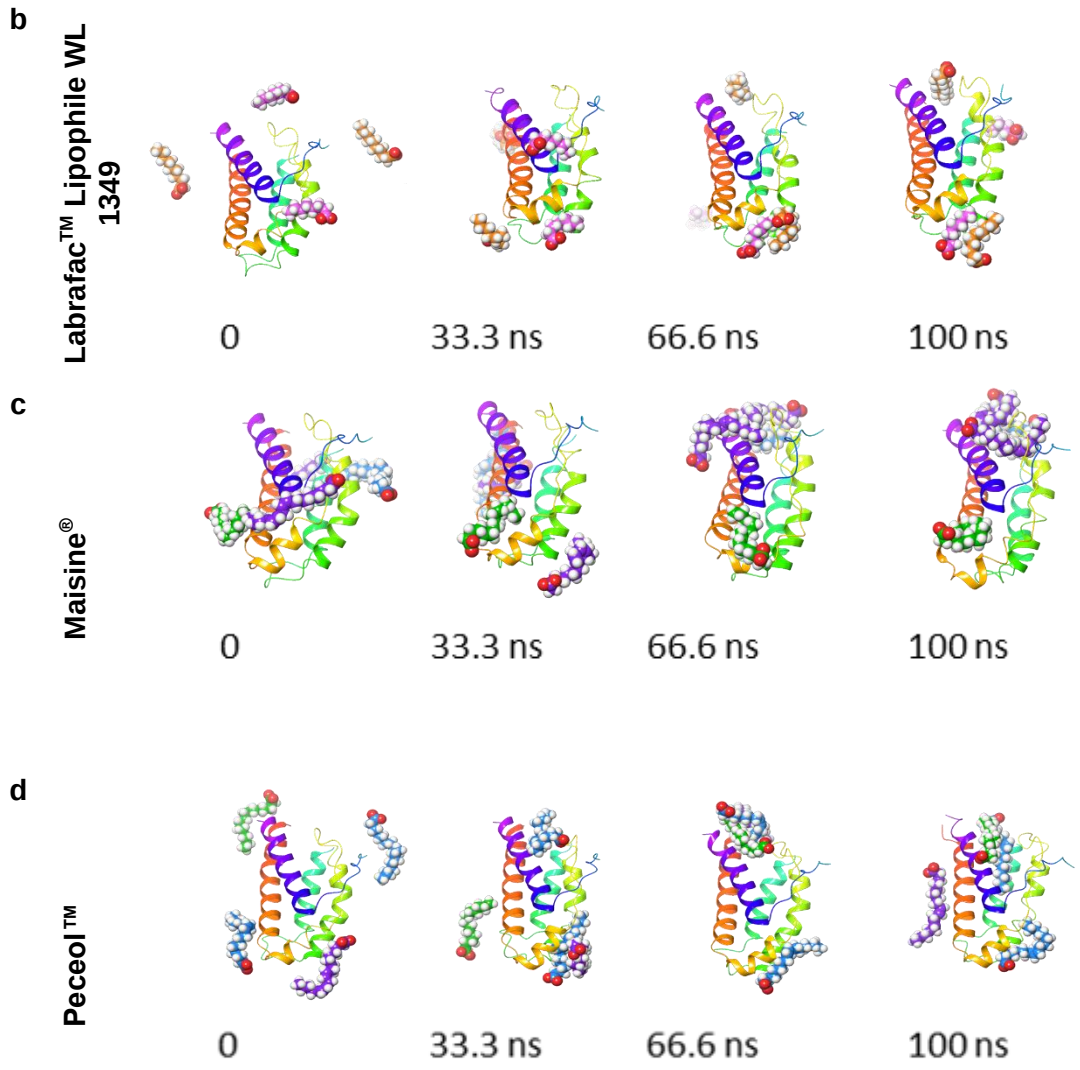
Çizelge 4.1. IL-2'nin X-ray ile elde edilen IL-2R alt birimleriyle etkileşim bölgeleri ve etkileşim tipleri (PDB kodu: 2ERJ)

IL-2	IL-2R	Gözlenen etkileşim türleri
Lys 35	α	Hidrofobik Etkileşim
Thr 37	α	Hidrojen Bağları
Arg 38	α	Hidrojen Bağları, Tuz Köprüsü
Thr 41	α	Hidrojen Bağları
Phe 42	α	Hidrofobik Etkileşim
Lys 43	α	Hidrojen Bağları
Phe 44	α	Hidrofobik Etkileşim
Tyr 45	α	Hidrofobik Etkileşim, Hidrojen Bağları, π-Cation Etkileşim
Glu 61	α	Hidrojen Bağları, Tuz Köprüsü
Glu 62	α	Tuz Köprüsü
Lys 64	α	Hidrojen Bağları
Pro 65	α	Hidrofobik Etkileşim
Glu 68	α	Hidrojen Bağları
Leu 72	α	Hidrofobik Etkileşim
Cys 105	α	Hidrojen Bağları
Leu 12	β	Hidrofobik Etkileşim
Gln 13	β	Hidrofobik Etkileşim
Glu 15	β	Tuz Köprüsü
His 16	β	Hidrofobik Etkileşim
Asp 20	β	Hidrojen Bağları, Tuz Köprüsü
Asp 84	β	Tuz Köprüsü
Asn 88	β	Hidrojen Bağları
Ile 92	β	Hidrofobik Etkileşim
Glu 95	β	Hidrofobik Etkileşim, Tuz Köprüsü
Gln 22	γ	Hidrojen Bağları
Thr 123	γ	Hidrofobik Etkileşim
Gln 126	γ	Hidrofobik Etkileşim, Hidrojen Bağları
Ser 130	γ	Hidrojen Bağları

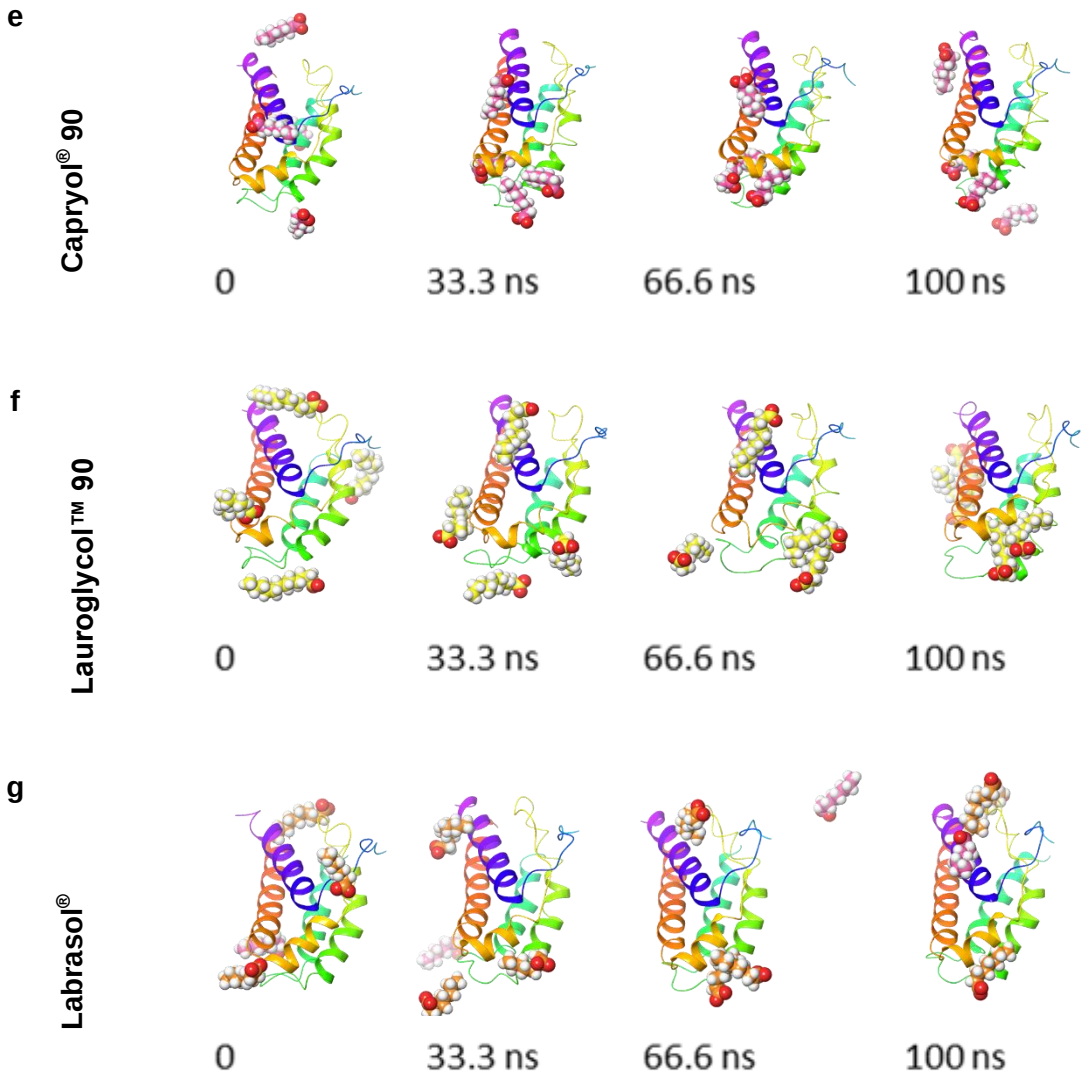
IL-2 ile yardımcı maddeler arasındaki 100 ns'lik etkileşimlere ait 0, 33,3, 66,6, ve 100 nanosaniyelerde oluşturulan görseller Şekil 4.2'de sunulmuştur. Bu simülasyonlara ait etkileşim analizleri Çizelge 4.2 - 4.9'da özetlenmiştir. Çizelgelerde yardımcı maddeler ile IL-2 arasında %10 ve üzerindeki etkileşimler raporlanmıştır. RMSD (Root Mean Square Deviation; Kök Ortalama Kare Sapması), moleküler sistemin zaman içerisindeki yapısal stabilitesini değerlendirirken, RMSF (Root Mean Square Fluctuation; Kök Ortalama Kare Fluktuasyonu), her bir kalıntının dinamik esnekliğini ortaya koymaktadır. RMSD analizi, proteinin genel yapısal stabilitesini ve zaman içerisindeki yapısal değişimlerini incelerken, RMSF analizi, proteindeki kalıntıların yerel esnekliğini ve hareketliliğini değerlendirmektedir. Bu analizlerin sonuçları sırasıyla Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'te sunulmuştur.



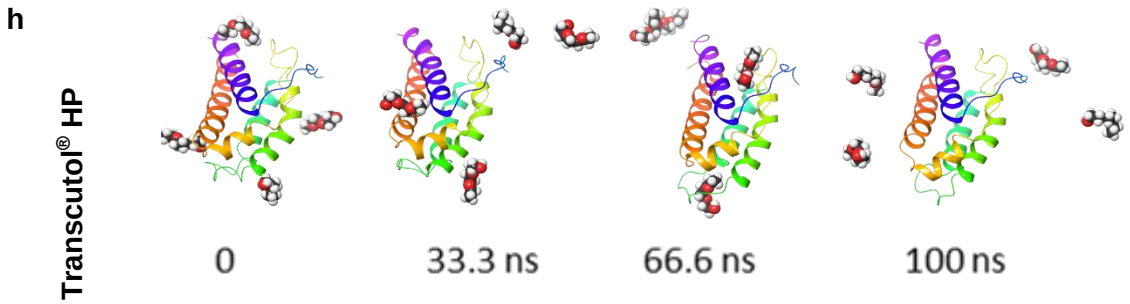
Şekil 4.2. Yardımcı madde ve IL-2 simülasyonlarından kesitler a. Oleik asit (Oleik asitin karbon atomları mavi renkle gösterilmiştir.) b. Labrafac™ Lipophile WL 1349 (Kaprik ve kaprilik asitin karbon atomları sırasıyla turuncu ve pembe renkle gösterilmiştir.) c. Maisine® (Palmitik asitin karbon atomları yeşil, linoleik asitin karbon atomları mor ve oleik asitin karbon atomları mavi ile gösterilmiştir.) d. Peceol™ (Palmitik asitin karbon atomları yeşil, linoleik asitin karbon atomları mor ve oleik asitin karbon atomları mavi ile gösterilmiştir.) e. Capryol® 90 (Kaprilik asitin karbon atomları pembe ile gösterilmiştir.) f. LauroglycolTM 90 (Laurik asitin karbon atomları sarı ile gösterilmiştir.) g. Labrasol® (Kaprik asitin karbon atomları turuncu, kaprilik asitin karbon atomları ise pembe ile gösterilmiştir.) h. Transcutol® HP (Dietilen glikol monoetil eterin karbon atomları koyu gri ile gösterilmiştir.).



Şekil 4.2. (devam) Yardımcı madde ve IL-2 simülasyonlarından kesitler a. Oleik asit (Oleik asitin karbon atomları mavi renkle gösterilmiştir.) b. Labrafac™ Lipophile WL 1349 (Kaprik ve kaprilik asitin karbon atomları sırasıyla turuncu ve pembe renkle gösterilmiştir.) c. Maisine® (Palmitik asitin karbon atomları yeşil, linoleik asitin karbon atomları mor ve oleik asitin karbon atomları mavi ile gösterilmiştir.) d. Peceol™ (Palmitik asitin karbon atomları yeşil, linoleik asitin karbon atomları mor ve oleik asitin karbon atomları mavi ile gösterilmiştir.) e. Capryol® 90 (Kaprilik asitin karbon atomları pembe ile gösterilmiştir.) f. LauroglycolTM 90 (Laurik asitin karbon atomları sarı ile gösterilmiştir.) g. Labrasol® (Kaprik asitin karbon atomları turuncu, kaprilik asitin karbon atomları ise pembe ile gösterilmiştir.) h. Transcutol® HP (Dietilen glikol monoetil eterin karbon atomları koyu gri ile gösterilmiştir.).



Şekil 4.2. (devam) Yardımcı madde ve IL-2 simülasyonlarından kesitler a. Oleik asit (Oleik asitin karbon atomları mavi renkle gösterilmiştir.) b. Labrafac™ Lipophile WL 1349 (Kaprik ve kaprilik asitin karbon atomları sırasıyla turuncu ve pembe renkle gösterilmiştir.) c. Maisine® (Palmitik asitin karbon atomları yeşil, linoleik asitin karbon atomları mor ve oleik asitin karbon atomları mavi ile gösterilmiştir.) d. Peceol™ (Palmitik asitin karbon atomları yeşil, linoleik asitin karbon atomları mor ve oleik asitin karbon atomları mavi ile gösterilmiştir.) e. Capryol® 90 (Kaprilik asitin karbon atomları pembe ile gösterilmiştir.) f. LauroglycolTM 90 (Laurik asitin karbon atomları sarı ile gösterilmiştir.) g. Labrasol® (Kaprik asitin karbon atomları turuncu, kaprilik asitin karbon atomları ise pembe ile gösterilmiştir.) h. Transcutol® HP (Dietilen glikol monoetil eterin karbon atomları koyu gri ile gösterilmiştir.).



Şekil 4.2. (devam) Yardımcı madde ve IL-2 simülasyonlarından kesitler **a.** Oleik asit (Oleik asitin karbon atomları mavi renkle gösterilmiştir.) **b.** Labrafac™ Lipophile WL 1349 (Kaprik ve kaprilik asitin karbon atomları sırasıyla turuncu ve pembe renkle gösterilmiştir.) **c.** Maisine® (Palmitik asitin karbon atomları yeşil, linoleik asitin karbon atomları mor ve oleik asitin karbon atomları mavi ile gösterilmiştir.) **d.** Peceol™ (Palmitik asitin karbon atomları yeşil, linoleik asitin karbon atomları mor ve oleik asitin karbon atomları mavi ile gösterilmiştir.) **e.** Capryol® 90 (Kaprilik asitin karbon atomları pembe ile gösterilmiştir.) **f.** LauroglycolTM 90 (Laurik asitin karbon atomları sarı ile gösterilmiştir.) **g.** Labrasol® (Kaprik asitin karbon atomları turuncu, kaprilik asitin karbon atomları ise pembe ile gösterilmiştir.) **h.** Transcutol® HP (Dietilen glikol monoetil eterin karbon atomları koyu gri ile gösterilmiştir.).

Çizelge 4.2. Oleik asit ve IL-2 etkileşim analizi

Oleik asit 1	**Lys 49 (%19,** Hidrofilik**); Glu 116 (%12,** Hidrofilik**); Asn 119 (%12,5,** Hidrofilik**); Arg 120 (%15,** Hidrofilik**)**
Oleik asit 2	**Lys 8 (%12,** Hidrofilik**)**
Oleik asit 3	**Asn 33 (%30,** Hidrofilik**); Thr 37 (%20,** Hidrofilik**); Ile 114 (%25,** Hidrofobik**); Val 115 (%20,** Hidrofobik, Hidrofilik**)**
Oleik asit 4	**Lys 49 (%10,** Hidrofilik**)**

Çizelge 4.3. Labrafac™ Lipophile WL 1349 ve IL-2 etkileşim analizi

Kaprilik asit 1	**Arg 120 (%12,** Hidrofilik**)**
Kaprilik asit 2	**Lys 35 (%95,** Hidrofilik**); Arg 38 (%70,** Hidrofilik**), Lys 76 (%40,** Hidrofilik**)**
Kaprik asit 1	**Ala 50 (%10,** Hidrofilik**); Thr 51 (%30,** Hidrofilik**); Glu 52 (%25,** Hidrofilik**)**
Kaprik asit 2	**Arg 38 (%95,** Hidrofilik**)**

Çizelge 4.4. Maisine® ve IL-2 etkileşim analizi

Oleik asit	**Thr 7 (%13,** Hidrofilik**); Lys 8 (%15,** Hidrofilik**); Lys 54 (%14,** Hidrofilik**)**
Palmitik asit	**Asn 33 (%30,** Hidrofilik**); Thr 37 (%10,** Hidrofilik**); Leu 40 (%10,** Hidrofobik, Hidrofilik**); Ile 114 (%10,** Hidrofobik**)**
Linoleik asit 1	**Arg 38 (%17,5,** Hidrofilik**); Leu 53 (%15,** Hidrofobik, Hidrofilik**); Lys 54 (%12,5,** Hidrofilik**)**
Linoleik asit 2	**Lys 9 (%13,** Hidrofilik**); Pro 47 (%13,** Hidrofobik**); Arg 120 (%14,** Hidrofilik**)**

Çizelge 4.5. Peceol™ ve IL-2 etkileşim analizi

Palmitik asit	**Lys 49 (%14,** Hidrofilik**); Arg 120 (%10,** Hidrofilik**)**
Linoleik asit	**Arg 38 (%20,** Hidrofilik**)**
Oleik asit 1	**Lys 35(%80,** Hidrofilik**); Arg 38 (%80,** Hidrofilik**); Phe 42 (%20,** Hidrofobik**); Leu 72 (%30,** Hidrofilik, Hidrofobik**); Gln 74 (%20,** Hidrofilik**)**
Oleik asit 2	**Lys 49 (%25,** Hidrofilik**); Ala 50 (%25,** Hidrofilik**); Thr 51(%15,** Hidrofilik**); Arg 120 (%40,** Hidrofilik**); Trp 121 (%10,** Hidrofobik**)**

Çizelge 4.6. Capryol® 90 ve IL-2 etkileşim analizi

Kaprilik asit 1	**Tyr 31 (%25,** Hidrofobik, Hidrofilik**); Lys 35 (%80,** Hidrofilik**); Arg 38 (%80,** Hidrofilik**); Ser 75 (%25,** Hidrofilik**)**
Kaprilik asit 2	**Lys 32(%10,** Hidrofilik**); Lys 49 (%35,** Hidrofilik**); Arg 120 (%30,** Hidrofilik**)**
Kaprilik asit 3	**Asn 30 (%15,** Hidrofilik**); Lys 76 (>%75,** Hidrofilik**); Phe 78 (%30,** Hidrofobik, Hidrofilik**); His 79 (%95,** Hidrofilik**)**
Kaprilik asit 4	**Arg 38 (%60,** Hidrofilik**)**

Çizelge 4.7. Lauroglycol™ 90 ve IL-2 etkileşim analizi

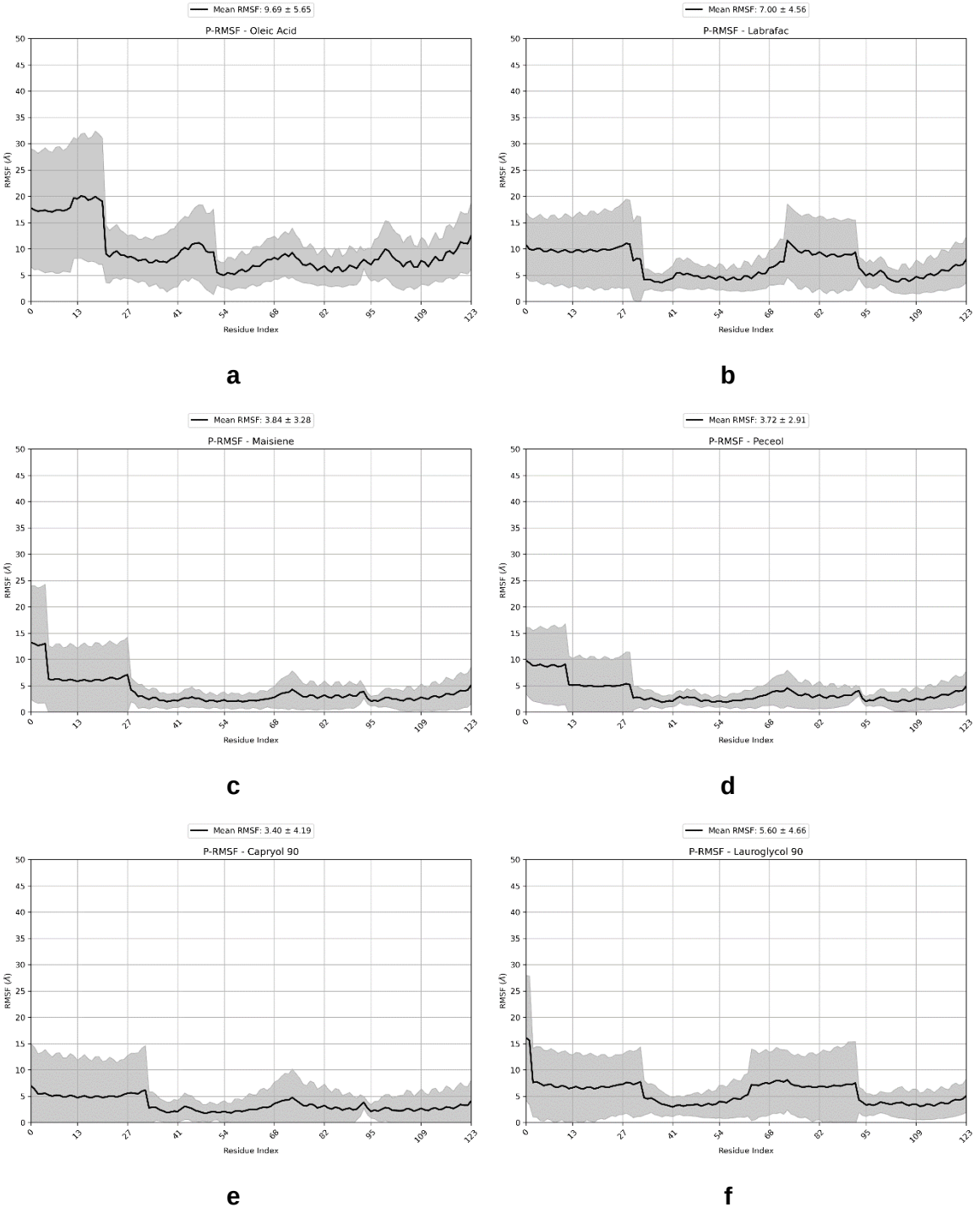
Laurik asit 1	**Asn 30 (%10,** Hidrofilik**); Lys 35 (%20,** Hidrofilik**); Arg 38 (%40,** Hidrofilik**); Asn 77(%15,** Hidrofilik**)**
Laurik asit 2	**Lys 35 (%10,** Hidrofilik**); Arg 38 (%100,** Hidrofilik**)**
Laurik asit 3	<%10
Laurik asit 4	**Lys 8 (%10,** Hidrofilik**); Lys 9 (%10,** Hidrofilik**); Pro 47 (%10,** Hidrofilik**); Ala 50 (%10** Hidrofilik**,); Arg 120 (%80,** Hidrofilik**)**

Çizelge 4.8. Labrasol® ve IL-2 etkileşim analizi

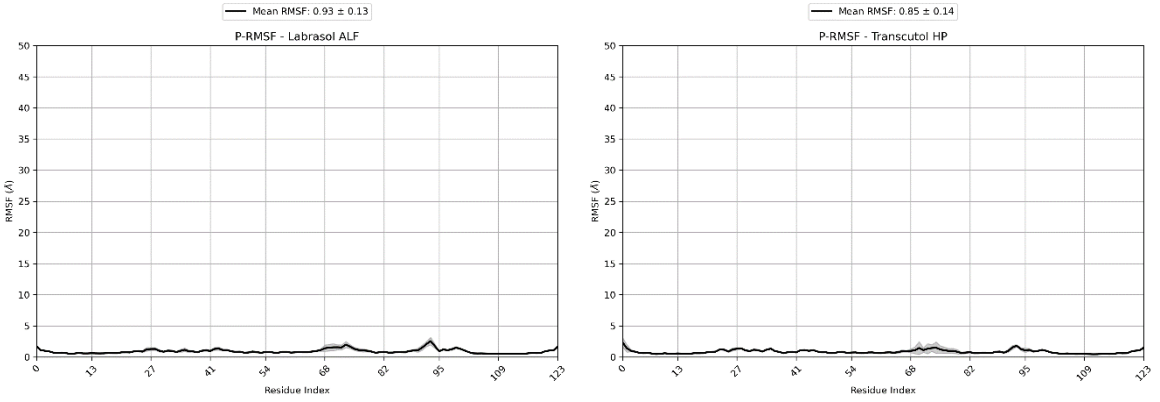
Kaprik asit	**Lys 48 (%10,** Hidrofilik**); Arg 120 (%40,** Hidrofilik**)**
Kaprilik asit 1	**Lys 32 (%10,** Hidrofilik**); Lys 35 (%12,** Hidrofilik**); Arg 38 (%10,** Hidrofilik**); Lys 76 (%10,** Hidrofilik**)**
Kaprilik asit 2	**Tyr 31 (%10,** Hidrofobik, Hidrofilik**); Lys 35 (%60,** Hidrofilik**); Arg 38 (%80,** Hidrofilik**); Leu 72 (%15,** Hidrofilik, Hidrofobik**); Lys 76 (%30,** Hidrofilik**)**
Kaprilik asit 3	**Arg 38 (%10,** Hidrofilik**); Arg 120 (%20,** Hidrofilik**)**

Çizelge 4.9. Transcutol® HP ve IL-2 etkileşim analizi

Dietilen glikol monoetil eter 1	<%10
Dietilen glikol monoetil eter 2	<%10
Dietilen glikol monoetil eter 3	**Pro 47 (%25,** Hidrofilik, Hidrofobik**); Arg 120 (%50,** Hidrofilik**); Trp 121 (%10,** Hidrofobik, Hidrofilik**)**
Dietilen glikol monoetil eter 4	<%10

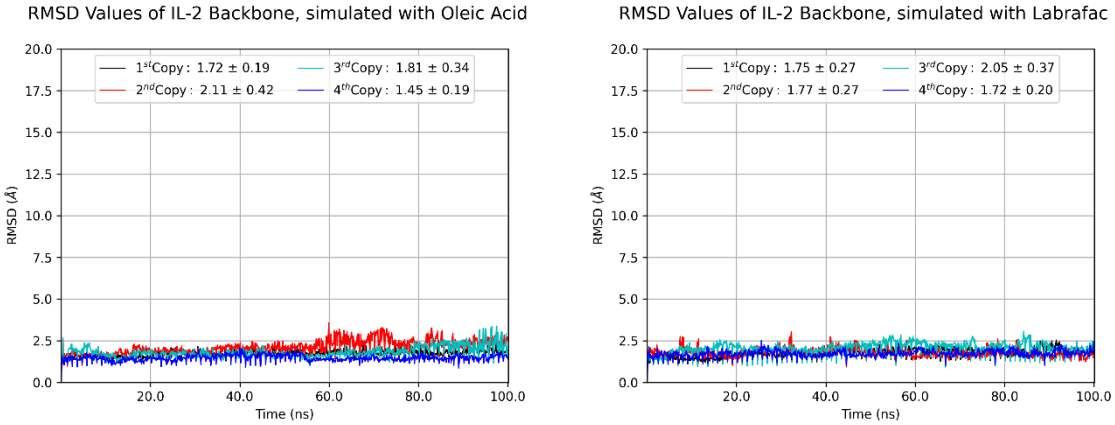


Şekil 4.3. Yardımcı madde ve IL-2 simülasyonlarına ait RMSF grafiği, simülasyonlar sırasında IL-2 yapısının esnekliğini a. Oleik asit, b. Labrafac™ Lipophile WL 1349, c. Maisine®, d. Peceol™, e. Capryol® 90, f. Lauroglycol™ 90, g. Labrasol®, h. Transcutol® HP varlığında gösterilmiştir. Her kalıntının ortalama RMSF değeri siyah olarak rapor edilmiş ve standart sapmalar her IL-2 kalıntısı için gri bölgeler olarak gösterilmiştir.



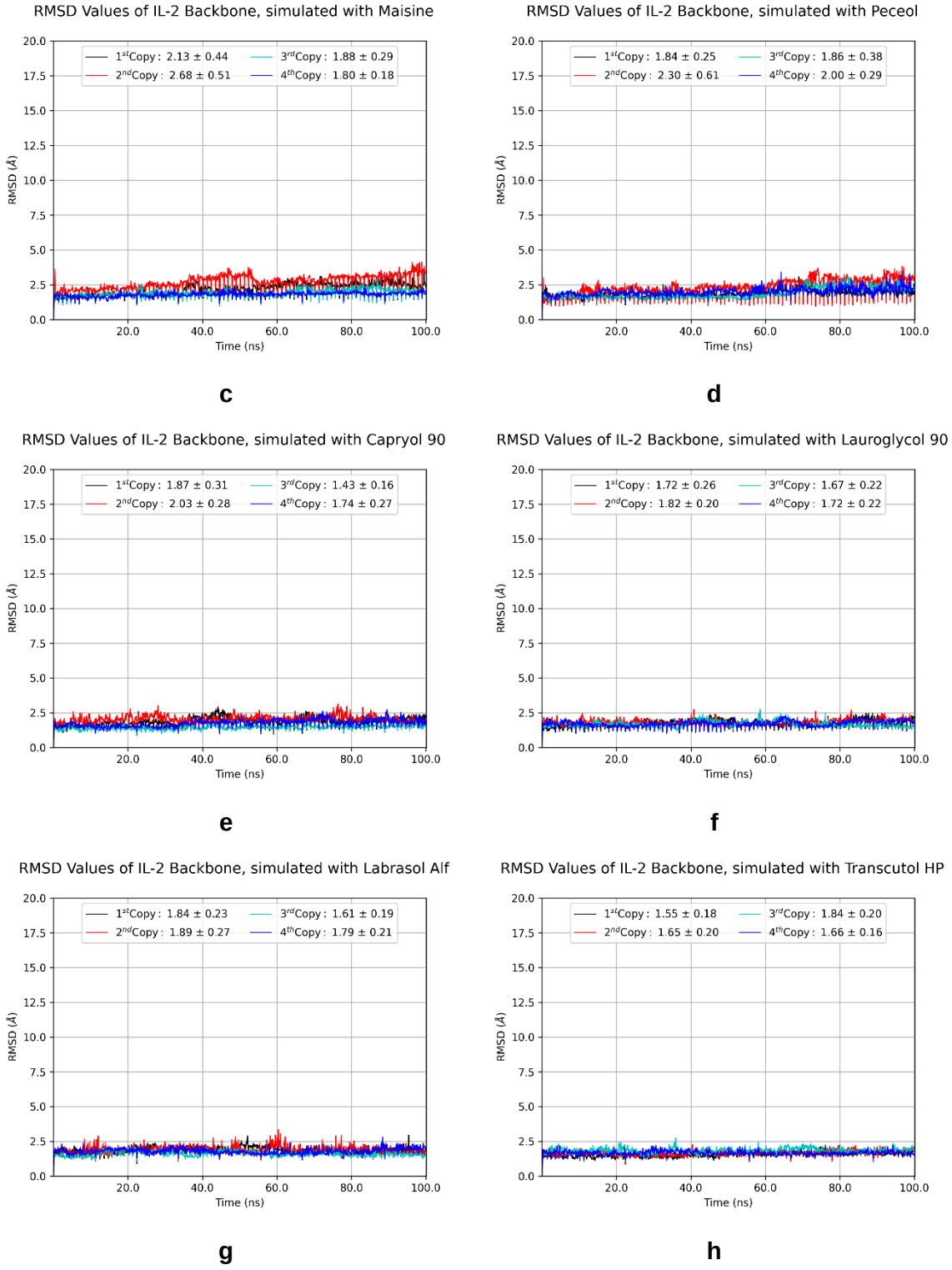
g **h**

Şekil 4.3. (devam) Yardımcı madde ve IL-2 simülasyonlarına ait RMSF grafiği, simülasyonlar sırasında IL-2 yapısının esnekliğini **a.** Oleik asit, **b.** Labrafac™ Lipophile WL 1349, **c.** Maisine®, **d.** Peceol™, **e.** Capryol® 90, **f.** Lauroglycol™ 90, **g.** Labrasol®, **h.** Transcutol® HP varlığında gösterilmiştir. Her kalıntının ortalama RMSF değeri siyah olarak rapor edilmiş ve standart sapmalar her IL-2 kalıntısı için gri bölgeler olarak gösterilmiştir.



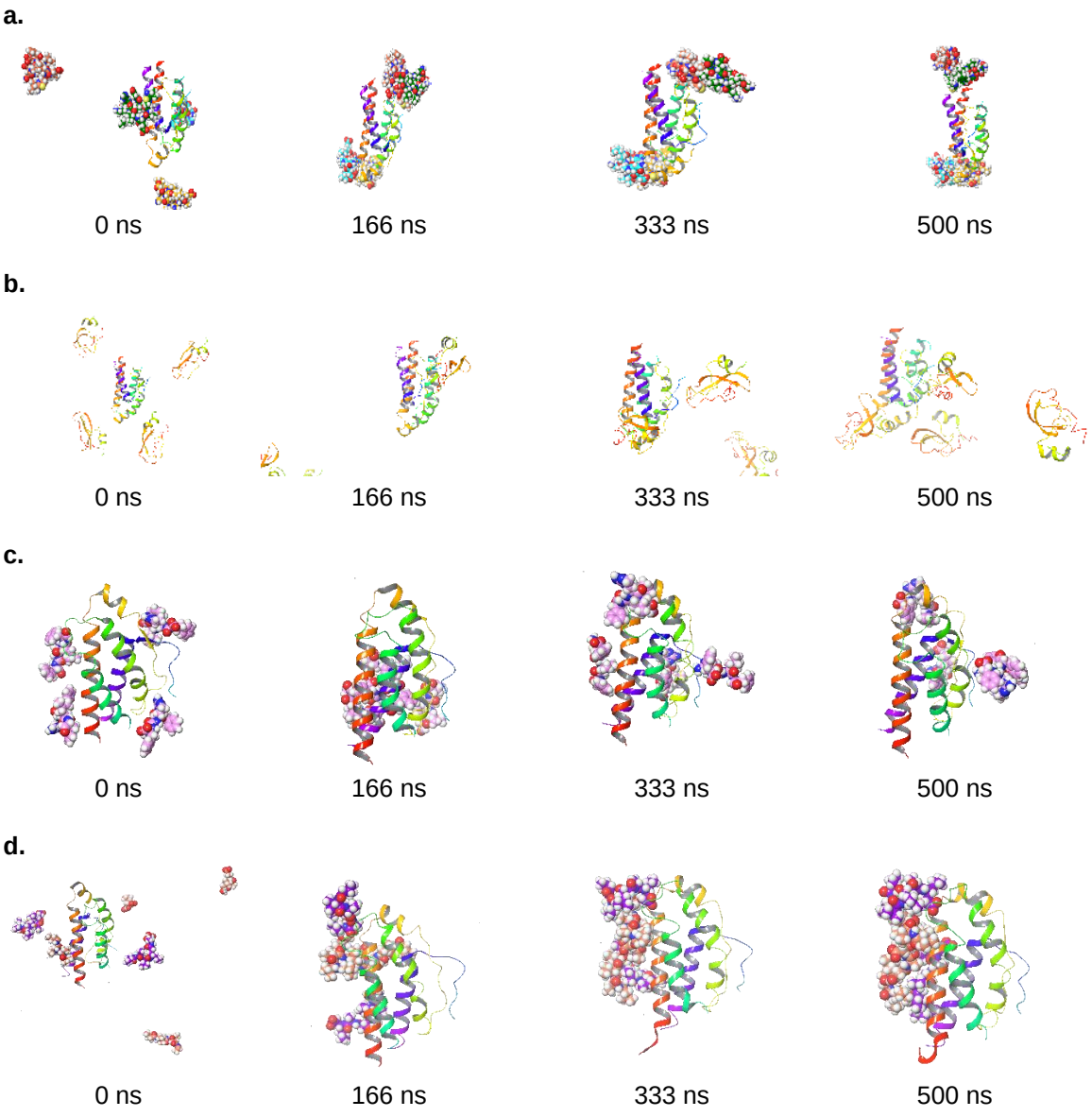
a **b**

Şekil 4.4. Yardımcı madde ve IL-2 simülasyonlarına ait RMSD grafiği, IL-2 yapısının a. Oleik asit, b. Labrafac™ Lipophile WL 1349, c. Maisine®, d. Peceol™, e. Capryol® 90, f. Lauroglycol™ 90, g. Labrasol®, h. Transcutol® HP varlığında simülasyon sırasında sistem ilk başlatıldığındaki duruma benzerliğini göstermektedir. Her kopya farklı bir renkle temsil edilmiştir.

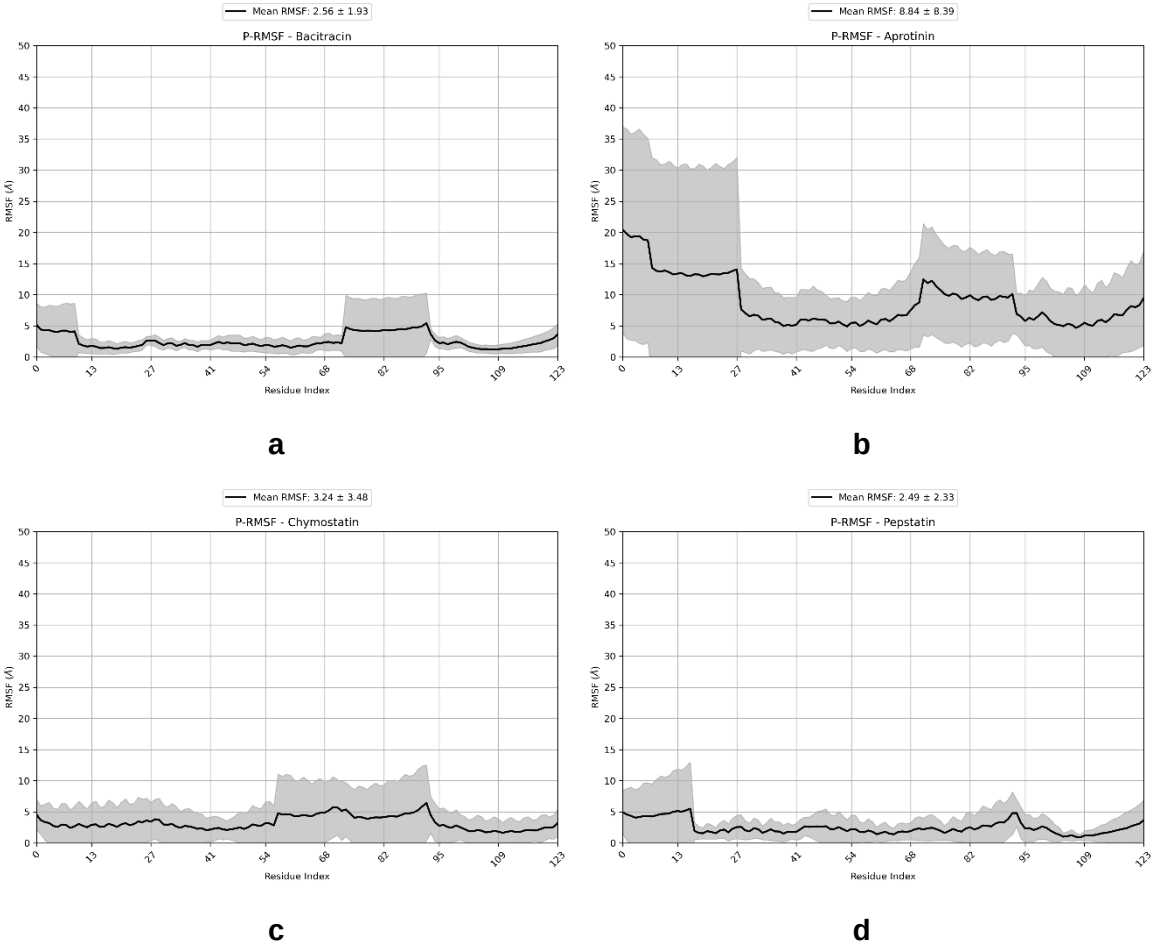


Şekil 4.4. (devam) Yardımcı madde ve IL-2 simülasyonlarına ait RMSD grafiği, IL-2 yapısının **a.** Oleik asit, **b.** Labrafac™ Lipophile WL 1349, **c.** Maisine®, **d.** Peceol™, **e.** Capryol® 90, **f.** Lauroglycol™ 90, **g.** Labrasol®, **h.** Transcutol® HP varlığında simülasyon sırasında sistem ilk başlatıldığındaki duruma benzerliğini göstermektedir. Her kopya farklı bir renkle temsil edilmiştir.

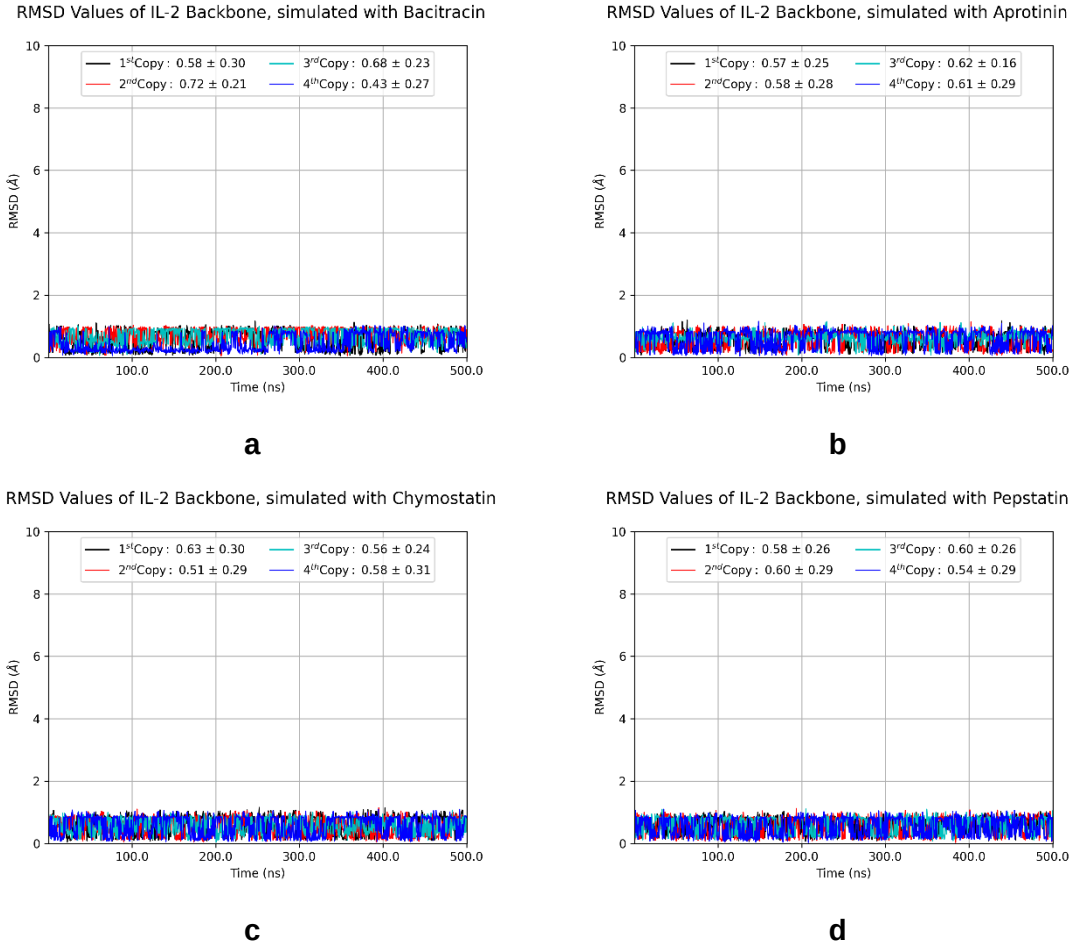
IL-2 ile proteaz inhibitörleri arasındaki 500 ns'lik etkileşimlere ait 0, 166, 333, ve 500 nanosaniyelerde oluşturulan görseller ise Şekil 4.5'te sunulmuştur. Proteaz inhibitörleri ile yapılan simülasyon sürecinde gerçekleşen konformasyonel değişime ait grafikler Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'da sunulmuştur.



Şekil 4.5. Proteaz inhibitörleri ve IL-2 simülasyonlarına ait kesitler **a.** IL-2 basitrasin, **b.** IL-2 aprotinin **c.** IL-2 kimostatin ve IL-2 pepstatin



Şekil 4.6. Proteaz inhibitörleri ve IL-2 simülasyonlarına ait RMSF grafiği **a.** basitrasin, **b.** aprotinin, **c.** kimostatin ve **d.** pepstatin



Şekil 4.7. Proteaz inhibitörleri ve IL-2 simülasyonlarına ait RMSD grafiği **a.** basitrasin, **b.** aprotinin, **c.** kimostatin ve **d.** pepstatin

4.2. İnterlökin-2 Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

4.2.1. IL-2 üretimi

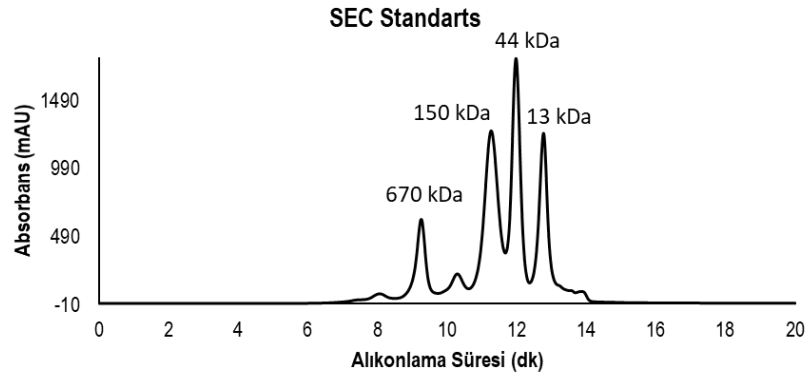
IL-2 üretimi Bölüm 3.2.2'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiş ve saflaştırılmıştır. Tüm çalışmalarda kullanılan ve referans kabul edilen IL-2, Elabscience®'tan temin edilmiştir. Koç Üniversitesi'nde üretilen IL-2 bundan sonra K-IL-2*, SUMO etiketi içeren IL-2 ise K-SUMO-IL-2**, İstanbul Teknik Üniversitesi'nde üretilen IL-2 bundan sonra B1-IL-2* olarak kodlanmıştır.

*K-IL-2 ve B1-IL-2 sadece sonuç formülasyon için referans IL-2 ile kıyaslanarak tekrarlanabilir sonuçlar elde edilip edilmediğini değerlendirmek amacıyla kullanılmıştır.

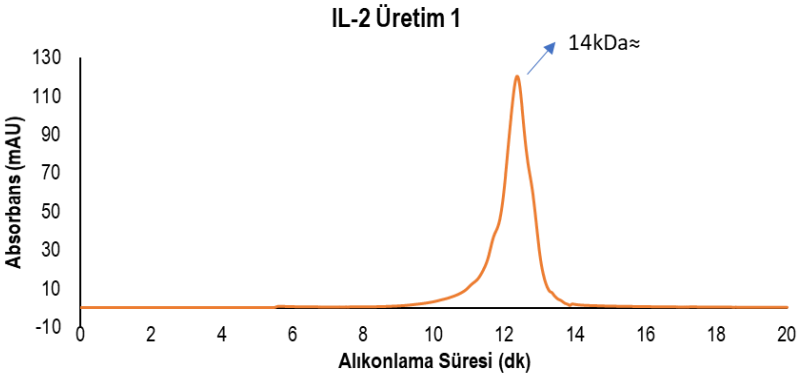
**K-SUMO-IL-2, rekombinant DNA teknolojisiyle IL-2 üretim sürecinde proteinin çözünürlüğünü arttırma amacıyla SUMO-Tag eklenmiştir. Büyük yapılı olması nedeniyle SUMO-Tag kolayca kesilerek K-IL-2 üretilmektedir. Formülasyon çalışmalarında etkinliği ve güvenliği bilinmediğinden kullanılmamış olup sadece karakterizasyon çalışmalarında değerlendirilmiştir.

4.2.2. Boyut dışlama kromatografisi (SEC-HPLC)

IL-2'nin Bölüm 3.2.2'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilen SEC-HPLC analizine ait kromatogramlar Şekil 4.8'de sunulmuştur. Farklı kaynak ve farklı kolonlar kullanılarak yapılan bu yöntemle saflaştırma sonrası dimerizasyon ve oligomerizasyon durumları test edilerek değerlendirilmiştir.

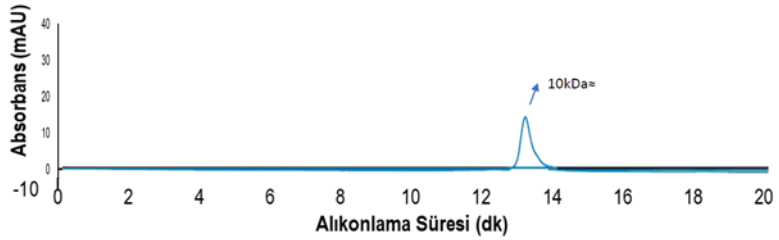


a.

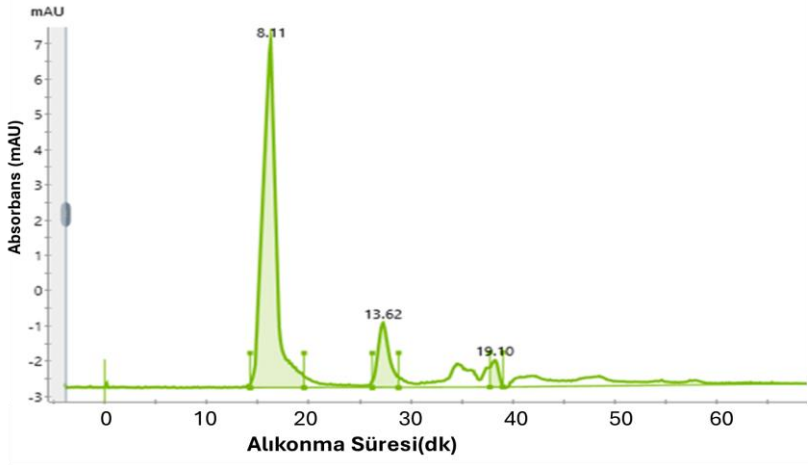


b.

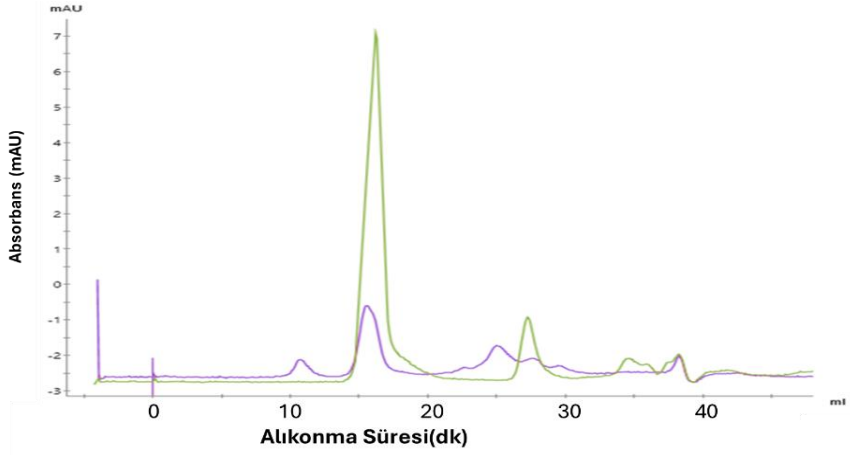
Şekil 4.8. Saflaştırılan rekombinant IL-2 proteinin saflaştırma sonrası SEC-HPLC sonuçları (S250 kolon ile gerçekleştirilen analizde a. siyah kromatogram standarttır, b. turuncu kromatogram B1-IL-2'ye ve c. mavi kromatogram referans IL-2'ye (Elabscience®) aittir. S75 kolon ile gerçekleştirilen analizde ise d. yeşil kromatogramlar referans ve e. mor kromatogram K- SUMO-IL-2'ye aittir.



c.



d.



e.

Şekil 4.8. (devam) Saflaştırılan rekombinant IL-2 proteinin saflaştırma sonrası SEC-HPLC sonuçları (S250 kolon ile gerçekleştirilen analizde **a.** siyah kromatogram standarttır, **b.** turuncu kromatogram B1-IL-2'ye ve **c.** mavi kromatogram referans IL-2'ye (Elabscience®) aittir. S75 kolon ile gerçekleştirilen analizde ise **d.** yeşil kromatogramlar referans ve **e.** mor kromatogram K- SUMO-IL-2'ye aittir.

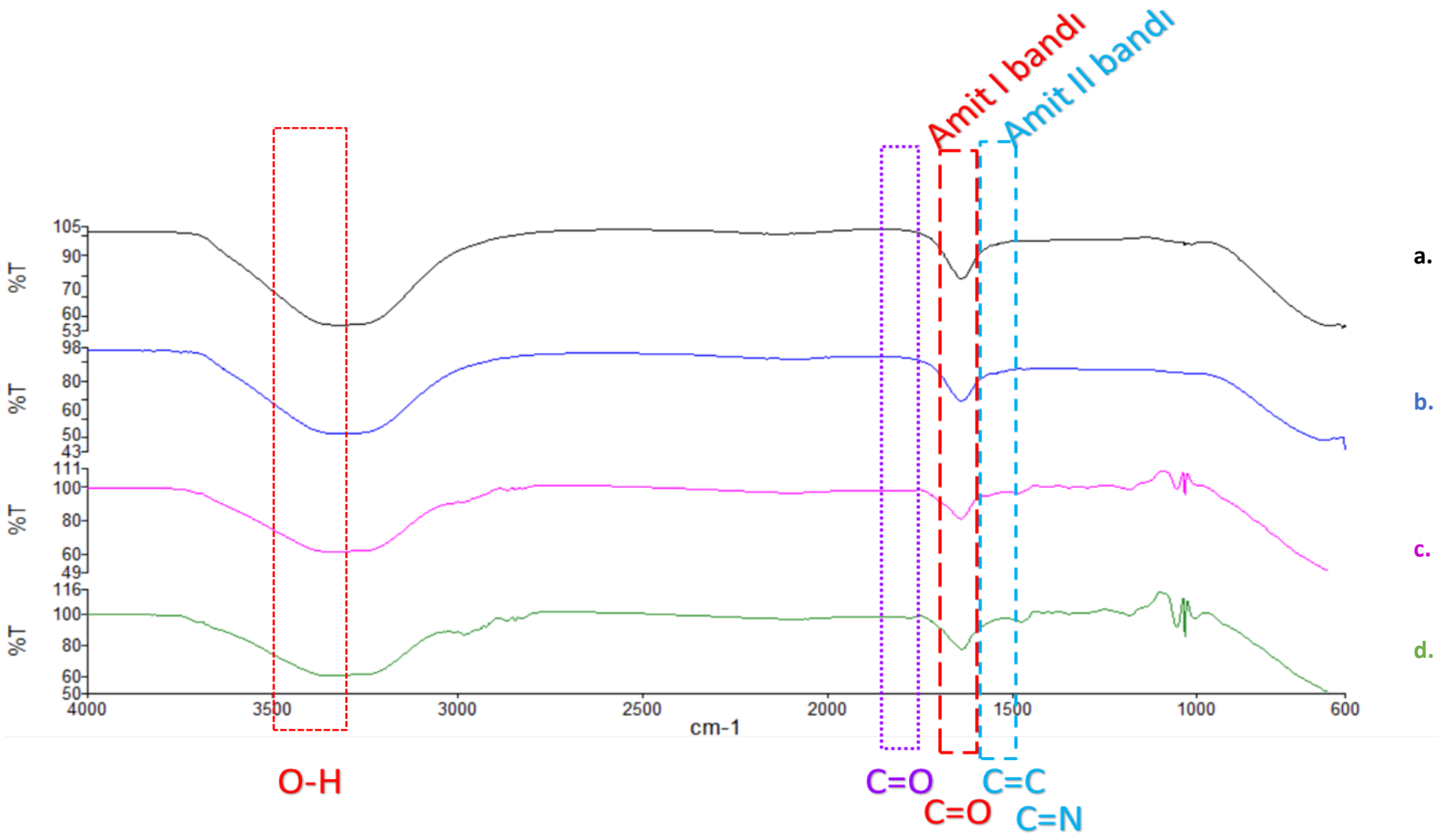
4.2.3. FT-IR analizi

Bu analizde proteinlerin hangi dalga boylarının emildiği ölçülür. Bu, proteinlerin Amit I (C=O gerilme titreşimleri) ve Amit II (N-H bükülme titreşimleri) bantlarıyla tanımlanır. Amit I bandı, proteinlerin alfa sarmal ve beta tabaka gibi ikincil yapısını yansıtır (Gallagher, 2009).

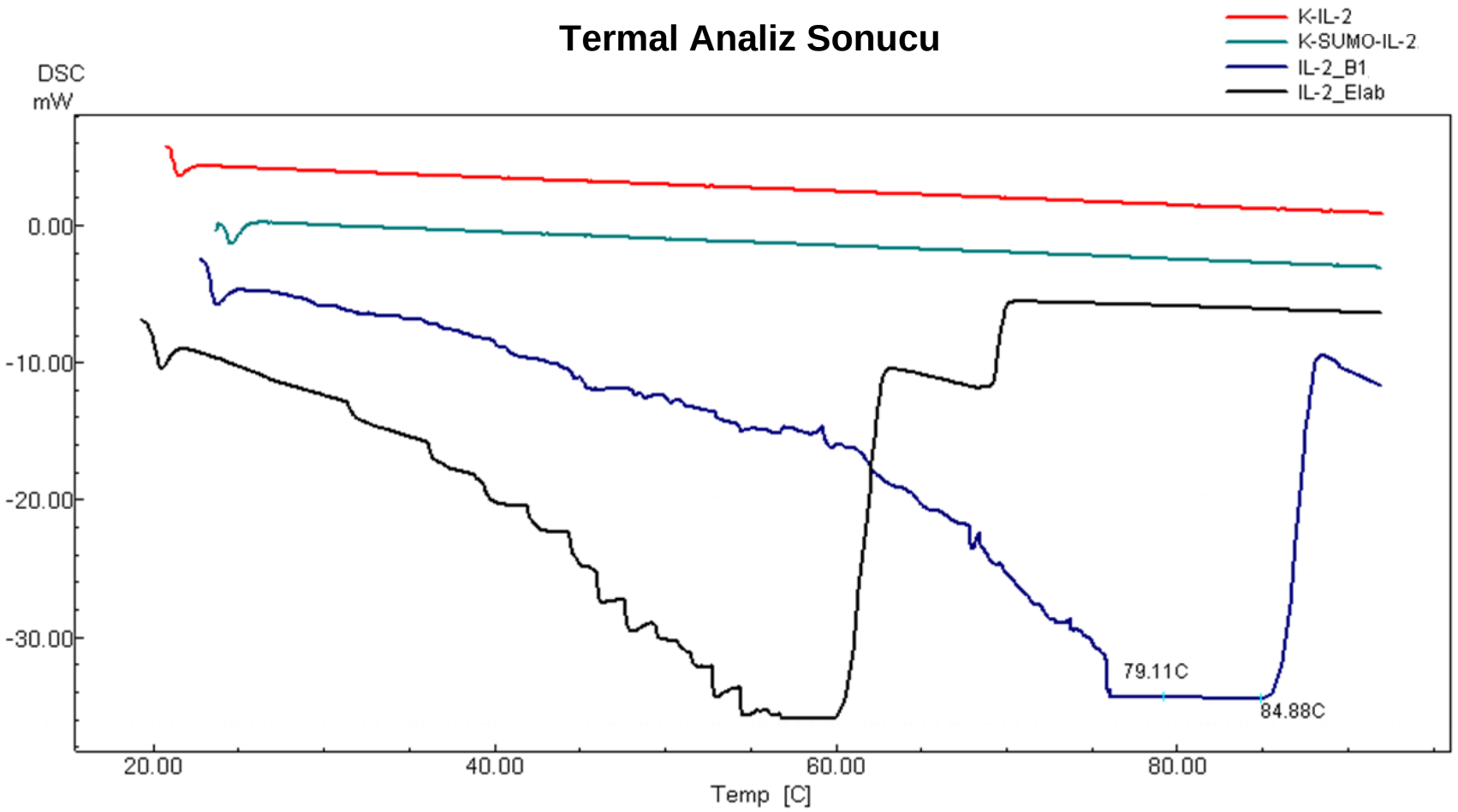
IL-2'nin Bölüm 3.2.2'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilen FT-IR analizine ait spektrumu Şekil 4.9'da sunulmuştur. FTIR pikleri literatürlerdeki değerlerle karşılaştırılmıştır (Prestrelski, Pikal ve Arkawa, 1995). Yapılan çalışmalarda, farklı kaynaklardan temin edilen IL-2'ye ait spektrumlar aynı bölgelerde gerilim bantları vermiştir.

4.2.4. DSC analizi

IL-2'nin Bölüm 3.2.2'de açıklandığı şekilde gerçekleştirilen DSC analizine ait termogramı Şekil 4.10'da verilmiştir. Elabscience® IL-2'ye ait bozulma piki 59,68°C ve B1-IL-2'ye ait bozulma piki 79,11°C olarak bulunmuştur.



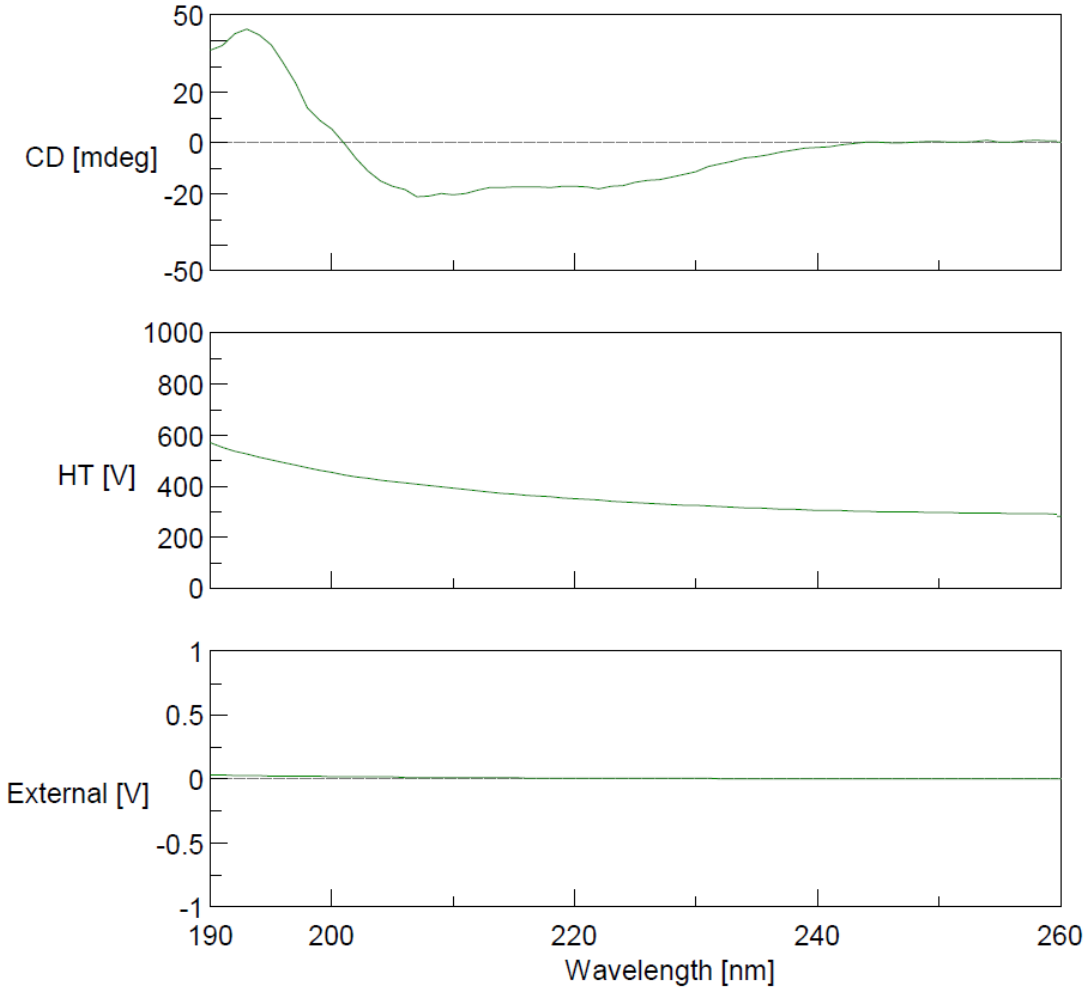
Şekil 4.9. Farklı kaynaklardan alınan IL-2'nin FT-IR spektrumu; a. üretilen (B1-IL-2), b. referans IL-2 (Elabscience®), c. üretilen (K-IL-2), d. üretilen (K-SUMO-IL-2)



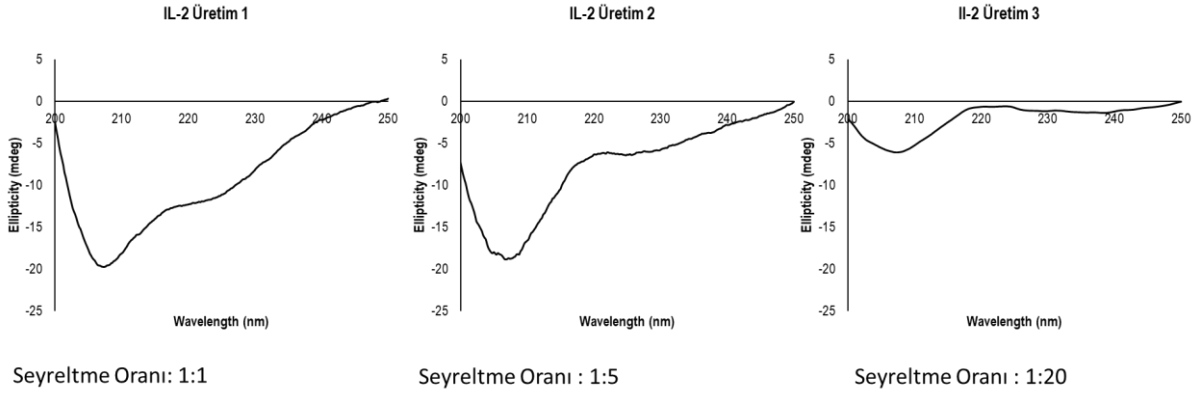
Şekil 4.10. Farklı kaynaklardan alınan IL-2'nin DSC termogramı; referans IL-2 (Elabscience®), üretilen (B1-IL-2), üretilen (K-IL-2) ve üretilen (K-SUMO-IL-2)

4.2.5. Sirküler dikroizm spektroskopisi

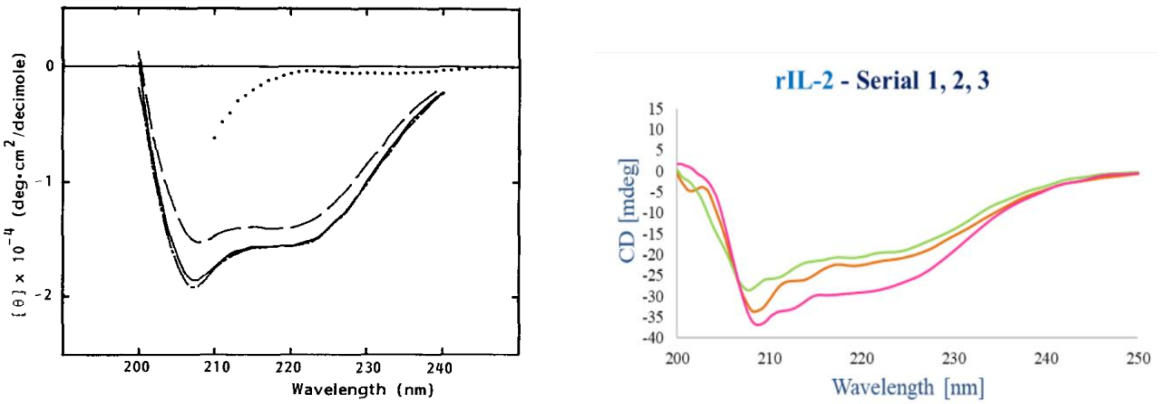
IL-2'nin Bölüm 3.2.2'de açıklandığı şekilde Jasco J-815 ile gerçekleştirilen referans IL-2'nin sirküler dikroizm analizine ait spektrumu Şekil 4.11'de verilmiştir. Jasco J-1500 ile gerçekleştirilen B1-IL-2'nin sirküler dikroizm analizine ait spektrumu Şekil 4.12'de verilmiştir. Spektrumda 200-250 dalga boylarında pik vermiştir, spektrumun şeklinin referanslarla benzerlikler gösterdiği görülmektedir, bu da IL-2'ye ait bir patern olduğunu göstermektedir (Şekil 4.12).



Şekil 4.11. Referans (Elabscience®) IL-2 CD spektrumu



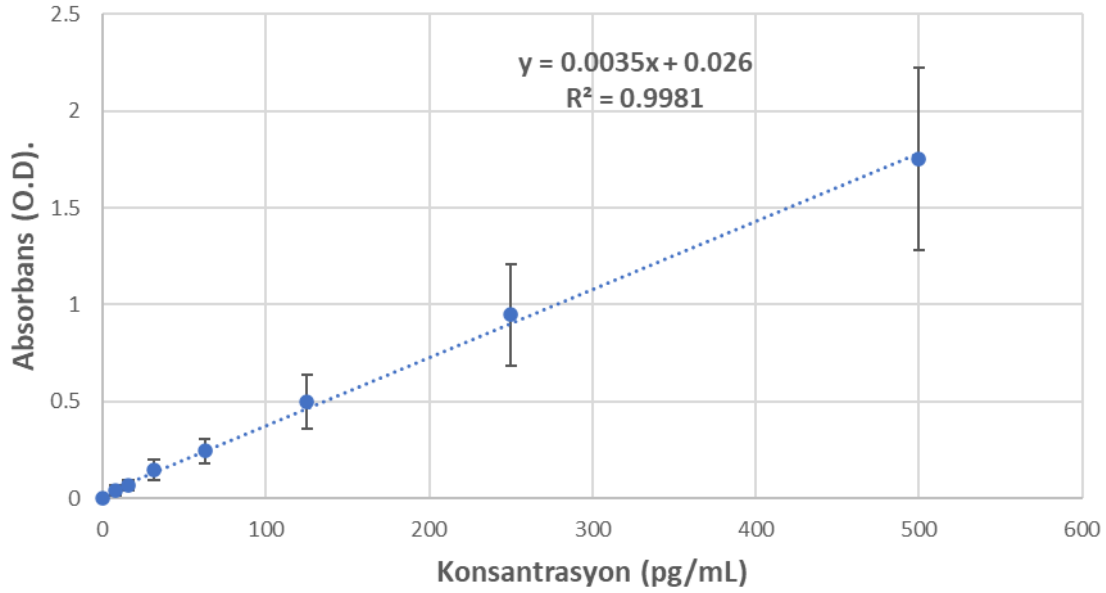
Şekil 4.12. B1- IL-2 CD spektrumu



Şekil 4.13. Literatürdeki IL-2 CD spektrumları (Yamada, T., 1987; Akgün, B., 2022).

4.3. İnterlökin-2'nin Miktar Tayini Yöntemi ve Validasyonu

Oral yoldan uygulanmak üzere hazırlanan IL-2 yüklü nanoemülsiyonlardan IL-2'nin salım hızının değerlendirilmesi amacıyla in vitro salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. IL-2'nin miktar tayini temin edilen Elabscience® Human IL-2 ELISA Kit ile yapılmıştır. Yapılan analiz sonucu kalibrasyon denklemi y=0,0035x+0,026 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. ELISA kitinin kalibrasyon grafiği (n=3)

4.4. Nanoemülsiyon Formülasyonu Geliştirme Çalışmaları

IL-2 içermeyen nanoemülsiyon formülasyonlarına ait Bölüm 3.2.4'te açıklandığı şekilde gerçekleştirilen çalışmaların sonuçları Çizelge 4.10 ve Çizelge 4.11'de verilmiştir.

Çizelge 4.10. F1 (su/yağ/su tipi nanoemülsiyon) formülasyonu damlacık boyutu ve PDİ sonuçları (n=3, Ort ± SD).

Primer emülsiyon		**Çoklu emülsiyon**					
Damlacık boyutu (nm)	**PDİ**	**Geçiş Sayısı**					
1415 ± 162,8	0,146 ± 0,121	**3 geçiş**		**4 geçiş**		**5 geçiş**	
Basınç		**Damlacık boyutu (nm)**	**PDİ**	**Damlacık boyutu (nm)**	**PDİ**	**Damlacık boyutu (nm)**	**PDİ**
10.000 psi		196,9 ± 2,7	0,079 ± 0,026	206,6 ± 3,1	0,071 ± 0,016	203,1 ± 3,6	0,071 ± 0,013
20.000 psi		287,5 ± 3,2	0,084 ± 0,008	290,7 ± 0,2	0,117 ± 0,013	301,2 ± 5,4	0,058 ± 0,035
30.000 psi		456,5 ± 6,2	0,170 ± 0,009	509,0 ± 20,4	0,258 ± 0,017	482,4 ± 4,6	0,259 ± 0,011

Çizelge 4.11. F2 (su/yağ/su tipi nanoemülsiyon) formülasyonu damlacık boyutu ve PDİ sonuçları (n=3, Ort ± SD).

Ultra-Turrax süresi	Geçiş Sayısı	Primer Emülsiyon		Çoklu Emülsiyon	
		Damlacık boyutu (nm)	PDİ	Damlacık boyutu (nm)	PDİ
3 dk	**1**	190,900 ± 7,271	0,271 ± 0,092	90,790 ± 4,119	0,241 ± 0,002
4 dk	**1**	191,900 ± 7,151	0,275 ± 0,028	86,780 ± 1,301	0,157 ± 0,009
	2	167,900 ± 11,060	0,148 ± 0,117	89,660 ± 0,975	0,163 ± 0,012
	3	173,0 ± 5,126	0,151 ± 0,051	91,840 ± 0,262	0,178 ± 0,008
	4	168,200 ± 2,346	0,161 ± 0,009	81,380 ± 0,195	0,138 ± 0,013
	5	188,800 ± 9,506	0,145 ± 0,054	96,760 ± 3,225	0,172 ± 0,003

Formülasyonlara ait yardımcı maddeler ve formülasyonların işlem parametreleri özet olarak Çizelge 4.12'de sunulmuştur.

Çizelge 4.12. Formülasyon parametreleri

		Bileşenler	İşlem parametreleri	Damlacık boyutu ve PDİ
F1 (su/yağ/su tipi nanoemülsiyon)	Primer Emülsiyon	Oleik asit	40°C, 350 rpm, 10 dk	
		PGPR	Ultra-Turrax 10.000 rpm 3 dk	
		Distile su	Ultrasonik banyo, 35 kHz, 5 dk	
	Çoklu Emülsiyon	Primer Emülsiyon	Ultra-Turrax 10.000 rpm 2 dk	Damlacık boyutu 238,3 ± 6,6 nm; PDİ 0,061 ± 0,023
		Tween® 80	Microfluidizer® 3 geçiş, 10.000 psi	
		Distile su		
F2 (su/yağ/su tipi nanoemülsiyon)	Primer Emülsiyon	Labrafac™ Lipophile WL1349	50°C, 1000 rpm, 3 dk	
		PGPR	Ultra-Turrax 24000 rpm 3 dk	
		Distile su	Microfluidizer® 1 geçiş, 10.000 psi	
	Çoklu Emülsiyon	Primer Emülsiyon		Damlacık boyutu 94,72 ± 4,20 nm; PDİ 0,181 ± 0,002
		Kolliphor EL	100 rpm homojenize olana kadar, oda sıcaklığında	

4.5. Geliştirilen Nanoemülsiyon Formülasyonlarında Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları

4.5.1. ELISA kiti ile IL-2 yükleme tayini

IL-2'nin miktar tayini Bölüm 3.2.5'te açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiş ve ELISA kiti ile yapılan IL-2 miktar tayini bir seri olarak yapılmış olup 1 g emülsiyonda yükleme etkinliği F1 ve F2 için yaklaşık %100 olarak hesaplanmıştır (1 g emülsiyonda olması istenen IL-2 miktarı; 0,025 mg). Sonuçlar Çizelge 4.13'te sunulmuştur.

Çizelge 4.13. IL-2 yüklü nanoemülsiyonların yükleme etkinliği (n=3)

	Ortalama (mg)	Standart Sapma	%Bağıl sapma
IL-2 yüklü F1	0,0249	0,0032	0,41
IL-2 yüklü F2	0,0254	0,0039	1,20

4.5.2. Damlacık boyutu, PDİ ve zeta potansiyeli ölçümleri

IL-2 yüklü olmayan F1 ve F2 formülasyonlarının Malvern Zetasizer cihazı ile gerçekleştirilen damlacık boyutu, PDİ ve zeta potansiyeli ölçümleri Bölüm 3.2.5'te açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir ve sonuçları Çizelge 4.14'te sunulmuştur.

Çizelge 4.14. Nanoemülsiyonların damlacık boyutu, PDİ ve zeta potansiyeli ölçüm değerleri (n=3)

	Damlacık boyutu (nm)	PDİ	Zeta Potansiyeli (mV)
F1 formülasyonu	208,1 ± 2,7	0,050 ± 0,010	-50,0 ± 0,4
F2 formülasyonu	96,9 ± 1,7	0,181 ± 0,002	-8,04 ± 0,90

(Ort ± SS, n=3)

IL-2 yüklü F1 ve F2 formülasyonlarına ait Malvern Zetasizer cihazı ile gerçekleştirilen damlacık boyutu, PDİ ve zeta potansiyeli ölçümleri Çizelge 4.15'te sunulmuştur.

Çizelge 4.15. IL-2 yüklü nanoemülsiyonların damlacık boyutu, PDİ ve zeta potansiyeli ölçüm değerleri (n=3)

	Damlacık boyutu (nm)	PDİ	Zeta Potansiyeli (mV)
IL-2 yüklü F1	175,9 ± 3,5	0,105 ± 0,075	-54,9 ± 0,8
IL-2 yüklü F2	103,9 ± 2,3	0,213 ± 0,009	-5,17 ± 0,93
IL-2 ve aprotinin yüklü F1	189,0 ±1,7	0,062 ± 0,020	-41,5 ±1,4
IL-2 ve aprotinin yüklü F2	77,6 ± 0,7	0,149 ± 0,006	-11,6 ± 0,3

(Ort ± SS, n=3)

K-IL-2 ve B1-IL-2 yüklü F2 formülasyonlarına ait Malvern Zetasizer cihazı ile gerçekleştirilen damlacık boyutu, PDİ ve zeta potansiyeli ölçümleri Çizelge 4.16'da sunulmuştur.

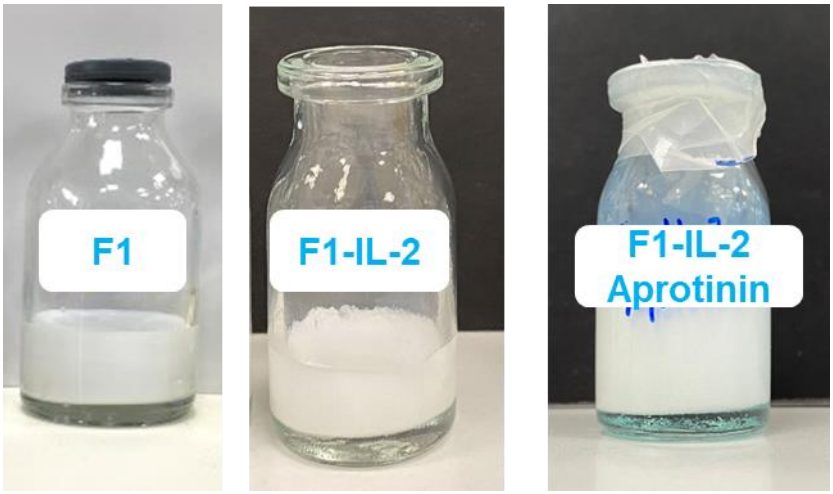
Çizelge 4.16. Farklı kaynaklardan temin edilen IL-2 ile yüklü nanoemülsiyonların karşılaştırılması

	Damlacık boyutu (nm)	PDİ	Zeta Potansiyeli (mV)
IL-2 ve aprotinin yüklü F2	77,6 ± 0,7	0,149 ± 0,006	-11,6 ± 0,3
K-IL-2 ve aprotinin yüklü F2	85,06 ± 0,76	0,174 ± 0,011	-10,2 ± 0,3
B1-IL-2 ve aprotinin yüklü F2	95,28 ± 1,03	0,220 ± 0,006	-7,69 ±0,25

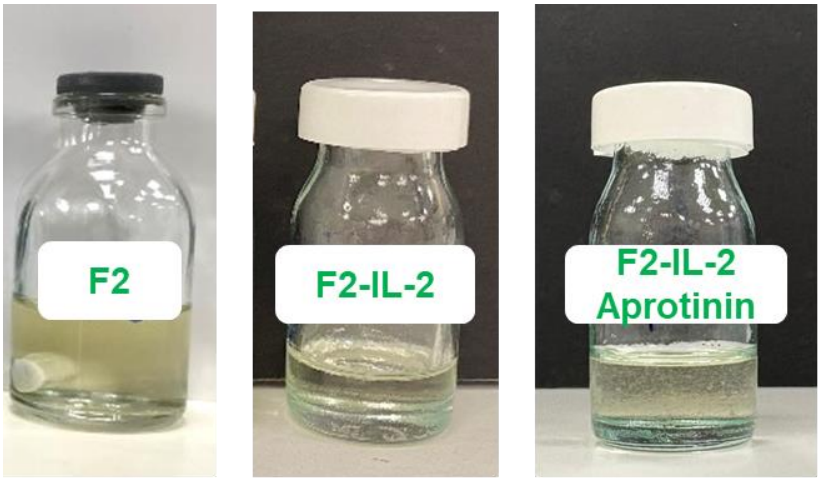
(Ort ± SS, n=3, $p<0,05$)

4.5.3. Morfolojik çalışmalar

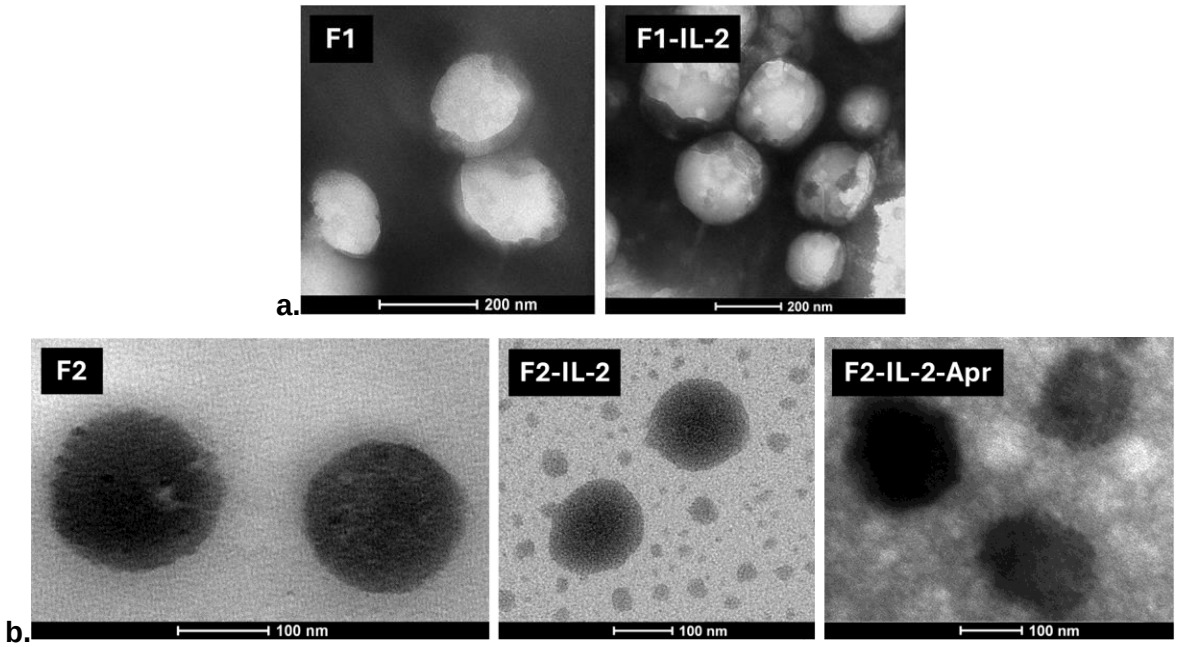
Bölüm 3.2.5'te açıklandığı şekilde gerçekleştirilen morfolojik çalışmalarda F1 formülasyonlarına ait fiziksel görünümler Resim 4.1'de, F2 formülasyonlarına ait fiziksel görünümler Resim 4.2'de ve formülasyonlara ait TEM görüntüleri Resim 4.3'te verilmiştir. TEM görüntülerinde küresel damlacıkların oluştuğu ve IL-2 yüklendikten sonra morfolojik olarak değişiklik olmadığı gözlenmektedir.



Resim 4.1. F1 formülasyonların fiziksel görünümü



Resim 4.2. F2 formülasyonların fiziksel görünümü

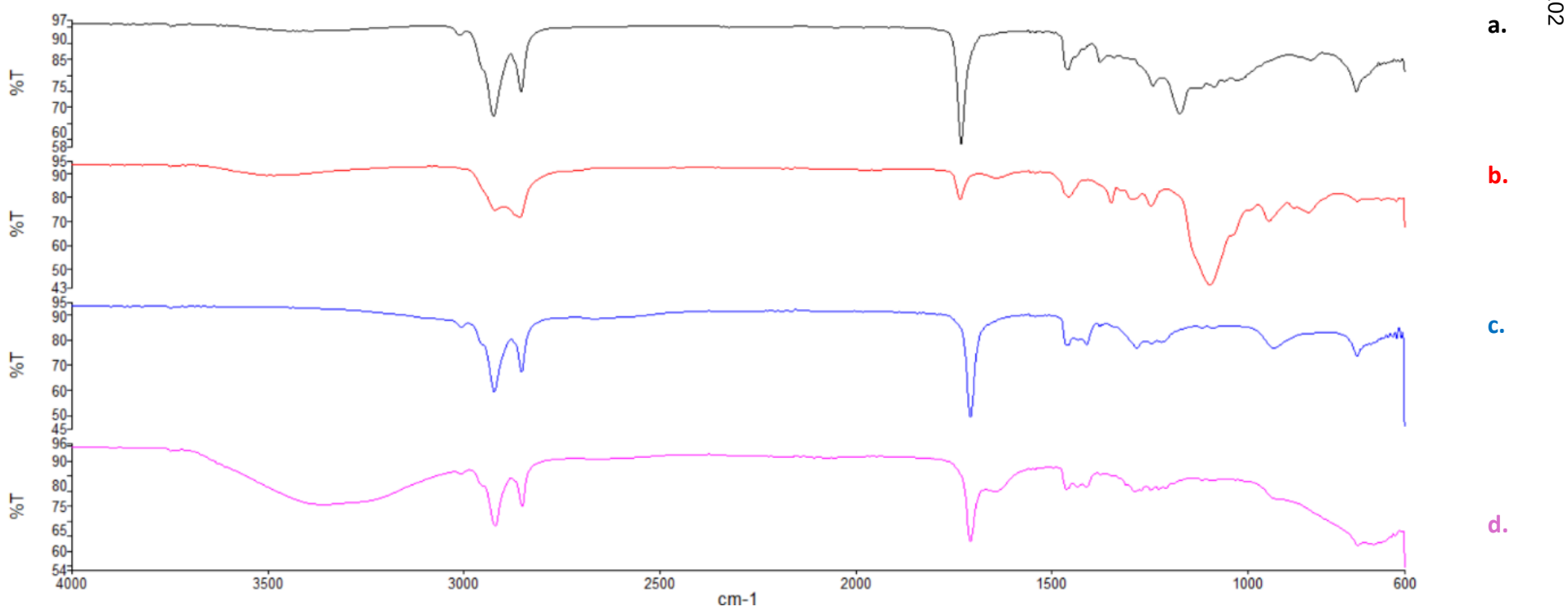


Resim 4.3. **a.** F1 formülasyonlarının* ve **b.** F2 formülasyonlarının TEM görüntüleri

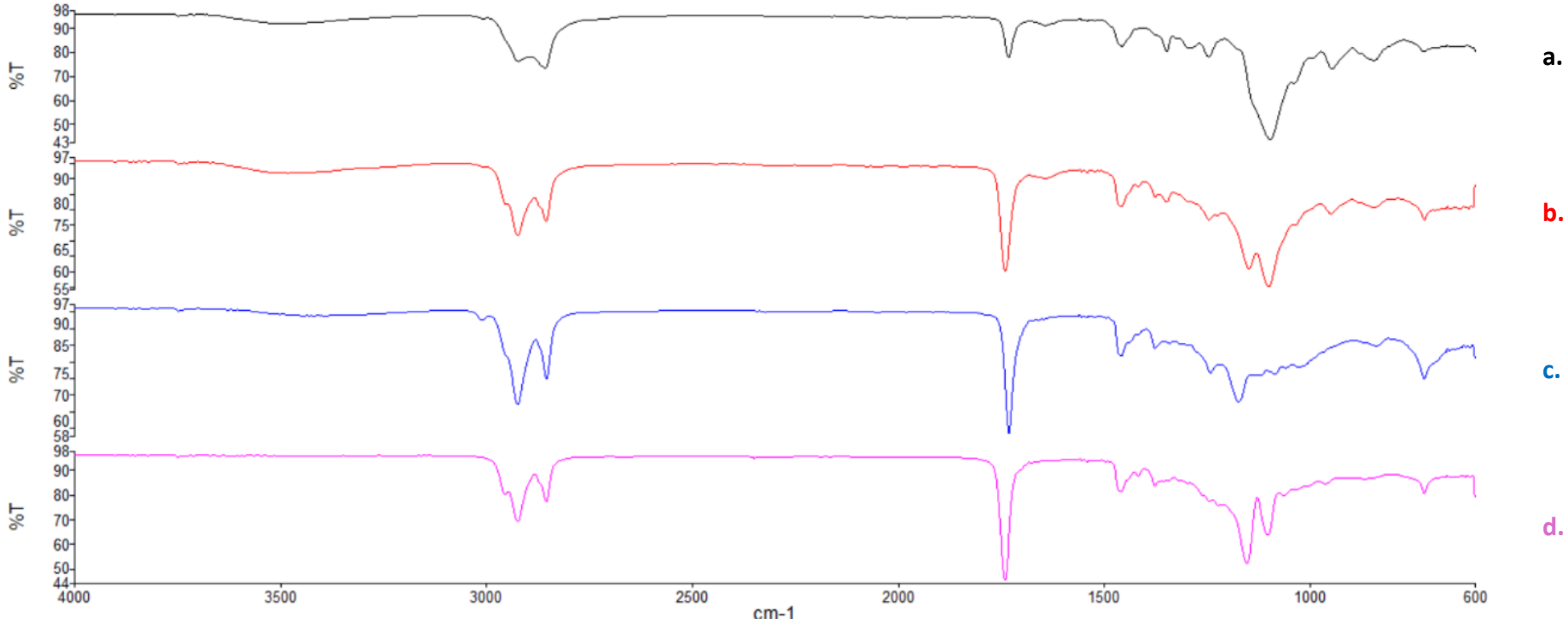
* Aprotinin içeren F1-IL-2 formülasyonu ile çalışmalara devam edilmediğinden TEM ile görüntülenmemiştir.

4.5.4. FT-IR analizi

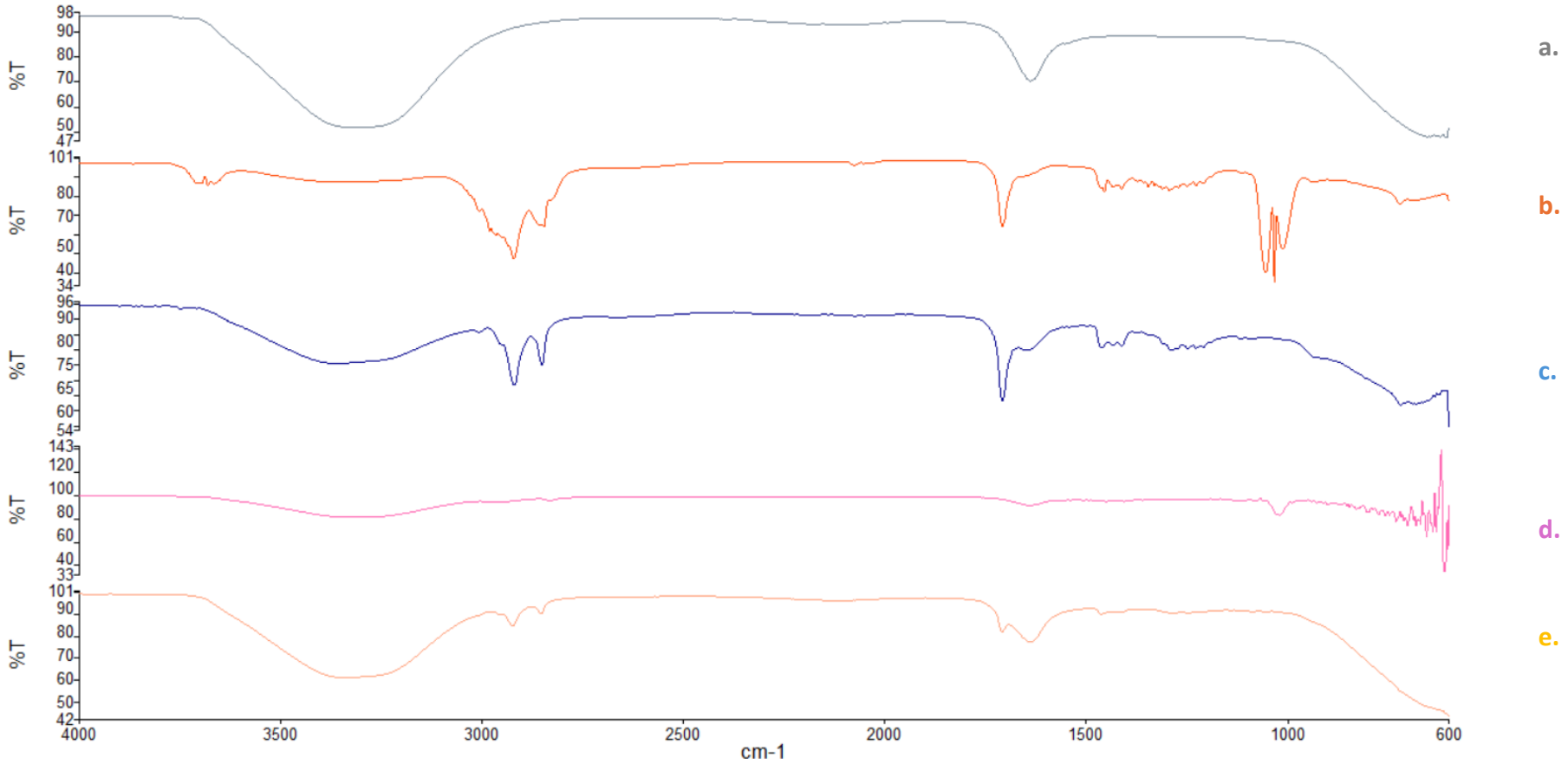
Formülasyon bileşenleri arasındaki etkileşimlerin incelenmesi amacıyla Bölüm 3.2.5'te belirtildiği şekilde gerçekleştirilen FT-IR analizine ait spektrumlar Şekil 4.15 - Şekil 4.18'de sunulmuştur.



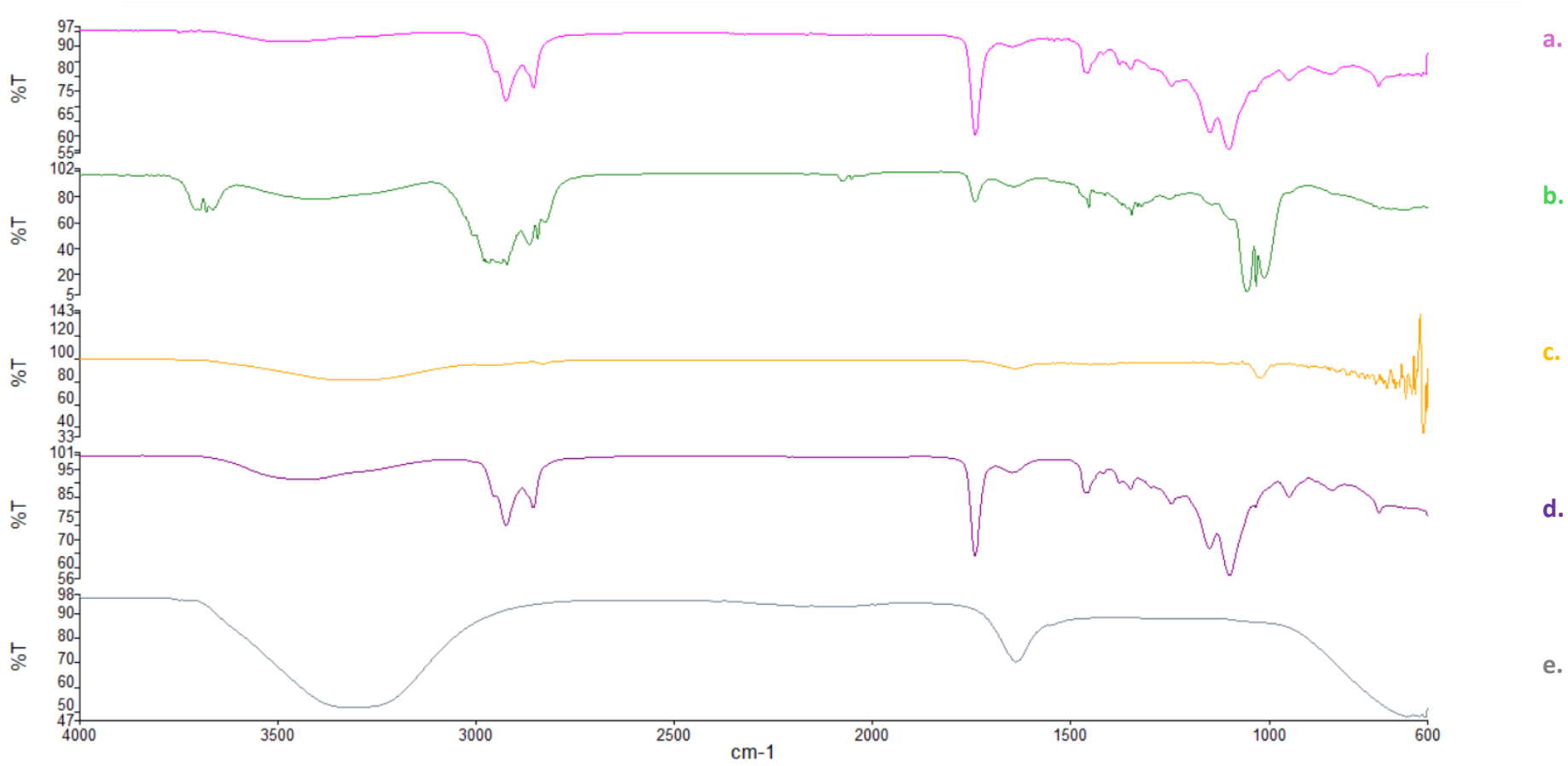
Şekil 4.15. **a.** Poligliserol polirisinolat, **b.** Tween 80, **c.** Oleik asit, **d.** F1 formülasyonuna ait IR spektrumları



Şekil 4.16. **a.** Kolliphor EL, **b.** F2 formülasyonu, **c.** Poligliserol polirisinolat, **d.** Labrafac™'a ait IR spektrumları



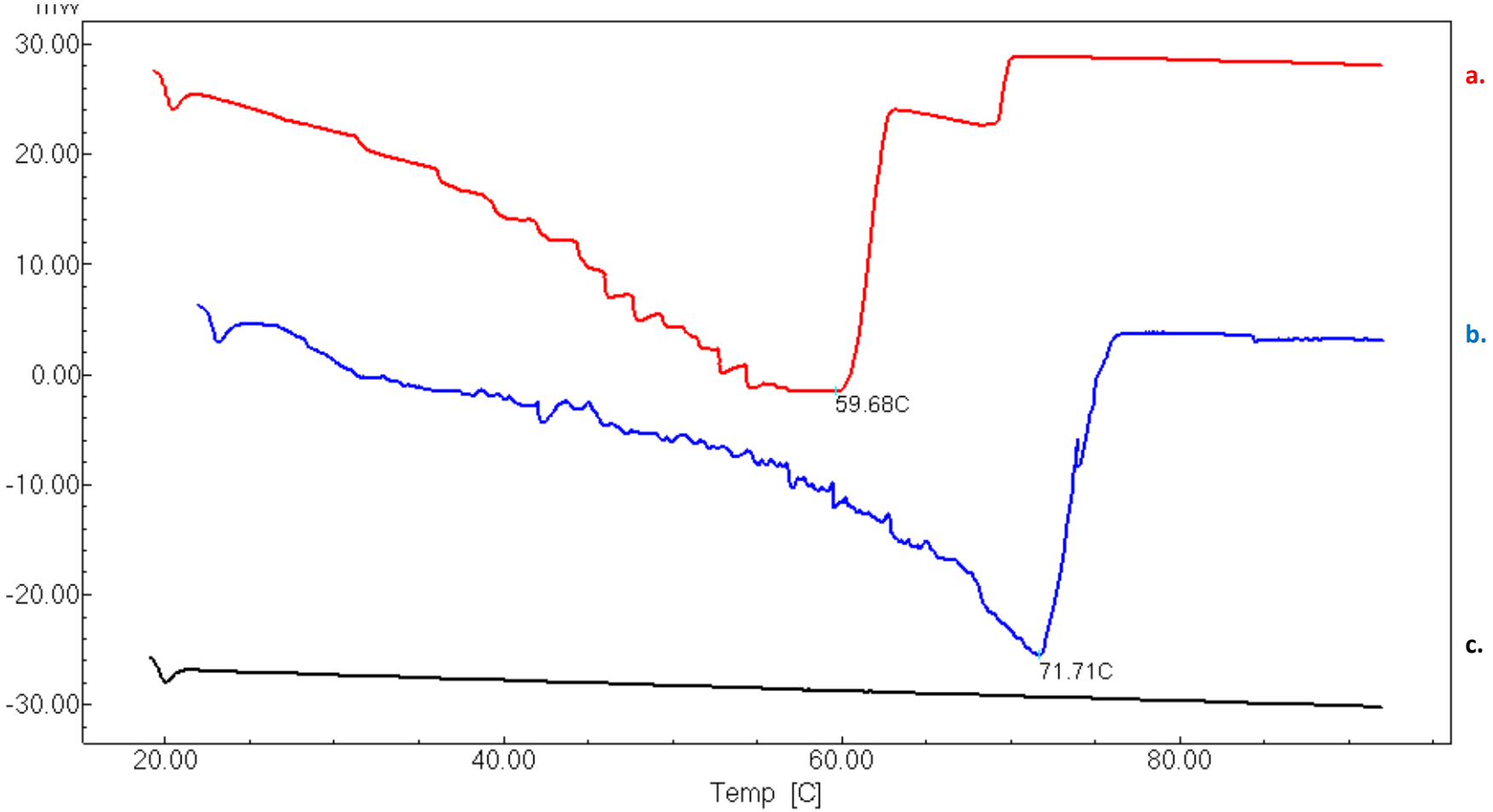
Şekil 4.17. **a.** IL-2, **b.** IL-2 yüklü F1 nanoemülsiyonu, **c.** F1 nanoemülsiyonu, **d.** Aprotinin, **e.** IL-2 ve aprotinin yüklü F1 nanoemülsiyonunun IR spektrumları



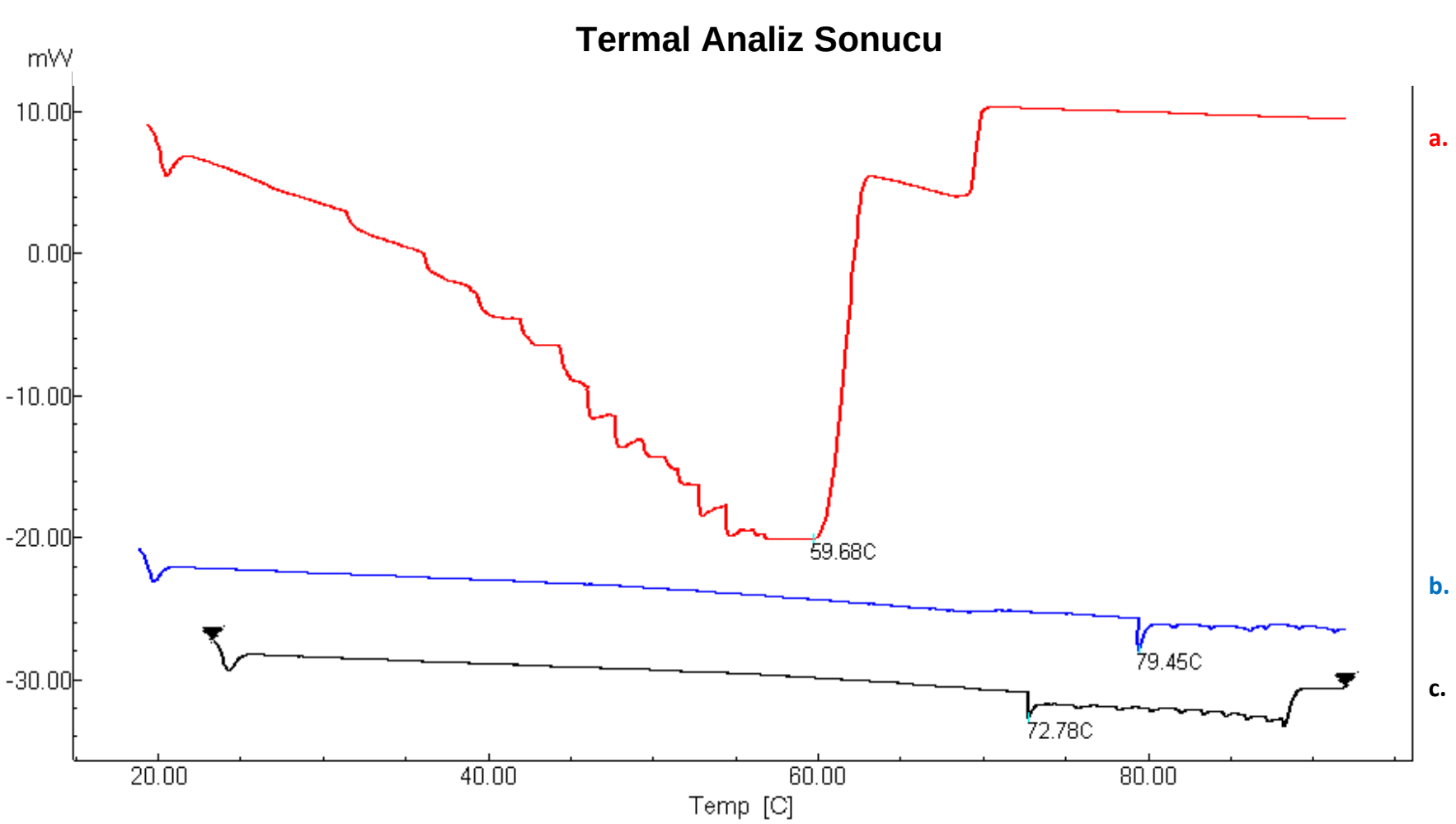
Şekil 4.18. **a.** F2 nanoemülsiyonu, **b.** IL-2 yüklü F2 nanoemülsiyonu, **c.** Aprotinin, **d.** IL-2 ve aprotinin yüklü F2 nanoemülsiyonu, **e.** IL-2 IR spektrumları

4.5.5. DSC Analizi

Formülasyon bileşenleri arasındaki etkileşimlerin incelenmesi amacıyla Bölüm 3.2.5'te belirtildiği şekilde gerçekleştirilen DSC analizine ait termogramlar Şekil 4.19, Şekil 4.20 ve Şekil 4.21'de sunulmuştur.



Şekil 4.19. **a.** IL-2, **b.** IL-2 yüklü F1 nanoemülsiyonu ve **c.** F1 nanoemülsiyonuna ait DSC termogramı



Şekil 4.20. **a.** IL-2, **b.** IL-2 yüklü F2 nanoemülsiyonu ve **c.** F2 nanoemülsiyonuna ait DSC termogramı

4.5.6. Viskozite

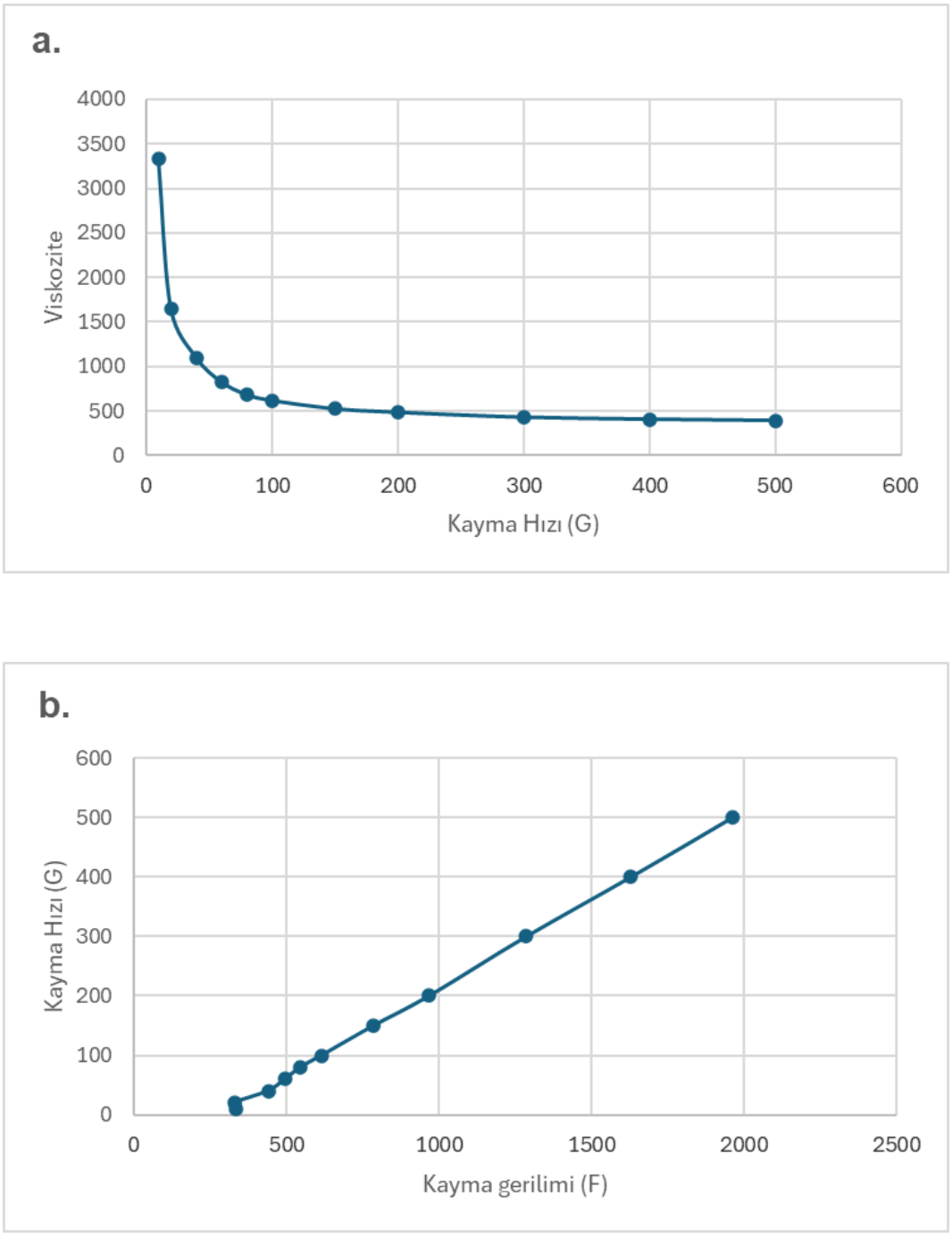
IL-2 yüklü ve yüklü olmayan formülasyonlara ait viskozite ölçümleri Bölüm 3.2.5'te belirtildiği şekilde MicroVisc cihazı ve Brookfield DV-III Rheometer ile gerçekleştirilmiştir. F1 formülasyonunun viskozitesi çok düşük olduğu için Brookfield rotasyonel koni viskozimetresi ile değerlendirilemediğinden MicroVisc cihazı tercih edilerek ölçümler yapılmıştır. MicroVisc cihazı ile F1 ve F2 formülasyonları için viskozite değerleri sırasıyla 138,27 ± 0,12 mPa.s ve 770,37 ± 1,21 mPa.s olarak bulunmuştur. IL-2 yüklü F1 ve IL-2 yüklü F2 formülasyonları için ise sırasıyla 124,20 ± 2,10 mPa.s ve 725,03 ± 0,57 mPa.s olarak yüklü olmayan formülasyonlarla benzer bulunmuştur.

Brookfield DV-III Rheometer ile F1 formülasyonlarının viskozitesi ölçülemediğinden ölçülebilen F2 formülasyonlarına ait viskozite sonuçları Çizelge 4.17'de verilmiştir. Bu formülasyonların viskozite-kayma hızı ve kayma hızı- kayma gerilimi grafikleri Şekil 4.21, Şekil 4.22 ve Şekil 4.23'te sunulmuştur.

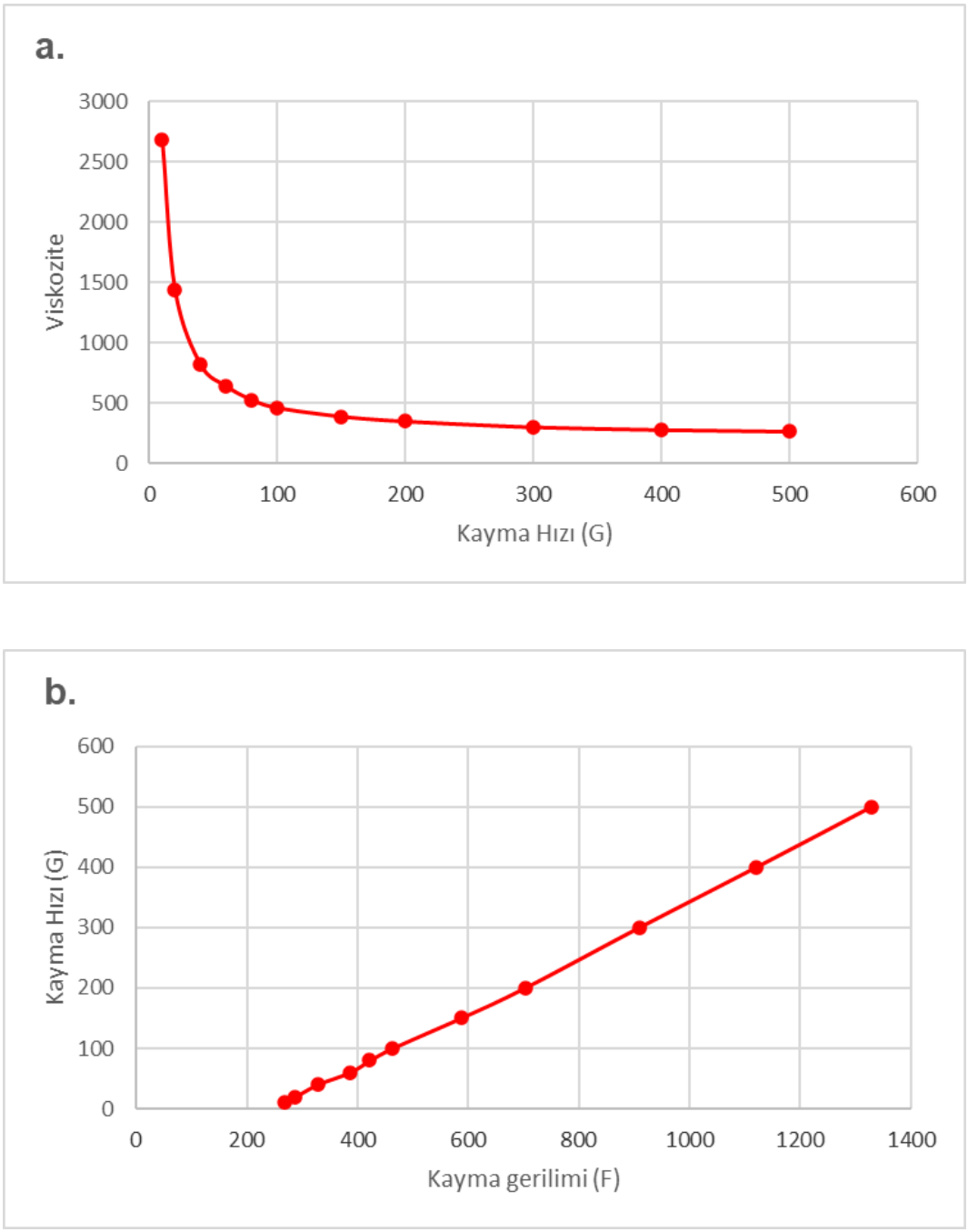
Çizelge 4.17. F2 formülasyonlarına ait Brookfield DV-III Rheometer viskozite sonuçları

Formülasyon	**Viskozite (cP)** (Kayma hızı:60) (Ort±SS)
F2	819 ± 20
F2-IL-2	644 ± 7
F2- IL-2-Aprotinin	646 ± 18

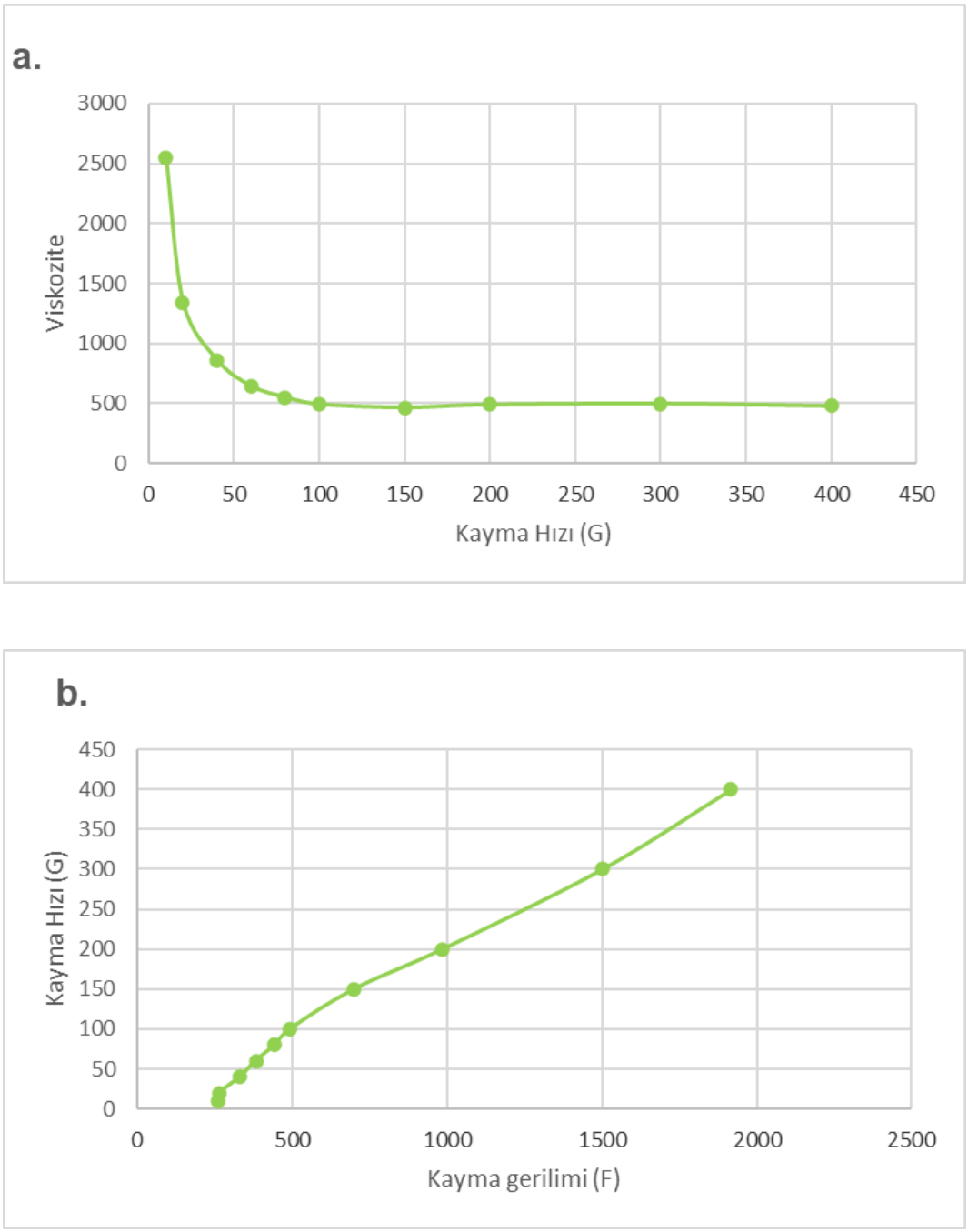
(Ort±SS n=3)



Şekil 4.21. F2 formülasyonunun **a.** viskozite-kayma hızı ve **b.** kayma hızı- kayma gerilimi grafikleri



Şekil 4.22. F2-IL-2 formülasyonunun **a.** viskozite-kayma hızı ve **b.** kayma hızı-kayma gerilimi grafikleri



Şekil 4.23. F2-IL-2-Aprotinin formülasyonunun **a.** viskozite-kayma hızı ve **b.** kayma hızı- kayma gerilimi grafikleri

4.5.7. Yüzey gerilimi ölçümleri

Asılı damla yöntemi kullanılarak Attension® Theta Lite cihazı ile Bölüm 3.2.5'te belirtildiği şekilde gerçekleştirilen yüzey gerilimi ölçümlerine ait sonuçlar Çizelge 4.18 - 4.20'de sunulmuştur.

Çizelge 4.18. F1 ve IL-2 yüklü F1'e ait asılı damla görüntüleri ve yüzey gerilimi sonuçları*



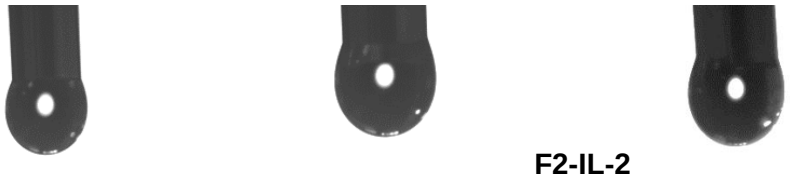
F1 **F1-IL-2**

Yüzey gerilimi	34,88 ± 1,30 mN/m	37,41 ± 0,39 mN/m
Hacim	5,62 ± 0,03 µL	5,59 ± 0,02 µL

(Ort±SS n=3, p>0,05)

* Aprotinin içeren F1-IL-2 formülasyonu ile çalışmalara devam edilmediğinden yüzey gerilimleri değerlendirilmemiştir.

Çizelge 4.19. F2, IL-2 yüklü F2 ve Aprotinin içeren IL-2 yüklü F2'ye ait asılı damla görüntüleri ve yüzey gerilimi sonuçlar



F2 **F2-IL-2** **F2-IL-2 -Aprotinin**

Yüzey gerilimi	28,92 ± 0,11 mN/m	29,26 ± 0,21 mN/m	27,74 ± 1,60 mN/m
Hacim	5,60 ± 0,03 µL	6,90 ± 0,73 µL	7,31 ± 0,11 µL

(Ort±SS n=3, p>0,05)

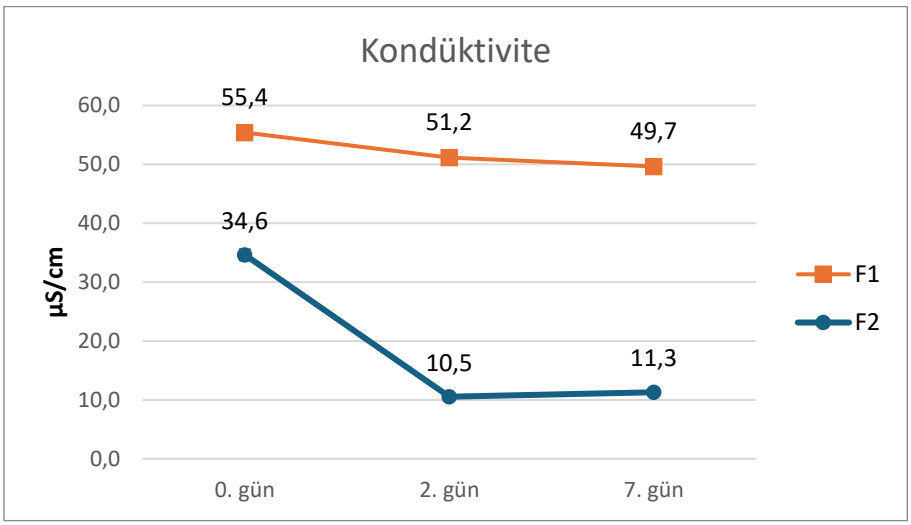
Çizelge 4.20. Farklı kaynaklardan temin edilen IL-2 ile yüklü nanoemülsiyonların karşılaştırılması

	F2-IL-2-Aprotinin	**F2-K-IL-2-Aprotinin**	**F2-B1-IL-2-Aprotinin**
Yüzey gerilimi	27,74 ± 1,59 mN/m	26,77 ± 0,0,45 mN/m	29,03 ± 0,18 mN/m
Hacim	7,31 ± 0,11 µL	6,67 ± 0,87 µL	7,29 ± 0,84 µL

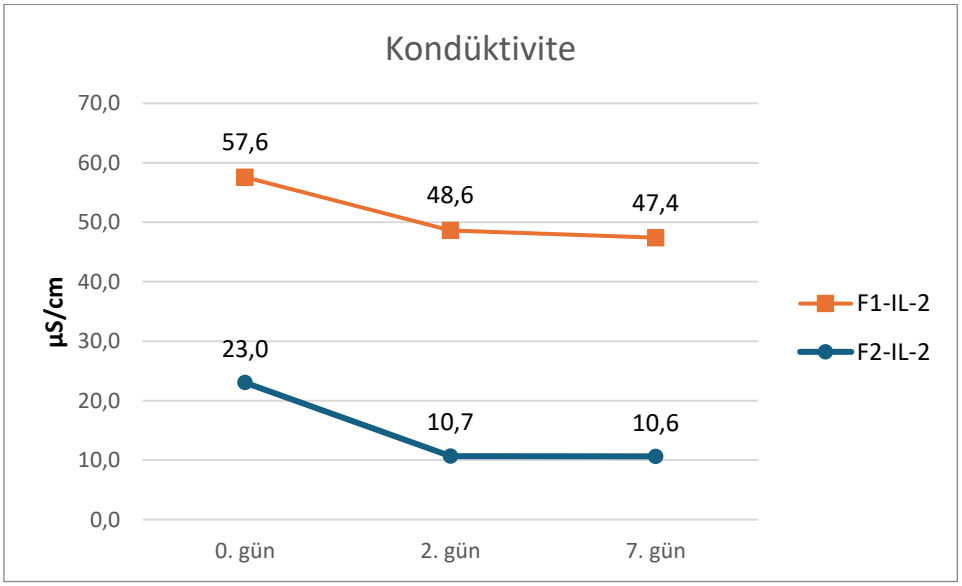
(Ort±SS n=3, p>0,05)

4.5.8. İletkenlik ölçümleri

Bölüm 3.2.5'te belirtildiği şekilde gerçekleştirilen iletkenlik ölçümlerine ait sonuçlar Şekil 4.24, Şekil 4.25 ve Çizelge 4.21'de sunulmuştur.



Şekil 4.24. F1 ve F2 formülasyonlarının 1 haftalık kondüktivite sonuçları



Şekil 4.25. IL-2 yüklü F1 ve IL-2 yüklü F2 formülasyonlarının 1 haftalık kondüktivite sonuçları

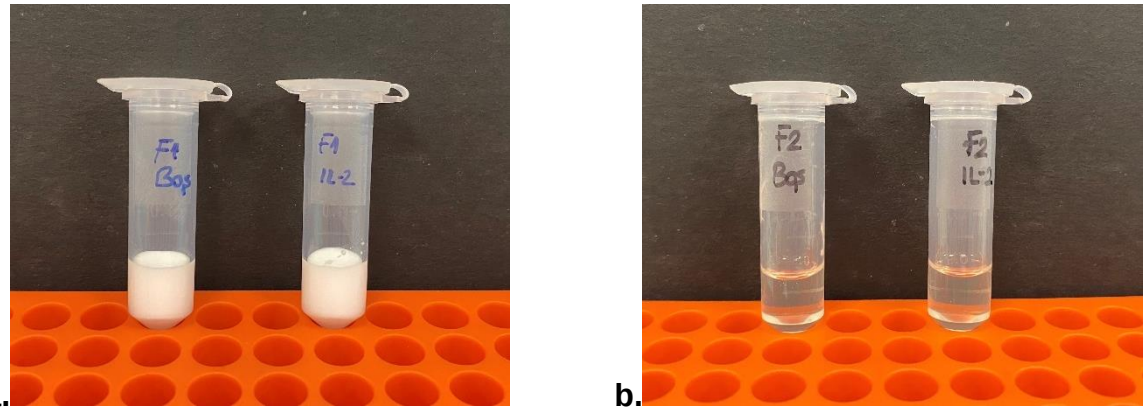
Çizelge 4.21. Taze hazırlanan IL-2 yüklü olmayan, IL-2 yüklü ve Aprotinin içeren IL-2 yüklü çoklu emülsiyonların iletkenlik ölçümleri

Formülasyon	**İletkenlik (µS/cm)**
F1	55,4 ± 0,4
F1-IL-2	57,6 ± 0,2
F1- IL-2-Aprotinin	85,4 ± 0,1
F2	34,6 ± 0,91
F2-IL-2	23,0 ± 0,02
F2- IL-2-Aprotinin	6,05 ± 0,07

(Ort±SS n=3)

4.5.9. Termodinamik stabilite çalışmaları

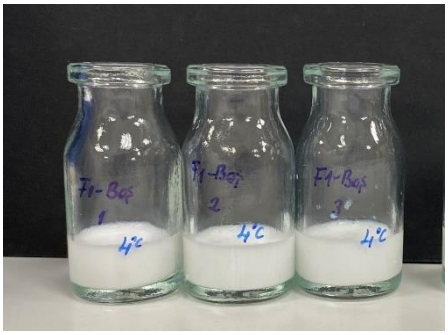
IL-2 içermeyen ve IL-2 yüklü çoklu nanoemülsiyonların ısıtma-soğutma döngüsü, santrifüj ve donma-çözme olmak üzere üç basamakta gerçekleştirilen termodinamik stabilite çalışmalarına ait damlacık boyutu ve PDİ ölçüm sonuçları aşağıda sunulmuştur. Formülasyonlarda santifüj testinden sonra faz ayrılması gözlenmemiştir (Resim 4.4.a-b).



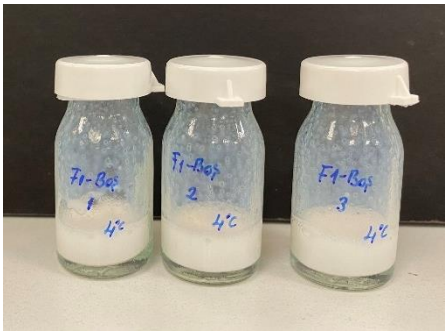
a. **b.**

Resim 4.4. **a.** F1 formülasyonlarının fiziksel görünümü **b.** F2 formülasyonlarının fiziksel görünümü

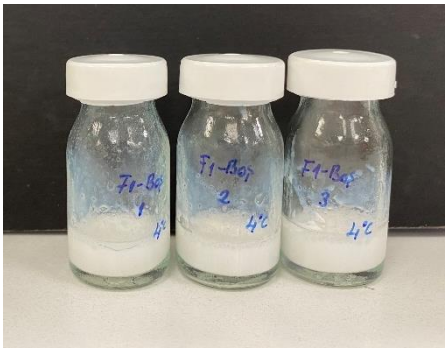
Başlangıç ve döngü sonrası çekilen fotoğraflar Resim 4.5 ve Resim 4.6'da sunulmuştur. Gerçekleştirilen damlacık boyutu, PDİ ve zeta potansiyeli ölçümleri grafiksel olarak Şekil 4.26 ve Şekil 4.27'de gösterilmiştir.



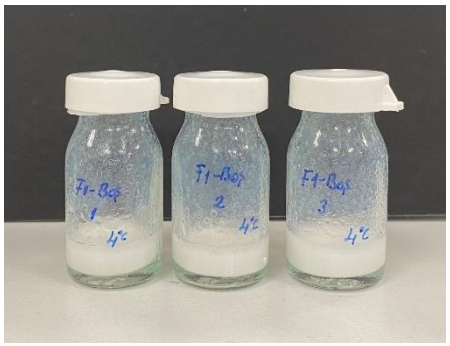
Başlangıç



1.Döngü

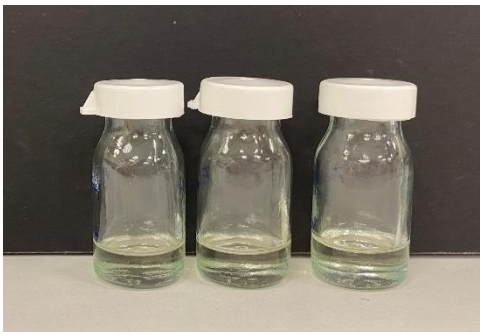


2.Döngü

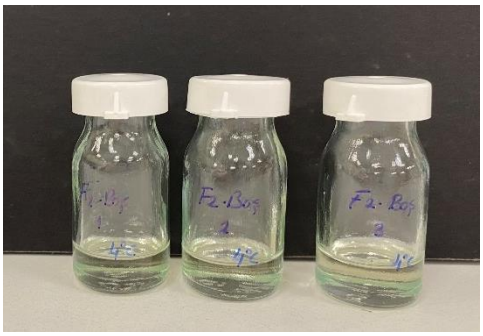


3.Döngü

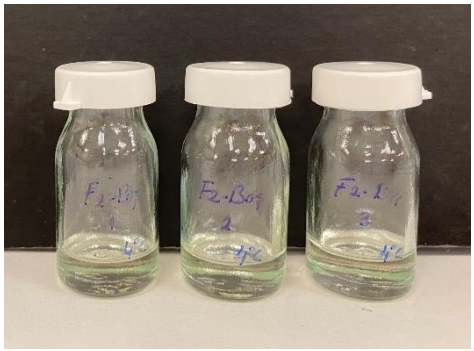
Resim 4.5. F1 formülasyonunun başlangıç ve ısıtma-soğutma döngüleri sonrası fiziksel görünümü



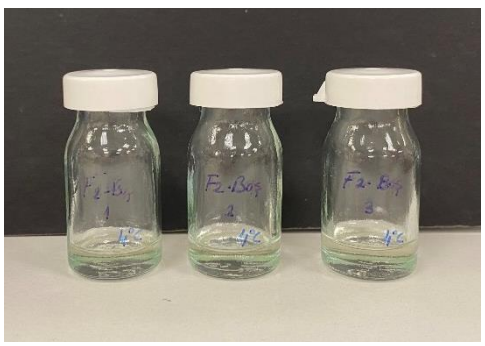
Başlangıç



1.Döngü

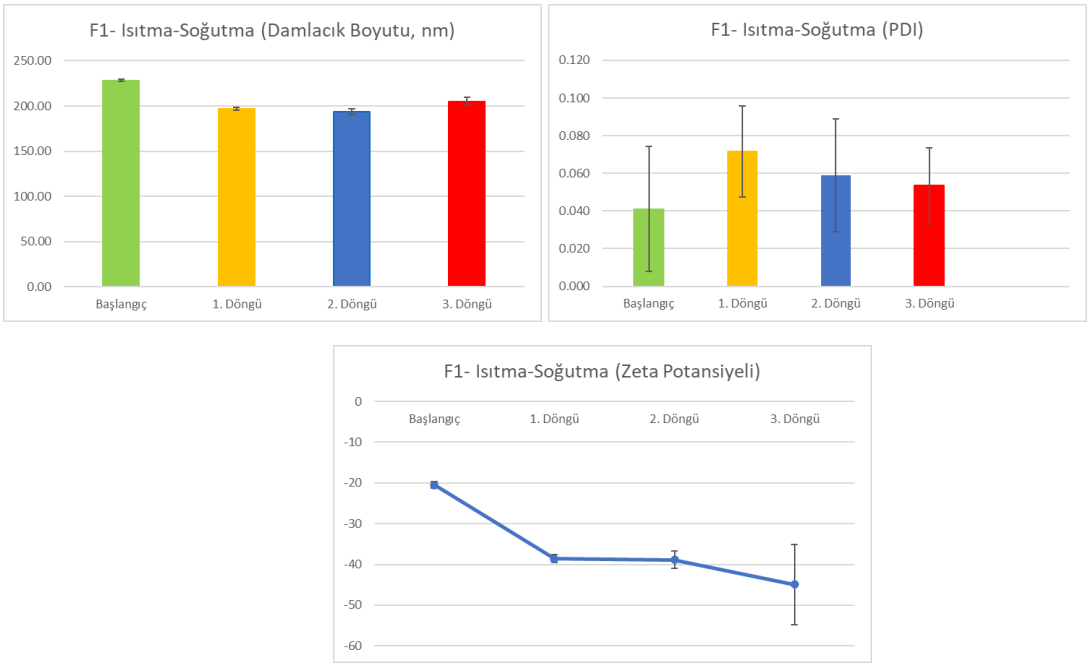


2.Döngü

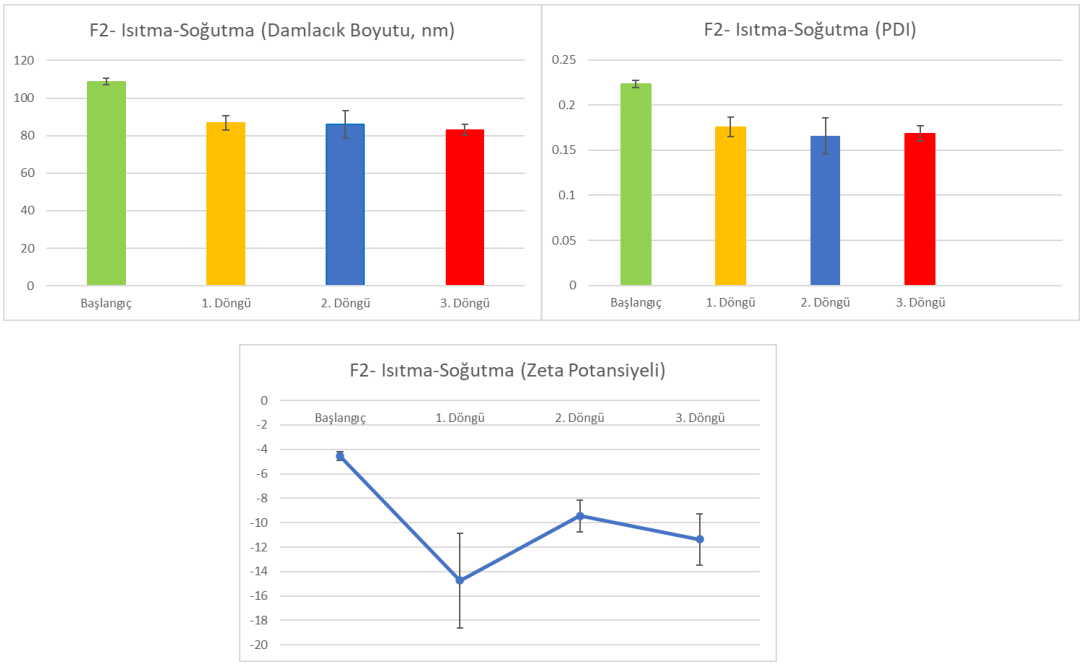


3.Döngü

Resim 4.6. F2 formülasyonunun başlangıç ve ısıtma-soğutma döngüleri sonrası fiziksel görünümü



Şekil 4.26. F1 formülasyonunun başlangıç ve ısıtma-soğutma döngüleri sonrası damlacık boyutu, PDİ ve zeta potansiyeli grafikleri.

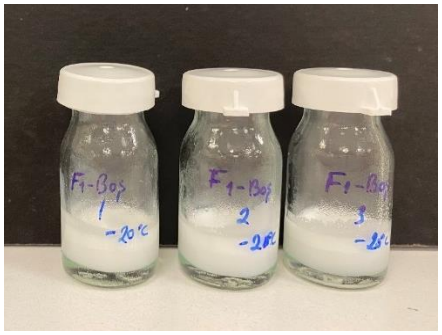


Şekil 4.27. F2 formülasyonunun başlangıç ve ısıtma-soğutma döngüleri sonrası damlacık boyutu, PDİ ve zeta potansiyeli grafikleri.

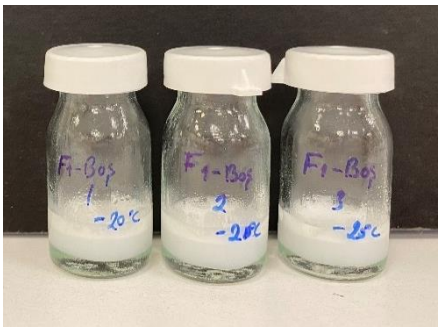
Dondurma-Çözme testine ait başlangıç ve döngü sonrası çekilen fotoğraflar Resim 4.7 ve Resim 4.8'de sunulmuştur. Gerçekleştirilen damlacık boyutu, PDİ ve zeta potansiyeli ölçümleri grafiksel olarak Şekil 4.28 ve Şekil 4.29'da gösterilmiştir.



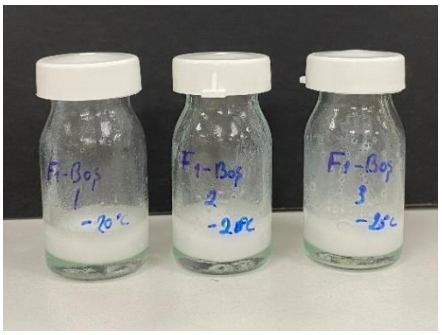
Başlangıç



1.Döngü

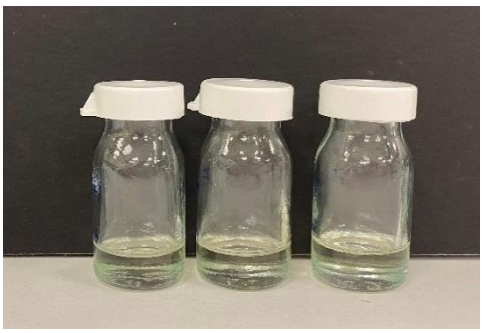


2.Döngü

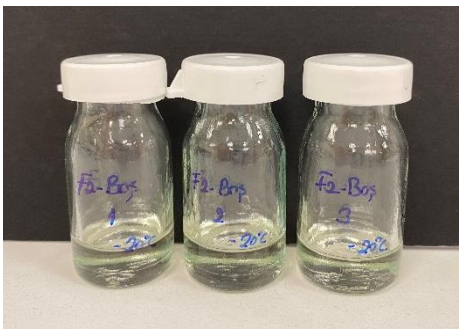


3.Döngü

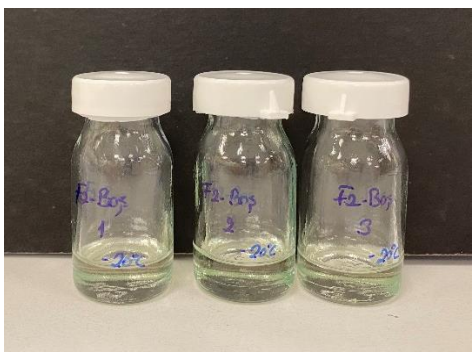
Resim 4.7. F1 formülasyonunun başlangıç ve dondurma-çözme döngüleri sonrası fiziksel görünümü



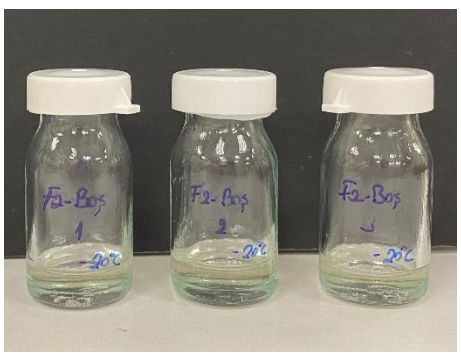
Başlangıç



1.Döngü

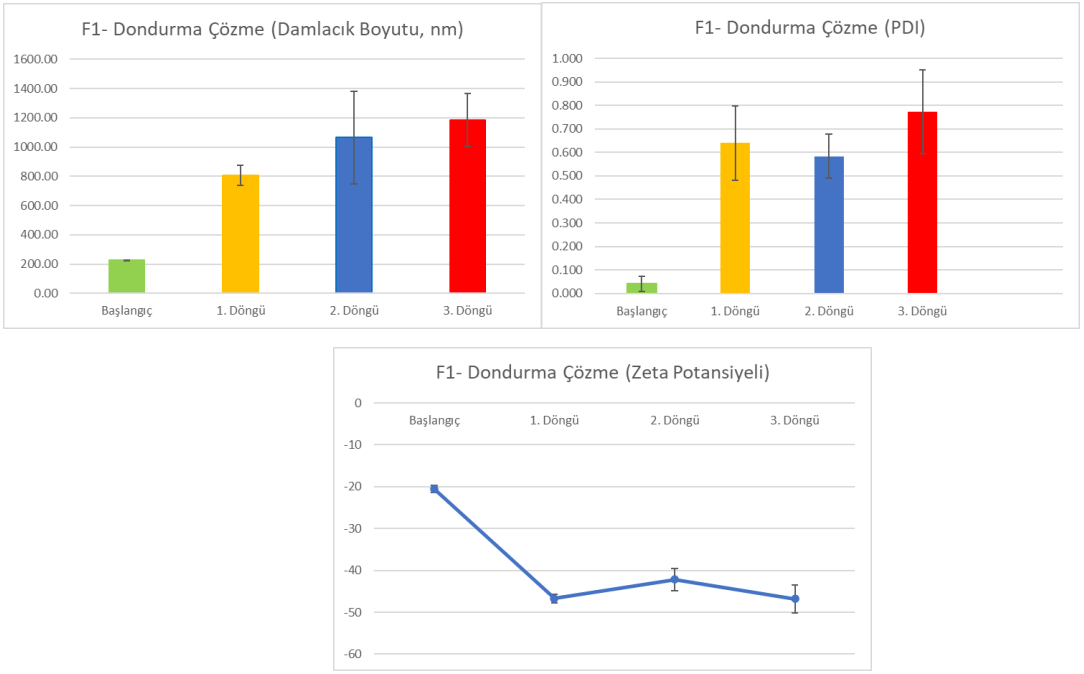


2.Döngü

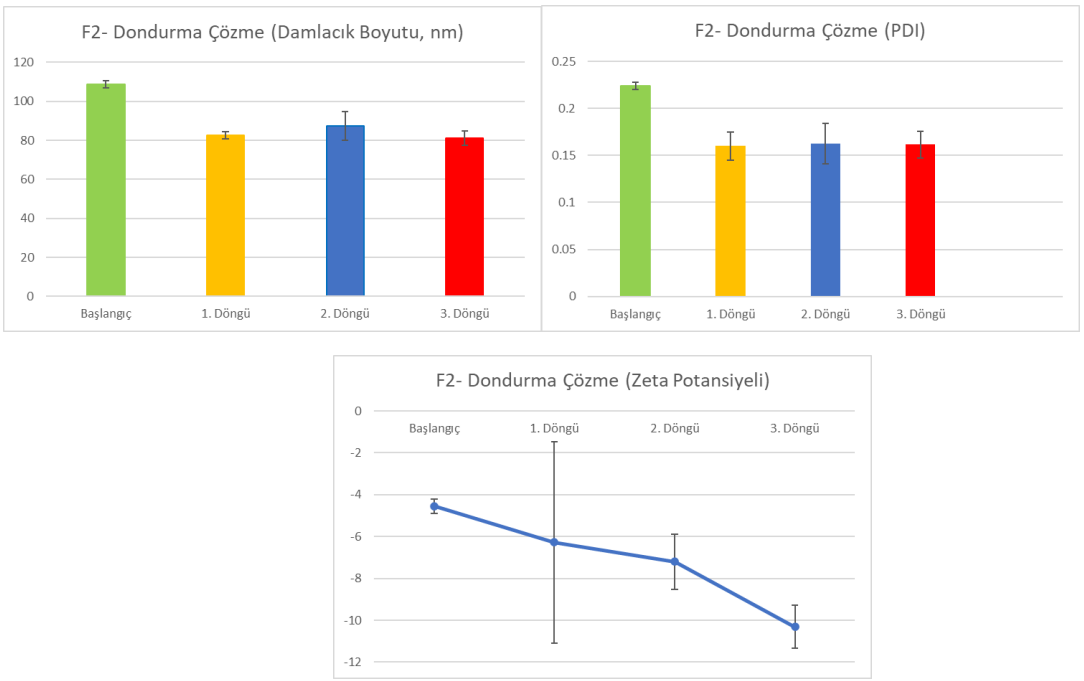


3.Döngü

Resim 4.8. F2 formülasyonunun başlangıç ve dondurma-çözme döngüleri sonrası fiziksel görünümü

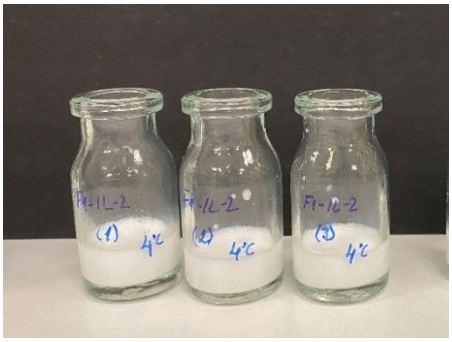


Şekil 4.28. F1 formülasyonunun başlangıç ve dondurma-çözme döngüleri sonrası damlacık boyutu, PDİ ve zeta potansiyeli grafikleri.

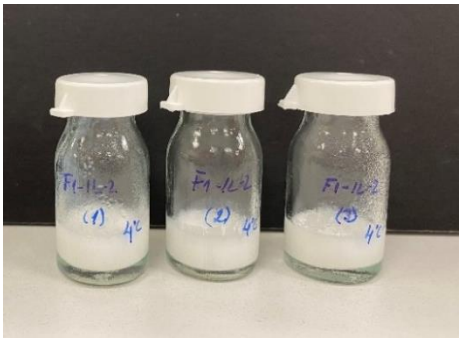


Şekil 4.29. F2 formülasyonunun başlangıç ve dondurma-çözme döngüleri sonrası damlacık boyutu, PDİ ve zeta potansiyeli grafikleri.

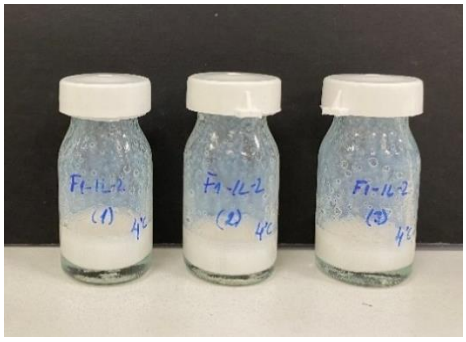
IL-2 yüklü formülasyonlara ait ısıtma-soğutma testine ait başlangıç ve döngü sonrası çekilen fotoğraflar Resim 4.9 ve Resim 4.10'da sunulmuştur. Gerçekleştirilen damlacık boyutu, PDİ ve zeta potansiyeli ölçümleri grafiksel olarak Şekil 4.30 ve Şekil 4.31'de gösterilmiştir.



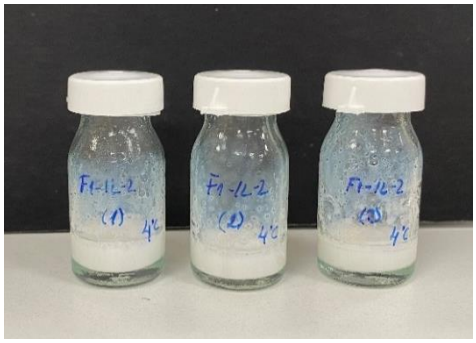
Başlangıç



1.Döngü

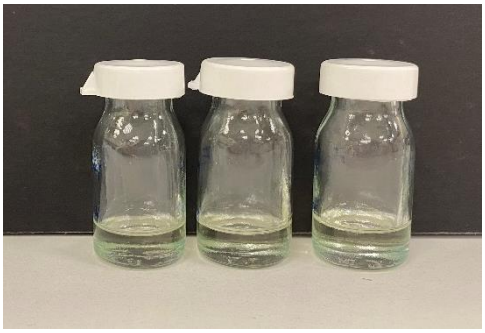


2.Döngü

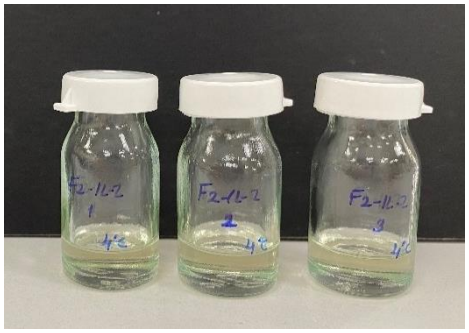


3.Döngü

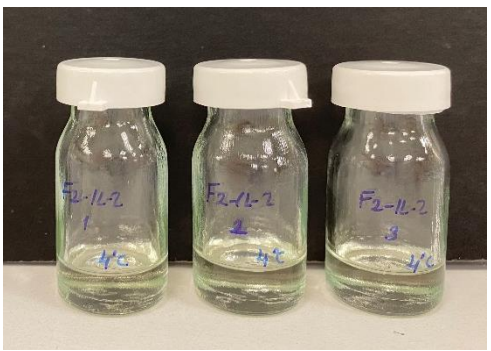
Resim 4.9. IL-2 yüklü F1'in başlangıç ve ısıtma-soğutma döngüleri sonrası fiziksel görünümü



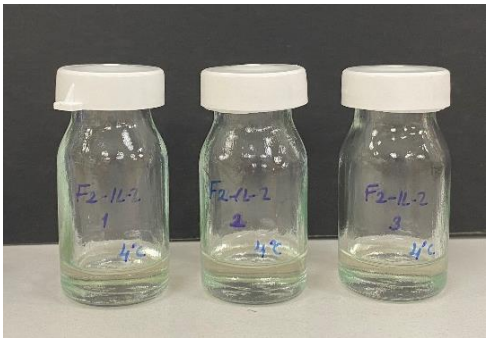
Başlangıç



1.Döngü

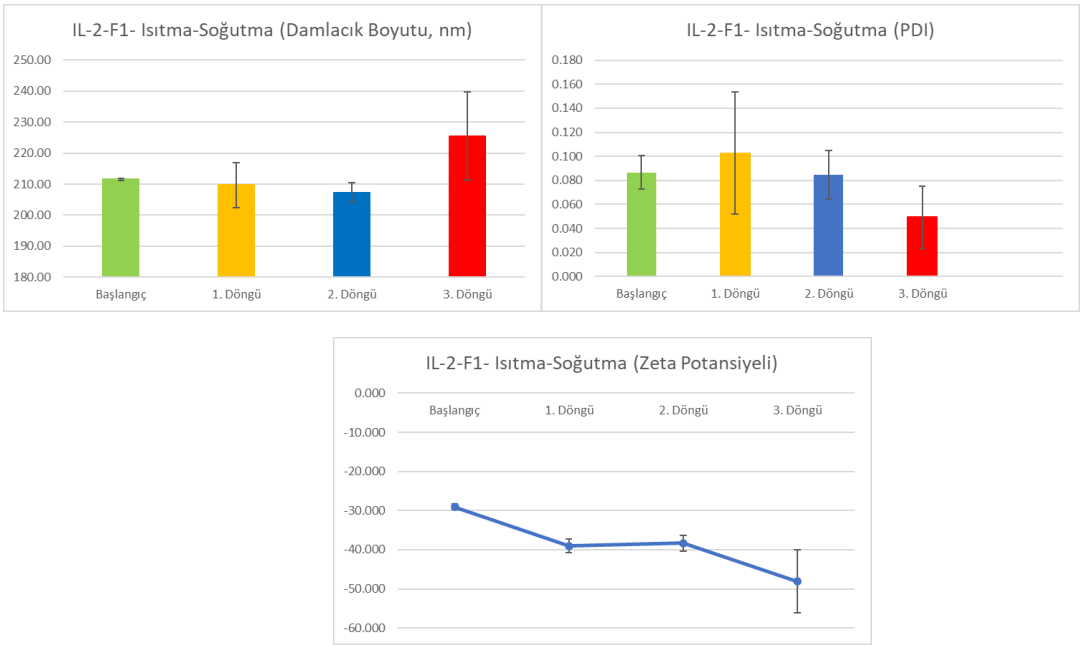


2.Döngü

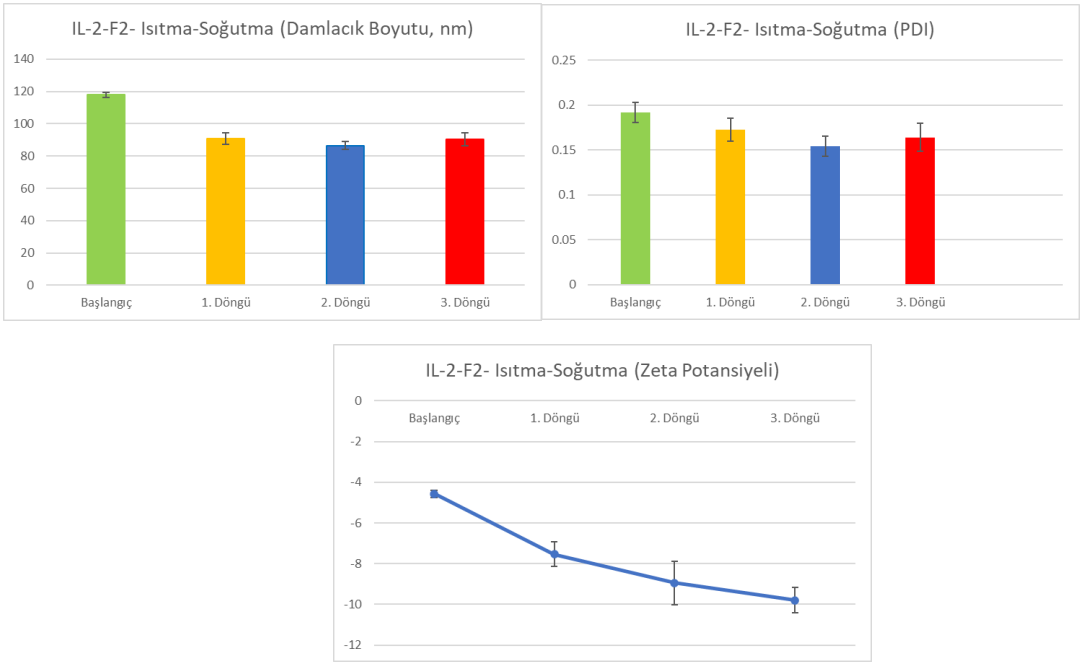


3.Döngü

Resim 4.10. IL-2 yüklü F2'nin başlangıç ve ısıtma-soğutma döngüleri sonrası fiziksel görünümü



Şekil 4.30. IL-2 yüklü F1 formülasyonunun başlangıç ve ısıtma-soğutma döngüleri sonrası damlacık boyutu, PDİ ve zeta potansiyeli grafikleri.

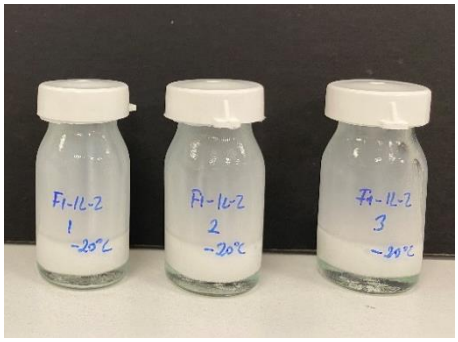


Şekil 4.31. IL-2 yüklü F2 formülasyonunun başlangıç ve ısıtma-soğutma döngüleri sonrası damlacık boyutu, PDİ ve zeta potansiyeli grafikleri.

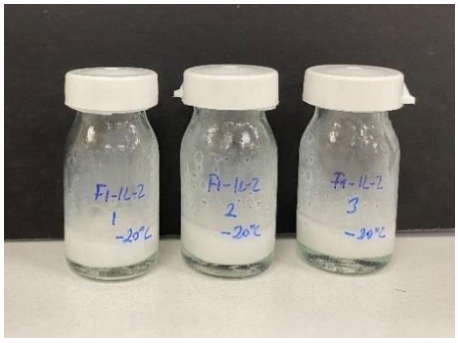
IL-2 yüklü formülasyonlara ait Dondurma-Çözme testine ait başlangıç ve döngü sonrası çekilen fotoğraflar Resim 4.11 ve Resim 4.12'de sunulmuştur. Gerçekleştirilen damlacık boyutu, PDİ ve zeta potansiyeli ölçümleri grafiksel olarak Şekil 4.32 ve Şekil 4.33'te gösterilmiştir.



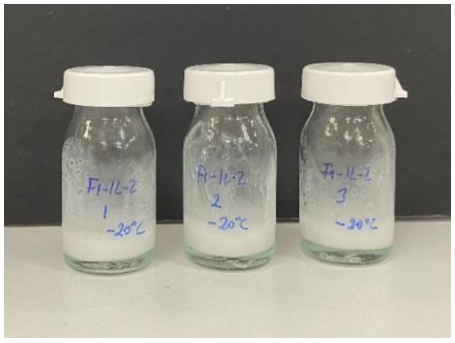
Başlangıç



1.Döngü

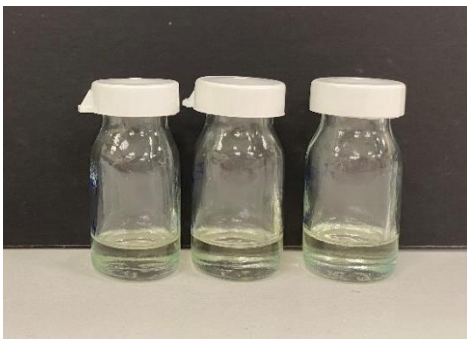


2.Döngü

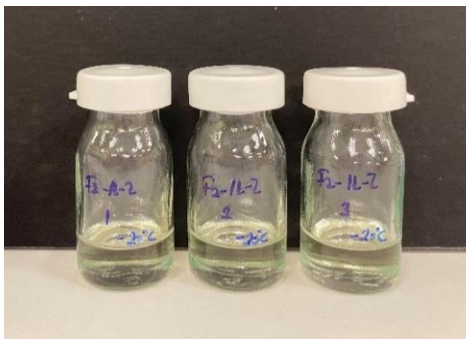


3.Döngü

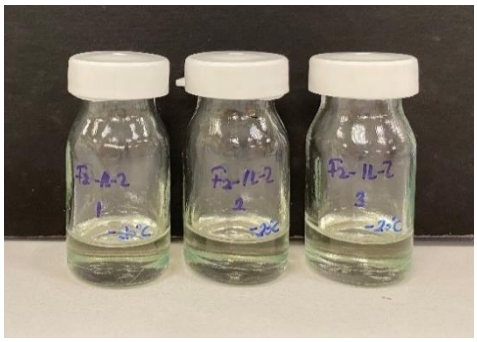
Resim 4.11. IL-2 yüklü F1'in başlangıç ve dondurma-çözme döngüleri sonrası fiziksel görünümü



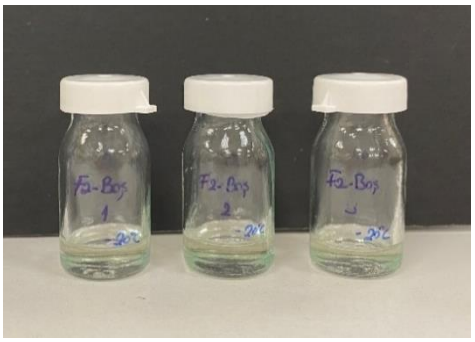
Başlangıç



1.Döngü

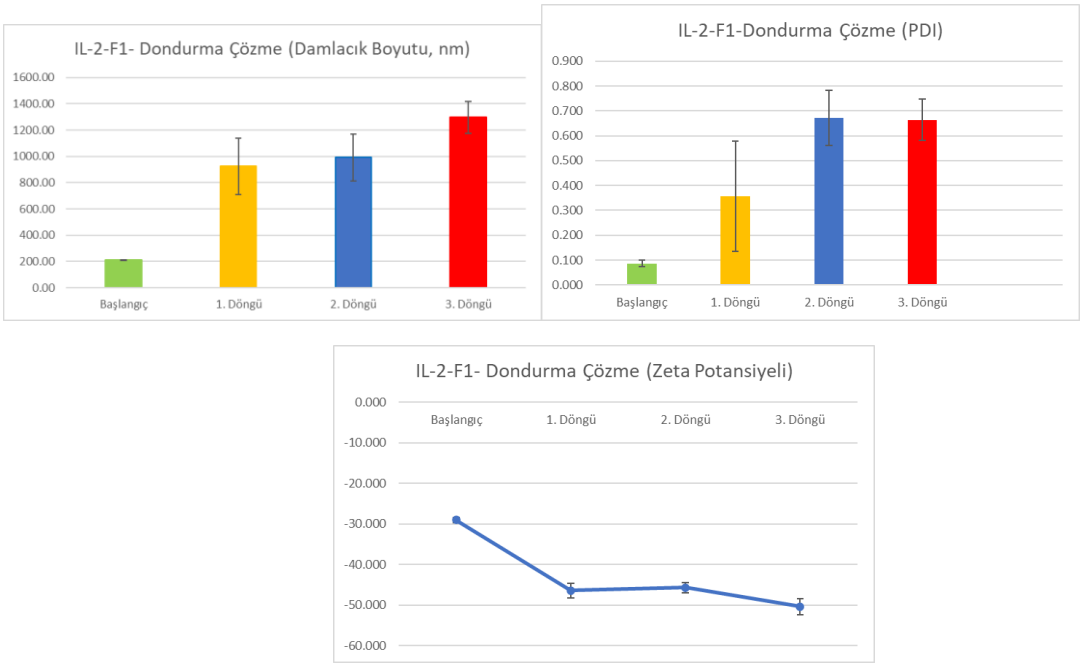


2.Döngü

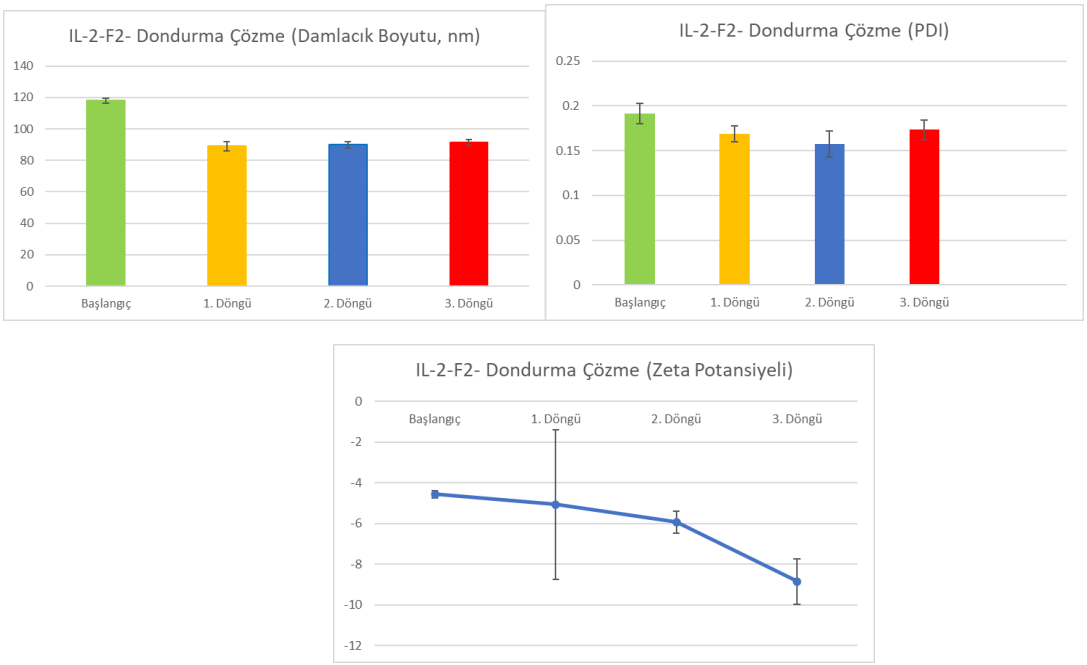


3.Döngü

Resim 4.12. IL-2 yüklü F2'nin başlangıç ve dondurma-çözme döngüleri sonrası fiziksel görünümü



Şekil 4.32. IL-2 yüklü F1 formülasyonunun başlangıç ve dondurma-çözme döngüleri sonrası damlacık boyutu, PDİ ve zeta potansiyeli grafikleri.

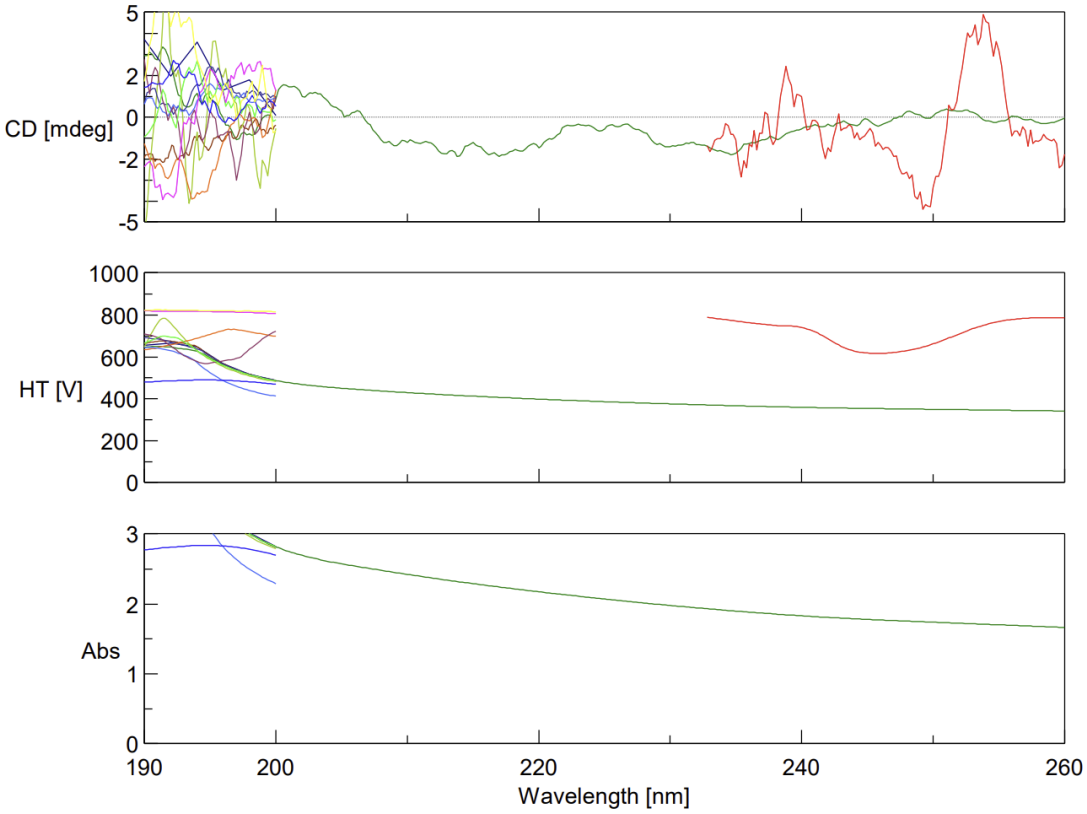


Şekil 4.33. IL-2 yüklü F2 formülasyonunun başlangıç ve dondurma-çözme döngüleri sonrası damlacık boyutu, PDİ ve zeta potansiyeli grafikleri.

4.5.10. Stabilite çalışmaları

IL-2 soğuk zincirde saklandığından IL-2 yüklü çoklu nanoemülsiyonun in vitro stabilitesinin incelenmesi amacıyla saklama ortamı olarak 5°C ± 3°C seçilmiştir. Stres koşulu olarak da 25°C ± 2°C / %60 ± %5 bağıl nemde saklanması ve belirli zaman aralıklarında fiziksel stabilite çalışmaları yapılması planlanmıştı. Ancak, analiz yöntemlerinin formülasyonların değerlendirilmesinde yetersiz kalması sonucu çalışmalar planlandığı doğrultuda gerçekleştirilememiştir. Stabiliteyi değerlendirmek amacıyla damlacık boyutları, PDİ, zeta potansiyeli, viskozite ve yüzey gerilimi değerlendirilmiştir.

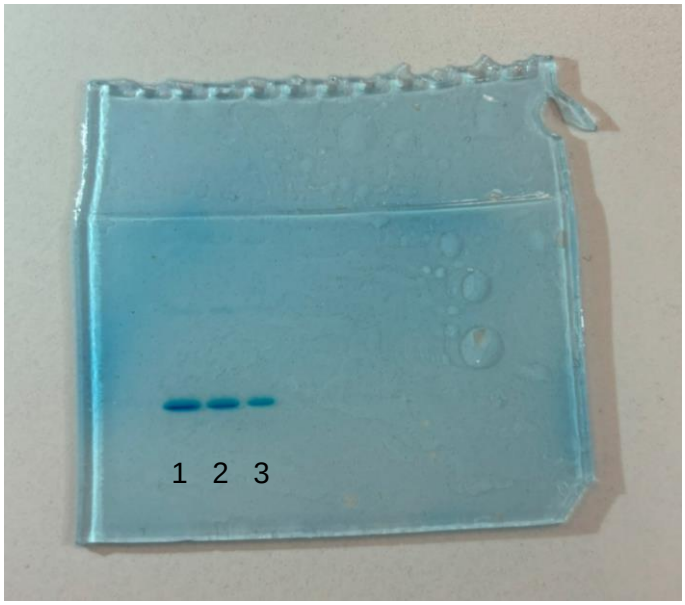
IL-2 yüklü çoklu nanoemülsiyonların Bölüm 3.2.2'de açıklandığı şekilde Jasco J-815 ile gerçekleştirilen sirküler dikroizm analizine ait sonuçlar Şekil 4.34'te verilmiştir.



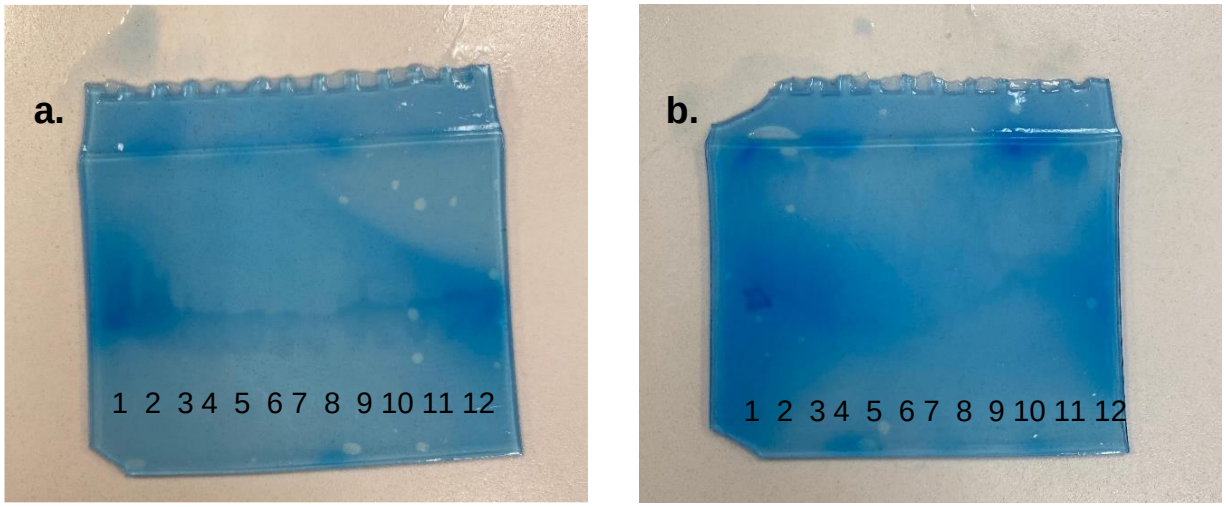
Şekil 4.34. CD ile tekrarlanan ölçüme ait görsel

CD ile formülasyondaki IL-2'nin stabilitesi gösterilmediğinde SDS-PAGE çalışmaları yapılmıştır. SDS ile muamele olan protein yapılarının negatif yüklü bir hale geldikten sonra molekül ağırlığına bağlı olarak jel üzerinde ilerlemeleri incelenmektedir.

%12'lik jelde 150 V 25 dk, 200 V 45 dk koşullarında IL-2 çözeltisine ait bant gözlenmiştir (Resim 4.13). Çalışma bu koşullarda F1 ve F2 için tekrarlandığında formülasyonlardaki IL-2 için jelde referans dışında protein bandı gözlenememiştir (Resim 4.14).

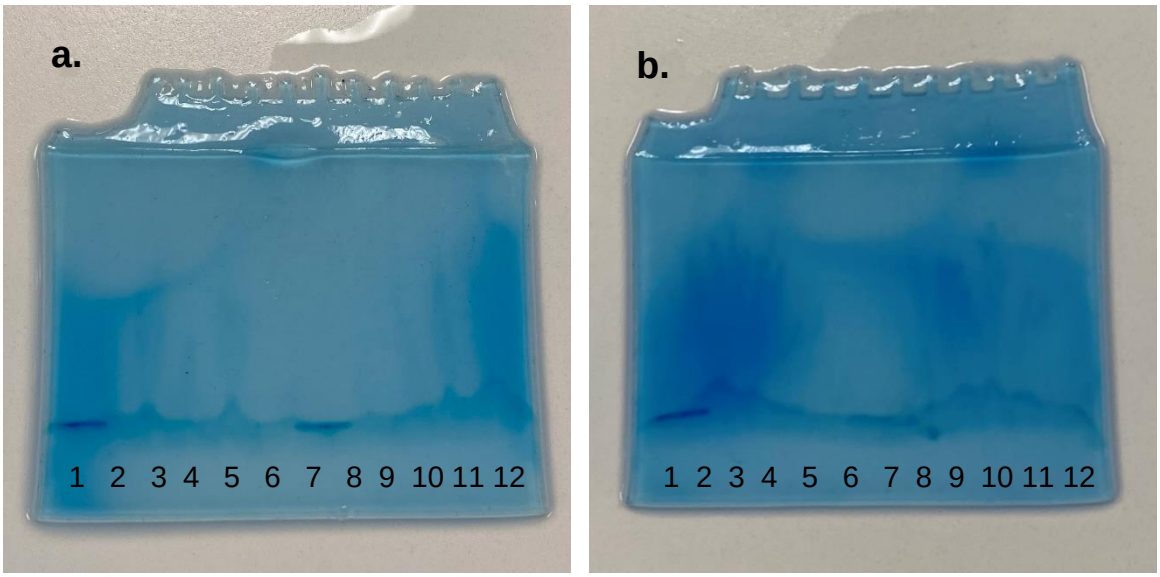


Resim 4.13. %12'lik akrilamid jelde SDS PAGE çalışma görüntüleri (1: 0,625 mg/mL IL-2 çözeltisi, 2: 0,416 mg/mL IL-2 çözeltisi, 3: 0,208 mg/mL IL-2 çözeltisi)



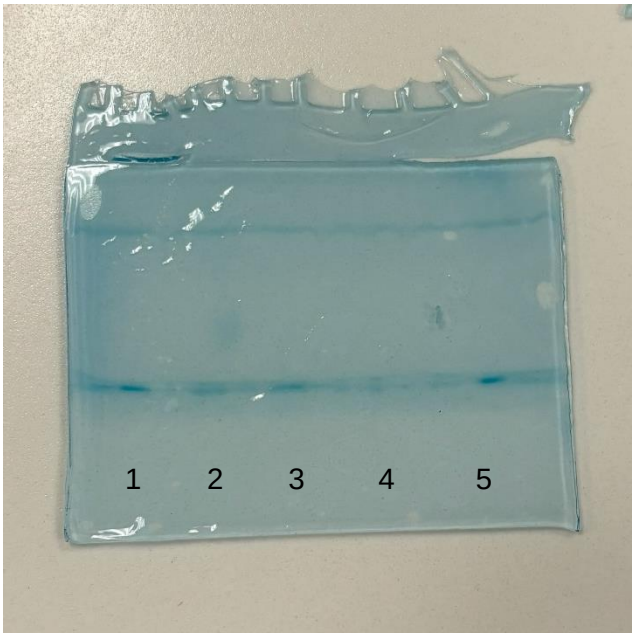
Resim 4.14. Formülasyonların %12'lik akrilamid jelde SDS PAGE çalışma görüntüleri (a jeli F1 formülasyonu için, b jeli F2 formülasyonu için kullanılmıştır. 1: 0,416 mg/mL IL-2 çözeltisi, 2: Formülasyon, 3-7: Formülasyon : %5 Triton-X Çözeltisi, 8-12: Formülasyon : Etanol)

Yüksek konsantrasyonlu IL-2 yüklü F2 formülasyonu hazırlanmıştır. Formülasyon 0,08 mg/g IL-2 içermektedir ve formülasyon Y-F2-IL-2 olarak kodlanmıştır. Jele bu formülasyonun seyreltilmesiyle hazırlanan örnekler yüklenmiştir (Resim 4.15).



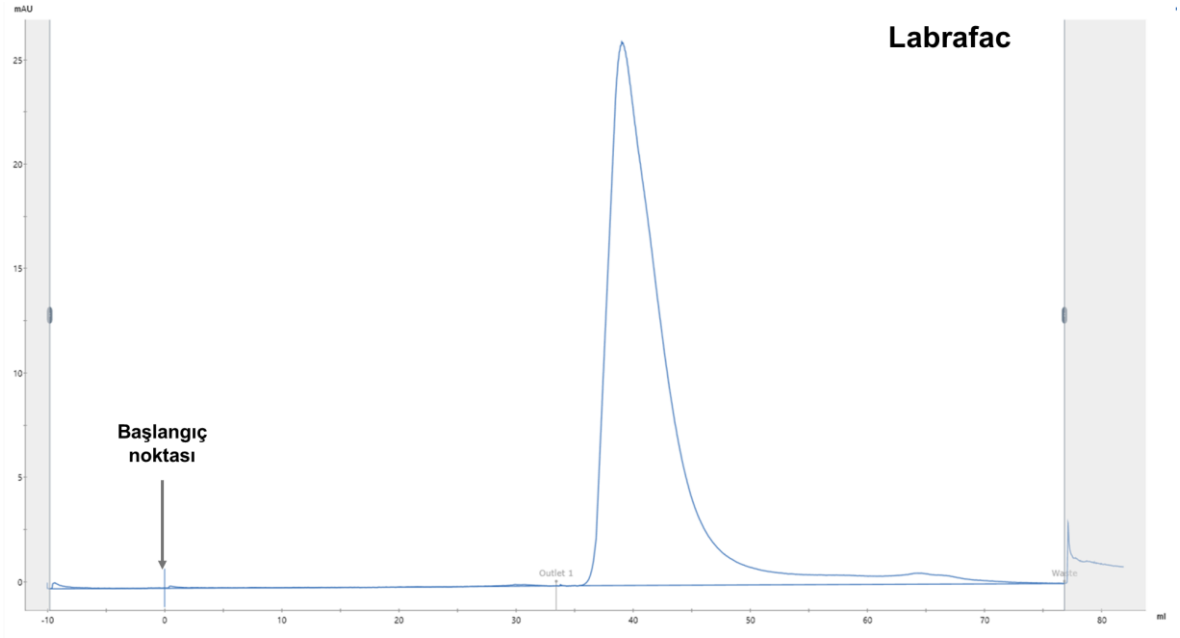
Resim 4.15. F2-IL-2 formülasyonların %12'lik akrilamid jelde SDS PAGE çalışma görüntüleri (a jeline 10 µL, b jeline 20 µL örnek yüklenmiştir. F2 formülasyonu için kullanılmıştır. 1: 0,312 mg/mL IL-2 çözeltisi, 2: Y-F2-IL-2: izopropanol, 3: Y-F2-IL-2: metanol, 4: Y-F2-IL-2: etanol, 5: Y-F2-IL-2: asetonitril, 6: Y-F2-IL-2: %5 Triton-X Çözeltisi, 7: 0,312 mg/mL IL-2 çözeltisi, 8: F2-IL-2: izopropanol, 9: F2-IL-2: metanol, 10: F2-IL-2: etanol, 11: F2-IL-2: asetonitril, 12: F2-IL-2:%5 Triton-X Çözeltisi)

Yüksek konsantrasyonlu IL-2 yüklü F2 formülasyonu pH 7,4 PBS tamponu ile hidrate edilmiş diyaliz membrana doldurulmuş üzerine 200 µL PBS tamponu eklenerek her iki taraftan da sıkıca bağlanmıştır. Diyaliz torba içinde PBS tamponu olan tüpe yerleştirildikten sonra 50 rpm'e ayarlanan çalkalayıcıda 2 saat çalkalanmıştır. PBS tamponundan alınan örnek, örnek seyreltme tamponu ile muamele edildikten sonra jele yüklenerek elektroforez işlemi başlatılmıştır. Elde edilen sonuç Resim 4.16'da sunulmuştur.

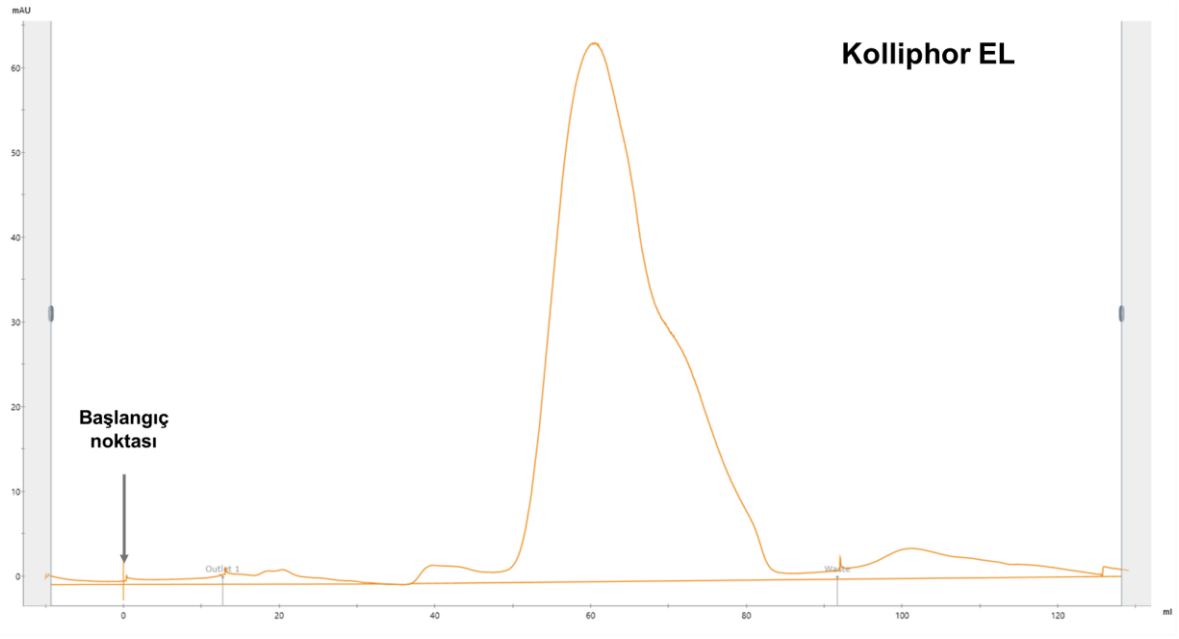


Resim 4.16. Y-F2-IL-2 formülasyonunun %12'lik akrilamid jelde SDS PAGE çalışma görüntüleri (1: 0,312 mg/mL IL-2 çözeltisi, 2: Y-F2-IL-2 diyaliz örneği, 3: Y-F2-IL-2 diyaliz örneği, 4: Y-F2-IL-2 seyreltilmiş diyaliz örneği, 5: 0,312 mg/mL IL-2 çözeltisi)

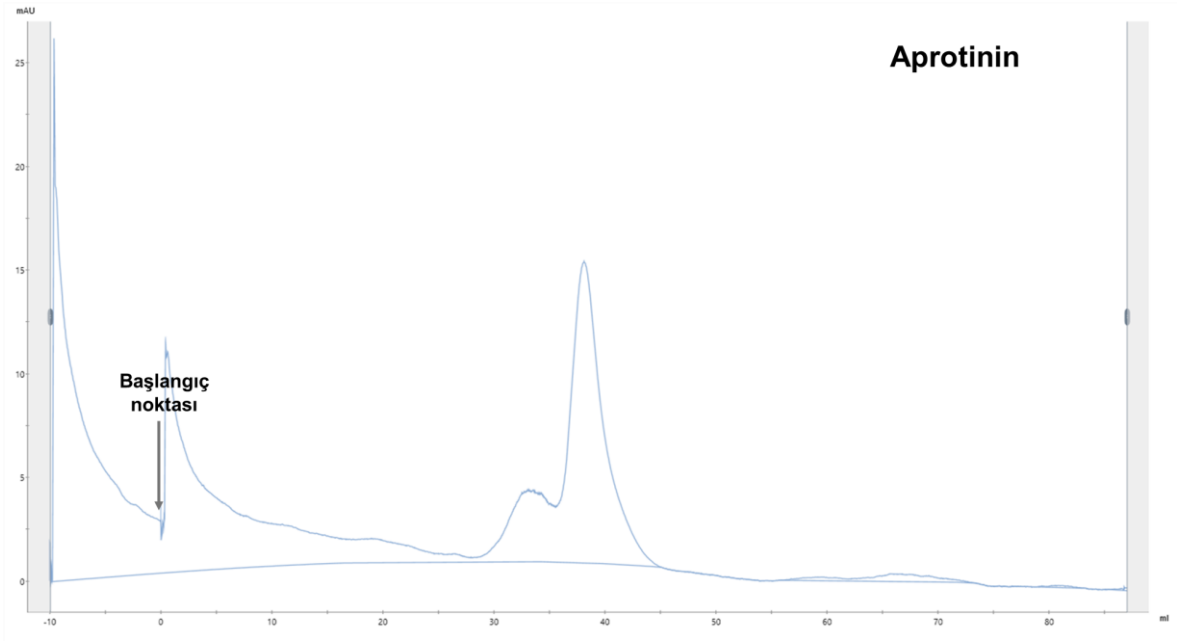
SDS-PAGE çalışmaları ile formülasyon stabilitesi değerlendirilemediğinden, protein stabilitesini değerlendirebilmek amacıyla formülasyonun ve yardımcı maddelerin SEC-HPLC ile analizleri gerçekleştirilmiştir. Analizler Bölüm 3.2.2'de açıklandığı gibi gerçekleştirilmiştir. Kromatogramlar Şekil 4.35 - Şekil 4.41'de sunulmuştur. Yardımcı maddelere ait örnekler analiz edilirken formülasyondaki oranları dikkate alınmamıştır. Elde edilen kromatogramlar Şekil 4.42'de karşılaştırılmıştır.



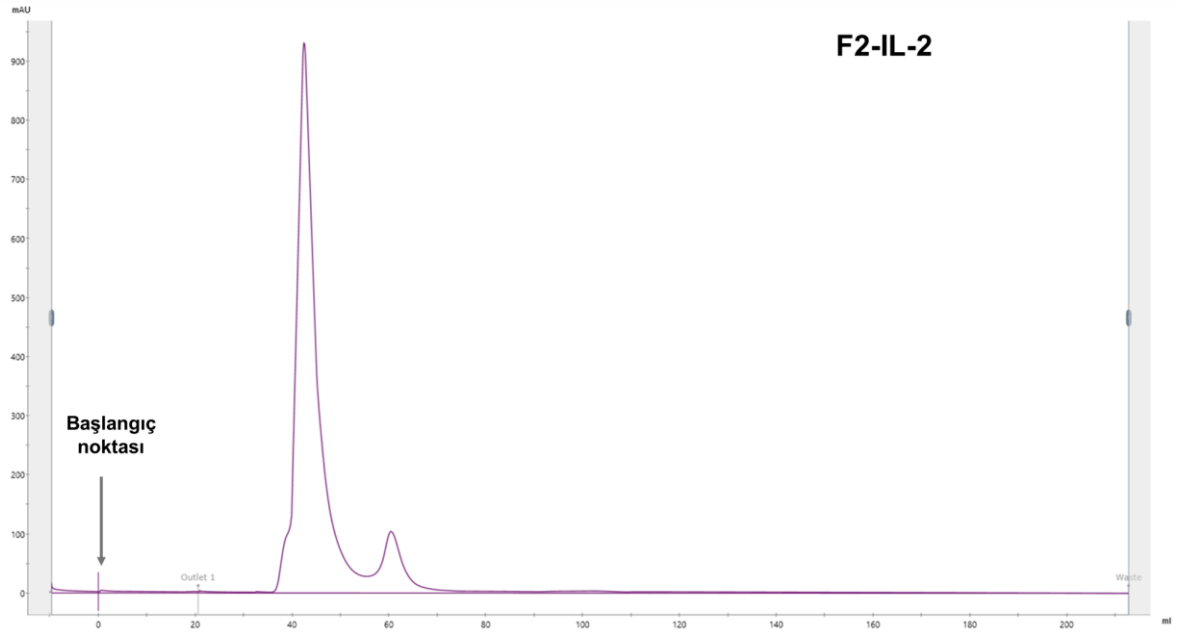
Şekil 4.35. S200 kolon ile gerçekleştirilen SEC-HPLC; Labrafac kromatogramı



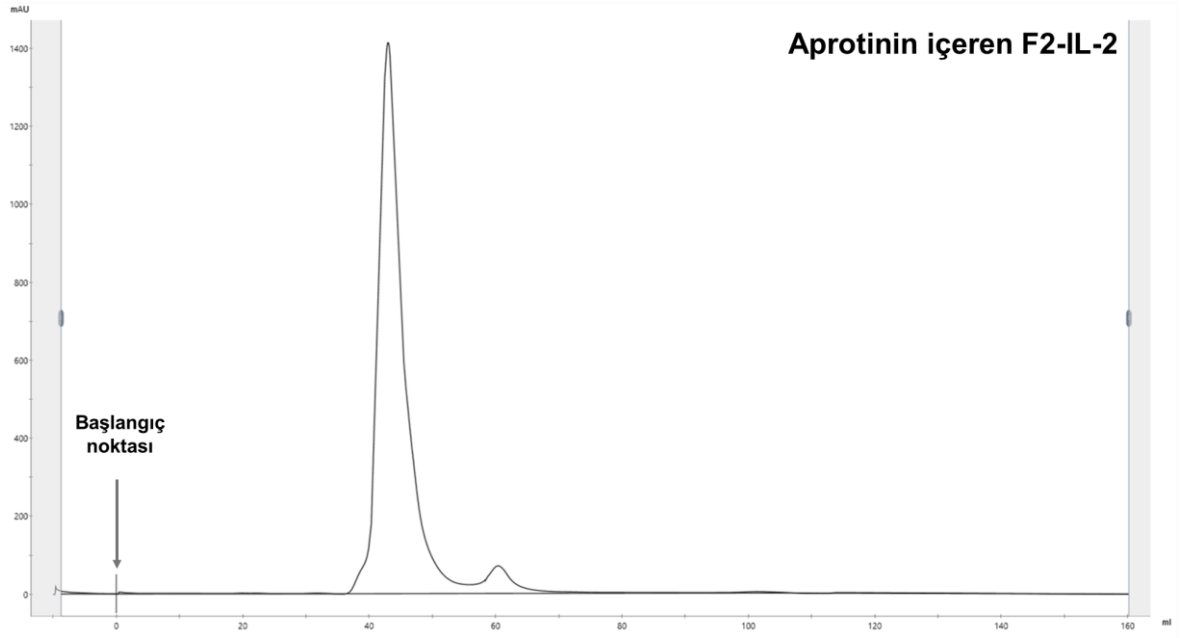
Şekil 4.36. S200 kolon ile gerçekleştirilen SEC-HPLC; Kolliphor® EL kromatogramı



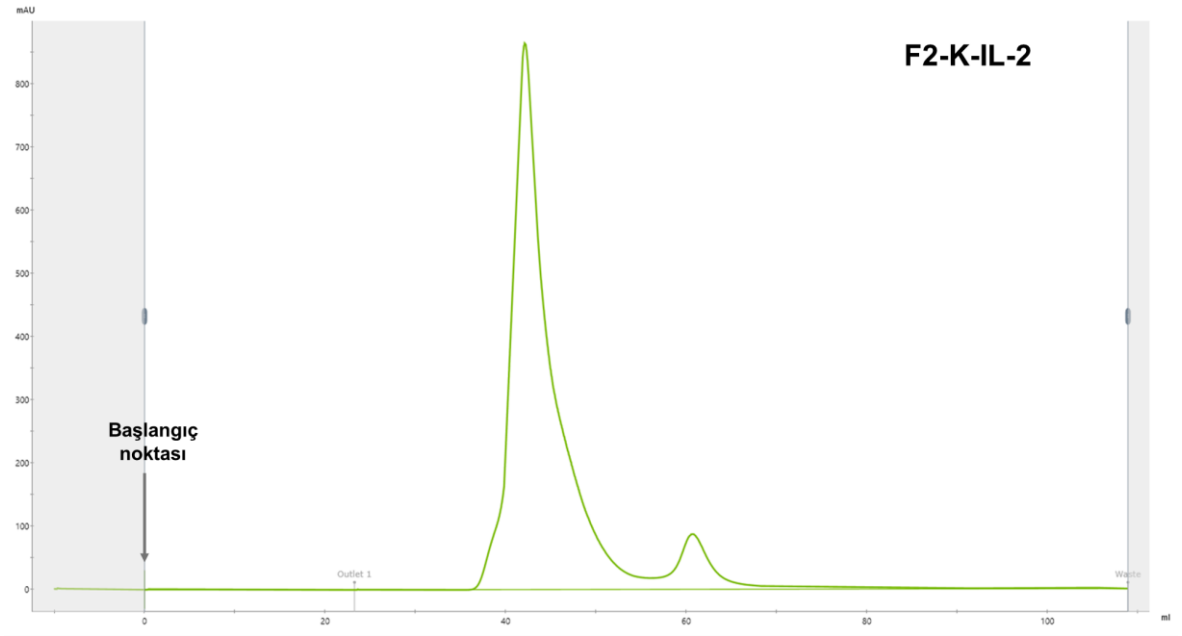
Şekil 4.37. S200 kolon ile gerçekleştirilen SEC-HPLC; Aprotinin kromatogramı



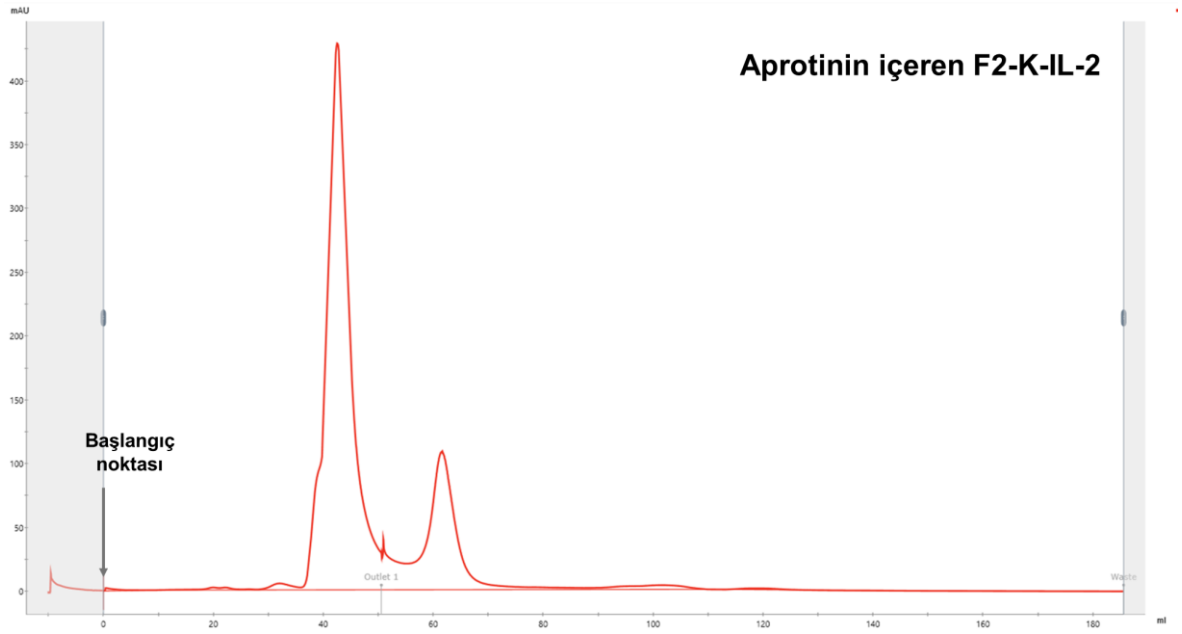
Şekil 4.38. S200 kolon ile gerçekleştirilen SEC-HPLC; F2-IL-2 kromatogramı



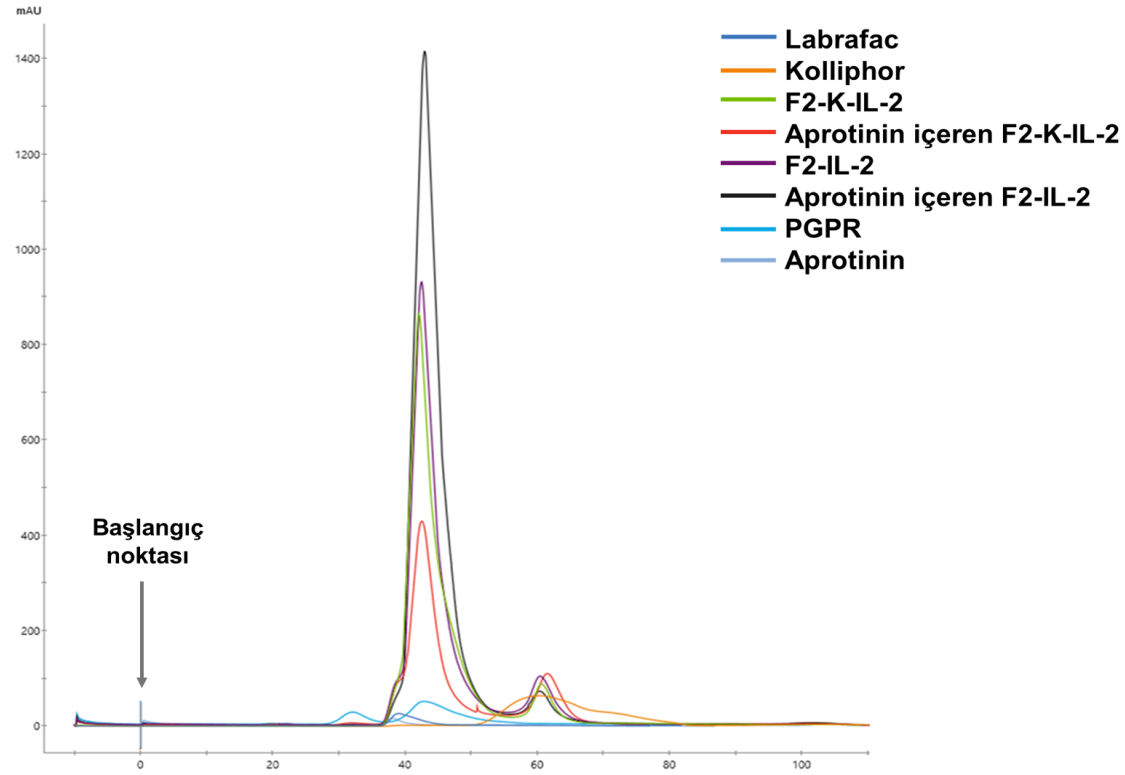
Şekil 4.39. S200 kolon ile gerçekleştirilen SEC-HPLC; Aprotinin içeren F2-IL-2 kromatogramı



Şekil 4.40. S200 kolon ile gerçekleştirilen SEC-HPLC; F2-K-IL-2 kromatogramı



Şekil 4.41. S200 kolon ile gerçekleştirilen SEC-HPLC; Aprotinin içeren F2-K-IL-2 kromatogramı



Şekil 4.42. S200 kolon ile gerçekleştirilen SEC-HPLC analiz edilen kromatogramların karşılaştırılması

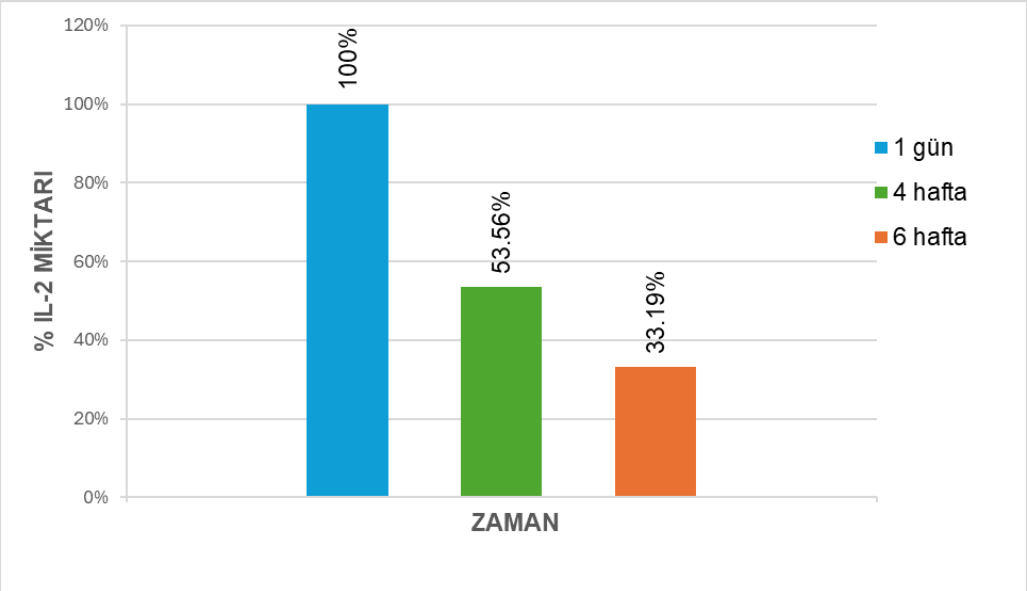
5°C ± 3°C saklanan IL-2 yüklü ve aprotinin içeren IL-2 yüklü çoklu nanoemülsiyonların fiziksel stabilite özelliklerinde zamanla meydana gelen değişimler incelenerek Çizelge 4.22'de sunulmuştur.

Çizelge 4.22. IL-2 yüklü ve aprotinin içeren IL-2 yüklü çoklu F2 formülasyonlarının karşılaştırılması

F2-IL-2	**Başlangıç**	**3. ay**	
Damlacık boyutu (nm)	98,41 ± 1,08	94,38 ± 3,73	p>0,05
PDİ	0,202 ± 0,007	0,180 ± 0,010	p>0,05
Zeta potansiyeli (mV)	-10,8 ± 0,7	-8,75 ± 1,26	p>0,05
Yüzey gerilimi (mN/m)	29,26 ± 0,21	27,52 ±1,59	p>0,05
Viskozite (cP)	644 ± 7	547 ± 9	**p<0,05 (p<0,0001)**
Aprotinin içeren F2-IL-2	**Başlangıç**	**3. ay**	
Damlacık boyutu (nm)	80,05 ± 0,17	84,14 ± 0,58	p>0,05
PDİ	0,170 ± 0,010	0,177 ± 0,009	p>0,05
Zeta potansiyeli (mV)	-9,17 ± 0,14	- 16,2 ± 1,7	p>0,05
Yüzey gerilimi (mN/m)	27,74 ± 1,60	25,51 ± 1,45	p>0,05
Viskozite (cP)	646 ± 18	553 ± 9	**p<0,05 (p<0,0001)**

(Ort ± SS, n=3)

IL-2 yüklü formülasyonun protein stabilitesi ise 4. ve 6. haftalarda %5'lik Triton X-100 ile seyreltilerek değerlendirilmiş ve Şekil 4.43'te sunulmuştur.



Şekil 4.43. IL-2 yüklü F2 formülasyonunun %IL-2 miktarının zamana karşı incelenmesi

4.6. İn Vitro Salım Çalışmaları

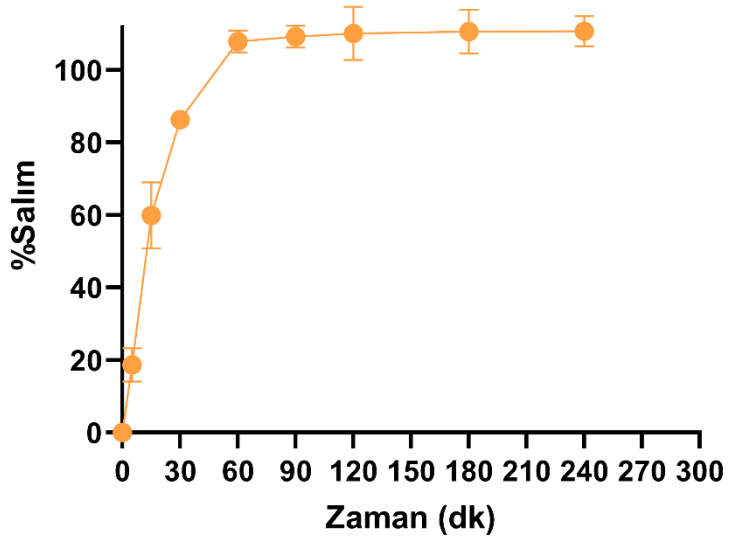
İn vitro salım çalışmaları Bölüm 3.2.6'da anlatıldığı gerçekleştirilmiştir (Resim 4.12). Diyaliz kaset ile gerçekleştirilen in vitro salım sonuçları Çizelge 4.23'te verilmiştir.

Çizelge 4.23. IL-2 yüklü F2 formülasyonlarının pH 1,2 ve pH 6,8'deki zamana bağlı salım tablosu

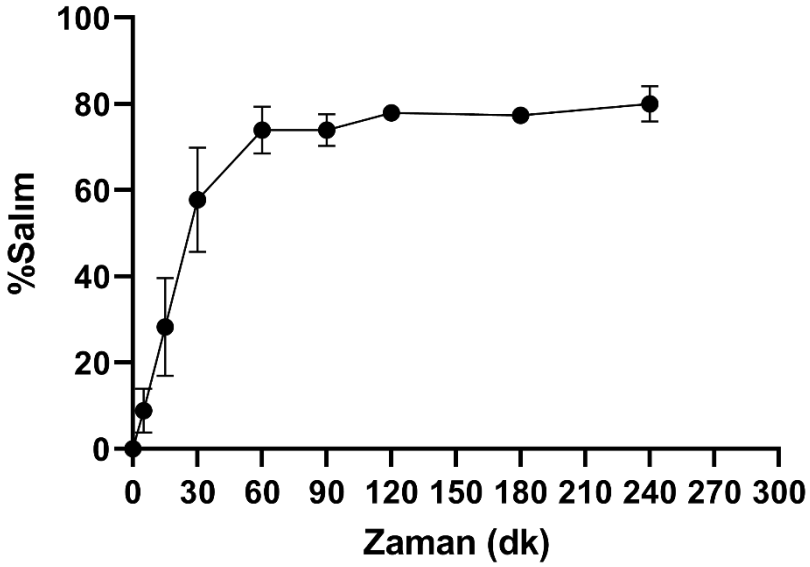
t (dk)	F1 - pH 1,2 (ng)	F1 - pH 6,8 (ng)	F2 - pH 1,2 (ng)	F2 - pH 6,8 (ng)
0	0	0	0	0
5	3,559857	-3,1523	7,444894	1,247024
15	3,746425	-6,90472	9,572415	6,556073
30	2,781228	-6,22791	9,566075	3,920369
45	4,608491	-7,1182	4,605357	5,755558
60	4,84335	-7,10364	3,945102	-1,356
90	2,985601	-6,85961	2,509531	1,565823
120	4,310213	-7,26305	3,537172	0,808968
180	-	-12,1984	-	-1,91171

**Tablodaki negatif değerler, numuneler köre karşı okunduğu için elde edilen düşük optik dansite değerinden kaynaklanmaktadır ve anlamsızdır.*

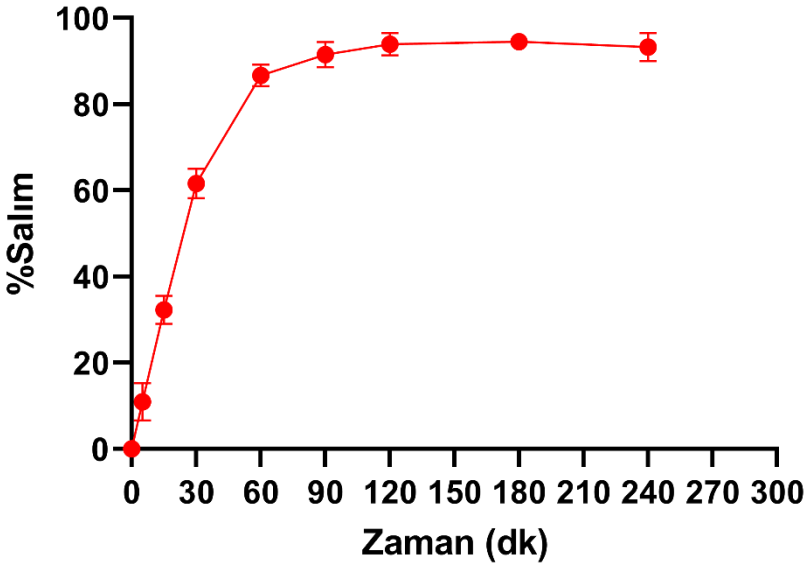
pH 1,2 tamponu, pH 6,8 fosfat tamponu, pH 6,5 FaSSIF ve FeSSIF tamponlarında formülasyonların kapsüllere doldurularak gerçekleştirildiği in vitro salım çalışmalarının sonuçları Şekil 4.44 - Şekil 4.47'de sunulmuştur.



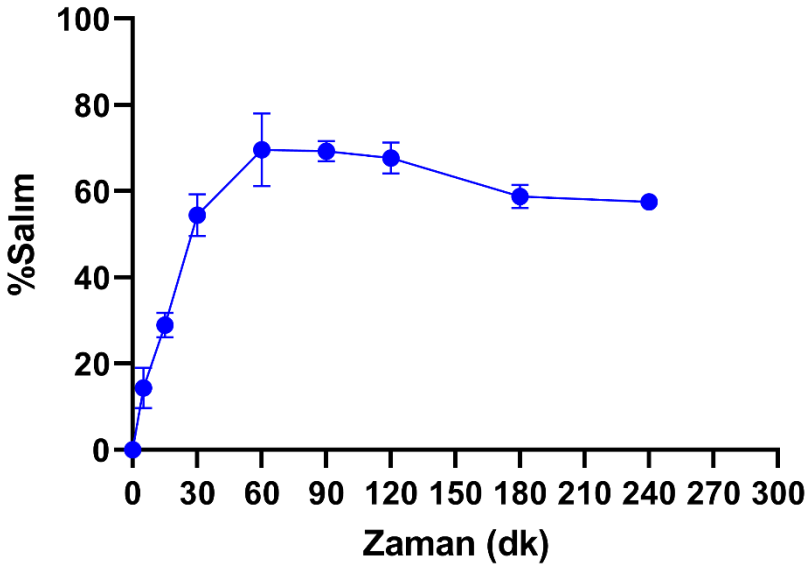
Şekil 4.44. pH 1,2 'deki in vitro salıma ait %IL-2-zaman grafiği



Şekil 4.45. pH 6,8'deki in vitro salıma ait %IL-2-zaman grafiği



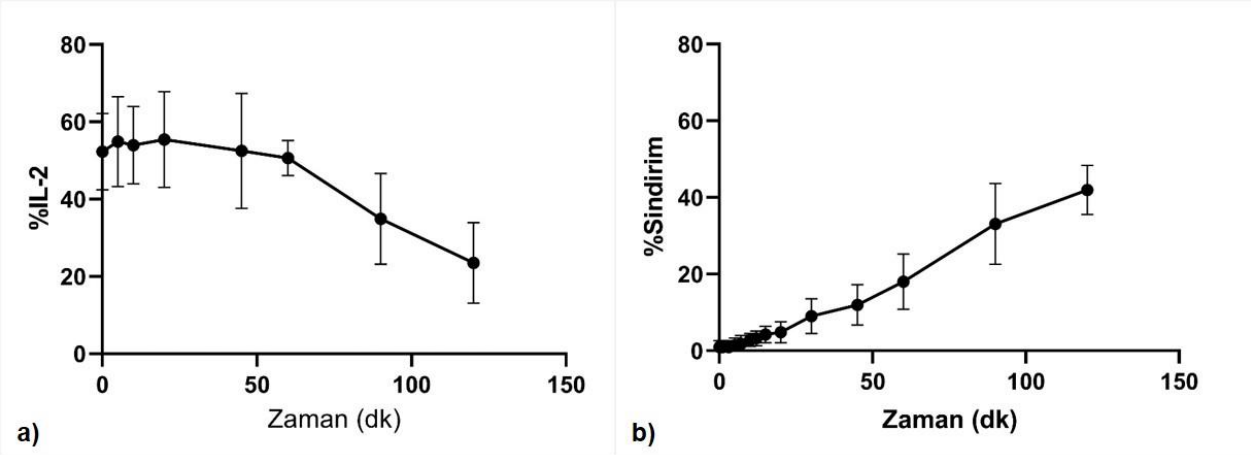
Şekil 4.46. pH 6,5 FaSSIF ortamındaki in vitro salıma ait %IL-2-zaman grafiği



Şekil 4.47. pH 6,5 FeSSIF ortamındaki in vitro salıma ait %IL-2-zaman grafiği

4.7. İn Vitro Sindirim Çalışması

İn vitro sindirim çalışmaları Bölüm 3.2.7'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Çalışma boyunca salınan IL-2 miktarı ve sindirim oranı (%) zamana karşı grafiklenmiştir. Bu grafikler Şekil 4.48'de sunulmuştur. Sindirim çalışması sonucunda formülasyon %45 oranında sindirime uğramıştır. 120 dakika sürdürülen çalışma sonucunda IL-2 %23,5'i stabilitesini korumuştur.



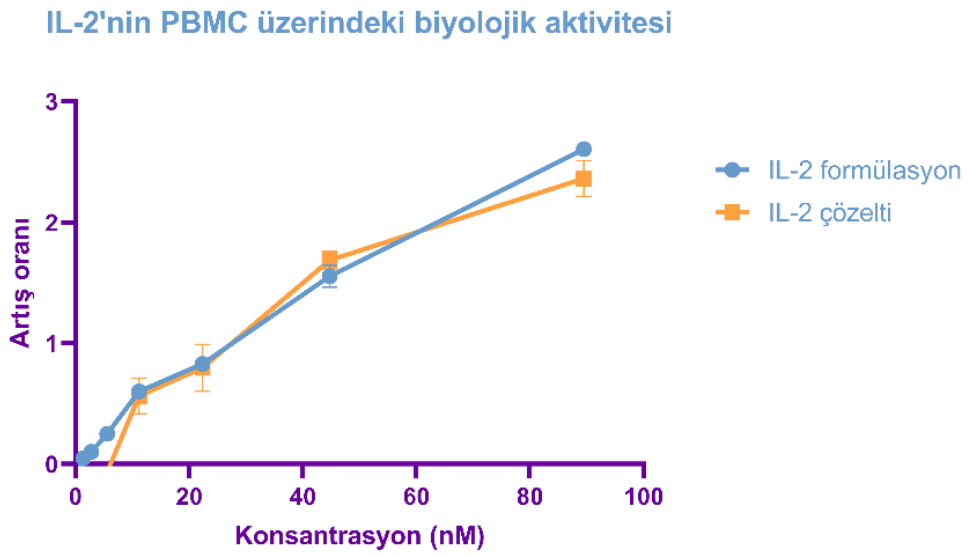
Şekil 4.48. Sindirim çalışması **a.** % IL-2 - zaman grafiği, **b.** % Sindirim - zaman grafiği

4.8. Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültürü çalışmaları Bölüm 3.2.8'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir.

Nanoemülsiyon formülasyonlarındaki IL-2'nin biyolojik aktivitesinin belirlenmesi

Aprotinin içeren IL-2 yüklü F2 nanoemülsiyonun hazırlanması sırasında IL-2'nin biyolojik aktivitesinin değerlendirilebilmesi için PBMC hücrelerinde proliferasyon çalışması yapılırken, formülasyonun IL-2 konsantrasyonuna uygun olarak seyreltmeleri yapılarak uygulanmış ve 48 saat inkübe edilmiştir. Hem IL-2 yüklü formülasyon hem de IL-2 çözeltisi 89,5 nM'dan hareketle seri dilüsyonla uygulanmıştır. 48 saat inkübasyonun sonunda WST-1 testi uygulanarak IL-2'nin biyolojik aktivitesi hücre artış oranıyla değerlendirilmiş ve Şekil 4.49'da sunulmuştur.

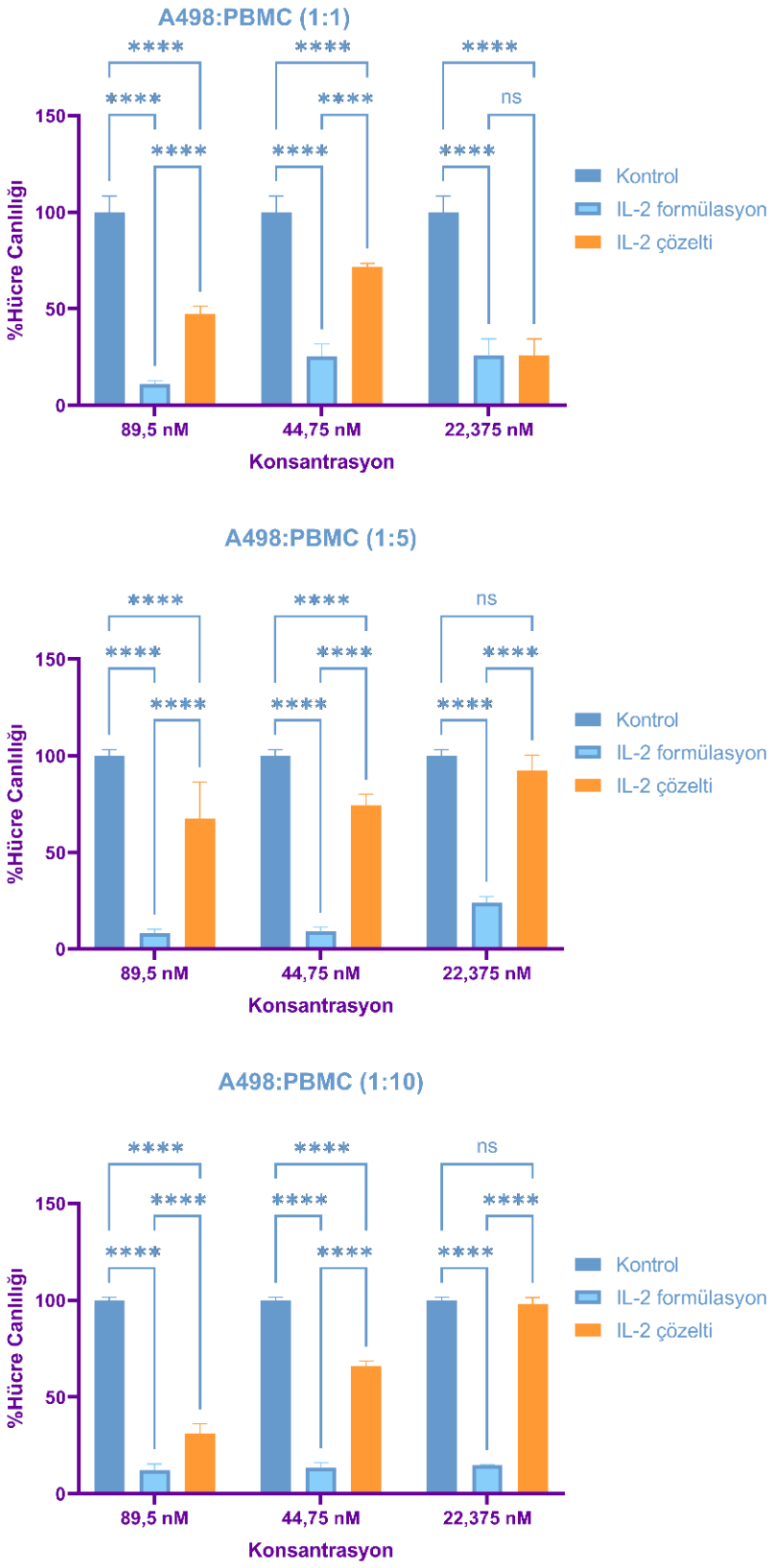


Şekil 4.49. PBMC hücrelerine ait hücre proliferasyonu grafiği

89,5 nM konsantrasyonda uygulanan IL-2 yüklü formülasyon ve IL-2 çözeltisi için 48 saatin sonunda hücre artış oranı sırasıyla 2,60 ± 0,05 ve 2,36 ± 0,15 bulunmuştur. 44,75 nM konsantrasyonda uygulanan IL-2 yüklü formülasyon ve IL-2 çözeltisi için 48 saatin sonunda hücre artış oranı sırasıyla 1,55 ± 0,09 ve 1,69 ± 0,07 olarak bulunmuştur. 22,375 nM konsantrasyonda uygulanan IL-2 yüklü formülasyon ve IL-2 çözeltisi için ise 48 saatin sonunda hücre artış oranı sırasıyla 0,83 ± 0,04 ve 0,80 ± 0,19 olarak bulunmuştur. Çözelti ve formülasyon arasında PBMC hücrelerinin artış oranı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Konvansiyonel hücre kültürü çalışmalarında antikanser etkinliğin belirlenmesi

Antikanser etkinliklerin değerlendirilmesi amacıyla PBMC ve A498 hücrelerinin ko-kültürü yapılmıştır. Biyolojik aktivitenin belirlenmesi çalışmasında seçilen konsantrasyonlar 89,5 nM, 44,75 nM ve 22,375 nM olarak belirlenmiş ve PBMC hücreleri uyarılmıştır. PBMC hücreleri A498 hücreleri üzerine 3 farklı oranda eklenip inkübe edildikten 24 saat sonra WST-1 testi ile edilmiştir. İlgili sonuçlar Şekil 4.50'de verilmiştir.

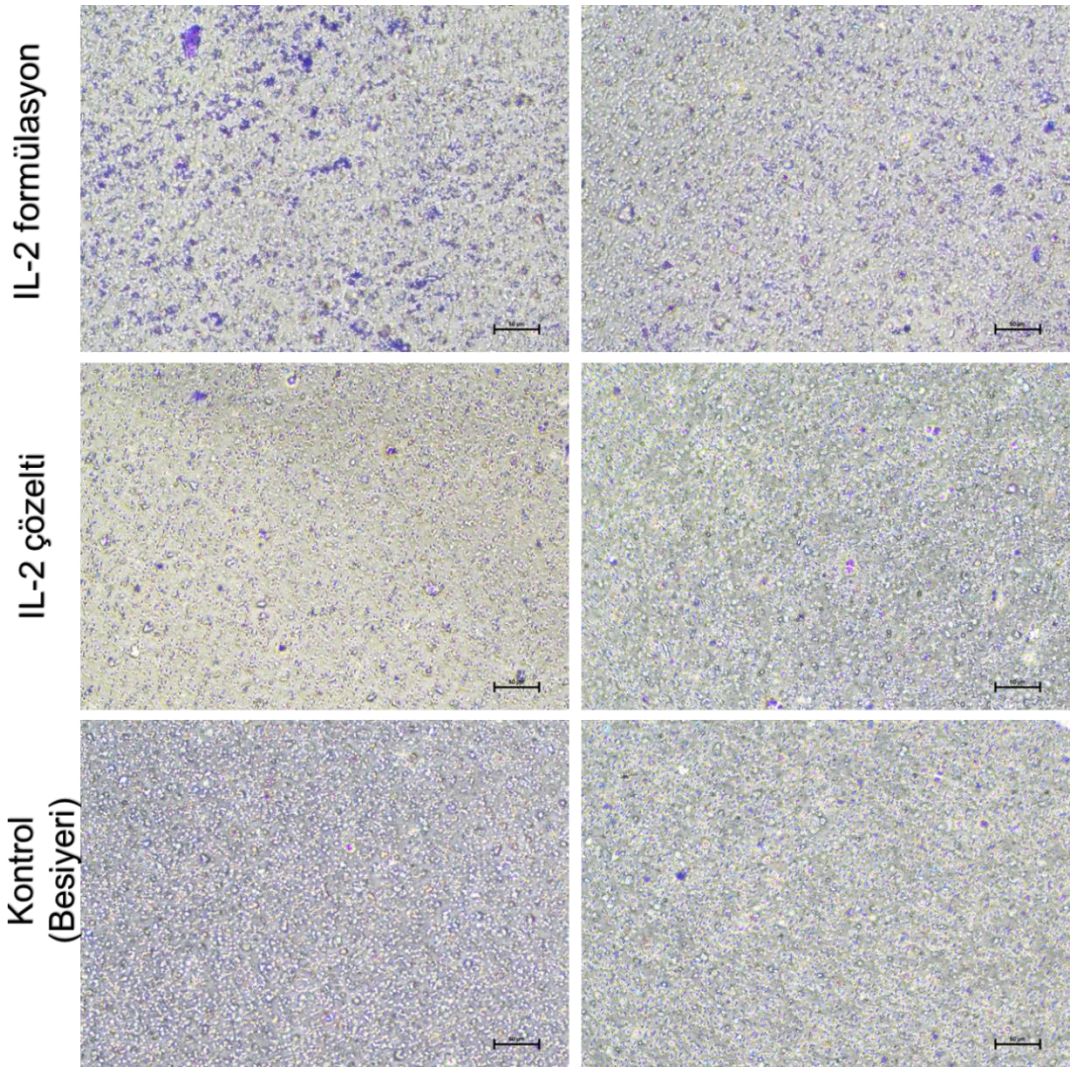


Şekil 4.50. A498 ve PBMC hücrelerinin ko-kültürü ile yapılan konvansiyonel hücre kültürü çalışmalarında ait hücre canlılığı grafikleri. A498: PBMC oranları sırasıyla, **a.** 1:1, **b.** 1:5, **c.** 1:10. *: p<0,05; **: p<0,005; ***: p<0,0005; ****: p<0,0001

IL-2 yüklü formülasyonun IL-2 çözeltisine ve kontrol grubuna kıyasla A498 hücreleri üzerinde % hücre canlılığını azalttığı görülmektedir. 89,5 nM konsantrasyonda 1:1 oranda uygulanan IL-2 yüklü formülasyon ve IL-2 çözeltisi için 24 saatin sonunda % hücre canlılığını sırasıyla %11 ± 1,83 ve 47,33 ± 4,07 olarak bulunmuştur.

Migrasyon çalışması

IL-2 yüklü formülasyonun ve IL-2 çözeltisinin immün hücrelerin kanser hücrelerine göçü üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla transwell migrasyon çalışmaları yapılmıştır. Kristal viyole boyama ile göç eden hücreler net bir şekilde görüntülenebilmiştir. Görüntüler Şekil 4.51'de sunulmuştur.



Şekil 4.51. A498 ve PBMC hücreleri ile yapılan migrasyon çalışmalarında ait mikroskop görüntüleri (x40) (Kristal viyole ile boyama yapılmıştır).

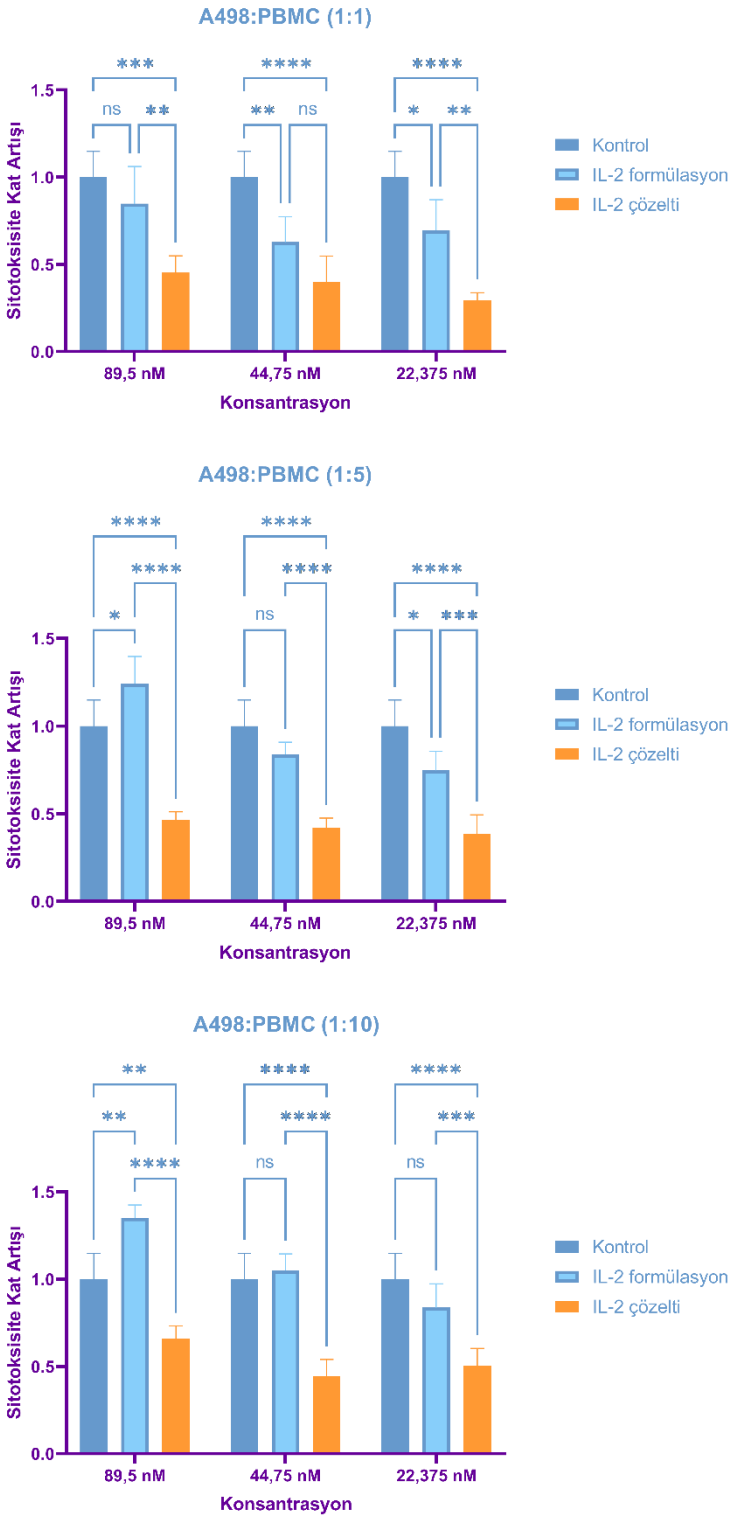
3B hücre kültürü çalışmalarında antikanser etkinliğin belirlenmesi

A498 hücreleri ile 3B sferoitler oluşturulabilmesi için poli-HEMA ile kaplanan hücre plakalarına Matrigel içerisinde ve 200 µL'de 5000 hücre/kuyucuk olacak şekilde hücre ekimi yapılmıştır. Ardından plakalar santrifüjlenmiş ve her iki günde bir, besi yeri değiştirilmiştir. Oluşan tümör modeline ait mikroskop görüntüsü Şekil 4.52'de sunulmaktadır.



Şekil 4.52. A498 insan renal karsinoma hücreleri ile oluşturulan 3B küresel tümörün (sferoit) mikroskobik görüntüsü.

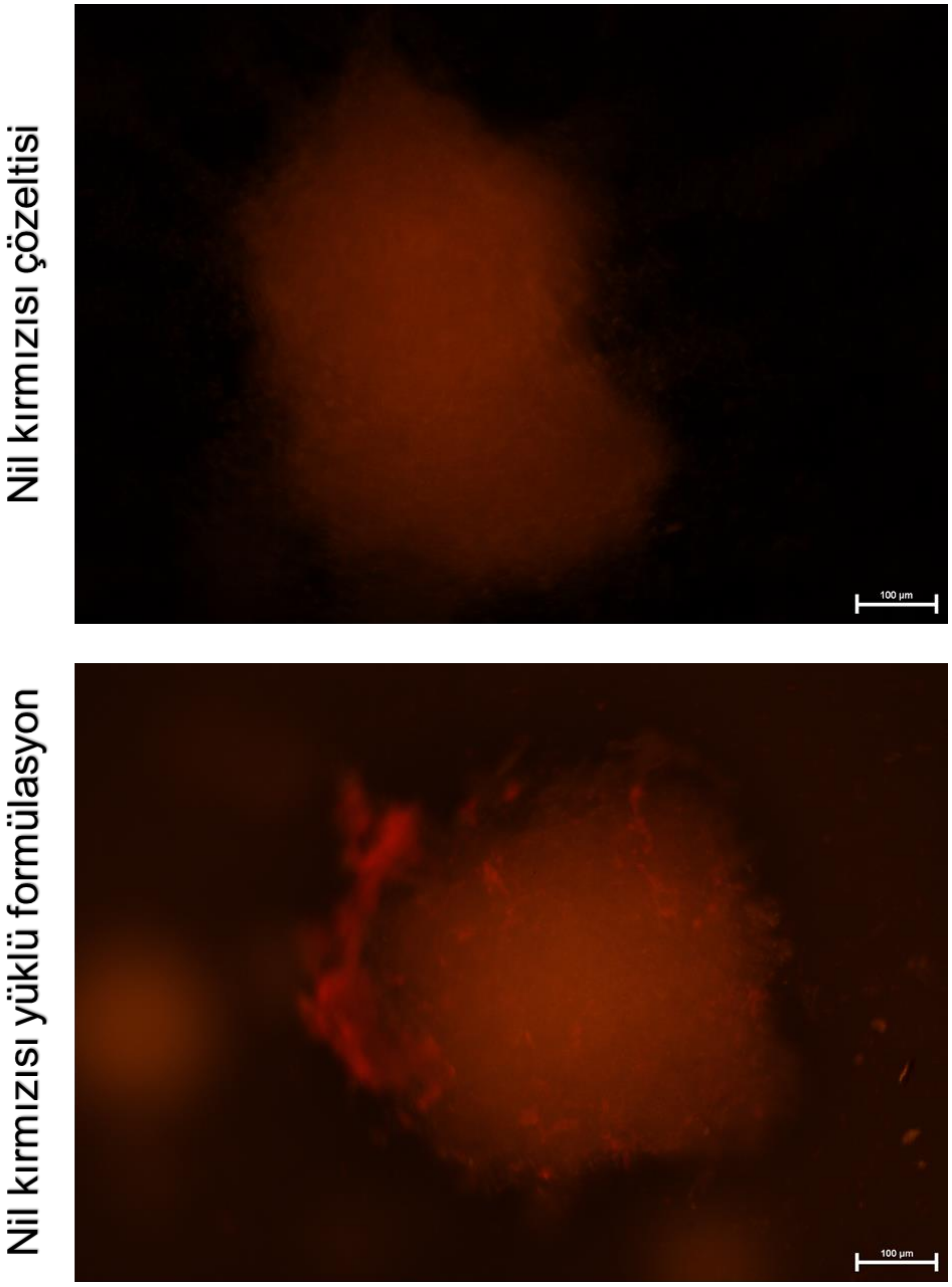
Seçilen konsantrasyonlar 89,5 nM, 44,75 nM ve 22,375 nM olarak belirlenmiş ve PBMC hücreleri uyarılmıştır. PBMC hücreleri A498 sferoitleri üzerine 3 farklı oranda eklenerek inkübe edilmiştir. LDH aktivitesi tayin edilmiştir ve sitotoksisitesi bulunarak Şekil 4.53'te sunulmuştur.



Şekil 4.53. A498 ve PBMC hücrelerinin ko-kültürü ile yapılan 3 boyutlu hücre kültürü çalışmalarında ait sitotoksisite grafikleri. A498: PBMC oranları sırasıyla, **a.** 1:1, **b.** 1:5, **c.** 1:10. *: p<0,05; **: p<0,005; ***: p<0,0005; ****: p<0,0001

3B hücre kültürü çalışmalarında tümöral penetrasyon özelliklerinin belirlenmesi

Seçilen IL-2 oranlarıyla aynı oranlarda hazırlanan nil kırmızısı yüklü formülasyon ve nil kırmızısı çözeltisi sferoitlerin üzerine eklenerek aralıklarla görüntü alınmıştır. Bu sayede formülasyonların tümöral penetrasyon yeteneklerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır (Şekil 4.54).



Şekil 4.54. A498 sferoitleri ile yapılan tümöral penetrasyon hücre kültürü çalışmalarında ait mikroskop görüntüleri (x4).

5. TARTIŞMA

Biyoteknolojik ve protein/peptit yapılı ilaçların oral yoldan uygulanabilmesi oldukça zor olan ancak hedeflenen önemli bir stratejidir. Bu tarz moleküllerden biri olan IL-2 ilk keşfedilen sitokinlerden biridir ve kazanılmış bağışıklık sisteminde önemli rol oynamaktadır. IL-2 ve etkileştiği reseptör IL-2R bağışık yanıtın oluşmasını sağlamaktadır. T-hücrelerinin proliferasyonunda ve farklılaşmasında önemli rolü vardır (Gillis ve diğerleri, 1978; Taniguchi ve diğerleri, 1983). Antineoplastik biyolojik yanıt düzenleyici olarak dünya pazarında olan ancak Türk ilaç pazarında bulunmayan Proleukin®'in etkin maddesi aldeslökin, insan IL-2 geni içeren bir Escherichia coli suşu kullanılarak rekombinant DNA teknolojisi ile üretilmiş rekombinant insan IL-2 (rhIL-2) molekülüdür ve vücuttaki endojen molekülle aynı etkiyi göstermektedir. IL-2, B ve T hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını destekler ve IL-2 aktivitesi üzerinde hem inhibe edici hem de sinerjik etkileri olan bir sitokin uyarımı başlatır. Etki, genellikle aktive edilmiş T hücrelerinde artan miktarlarda eksprese edilen IL-2 reseptörü aracılığıyla gerçekleşmektedir (Whittington ve Faulds, 1993). Liyofilize toz şeklindeki IL-2, intravenöz infüzyon ve subkütan enjeksiyon yoluyla tedavide kullanılmaktadır ve bu ilaç vücudun bağışıklık sistemini güçlendirerek metastatik melanoma ve metastatik böbrek kanserlerine karşı savaşmasını sağlamaktadır (Proleukin® Kullanım Talimatı, Novartis). Ayrıca, IL-2'nin akciğer metastazı, immün yetmezlik ve HIV'de de kullanılabileceğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır.

IL-2, rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen protein yapılı ilaçlardan biri olduğu için en önemli problemlerden biri zayıf oral biyoyararlanımları ve bu nedenle de IL-2 uygulanması için parenteral yolun tercih edilmesidir. Bu grup ilaçların fizyolojik sıvıda kısa yarı ömre sahip olmaları nedeniyle enjeksiyonları sık sık tekrarlanmaktadır. Dolayısıyla da hasta uyuncu oldukça zayıftır. Günümüzde, bu tarz ilaçların uygulanması için non-invazif yolların özellikle de oral yolun etkili tedaviyi sağlayacak şekilde uygulanması bu anlamda büyük bir avantaj olarak görülmektedir. Ancak, terapötik peptit/proteinler, biyolojik yapıları nedeniyle gastrointestinal kanaldaki proteazlar tarafından hızla metabolize olmaktadır. Bu sorunun önüne geçmek için, oral enkapsüle formülasyonlar ve enzim inhibitörleri ve absorpsiyon artırıcı maddelerin ilavesi gibi çeşitli formülasyon yaklaşımları

uygulanmaktadır. Son yıllarda peptit/proteinlerin uygulanması için lipit temelli taşıyıcı sistemlerden olan nanoemülsiyonların kullanımının da alternatif bir formülasyon yaklaşımı olabileceği düşünülmektedir. Bu kapsamda, IL-2'nin oral uygulanması için lipit temelli ilaç taşıyıcı sistemin geliştirilmesi ve in siliko moleküler dinamik simülasyonlar ile yardımcı madde etkileşimlerinin değerlendirilerek optimum formülasyonun geliştirilmesi sağlanmıştır.

Tezde, IL-2'nin MD simülasyonlardan yararlanılarak geliştirilecek oral nanoemülsiyon formülasyonunun proteazlardan korunarak lenfatik dolaşıma geçerek antikanser etki elde edileceği hipotezi test edilmiş, in vitro ve in siliko yöntemlerle incelenmiş ve çalışma sonuçları aşağıda başlıklar halinde tartışılmıştır.

5.1. İn Siliko Moleküler Dinamik Çalışmaları

IL-2, IL-2Rα, IL-2Rβ ve IL-2Rγc reseptörlerine bağlandığında immün yanıt azalmaktayken, IL-2Rβ, IL-2Rγc reseptörlerine bağlandığında immün yanıt artmaktadır. Bu nedenle de kanser tedavisinde IL-2'nin IL-2Rβ, IL-2Rγc'ye bağlanırken IL-2Rα'ya bağlanacak yüzey amino asitlerinin formülasyon bileşenleri ile etkileşim süresince meşgul edilerek antikanser etkinin arttırılması hedeflenmiştir.

Antikanser etkinliği artırmak amacıyla geliştirilecek IL-2 yüklü formülasyon için özellikle IL-2Rα ile etkileşen, geçimsizlik oluşturmayan formülasyona eklenebilecek yardımcı maddelere karar verilebilmesini kolaylaştırabilmek ve etkin madde ile yardımcı maddeler arasındaki moleküler etkileşimlerin anlaşılmasını sağlanmak amacıyla in siliko çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

IL-2, IL-2R ile etkileşerek etkisini göstermektedir. Tez çalışması kapsamında, IL-2 ve IL-2 reseptörleri ile kompleks oluşturan kristal yapısı (2ERJ) incelenmiş; etkileşimde yer alan yüzey amino asitleri ve bu amino asitler ile IL-2 reseptörleri arasındaki bağ tipleri belirlenmiştir. Bu yapının detaylı etkileşim analizi yapıldığında IL-2'ye ait toplam 20 amino asidin IL-2Rα alt birimiyle, 14 amino asidin IL-2Rβ alt birimiyle ve 16 amino asidin γc alt birimiyle etkileştiği görülmüştür (Şekil 4.1 ve Çizelge 4.1). Bunlardan en önemlileri daha önce bildirildiği gibi, IL-2Rα ile etkileşime

giren IL-2'nin bağlanma bölgesi kalıntıları (Arg 38, Phe 42, Glu 62 ve Leu 72) ilgili yüzey amino asitleri olarak vurgulanmıştır (Hyde ve diğerleri, 2003).

Yardımcı maddeler Çizelge 3.3'te belirtildiği gibi bir tür karışımdır ve bu yardımcı maddeler karışım bileşimlerine ve yüzdelerine göre çizilerek simülasyon sistemleri oluşturulmuştur. Gerçekleştirilen All-atom simülasyonlarına ait Şekil 4.2'deki etkileşim görselleri incelendiğinde gerçekleştirilen 100 ns'lik simülasyonlar boyunca IL-2 ile monomerlerin yapıya yapışmadığı ve geri dönüşümlü etkileşimler oluşturduğu gözlemlenmiştir. Transcutol® HP ile yapılan simülasyonlarda ise diğerlerinde farklı olarak monomerler ile IL-2 molekülünün arasındaki düşük etkileşime bağlı olarak bu moleküller arasında mesafenin korunduğu gözlemlenmiştir. Dört tekrarlı olarak gerçekleştirilen simülasyonların sonucunda Çizelge 4.1'de sunulan IL-2 ve reseptör etkileşim bölgelerine göre etkileşim bölgeleri IL-2R alt birimleriyle eşleştirilerek gözlemlenen etkileşimler her yardımcı madde için ayrı ayrı özetlenmiştir ve Çizelge 4.2 - 4.9'da sunulmuştur. Bu görsel ve tablolar incelendiğinde monomerlerin ve IL-2 moleküllerinin 100 ns içerisinde farklı aminoasitlerle hidrofilik ve hidrofobik olmak üzere farklı etkileşimler yaptığı görülmektedir.

Genel olarak, IL-2 ve monomerler arasında geri dönüşümlü etkileşimler gözlemlenmiştir. Oleik asitler, farklı amino asitlerle hidrofilik ve hidrofobik temaslar kurmaktadır. Oleik, palmitik ve linoleik asitlerden oluşan Maisine®, IL-2Rα'ya bağlanma bölgelerinden Arg 38, Phe 42 ve Leu 72 ile etkileşime girmektedir. Tekrarlanan simülasyonlarda IL-2Rα bağlanma bölgelerine önemli uzun süreli temaslar kurulduğu görülmüştür. Farklı oranlarda oleik, palmitik ve linoleik asit içeren Peceol™ ve Maisine® yardımcı maddeler IL-2Rα bağlanma bölgeleriyle yüksek etkileşimler göstermiştir. Özellikle, Peceol™'ün linoleik asit ve oleik asit molekülleri Arg 38 ile hidrofilik temas ve Phe 42 ile hidrofobik temas kurduğu görülmektedir. Kaprilik asit molekülleri içeren Capryol® 90 ile oluşturulan simülasyonlarda Arg 38 ile tutarlı hidrofilik temaslar kurulurken, Phe 42 ile kurulan hidrofobik temaslar 15 ns'den daha kısa bir süre ile sınırlı kalmıştır. Tekrarlanan simülasyonlarda, Leu 72 ile 15 ila 60 ns süren hidrofilik ve hidrofobik temaslar kurmuştur. Laurik asit moleküllerinden oluşan Lauroglikol™ 90, Arg 38 ile geri dönüşümsüz hidrofilik temaslar kurmuştur. Simülasyon sistemindeki özellikle iki

laurik asit molekülü, bu geri dönüşümsüz temaslara aracılık etmiştir. Labrasol®, Arg 38 ile kurulan hidrofilik temaslar oluşturmuştur ve simülasyon boyunca bu temaslar devam etmiştir. Bu sonuç, dört tekrarlı olarak yürütülen çalışmada tekrarlanabilir bulunmuştur. Dietilen glikol monoetil eter moleküllerinden oluşan Transcutol® HP, antitümör etki için önemli olan yüzey amino asitleriyle sınırlı etkileşim (%10'dan az) göstermiştir. Çeşitli amino asitlerle hidrofilik ve hidrofobik temaslar sınırlı olsa da herhangi bir uyumsuzluk beklenmemektedir.

Labrafac™ Lipophile WL 1349, kaprik ve kaprilik asit moleküllerinden oluşmakta ve antikanser etki için önemli bir yere sahip olan Arg 38 için yüksek etkileşim değerleri (sırasıyla %95 ve %70) ve ayrıca geri dönüşümlü etkileşimler (proteini zehirlemeden %100'ün altında) göstermiştir. Arg 38 ile etkileşim uzun zaman aldığından, IL-2Rα'ya bağlanması önlenebilir ve böylece mevcut çözelti formuna kıyasla üstün bir antikanser etkisi elde edilebilir.

RMSD ve RMSF, moleküler dinamik simülasyonlarında proteinlerin yapısal değişimlerini ve esnekliklerini analiz etmek için yaygın olarak kullanılan iki metriktir. RMSD, bir proteinin referans yapıya göre zaman içindeki ortalama atomik sapmasını ölçerken, RMSF, her bir amino asidin zaman içindeki ortalama konumsal dalgalanmasını değerlendirmektedir (Narwani ve diğerleri, 2019). RMSF analizleri, yardımcı madde bileşenleri ve IL-2 arasında yüksek etkileşim değerleri göstermeyen (Labrasol® ve Transcutol®) sistemlerin simülasyonlar sırasında IL-2 yapısında daha az dalgalanma olduğunu göstermiştir. IL-2 etkileşiminin simülasyonlar sırasında daha fazla dalgalanmaya neden olduğu diğer sistemler (Şekil 4.3), RMSD grafiklerinde (Şekil 4.4) görülebileceği gibi genel yapıyı etkilememiştir. RMSD değerleri 3'ün altında olduğundan yapıların önemli bir konformasyonel değişime uğramadığı anlaşılmaktadır. Bu çıkarım görsel analizle de desteklenmektedir. Maisine'in iki kopyası, Peceol'ün iki kopyası, oleik asidin bir kopyası ve Labrafac™'ın bir kopyasının simülasyonlarında RMSD değeri 2'yi bir miktar aşmış olsa da genel olarak değerlendirildiğinde IL-2 yapılarının bu küçük değişiklikler nedeniyle önemli konformasyonel değişikliklere veya denatürasyona uğraması beklenmemektedir. Yukarıda verilen in siliko bulgulara dayanarak formülasyon çalışmalarının Labrafac™ Lipophile WL 1349 ile yürütülmesine karar verilmiştir.

IL-2 ile proteaz enzim inhibitörleri arasındaki ilişki de gerçekleştirilen simülasyon sonuçlarına göre değerlendirilmiştir. Bu bağlamda primer emülsiyonda yer alan formülasyon bileşenleri için IL-2'nin IL-2Rα ile etkileşen bölgesine olan ilginin yüksek ancak geri dönüşümlü olması istenirken enzim inhibitörlerine karşı ise aksine IL-2 ile enzim inhibitörü arasında moleküler etkileşim oranlarının düşük (ilgisiz) olması beklenmektedir. Şekil 4.5'te basitrasin yapısının IL-2 ile bir arada yer aldığı MD simülasyon sisteminde basitrasin molekülleri IL-2 moleküllerine yaklaşarak uzun süreli etkileşimler kurduğu gözlenirken aprotinin ile gerçekleştirilen simülasyonlarda moleküllerin ilgisiz kalmanın yanı sıra IL-2'ye uzaklaştığı gözlenmiştir (Şekil 4.5.b). Kimostatin ve pepstatin yapısının ise simülasyon süresince ilgisinin arttığı ve IL-2'ye yapışarak istendiği gibi ilgisiz kalamadığı gözlenmiştir. Bunun yanı sıra Şekil 4.6'daki aprotinin için yapılan RMSF analizlerinde yardımcı maddelerde olduğu gibi IL-2 etkileşiminin simülasyonlar sırasında daha fazla dalgalanmaya neden olduğu görülmektedir. Bu yan zincirlerin daha fazla hareket etmesi anlamına gelmektedir ve RMSD grafiklerinde de (Şekil 4.7) görülebileceği gibi genel yapıyı etkilememiştir.

Elde edilen veriler ışığında proteaz inhibitörleri varlığında IL-2 yapısında kimyasal olmayan bozulma ve geçimsizlik beklenmemekle birlikte simülasyon analiz sonuçları baz alındığında daha büyük yapıya sahip olmasına karşın aprotinin için etkileşim yüzdelerinin daha düşük olması ve görsel analizde daha ilgisiz olması nedeniyle formülasyon çalışmalarında proteaz inhibitörü olarak aprotinin ile devam edilmesine karar verilmiştir.

5.2. İnterlökin-2 Fizikokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

IL-2 yüklü nanoemülsiyon formülasyonları geliştirilmeden önce önformülasyon çalışmaları kapsamında FT-IR analizi, DSC analizi ve sirküler dikroizm analizleri gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışması kapsamında kullanılan liyofilize toz halindeki referans IL-2 (Elabscience®) distile suda kolayca çözünebilmektedir.

Boyut dışlama kromatografisi sonuçları Şekil 4.8'de farklı IL-2 kaynakları için sunulmuştur. Farklı kolon ve yöntem kullanılması dolayısıyla bu kromatogramlar birbiriyle benzer olmasa da oligomer veya parçalanma ürünü olmadan dimer halinde elde edildiği sonucuna ulaşılmıştır. Referans ve B1-IL-2'ye ait kromatogramlarda farklı yapılar gözlenmezken K-SUMO-IL-2'de doğası gereği daha büyük ve daha küçük boyutlarda yapılar gözlenmektedir.

Farklı IL-2 kaynaklarına ait FT-IR spektrumu Şekil 4.9'da sunulmuştur. Mavi spektrum referans IL-2'ye aittir, spektrumu da referans olarak kullanılmaktadır. Siyah spektrum B-1-IL-2'ye aittir ve referans spektrum ile benzerlik göstermektedir. Gözlenen şiddet farklılıklarının protein konsantrasyonundan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Pembe spektrum K-IL-2'ye aittir belirgin farklılıklar mevcut olup 1000-600 cm^{-1} aralığında görülen bu değişimler, safsızlıklar veya farklı protein modifikasyonlarını gösterebilmektedir. Bu durumun K-IL-2'nin üretiminde tercih edilen sekans, kullanılan SUMO-etiketi ve saflaştırma sürecinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir. K-SUMO-IL-2'ye ait yeşil spektrumda önemli farklılıkların olduğu görülmektedir. SUMO etiketi, proteinin üretimi esnasında proteinin stabilitesini artırmak için bağlanmış bir yapıdır ve bu spektrumda ek bantlara yol açmıştır.

Alfa-sarmalları, beta-tabakalar ve rastgele sarmallar gibi ikincil yapıların tanımlanmasını sağlamaktadır. Spektrumda da görülen bu yapılar genellikle 1600-1700 cm^{-1} aralığında yer alan amit I bandında analiz edilmektedir. Bu bant, özellikle peptit omurgasındaki C=O gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. Spektrumlara bakıldığında bu protein yapısının stabilize olduğunu ve genelde alfa-heliks veya beta-tabaka içerebileceğini gösterebilmektedir. Amit I bölgesindeki bu bandın spektrumlar arasında hafif kayma gösterdiği bu durumun da kullanılan çözücülerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Amit I bandı, alfa-sarmallar genellikle 1650-1660 cm^{-1} aralığında absorpsiyon gösterirken, beta-tabakalar 1620-1630 cm^{-1} ve 1670-1680 cm^{-1} aralıklarında absorpsiyon göstermektedir. Amit II bandı ise 1500-1600 cm^{-1} aralığında yer almakta ve N-H bükülme ile C-N gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. Bu bant, ikincil yapıya dair tamamlayıcı bilgiler sağlamaktadır (Yang, Yang, Kong, Dong ve Yu, 2015). Spektrumların benzer olduğu özellikle pembe ve yeşil spektrum için

gözlenen ufak değişikliklerin çözücülerden ya da modifikasyonlardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Proteinin yapısal ve kimyasal modifikasyonları hakkında bilgi sağlayan parmak izi bölgesinde (600-1500 cm^{-1} aralığı) özellikle pembe ve yeşil spektrumlarda belirgin farklar söz konusudur. Bu farklar ve ek bantlar, yapısal değişiklikleri (aminoasit ve çözücü farklılıkları vb.) ve safsızlıkları yansıtır. Siyah ve mavi spektrumlar arasındaki ufak farklar önceden de belirtildiği gibi kullanılan çözücüler ile ilişkilendirilmiştir.

3500-3300 cm^{-1} aralığındaki geniş bant genellikle O-H gerilmesine işaret etmektedir bu yapıdaki su veya alkol grupları varlığına işaret eder. IL-2 için çözücü olarak kullanılan suyu gösterdiği düşünülmektedir.

1750-1650 cm^{-1} aralığındaki C=O gerilme titreşimleri (karbonil grupları) bu bölgede yer alır, genellikle esterler, aldehitler veya ketonlar için karakteristiktir. 1600-1500 cm^{-1} aralığındaki C=C ve C=N gerilmeleri aromatik halkalar veya konjuge çift bağlar için bu bölgede görülmektedir.

DSC analizi, termal davranış hakkında detaylı bilgi sunabilmektedir. Bu sayede proteinlerin denatürasyon sıcaklıklarını, termal stabilitelerini ve herhangi bir faz geçişini değerlendirmek mümkün olabilmektedir. Özellikle proteinlerin termal stabilitesini anlamak, biyolojik işlevselliklerini ve potansiyel terapötik kullanımlarını değerlendirmek için önemlidir. DSC termogramı, IL-2'nin termal davranışını ve stabilitesini değerlendirmek için kullanılır. IL-2'nin DSC termogramındaki sıcaklık artışı sürekli bir enerji alımını (endotermik reaksiyon) göstermektedir. Referans IL-2'ye ait siyah spektrumda denatürasyon sıcaklığının B1-IL-2'ye göre daha düşük olduğu daha düşük bir termal stabiliteye sahip olduğu görülmektedir. B1-IL-2 için 79,11°C ve 84,88°C aralıklarında belirgin bir endotermik pik gözlenir. Bu pikler, IL-2'nin ısınmaya karşı stabilitesini kaybettiği ve yapısal denatürasyon geçirdiği sıcaklık aralığını gösterir. 79,11°C, IL-2'nin yapısal değişikliklerinin başladığı sıcaklık yani ikincil ve üçüncül yapısını kaybetmeye başladığı şeklinde yorumlanabilmektedir. Yaklaşık 84,88°C'de termal geçiş tamamlanmaktadır. 84,88°C ise denatürasyon sürecinin tamamlandığı veya IL-2'nin tamamen yapısal olarak bozulduğu sıcaklık olarak düşünülebilir. Ancak referansla kıyaslandığında

daha iyi bir termal stabiliteye sahiptir ve bu durumun üretim sürecindeki modifikasyonlardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Kırmızı ve yeşil termogramlara bakıldığında termal stabilitenin diğer spektrumlara kıyasla daha iyi olduğu ve bu durumun SUMO etiketinden kaynaklandığı şeklinde yorumlanabilmektedir.

CD spektrumu, proteinlerin sekonder yapıları hakkında önemli bilgiler sağlar. IL-2'nin bu spektrumu, alfa sarmal ve beta-tabaka yapılarının varlığını gösterdiği düşünülmektedir (pozitif pikler, alfa sarmalların varlığını, negatif geçişler ise beta tabakaları veya rastgele kıvrımları işaret etmektedir). HT grafiğinin düzgün düşüşü, sistemin stabil olduğunu ve IL-2'nin analiz edilen dalga boyu aralığında yapısal bütünlüğünü koruduğunu göstermektedir. Spektrumda 200-250 nm dalga boylarındaki pik ve şeklinin referanslarla benzerlikler gösterdiği görülmektedir, bu da IL-2'ye ait bir patern olduğunu göstermektedir. Ayrıca Şekil 4.12'deki CD sonucuna bakıldığında uzak-UV aralığında IL-2 proteininin α-sarmal ağırlıklı ikincil yapısına sahip olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda elde edilen IL-2 proteininin katlanmış olduğu kanıtlanmıştır.

5.3. İnterlökin-2'nin Miktar Tayini Yöntemi ve Validasyonu

IL-2'nin miktar tayini yöntemi olarak insan IL-2 ELISA kiti (Elabscience® Human IL-2 ELISA Kit) kullanılmıştır. Bu ELISA kiti Sandviç-ELISA prensibini kullanmaktadır ve kolorimetrik ölçüm esasına dayanarak ölçüm yapmaktadır. Mevcut diğer protein miktar tayini yöntemlerine nazaran daha seçici ve daha hassas sonuç verdiği için tercih edilmiştir. Kullanılan kite özgü deney prosedürü ve çalışma aralığına uygun olarak çalışmalar yürütülmüştür. 7,81-500 pg/mL çalışma aralığında denklem bulunmuştur, R^2 değerinin 1'e yakınlığı doğrusallığı ifade etmektedir. Kit bilindiği gibi çok düşük konsantrasyonlara karşı hassastır. Bu nedenle ölçümler gerçekleştirilmeden önce istenilen konsantrasyon aralığında kalacak şekilde hesaplamalar yapılarak uygun seyreltmeler gerçekleştirildikten sonra ölçümler gerçekleştirilmiştir.

5.4. Nanoemülsiyon Formülasyonu Geliştirme Çalışmaları

Lipit temelli formülasyonların uzun süreli stabilite sağlayabilme, permeabilite ve oral biyoyararlanımını artırabilme yeteneklerinden dolayı IL-2'nin oral kullanılacak dozaj şekli için bu taşıyıcı sistemler düşünülmüştür. IL-2'nin sınırlı ve pahalı olmasının yanı sıra suda çözünürlüğünün yüksek olması gibi nedenlerle suda çözülerek hazırlanacak bir formülasyonun uygun olacağı düşünülmüştür. Kolay hazırlanabilmesi, hazırlanan sistemlerin homojen olması ve ölçek büyütmeye uygun olması nedenleriyle tez çalışmasında Microfludics® cihazı ile mikroakışkanlaştırıcı yöntem ile hazırlanabilecek uygun formülasyon tipleri belirlenmiştir. Cihaz ile öncelikli olarak denenen formülasyon tipleri su/yağ/su tipi çoklu nanoemülsiyon, yağ/su tipi nanoemülsiyon ve NLC'dir. Ancak, Bölüm 3.2.4'te açıklandığı gibi çoklu nanoemülsiyonlar dışında hazırlanan formülasyonların yüksek sıcaklık gerektirmeleri, sabit sıcaklıkla çalışılamaması, yüksek geçiş sayıları gerektirmesi, emülsiyon tipi ve homojen damlacık boyutuna sahip sistemlerin üretilememesi gibi nedenlerle uygun bulunmadığından değerlendirilmemiştir.

Özellikle çoklu emülsiyonların protein yapılı ilaçları uzun süre yapısında koruma yeteneğine sahip olduğu ve bu tip formülasyonlardan ilaç salımının yavaş gerçekleştirdiği bilinmektedir. IL-2 gibi protein moleküllerinin biyolojik bariyerlerden geçişini artırmayı sağlamak için penetrasyon arttırıcılar kullanılmaktadır ve bu amaçla genellikle yüzey etkin maddeler ve polimerler kullanılmaktadır. Tween® 80 ve Kolliphor® EL gibi non-iyonik yüzey etkin maddelerin formülasyonda kullanımı ile mukus tabakası gibi gastrointestinal sistemin fizyolojik bariyerini geçme ve konformasyonel esnekliğe sahip olduğu için sıkı bağlantı hücrelerini (tight junction cells) açma yeteneği kazandırmak amaçlanmıştır (Kusuma, Nugroho, Martien ve Julia, 2022). IL-2'yi gastrointestinal kanaldaki enzimatik bozulmadan korumak için formülasyona proteaz inhibitörleri eklenmiştir. Bunun, oral uygulama için uygun bir formülasyon stratejisi olduğu düşünülmektedir.

Literatüre göre belirlenen yardımcı maddeler ve simülasyon sonuçlarına göre formülasyonların hazırlanmasında ölçek büyütmeye uygun bir yöntem tercih edilmiştir. Nanoemülsiyonların Microfludics® cihazında üretilmesinde formülasyon parametreleri olan sulu faz, yağ fazı ve sürfaktan tip ve miktarının seçiminin yanı

sıra basınç ve homojenizasyon döngüsü işlem parametrelerinin belirlenmesi ve optimize edilmesi önemlidir. (Microfluidics, 2010; Llinares Santos, Trujillo-Cayado, Ramírez ve Muñoz, 2018). İşlem öncesinde kaba emülsiyonlarda ön-emülsiyon oluşturmak amacıyla ultra-turrax ile ön işlem uygulanmıştır. Bu aşamada ve farklı işlem süreleri denenmiştir. Hazırlamanın ve ölçek büyütmenin kolay olması gibi avantajlara da sahip olan mikroakışkanlaştırıcı ile farklı basınç ve geçiş sayıları denenmiştir (Çizelge 4.10 - 4.11). Özellikle peptit/protein yapılı etkin maddeler içeren ilaç taşıyıcı sistemler ile çalışırken sıcaklık önemli bir parametre olduğundan ve tekrarlanan geçiş sayılarının sıcaklığı arttırması ve yüksek basınca tekrarlı maruziyete bağlı olarak protein yapısının stabil kalamama durumu göz önünde bulundurularak uygun olabileceği düşünülen minimum parametreler seçilerek çalışmalar yürütülmüştür. Damlacık boyutu ve PDİ'sine bakıldığında F1 formülasyonu için 10.000 rpm'de 3 dk ve mikroakışkanlaştırıcıda 10.000 psi basınç altında 3 geçiş, F2 formülasyonu için ise 24.000 rpm'de 3 dk ve mikroakışkanlaştırıcıda 10.000 psi basınç altında 1 geçiş seçilmiştir.

Tez çalışmamızda olduğu gibi başka çalışmalarda da kaba emülsiyonlar mikroakışkanlaştırıcıdan geçirilmeden önce ön-emülsiyon oluşturmak amacıyla ultraturrax ile ön işlem uygulanmıştır (Patel, Patrick, Pollock ve Janjic, 2013). Formülasyon bileşenlerine bağlı olarak 30.000 psi basınçta damlacık boyutu 250 nm olan nanoemülsiyon hazırlanabildiği gibi (Alliod, Almouazen, Nemer, Fessi ve Charcosset, 2019) Tween® 80 varlığında 20.000 psi basınçta 10 geçiş sonrası damlacık boyutu 6 nm olan nanoemülsiyon hazırlanmıştır. Zeta potansiyeli kaba emülsiyona göre yaklaşık -17 mV'tan -52 mV'a kadar artış göstermiştir ve 3 geçiş sonrası neredeyse tamamen transparan emülsiyonlar elde edilmiştir (Salvia-Trujillo ve diğerleri, 2014). Nanoemülsiyon formülasyonları dışında nanosüspansiyon üretiminde peptit yapıda olan siklosporin A için 30.000 psi'da 30 geçişe kadar çalışıldığı görülmüştür (Gülbağ Pınar, 2020).

IL-2 içermeyen formülasyonlar hazırlanıp uygun koşullar belirlendikten sonra formülasyonlar IL-2 yüklü olarak hazırlanmıştır. Bunun için liyofilize toz halinde bulunan referans IL-2 istenen miktarda IL-2 ile hazırlanabilmesi için belirtilen hesaplamalar yapılarak çözeltisi hazırlanmış ve üretim sürecinde primer emülsiyonun su fazındaki distile su yerine bu çözelti kullanılmıştır. Moleküler

dinamik simülasyon sonuçlarına göre proteaz inhibitörü olarak aprotinin seçilmiştir ve en dış faza eklenerek sonuç formülasyon karakterize edilmiştir.

5.5. Geliştirilen Nanoemülsiyon Formülasyonlarında Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları

5.5.1. ELISA kiti ile IL-2 yükleme tayini

IL-2 yüklü formülasyonun tayininin doğru yapılabilmesi için örneklerin yeterince seyreltilmiş olması ve bulanık olmaması gerekmektedir. Formülasyondaki IL-2'yi serbest hale getirmek için %5'lik Triton X-100 ile damlacık yapısı parçalanmıştır. Bunun için ön denemelerle seyreltme oranları denenerek uygun seyreltmeye karar verilmiştir. Daha sonra boş emülsiyon formülasyonu ile kıyaslanarak yüklü IL-2'nin miktarı okunan optik dansite değerlerinin kalibrasyon denklemi yardımıyla hesaplanarak bulunmuştur. 1 g F1 çoklu nanoemülsiyonu için 0,0249 ± 0,0032 mg IL-2 ve 1 g F2 kendiliğinden emülsifiye çoklu nanoemülsiyonu için 0,0254 ± 0,039 mg olarak IL-2 miktarları bulunmuştur.

5.5.2. Damlacık boyutu, PDİ ve zeta potansiyeli ölçümleri

Lenfatik dolaşıma geçişin damlacık boyutuyla ilişkisi üzerine literatürde çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistemler ve nanoemülsiyonlar gibi lipit bazlı sistemlerde, damlacık boyutunun küçüklüğü lenfatik dolaşıma geçiş için kritik bir faktördür. Bu tür formülasyonların ilaç emilimi sırasında enterositlerde yüksek ilaç konsantrasyonu sağlayabileceği ve lenfatik geçişi artırabileceği belirtilmiştir (Gürsoy ve Çevik, 2011). Özellikle 200 nm'nin altındaki damlacık boyutları, lenfatik taşıma için daha uygun kabul edilmektedir.

Bu doğrultuda hazırlanan formülasyonların damlacık boyutu ve zeta potansiyelleri oldukça önemlidir ve 1:250 oranında distile su ile seyreltilen nanoemülsiyonlardan Malvern Zetasizer Nano ZS ile ölçülmüştür. Her iki formülasyon için damlacık boyutu yaklaşık 200 nm'den küçük bulunmuştur (Çizelge 4.14 - 4.15). Bu ölçümler hazırlanan formülasyonların stabilitesini ve tek düzeliğini açıklamaktadır. PDİ

damlacık boyut dağılımını ifade etmektedir ve ne kadar küçük ise o kadar homojen dağılım gösterdiği anlamına gelmektedir.

Zeta potansiyel, damlacıkların yüzeyindeki elektriksel yükü gösterir ve damlacıklar arasındaki itme kuvvetlerini belirler. Zeta potansiyelin mutlak değeri yüksek olduğunda, damlacıklar birbirini iterek agregasyonu engeller ve fiziksel stabilite artar. Nanoemülsiyonların ve kendiliğinden emülsifiye sistemlerinin stabilitesi için zeta potansiyel mutlak değerinin genellikle ±30 mV veya daha yüksek olması önerilmektedir. Aynı zamanda negatif veya pozitif zeta potansiyel, damlacıkların bağlandığı biyolojik yüzeylerle olan etkileşimleri etkileyebilir. Örneğin, negatif yük genellikle biyouyumlu sistemlerde tercih edilir.

Tezde, farklı kaynaklardan temin edilen IL-2 ile F2 formülasyonları hazırlanarak karşılaştırılmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.16'da sunulmuştur. Damlacık boyutu, PDİ ve zeta potansiyeli (mV) sırasıyla; IL-2 ve aprotinin yüklü F2 için 77,6 ± 0,7 nm, 0,149 ± 0,006, -11,6 ± 0,3 mV; K-IL-2 ve aprotinin yüklü F2 için 85,06 ± 0,76 nm, 0,174 ± 0,011, -10,2 ± 0,3 mV ve B1-IL-2 ve aprotinin yüklü F2 için 95,28 ± 1,03 nm, 0,220 ± 0,006, -7,69 ±0,25 mV olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre damlacık büyüklüklerinin ve zeta potansiyellerinin istatistiksel olarak farklı olduğu ($p<0,05$) bu farkın da proteinin saklandığı çözücülerden ve üretim sürecindeki modifikasyonlardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Tüm bu bilgilere göre F1 ve F2 için lenfatik geçiş için damlacık boyutunun uygun olduğu, iyi bir damlacık boyutu dağılımına sahip oldukları ve zeta potansiyellerine bakıldığında F2'nin F1 'den daha stabil olduğu yorumlanmıştır.

5.5.3. Morfolojik çalışmalar

Formülasyonlara ait Resim 4.1 ve Resim 4.2'de de görüldüğü üzere homojen görünümlü su/yağ/su tipi çoklu nanoemülsiyonlar üretilmiştir. IL-2 içeren ve içermeyen formülasyonların fiziksel görünümleri arasında bir fark gözlenmemiştir. IL-2 içeren ve içermeyen su/yağ/su tipi çoklu nanoemülsiyonlar TEM ile görüntülenmiş ve küresel yapıda damlacıklar oluştuğu gözlenmiştir. Damlacık boyutlarının yaklaşık olarak Malvern Zeta Sizer ile ölçülen damlacık boyutuna

benzer olduğu görülmüştür (Çizelge 4.14 - 4.15). Çalışmalara F2 ile devam edildiğinden F1'in aprotinin içeren formülasyonu için TEM görüntülemesi yapılmamıştır.

5.5.4. FT-IR analizi

Şekil 4.15 ve Şekil 4.16'da F1 ve F2 formülasyonlarını ve yardımcı maddelerini içeren spektrumlar incelendiğinde geçimsizlik sonucu kaybolan ya da yeni oluşan pikler gözlenmemiştir. Şekil 4.17 ve Şekil 4.18'de spektrumlara bakıldığında proteine özgü karakteristik pikler (amit I ve amit II bantları, sırasıyla ~1650 cm^{-1} ve ~1540 cm^{-1}) gözlemlendiğinden IL-2'nin formülasyona yüklendiği şeklinde yorumlanmıştır.

İn siliko çalışmalarda da görüldüğü üzere proteinle yardımcı maddeler arasındaki yüksek etkileşim proteinin yardımcı maddelerdeki çözünürlüğüne işaret etmekte ve bu nedenle de IR spektrumunda 1600 bandında görülen amit I gerilim bandının (Prestrelski ve diğerleri, 1995) formülasyon spektrumlarında da maskelenmekle birlikte tamamen kaybolmadığı görülmektedir. IL-2'nin su ve yağ bileşenlerine afinite göstermesi nedeniyle yağ fazına da geçiş yaptığı düşünülmektedir.

5.5.5. DSC analizi

Şekil 4.19 ve Şekil 4.20'deki DSC termogramları incelendiğinde kırmızı termogramlar IL-2'ye aittir ve 59,68°C'de bir denatürasyon tepe noktası göstermektedir. Saf IL-2'nin bu sıcaklıkta denatüre olması, onun doğal yapısını kaybettiğini ve sekonder ya da tersiyer yapısının bozulduğunu göstermektedir. Şekil 4.19'daki mavi termogram ise IL-2 yüklü çoklu nanoemülsiyon olan F1 formülasyonuna aittir. IL-2 içermeyen çoklu nanoemülsiyon olan yani siyah termogramdan farklı olarak 71,71°C'de görülen denatürasyon tepe noktası IL-2'nin formülasyon içindeki kararlılığının arttığını göstermektedir. Nanoemülsiyon ortamının, protein moleküllerini stabilize ederek termal bozulmaya karşı koruma sağladığı şeklinde yorumlanabilmektedir. Ayrıca, denatürasyon sıcaklığındaki bu artış, emülsiyon ortamındaki yağ fazı veya diğer yardımcı maddelerin proteini koruyucu etkisine bağlanmıştır. Şekil 4.20'de kendiliğinden emülsifiye olan çoklu

nanoemülsiyona ait termogramlarda benzer sonuçlar görülmektedir. Yani IL-2 yüklü kendiliğinden emülsifiye çoklu nanoemülsiyon (mavi termogram), IL-2'nin termal kararlılığını artırarak, saf IL-2 (kırmızı termogram) ile kıyaslandığında daha yüksek denatürasyon sıcaklıkları göstermektedir.

Bu sonuçlar, peptit ve proteinlerin nanoemülsiyonlar gibi lipit sistemlerle bir ilaç taşıyıcı sistem olarak formülasyonunun geliştirilmesinin proteinin kararlılığını arttırabileceğini göstermektedir. Elde edilen sonuçların, IL-2'nin biyolojik aktivitesini koruma açısından umut verici olduğu düşünülmektedir.

Benzer şekilde Pisal ve arkadaşları tarafından yürütülen çalışmada protein enkapsüle edilmiş lipozomlarla stabilizasyon sağlandığı ve biyolojik aktivitenin korunduğu gözlenmiştir (Pisal, Kosloski ve Balu-Iyer, 2010). Mehrdadi tarafından yürütülen çalışmada benzer şekilde lipit nanopartiküllerin, proteinlerin termal stabilitesini artırmada etkili olduğu ve bu sistemlerin proteinlerin denatürasyonunu önleyerek biyolojik etkinliğini de koruyabileceği belirtilmiştir (Mehrdadi, 2024). Jorgensen ve arkadaşları tarafından yürütülen lipit temelli ilaç taşıyıcı sistemlerde protein fiziksel stabilitesinin incelendiği çalışmada ise bu sistemlerin proteinlerin denatürasyon sıcaklıklarını artırarak termal stabilite sağlayabileceği gösterilmiştir (Jorgensen, Martins, ve van de Weert, 2009).

5.5.6. Viskozite

Viskozite sistemin fiziksel özelliklerini, stabilitesini, biyoyararlanımını ve uygulama kolaylığını doğrudan etkileyebildiğinden hem çoklu nanoemülsiyonlar hem de kendiliğinden emülsifiye olan çoklu nanoemülsiyonlar için kritik bir parametredir. Çok düşük viskozite, damlacıkların birbirine yaklaşmasını dolayısıyla koalesans riskini artırırken yüksek viskozite ise damlacıkların hareketini kısıtlamakta ve böylece stabiliteyi arttırabilmektedir. Ayrıca kendiliğinden emülsifiye sistemler için düşük viskozite genellikle avantajlıdır, çünkü lipit karışımının hızlı bir şekilde sulu fazla temas edip emülsiyon oluşturmasını sağlamaktadır (Pouton, 1997; Wang, Dong, Chen, Eastoe ve Li, 2009). Ancak, bu durum gastrointestinal ortamda daha hızlı dağılarak lipaz enzimleri ile etkileşimi artırır. Çok düşük viskozite, sistemin hızlı dağılmasına sağlarken stabil bir emülsiyon oluşturmasını zorlaştırabilmektedir

(Buya, Beloqui, Memvanga ve Préat, 2020). Bunu yanı sıra yüksek viskozite, sindirimdeki enzimatik parçalanmayı yavaşlatabilir ve bu da lenfatik taşıma etkinliğini düşürebilir. Yüklü olmayan formülasyonun viskozitesi formülasyona IL-2'nin eklenmesiyle azalmıştır ve kayma hızı 60 için 25°C'de F2, F2-IL-2 ve aprotinin içeren F2-IL-2'nin viskozitesi sırasıyla 819 ± 20 cP, 644 ± 7 cP ve 646 ± 18 cP olarak ölçülmüştür.

Şekil 4.21 - 4.23'te sunulan akış reogramlarına göre IL-2 yüklü ve IL-2 yüklü olmayan F2 formülasyonları non-Newtonian akışa sahiptir. Non-Newtonian akış tiplerinden ise sisteme belli bir kayma gerilimi uygulandığında akmaya başlayan plastik akış göstermektedir.

5.5.7. Yüzey gerilimi ölçümleri

Yüzey gerilimi sıcaklığın ve her iki fazın bileşiminin bir fonksiyonudur. Sürfaktan karışımının konsantrasyonunun artırılmasının yüzey geriliminde bir azalmaya yol açtığı bulunmuştur. Bu sürfaktan karışımının konsantrasyonunun artırılmasının hava/su arayüzündeki yüzey etkinliğini artırmasından kaynaklanmaktadır (Ali ve Hussein, 2017). Yüzey gerilimi F2 için 28,92 ± 0,11 mN/m, F2-IL-2 için 29,26 ± 0,21 mN/m ve F2-IL-2-Aprotinin için 27,74 ± 1,60 mN/m olarak ölçülmüştür. IL-2 yüklü ve IL-2 yüklü olmayan formülasyonlar birbirleriyle karşılaştırıldığında yüzey gerilimleri benzer bulunmuştur, istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p>0,05$). Farklı kaynaklardan elde edilen IL-2 ile yüklü olarak hazırlanan formülasyonlar için ise F2-IL-2-Aprotinin, F2-K-IL-2-Aprotinin ve F2-B1-IL-2-Aprotinin için sırasıyla 27,74 ± 1,59 mN/m, 26,77 ± 0,45 mN/m ve 29,03 ± 0,18 mN/m olarak bulunmuştur ve birbirleriyle karşılaştırıldığında da yüzey gerilimleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu sonuçlar IL-2 çözeltisinin yüzey gerilimini etkilemediği bunun da sebebinin yardımcı maddelere oranla formülasyondaki IL-2 çözeltisinin miktarının çok az olması şeklinde yorumlanmaktadır.

5.5.8. İletkenlik ölçümleri

İletkenlik değerinin 10 µS/cm'den düşük ve temelde sıfır olması durumunda sürekli fazın yağ olduğu anlamına gelirken, 10 µS/cm'den yüksek iletkenlik değeri, sürekli

fazın su olduğu anlamına gelmektedir (Hassan, 2015). Literatürde taze hazırlanmış formülasyon buzdolabında ve 25°C'de saklanıp damlacık boyutu ve kondüktivitesi ölçüldüğünde ortalama kürecik boyutunun zamanla arttığı gözlemlenmiştir ve bu durum, suyun dış sulu fazdan iç sulu faza göç etmesinden dolayı damlacıkların şişmesinden kaynaklanabileceği şeklinde açıklanmıştır. Bu durum iki derecede de saklanan numunelerin elektriksel iletkenliğinin azalmasıyla gösterilmektedir (Akhtar ve diğerleri, 2010). F2-IL-2 için hazırlandığında 23 ± 0 µS/cm, 2. gün 10,7 ± 0,1 µS/cm ve 7. gün için 10,6 ± 0,2 µS/cm olarak bulunmuştur ve hazırlanan formülasyonların su miktarları ve kondüktivite ölçümleri göz önünde bulundurulduğunda benzer sonuçlar elde edilmiştir. Kısaca, buzdolabında saklanan IL-2 yüklü olmayan çoklu emülsiyonların daha stabil olduğu sonucuna ulaşılmaktadır. Ancak, yüklü olan ve yüklü olmayan formülasyonlarla da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Aprotinin yüzey yükü genellikle pozitif yönlüdür ve dış faza yüklenmiş olmasının formülasyonun iletkenliğini doğrudan etkilediği düşünülmektedir.

5.5.9. Termodinamik stabilite çalışmaları

IL-2 yüklü olmayan ve IL-2 yüklü F1 ve F2 formülasyonları ısıtma-soğutma, santrifüj ve dondurma-çözme gibi stres koşulları için değerlendirilmiştir (Kallakunta, Bandari, Jukanti ve Veerareddy, 2012).

IL-2 yüklü olmayan ve IL-2 yüklü F1 ve F2 formülasyonları ile 3500 rpm'de gerçekleştirilen santifüj testinden sonra faz ayrılması gözlenmemiştir.

F1 formülasyonu dondurma-çözme döngüsü Resim 4.7'deki fiziksel görünüş ve Şekil 4.28'deki grafiklerden de anlaşılacağı üzere F1 formülasyonu dondurma-çözme döngüsüne dayanıklı bulunmamıştır. Başlangıçta 228,27 ± 1,10 nm olarak ölçülen damlacık boyutu 3. dondurma-çözme döngüsünün sonunda 1184,89 ± 182,13 nm olarak ölçülmüştür. IL-2 yüklü F1 formülasyonu da F1 formülasyonu gibi dondurma-çözme döngüsüne dayanıklı bulunmamıştır. Bu durum, Resim 4.11'deki fiziksel görünüş ve Şekil 4.32'deki grafiklerden de anlaşılmaktadır. Başlangıçta 211,57 ± 0,32 nm olarak ölçülen damlacık boyutu 3. dondurma-çözme döngüsünün sonunda 1297,24 ± 121,93 nm olarak ölçülmüştür.

Isıtma-soğutma, santrifüj ve dondurma-çözme stres koşullarında, IL-2 yüklü ve IL-2 yüklü olmayan F2 formülasyonlarda herhangi bir çökelme ve faz ayrımı gözlenmemiştir. Böylece, F2 formülasyonlarının termodinamik stabilitesi doğrulanmıştır.

5.5.10. Stabilite çalışmaları

pH, iyonik güç, sıcaklık, yüksek basınç, susuz çözücüler, metal iyonları, deterjanlar, adsorpsiyon, çalkalama ve kesme gibi faktörler proteinlerin kimyasal ve fiziksel kararlılığını etkileyebilmekte, proteine zarar vererek biyolojik inaktivasyon, agregasyon, immünojenite ve çökelmeye neden olabilmektedir (Mehrdadi, 2024). Bu nedenle öncelikle sirküler dikroizm spektroskopisiyle formülasyondaki IL-2'nin stabilitesinin incelenmesi planlanmıştır. IL-2 yüklü çoklu nanoemülsiyon formülasyonu, literatüre uygun olarak su ve metanol karışımı (4:1) ile seyretilerek 20 dk, 12.000 g'de santrifüj edilmiştir (Ali ve diğerleri, 2022). Süpernatant alınıp süzülerek analiz için taze olarak hazırlanmıştır. Ancak ölçümler CD cihazının voltajını arttırdığı gerekçesiyle operatör tarafından sonlandırılmıştır.

Farklı seyreltme alternatifleri ile yüksek konsantrasyonlu formülasyon hazırlanarak çalışma tekrarlanmıştır. IL-2 yüklü nanoemülsiyon formülasyonu, %5 Triton-X, etanol ve metanol ile çeşitli seyreltmeler yapılarak taze olarak hazırlanmıştır. Daha önceden çalışılan çözücüye bağlı dalga boyu ve küvet tipine bağlı olarak değişiklikler gözlenmesi nedeniyle 1 mm'lik küvet tercih edilmiştir, ancak ölçümler cihazın voltajını artırdığı gerekçesiyle operatör tarafından tekrar sonlandırılmıştır ve cihazdan kaynaklı olduğu düşünülen nedenlerle CD ölçümleri gerçekleştirilemediği görülmüştür. Formülasyonlardan kaynaklanan bulanıklık nedeniyle seyreltme oranı artırıldığında da formülasyon için seçilen yükleme dozunun ölçüm için düşük seviyede kalması nedeniyle istenen spektrumlar yine elde edilememiştir. Tekrarlanan ölçüme ait görsel Şekil 4.34'te verilmiştir ancak ölçüm tamamlanamadığından bir sonuç elde edilememiştir.

Sirküler dikroizm spektroskopisiyle sadece referans IL-2'nin sulu çözeltisi ile IL-2 yapısının literatürle uyum gösteren spektrumu elde edilebilmiştir (Şekil 4.11). CD çalışmaları ile formülasyonlardaki IL-2 stabilitesini değerlendirilemediğinden

alternatif olarak SDS-PAGE çalışmalarının yapılmasına karar verilmiştir. Öncelikle jel yüzdesi örnek seyreltme tamponu ve elektroforez koşulları belirlendikten sonra formülasyon örnekleri jelde yürütülmüştür.

SDS-PAGE yöntemi ile sadece formülasyon üretim sürecinde protein yapısının bozulup bozulmadığı değerlendirilebilmiştir. Stabilite çalışmaları kapsamında 0., 1., 2., 3. ve 4.haftalarda 5°C ± 3°C'de saklanan etkin madde içermeyen nanoemülsiyon ve IL-2 yüklü nanoemülsiyondan örnekler alınarak SDS-PAGE jellerine yüklenmesi planlanmıştır. Ancak, formülasyonların farklı maddelerle farklı oranlarda seyreltilmesi ile hazırlanan numunelerde protein bandı gözlenememiştir. Literatür incelendiğinde bu durumun formülasyonda yüksek miktarda bulunan Kolliphor® EL'den kaynaklı olduğu görülmüştür. Bilindiği gibi SDS anyonik bir yüzey etkin maddedir ve proteinleri denatüre ederek proteinleri negatif yüklü hale getirir bu şekilde elektroforez sırasında yalnızca boyutlarına göre ayrılmalarını sağlar. Kolliphor® EL gibi non-iyonik sürfaktanlar, proteinin hidrofobik bölgelerine bağlanarak SDS'nin proteinle etkileşimini engelleyebilir. Bu durum, SDS'nin etkisini azaltır ve protein-SDS kompleksinin oluşumunu engelleyerek SDS-PAGE'de proteinin doğru şekilde ayrışmasının veya görünmesinin önüne geçebildiği şeklinde açıklanmıştır (G-Biosciences, 2017).

Yapılan bir çalışmada ise Cremophor® EL içeren formülasyonların hiçbirinde exendin-4'e ait protein bandı görülmemiştir. Bu durumu değerlendirmek için exendin-4 ile formülasyon bileşenleri Cremophor® EL içeren ve Cremophor® EL içermeyen şekilde jele yüklenerek çalışma tekrarlandığında Cremophor® EL içermeyecek şekilde uygulanan kuyucuklarda exendin-4'ün jelde ilerlediği, Cremophor® EL içerecek şekilde uygulanan kuyucuklarda exendin-4'ün jelde ilerlemediği gözlenmiştir (Çelik-Tekeli, 2020). Yapılan bir diğer çalışmada da Cremophor® EL içeren formülasyonun 100 kat seyreltilerek SDS-PAGE analizi yapıldığı görülmüştür (Lamaisakul, Tantituvanont, Lipipun ve Ritthidej, 2019). Bu doğrultuda 100 kat seyreltme Kolliphor® EL konsantrasyonunu düşüreceğinden SDS'nin protein üzerindeki etkisini engelleyemeyeceği düşünülerek formülasyonlar farklı maddelerle 100 kat seyreltilerek deney tekrarlanmıştır. Burada, protein bantları bu sefer de SDS-PAGE çalışmalarında protein miktarı genellikle 10-50 µg arasında olması istendiğinden ancak bu oranda seyreltme ile bu formülasyon için bu durum

sağlanamadığından IL-2'ye ait protein bandı gözlenememiştir. Ancak jellerde özellikle Resim 4.15'te belirgin olarak görünen ve Kolliphor® EL'dan kaynaklandığı düşünülen sürüklenme benzeri leke görüntüsü literatürle uyumlu bulunmuştur (Çelik-Tekeli, 2020; Lamaisakul ve diğerleri, 2019).

Yüksek konsantrasyonlu IL-2 ile hazırlanan F2 formülasyonu ve Spectra/Por® Biotech CE diyaliz membran kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada ise IL-2'ye ait protein bandı görülmüştür. Ancak, formülasyonun istenen konsantrasyonda olmaması ve stabilite çalışması yapacak kadar yüksek konsantrasyonlu F2 formülasyonu hazırlayabilecek kadar IL-2 mevcut olmaması nedeniyle çalışma sürdürülebilir ve tekrarlanabilir bulunmamıştır. Yapılan bu çalışmanın formülasyon üretim sürecinde IL-2'nin yapısal bütünlüğünün korunup korunmadığının değerlendirilmesi açısından yeterli olduğu düşünülmektedir.

SDS-PAGE çalışmalarında formülasyonun yapısında yüksek miktarda bulunan non-iyonik sürfaktandan kaynaklı olarak protein bandı oluşumu gözlenemediğinden stabilitenin değerlendirilebilmesi için SEC-HPLC yapılmasına karar verilmiştir. SEC-HPLC ile elde edilen kromatogramlar incelendiğinde formülasyon kromatogramlarında tamamen bir pik ayrımı görülmemiştir. Formülasyona ait spektrum, yardımcı maddelerle kıyaslandığında spektrumların benzerlik gösterdiği görülmektedir. Bilindiği gibi SEC-HPLC ile analiz edilen maddenin moleküler ağırlığına göre ayrım sağlanmaktadır ve küçük molekül ağırlığına sahip maddelerin kolonda tutulma süresi artmaktadır. Bu bilgi doğrultusunda, kromatogramlar karşılaştırıldığında yardımcı maddeler dışında başka pik görülmediğinden proteinin yapısının bozulmadığı şeklinde bir yorum yapılmıştır.

IL-2 yüklü ve aprotinin içeren IL-2 yüklü çoklu F2 formülasyonları başlangıç ve 3. aylarda damlacık boyutları, PDİ, zeta potansiyeli, viskozite ve yüzey gerilimi değerlendirilmiştir. Çizelge 4.22'e göre viskozite sonuçları hariç sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Aprotinin içeren F2-IL-2 için başlangıçta 80,05 ± 0,17 nm olan damlacık boyutu 3 ay sonra 84,14 ± 0,58 nm olarak, 0,170 ± 0,010 olan PDİ 3 ay sonra 0,177 ± 0,009 olarak, -9,17 ± 0,14 mV olan zeta potansiyeli 3 ay sonra -16,2 ± 1,7 mV olarak, 27,74 ± 1,60 mN/m olarak ölçülen yüzey gerilimi ise 3 ay sonra 25,51 ± 1,45 mN/m olarak ölçülmüştür. İki yönlü

varyans analizi (ANOVA) yapılmıştır ve belirtildiği gibi istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Stabilite çalışmalarında belirtildiği gibi CD, SDS-PAGE ve SEC HPLC denenmiştir ancak yöntemler ve koşullar tam olarak uygun olmadığından, formülasyonun yapısı analizine engel olduğundan IL-2'nin stabilitesinin IL-2 miktarı olarak ELISA kiti ile analiz edilmiştir. 5°C ± 3°C saklanan aprotinin içeren F2-IL-2 sonuç formülasyonunda IL-2 miktarının 4 haftada %53,56 ve 6 haftada %33,19'a düştüğü görülmüştür. Ancak çözelti haldeki IL-2 için fiziksel ve kimyasal stabilite süresi oda sıcaklığında 48 saat olduğu bilindiğinden (Proleukin® Kullanım Talimatı, Novartis) formülasyonunun IL-2'nin stabilitesini artırdığı şeklinde bir yorum yapılabilir.

5.6. İn Vitro Salım Çalışmaları

İn vitro salım çalışmaları planlanırken literatürde peptit, protein yüklü lipit temelli sistemler için genellikle pH 6,8'de çalışıldığı görülmüştür (Hintzen ve diğerleri, 2014; Zupančič, Partenhauser, Lam, Rohrer ve Bernkop-Schnürch, 2016). Ancak gastrointestinal sistemden geçerken bozulmadığını göstermek amacıyla pH 1,2'de de in vitro salım çalışması yapılmıştır. Ayrıca diyaliz membran kullanılarak yağ damlacıklarının geçmesi sınırlandırılırken uygun molekül ağırlığına göre seçilen bir diyaliz membran ile protein salımının sağlanabildiği görülmüştür (Bernkop-Schnürch ve Jalil, 2018). Bu doğrultuda, salım çalışmaları Bölüm 3.2.6'da anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. IL-2 molekül ağırlığı 15,5-16 kDa'dur ve buna göre 20kDa diyaliz kasediyle (diyaliz membran) yapılan salım çalışmalarında Çizelge 4.23'te görüldüğü gibi anlamlı sonuçlar elde edilememiştir. pH 1,2'de gerçekleşen salım her ne kadar pH 6,8'den fazla olsa da maksimum %0,016 salım gerçekleşmiştir. Deney sonunda diyaliz kasetinden formülasyon geri alınarak ELISA kitiyle analiz edildiğinde ise tamamına yakını ölçülebilmiştir. Bu durum difüzyonun membran yüzeyiyle sınırlı olmasından kaynaklı olabileceği, diyaliz membranın yüzey yükünün formülasyon için uygun olmaması nedeniyle kasetin içine yeterince tamponun geçmemiş olması ve dolayısıyla sistemin tamamen emülsifiye olmamasıyla ilişkili olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Benzer şekilde IL-2 yüklü lipozomlarla gerçekleştirilen bir çalışmada 25 kDa'dan küçük molekülleri geçirebilen diyaliz membran kullanılarak salım çalışması gerçekleştirilmiştir. 8 saat olarak planlanan çalışmanın sonunda IL-2

miktarının çok az bulunması sebebiyle çalışma 48 saate uzatılmış ve in vitro salım sonuçları incelendiğinde (Franz hücresine konulan 1 mL lipozom $50x10^7$ pg IL-2 içermektedir) 48 saat sonunda formülasyondan 5,532 pg IL-2 salındığı (%0,0011) bulunmuştur (Çilek, 2008).

Diyaliz kaset ile gerçekleştirilen salım sonuçlarına göre IL-2 salımının uygun olmadığı görüldüğünden IL-2'nin in vitro salım çalışmaları için formülasyonların kapsüle doldurularak palet yöntemi uygulanmıştır. pH 1,2 tamponu ve pH 6,8 fosfat tamponunun yanı sıra pH 6,5 FaSSIF ve FeSSIF tamponları ile çalışılmıştır. pH 1,2'de bozulmadan tamamı salım ortamına geçerken, pH 6,8'de IL-2 salımı 4 saatin sonunda maksimum %80 ± 4'tür. pH 6,5 FaSSIF ortamında salınan miktar 4. saatte %93,3 ± 3,2 olarak bulunmuştur. pH 6,5 FeSSIF maksimum salım 1. saatte görülmektedir ve salım %69,61 ± 8,41 olarak bulunmuştur. 4 saatte ise %57,53 ± 0,85'e düşmektedir. Bu durumun kullanılan FeSSIF ve FaSSIF ortamlar arasındaki SIF miktarı ile yani ortamın kimyasal bileşimi ile ilişkili (safra tuzları ve lesitin konsantrasyonları ile ilişki) olduğu düşünülmektedir. Formülasyona proteaz inhibitörleri eklemek ve kapsüle koymak alternatif bir strateji olarak düşünülmektedir.

5.7. İn Vitro Sindirim Çalışması

Gastrointestinal kanalda nanoemülsiyon gibi lipit yapılı ilaç taşıyıcı sistemler lipazlar tarafından sindirime uğrayabilirler. Tezde, formülasyonun sağladığı korumayı değerlendirebilmek için lipaz varlığında sindirim çalışması yürütülmüştür. IL-2 yüklü nanoemülsiyon formülasyonunun sindirim çalışması sırasında harcanan 0,1 M NaOH miktarından hareketle sindirim oranı hesaplanmıştır. Formülasyonun %45 oranında sindirime uğradığı gözlenmiştir (Şekil 4.48). Formülasyonda kullanılan sürfaktanlar kimyasal yapılarından ötürü lipazın substrata erişimini sterik olarak engelleyebilir ve dolayısıyla formülasyonun sindirim hızını da etkileyebilir. Literatürde polietilen glikol (PEG) ve poligliserol yapısı taşıyan sürfaktanların orta zincirli yağ asitlerinin mono-, di- ve trigliserit yapılarına kıyasla daha az ve yavaş sindirime uğradığı belirtilmiştir (Shahzadi ve diğerleri, 2021). Bu bilginin pratik sonucu ise sürfaktan yapısındaki etilen oksit grubu sayısının fazlalığı sterik engel sağlayarak lipazın lipide erişmesini geciktirmesi ve engellemesidir. Su/yağ/su yapısına sahip IL-2 yüklü nanoemülsiyon formülasyonun dış fazında bulunan

Kolliphor® EL ise etilen oksit ile hint yağının 1:35 mol oranında reaksiyona girmesi sonucu üretilir (Suys ve diğerleri, 2019). Kolliphor® EL'nin sahip olduğu kimyasal yapı nedeniyle formülasyon sindiriminin daha geç başladığı gözlenmiştir. Literatürde dış sulu faza eklenen hidrofilik sürfaktanın misel oluşturabileceği bildirilmiştir (Sun ve Xia, 2020). Buna bağlı olarak IL-2 yüklü formülasyonda Kolliphor® EL'nin kısmi sindirimi veya misel oluşturması sonucu yağ fazının bir kısmının da sindirime uğradığı ve bu nedenle sindirim oranının %50'ye yakın olduğu düşünülmektedir.

Formülasyonun sindirim ortamında 30 dakika dispersiyonundan (enzim eklenmeden hemen önce) sonra ortamda %52,3 oranında IL-2 olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.48). Bu değer benzer ortam içerikleri nedeniyle FaSSIF ortamında yapılan in vitro salım çalışması ile karşılaştırılmış ve tutarlı sonuçlar elde edildiği gözlenmiştir (Şekil 4.45). Enzim eklenmeden hemen önce formülasyondan IL-2 salımının devam ettiği söylenebilir. Ancak, enzim ilavesinden sonra IL-2 miktarının belirli bir süre sabit kalmasının ardında düşmeye başladığı görülmüştür. Çalışmada kullanılan Lipaz A enzimi gliserit yapısındaki 1 ve 3. ester pozisyonları için spesifiktir ve peptit/protein yapıları üzerinde etkili değildir (Fernandez-Lafuente, 2010) ancak IL-2 miktarında beklenmedik bir azalma meydana gelmiştir. Bu durumun, sindirim esnasında açığa çıkan yağ asitlerinin protein stabilitesini veya çözünürlüğünü etkilemesinden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Sözkonusu durum, IL-2'nin formülasyondan salım oranını da etkileyebilmektedir.

5.8. Hücre Kültürü Çalışmaları

Tez kapsamında hücre kültürü çalışmaları ile önce IL-2'nin biyolojik aktivitesini belirlemek amacıyla uygulanması gereken IL-2 konsantrasyonuna karar verilmiştir. Hücre kültürü çalışmaları boyunca uygulanan IL-2 yüklü formülasyon ve IL-2 çözeltileri biyolojik aktivitenin belirlenmesi çalışmasında seçilen 89,5 nM, 44,75 nM ve 22,375 nM konsantrasyonlarında seyreltilerek uygulanmıştır. IL-2'nin biyolojik aktivitesini belirlemek amacıyla PBMC hücreleri ile inkübe edilmiş ve deney sonucunda hem toksik etki görülmediği hem de hücre sayısının artmasını sağladığı görülmüştür.

IL-2'nin kanser hücreleri üzerinden doğrudan bir sitotoksisitesi yoktur ancak PBMC hücrelerini indükleyerek bağışıklık sisteminin aktivasyonunda ve düzenlenmesinde önemli bir rol oynayabilmekte, özellikle T hücrelerini ve NK hücreleri aktive etmektedir. IL-2, CD4+ ve CD8+ T hücrelerinin proliferasyonunu ve aktivasyonunu uyarmaktadır. Sitotoksik T hücrelerinin (CTL) sayısını artırarak kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkilerini güçlendirir. NK hücrelerini aktive ederek bu hücrelerin tümör hücrelerini öldürme kapasitesini artırır. Ayrıca IL-2, PBMC'lerden sitokin salımını (IFN-γ, TNF-α gibi) artırır, bu da bağışıklık yanıtını güçlendirir. Salınan sitokinler, tümör mikro çevresini değiştirebilir ve bağışıklık hücrelerinin tümör hücrelerine saldırmasını kolaylaştırabilir (Dehghan ve diğerleri, 2022).

Renal hücreli karsinom ve immün hücrelerle ko-kültüre edilmiş 3B hücrek kültürü çalışmasında tümör mikroçevresini oluşturan kanser hücrelerini, endotel hücrelerini, bağışıklık hücrelerini ve fibroblastları içeren heterotipik 3B ko-kültür sferoit modelleri oluşturulmuştur. Farklı hücreler arası etkileşimleri, hücre çoğalmasını ve matris üretimini kolaylaştıran tümör benzeri bir mikroçevre şekillendirmiştir. Hücresel adezyona ve epitelyal-mezenkimal geçişe karşılık gelen protein ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler indüklenmektedir. Sonuç olarak bağışıklık hücresi alt tiplerinin korunduğunu ve çeşitli tedavilerle düzenlenebileceği gösterilmiştir (Rausch ve diğerleri, 2021).

Yapılan bir çalışmada da IL-2 içeren hücre kültüründe büyütülen T lenfositlerin, in vitro olarak tümör hücrelerini öldürme kabiliyetine sahip olduğu gösterilmiştir. PBMC hücreleri 2B ve 3B hücre ko-kültürü ile IL-2'nin kanser hücrelerini üzerindeki immünomodülasyonu incelenmiştir (Amin ve White, 2014). Tez çalışmasında da benzer şekilde IL-2 yüklü formülasyonun antikanser etkinlikleri hem konvansiyonel hücre kültürü dediğimiz 2B hücre kültürü ile hem de 3B hücre kültürü çalışmalarıyla değerlendirilmiştir. Şekil 4.49'da 2B hücre kültürü çalışmalarıyla IL-2 yüklü formülasyonun (aprotinin içeren F2-IL-2) IL-2 çözeltisiyle kıyaslandığında stabil olduğu, biyolojik aktivitesini kaybetmediği görülmüştür. Şekil 4.50'de IL-2 yüklü formülasyonunun artan konsantrasyonda IL-2 çözeltisine kıyasla daha etkili olduğu bulunmuştur.

Yapılan çalışmada, IL-2'nin nanoemülsiyon formülasyonu içinde biyolojik aktivitesinin korunduğu ve farklı konsantrasyonlarda PBMC hücrelerinde proliferasyonu etkili bir şekilde indüklediği gösterilmiştir. Özellikle, 89,5 nM konsantrasyonda IL-2 yüklü formülasyonun hücre proliferasyon oranı, serbest IL-2 çözeltisine kıyasla istatistiksel olarak farklılık göstermemiştir ($p>0,05$). Bununla birlikte, daha düşük konsantrasyonlarda (44,75 nM ve 22,375 nM) formülasyonun biyolojik aktivitesi korunmuştur. Lipit bazlı taşıyıcı sistemlerin protein yapısındaki biyolojik ajanların stabilitesini ve biyolojik aktivitesini koruma yeteneği olduğu bilinmektedir. Hazırlanan nanoemülsiyonun da IL-2 gibi hassas moleküller için potansiyel ilaç taşıyıcı sistem olduğu iddiasını desteklemektedir.

Antikanser etkinliklerin değerlendirilmesi amacıyla yapılan PBMC ve A498 hücrelerinin ko-kültür çalışmaları, IL-2 yüklü formülasyonun serbest IL-2 çözeltisine kıyasla A498 hücre canlılığını daha fazla azalttığını göstermiştir. Özellikle, 89,5 nM konsantrasyonda ve 1:1 hücre oranında uygulandığında, IL-2 yüklü formülasyonun hücre canlılığını %11 ± 2'ye düşürdüğü görülmüştür. Bu sonuç, IL-2 yüklü nanoemülsiyonun immün yanıtı artırmada serbest formdan daha etkili olduğunu göstermektedir.

Migrasyon çalışması, IL-2 yüklü nanoemülsiyon formülasyonun immün hücrelerin (PBMC) böbrek kanseri hücrelerine (A498) migrasyonunu uyardığını ortaya koymaktadır. Şekil 4.51'deki mikroskop görüntülerinde belirli bölgelerde mavi renk yoğunluğunun daha fazla olduğu görülmektedir. Bu durum, immün hücrelerin bu bölgelerde öbeklenerek kanser hücrelerine göç etmeye çalıştığını göstermektedir. IL-2 yüklü formülasyonun bulunduğu grupta öbeklenme yoğunluğunun, IL-2 çözeltisinin veya kontrol grubunun bulunduğu gruplara göre daha fazla olması, bu formülasyonun immün hücrelerin kanser hücrelerine göçünü artırdığı şeklinde yorumlanmıştır. Bu mekanizmanın, formülasyonun yüzey özelliklerinden ve IL-2'nin formülasyondaki kontrollü salınımından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bu sonuçlar, IL-2 yüklü formülasyonun immün hücre göçünü artırarak kanser tedavisinde kullanılma potansiyeline sahip olabileceğini göstermektedir.

3B tümör modelinde yapılan sitotoksisite çalışmaları, IL-2 yüklü nanoemülsiyonun serbest IL-2 çözeltisinden PBMC hücrelerini uyararak daha yüksek bir sitotoksisite gösterdiğini ortaya koymuştur. Özellikle, 1:1 hücre oranında (PBMC:A498) uygulanan formülasyon, kanser hücresi ölümünü daha etkili bir şekilde indüklemiştir.

Bu sonuçlar, nanoemülsiyonların yalnızca biyolojik aktiviteyi korumakla kalmayıp, aynı zamanda antikanser etkinliği artırabileceğini de göstermektedir.

Nil kırmızısı yüklü formülasyonlarla yapılan tümöral penetrasyon çalışmaları, nanoemülsiyonların, serbest çözeltiye kıyasla daha derin tümöral penetrasyon yeteneği gösterdiğini ortaya koymuştur. Şekil 4.54'te tespit edilen kırmızı floresans sinyalinin literatürde görüldüğü kadar yoğun olmamasına karşın benzer olduğu ve sferoitin hem yüzeyinde hem de derin katmanlarında tespit edilmesi, formülasyonun sayesinde etkin bir şekilde dağıldığını ve tümöral penetrasyon yeteneğini artırdığını göstermektedir (Varan ve diğerleri, 2018; Varan ve diğerleri, 2021b). Nil kırmızısı çözeltisinin sferoit yüzeyinde yoğunlaştığı ancak sferoitin iç kısımlarına sınırlı penetrasyon gösterdiği gözlemlenmektedir. Nanoemülsiyonların küçük damlacık boyutları ve yüzey modifikasyonları, bu penetrasyonun temel mekanizmaları olarak düşünülebilir. Bu durum, gelecekte klinik uygulamalar için umut verici bir özellik olarak değerlendirilebilmektedir. Bu sonuçlar, lipit temelli ilaç taşıyıcı sistemlerin IL-2 gibi immünoterapötik ajanlarla kombine edilerek daha etkili tedavi stratejilerinin oluşturulabileceğini de ortaya koymaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışması sonucunda böbrek kanseri tedavisinde oral yolla kullanılmak üzere IL-2 yüklü çoklu nanoemülsiyon formülasyonları geliştirilmiştir. Yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir:

- IL-2 farklı reseptör alt tiplerine bağlanarak farklı etkiler ortaya koyduğu için istenen antikanser etki için IL-2Rα'nın önemi ve IL-2Rα ile etkileşime giren Arg 38, Phe 42, Glu 62 ve Leu 72 ilgili yüzey amino asitleri belirlenerek in siliko çalışmalar bu doğrultuda gerçekleştirilmiştir.
- Moleküler dinamik simülasyonlar için doğrudan yardımcı madde ve IL-2 arasındaki etkileşimin incelenmesi planlandığından sistemdeki her bir atomun konumunu ve hareketini açıkça modelleyen, yüksek çözünürlüklü detaylı bilgi sağlayan all-atom simülasyonlar tercih edilmiştir.
- İn siliko moleküler dinamik simülasyonları, formülasyon bileşenlerinin IL-2 ile uyumlu olduğunu ve proteinin stabilitesini koruyabildiğini göstermiştir.
- Labrafac™ Lipophile WL 1349, IL-2Rα ile güçlü ve geri dönüşümlü etkileşimler sağlayarak antitümör etkilerin artırılmasında uygun bir bileşen olarak saptanmıştır.
- Peceol™ ve Maisine® gibi lipit bazlı sistemlerin IL-2Rα bağlanmasını bozarak antitümör etkilerini artırma potansiyeline sahip olduğu, bu sistemlerin gelecekteki çalışmalar için alternatif stratejiler olarak değerlendirilebileceği belirlenmiştir.
- Proteaz inhibitörleri ile yapılan simülasyonlar sonucunda aprotininin daha düşük etkileşim göstermesi nedeniyle formülasyon için uygun proteaz inhibitörü olduğu görülmüştür.
- FT-IR analizine göre IL-2 ile yardımcı maddelerin geçimli olduğu sonucuna varılmıştır.
- Mikroakışkanlaştırcı yönteminde F1 için basınç ve geçiş sayıları 10.000 psi'de 3 geçiş ve F2 için 10.000 psi'de 1 geçiş olarak belirlenmiştir.
- Formülasyonların 1 gramına hedeflendiği gibi 2,5 x 10^5 U/mL IL-2 yüklenmiştir.
- Formülasyonlara IL-2 ile yüklemede, hazırlanan ilaç taşıyıcı sistemlerinde herhangi bir faz ayrışmasına ve geçimsizliğe neden olmamıştır. Sonuçlarda

istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir ($p>0,05$). Böylece in siliko sonuçların in vitro çalışmalarla uyumlu hale geldiği kanıtlanmıştır.

- Formülasyonlar damlacık boyutu, PDİ, viskozite, morfoloji, viskozite ve stabilite çalışmaları ile karakterize edilmiştir. F1 ve F2 formülasyonlarının zeta potansiyel değerleri karşılaştırıldığında F2'nin daha stabil olduğu görülmüştür.
- Aprotinin içeren F2-IL-2 TEM görüntüleri incelendiğinde damlacıkların küreselliği kanıtlanmıştır.
- Geliştirilen F2 formülasyonu, damlacık boyutu, zeta potansiyeli ve termodinamik stabilitesi açısından optimize edilmiş ve stabil bir formülasyon olarak F1 formülasyonuna göre daha uygun bulunmuştur.
- F1 formülasyonu, dondurma-çözme döngüsüne dayanıklı olmadığı ve damlacık boyutunun büyük bir artış gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu, formülasyonun stabilitesini ve biyoyararlanımını etkileyebileceğinden tercih edilmemiştir.
- IL-2 yüklü F2 formülasyonları, ısıtma-soğutma, santrifüj ve dondurma-çözme stres koşullarına dayanıklılık gösterdiği için termodinamik olarak daha stabil bulunmuştur. Bu, F2 formülasyonunun potansiyel olarak daha uygun bir ilaç taşıyıcı sistem olabileceği düşünülmüştür.
- Lenfatik dolaşıma geçiş için 200 nm'nin altındaki damlacık boyutlarının daha uygun olduğu belirtilmiştir. Hazırlanan her iki formülasyonun yaklaşık 200 nm'den küçük damlacık boyutlarına sahip olduğu tespit edilmiş olup bu durumun lenfatik dolaşıma uygunluklarının yanı sıra stabilite ve homojenlik açısından da avantaj sağladığını kanıtlamıştır.
- İn vitro salım çalışmasında diyaliz kaset ile gerçekleştirilen salım sonuçları düşük bulunmuştur. Bu yöntemin formülasyon için uygun olmayacağına karar verilmiş ve deneylere palet yöntemi kullanılarak devam edilmiştir. Aprotinin içeren F2-IL-2 için maksimum salım 4. saatte pH 6,5 FaSSIF ortamında %93,3 ± 3,24 olarak bulunmuştur.
- İn vitro salım çalışması bu tip formülasyonlar için yeterli olmayacağından in vitro lipoliz çalışmaları yürütülmüştür. Aprotinin içeren F2-IL-2 nanoemülsiyon, lipaz varlığında %45 oranında sindirime uğramış ve Kolliphor® EL'nin lipaz erişimini sterik olarak engelleyerek sindirim hızını yavaşlattığı görülmüştür. Bu durum, formülasyonun IL-2'yi gastrointestinal ortamda koruma kapasitesini artırmıştır.

- Hücre kültürü çalışmalarında IL-2 yüklü nanoemülsiyonun biyolojik aktivitesini koruduğu ve antikanser etkinlik sağladığı görülmüştür.
- IL-2 yüklü F2 formülasyonlarının A498 ve PBMC hücre hattında antiproliferatif etkinliğinin konsantrasyon bağlı olduğu görülmüştür.
- Lipit bazlı taşıyıcı sistemlerin, protein/peptit ilaçların oral biyoyararlanımını artırmada potansiyel bir formülasyon yaklaşımı olduğu ve gerçekleştirilen IL-2 için moleküler simülasyona dayalı formülasyon geliştirme çalışmasının bu yaklaşıma katkı sağladığı belirlenmiştir.
- Geliştirilen üretim yönteminin, mikroakışkanlaştırıcı cihazının optimizasyonuyla ölçek büyütme süreçlerinde kullanılabilirliği ve bu teknolojinin protein temelli formülasyonlar için uygun olabileceği düşünülmektedir.

Tez çalışması kapsamında in siliko yaklaşımların kullanılmasıyla formülasyon bileşenlerini seçmek ve biyoteknoloji endüstrisinde nanoteknolojik formülasyon teknolojilerinin araştırma ve geliştirme çalışmalarının uygulanabilirliğini sınırlayan rekombinant protein kullanımıyla ilgili potansiyel maliyetleri azaltmak gibi çeşitli zorlukların aşılmasında yol gösterici olmuştur. Çalışmada geliştirilen F1 ve F2 kodlu nanoemülsiyon formülasyonların hazırlanırken IL-2 yapısı bozulmadan üretilebildiği, gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmalarıyla immünolojik hücreler üzerinde proliferatif etki sağlarken kanser hücreleri üzerinde antiproliferatif etki sağladığı iki ve üç boyutlu yöntemlerle gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarla geliştirilen formülasyonun alternatif bir formülasyon olabileceği ve olası yan etkileri azaltabileceği ön görülmektedir.

Öneriler

- IL-2'nin formülasyondaki uzun dönem stabilitesini daha iyi anlamak için analiz yöntemi kesinleştirilerek stabilite çalışmaları yapılmalıdır.
- Gastrointestinal sistemdeki enzimatik bozulmayı azaltmak için yeni proteaz inhibitörlerinin eklenmesi veya formülasyona mukus geçişini artırıcı maddelerin dahil edilmesi söz konusu olabilir.
- IL-2 yüklü nanoemülsiyonların etkinlik ve güvenlik analizlerinin in vivo hayvan modellerinde de kanıtlanması gerekmektedir.

- Nanoemülsiyon formülasyonlarının, farklı tümör tiplerinde immün hücre göçü ve tümöral penetrasyon üzerindeki etkilerinin in vivo modellerde daha kapsamlı olarak incelenmesi önerilmektedir.
- Farklı tümör tiplerinde uygulanabilirlik ve uzun vadeli immün yanıt etkilerinin detaylı immünolojik çalışmalarla araştırılması gerekmektedir.
- Geliştirilen IL-2 sentez yöntemlerinin optimizasyon ve ölçek büyütme çalışmaları yapılarak biyoteknoloji endüstrisine uygulanabilirliği ileri çalışmalarla değerlendirilebilir.

KAYNAKLAR

Akgün, B. (2022). *Expression, purification, and characterization of recombinant human IL-2*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Moleküler Biyoloji-Genetik ve Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı, İstanbul, 11-18, 31.

Akhtar, J., Siddiqui, H.H., Fareed, S., Badruddeen, Khalid, M., Aqil, M. (2016). Nanoemulsion: for improved oral delivery of repaglinide. *Drug delivery, 23*(6), 2026-2034.

Akhtar, N., Ahmad, M., Khan, H.M.S., Akram, J., Gulfishan, G., Mahmood, A., Uzair, M. (2010). Formulation and characterization of a multiple emulsion containing 1% L-ascorbic acid. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia, 24*(1).

Akhtar, N., Mohammed, S. A., Khan, R. A., Yusuf, M., Singh, V., Mohammed, H. A., Al-Omar, M. S., Abdellatif, A. A., Naz, M., and Khadri, H. (2020). Self-Generating nano-emulsification techniques for alternatively-routed, bioavailability enhanced delivery, especially for anti-cancers, anti-diabetics, and miscellaneous drugs of natural, and synthetic origins. *Journal of Drug Delivery Science and Technology, 58*, 101808.

Akkın, S., Varan, G., Aksüt, D., Malanga, M., Ercan, A., Şen, M., Bilensoy, E. (2022). A different approach to immunochemotherapy for colon cancer: Development of nanoplexes of cyclodextrins and Interleukin-2 loaded with 5-FU. *International Journal of Pharmaceutics*, *623*, 121940.

Aktas, Y., Celik Tekeli, M., Celebi, N. (2020). Development and characterization of exendin-4 loaded self-nanoemulsifying system and in vitro evaluation on Caco-2 cell line. Journal of Microencapsulation, 37(1), 41-51.

Alhamdany, A. T., Saeed, A. M., and Alaayedi, M. (2021). Nanoemulsion and solid nanoemulsion for improving oral delivery of a breast cancer drug: Formulation, evaluation, and a comparison study. *Saudi Pharmaceutical Journal*, *29*(11), 1278-1288

Ali, H.H., Hussein, A.A. (2017). Oral nanoemulsions of candesartan cilexetil: formulation, characterization and in vitro drug release studies. *AAPS Open*, 3, 4.

Ali, F.R., Shoaib, M.H., Ali, S.A., Yousuf, R.I., Siddiqui, F., Raja, R., Jamal, H.S., Saleem, M.T., Ahmeed, K., Imtiaz, M.S., Ahmad, M., Sarfaraz, S., Ahmed, F.R. (2022). A nanoemulsion based transdermal delivery of insulin: Formulation development, optimization, in-vitro permeation across Strat-M® membrane and its pharmacokinetic/pharmacodynamic evaluation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *71*, 103338.

Alliod, O., Almouazen, E., Nemer, G., Fessi, H., Charcosset, C. (2019). Comparison of three processes for parenteral nanoemulsion production: Ultrasounds, microfluidizer, and premix membrane emulsification. *Journal of Pharmaceutical Sciences, 108*(8), 2708-2717.

Aloulou, A., Rodriguez, J. A., Fernandez, S., van Oosterhout, D., Puccinelli, D., and Carrière, F. (2006). Exploring the specific features of interfacial enzymology based on lipase studies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1761*(9), 995-1013.

Amin, A., White, R.L. (2014). Interleukin-2 in renal cell carcinoma: a has-been or a still-viable option?, *Journal of Kidney Cancer and VHL*, *1*(7), 74-83.

Anderson, P.M., Sorenson, M.A. (1994). Effects of route and formulation on clinical pharmacokinetics of interleukin-2. *Clin Pharmacokinet, 27*(1): 19-31.

Arenas-Ramirez, N., Zou, C., Popp, S., Zingg, D., Brannetti, B., Wirth, E., and Boyman, O. (2016). Improved cancer immunotherapy by a CD25-mimobody conferring selectivity to human interleukin-2. *Science translational medicine*, *8*(367), 367ra166-367ra166.

Arkin, M.R., Randal, M., DeLano, W.L., Hyde, J., Luong, T.N., Oslob, J.D., Raphael, D.R., Taylor, L., Wang, J., McDowell, R.S., Wells, J.A., Braisted, A.C. (2003). Binding of small molecules to an adaptive protein–protein interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 100*(4), 1603-1608.

Arnold, Y. E., Imanidis, G., and Kuentz, M. (2012). In vitro digestion kinetics of excipients for lipid-based drug delivery and introduction of a relative lipolysis half life. *Drug Development and Industrial Pharmacy, 38*(10), 1262-1269.

Arsiccio, A., Paladini, A., Pattarino, F., and Pisano, R. (2019). Designing the Optimal Formulation for Biopharmaceuticals: A New Approach Combining Molecular Dynamics and Experiments. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *108*(1), 431–438.

Atkins, M. B. (2006). Cytokine-based therapy and biochemotherapy for advanced melanoma. *Clinical Cancer Research*,12(7 Pt 2):2353s-2358s.

Attama, A. A., Momoh, M. A., and Builders, P. F. (2012). Lipid nanoparticulate drug delivery systems: a revolution in dosage form design and development. *Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems*, *5*, 107-140.

Bak, A., Leung, D., Barrett, S.E., Forster, S., Minnihan, E.C., Leithead, A.W., Crocker, L.S. (2015). Physicochemical and formulation developability assessment for therapeutic peptide delivery—a primer. *The AAPS journal*, *17*(1), 144-155.

Baldo, B. A. (2014). Side effects of cytokines approved for therapy. *Drug Safety*,37(11):921-43.

Bamborough, P., Hedgecock, C. J., and Richards, W. G. (1994). The interleukin-2 and interleukin-4 receptors studied by molecular modelling. *Structure*, *2*(9), 839-851.

Berben, P., Ashworth, L., Beato, S., Bevernage, J., Bruel, J. L., Butler, J., Dressman, J., Schäfer, J., Hutchins, P., Klumpp, L., Mann, J., Nicolai, J., Ojala, K., Patel, S., Powell, S., Rosenblatt, K., Tomaszewska, I., Williams J., and Augustijns,

P. (2019). Biorelevant dissolution testing of a weak base: Interlaboratory reproducibility and investigation of parameters controlling in vitro precipitation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 140, 141-148.

Bernkop-Schnürch, A. and Jalil, A. (2018). Do drug release studies from SEDDS make any sense? *Journal of Controlled Release*, 271, 55-59.

Berthelsen, R., Klitgaard, M., Rades, T., and Müllertz, A. (2019). In vitro digestion models to evaluate lipid based drug delivery systems; present status and current trends. *Advanced Drug Delivery Reviews, 142*, 35-49.

Berthelsen, R., Sassene, P., Rades, T., and Müllertz, A. (2016). Evaluating oral drug delivery systems: Digestion models. *Analytical Techniques in the Pharmaceutical Sciences*, 773-790.

Boyman, O., Arenas-Ramirez, N. (2019). Development of a novel class of interleukin-2 immunotherapies for metastatic cancer. *Swiss Medical Weekly*, *149*(0304), w14697-w14697.

Buya, A. B., Beloqui, A., Memvanga, P. B., and Préat, V. (2020). Self-nano-emulsifying drug-delivery systems: From the development to the current applications and challenges in oral drug delivery. *Pharmaceutics, 12*(12), 1194.

Capitanio, U., Bensalah, K., Bex, A., Boorjian, S. A., Bray, F., Coleman, J., Gore, J.L., Sun, M., Wood, C., Russo, P. (2019). Epidemiology of renal cell carcinoma. *European Urology, 75*(1), 74-84.

Carrière, F. (2016). Impact of gastrointestinal lipolysis on oral lipid-based formulations and bioavailability of lipophilic drugs. *Biochimie, 125*, 297-305.

Chakraborty, S., Shukla, D., Mishra, B., and Singh, S. (2009). Lipid–an emerging platform for oral delivery of drugs with poor bioavailability. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, *73*(1), 1-15.

Charych, D. H., Hoch, U., Langowski, J. L., Lee, S. R., Addepalli, M. K., Kirk, P. B., and Doberstein, S. K. (2016). NKTR-214, an engineered cytokine with biased IL2 receptor binding, increased tumor exposure, and marked efficacy in mouse tumor models. *Clinical Cancer Research, 22*(3), 680-690.

Chen, G., Huang, K., Miao, M., Feng, B., and Campanella, O. H. (2019). Molecular Dynamics Simulation for Mechanism Elucidation of Food Processing and Safety: State of the Art. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, *18*(1), 243–263.

Chen, M.-L. (2008). Lipid excipients and delivery systems for pharmaceutical development: a regulatory perspective. *Advanced Drug Delivery Reviews, 60*(6), 768-777.

Cheng, M.B., Wang, J.C., Li, Y.H., Liu, X.Y., Zhang, X., Chen, D.W., Zhou, S.F., Zhang, Q. (2008). Characterization of water-in-oil microemulsion for oral

delivery of earthworm fibrinolytic enzyme. *Journal of Controlled Release*, *129*(1), 41-48.

Chou, T.H., Nugroho, D.S., Chang, J.Y., Cheng, Y.S., Liang, C.H., Deng, M. J. (2021). Encapsulation and characterization of nanoemulsions based on an anti-oxidative polymeric amphiphile for topical apigenin delivery. *Polymers*, *13*(7), 1016.

Christophersen, P. C., Christiansen, M. L., Holm, R., Kristensen, J., Jacobsen, J., Abrahamsson, B., and Müllertz, A. (2014). Fed and fasted state gastro-intestinal in vitro lipolysis: In vitro in vivo relations of a conventional tablet, a SNEDDS and a solidified SNEDDS. *European Journal of Pharmaceutical Sciences, 57*, 232-239.

Christophersen, P., Zhang, L., Yang, M., Nielsen, H.M., Müllertz, A., Mu, H. (2013). Solid lipid particles for oral delivery of peptide and protein drugs I–elucidating the release mechanism of lysozyme during lipolysis, *European Journal of Pharmaceutics Biopharmaceutics*, *85*(3), 473-480.

Christophersen, P.C., Zhang, L., Müllertz, A., Nielsen, H.M., Yang, M., Mu, H. (2014). Solid lipid particles for oral delivery of peptide and protein drugs II–the digestion of trilaurin protects desmopressin from proteolytic degradation. *Pharmaceutical Research*, *31*(9), 2420-2428.

Collins, L., Tsien, W.H., Seals, C., Hakimi, J., Weber, D., Bailon, P., Hoskings, J., Greene, W.C., Toome, V., Ju, G. (1988). Identification of specific residues of human interleukin 2 that affect binding to the 70-kDa subunit (p70) of the interleukin 2 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *85*(20), 7709-7713.

Conlon, K.C., Miljkovic, M.D., Waldmann, T.A. (2019). Cytokines in the treatment of cancer. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, *39*(1), 6-21.

Cuine, J. F., McEvoy, C. L., Charman, W. N., Pouton, C. W., Edwards, G. A., Benameur, H., and Porter, C. J. (2008). Evaluation of the impact of surfactant digestion on the bioavailability of danazol after oral administration of lipidic self-emulsifying formulations to dogs. *Journal of pharmaceutical sciences, 97*(2), 995-1012.

Çelik-Tekeli, M. (2020). *Tip 2 Diyabet Tedavisinde Kullanılmak Üzere Oral Yolla Uygulanacak Protein/Peptit İçeren Kendiliğinden Emülsifiye Olan Nanoformülasyonunun Geliştirilmesi, İn Vitro/İn Vivo Değerlendirilmesi*, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Ensitüsü, Ankara,129, 177-178.

Çilek, A. (2008). *İnterlökin 2'nin Pulmoner Yoldan Uygulanabilecek Lipozom Formülasyonunun Geliştirilmesi ve İn Vitro-İn Vivo Değerlendirilmesi*, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Ensitüsü, Ankara.

Dahan, A. and Hoffman, A. (2008). Rationalizing the selection of oral lipid based drug delivery systems by an in vitro dynamic lipolysis model for improved oral

bioavailability of poorly water soluble drugs. *Journal of Controlled Release, 129*(1), 1-10.

Date, A. A., Desai, N., Dixit, R., and Nagarsenker, M. (2010). Self-nanoemulsifying drug delivery systems: formulation insights, applications and advances. *Nanomedicine, 5*(10), 1595-1616.

Dehghan, R., Beig Parikhani, A., Zeinali, S., Shokrgozar, M., Amanzadeh, A., Ajdary, S., Cohan, R.A, Talebkhan, Y., Behdani, M. (2022). Efficacy and antitumor activity of a mutant type of interleukin 2. *Scientific reports, 12*(1), 1-7.

Deo, V. K., Kato, T., and Park, E. Y. (2016). Virus-like particles displaying recombinant short-chain fragment region and interleukin 2 for targeting colon cancer tumors and attracting macrophages. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *105*(5), 1614–1622.

DiPaola, R. S. (2002). Silibinin strongly synergizes human prostate carcinoma DU145 cells to doxorubicin-induced growth inhibition, G2-M arrest, and apoptosis. *Clinical Cancer Research, 8*(11), 3311-3314.

Diril, M., Yıldız-Türkyılmaz, G., and Karasulu, H. Y. (2019). Formulation and In Vitro Evaluation of Self Microemulsifying Drug Delivery System Containing Atorvastatin Calcium. *Current Drug Delivery*, *16*(8), 768-779.

Donohue, J. H., Rosenberg, S. A. (1983). The fate of interleukin-2 after in vivo administration. *Journal of Immunology*, *130*(5):2203-8.

Dressman, J. B., Berardi, R. R., Dermentzoglou, L. C., Russell, T. L., Schmaltz, S. P., Barnett, J. L., and Jarvenpaa, K. M. (1990). Upper gastrointestinal (GI) pH in young, healthy men and women. *Pharmaceutical Research, 7*, 756-761.

Dumont, C., Bourgeois, S., Fessi, H., Jannin, V. (2018). Lipid-based nanosuspensions for oral delivery of peptides, a critical review.*International Journal of Pharmaceutics*, *541*(1-2), 117-135.

Ejskjær, L., O'Dwyer, P. J., Ryan, C. D., Holm, R., Kuentz, M., Box, K. J., and Griffin, B. T. (2024). Developing an in vitro lipolysis model for real-time analysis of drug concentrations during digestion of lipid-based formulations. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 194, 106681.

Eurodiagnostico. (2024). *LDH-Cytotoxicity Assay Kit (Catalog #K311-400)*. https://www.eurodiagnostico.com/media/pdf/K311.pdf, Son erişim tarihi: 09.12.2024.

Faiz Afzal, M.A., Lehmkemper, K., Sobich, E., Hughes, T.F., Giesen, D.J., Zhang, T., Krauter, C.M., Winget, P., Degenhardt, M., Kyerematen, S.O., Browning, A.R., Shelley, J. C. (2021). Molecular-level examination of amorphous solid dispersion dissolution. *Molecular Pharmaceutics*, *18*(11), 3999-4014.

Fatouros, D. G., Deen, G. R., Arleth, L., Bergenstahl, B., Nielsen, F. S., Pedersen, J. S., and Mullertz, A. (2007). Structural development of self nano emulsifying

drug delivery systems (SNEDDS) during in vitro lipid digestion monitored by small-angle X-ray scattering. *Pharmaceutical Research, 24*, 1844-1853.

Feeney, O. M., Crum, M. F., McEvoy, C. L., Trevaskis, N. L., Williams, H. D., Pouton, C. W., Charman, W. N., Bergström, C. A., and Porter, C. J. (2016). 50 years of oral lipid-based formulations: provenance, progress and future perspectives. *Advanced Drug Delivery Reviews, 101*, 167-194.

Fernandez, S., Rodier, J.-D., Ritter, N., Mahler, B., Demarne, F., Carrière, F., and Jannin, V. (2008). Lipolysis of the semi-solid self-emulsifying excipient Gelucire® 44/14 by digestive lipases. *Biochimica et Biophysica Acta -Molecular Cell Biology of Lipids, 1781*(8), 367-375.

Fernandez-Lafuente, R. (2010). Lipase from Thermomyces lanuginosus: uses and prospects as an industrial biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 62(3-4), 197-212.

Fitzgerald, A.A., Li, E., Weiner, L.M. (2020). 3D culture systems for exploring cancer immunology. *Cancers*, *13*(1), 56.

Gallagher, W. (2009). FTIR analysis of protein structure. *Course manual Chem*, *455*.

G-Biosciences. (2017). *Detergents and their role in successful SDS-PAGE electrophoresis*. https://info.gbiosciences.com/blog/detergents-and-their-role-in-successful-sds-page-electrophoresis. Son erişim tarihi: 03.11. 2024

Gillis, S., Baker, P. E., Ruscetti, F. W., Smith, K. A. (1978). Long-term culture of human antigen-specific cytotoxic T-cell lines. *J Exp Med*, *148*(4), 1093-1098.

Gopal, G.J., Kumar, A. (2013). Strategies for the production of recombinant protein in Escherichia coli. *The Protein Journal, 32*(6), 419-425.

Goryacheva, E. A., Artemyev, I. V., Pletneva, N. V., and Pletnev, V. Z. (2023). Three-dimensional structure of fab fragment of monoclonal antibody LNKB-2 complexed with antigenic nonaptide from human interleukin-2. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, *49*(1), 81-85.

Gurpreet, K., Singh, S. K. (2018). Review of Nanoemulsion Formulation and Characterization Techniques. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 80*(5), 781–789.

Gülbağ Pınar, S. (2020). *Siklosporinin yeni oral nanoformülasyonunun geliştirilmesi ve in vitro/in vivo değerlendirilmesi*, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Ensitüsü, Ankara.

Gürsoy, R. N. and Benita, S. J. (2004). Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. *Biomedicine Pharmacotherapy, 58*(3), 173-182.

Gürsoy, R.N., Çevik, Ö. (2011). Kendiliğinden emülsifiye olabilen İlaç taşıyıcı sistemler ve farmasötik alanda uygulamaları. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, *31*(2), 151-170.

Haddadzadegan, S., Dorkoosh, F., and Bernkop-Schnürch, A. (2022). Oral delivery of therapeutic peptides and proteins: Technology landscape of lipid-based nanocarriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *182*, 114097.

Hamzeloo, M. M., Taiebi, N., Mosaddegh, M., Eslami, T. B., and Esmaeili, S. (2014). The effect of some cosolvents and surfactants on viability of cancerous cell lines. *Research Journal of Pharmacognosy*.

Han, G., Noh, D., Lee, H., Lee, S., Kim, S., Yoon, H. Y., Lee, S. H. (2023). Advances in mRNA therapeutics for cancer immunotherapy: from modification to delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 114973.

Hassan, A.K. (2015). Effective Surfactants Blend Concentration Determination for O/W Emulsion Stabilization by Two Nonionic Surfactants by Simple Linear Regression. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 77*(4):461-9.

Hintzen, F., Perera, G., Hauptstein, S., Müller, C., Laffleur, F., and Bernkop-Schnürch, A. (2014). In vivo evaluation of an oral self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) for leuprorelin. *International Journal of Pharmaceutics*, 472(1-2), 20- 26.

Hiemstra, C., Zhong, Z., Van Tomme, S.R., van Steenbergen, M.J., Jacobs, J.J., Den Otter, W., Feijen, J. (2007). In vitro and in vivo protein delivery from in situ forming poly (ethylene glycol)–poly (lactide) hydrogels. *Journal of Controlled Release, 119*(3), 320-327.

Hsu, C. Y., Pallathadka, H., Jasim, S. A., Rizaev, J., Olegovich, B. D., Hjazi, A., and Jawad, M. A. (2024). Innovations in Cancer Immunotherapy: A Comprehensive Overview of Recent Breakthroughs and Future Directions. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 104588.

Huang, C.J., Lin, H., Yang, X. (2012). Industrial production of recombinant therapeutics in Escherichia coli and its recent advancements. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 39*(3), 383-399.

Huang, Y., Yu, Q., Chen, Z., Wu, W., Zhu, Q., and Lu, Y. (2021). In vitro and in vivo correlation for lipid-based formulations: Current status and future perspectives. *Acta Pharmaceutica Sinica B, 11*(8), 2469-2487.

Hyde, J., Braisted, A. C., Randal, M., and Arkin, M. R. (2003). Discovery and characterization of cooperative ligand binding in the adaptive region of interleukin-2. *Biochemistry*, *42*(21), 6475-6483.

Incecayir, T., Ilbasmis-Tamer, S., Tirnaksiz, F., and Degim, T. (2016). Assessment of the potential drug-drug interaction between carvedilol and clopidogrel mediated through intestinal P-glycoprotein. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences, 71*(8), 472-477.

İnternet: Brenke, R., Jehle, S., Vajda, S., Allen, K.N., Kozakov, D. (2014). Small molecular fragments bound to binding energy hot-spot in crystal contact interface of Interleukin-2. Web: https://www.rcsb.org/structure/4NEJ adresinden 14 Aralık 2024'te alınmıştır.

İnternet: Corning Incorporated. (2024). Corning Matrigel Matrix. Web: https://www.corning.com/worldwide/en/products/life-sciences/products/surfaces/matrigel-matrix.html adresinden 9 Aralık 2024'te alınmıştır.

İnternet: IARC, Cancer Today - Cancer Fact Sheets- Kidney Fact Sheet 2020. Web: https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/29-Kidney-fact-sheet.pdf, adresinden 8 Mart 2022'de alınmıştır.

İnternet: Immunocore. (*Immunocore announces clinical trial collaboration with Sanofi to evaluate Sanofi's product candidate SAR444245 (non-alpha IL-2) in combination with KIMMTRAK in patients with metastatic cutaneous melanoma.* Immunocore. Web: https://www.immunocore.com/investors/news/press-releases/detail/36/immunocore-announces-clinical-trial-collaboration-with-sanofi-to-evaluate-sanofis-product-candidate-sar444245-non-alpha-il-2-in-combination-with-kimmtrak-in-patients-with-metastatic-cutaneous-melanoma. Adresinden 30 Aralık 2024'te alınmıştır.

İnternet: International Agency for Research on Cancer (IARC) (2024). Cancer Today 2024. Web: https://gco.iarc.who.int/today/en/dataviz/bars?mode=cancer&key=total&group_populations=1&types=0&sort_by=value0&populations=900&multiple_populations=0&values_position=out&cancers_h=39&sexes=1, adresinden 18 Haziran 2024'te alınmıştır.

İnternet: International Agency for Research on Cancer (IARC) (2024). Cancer Today – All Cancers Fact Sheets 2024. Web: https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/cancers/39-all-cancers-fact-sheet.pdf, adresinden 18 Haziran 2024'te alınmıştır.

İnternet: Merck & Co. (2021). Merck to acquire Pandion Therapeutics. Web: https://www.merck.com/news/merck-to-acquire-pandion-therapeutics/. Adresinden 30 Aralık 2024'te alınmıştır.

İnternet: Microfluidics. (2010). Web: https://www.microfluidicscorp.com/2010. Adresinden 30 Aralık 2022'de alınmıştır.

İnternet: National Cancer Institute (NCI) (2024). Types of Cancer Treatment. Web: https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types adresinden 19 Haziran 2024'te alınmıştır.

İnternet: Nektar Therapeutics. (2017). *Nektar presents new preclinical data on NKTR-358, a first-in-class IL-2 therapy*. Nektar Therapeutics. Web: https://ir.nektar.com/news-releases/news-release-details/nektar-presents-

new-preclinical-data-nktr-358-first-class. Adresinden 30 Aralık 2024'te alınmıştır.

İnternet: Nektar Therapeutics. (2018). *Nektar Therapeutics presents new clinical and preclinical data*. Nektar Therapeutics. Web: https://ir.nektar.com/news-releases/news-release-details/nektar-therapeutics-presents-new-clinical-and-preclinical-data. Adresinden 30 Aralık 2024'te alınmıştır.

İnternet: PDQ® Adult Treatment Editorial Board. PDQ Renal Cell Cancer Treatment. Bethesda, MD: National Cancer Institute. [PMID: 26389448] Güncellenme tarihi: 17/12/2021. Web: https://www.cancer.gov/types/kidney/patient/kidney-treatment-pdq, adresinden 8 Mart 2022'de alınmıştır.

İnternet: Proleukin® Kullanım Talimatı, Novartis. https://www.novartis.com.tr/sites/www.novartis.com.tr/files/Prolekin_KT_14.03.2019.pdf 2010 adresinden 8 Mart 2022'de alınmıştır.

İnternet: Sanofi. (2021). *Sanofi announces collaboration with Immunocore to evaluate SAR444245 (non-alpha IL-2) in combination with KIMMTRAK in patients with metastatic cutaneous melanoma. Sanofi.* Web: https://www.sanofi.com/en/media-room/press-releases/2021/2021-04-09-04-01-00-2207165. Adresinden 30 Aralık 2024'te alınmıştır.

İnternet: TİTCK, Ruhsatlı Ürünler Listesi- 01.07.2022. Web: https://titck.gov.tr/storage/Archive/2022/dynamicModulesAttachment/RuhsatlrnlerListesi01.07.2022_1f99ec90-7dbc-41fd-b653-be2565973c59.xlsx adresinden 19 Eylül 2022'de alınmıştır.

İnternet: World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research (WCRF). Kidney cancer: How diet, nutrition and physical activity affect kidney cancer risk. Web: https://www.wcrf.org/dietandcancer/kidney-cancer 5 Haziran 2020'de alınmıştır.

İnternet: Worldwide Cancer Research Fund International (WCRF) (2024) Cancer trends - Worldwide cancer data. Web: https://www.wcrf.org/cancer-trends/worldwide-cancer-data/ adresinden 18 Haziran 2024'te alınmıştır.

Jensen, C., Teng, Y. (2020). Is it time to start transitioning from 2D to 3D cell culture? *Frontiers in Molecular Biosciences*, *7*, 33.

Jiang, T., Zhou, C., Ren, S. (2016). Role of IL-2 in cancer immunotherapy. *Oncoimmunology*. *5*(6):e1163462.

Jorgensen, L., Martins, S., and van de Weert, M. (2009). Analysis of protein physical stability in lipid based delivery systems—the challenges of lipid drug delivery systems. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, *5*(4), 401-408.

Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., and Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, *596*(7873), 583-589.

Kallakunta, V.R., Bandari, S., Jukanti, R., and Veerareddy, P.R. (2012). Oral self emulsifying powder of lercanidipine hydrochloride: Formulation and evaluation. *Powder Technology, 221*, 375-382.

Kalepu, S., Manthina, M., and Padavala, V. (2013). Oral lipid-based drug delivery systems–an overview. *Acta Pharmaceutica Sinica B, 3*(6), 361-372.

Kanaoka, E., Takahashi, K., Yoshikawa, T., Jizomoto, H., Nishihara, Y., Hirano, K. (2001). A novel and simple type of liposome carrier for recombinant interleukin-2. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *53*(3), 295-302.

Kanwal, T., Rehman, K., Hamid, H. M., Shuja, A. A., Saifullah, S., Ahmed, T., Hasnain, M., Simjee, S. U., and Shah, M. R. (2023). A novel cationic arginine-modified Self-Nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) for improved anticancer and antioxidant activities of Naringin. *Journal of Molecular Liquids, 391*, 123235.

Karakus, U., Sahin, D., Mittl, P. R., Mooij, P., Koopman, G., and Boyman, O. (2020). Receptor-gated IL-2 delivery by an anti-human IL-2 antibody activates regulatory T cells in three different species. *Science translational medicine*, *12*(574), eabb9283.

Kawakami, K., Yoshikawa, T., Hayashi, T., Nishihara, Y., and Masuda, K. (2002). Microemulsion formulation for enhanced absorption of poorly soluble drugs: II. In vivo study. *Journal of Controlled Release, 81*(1-2), 75-82.

Khan, M. A., Ullah, K., ur Rahman, N., Mahmood, A., Müllertz, A., Mannan, A., Murtaza, G., and Khan, S. A. (2022). Formulation, characterization and in-vitro evaluation of self-nanoemulsifying drug delivery system containing rhamnolipid biosurfactant. *Journal of Drug Delivery Science and Technology, 75*, 103673.

Kim, J., Lee, J. Y., Park, S. Y., Lee, Y. J., and Kim, M. S. (2021). Crystal structure of human interleukin-2 in complex with TCB2, a new antibody-drug candidate with antitumor activity. *Oncoimmunology*, *10*(1), 1899671.

Klein, C., Waldhauer, I., Nicolini, V., Dunn, C., Freimoser-Grundschober, A., Danny, G., and Umana, P. (2013). Novel tumor-targeted, engineered IL-2 variant (IL2v)-based immunocytokines for immunotherapy of cancer. *Blood*, *122*(21), 2278.

Klein, C., Waldhauer, I., Nicolini, V. G., Freimoser-Grundschober, A., Nayak, T., Vugts, D. J., and Umaña, P. (2017). Cergutuzumab amunaleukin (CEA-IL2v), a CEA-targeted IL-2 variant-based immunocytokine for combination cancer immunotherapy: Overcoming limitations of aldesleukin and conventional IL-2-based immunocytokines. *Oncoimmunology*, *6*(3), e1277306.

Klein, S. (2010). The use of biorelevant dissolution media to forecast the in vivo performance of a drug. *AAPS PharmaSciTech, 12*(3), 397-406.

Klitgaard, M., Müllertz, A., and Berthelsen, R. (2021). Estimating the oral absorption from self-nanoemulsifying drug delivery systems using an in vitro lipolysis-permeation method. *Pharmaceutics, 13*(4), 489.

Kmiecik, S., Gront, D., Kolinski, M., Wieteska, L., Dawid, A. E., and Kolinski, A. (2016). Coarse-grained protein models and their applications. *Chemical reviews*, *116*(14), 7898-7936.

Koçancı, F.G., Aslım, B. (2019). Üç boyutlu hücre kültürü modelleri ve uygulamaları. İlaç Araştırma, Geliştirme ve Toksikolojik Çalışmalarda Kullanılan Alternatif Yöntemler. *Türkiye Klinikleri*, 8-14.

Koren, S., Fleischmann Jr, W.R. (1994). Modulation of peripheral leukocyte counts and bone marrow function in mice by oral administration of interleukin-2. *Journal of Interferon Research*, *14*(6), 343-347.

Kossena, G. A., Charman, W. N., Wilson, C. G., O'Mahony, B., Lindsay, B., Hempenstall, J. M., Davison, C. L., Crowley, P. J., and Porter, C. J. (2007). Low dose lipid formulations: effects on gastric emptying and biliary secretion. *Pharmaceutical Research, 24*, 2084-2096.

Kuentz, M. (2012). Lipid-based formulations for oral delivery of lipophilic drugs. *Drug Discovery Today: Technologies, 9*(2), e97-e104.

Kusuma, T.M., Nugroho, A.K., Martien, R., Julia, M. (2022). A review of potential double emulsion formula for recombinant human erythropoietin per oral. *Research Journal of Pharmacy and Technology, 15*(5), 2381-2388.

Lamaisakul, S., Tantituvanont, A., Lipipun, V., and Ritthidej, G. (2019). Development ofnovel cationic microemulsion as parenteral adjuvant for influenza vaccine. *AsianJournal of Pharmaceutical Sciences*, 20, 58.

Larsen, A. T., Sassene, P., and Müllertz, A. (2011). In vitro lipolysis models as a tool for the characterization of oral lipid and surfactant based drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics, 417*(1-2), 245-255.

Larsen, A., Holm, R., Pedersen, M. L., and Müllertz, A. (2008). Lipid-based formulations for danazol containing a digestible surfactant, Labrafil M2125CS: in vivo bioavailability and dynamic in vitro lipolysis. *Pharmaceutical Research, 25*, 2769-2777.

Levin, A.M., Bates, D. L., Ring, A.M., Krieg, C., Lin, J.T., Su, L., Morago,I., Raeber, M.E., Bowman, G.R., Novick, P., Pande, V.S., Fathman, C.G., Boyman, O., Garcia, K.C. (2012). Exploiting a natural conformational switch to engineer an interleukin-2 'superkine'. Nature, 484(7395), 529-533.

Li, L., Zhou, C. H., and Xu, Z. P. (2019). Self-nanoemulsifying drug-delivery system and solidified self-nanoemulsifying drug-delivery system. In S.S. Mohapatra, S. Ranjan, N. Dasgupta, R. K. Mishra, and Thomas S. (Eds.), *Nanocarriers for drug delivery*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, pp. 421-449.

Li, P., Tan, A., Prestidge, C.A., Nielsen, H.M., and Müllertz, A. (2014). Self-nanoemulsifying drug delivery systems for oral insulin delivery: in vitro and in vivo evaluations of enteric coating and drug loading. *International Journal of Pharmaceutics*, *477*(1-2), 390-398.

Liu, W., Wang, W., Wang, X., Xu, C., Zhang, N., Di, W. (2020). Cisplatin-stimulated macrophages promote ovarian cancer migration via the CCL20-CCR6 axis. *Cancer letters*, *472*, 59-69.

Llinares, R., Santos, J., Trujillo-Cayado, L.A., Ramírez, P., Muñoz, J. (2018). Enhancing rosemary oil-in-water microfluidized nanoemulsion properties through formulation optimization by response surface methodology, *LWT*, *97*, 370-375.

Lopes, J. E., Fisher, J. L., Flick, H. L., Wang, C., Sun, L., Ernstoff, M. S., and Losey, H. C. (2020). ALKS 4230: a novel engineered IL-2 fusion protein with an improved cellular selectivity profile for cancer immunotherapy. *Journal for immunotherapy of cancer*, *8*(1).

Lykhopiy, V., Malviya, V., Humblet-Baron, S., and Schlenner, S. M. (2023). IL-2 immunotherapy for targeting regulatory T cells in autoimmunity. *Genes & Immunity*, *24*(5), 248-262.

Macleod, L. C., Hotaling, J. M., Wright, J. L., Davenport, M. T., Gore, J. L., Harper, J., White, E. (2013). Risk factors for renal cell carcinoma in the VITAL study. *The Journal of urology*, *190*(5), 1657-1661.

Mahdavifar, N., Mohammadian, M., Ghoncheh, M., Salehiniya, H. (2018). Incidence, mortality and risk factors of kidney cancer in the world, *World Cancer Research Journal*, *5*(1), 1-9.

Mahmood, A. and Bernkop-Schnürch, A. (2019). SEDDS: A game changing approach for the oral administration of hydrophilic macromolecular drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews, 142*, 91-101.

Maliszewska-Olejniczak, K., Brodaczewska, K.K., Bielecka, Z.F., Czarnecka, A.M. (2018). Three-dimensional cell culture model utilization in renal carcinoma cancer stem cell research. *In Epithelial Cell Culture*, 47-66. Humana Press, New York, NY.

Mármol, Á. L., Fischer, P. L., Wahl, A., Schwöbel, D., Lenz, V., Sauer, K., and Koziolek, M. (2022). Application of tiny-TIM as a mechanistic tool to investigate the in vitro performance of different itraconazole formulations under physiologically relevant conditions. *European Journal of Pharmaceutical Sciences, 173*, 106165.

Mason, T.G., Wilking, J.N., Meleson, K., Chang, C.B., Graves, S.M. (2006). Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. *Journal of Physics: Condensed Matter, 18*(41), 635-666.

McClements, D. J. and Li, Y. (2010). Review of in vitro digestion models for rapid screening of emulsion-based systems. *Food Function, 1*(1), 32-59.

McHugh, M. D., Park, J., Uhrich, R., Gao, W., Horwitz, D. A., Fahmy, T. M. (2015). Paracrine co-delivery of TGF-beta and IL-2 using CD4-targeted nanoparticles for induction and maintenance of regulatory T cells. *Biomaterials*, *59*:172-81.

McKay, D. B. (1992). Response: Unraveling the Structure of IL-2. *Science*, *257*(5068), 412-413.

Mehrdadi S. (2024). Lipid-Based nanoparticles as oral drug delivery systems: Overcoming poor gastrointestinal absorption and enhancing bioavailability of peptide and protein therapeutics. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, *14*(1), 48–66.

Mogensen, J. E., Sehgal, P., and Otzen, D. E. (2005). Activation, inhibition, and destabilization of Thermomyces lanuginosus lipase by detergents. *Biochemistry*, *44*(5), 1719-1730.

Moghaddasi, F., Housaindokht, M. R., Darroudi, M., Bozorgmehr, M. R., and Sadeghi, A. (2018). Soybean oil-based nanoemulsion systems in absence and presence of curcumin: Molecular dynamics simulation approach. *Journal of Molecular Liquids*, *264*, 242-252.

Mohsen, K., Azzazy, H. M., Allam, N. K., and Basalious, E. B. (2020). Intranasal lipid nanocapsules for systemic delivery of nimodipine into the brain: In vitro optimization and in vivo pharmacokinetic study. *Materials Science and Engineering: C*, *116*, 111236.

Momoh, M.A., Franklin, K.C., Agbo, C.P., Ugwu, C.E., Adedokun, M.O., Anthony, O.C., Chidozie, O.E., Okorie, A.N. (2020). Microemulsion-based approach for oral delivery of insulin: formulation design and characterization. *Heliyon, 6*(3), e03650.

Mott, H. R., Baines, B. S., Hall, R. M., Cooke, R. M., Driscoll, P. C., Weir, M. P., and Campbell, I. D. (1995). The solution structure of the F42A mutant of human interleukin 2. *Journal of molecular biology*, *247*(5), 979-994.

Mountfield, R. J., Senepin, S., Schleimer, M., Walter, I., and Bittner, B. (2000). Potential inhibitory effects of formulation ingredients on intestinal cytochrome P450. *International Journal of Pharmaceutics, 211*(1-2), 89-92.

Mu, H., Holm, R., and Müllertz, A. (2013). Lipid-based formulations for oral administration of poorly water-soluble drugs. *International Journal of Pharmaceutics, 453*(1), 215-224.

Muhammad, S., Fan, T., Hai, Y., Gao, Y., and He, J. (2023). Reigniting hope in cancer treatment: the promise and pitfalls of IL-2 and IL-2R targeting strategies. *Molecular Cancer*, *22*(1), 121.

Müllertz, A., Ogbonna, A., Ren, S., and Rades, T. (2010). New perspectives on lipid and surfactant based drug delivery systems for oral delivery of poorly soluble drugs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology, 62*(11), 1622-1636.

Narwani, T. J., Etchebest, C., Craveur, P., Léonard, S., Rebehmed, J., Srinivasan, N., and de Brevern, A. G. (2019). In silico prediction of protein flexibility with local structure approach. *Biochimie*, *165*, 150-155.

Navai, N., Wood, C. G. (2012). Environmental and modifiable risk factors in renal cell carcinoma. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, *30*(2), 220-224.

Nazlı, H., Mesut, B., and Özsoy, Y. (2021). In vitro evaluation of a solid supersaturated self nanoemulsifying drug delivery system (Super-SNEDDS) of aprepitant for enhanced solubility. *Pharmaceuticals, 14*(11), 1089.

Nelson, E. C., Evans, C. P., Lara Jr, P. N. (2007). Renal cell carcinoma: current status and emerging therapies. *Cancer treatment reviews, 33*(3), 299-313.

Nicolaides, E., Symillides, M., Dressman, J. B., and Reppas, C. (2001). Biorelevant dissolution testing to predict the plasma profile of lipophilic drugs after oral administration. *Pharmaceutical Research, 18*, 380-388.

Nishioka, Y., Yoshino, H. (2001). Lymphatic targeting with nanoparticulate system. *Advanced drug delivery reviews*, *47*(1), 55-64.

Niu, Z., Conejos-Sánchez, I., Griffin, B. T., O'Driscoll, C. M., and Alonso, M. J. (2016). Lipid-based nanocarriers for oral peptide delivery. *Advanced drug delivery reviews*, *106*, 337-354.

O'Driscoll, C. M. (2002). Lipid-based formulations for intestinal lymphatic delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences, 15*(5), 405-415.

Olğaç, S., İnceçayır, T., Teksin, Z.Ş. (2021a). Production of different nanoemulsions with high energy method for oral drug delivery. *12th PBP World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology*, 11-14 Mayıs, Çevrimiçi Konferans (Poster).

Olğaç, S., Olğaç, A., İnceçayır, T., Teksin, Z.Ş. (2021b). Structure-guided selection of suitable nanoemulsion formulation components for a recombinant form of human Interleukin-2 (Aldesleukin). *3rd International Gazi Pharma Symposium Series (GPSS-2021),* 8-10 Eylül 2021, Çevrimiçi Konferans (Poster).

Ouyang, D., Smith, S.C. (2015). Computational Pharmaceutics: Application of molecular modeling in drug delivery. *John Wiley & Sons Ltd*.

Park, J., Wrzesinski, S., Stern, E. Look, M., Criscione, J., Ragheb, R. (2012). Combination delivery of TGF-β inhibitor and IL-2 by nanoscale liposomal polymeric gels enhances tumour immunotherapy. *Nature Materials*, 11, 895–905.

Patel, S.K., Patrick, M.J., Pollock, J.A., Janjic, J.M. (2013). Two-color fluorescent (ear-infrared and visible) triphasic perfluorocarbon nanoemuslions. *Journal of biomedical optics*, *18*(10), 101312.

Patel, V., Lalani, R., Bardoliwala, D., Ghosh, S., Misra, A. (2018). Lipid-based oral formulation strategies for lipophilic drugs. *AAPS PharmSciTech*, *19*(8), 3609-3630.

Patil, P., Patil, V., and Paradkar, A. (2007). Formulation of a self-emulsifying system for oral delivery of simvastatin: in vitro and in vivo evaluation. *Acta Pharmaceutica Sinica B, 57*(1), 111-122.

Persson, K.H., Blute, I.A., Mira, I.C., Gustafsson, J. (2014). Creation of well-defined particle stabilized oil-in-water nanoemulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *459*, 48-57.

Phan, S., Salentinig, S., Hawley, A., and Boyd, B. J. (2015). Immobilised lipase for in vitro lipolysis experiments. *Journal of pharmaceutical sciences*, 104(4), 1311-1318.

Pirhadi, S., Amani, A. (2020). Molecular dynamics simulation of self-assembly in a nanoemulsion system. *Chem. Pap*., *74*, 2443–2448.

Pisal, D. S., Kosloski, M. P., and Balu-Iyer, S. V. (2010). Delivery of therapeutic proteins. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *99*(6), 2557–2575. https://doi.org/10.1002/jps.22054

Polat, E. (2020). Üç boyutlu hücre kültürü sistemlerine güncel yaklaşımlar. *Namık Kemal Tıp Dergisi*, *8*(1): 84 – 92.

Porter, C. J. and Charman, W. N. (2001(a)). In vitro assessment of oral lipid based formulations. *Advanced drug delivery reviews*, 50, S127-S147.

Porter, C. J. and Charman, W. N. (2001(b)). Intestinal lymphatic drug transport: an update. *Advanced Drug Delivery Reviews, 50*(1-2), 61-80.

Porter, C. J., Pouton, C. W., Cuine, J. F., and Charman, W. N. (2008). Enhancing intestinal drug solubilisation using lipid-based delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews, 60*(6), 673-691.

Porter, C. J., Trevaskis, N. L., and Charman, W. N. (2007). Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. *Nature Reviews Drug Discovery, 6*(3), 231-248.

Pouton, C. W. (1997). Formulation of self-emulsifying drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews, 25*(1), 47-58.

Pouton, C. W. (2000). Lipid formulations for oral administration of drugs: non-emulsifying, self-emulsifying and ‘self-microemulsifying’drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences, 11*, S93-S98.

Pouton, C. W. (2006). Formulation of poorly water-soluble drugs for oral administration: physicochemical and physiological issues and the lipid formulation classification system. *European Journal of Pharmaceutical Sciences, 29*(3-4), 278-287.

Pouton, C. W. and Porter, C. J. (2008). Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: materials, methods and strategies. *Advanced Drug Delivery Reviews, 60*(6), 625-637.

Potong, W., Sookkumnerd, T., Rattanaphanee, P. (2011). Analysis of Phase Transformation of Pure Fatty acids and Its Mixtures by Differential Scanning Calorimetry, *Chemistry*. Corpus ID: 97286512.

Prajapat, M. D., Patel, N. J., Bariya, A., Patel, S. S., and Butani, S. B. (2017). Formulation and evaluation of self-emulsifying drug delivery system for

nimodipine, a BCS class II drug. *Journal of Drug Delivery Science Technology, 39*, 59-68.

Pramil, E., Dillard, C., Escargueil, A.E. (2021). Colorectal Cancer and Immunity: From the Wet Lab to Individuals, *Cancers*, *13*(7), 1713.

Prasad, M., Lambe, U.P., Brar, B., Shah, I., J,M., Ranjan, K., Rao, R., Kumar, S., Mahant, S., Khurana, S. K., Iqbal, H. M. N., Dhama, K., Misri, J., Prasad, G. (2018). Nanotherapeutics: An insight into healthcare and multi-dimensional applications in medical sector of the modern World. *Biomed Pharmacother*, *97*, 1521-1537.

Prestrelski, S. J., Pikal, K. A.,and Arakawa, T. (1995). Optimization of lyophilization conditions for recombinant human interleukin-2 by dried-state conformational analysis using Fourier-transform infrared spectroscopy. *Pharmaceutical research*, *12*, 1250-1259.

Ptacin, J. L., Caffaro, C. E., Ma, L., San Jose Gall, K. M., Aerni, H. R., Acuff, N. V., and Milla, M. E. (2021). An engineered IL-2 reprogrammed for anti-tumor therapy using a semi-synthetic organism. *Nature Communications*, *12*(1), 4785.

Rauf, M. A., Soliman, A. A., and Khattab, M. (2008). Solvent effect on the spectral properties of Neutral Red. *Chemistry Central Journal, 2*, 1-8.

Rausch, M., Blanc, L., De Souza Silva, O., Dormond, O., Griffioen, A.W., Nowak-Sliwinska, P. (2021). Characterization of renal cell carcinoma heterotypic 3D co-cultures with immune cell subsets. *Cancers, 13*(11), 2551.

Reddy, M. R. and Gubbiyappa, K. S. (2022). Formulation development, optimization and characterization of Pemigatinib-loaded supersaturable self-nanoemulsifying drug delivery systems. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences, 8*(1), 45.

Ren, J., Chu, A. E., Jude, K. M., Picton, L. K., Kare, A. J., Su, L., and Garcia, K. C. (2022). Interleukin-2 superkines by computational design. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *119*(12), e2117401119.

Rickert, M., Wang, X., Boulanger, M. J., Goriatcheva, N., and Garcia, K. C. (2005). The structure of interleukin-2 complexed with its alpha receptor. *Science*, *308*(5727), 1477-1480.

Rosso, A., Almouazen, E., Pontes, J., Andretto, V., Leroux, M., Romasko, E., Azzouz-Maache, S., Bordes, C., Coste, I., and Renno, T. (2021). Supersaturable self-microemulsifying delivery systems: An approach to enhance oral bioavailability of benzimidazole anticancer drugs. *Drug Delivery and Translational Research, 11*, 675-691.

Ruddy, S. B., Matuszewska, B. K., Grim, Y. A., Ostovic, D., and Storey, D. E. (1999). Design and characterization of a surfactant-enriched tablet formulation for oral delivery of a poorly water-soluble immunosuppressive agent. *International Journal of Pharmaceutics, 182*(2), 173-186.

RxMediaPharma. (2022). İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı. GEMAŞ Genel Mühendislik Mekanik Sanayi ve Tic. A.Ş. Son erişim tarihi: 08.03.2022.

Salo-Ahen, O. M., Alanko, I., Bhadane, R., Bonvin, A. M., Honorato, R. V., Hossain, S., and Vanmeert, M. (2020). Molecular dynamics simulations in drug discovery and pharmaceutical development. *Processes*, *9*(1), 71.

Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graü, M.A., Soliva-Fortuny, R., Martín-Belloso, O. (2014). Impact of microfluidization or ultrasound processing on the antimicrobial activity against Escherichia coli of lemongrass oil-loaded nanoemulsions. *Food Control*, *37*, 292-297.

Saraiva, D.P., Matias, A.T., Braga, S., Jacinto, A., Cabral, M. G. (2020). Establishment of a 3D co-culture with MDA-MB-231 breast cancer cell line and patient-derived immune cells for application in the development of immunotherapies. *Frontiers in Oncology*, *10*, 1543.

Sarpal, K., Pawar, Y. B., and Bansal, A. K. (2010). Self-emulsifying drug delivery systems: a strategy to improve oral bioavailability. *Current Research Information on Pharmaceuticals Sciences, 11*(3), 42-49.

Sassene, P. J., Knopp, M. M., Hesselkilde, J. Z., Koradia, V., Larsen, A., Rades, T., and Müllertz, A. (2010). Precipitation of a poorly soluble model drug during in vitro lipolysis: characterization and dissolution of the precipitate. *Journal of Pharmaceutical Sciences, 99*(12), 4982-4991.

Satyanarayana, M. (2021a). IL-2 treatment can be dangerous. Here's how drug firms are trying to fix it. *C&EN Biologics*, 99(12). https://cen.acs.org/pharmaceuticals/biologics/safer-IL2-cancer-immunotherapy-autoimmunity/99/i12?ref=search_results, Son erişim tarihi: 05.03.2022.

Satyanarayana, M. (2021b). IL-2 firm Synthekine raises $107.5 million in series B funding. *C&EN Biologics*, 99(22). https://cen.acs.org/pharmaceuticals/biologics/IL-2-firm-Synthekine-raises/99/i22?ref=search_results, Son erişim tarihi: 05.03.2022.

Saydé, T., El Hamoui, O., Alies, B., Gaudin, K., Lespes, G., and Battu, S. (2021). Biomaterials for Three-Dimensional Cell Culture: From Applications in Oncology to Nanotechnology. *Nanomaterials*, *11*(2), 481.

Schrödinger Release 2021-3: Desmond Molecular Dynamics System, D. E. Shaw Research, New York, NY, 2021. Maestro-Desmond Interoperability Tools, Schrödinger, New York, NY, 2021.

Schrödinger Release 2021-3: LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021.

Schrödinger Release 2021-3: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021.

Schrödinger Release 2021-3: Schrödinger Suite 2021-3 Protein Preparation Wizard; Epik, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021; Impact, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021; Prime, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021.

Serajuddin, A. T., Mufson, D., Bernstein, D. F., Sheen, P.-C., and Augustine, M. A. (1988). Effect of vehicle amphiphilicity on the dissolution and bioavailability of

a poorly water-soluble drug from solid dispersions. *Journal of Pharmaceutical Sciences, 77*(5), 414-417.

Shahba, A. A.-W., Mohsin, K., and Alanazi, F. K. (2012). Novel self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) for oral delivery of cinnarizine: design, optimization, and in-vitro assessment. *AAPS PharmaSciTech, 13*, 967-977.

Shahzadi, I., Fürst, A., Knoll, P., Bernkop-Schnürch, A. (2021). Nanostructured lipid carriers (NLCs) for oral peptide drug delivery: About the impact of surface decoration. *Pharmaceutics*, *13*(8), 1312.

Shaker, M.A., Younes, H.M. (2009). Interleukin-2: evaluation of routes of administration and current delivery systems in cancer therapy. *J Pharm Sci*, *98*(7), 2268-2298.

Shi, Y., Oeh, J., Hitz, A., Hedehus, M., Eastham-Anderson, J., Peale, F.V., Jr., Hamilton, P., O'Brien, T., Sampath, D., Carano, R.A.D. (2017). Monitoring and targeting Anti-VEGF induced hypoxia within the viable tumor by (19)F-MRI and multispectral analysis. *Neoplasia*, *19*(11), 950-959.

Shrestha, H., Bala, R., and Arora, S. (2014). Lipid-based drug delivery systems. *Journal of Pharmaceutics, 2014*.

Silva, D. A., Yu, S., Ulge, U. Y., Spangler, J. B., Jude, K. M., Labão-Almeida, C., and Baker, D. (2019). De novo design of potent and selective mimics of IL-2 and IL-15. *Nature*, *565*(7738), 186-191.

Singh, B., Bandopadhyay, S., Kapil, R., Singh, R., and Katare, O. P. (2009). Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS): formulation development, characterization, and applications. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems, 26*(5).

Skjold-Jørgensen, J., Vind, J., Svendsen, A., and Bjerrum, M. J. (2014). Altering the activation mechanism in Thermomyces lanuginosus lipase. *Biochemistry*, 53(25), 4152-4160.

Skog, A.L.H, Wadhwa, M., Hassan, M., Gharizadeh, B., Bird, C., Ragnhammar, P., et al. (2001). Alteration of interleukin 2 (IL–2) pharmacokinetics and function by IL–2 Antibodies induced after treatment of colorectal carcinoma patients with a combination of monoclonal antibody 17-1A, granulocyte macrophage colony stimulating Factor, and IL–2. *Clin Cancer Res*, *7*: 1163–1170.

Smith, K.A. (2001). IL-2. Oppenheim, J.J., Feldmann, M. (Eds.). *Cytokine Reference*. New York: Academic Pres, 113-125.

Sobczuk, P., Brodziak, A., Khan, M. I., Chhabra, S., Fiedorowicz, M., Wełniak-Kamińska, M., Synoradzki, K., Bartnik, E., Cudnoch-Jedrzejewska, A., Czarnecka, A.M. (2020). Choosing the right animal model for renal cancer research, *Translational Oncology*, *13*(3), 100745.

Song, Q., Yin, Y., Shang, L., Wu, T., Zhang, D., Kong, M., Zhao, Y., He, Y., Tan, S., Guo, Y., and Zhang, Z. (2017). Tumor microenvironment responsive nanogel

for the combinatorial antitumor effect of chemotherapy and immunotherapy. *Nano Letters*, *17*(10), 6366–6375.

Stauber, D. J., Debler, E. W., Horton, P. A., Smith, K. A., Wilson, I. A. (2006). Crystal structure of the IL-2 signaling complex: paradigm for a heterotrimeric cytokine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(8), 2788-2793.

Sulek, M. W., Wasilewski, T., and Kurzydłowski, K. J. (2010). The effect of concentration on lubricating properties of aqueous solutions of sodium lauryl sulfate and ethoxylated sodium lauryl sulfate. *Tribology Letters, 40*, 337-345.

Sun, R., and Xia, Q. (2020). In vitro digestion behavior of (W1/O/W2) double emulsions incorporated in alginate hydrogel beads: Microstructure, lipolysis, and release. *Food Hydrocolloids*, 107, 105950.

Suys, E. J., Warren, D. B., Pham, A. C., Nowell, C. J., Clulow, A. J., Benameur, H., Porter, C.J.H., Pouton, C.W., and Chalmers, D. K. (2019). A nonionic polyethylene oxide (PEO) surfactant model: experimental and molecular dynamics studies of Kolliphor EL. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 108(1), 193-204.

Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J., and Solans, C. (2004). Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in Colloid Interface Science, 108*, 303-318.

Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J., Solans, C. (2004). Formation and stability of nano-emulsions. *Adv Colloid Interface Sci*, 108-109, 303-318.

Taniguchi, T., Matsui, H., Fujita, T., Takaoka, C., Kashima, N., Yoshimoto, R., Hamuro, J. (1983). Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2. *Nature*, *302*(5906), 305-310.

Tayeb, H. H. and Sainsbury, F. (2018). Nanoemulsions in Drug Delivery: Formulation to Medical Application. *Nanomedicine*, *13*(19), 2507–2525. https://doi.org/10.2217/nnm-2018-0088

Thanos, C. D., Randal, M., and Wells, J. A. (2003). Potent small-molecule binding to a dynamic hot spot on IL-2. *Journal of the American Chemical Society*, *125*(50), 15280-15281.

Thanos, C. D., DeLano, W. L., and Wells, J. A. (2006). Hot-spot mimicry of a cytokine receptor by a small molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(42), 15422-15427.

Thomas, N., Holm, R., Garmer, M., Karlsson, J. J., Müllertz, A., and Rades, T. (2013). Supersaturated self-nanoemulsifying drug delivery systems (Super-SNEDDS) enhance the bioavailability of the poorly water-soluble drug simvastatin in dogs. *AAPS PharmaSciTech, 15*, 219-227.

Thomas, N., Holm, R., Müllertz, A., and Rades, T. (2012). In vitro and in vivo performance of novel supersaturated self-nanoemulsifying drug delivery systems (super-SNEDDS). *Journal of Controlled Release, 160*(1), 25-32.

Thomas, N., Richter, K., Pedersen, T. B., Holm, R., Müllertz, A., and Rades, T. (2014). In vitro lipolysis data does not adequately predict the in vivo performance of lipid-based drug delivery systems containing fenofibrate. *AAPS PharmaSciTech, 16*, 539-549.

Timur B., Yılmaz-Usta, D., ve Teksin, Z.S. (2021). Türkiye Patent No: 2021 019639 B. Türk Patent ve Marka Kurumu.

Timur, B., Yılmaz-Usta, D., Teksin, Z.S. (2022). Investigation of the effect of colloidal structures formed during lipolysis of lipid-based formulation on exemestane permeability using the in vitro lipolysis-permeation model, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *77*, 103797.

Timur, B. (2024). *Eksemestan Yüklü Kendiliğinden Emülsifiye İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi ve İn Vitro - İn Situ Değerlendirmeler*, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Ensitüsü, Ankara.

Tran, T., Xi, X., Rades, T., and Müllertz, A. (2016). Formulation and characterization of self-nanoemulsifying drug delivery systems containing monoacyl phosphatidylcholine. *International Journal of Pharmaceutics, 502*(1-2), 151-160.

Trotta, E., Bessette, P. H., Silveria, S. L., Ely, L. K., Jude, K. M., Le, D. T., and Bluestone, J. A. (2018). A human anti-IL-2 antibody that potentiates regulatory T cells by a structure-based mechanism. *Nature medicine*, *24*(7), 1005-1014.

Trujillo-Cayado, L.A., Santos, J., Ramírez, P., Alfaro, M.C., Muñoz, J. (2018). Strategy for the development and characterization of environmental friendly emulsions by microfluidization technique. *Journal of Cleaner Production, 178*, 723-730.

Ujhelyi, Z., Vecsernyés, M., Fehér, P., Kósa, D., Arany, P., Nemes, D., Sinka, D., Vasvári, G., Fenyvesi, F., Váradi J., and Bácskay, I. (2018). Physico-chemical characterization of self-emulsifying drug delivery systems. *Drug Discovery Today: Technologies*, *27*, 81-86.

Varadi, M., Bertoni, D., Magana, P., Paramval, U., Pidruchna, I., Radhakrishnan, M., and Velankar, S. (2024). AlphaFold Protein Structure Database in 2024: providing structure coverage for over 214 million protein sequences. *Nucleic acids research*, *52*(D1), D368-D375.

Varan, G., Akkın, S., Demirtürk, N., Benito, J.M. Bilensoy, E. (2021b). Erlotinib entrapped in cholesterol-depleting cyclodextrin nanoparticles shows improved antitumoral efficacy in 3D spheroid tumors of the lung and the liver. *Journal of Drug Targeting, 29*(4), 439-453.

Varan, G., Patrulea, V., Borchard, G., Bilensoy, E. (2018). Cellular interaction and tumoral penetration properties of cyclodextrin nanoparticles on 3D breast tumor model. *Nanomaterials, 8*(2), 67.

Varan, G., Varan, C., Öztürk, S.C., Benito, J.M., Esendağlı, G., Bilensoy, E. (2021a). Therapeutic efficacy and biodistribution of paclitaxel-bound amphiphilic cyclodextrin nanoparticles: analyses in 3D tumor culture and tumor-bearing animals in vivo. *Nanomaterials, 11*(2), 515.

Vrikkis, R.M. (2013). Interleukin-2 in Aqueous and Lipid Environments: Understanding Molecular Interactions that Impact Pharmaceutical Formulation Development (Doctoral dissertation, The University of North Carolina at Charlotte).

Waldmann, T.A. (2018). Cytokines in cancer immunotherapy. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *10*(12), a028472.

Wang, L., Dong, J., Chen, J., Eastoe, J., and Li, X. (2009). Design and optimization of a new self-nanoemulsifying drug delivery system. *Journal of Colloid Interface Science, 330*(2), 443-448.

Wang, P.L., Johnston, T.P. (1995). Sustained-release interleukin-2 following intramuscular injection in rats. *International Journal of Pharmaceutics, 113*(1), 73-81.

Wang, X., Rickert, M., and Garcia, K. C. (2005). Structure of the quaternary complex of interleukin-2 with its α, β, and γc receptors. *Science*, *310*(5751), 1159-1163.

Wang, Y., Tong, J., Chang, B., Wang, B., Zhang, D., and Wang, B. (2014). Effects of alcohol on intestinal epithelial barrier permeability and expression of tight junction-associated proteins. *Molecular Medicine Reports, 9*(6), 2352-2356.

Wang, Y., Wang, G., Li, Y., Zhu, Q., Shen, H., Gao, N., and Xiao, J. (2020). Structural insights into secretory immunoglobulin A and its interaction with a pneumococcal adhesin. *Cell research*, *30*(7), 602-609.

Weikert, S., Ljungberg, B. (2010). Contemporary epidemiology of renal cell carcinoma: perspectives of primary prevention. *World Journal of Urology*, 28, 247-252.

Whittington, R., Faulds, D. (1993). Interleukin-2. A Review of its Pharmacological Properties and Therapeutic Use in Patients with Cancer, *Drugs*, *46*(3), 446-514.

Williams, H. D., Sassene, P., Kleberg, K., Bakala-N'Goma, J.-C., Calderone, M., Jannin, V., Igonin, A., Partheil, A., Marchaud, D., and Jule, E. (2012(a)). Toward the establishment of standardized in vitro tests for lipid-based formulations, part 1: method parameterization and comparison of in vitro digestion profiles across a range of representative formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences, 101*(9), 3360-3380.

Williams, H. D., Sassene, P., Kleberg, K., Calderone, M., Igonin, A., Jule, E., Vertommen, J., Blundell, R., Benameur, H., and Müllertz, A. (2013). Toward the establishment of standardized in vitro tests for lipid-based formulations, part 3: understanding supersaturation versus precipitation potential during the in vitro digestion of type I, II, IIIA, IIIB and IV lipid-based formulations. *Pharmaceutical Research, 30*, 3059-3076.

Williams, H.D., Anby, M.U., Sassene, P., Kleberg, K., Bakala-N'Goma, J.-C., Calderone, M., Jannin, V., Igonin, A., Partheil, A., Marchaud, D., Jule, E., Vertommen, J., Maio, M., Blundell, R., Benameur, H., Carriere, F., Müllertz, A., Pouton, C.W., Porter, C.J.H. (2012). Toward the establishment of standardized in vitro tests for lipid-based formulations. 2. The effect of bile salt concentration and drug loading on the performance of type I, II, IIIA, IIIB, and IV formulations during in vitro digestion. *Molecular Pharmaceutics, 9*(11), 3286-3300.

Wilson, R. J., Li, Y., Yang, G., and Zhao, C. X. (2022). Nanoemulsions for drug delivery. *Particuology*, *64*, 85-97.

Yang, H., Yang, S., Kong, J., Dong, A., and Yu, S. (2015). Obtaining information about protein secondary structures in aqueous solution using Fourier transform IR spectroscopy. *Nature protocols*, *10*(3), 382–396.

Yamamoto, A., Taniguchi, T., Rikyuu, K. Tsuji, T., Fujita, T., Murakami, M., Muranishi, S. (1994). Effects of various protease inhibitors on the intestinal absorption and degradation of insulin in rats. *Pharmaceutical Research, 11*, 1496–1500.

Yetkin, G., Celebi, N., Özer, Ç., Gönül, B., Özoğul, C., (2004). The healing effect of TGF-α on gastric ulcer induced by acetylsalicylic acid in rats. *International Journal of Pharmaceutics, 277*(1-2), 163-172.

Yılmaz-Usta, D. (2022). *Katı Kendiliğinden Emülsifiye İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi ve İn Vitro – İn Vivo Değerlendirmeler*, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Ensitüsü, Ankara.

Yılmaz-Usta, D., Timur, B., and Teksin, Z. S. (2022). Formulation development, optimization by Box-Behnken design, characterization, in vitro, ex-vivo, and in vivo evaluation of bosentan-loaded self-nanoemulsifying drug delivery system: A novel alternative dosage form for pulmonary arterial hypertension treatment. *European Journal of Pharmaceutical Sciences, 174*, 106159.

Żarska, M., Dzida, M., Apelblat, A. (2017). Surface tensions and densities of concentrated aqueous solutions of citric acid. *Journal of Molecular Liquids*, *228*, 91-95.

Zupančič, O., Partenhauser, A., Lam, H.T., Rohrer, J., and Bernkop-Schnürch, A. (2016). Development and in vitro characterisation of an oral self-emulsifying delivery system for daptomycin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 81, 129-136.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : OLĞAÇ, Seval

Uyruğu : T.C.

Doğum tarihi ve yeri

Medeni hali

Telefon

e-posta

Eğitim

Derece	Okul/Program	Mezuniyet yılı
Doktora	Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji ABD	Devam Ediyor
Lisans	Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2017
Lise	Diyarbakır Rekabet Kurumu Cumhuriyet Fen Lisesi	2012

İş Deneyimi

Yıl	Çalıştığı Yer	Görev
2023- Devam ediyor	Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce - 71,25 (YÖKDİL)

Yayın

1. **Olgac S**, Olgac A, Teksin ZS. Screening oil components for interleukin-2 loaded lipid-based formulations with molecular dynamic simulations. International Journal of Biological Macromolecules (**Değerlendirme aşamasında).**
2. Yılmaz-Usta D, **Olgac S**, Teksin ZS. (2024). Optimization and validation of HPLC methods for in vitro and ex vivo analyses of bosentan monohydrate in FDA-recommended and biorelevant media. İstanbul Journal of Pharmacy, 54 (3): 466–475.
3. Yılmaz-Usta D, **Olgac S**, Timur B, Teksin ZS. (2023). Development and pharmacokinetic evaluation of Neusilin® US2-based S-SNEDDS tablets for bosentan: Fasted and fed states bioavailability, IVIS® real-time biodistribution, and ex-vivo imaging. International Journal of Pharmaceutics, 643, 123219.
4. Tort S, Kodan Akca E, **Olgac S**, Saar S, Yildiz A, Unal IS, Ozdal ZD, Tugcu Demiroz F. (2022). Development and Evaluation of Sustained Release Tablet Formulations of Venlafaxine Hydrochloride. Sağlık Bilimlerinde Değer 12 (1): 28-35.
5. **Olgac S**, Yılmaz-Usta D, Inceçayır T. (2021). Comparison of Tablet Splitting Techniques for Dosing Accuracy of Nebivolol Tablets: Hand Splitting versus Tablet Cutter and Knife. Saudi Pharmaceutical Journal 29 (12): 1486-1491.
6. Inceçayır T, **Olgac S**, Yılmaz-Usta D, Teksin ZS. (2021). Role of Surfactants on Dissolution Behavior of Tamoxifen. Dissolution Technologies 28 (2): 6-15.
7. Inceçayır T, **Olgac S**, Yildiz A, Saar S, Kodan E. (2019). pH-Dependent Dissolution Behavior of a Weakly Basic BCS Class II Drug, Clopidogrel. Latin American Journal of Pharmacy 38 (10): 1921-8.

Proje

1. Teksin ZŞ, Yılmaz-Usta D, **Olğaç S**, Kula S, Sezginer P., Elmas Ç. “Katı kendiliğinden emülsifiye ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi ve in vitro - in vivo değerlendirmeler”. 1001 - Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı, Proje Kodu: 217S602, Bursiyer, 01.11.2018-01.02.2022.

2. Teksin ZŞ, **Olğaç S**, Olğaç A, Timur B, Bilensoy E, Canpınar H, Varan G. “Böbrek kanseri tedavisi için moleküler dinamik simülasyonlar kullanılarak rekombinant insan interlökin-2 içeren oral nano ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi ve in vitro - in vivo değerlendirilmesi”. 1001 - Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı, Proje Kodu: 222S478, Bursiyer, 01.04.2023-Devam ediyor.
3. Teksin ZŞ, **Olğaç S**, Olğaç A, Dinler Doğanay G, Demirci H, Kulakman C. “Aldeslökinin lipit formülasyonunda kullanılacak yardımcı maddelerin hesaplamalı ve deneysel olarak belirlenmesi”. Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi - Katılımlı Araştırma Projesi (KAP), Proje Kodu: TKA-2023-8761, Araştırmacı, 12.09.2023-Devam ediyor.

Bildiri

1. **Olgac S**, Olgac A, Teksin ZS: “Assessment of in vitro release and in vitro lipolysis for interleukin-2-loaded double self-nanoemulsifying drug delivery system”, The European Federation for Pharmaceutical Sciences (EUFEPS) Annual Meeting 2025, Vienna, Austria (**Kabul edildi**).
2. **Olgac S**, Olgac A, Teksin ZS: “Exploring protease enzyme selection for protein-structured active ingredient loaded drug formulation with molecular dynamics simulations”, 21st International Pharmaceutical Technology Symposium (IPTS), Ankara, Türkiye, 9-11 September 2024.
3. **Olgac S**, Teksin ZS: “Development of Recombinant Human Interleukin-2 Loaded Double Nanoemulsions Using Microfluidizer® for Oral Drug Delivery”, 21st International Pharmaceutical Technology Symposium (IPTS), Ankara, Türkiye, 9-11 September 2024.
4. Timur B, **Olgac S**, Yilmaz Usta D, Demirel MA, Teksin ZS: “Evaluation of EXE-loaded SNEDDS using simultaneous lipolysis/ex-vivo permeability and lipolysis/in situ single-pass intestinal perfusion method”, 21st International Pharmaceutical Technology Symposium (IPTS), Ankara, Türkiye, 9-11 September 2024.
5. **Olgac S**, Olgac A, Teksin ZS: “Screening and assessment of excipients for nanoemulsion formulations of interleukin-2 with computational studies”, The European Federation for Pharmaceutical Sciences (EUFEPS) Annual Meeting 2023, Lisbon, Portugal, 31 May-2 June 2023.

6. Yılmaz-Usta D, **Olgac S**, Demirel MA, Kula S, Kavgacı A, Sezginer P, Elmas Ç, Teksin ZS: “Histology and pharmacodynamic echocardiography studies of bosentan-loaded SNEDDS and S-SNEDDS: New oral drug delivery systems for pulmonary arterial hypertension”, The European Federation for Pharmaceutical Sciences (EUFEPS) Annual Meeting 2023, Lisbon, Portugal, 31 May-2 June 2023.
7. **Olgac S**, Olgac A, Incecayir T, Teksin ZS: “Structure-guided selection of suitable nanoemulsion formulation components for a recombinant form of human interleukin-2 (Aldesleukin)”, 3rd International Gazi Pharma Symposium Series (GPSS-2021), Turkey, Online, 8-10 September 2021.
8. **Olgac S**, Yılmaz-Usta D, Incecayir T: “Comparison of tablet splitting techniques for dosing accuracy of nebivolol tablets: Hand splitting versus tablet cutter and knife”, 3rd International Gazi Pharma Symposium Series (GPSS-2021), Turkey, Online, 8-10 September 2021.
9. Yılmaz-Usta D, **Olgac S**, Teksin ZS: “Development and validated of uv spectrophotometric and HPLC method of bosentan monohydrate for ın vitro and ex-vivo samples”, 3rd International Gazi Pharma Symposium Series (GPSS-2021), Turkey, Online, 8-10 September 2021.
10. Yılmaz-Usta D, **Olgac S**, Teksin ZS: “Solid-State Characterization Studies of Bosentan-Loaded Solid Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System (S-SNEDDS) Comprising of Neusilin® US2”, 3rd International Gazi Pharma Symposium Series (GPSS-2021), Turkey, Online, 8-10 September 2021.
11. **Olgac S**, Yılmaz-Usta D, Erman NA, Incecayir T, Teksin ZS: “Validated HPLC method for the determination of tenofovir and its application for in-vitro and ex-vivo investigations of tenofovir loaded double nanoemulsion”, 13th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS), Turkey, Online, 22-25 June 2021.
12. **Olgac S**, Yılmaz-Usta D, Demirdas B, Erman NA, Teksin ZS: “Modeling and comparison of in vitro dissolution profiles of naproxen sodium tablets in biorelevant media”, 13th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS), Turkey, Online, 22-25 June 2021.
13. Yılmaz-Usta D, **Olgac S**, Timur B, Teksin ZS: “Enhancement of in vitro dissolution, in vitro lipolysis, ex-vivo permeability, and fasted and fed state bioavailability of Bosentan-solid SNEDDS: New oral drug delivery system for

pulmonary arterial hypertension", The European Federation for Pharmaceutical Sciences (EUFEPS) Annual Meeting 2021, Stockholm, Sweden, 7-9 June, 2021.

14. **Olgac S**, Yılmaz-Usta D, Incecayir T, Teksin ZS: "Evaluation of in-vitro dissolution ex-vivo permeability of tenofovir double nanoemulsion produced with the high energy method for oral drug administration", The European Federation for Pharmaceutical Sciences (EUFEPS) Annual Meeting 2021, Stockholm, Sweden, 7-9 June, 2021.
15. **Olgac S**, Incecayir T, Teksin ZS: "Production of different nanoemulsions with high energy method for oral drug delivery", 12th PBP World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Vienna, Austria, 11-14 May, 2021.
16. Yılmaz-Usta D, **Olgac S**, Teksin ZS: "Development and characterization of bosentan loaded solid self nanoemulsifying drug delivery system (S-SNEDDS). 8th BBBB International Conference on Pharmaceutical Science, Çeşme İzmir, Turkey, October 14-16, 2019.
17. Timur B, **Olgac S**, Yılmaz-Usta D, Teksin ZS: "Evaluation of fasted and fed state intestinal in vitro lipolysis test for bosentan loaded lipid-based drug delivery systems", 8th BBBB International Conference on Pharmaceutical Science, Çeşme İzmir, Turkey, October 14-16, 2019.
18. **Olgac S**, Yılmaz-Usta D, Incecayir T, Teksin ZS: "Role of surfactants and pH on dissolution behavior of tamoxifen, a weakly basic BCS class II drug", 2018 AAPS PharmSci 360, Washington, USA, November 4-7, 2018.
19. Yılmaz-Usta D, **Olgac S**, Incecayir T, Teksin ZS: "Modeling and comparison of in-vitro dissolution profiles of tamoxifen citrate immediate release tablets", 19th International Pharmaceutical Technology Symposium, Antalya, Turkey, September 17-19, 2018.
20. **Olgac S**, Yildiz A, Saar S, Kodan E, Incecayir T: "pH-dependent dissolution behavior of a weakly basic BCS class II drug, clopidogrel", 12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, Ankara, Turkey, June 26-29, 2018.
21. Saar S, Yildiz A, Unal IS, Ozdal ZD, **Olgac S**, Kodan E, Duran C, Tort S, Tugcu Demiroz F: "Development and evaluation of extended release tablet formulations of venlafaxine hydrochloride", 12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, Ankara, Turkey, June 26-29, 2018.

Burs

1. Eğitim Burs Programları. 100/2000 YÖK Doktora Bursu Programı, 2017 - 01.09.2017 - 31.08.2021.
2. Tübitak 1001 Proje Bursu, Katı Kendiliğinden Emülsifiye İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi ve İn Vitro - İn Vivo Değerlendirmeler (TÜBİTAK SBAG-1001 # 217S602), 01.03.2019 - 29.02.2020.
3. Eğitim Burs Programları. 2211-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı- 2019, 01.10.2019 - 30.09.2022.
4. Tübitak 1001 Proje Bursu, Böbrek Kanseri Tedavisi İçin Moleküler Dinamik Simülasyonlar Kullanılarak Rekombinant İnsan İnterlökin-2 İçeren Oral Nano İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi ve İn Vitro - İn Vivo Değerlendirilmesi (TÜBİTAK SBAG-1001 # 222S478), 24.04.2023 - Devam ediyor.
5. Eğitim Burs Programları. 2250-Lisansüstü Bursları Performans Programı, 2023 - 01.04.2023 - 31.07.2023.
6. Eğitim Burs Programları. 2250-Lisansüstü Bursları Performans Programı, 2024 - 01.08.2023 - 31.01.2024.
7. Eğitim Burs Programları. 2250-Lisansüstü Bursları Performans Programı, 2024 - 01.02.2024 - 31.07.2024.

Sertifika

1. Eğiticilerin Eğitimi Sertifikası. Gazi Üniversitesi. 16 Şubat 2024.
2. İş Sağlığı ve Güvenliği Sertifikası. Gazi Üniversitesi İş Sağlığı ve Güvenliği Koordinatörlüğü. 1 Mart 2024.
3. Teorik ve Uygulamalı Hücre Kültürü Eğitimi Katılım Belgesi. TÜSEB BİYAŞAM. 7 Mart ve 8 Nisan 2022.
4. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası. Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi (GÜDAM). 16-24 Aralık 2019.



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR…

