

T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PROTEİN KONJÜGASYONU
YENİ BİR FORMÜLASYON ÇALIŞMASI

Filiz ÖZYÜREK

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
ORGANİK KİMYA PROGRAMI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Nilhan KAYAMAN APOHAN
İKİNCİ DANIŞMAN
Dr. Peter GRIFFITHS

İSTANBUL 2010

T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PROTEİN KONJÜGASYONU
YENİ BİR FORMÜLASYON ÇALIŞMASI

Filiz ÖZYÜREK
(520808008)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
ORGANİK KİMYA PROGRAMI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Nilhan KAYAMAN APOHAN
İKİNCİ DANIŞMAN
Dr. Peter GRIFFITHS

İSTANBUL 2010

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında verdiği destek ve önerilerinden dolayı tez danışmanım Prof. Dr. Nilhan KAYAMAN-APOHAN'a çok teşekkür ederim.

Çalışmalarımın yönlendirilmesi ve sonuçlandırılmasında büyük emeği geçen ikinci tez danışmanım Dr. Peter GRIFFITHS ve birlikte çalıştığı Dr. Alison PAUL'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Anlayışlı olmaları, özenli yol göstermeleri ve sürekli teşvik edici tutumları ile çalışmam bu son haline ulaşmıştır. Ayrıca bütün bir yıl boyunca destek ve yardımlarını esirgemeyen laboratuvar arkadaşlarım Vanessa GIMENEZ, Craig JAMES, Gemma TALBOT, Eduardo de LUCA ve Abdulhakim JANGLER'e teşekkür ederim. Yoğun çalışma dönemini kolaylaştırdıkları ve sunduğu bütün imkanlar için Cardiff Üniversitesi ve çalışanlarına da teşekkür ederim.

Tez çalışmamı, İngiltere Cardiff Üniversitesi'nde yapma imkanı tanıyan ve maddi desteğinden dolayı Erasmus öğrenci değişim programına ve dolayısıyla Avrupa Birliğine teşekkür ederim. Bu programa başvuru sırasında ve sonrasında gösterdiği büyük ilgi ve yardımlarından dolayı Marmara Üniversitesi Kimya Bölümü Erasmus Koordinatörü Prof. Dr. Safiye ERDEM'e de teşekkürü bir borç bilirim.

Son olarak, en önemlisi, hayatımın her safhasında yanımda oldukları için ve gösterdikleri koşulsuz sevgi, ilgi ve maddi-manevi tüm desteklerinden dolayı annem, babam ve abime binlerce kez teşekkür ederim.

Eylül, 2010

Filiz ÖZYÜREK

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
SEMBOLLER.....	vii
KISALTMALAR.....	viii
ŞEKİLLER.....	ix
TABLolar.....	xi
BÖLÜM I. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
I.1. POLİMER TERAPÖTİKLER.....	1
I.1.1. Protein-Polimer Terapötikler.....	2
I.2. AMAÇ.....	3
BÖLÜM II. GENEL BİLGİLER.....	4
II.1. AKCİĞERLER YOLU İLE İLAÇ SALINIMI.....	4
II.1.1. Akciğer Yolu ile İlaç Salınımına Dikkat Çeken Sebepler.....	5
II.2. İLAÇ SALINIM CİHAZLARI.....	6
II.2.1. Nebülizatörler.....	7
II.2.2. Kuru Toz İnhalerler (DPI).....	8
II.2.3. Basınç Ölçekli İnhalerler (pMDI).....	8
II.2.3.1. Basın Ölçekli İnhalerlerin Formülasyonu.....	9
II.2.3.2. İlaç Salınım Teknolojisindeki Mücadeleler.....	10
II.3. FLORLU ÇÖZÜCÜLER.....	11
II.3.1. Florlu Çözücülerin Sınıflandırılması.....	12
II.3.1.1. Kloroflorokarbonlar(CFC).....	12
II.3.1.2. Hidrokloroflorokarbonlar (HCFC).....	13
II.3.1.3. Hidroflorokarbonlar (HFC).....	14
II.3.1.4. Perflorokarbonlar (PFC).....	14

II.3.2. Model Çözücü 2H,3H-perfloropentan (HPFP)	15
II.4. PEPTİT ve PROTEİNLERİN KONJÜGASYONU	15
II.4.1. Konjügasyonda Kullanılan Polimerler	17
II.4.1.1. Polietilen glikol (PEG)	19
II.4.1.2. Polipropilen Oksit (PPO)	20
II.4.1.3. (Pluronic®)	20
II.4.2. Poli(amidoamin) Dendrimerler (PAMAM)	21
II.4.3. Konjügasyon Kimyası	22
II.4.4. Polimerlerin Aktivasyonu	25
II.4.4.1. Polimerlerin CDI ile Aktivasyonu	26
II.4.5. Konjügasyonun Sağladığı Yararlar	26
II.5. MODEL PROTEİN OLARAK KULLANILAN TRİPSİN	27
BÖLÜM III. ÇALIŞMALAR	29
III.1. KULLANILAN KİMYASALLAR	29
III.2. KULLANILAN CİHAZLAR	29
III.3. FAZ DİYAGRAMLARI	30
III.4. TRİPSİNİN MS(PEG)₁₂ ile KONJÜGASYONU	30
III.5. TRİPSİNİN REAKTİF mPEG 500 ile KONJÜGASYONU	30
III.6. TRİPSİNİN REAKTİF PPO 1000 ile KONJÜGASYONU	31
III.7. TRİPSİNİN REAKTİF PLURONIC® 1100 ile KONJÜGASYONU	33
III.8. G2 PAMAM'ın REAKTİF mPEG ile KONJÜGASYONU	34
III.9. G4 PAMAM'ın REAKTİF mPEG ile KONJÜGASYONU	34
III.10. POLİMER-TRİPSİN KONJÜGE ÜRÜNLERİNİN HPFP İÇİNDEKİ ÇÖZÜNÜRLÜKLERİ	35
III.11. PEG-PAMAM KONJÜGE ÜRÜNLERİNİN HPFP İÇİNDEKİ ÇÖZÜNÜRLÜKLERİ	35
III.11.1. %50 Modifiye mPEG-PAMAM G2/G4 Örneklerinin Hazırlanması	36
BÖLÜM IV. SONUÇLAR ve TARTIŞMA	37
IV.1. FAZ DİYAGRAMLARI	37
IV.2. TRİPSİNİN MS(PEG)₁₂ ile KONJÜGASYONU	40
IV.3. POLİMERLERİN AKTİVASYONU	41

IV.4. TRİPSİNİN REAKTİF POLİMERLER ile KONJÜGASYONU	45
IV.5. KONJÜGE TRİPSİN ÖRNEKLERİNİN HPFP İÇİNDEKİ ÇÖZÜNÜRLÜKLERİ	47
IV.5.1. Örneklerin Kantitatif Analizi	47
IV.6. G2 PAMAM'IN REAKTİF mPEG ile KONJÜGASYONU	50
IV.7. G4 PAMAM'IN REAKTİF mPEG ile KONJÜGASYONU	51
IV.8. mPEG-PAMAM KONJÜGE ÜRÜNLERİNİN HPFP İÇİNDEKİ ÇÖZÜNÜRLÜKLERİ	52
BÖLÜM V. SON DEĞERLENDİRMELER ve ÖNERİLER	55
KAYNAKLAR	57
ÖZGEÇMİŞ	

ÖZET

PROTEİN KONJÜGASYONU - YENİ BİR FORMÜLASYON ÇALIŞMASI

Peptit, protein gibi biyolojik moleküller, hastalıkların iyileştirilmesinde oldukça fazla kullanılmaktadır. Basınç ölçekli inhalerler, ilaç aktif maddelerinin akciğerler vasıtasıyla kan dolaşımına taşınmasında kullanılan etkileyici bir cihazdır. İlaç partiküllerinin dispers olmasını sağladığından, bu tip cihazlarda uçucu çözücü sistemi çok önemlidir. İlaç endüstrisi genellikle kloroflorokarbon çözücülerini kullanmaktadır. Ancak; bu çözücüler ozon tabakasına zarar verdiği için, bunların yerine klor içermeyen, çevre dostu çözücüler araştırılmaktadır. Bu tez çalışmasında, model çözücü olarak 2H,3H-perfloropentan ve model protein olarak tripsin kullanıldı. Basınç ölçekli inhalerlerin formülasyonlarında ekspiyan olarak kullanılan polietilen glikol, polipropilen glikol ve polietilen oksit-polipropilen oksit-polietilen oksit blok kopolimerinin, 2H,3H-perfloropentan içindeki faz davranışları incelendi. Monometil veya dimetil polietilen glikol, dihidroksil polietilen glikol'e nazaran daha fazla çözüldü. Dolayısıyla polimerin çözünürlüğü, sahip olduğu fonksiyonel grup ile çözücü arasındaki etkileşime bağlıdır. 2H,3H-perfloropentan içinde çözünmeyen tripsin, çözünürlüğünün artırılması için monometil polietilen glikol 500, polipropilen glikol 1000 ve polietilen oksit-polipropilen oksit-polietilen oksit blok kopolimeri 1100 ile konjüge edildi. Bu polimerler, tripsinin amin grupları ile reaksiyona girebilmesi için, öncelikle N,N'-karbonildiimidazol kullanılarak reaktif hale getirildi. Elde edilen modifiye tripsinlerin, model çözücü 2H,3H-perfloropentan içinde, farklı sıcaklıklardaki çözünürlük davranışı incelendi. Bütün sıcaklıklarda bulanık olan örneklerin UV spektrofotometresiyle kantitatif analizi yapıldı. 4°C'de daha fazla çözüldüğü saptandı. Ayrıca bu tez çalışmasında poli(amidoamin) dendrimerlerin polietilen glikol ile konjügasyonu da çalışıldı. Poli(amidoamin) dendrimerler gen terapisinde oldukça yaygın kullanılmaktadır. Yine 2H,3H-perfloropentan içinde çözünmeyen poli(amidoamin) dendrimerleri, sentezlenen reaktif monometil polietilen glikol ile %50 ve %100 oranında modifiye edildi ve %100 modifiye olan poli(amidoamin)'in çözünürlüğü artırıldı.

ABSTRACT

PROTEIN CONJUGATION - A NEW FORMULATION STRATEGY

Biological molecules such as peptide and protein has been used for the treatment of diseases. Pressure metered dose inhalers are the devices to send the active molecules to the blood stream via lungs attractively. Volatile propellant is very important as it provides to disperse medicine particles. The propellant used in these devices is chlorofluorocarbons. However, they are known to cause to ozone depletion, drug companies are trying to replace them with more environmentally friendly fluorinated solvents. In this project, 2H,3H-perfluoropentane as model propellant and trypsin as model protein were used. The phase behaviors of polyethylene glycol, polypropylene glycol ve polyethylene oxide-polypropylene oxide-polyethylene oxide block copolymer which are used as excipients in pressure metered dose inhalers, in 2H,3H-perfluoropentane were investigated. Monomethyl and dimethyl polyethylene glycols were more soluble than dihydroxyl polyethylene glycol. Therefore, the solubility is dependant on the functional group-solvent interaction. Insoluble trypsin in 2H,3H-perfluoropentane, was conjugated by monomethyl polyethylene glycol 500, polypropylene glycol 1000 ve polyethylene oxide-polypropylene oxide-polyethylene oxide block copolymer 1100, to improve its solubility. Polymers were firstly activated using N,N-carbonyldiimidazole in order to react with the amine groups of trypsin. The solubility behaviors of modified trypsins at different temperatures were obtained. Quantitative analysis of modified trypsin solutions having cloudy appearance by UV spectrophotometer was made. They were more soluble at 4°C. Also 50% and 100% conjugation of poly(amidoamine) dendrimers which are widely used for gene therapy, by polyethylene glycol was studied. Insoluble poly(amidoamine) dendrimers in 2H,3H-perfluoropentane became soluble when 100% conjugation was performed.

SEMBOLLER

α	: Alfa
ϵ	: Epsilon
A°	: Amstrong
°C	: Santigrat derece
C	: Karbon
Cl	: Klor
CO₂	: Karbondioksit
F	: Flor
H	: Hidrojen
O₂	: Oksijen
®	: Tescilli ticari marka
S	: Kükürt

KISALTMALAR

CDI	: N,N'-karbonildiimidazol
CFC	: Kloroflorokarbon
DH PEG	: Dihidroksil polietilen glikol
DM PEG	: Dimetil polietilen glikol
DMSO	: Dimetil sülfoksit
d-DMSO	: Dötorolanmış dimetilsülfoksit
DPI	: Kuru toz inhaler
G2	: İkinci jenerasyon
G4	: Dördüncü jenerasyon
HCFC	: Hidrokloroflorokarbon
HFC	: Hidroflorokarbon
HLB	: Hidrofilik-lipofilik denge
HPFP	: 2H,3H-perfloropentan
IR	: İnfrared
MDI	: Basınç ölçekli inhaler
mPEG	: Monometil polietilen glikol
NMR	: Nükleer manyetik rezonans
PAMAM	: Poli(amidoamin)
PEG	: Polietilen glikol
PEO	: Polietilen oksit
PFC	: Perflorokarbon
Pluronic®	: Polietilen oksit-polipropilen oksit-polietilen oksit blok kopolimeri
pMDI	: Basınç ölçekli inhaler
PPO	: Polipropilen glikol (polipropilen oksit)
THF	: Tetrahidrofur
UV	: Ultraviyole

ŞEKİLLER

SAYFA NO

Şekil I.1. Polimer Terapötikler a) Polimerik İlaçlar b) Polimer-Biyopolimer Kompleksleri c) Polimer-Protein Terapötikler d) Polimerik Miseller.....	2
Şekil II.1. Solunum Yolu Organları.....	5
Şekil II.2. Basınç Ölçekli İnhaler ve Bileşenleri.....	9
Şekil II.3. Kloroflorokarbon Örnekleri.....	13
Şekil II.4. Hidrokloroflorokarbon Örnekleri.....	14
Şekil II.5. Hidroflorokarbon Örnekleri.....	14
Şekil II.6. Perflorokarbon Örneği.....	15
Şekil II.7. 2H-3H-Perfloropentan (HPFP).....	15
Şekil II.8. (a) Dihidroksi PEG, (b) Monometoksi PEG.....	19
Şekil II.9. Polipropilen oksit.....	20
Şekil II.10. Pluronic®.....	20
Şekil II.11. G2 PAMAM.....	21
Şekil II.12. PEG ile Konjüge Olmuş Bir Proteinin Temsili Resmi.....	24
Şekil II.13. Reaktif PEG Türevleri a) PEG Diklorotriazin b) PEG Triklorfenil Karbonat c) PEG Süksinimidil Karbonat d) PEG Süksinimidil Süksinat e) PEG p-Nitrofenol Karbonat f) PEG Karbonildiimidazol g) PEG Benzotriazol Karbonat h) PEG Tresilat.....	25
Şekil II.14. Tripsin.....	27
Şekil II.15. Tripsinin Amino Asit Dizilimi.....	28
Şekil III.1. Tripsinin MS(PEG) ₁₂ ile Konjügasyonu.....	30
Şekil III.2. mPEG'in Aktivasyonu ve Tripsin ile Konjügasyonu.....	31
Şekil III.3. PPO'nun Aktivasyonu ve Tripsin ile Konjügasyonu.....	32
Şekil III.4. Pluronic®'in Aktivasyonu ve Tripsin ile Konjügasyonu.....	33
Şekil III.5. PAMAM'ın mPEG ile Konjügasyonu.....	34
Şekil IV.1. DH PEG 600'ün HPFP İçindeki Faz Davranışı.....	37
Şekil IV.2. DM PEG 1000'in HPFP İçindeki Faz Davranışı.....	37
Şekil IV.3. DH PEG 1000'in HPFP İçindeki Faz Davranışı.....	38
Şekil IV.4. PPO 1000'in HPFP İçindeki Faz Davranışı.....	38

Şekil IV.5. Pluronic® 1100'ün HPFP İçindeki Faz Davranışı.....	38
Şekil IV.6. MS(PEG) ₁₂ ile Konjüge Tripsinin ¹ H NMR Spektrumu / d-DMSO.....	40
Şekil IV.7. mPEG'in FT-IR Spektrumu.....	41
Şekil IV.8. Reaktif mPEG'in FT-IR Spektrumu.....	41
Şekil IV.9. PPO'nun FT-IR Spektrumu.....	42
Şekil IV.10. Reaktif PPO'nun FT-IR Spektrumu.....	42
Şekil IV.11. Pluronic®'in FT-IR Spektrumu.....	43
Şekil IV.12. Reaktif Pluronic®'in FT-IR Spektrumu.....	43
Şekil IV.13. Reaktif mPEG'in ¹ H NMR Spektrumu / d-DMSO.....	44
Şekil IV.14. Reaktif PPO'nun ¹ H NMR Spektrumu / d-DMSO.....	44
Şekil IV.15. Reaktif Pluronic®'in ¹ H NMR Spektrumu / d-DMSO.....	45
Şekil IV.16. mPEG ile Konjüge Tripsinin ¹ H NMR Spektrumu / d-DMSO.....	45
Şekil IV.17. PPO ile Konjüge Tripsinin ¹ H NMR Spektrumu / d-DMSO.....	46
Şekil IV.18. Pluronic® ile Konjüge Tripsinin ¹ H NMR Spektrumu / d-DMSO.....	46
Şekil IV.19. Standart Tripsin Çözeltilerinin Kalibrasyon Eğrisi.....	48
Şekil IV.20. %50 Modifiye mPEG-PAMAM G2'nin ¹ H NMR Spektrumu / CDCl ₃	50
Şekil IV.21. %100 Modifiye mPEG-PAMAM G2'nin ¹ H NMR Spektrumu / CDCl ₃	50
Şekil IV.22. %50 Modifiye mPEG-PAMAM G4'ün ¹ H NMR Spektrumu / CDCl ₃	51
Şekil IV.23. %100 Modifiye mPEG-PAMAM G4'ün ¹ H NMR Spektrumu / CDCl ₃	51
Şekil IV.24. %100 Modifiye mPEG-PAMAM G2'nin HPFP İçindeki Çözünürlük Davranışı.....	53
Şekil IV.25. %100 Modifiye mPEG-PAMAM G4'ün HPFP İçindeki Çözünürlük Davranışı.....	53

TABLolar

	<u>SAYFA NO</u>
Tablo II.1. 2H-3H-perfloropentan'ın Fiziksel Özellikleri.....	15
Tablo II.1. PAMAM Dendrimerlerin Molekül Ağırlıkları ve Uç Reaktif Grup Sayıları.....	22
Tablo IV.1. Konjüge Tripsin Örneklerinin HPFP İçindeki Çözünürlükleri.....	47
Tablo IV.2. Standart Tripsin Çözeltilerinin 280nm'deki Absorbansları.....	47
Tablo IV.3. Farklı Konjüge Tripsinlerin Farklı Sıcaklıklardaki UV Absorbansları.....	49
Tablo IV.4. Farklı Konjüge Tripsinlerin Farklı Sıcaklıklarda HPFP İçinde Çözünen Miktarları.....	49
Tablo IV.5. mPEG-PAMAM Konjüge Ürünlerin HPFP İçindeki Çözünürlüğü.....	52
Tablo IV.6. mPEG-PAMAM G2-G4 Örneklerinin 1mL HPFP İçindeki Çözünürlük Limitleri.....	52

BÖLÜM I

GİRİŞ ve AMAÇ

I.1. POLİMER TERAPÖTİKLER

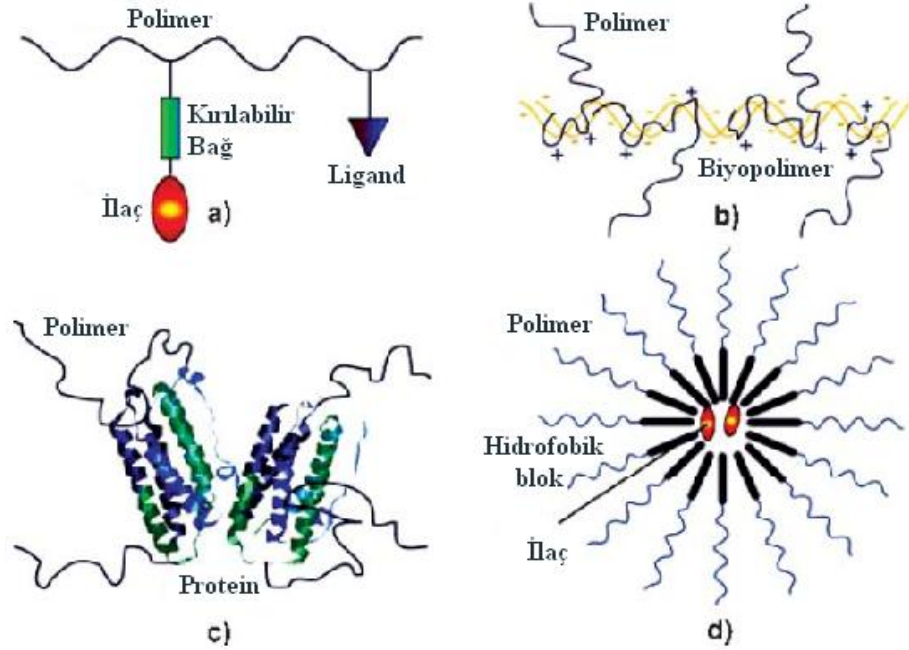
Etkili ilaç salınım sistemleri son yıllarda büyük önem kazanmıştır. İlaç salınım teknolojisinin inanılmaz derecede büyümesinin ana sebebi, günümüzdeki terapiler üzerinde elde edilecek büyük başarıların piyasada var olan ve henüz keşfedilmemiş ilaçların geliştirilmiş salınımı sayesinde oluşacağı beklentisidir. Bu gereklilik, ilaç moleküllerinin vücut içerisinde biyolojik rolünü uygulayabilmesi için hedef bölgeye ulaşmadan önce aşması gereken büyük bariyerlerden dolayı ortaya çıkmaktadır. Ek olarak, salınım sistemleri çözünürlük ve kararlılık gibi ilacın karakteristik fiziksel özellikleri ile bağlantılı problemleri düzeltebilir. Sonuç olarak, ilaç salınım ve hedef ilaç sistemleri yeni ilaç terapilerinin geliştirilmesi ile büyük etki yaratacağından bu teknolojiler halen geliştirilme aşamasındadır [1].

İlaç ve polimer konjugasyonları ve diğer polimerik taşıyıcı sistemleri toplu olarak polimer terapötik olarak adlandırılmaktadır. Polimer terapötikler ilacın polimere kovalent bağlarla bağlı olduğu polimer-ilaç konjugasyonları, polimer-protein konjugasyonları [2], polimerik miseller ve virüssüz taşıma olarak geliştirilmekte olan polimerik ilaçlar ve polimer-biyopolimer komplekslerini kapsamaktadır (Şekil I.1). Bütün sınıflar ilaç, protein ya da gen salınımı için fiziksel taşıyıcı olarak, önilaçların bileşeni olarak, tıpta çok önemli olan biyopolimerlerin kompleksleri ya da konjugasyonları olarak ya da tek başına direk terapötik olarak suda çözünebilir, spesifik bir polimer kullanır [3].

Endüstrinin bakış açısına göre, nano boyuttaki ilaçlar, kimyasal konjugasyona gerek kalmadan kolayca çözünebilir ve salınımı yapılabilir, geleneksel ilaç salınım sistemleri ve formülasyonlarından daha yeni, gelişime açık bir kimyasal alan oluşturmaktadır [4]. Polimer terapötikler diğer makromoleküllerle (proteinler, anti-korlar, oligonükleotidler) ve bağışıklık kazandıran konjugasyon ürünleri de dahil olmak üzere makromoleküler önilaçlar ile birçok özelliklerini paylaşırlar. Molekül ağırlığına bağlı olarak sentetik kimyanın çok yönlülüğü ya da laboratuarda sentez-

lenen maddelerin biyolojik açıdan rolünü yine yerine getirebilmesi büyük bir avantajdır [3].

Kanser, iltihap ve enfeksiyon hastalıkları gibi birçok alanda yeni adımlar atılabilmesi için terapötik indeksin geliştirilmesi öncelikli aşamadır [2].



Şekil I.1. Polimer Terapötikler a) Polimerik İlaçlar b) Polimer-Biyopolimer Kompleksleri c) Polimer-Protein Terapötikler d) Polimerik Miseller

I.1.1. Protein-Polimer Terapötikler

Rekombinan DNA ve monoklonal antikor teknolojisi, biyolojide yeni devrim yaratmıştır ve peptit, protein ve antikor içeren ilaçların sayısının artmasını sağlamıştır [3].

Oligopeptit ve proteinlerin kullanımlarında, özellikle in-vivo ortamda hedef bölgeye ulaşırken, bu moleküllerin kararsızlıkları yüzünden dikkate değer zorluklar vardır. Peptit ve proteinlerin konjügasyonu, biyomolekülü peptidaz enzimlerinden ve vücudun bağışıklık sisteminden korumak için çok etkili bir yöntemdir. Polietilen glikol (PEG), farmasötik ve formülasyon kimyasında biyolojik açıdan uyumlu bir polimer olarak oldukça fazla kullanılmaktadır ve ayrıca protein ve biyopolimer konjügasyon uygulamalarında önemi gittikçe artmaktadır [5].

Terapötik peptit, protein ve antikörlerin konjügasyonu, biyopolimerlerin vücut içinde kalış zamanını arttırır, toksikliği ve immünojenisiteyi azaltır ve önemli ölçüde çözünürlük ve kararlılığı arttırır. Bu yolda, daha aktif biyofarmasötik bileşenler hazırlanabilir ve zaten şunda birçok PEG ile modifiye edilmiş farmasötik maddeler geliştirilme aşamasındadır [5].

I.2. AMAÇ

Biyolojik ürünler (peptit, protein ve DNA bazlı terapötikler), insanlardaki hastalıkların iyileştirilmesinde ve yine bu hastalıklardan korunma amaçlı oldukça yaygın kullanılmaktadır.

Akciğerler yolu ile ilaç salınımı, yıllardır astım ve kronik akciğer hastalıklarının tedavisinde etkilidir ve basınç ölçekli doz inhalerlerin (pMDI) kullanımı, aktif moleküllerin kan dolaşımına gönderilebilmesi için ilgi çekici bir yöntemdir. pMDI'lar, belli dozdaki terapötik formülasyonun vücuda alınmasına yardımcı olan, elle tutulur, kapalı cihazlardır. İlaç partikülleri inhalerlerin içindeki sıvılaştırılmış çözücü içinde dağıtılmıştır. Günümüzde, bu tür cihazlarda çözücü olarak, tipik kloroflorokarbonlar (CFC) kullanılmaktadır. Ancak, CFC'ların ozon tabakasına verdikleri zarardan dolayı, farmasötik endüstri, bu çözücülerin yerine daha çok çevre dostu florlu çözücüler kullanmaya çalışmaktadır.

Florlu çözeltilerde yapılan bu değişim, beraberinde çözülmesi gereken bazı problemler getirmektedir ve farmasötik endüstri, ilaç etkinliğini arttırmak, yan etkileri azaltmak, düzenli doz alımını sağlamak, kullanım kolaylığını arttırmak ve proteinlerin bu tür florlu solventlerdeki çözünürlüğünü arttırmak gibi bazı problemlerin üstesinden gelmeye çalışmaktadır.

Bu tez çalışmasında, model çözücü olarak 2H,3H-perfloropentan (HPFP) ve model protein olarak tripsin kullanıldı. Tripsin HPFP içinde çözünmemektedir ve çözünürlüğünü arttırmak için polietilen glikol, polipropilen glikol ve etilen oksit-propilen oksit-etilen oksit blok kopolimeri ile konjüge edildi. Polimerler önce N,N-karbonildiimidazol (CDI) kullanılarak aktifleştirildi ve daha sonra amin grupları üzerinden tripsine bağlandı.

Ayrıca, gen terapisinde geniş ölçüde kullanılan poli(amidoamin) dendrimerler de, HPFP'deki çözünürlüklerinin arttırılması için polietilen glikol ile modifiye edildi.

BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER

II.1. AKCİĞERLER YOLU İLE İLAÇ SALINIMI

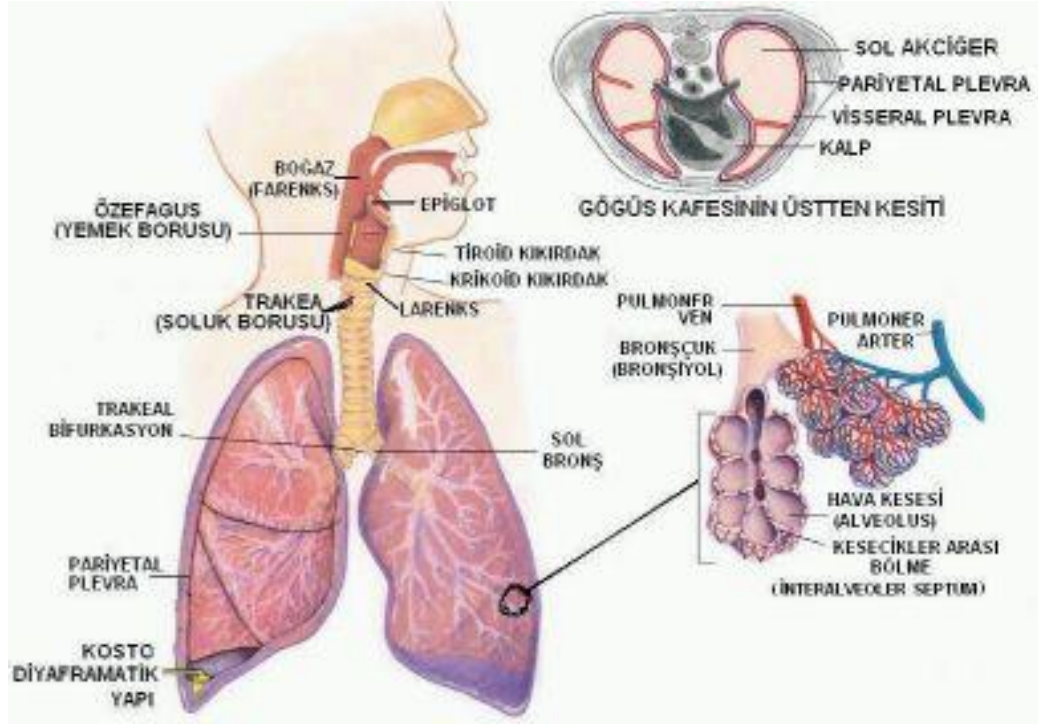
İlaç salınım teknolojisi sürekli yarış halinde ve hızlı gelişen bir alana sahiptir [6]. Biyoteknolojinin bir hayli ilerlemesi ve insan genomunun son dizilimi ile birlikte protein salınım metodlarının daha fazla geliştirilmesi isteği, şirketlerin salınım yöntemleri üzerine odaklanmasına sebep olmuş ve bir sürü yeni teknoloji ortaya çıkmıştır [7].

İlaçlar vücuda “lokal” (örnek: krem ve merhemler), “oral” (örnek: tabletler) ya da “parenteral” (örnek: enjeksiyon) gibi çeşitli yollarla gönderilebilmektedir. Bütün durumlarda, aktif farmasötik bileşenlerin önce kan dolaşımını geçerek tedavi gerektiren bölgelere ulaşmaları gerekmektedir [8].

Son yıllarda, akciğerler üzerinden vücuda gönderilen terapötik makromoleküllerin emilmesi büyük dikkat çekmektedir [9] ve bu metod ilaç salınım sistemleri arasında hızlı bir şekilde büyüyen yeni bir alana sahip olmuştur [10]. Akciğerler yolu ile ilaç salınımı, solunum yolu hastalıklarını tedavi etmek ve bu tür hastalıklardan korunmak, tedavi amaçlı vücudun ilaçları absorplaması ya da diğer hastalıklardan korunmak için ilaçların solunum ile ilgili bölgeye taşınmasını içermektedir [11].

Terapötik ilaçların akciğerler vasıtasıyla vücut dolaşımına gönderilmesi, çeşitli ilaç uygulamalarına büyük olanak sağlamaktadır. Peptit, protein ya da küçük moleküllerin (örnek: antibiyotik) vücuda alınması ile radyoterapi ve tümör, gen, AIDS gibi önemli rahatsızlıkların tedavisi mümkün olabilmektedir [12]. Özellikle de bronşlar içerisindeki hastalıklı bölgelerin tedavisinde bu yöntem yıllardır kullanılmaktadır. Terapötik ajanların daha çok hastalıklı bölgelere gönderilip, diğer organlara dağıtılmasının az olduğu keşfedildiğinden beri, bu metod ilaç terapisi için mükemmel bir örnek oluşturmaktadır. Bundan dolayı, ilaçlar, oral yola nazaran inhalasyon (solunma, içine çekme) yöntemi ile vücuda gönderildiğinde, akciğer hastalıklarının tedavisi için daha verimli bir terapötik indeks elde edilebilir [13].

Yapılan birçok çalışmada, yüzey aktif madde kullanılmadan, akciğerlerin, diğer uygulama yöntemleri ile karşılaştırıldığında, biyolojik açıdan büyük ölçüde daha iyi uyum sağladığı görülmektedir [14].



Şekil II.1. Solunum Yolu Organları

II.1.1. Akciğer Yolu ile İlaç Salınımına Dikkat Çeken Sebepler

- Gelişmekte olan terapötik peptit ve proteinlerin sayısının artması ve oral yolla ilaç salınım yönteminin zorlukları [15].
- Akciğerler tarafından ilaçların emilme hızı, gelişmiş bir farmakokinetik profil oluşturmaktadır [15]. Küçük moleküller, ilaçların direk damar içine verilmesinin dışında diğer yöntemlere göre, akciğerler tarafından çok hızlı bir şekilde emilip büyük kan dolaşımına gönderilebilmektedir [12, 16].
- Akciğer hastalıklarının tedavisinde kullanılan ilaçlara gün geçtikçe daha çok ilgi gösterilmesi [15].
- Geniş alveoler yüzey alanı [7, 9]. Akciğerler meşe ağacına benzetilir. Birincisi, meşe ağacının dalları ile benzer, “solunum yolu” (nefes borusu, bronşlar ve bronşçuklar), ikincisi meşe ağacının yaprakları ile benzer olan “alveoller” (CO_2 ve O_2 'nin yer değiştirdiği alan) olmak üzere iki

fonksiyonel kısımdan oluşmaktadır [14, 17]. Bir insan akciğeri yaklaşık 2300km solunum yolu ile 500 milyon alveole [17, 18] ve havanın tek bir nefes alışta ulaşabileceği 100m² gibi oldukça geniş bir emici alana sahiptir. Çeşitli moleküller, akciğerler vasıtası ile etkili bir şekilde emilip büyük kan dolaşımına gönderilebilirler [19].

- Akciğerlerin ince epitelyum tabakası [9]. İlaçların kan dolaşımına difüzenmesini kolaylaştırır [11]. Nefes yoluyla vücuda çekilmiş ilaçların emilmesinde önemli bir tabaka olan epitelyum, soluk borusunda 50-60µm kalınlıktadır; ancak alveollerde bu kalınlık 0.2µm'ye kadar aşırı derecede azalır [12]. Akciğerler, moleküllerin vücuda diğer alınma yerlerine göre daha fazla geçirgendir. Bazı umut verici terapötik ajanlar (peptit ve proteinler) enjeksiyon yerine inhalasyon tekniği ile epitelyumdan kolaylıkla kan dolaşımına geçebilirler. Akciğerler küçük moleküllerin vücut dolaşımına karışabilmesi için mide ve bağırsaklardan bile daha geçirgendir [20].
- Bronş ve bronşçukların geniş damarlanması [9].
- Diğer uygulama yöntemlerine göre akciğerlerin proteolitik (proteinleri parçalayıcı) aktivitesi daha düşüktür [9]. Ayrıca bu ilaçları parçalayıcı enzimler mide, bağırsak ve karaciğere oranla daha düşüktür. Böylece metabolizma enzimlerine karşı dayanıksız olan bölgesel ilaçların degradasyonu akciğerlerde daha azdır ve salınımı oldukça etkili bir şekilde gerçekleştirilir. Bu durum, peptit ve protein içeren ilaçların kolaylıkla vücuda alınmasını mümkün kılar [21].
- Çok fazla aerosolün bir seferde dağılabilmesi (bir dozaj yüz milyon partikül içerir) [16].
- Biyolojik açıdan daha uyumlu bir ilaç uygulama metodudur. Bu gerçekten de peptit ve proteinlerin salınımı için doğrulanmıştır [12].

II.2. İLAÇ SALINIM CİHAZLARI

Akciğerler yolu ile ilaç salınımı, astım, kronik obstrüktif akciğer hastalıkları ve kistik fibroz gibi hastalıkların tedavisinde kullanılan önemli bir araştırma alanına sahiptir. İnhalasyon, hedef noktaya ulaşabilmeleri için ilaçlara direk giriş olanağı sağlar [22].

Herhangi bir ilacın inhalasyon tekniği ile akciğerlere gönderilebilmesi için, aerosol olarak hazırlanması gerekmektedir [11]. Farmasötik aerosoller tipik olarak iki şekildedir:

- İlaç çözelti içindedir.
- Ya da ilacın uygun bir inert çözücü ve süspansiyon ajanı ile karıştırıldığı süspansiyon halindedir [21].

Oldukça etkili bir ilaç salınımı elde edebilmek için, aerosol oluşum prosesi kontrol edilmelidir ki böylece bilinen konsantrasyonda ilaç içeren partikül bulutu ya da damlacığı hasta tarafından vücuda alınabilsin [23].

Farmasötik aerosoller, sağlık üzerine çok önemli bir rol oynamaktadır ve yıllardır milyonlarca insan tarafından kullanılmaktadır. Bu ürünler basınç ölçekli doz inhaler (pMDI), kuru toz inhaler (DPI) ve nebulizatörleri kapsamaktadır. Teknolojinin süregelen ilerlemesi, kullanım kolaylığı ve akciğerler yolu ile ilaç salınımının enjeksiyondan daha çok tercih edilmesi, son yıllarda farmasötik aerosollere olan ilgiyi arttırmıştır [24].

II.2.1. Nebülizatörler

Nebülizatörler genellikle büyük miktardaki süspansiyonların veya ilaç çözeltilerinin inhalasyon tekniği ile taşınmasına yardımcı olur ve daha çok MDI ve DPI için kolayca formüle edilemeyen ilaçlar için kullanılmaktadır. Hem MDI hem de DPI tarafından salınmayacak kadar büyük terapötik dozdaki protein gibi ilaçlar için kullanılır [11] ve ayrıca bebekler, yaşlı ve kritik durumdaki hastalar için kullanılmaktadır [22]. Bu tür cihazlar geniş ölçüde hastanelerde ve evde gözetim gerektiren terapilerde uygulanmaktadır [25].

Nebülizatör ile ilaç içeren sulu çözeltilerin akciğerlere gönderilmesi geleneksel bir ilaç salınım sistemidir; çünkü bu cihazlar alveoler bölgeye ulaşabilecek kadar küçük damlacıklar üretebilirler. Ancak damlacık boyutu, salınım esnasında nebulizatörün içindeki çözeltinin sıcaklığında ve konsantrasyonunda meydana gelen herhangi bir değişiklikten etkilenebilir [26].

Nebülizatörlerin elle tutulabilen iki ana tipi vardır. Hava püskürtmeli ya da jet nebulizatörler en ucuzlarıdır ve daha çok klinik olarak kullanılırlar, halbu ki ultrasonik nebulizatörler, süspansiyon salınımındaki yetersizliğini de içeren bazı sebeplerden dolayı son zamanlarda kullanımdan kalkmıştır [23].

II.2.2. Kuru Toz İnhalerler (DPI)

Kuru toz inhaleler (DPI) ilaçların partikül bulutu Şeklinde solunduğu aerosol sistemlerdir [11] ve akciğerler yolu ile ilaç salınımı teknolojisinde önemli bir ilerlemeyi temsil eder. Piyasada ya da henüz gelişme aşamasında olan birçok çeşit DPI mevcuttur [27].

Kuru toz inhaleler formülasyonu hem toz akımına yardımcı olmak üzere büyük partikül boyutlu ekspiyanla (ya da seyreltici ajan; örnek: laktoz) karıştırlmış ilaç şeklinde hem de sadece ilaç içerek şekilde olabilir [22, 23]. Bu tür inhaleler aslında basınç ölçekli inhalelerin (pMDI) koordinasyon ve kloroflorokarbon (CFC) çözücü problemlerinden kaçınmak amacıyla geliştirilmiştir. DPI'lar herhangi bir çözücüye, spesifik olarak klorofluorokarbonlara, gereksinim duymazlar [22].

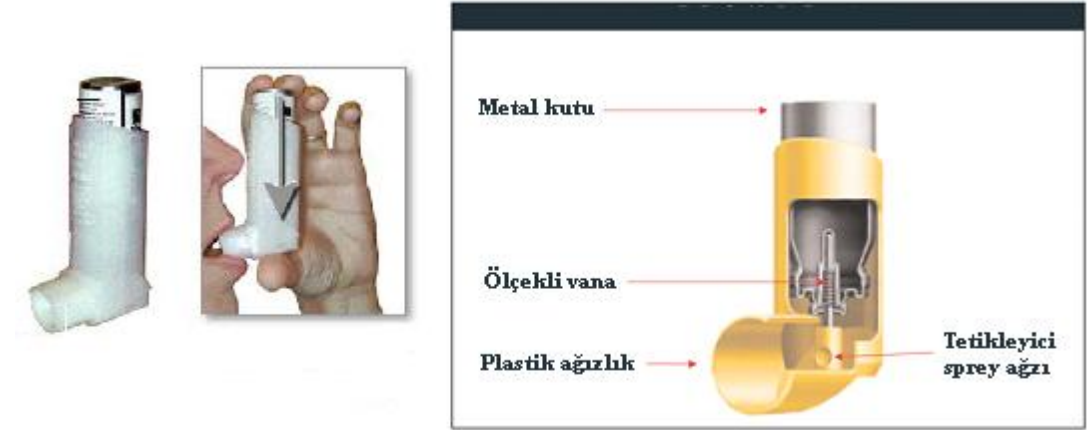
II.2.3 Basınç Ölçekli İnhaleler (pMDI)

Basınç ölçekli inhaleler (pMDI), inhalasyon terapi uygulamalarına yıllar boyunca önderlik etmiştir. Kullanım kolaylığı, oldukça fazla güvenilir olması, kesin doğru ölçeklendirilme performansı, ucuz olması ve uzun raf ömrü gibi birçok tercih edilebilir özellikleriyle beraber bu çeşit inhaleler grubu, astım hastalıklarının %90'ından fazlasında tedavi amaçlı kullanılmaktadır [27, 28]. Basınç ölçekli inhaleler, aktif moleküllerin akciğerler vasıtasıyla kan dolaşımına taşınması için ilgi çekici bir seçenek olarak görülmektedir. Ancak, aktif maddenin uçucu bir çözücü içinde dağıtılması gerektiğinden formülasyon konusu hayli önemlidir [29].

Aynı zamanda aerosol inhaleler ya da sprey olarak da bilinen basınç ölçekli inhaleler, ilaçların direk olarak akciğerlere taşınmasına yardımcı olan bir alettir. Dört ana bileşenden oluşmaktadır (Şekil II.2). İlaç çözeltisi ya da süspansiyonunu içeren metal kutu, ağızlığı bulunan yine plastik bir kutu içine yerleştirilmiştir. Metal kutu aşağı doğru bastırıldığında, vana ilacı ölçeklendirilmiş dozda duman bulutu haline getirir. Bu, ağızlık yardımıyla akciğerlerin içine solunur. İnhaleler kullanılmasıyla ilaç gerekli olduğu bölgeye yani akciğerlere direk olarak gönderilir [30].

Basınç ölçekli inhaleler, ilaç salınımının en basit ve ilk örneklerinden biridir ve astım tedavisinde kullanılmak üzere bölgesel olarak uygulanan aerosol salınım cihazı olarak geliştirilmiştir. Bu akciğer yolu ile ilaç salınımı, ağız yoluyla alınan dozajdan önemli derecede az ancak yeterli miktarda ilacın vücuda girmesine yardımcı olur. Bu oldukça azaltılmış ilaç seviyesi, beraberinde negatif yan etkileri de azaltır. Astım hastalıklarının iyileştirilmesine odaklandıktan sonra, inhalasyon

ilaç salınım tekniği, astım dışındaki akciğer hastalıklarına da (COPD, kistik fibroz, enfeksiyonlar, kanser vb) uygulamak için geliştirilmiştir. Gerçekten, inhalasyon ilaç salınım yöntemi, hızlı bir başlangıç (örnek: acının azaltılması) veya ilk metabolik enzimlerle karşılaşmamasını gerektiren (örnek: protein, peptit, nükleotid ve diğer hassas moleküllerin salınımı) vücut terapileri için ekjeksiyonun yerini alabilecek her derde deva şeklinde düşünülmektedir [31].



Şekil II.2. Basınç Ölçekli İnhaler ve Bileşenleri

II.2.3.1. Basınç Ölçekli İnhalerlerin Formülasyonu

Basınç ölçekli inhalerler kompakt, kapalı ilaç salınım sistemleridir ve başlıca aşağıdaki bileşenlerden oluşmaktadır:

- Aktif ilaç
- Çözücü
- Eksipiyen (katkı maddesi)
- Yüzey aktif madde (veya eş-çözücü)
- Ölçü vanasını kayganlaştırıcı madde

Bu işi yürütmek için iki çeşit formülasyon mevcuttur. Birincisi ilacın etanol gibi uçucu olmayan bir solvent yardımıyla çözüldüğü “çözelti tipi pMDI”dır. İkincisi de çözünmemiş ilaç partiküllerinin bir çözücü içinde dağıtıldığı “süspansiyon tipi pMDI”dır [32].

Çözücü sistemi pMDI formülasyonunda ana maddeyi temsil eder, ilaç ve diğer katkı maddeleri için çözücü ve dispersiyon ortamı olarak görev yapar ve aynı zamanda ilaç karışımı ölçü vanasından yayılırken aerosol bulutu oluşturmak için gerekli enerjiyi sağlamaktadır [33]. Bu çözücüler, çözelti ya da süspansiyon olarak

formüle edilmiş ilaç ile uyumlu olmalıdır, zehirli ve yanıcı olmamalıdır ve uygun bir uçuculuk ve yoğunluğa sahip olmalıdır [8]. Diğer bileşenler ise yayılan partiküllerin boyutunu ayarlamakta görevlidir [32].

Süspansiyon şeklindeki basınç ölçekli inhaler tipinde, ilaç çözücü içinde kısmi olarak çözünmemiştir ve bundan dolayı ilaç partikülleri metal kutu içinde asılı durumdadır. İlaç aktif maddesinin kendisi, çözünmüş haline oranla genellikle katı halde kimyasal olarak daha karardır, ancak kararlı mikrokristalin süspansiyon elde edebilmek ve dispersiyonun sürekli olmasını sağlamak biraz zordur. Özellikle, süspansiyon pMDI'lar için, asılı konumdaki ilaç partiküllerinin yüzeyler arası kimyası, bu gibi durumlarda egemen olan bir faktördür. Partikülleri, biyolojik olarak tercih edilen aerodinamik boyutta (1-5 mikron) dağıtabilmek için yüzey aktif maddelere gereksinim duyulur [24].

Hidrofloroalkanlara (HFA) dayalı basınç ölçekli inhalerleri (pMDI) daha fazla geliştirmek ve kapasitelerini arttırmak için ortaya atılan bir yaklaşım en düşük miktardaki eş-çözücü ile bile işlev görebilecek yeteneğe sahip ekspiyanları (katkı maddelerini) ve dolayısıyla yeniden formülasyon geliştirmektir. Bu ekspiyanları tasarlayabilmek, özellikle de HFA'ya dayalı pMDI'da kullanabilmek için fiziksel, kimyasal ve biyolojik faktörler düşünülme zorundadır. Biyolojik uyumluluğu en üst seviyeye çıkarmak için, ekspiyanlar güvenlik profilleri iyi bilinen bileşiklerden oluşturulmaktadır ve hızlıca degradesyona uğrayacak ve kolayca vücuttan dışarı atılacak şekilde dizayn edilmektedir [31]. Polietilen glikol (PEG) en iyi bilinen farmasötik ekspiyanlardan biridir [33].

II.2.3.2. İlaç Salınım Teknolojisindeki Mücadeleler

İlaç ve ilaç salınım şirketlerinin her ikisi de, var olan ve doğuş sürecindeki ilaç teknolojilerinin kullanımlarını hastaların, sağlık örgütleri ve çalışanlarının yararına olması için geliştirmekte ve bunun için büyük mücadele vermektedirler. Bu mücadelelerin içinde şunlar yer almaktadır:

- Yan etkilerin azaltılması
- Uygulama yönteminin verdiği acının azaltılması
- Kullanım kolaylığının artırılması
- İlaçların etkisinin geliştirilmesi
- Alınan dozun devamlılığı

- Hastalar tarafından kullanımının kabul edilmesi
- İlacın akışkanlığın geliştirilmesi
- Sağlık örgütü çalışanlarının tepkilerinin azaltılması
- Güvenli kullanım koşullarının arttırılması
- Çevresel zararın azaltılması (kloroflorokarbonların eliminasyonu) [6].

II.3. FLORLU ÇÖZÜCÜLER

Florlu çözücüler bir ya da daha fazla flor atomu içeren herhangi bir hidrokarbon olarak tanımlanabilir ve basınç ölçekli inhalelerde kullanılan en iyi alternatif kloroflorokarbon çözücü olarak tanınmaktadır [32].

Florlu ve kısmi florlu sıvılar, diğer hidrokarbonlardan kendilerini ayırt edebilecek mükemmel özelliklere sahiptir [34].

- Flor atomunun, en elektronegatif atom olmasından ötürü birçok özel özelliği vardır. Yüksek iyonlaşma potansiyeline ve düşük polarizasyon özelliğine sahiptir [35]. Flor atomlarının bu çok düşük polarizasyon özelliğinden dolayı perflorokarbonlar sadece zayıf van der Waals etkileşim gösterirler [34].
- Çok kuvvetli karbon-flor bağı, ki gerçekten de flor karbon ile en güçlü tekli bağı oluşturur, perfloroalkanlara bazı sıradışı özellikler katar. Bu bileşikler oldukça kararlı yapıdadırlar ve atmosferik ömürlerinin 2000 yıldan fazla olduğu tahmin edilmektedir [36]. Yüksek seviyedeki bu kimyasal inertlik, florokarbondaki flor sayesinde daha da kuvvetlendirilmiş C-C bağı sayesinde kazanılır [37] ve bu durum florlu çözücülerini biyomedikal uygulamalar için ideal bir aday yapar [34].
- Hidrokarbonlarla karşılaştırıldığında, florokarbonlar molekül ağırlığına bağlı olarak yüksek buhar basıncı, düşük refraktif indis ve yüksek sıkışabilirlik, yüksek gaz çözünürlüğü (suya göre), düşük yüzey gerilimi, yüksek akışkanlık ve yayılma katsayısı, yüksek yoğunluk, düşük dielektrik sabiti, ve su ile karşılaştırılabilir manyetik duyarlılık gibi ayırt edici özelliklere sahiptir [38].
- Oldukça küçük olan flor atomu, hidrojene göre önemli ölçüde büyüktür (van der Waals yarıçapları; Flor: 1.47Å⁰ ve Hidrojen: 1.20Å⁰). Sonuç olarak, perfloroalkil (F-alkil) zincirleri hidrojenli bileşiklerinden daha

hacimlidir. Flor atomunun hidrojene göre daha büyük olması, florokarbon zincir yapısının sarmal konformasyonda olmasına sebep olur, bu sarmal yapı, zinciri diğer reaktif maddelerin saldırılarından korur ve zincire daha çok sertlik katar [35].

- Birçok floroalkanın biyoaktivitesi test edilmiştir ve insan vücudunun tolere edilebileceği kadar düşük miktarda toksik olduğu bulunmuştur, hatta çoğu floroalken toksik değildir [37].
- F-alkil zincirleri oldukça hidrofobik ve liyofobiktirler, bu özellikler flor atomunun düşük polarizasyon özelliğinden ve yine F-alkil zincirlerinin hidrojen-alkil (H-alkil) zincirlerine göre daha geniş yüzey alanına sahip olmasından kaynaklanmaktadır [32].
- Perflorokarbonlar renksiz ve kokusuzdur, yanıcı değildir. Herhangi bir özel kullanım prosedürü gerektirmez ve en önemlisi klor içermediğinden ozona zarar verecek herhangi bir etkisi yoktur [36].

Son zamanlarda, farmasötik uygulamalar için bir hayli dikkat çekmektedir ve yapay kan olarak, ultrasound görüntüleme aygıtlarında kontrast madde olarak, sıvı havalandırma aygıtlarında ya da basınç ölçekli inhalelerde kullanılmak üzere geliştirilmektedir [34, 37].

II.3.1. Florlu Çözücülerin Sınıflandırılması

II.3.1.1. Kloroflorokarbonlar (CFC)

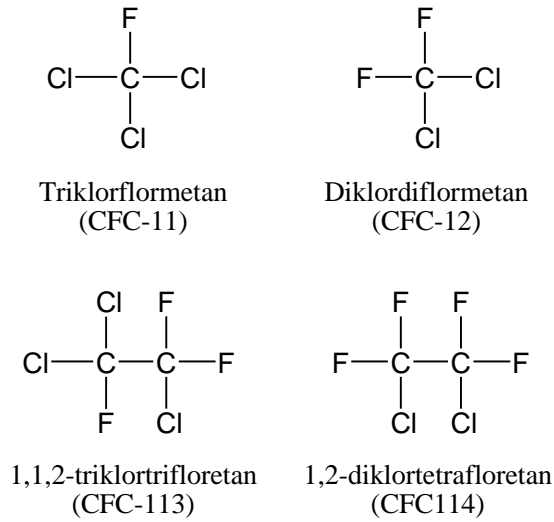
Kloroflorokarbonlar (CFC), karbon, klor ve flor içeren organik bileşiklerdir. Etan ve metanın uçucu türevleri olarak elde edilirler [39]. Çoğunlukla, bu bileşikler için ticari ismi freon kullanılır [40].

CFC'ler 1930'ların başında üretilmeye başlanmıştır ve çok çeşitli endüstriyel, ticari ve ev uygulamaları mevcuttur [41]. Bu maddeler toksik, yanıcı ve kanserojen değildir [42] ve başka kimyasal bileşiklerle reaksiyona girmezler [41]. Kararlı termodinamik özellikleri ile birlikte bu karakteristik güvenlik özellikleri birçok uygulama için ideal olmalarını sağlamaktadır. Ticari ve evlerde kullanılan buzdolabı birimlerinde soğutucu, elektronik temizleme sistemlerinde çözücü, ve köpük üretiminde şişirici (örneğin; yangın söndürücüler), ve aerosollerde yine çözücü olarak kullanılmaktadır [39, 41, 42].

Aynı zamanda, brom ve klor içeren diğer bileşiklerde olduğu gibi kloroflorokarbonların, Dünya'nın stratosfer katmanındaki ozonun delinmesini hızlandırdığı

saptanmıştır [41]. Fotokimyasal reaksiyonlar bu bileşiklerin parçalanmasına ve ozonla reaksiyona girmesine sebep olmaktadır. Bu sebepten dolayı bu maddeler pek kullanılmak istenmemektedir.

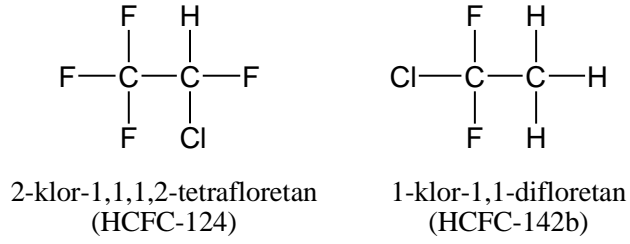
Ticari olarak, en önemli kloroflorokarbonlar metan ve etanın türevleridir. Bunlara örnek olarak, trikloroflorometan (CFC-11), diklorodiflorometan (CFC-12), 1,1,2-trikloro-1,2,2-trifloroetan (CFC-113), 1,2-dikloro-1,1,2,2-tetrafloroetan (CFC-114) gösterilebilir [40].



Şekil II.3. Kloroflorokarbon Örnekleri

II.3.1.2. Hidrokloroflorokarbonlar (HCFC)

HCFC genel adı ile bilinen hidrokloroflorokarbonlar hidrojen, klor, flor ve karbon atomlarından oluşur ve laboratuarlarda sentezlenmektedir. Doğada hiçbir yerde bulunmaz [42]. Kloroflorokarbonlara (CFC) hidrojen katılmasıyla klor ya da flor atomlarından birinin yer değiştirmesiyle elde edilir. Bu proses bileşiğin kararlılığını azaltır ve dolayısıyla ozon tabakasına ulaşmadan önce parçalanmasını sağlar. Bu nedenle HCFC'ler, geleneksel CFC'lere göre daha fazla çevre dostu olarak nitelendirilmektedir. Ancak yapısında hala klor atomu taşıdığı için, HCFC'ler ozonun delinmesine az da olsa neden olurlar. HCFC'ler stratosferde serbest klora parçalanırlar ve klor da, UV ışınları varlığında hızlı bir şekilde ozonla reaksiyona girerek ozon tabakasının delinmesine katkıda bulunurlar [43].

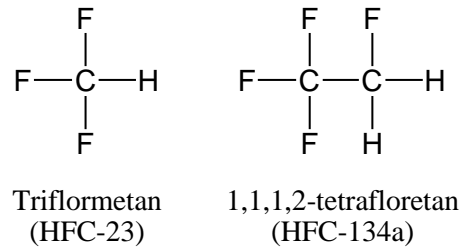


Şekil II.4. Hidrokloroflorokarbon Örnekleri

II.3.1.3. Hidroflorokarbonlar (HFC)

Hidroflorokarbonların yapısında klor ve brom elementleri bulunmaz. Bu elementler olmadığından ozon tabakasının delinmesine sebep olmazlar; ancak sera etkisinin artmasına katkıda bulunurlar [45].

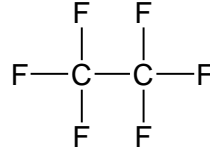
HFC-23 (triflorometan) bolca mevcuttur ve sera etkisini hayli artırır.



Şekil II.5. Hidroflorokarbon Örnekleri

II.3.1.4. Perflorokarbonlar (PFC)

Perflorokarbonlar, hidrokarbonların florlu bileşikleridir. Lineer, siklik veya polisiklik yapıda olabilirler. Son yirmi yıl içerisinde flor kimyası ve perflorokarbon bileşikleri önemli bir araştırma alanı olmuştur. Perflorokarbonların özellikleri ve uygulamaları biyofizik, biyokimya, farmakoloji, mühendislik, biyoteknoloji ve klinik gibi birçok alandaki araştırmacılar tarafından incelenmektedir [46].

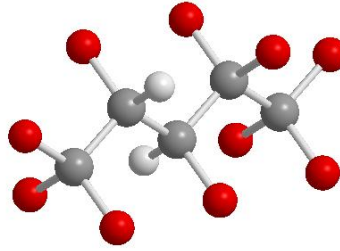


Perfloroetan
(PFC-116)

Şekil II.6. Perflorokarbon Örneği

II.3.2. Model Çözücü 2H,3H-perfloropentan (HPFP)

Basınç ölçekli inhalerler basınç altında formüle edilirler. Dolayısıyla bunların davranışlarını laboratuvar ortamında çalışmak diğer sistemlere göre daha zordur. Bu durumun üstesinden gelebilmek için, katkı maddelerinin özelliklerinin de incelenebileceği ve sonuçlarının kolaylıkla gerçek çözücülerde kullanılabilceği, iyi fiziksel özellikli model çözücüler kullanılmaktadır. Model çözücülerden bir tanesi 2H,3H-perfloropentandır (HPFP) [32].



Şekil II.7. 2H,3H-Perfloropentan (HPFP)

Tablo II.1. 2H,3H-Perfloropentan'ın Fiziksel Özellikleri

Çözücü	Kaynama noktası (°C)	Yoğunluk (g/cm ³)	Dielektrik Sabiti
HPFP	53.6	1.58	7.04

II.4 PEPTİT ve PROTEİNLERİN KONJÜGASYONU

Peptit ve proteinlerin tıpta ve eczacılıkta ilaç olarak kullanılması uzun zaman almıştır ve bu bileşiklerin, toksik ve vücutta fazla üretilmiş bileşikleri uzaklaştırma ve endojen hormonları, sitokinleri ve antikorları gibi davranabilme yetenekleri bu alana olan ilginin artmasına neden olmuştur. Ancak araştırmacılar iki ana zorluk ile

karşı karşıya kalmışlardır. Birincisi, yeterli miktarda madde elde edilebilmedeki zorluktur. Küçük peptitler kimyasal yolla sentezlenmekteydi; ancak büyük moleküller sadece laboratuvar koşullarında doğal maddelerden ekstraksiyon ve saflaştırma yolları ile elde edilebilmektedir [47]. Ayrıca bir gram peptitin üretilmesi binlerce dolara mal olabilmektedir. Örneğin altı sentetik basamakta üretilen beş amino asit içeren bir peptitin maliyeti 300-500g üretildiğinde 300-500\$/g, 1-2 kg üretildiğinde 100-200\$/g, 50-100kg üretildiğinde 25-50\$/g ya da tonlarca üretildiğinde 10\$'dan daha düşük olabilmektedir. Saflaştırma yapılmak istendiğinde, bu maliyet örneğin 100 üretim basamağından geçerek elde edilen 36 amino asitlik bir peptit için 10-20 kat daha pahalı olmaktadır. Formülasyon, paketleme, dağıtım masrafları da eklendiğinde maliyetin önemli derecede arttığını görmekteyiz. Kronik hastalıkların tedavisinde peptitlerin kullanılması ilacın düzenli olarak belli dozda alınması gerekir. Bu da bir hasta için yıllık binlerce doları bulan bir maliyete sebep olur [48]. Ancak, genetik mühendisleri bu problemin üstesinden gelmişlerdir ve artık günümüzde yeterli miktarda saf proteinler hazırlanmaktadır [47]. Biyo-teknolojide gerçekleşen devrim ile yeni ilaçlar olarak büyük önem kazanan birçok peptit ve protein üretilmiştir. 80'den fazlası şuanda Amerika'da piyasada bulunmaktadır ve yaklaşık 350 tanesi de klinik test aşamasındadır [49].

Diğer ikinci zorluk ise, bu moleküllerin vücuttaki hedef bölgeye taşınmasıdır. Proteinlerin oral yolla vücuda gönderilmesi mümkün değildir, çünkü sindirim sistemi tarafından çok rahat parçalanmaktadır. Proteinler vücuda enjekte edildiğinde bile, proteolitik sindirim ve böbrekler tarafından hızlı bir şekilde dışarı atıldığından zayıf farmakokinetik özellik göstermektedir. Sonuç olarak, kararsızlıkları yüzünden proteinlerin formüle edilmesi oldukça zordur [47].

Bilim adamları, polipeptitlerin ilaç sektöründe kullanılmasında karşılaşılan problemlerin üstesinden gelebilmek için çeşitli yollara başvurmuşlardır. Birçok araştırmacı polipeptitlerin klinik özelliklerini geliştirmek üzere aşağıdaki yolları denemişlerdir:

- Enzimler tarafından parçalanmasını azaltmak için aminoasit zincir yapısını değiştirmişlerdir.
- Vücutta kalış sürelerini arttırmak için albumin ya da immünnoglobulinlerle (serumda bulunan antikor özelliğine sahip proteinler) birleştirmişlerdir
- Ya da lipozom gibi ilaç taşıma araçlarına polipeptitleri bağlamışlardır.

Lipozom ile yapılan çalışmalar, bazen başarılı olmasına rağmen, bu metodun bazı sınırlamalar getirdiğini göstermektedir. Lipozomlar ilacı tümör gibi hastalıklı bölgeye taşıdıkları gibi aynı zamanda karaciğer, böbrek ve retikuloendotelyal sisteme de hızlı bir şekilde geçerler ve vücut dolaşımı sırasında ilaçtan ayrılabilirler. Hatta lipozomlar kalp ve karaciğer hücrelerini parçalayan yalancı alerjik reaksiyonlara neden olacak komplemanları aktif hale getirir [50].

Doğal ya da sentetik polimerlerle yapılan konjügasyon, bu zorlukların üstesinden gelmek için alternatif bir metottur [51]. Protein-polimer konjügasyonu alanında ilk çalışmalar Torchilin ve arkadaşları tarafından dekstran ile yapılmıştır. Bundan sonra, polimer konjügasyonu için birkaç alternatif polimer ortaya atılmıştır ve bunların içinde en iyi aday polietilen glikol (PEG) olmuştur [52].

PEG ile konjügasyon ilk kez 1970'lerde Davies ve Abuchowsky tarafından tanımlanmış ve albümin ve katalaz reaksiyonu üzerine iki anahtar makale yayınlamışlardır. Bu önemli bir adımdı; çünkü o zamanlar bir enzimin modifiye edilmesine rağmen aktivitesini yitirmemesi akla uygun bir şey değildi. Proteinler çok hassas yapılar olarak düşünölmekteydi ve sadece düşük molekül ağırlıklı ürünlerle birkaç basit modifikasyon gerçekleştirildi. Daha sonra, ilk tanımlanan PEG ile konjügasyon prosedürü büyük oranla geliştirildi ve günümüzde konjügasyon için kimyasal ve emzimatik olarak çok çeşitli yöntemler kullanılmaktadır [53].

Esasında, PEG ile yapılan modifikasyonlar, 4 milyar dolarlık, PEG ile modifiye protein ilaç satan biyoteknoloji endüstrisinde ana metot haline gelmiştir. Klinik alandaki büyük ilerlemesi ve bazı PEG-protein ilaçlarının piyasaya sürölmesi bu prosedürün uygulanışındaki önemi açıkça sergilemektedir [54]. PEG ile modifikasyon teknolojisini kullanarak elde edilen ve ticari olarak satışa sunulan ürünlere Adagen®, Oncaspar®, PEG-Intron®, PEGASYS® ve Somavert® örnek olarak verilebilir [54, 55].

II.4.1. Konjügasyonda Kullanılan Polimerler

Doğal ve sentetik ilaçların taşınmasında kullanılmak üzere birçok polimer incelenmektedir [52]. İlaç-polimer konjügasyon ürünlerinin hazırlanmasında kullanılan polimerler ideal olarak suda çözünmelidir, toksik ya da immünojenik olmamalıdır [2]. İdeal bir polimer in vivoda yığın oluşmasından kaçınmak için vücuttan kolay uzaklaştırılabilmesini sağlayan uygun bir molekül ağırlığına ve biyolojik

açından kolay parçalanabilme özelliğine sahip olmalıdır. Son ürünün homojen olabilmesi için polidispers olmamalıdır. Ürünün hem görevini yapabilmesi hem de istenen bölgeye dağıtımı ve orada toplanması için vücutta yeterince uzun kalabilmelidir [52]. Son olarak, bu makromoleküller, ilaca bağlanabilmesi için uygun bir fonksiyonel gruba sahip olmalıdır [2]. Ayrıca konjügasyon proteinin özelliklerini arttırmalıdır. Toksikliği arttırmamalı ve proteinin biyolojik aktivitesini düşürmemelidir [56].

Modern polimer kimyası çok değerlikli polimerler, dallanmış polimerler, aşı polimerler, dendrimerler, blok kopolimerler, yıldız polimerler, hibrit gliko- ve peptit polimerler gibi çok çeşitli polimer yapıları üretmektedir.

Lineer, yumak şeklindeki polimerler polimer terapötikleri sentezlemede yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [3]

Sentetik polimerler:

- PEG
- N-(2-hidroksipropil) metakrilamid kopolimerleri (HPMA)
- Poli(vinilprolidon) (PVP)
- Poli(etilenimin) (PEI)
- Lineer poliamidoaminler
- Divinileter maleik anhidrit/asit kopolimeri (DIVEMA)
- Poli(vinilalkol) (PVA)

Doğal polimerler:

- Dekstran (α -1,6 poliglukoz)
- Dekstrin (α -1,4 poliglukoz)
- Hyaluronik asit
- Kitozanlar

Yalancı sentetik polimerler:

- Poli(L-lisin)
- Poli(glutamik asit) (PGA)
- Poli(malik asit)
- Poli(aspartamid) [3, 52].

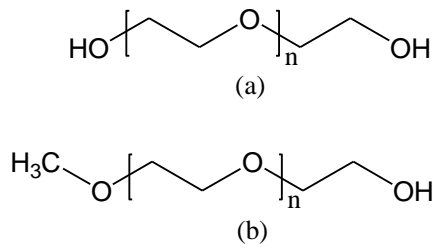
Bu çalışmada model protein tripsini modifiye etmek için PEG, PPO ve Pluronic® kullanıldı.

II.4.1.1. Polietilen glikol (PEG)

Poli(oksietilen) ya da polietilen oksit (PEO) olarak da bilinen polietilen glikol çeşitli molekül ağırlığına sahip sentetik bir polimerdir. Molekül ağırlığı 20000'den küçük olanlar genellikle PEG, daha yüksek molekül ağırlığındakiler ise PEO olarak adlandırılırlar [57].

Polietilen glikol, etilen oksit alt birimlerinin tekrar etmesiyle oluşan amfifilik bir polimerdir. Her bir etilen oksit birimi 44Da'luk bir molekül ağırlığına sahiptir ve tekrar eden her biriminin ağırlığının toplamı PEG zincirinin toplam molekül ağırlığını verir [58].

PEG, epoksit halkasındaki hidroksit iyonunun nükleofilik saldırısı ile başlatılan, etilen oksitin anyonik halka açılması polimerizasyonu ile sentezlenir. Polipeptitlerin modifikasyonunda genel olarak monometoksi PEG, mPEG kullanılmaktadır. mPEG metoksit iyonlarıyla başlatılan anyonik polimerizasyon ile sentezlenir [59]. PEG çeşitli molekül ağırlıklarında ticari olarak hazır halde mevcuttur. Biyolojik olarak aktif ürünlerin eldesinde 1000-20000Da molekül ağırlığı aralığındaki PEG'ler kullanılmaktadır. Basit ve sadece bir tane türetilen uç gruba sahip olmasından dolayı, mPEG'in kullanılması hem çapraz bağlanma olasılığını düşürür hem de son ürünün homojenliğini artırır. Bu yüzden, protein veya diğer biyomalzemelerin kovalent modifikasyonunda başlangıç maddesi olarak mPEG seçilir. PEG'in polieter zinciri biyolojik ortamda ve çoğu kimyasal reaksiyon koşullarında inerttir [60].



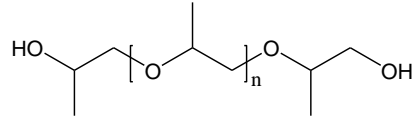
Şekil II.8. (a) Dihidroksi PEG (b) Monometoksi PEG

PEG birçok farmasötik ve kozmetik formülasyonlarda uzun zamandır katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. PEG aşağıdaki özelliklere sahiptir:

- İmmünnojenik, antijenik ve toksik değildir,
- Suda ve birçok organik çözücüde çözünür,
- PEG zinciri oldukça esnek ve hidrofildir [52].

II.4.1.2. Polipropilen Oksit (PPO)

Polipropilen oksit, propilen oksitin anyonik halka açılması polimerizasyon yöntemiyle elde edilir. Alkol ve genellikle potasyum hidroksit olan katalizör olarak bir baz reaksiyonu başlatır. Başlatıcı olarak etilen oksit ya da su kullanılırsa lineer bir polimer elde edilir. Gliserin, pentaeritritol ya da sorbitol gibi çok fonksiyonlu bir başlatıcı kullanılırsa polimerde dallanmalar oluşur. Propilen oksitin geleneksel polimerizasyonu ile ataktik polimer sentezlenir. İsotaktik polimer optik olarak aktif propilen oksitten üretilebilir ancak maliyeti oldukça pahalıdır.



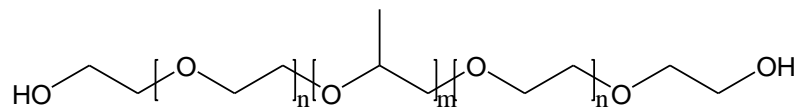
Şekil II.9. Polipropilen Oksit

PPO polietilen glikol ile ortak birçok özelliğe sahiptir. Oda sıcaklığında sıvıdır. Sudaki çözünürlüğü molekül ağırlığı arttıkça düşer. PPO'daki sekonder hidroksil grupları polietilen glikol'deki primer hidroksil gruplarından daha az reaktiftir [61].

Çoğu polieterler, poliüretan köpük ve poliüretan elastomer üretiminde kullanıldığı gibi aynı zamanda yüzey aktif maddeler, yağlayıcılar, fonksiyonel sıvılar, kalınlaştırıcılar ve plastikleştiriciler olarak da kullanılır [62]

II.4.1.3. Pluronic®

Pluronic® blok kopolimerleri (poloxamer olarak da bilinir) A-B-A yapısında etilen oksit ve propilen oksit bloklarından oluşur: $\text{EO}_n\text{-PO}_m\text{-EO}_n$. Hidrofilik EO_n ve hidrofobik PO_m birimlerinin sayısının değiştirilebildiği bu düzenlenme ile amfifilik bir polimer elde edilir. Pluronic® blok kopolimerinin yapısal formülü Şekil II.10'da görülmektedir. Kopolimerler değişken n ve m değerlerine bağlı olarak farklı hidrofilik-lipofilik denge (HLB) ile karakterize edilirler.



Şekil II.10. Pluronic®

Poli(amidoamin) dendrimerler, oldukça dallanmış küre şeklinde yapılardır. Merkezindeki molekül, üç değerli başlatıcı olarak amonyak (NH₃) veya dört değerli başlatıcı olarak etilendiamin (EDA) dendritik bir yapı ile çevrelenir ki bu yapılar her bir odak nokta arasındaki tabakalarla karakterize edilirler (jenerasyon). Çok düşük immünojenik özelliğine, DNA ve RNA ile yüksek etkileşme eğilimine sahiptir. Dendritik polimerlerin diğer bir avantajı da toksiklik oranının çok düşük olmasıdır [65].

Ek olarak, bu dendrimerlerin içi, çeşitleri molekülleri sarma kabiliyeti göstermektedir. Dolayısıyla, henüz kullanım alanı bütünüyle araştırılmamış olmasına rağmen, ilaç salınım sistemleri için büyük dikkat çekmektedir [66]. Poli(amidoamin) dendrimerler (PAMAM), bazı ilginç karakteristik özellikleri ve ilaç salınımı, gen salınımı ve in vivo görüntüleme gibi biyomedikal uygulamalar için potansiyele sahiptir [64]. Yüzeyindeki primer amino grupları sayesinde PAMAM dendrimerler, primer hücreler dahil çok çeşitli hücre tipine DNA'nın etkili bir şekilde taşınmasına yardımcı olur. Ayrıca bu dendrimerler, hem oligonükleotidler ve antisens oligonükleotidler için taşıma aracı hem de oligonükleotid dizileri için sonda görevi yapmaktadır. İn vivoda yapılan deney sonuçları, PAMAM dendrimerleri ile immünojenisiti artmadan etkili gen transferlerinin mümkün olacağını göstermektedir [67].

Tablo II.2. PAMAM Dendrimerlerin Molekül Ağırlığı ve Uç Reaktif Grup Sayısı

Jenerasyon	Molekül Ağırlığı	Uç Grup Sayısı
0	517	4
1	1430	8
2	3256	16
3	6909	32
4	14215	64

II.4.3. Konjügasyon Kimyası

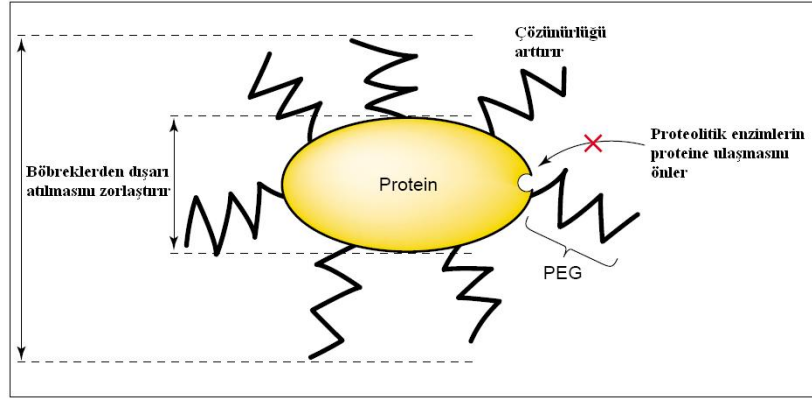
İlaçlardaki amino, tiyol, hidroksil ve karboksil gibi farklı grupların modifikasyonunda kullanılan farklı reaktiviteye sahip çeşitli PEG türevleri piyasada bulunmaktadır [69]. Fonksiyonel grup PEG'e bağlanacak molekül üzerinde bulunan reaktif gruba bağlı olarak seçilir. Proteinler için, tipik reaktif aminoasitler lizin, sistein, histidin, arjinin, aspartik asit, glutamik asit, serin, tireonin, tirozin, N-terminal amino asit ve C-terminal karboksilik asitlerden oluşmaktadır [59].

Araştırmacılar başlangıçta, uygun konjügasyon yapısı olarak amino grubu üzerinde yoğunlaşmışlardır. Çünkü bu gruplar proteinleri temsil eden gruplar olarak görülür, genellikle çözücüye maruz kalırlar ve çok çeşitli kimyasal yöntemlerle modifiye edilirler [53]. PEG ile konjügasyon en çok yüzeydeki lizin amino asitleri üzerinde bulunan ϵ -amino grupları üzerinden yapılmaktadır. Tipik bir proteinin yapısındaki amino asitlerin yaklaşık %10'unu lizin oluşturur, dolayısıyla antikolar dahil olmak üzere çoğu proteinin yüzeyinde, beraberinde hem avantaj hem de dezavantaj getiren lizin kalıntıları mevcuttur. Ancak bu grupların protein yapısında bulunması, konjügasyon teknolojisini kolaylaştırır [55].

PEG'in proteine bağlanması üç yolla gerçekleştirilebilir: tek bir büyük PEG molekülü tek bir yere bağlanabilir, dallanmış PEG (iki ya da daha fazla PEG bağlayıcı vasıtasıyla birbirine katılmıştır) tek bir yere bağlanabilir ya da birkaç küçük zincir birçok yerden proteine bağlanabilir. Teorikte, tek bir yerden PEG ile modifiye olmuş proteinler daha yüksek aktiviteye sahip olabilirler, çünkü PEG'in alıcı bölgelere bağlanma riski azaltılmış olur. Büyük PEG molekülünün birçok yerden proteine bağlanması ise kısmi veya tamamen aktivite kaybına yol açabilir [58].

PEG'in diğer moleküllerle konjügasyonu, lineer zincirinin uçlarındaki iki hidroksil grubu üzerinden yapılabilir. Bu proses, tipik olarak önce reaktif elektrofilik ara ürünün oluşturulmasıyla yapılır ki bu ara ürün kendiliğinden diğer moleküldeki nükleofilik grup ile birleşebilsin. Bifonksiyonel polimer kullanırken çapraz bağlanma olasılığı olduğundan, bu durumdan kaçınmak için monofonksiyonel PEG polimerleri kullanılabilir. Monofonksiyonel PEG zincirlerinin bir ucu metil eter ile etkisiz hale getirilmiştir. Monometoksi polietilen glikol, zincir başına sadece bir tane hidroksil grubu içerir. Böylece, aktivasyon ve modifikasyon reaksiyonlarının bu şekilde sınırlandırılması hem çapraz bağlı yapı oluşumunu hem de modifiye olmuş ürünlerin polimerizasyonunu engeller [70].

PEG-protein konjügasyon ürünlerinde, protein merkezdedir ve PEG zincirleri proteinin etrafında kovalent bağlarla bağlanmıştır. Konjügasyon sistemleri, başlangıç maddesine, miktarına, reaktivitesine ve reaksiyon koşullarına bağlıdır [59]. Ayrıca PEG'in molekül ağırlığı ve yapısı, proteine bağlanan PEG zincir sayısı, spesifik bağlanma yeri, kullanılan konjügasyon kimyası, başlangıç maddelerinin, ara ürünlerin ve son ürünlerin saflığı konjüğe olmuş polipeptidlerin performansını etkiler [48].



Şekil II.12. PEG ile Konjüge Olmuş Bir Proteinin Temsili Resmi

PEG, çözünürlük, biyolojik uygunluk gibi birçok iyi özelliğini proteine verir. Ancak sentetik bir polimer olan PEG polidispersdir, en iyi durumlarda bile polidispersite değeri düşük molekül ağırlıklı oligomerleri (3-4kDa) için yaklaşık 1.01'dir, yüksek molekül ağırlıklı olanları (20kDa) için 1.2 beklenebilir. Son ürünlerin de polidispers olmasına yol açtığından, bu istenmeyen bir özelliktir [71]. Birinci jenerasyon PEG ile konjügasyon sistemlerinde, PEG genellikle lizin üzerindeki α - ya da ϵ - amino gruplarına bağlanır [59]. Reaktif PEG'ler kullanıldığında, amino konjügasyonunda seçicilik çok önemlidir. Çünkü Protein üzerinde birkaç tane amino grubunun olması, PEG-protein izomer karışımının oluşmasına önderlik eder [69] ki bu izomerlerin saflaştırılması zordur [53]. Bu izomerlerin varlığı, ilaçların üretilmesini zorlaştırır ve klinik uygulamaların da zayıf olmasına katkıda bulunabilir [50]. Ek olarak, birinci jenerasyon yöntemleri genel olarak 12kDa daha az molekül ağırlıklı lineer PEG'leri kullanır. Kullanılan bu kimya yan ürünler oluşturur ya da PEG ile protein zayıf ve tersinir bağlarla bağlanır. Diğer bir problem de monometoksi PEG'in, bir kere aktive edildiğinde çapraz bağlanmaya sebep olacak kadar önemli miktarda PEG diol safsızlığı içermesidir [52]. Bu miktar, molekül ağırlığına bağlı olarak %1-10 arasında değişmektedir [71].

İkinci jenerasyon konjügasyon kimyası, izomer karışımı, diol safsızlığı, kararsız bağlar ile beraber birinci jenerasyon konjügasyon kimyasında karşılaşılan problemlerden kaçınmak için ortaya çıkmıştır. İkinci jenerasyon konjügasyon kimyasının hedefi, düşük molekül ağırlıklı PEG'ler ile görülen farmakokinetik ve farmokodinamik etkileri geliştirmek için daha büyük PEG polimerleri yaratmaktır. Araştırmacılar PEG türevlerini geliştirmek ve ilaçlarla yapılan bağları güçlendirmek

için bir dizi konjügasyon kimyası oluşturmuşlardır. Örneğin; PEG-asetaldehit yerine PEG-propiyonaldehit kullanarak, aldol kondensasyonu sonucu PEG’de oluşacak safsızlıkları önler. PEG’in karboksilik asit ara ürününü üretmek, PEG’in polipeptid ilaçlara bağlanmasından önce, diol safsızlığının %97’ye kadar iyon değişim kromatografisi ile giderilmesine yardımcı olur [50]. mPEG-propiyonaldehitin anah-tar özelliği, asidik ortamda (pH~5) aldehitin yüksek oranda N-terminal α -amin seçici olmasıdır, çünkü; diğer nükleofillere nazaran daha düşük pK_a değerine sahiptir. Elektrofilik PEG’in proteinlerin amino asit kalıntılarına konjügasyonu, her bir amino asitin nükleofilliğine bağlıdır. Nükleofilik saldırı sadece protein çözel-tisinin pH’ı amino asit kalıntısının pK_a değerine yakın veya daha yukarı olduğunda gerçekleşir [59].

II.4.4. Polimerlerin Aktivasyonu

Metoksi PEG’deki tek hidroksil ya da PEG diolün iki hidroksil grubu, farklı reaktif kimyasal gruplara modifiye edilebilir [52]. Lisin amino gruplarının modifi-kasyonu için birçok reaktif PEG dizayn edilmiştir [56]. Bu tür PEG türevlerine, PEG diklortriazin, PEG tresilat, PEG süksinimidil karbonat, PEG benzotriazol karbonat, PEG p-nitrofenol karbonat, PEG triklorfenil karbonat, PEG karbonil-diimidazol ve PEG süksinimidil süksinat örnek verilebilir [59].

Şekil II.13. Reaktif PEG Türevleri a) PEG diklortriazin b) PEG triklorfenil karbonat c) PEG süksinimidil karbonat d) PEG süksinimidil süksinat e) PEG p-nitrofenol karbonat f) PEG karbonildiimidazol g) PEG benzotriazol karbonat h) PEG tresilat

II.4.4.1. Polimerlerin CDI ile Aktivasyonu

N,N'-Karbonildiimidazol (CDI) oldukça reaktif bir karbonil bileşimidir ve hem karboksil hem de hidroksil gruplarının aktivasyonunda kullanılır.

Hidroksil içeren bileşikler için, CDI öncelikle N-nükleofili ile reaksiyona girecek imidazolil karbamat ara ürününü oluşturur. Proteinler normalde, N-terminal (α -amin) ve lisin yan zincir (ϵ -amin) fonksiyonel grupları üzerinden polimerlerle birleşirler. Oluşan son bağ, yüksüzdür ve mükemmel bir kimyasal kararlılığa sahiptir. CDI ile aktifleşmiş PEG kuru ortamda veya susuz organik solventte yıllarca kararlı kalabilir. Ayrıca protein konjügasyon reaksiyonu sırasında bile çok zor hidroliz olur.

CDI-PEG veya CDI-mPEG için ideal konjügasyon koşulları alkalik pH ortamıdır (tipik olarak $\text{pH} > 8.5$). Modifiye edilecek molekül sulu çözeltilerde çözünmüyorsa, reaksiyon direkt organik çözücü içinde de gerçekleştirilebilir. Organik çözücünün bir diğer avantajı da aktif gruplarının hidroliz olmamasıdır [70].

II.4.5. Konjügasyonun Sağladığı Yararlar

Protein veya diğer moleküllerin sentetik polimerler ile modifikasyonu hem *in vivo* hem de *in vitro* alanda birçok yarar sağlar [70]. Bu yararlar, nötral, kimyasal olarak inert ve hidrofilik PEG polimerleri tarafından molekülün hacimce artması, yüzeyin değişmesi ve korunması ile ortaya çıkar [55].

Çözünürlük ve kararlılığı artırır: PEG bağlandığı moleküle çözünürlük kendi fizikokimyasal özelliklerini de katar. Modifikasyon sonrası, enzimler organik çözücülerde çözünür ve aktif hale geçebilirler [71]. Ayrıca polimer modifikasyonu *in vivo* da kararlılığın artmasına da yardımcı olur [70].

Farmakokinetik özellikleri değiştirir, vücutta kalış süresini artırır: Peptit ve protein gibi biyolojik moleküllere dayalı bazı ilaçlar midede denature olur (oral yolla alındığında) veya enjekte edildiklerinde vücuttaki yarı ömürleri oldukça kısadır. Büyük polimer molekülüne bağlanması ile enzimlerin saldırılarından korunur, böbrekler tarafından dışarı atılması yavaşlar ve ayrıca kontrollü salınımına da yardımcı olur [72].

İmmünojeniteyi azaltır: Proteinlerin immünojenik doğalarına bağlı olarak, çeşitli PEG molekülleri ile konjüge edilerek immünojenitenin eliminasyonu gerçekleştirilebilir [56]. Dallanmış PEG'lerin yarattığı sterik engel nedeniyle antikörlerin proteine ulaşması zorlaşır. Lineer PEG'ler, proteinin yüzeyindeki antijen-

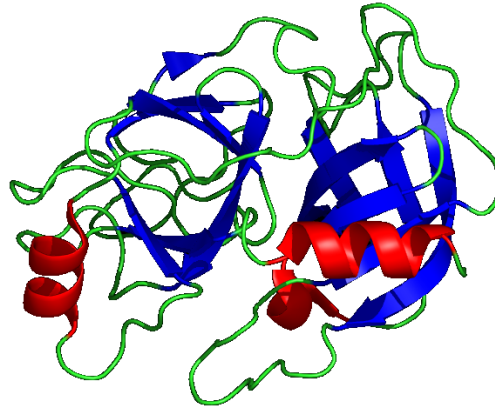
lerle etkileşmesine izin verebilir ve bağışıklık sisteminin devreye geçmesine neden olabilir [63].

Biyoaktiviteyi değiştirir: PEG ile modifikasyon sonucu in vitroda aktivite düşerken, in vivo da aktivitenin arttığı görülmüştür. Bağlanan PEG'in molekül ağırlığı ile in vivo da biyolojik aktivite arasında direkt bir ilişki vardır. Polimerin molekül ağırlığı arttıkça proteinin in vivo da aktivitesi de artar [58].

Konjügasyonun sağladığı diğer bir yarar da toksikliği azaltmasıdır [63].

II.5. MODEL PROTEİN OLARAK KULLANILAN TRİPSİN

Tripsin, serin proteinaz ailesinin bir üyesidir, özellikle protein ve peptidleri arjinin ve lisin kalıntılarının karboksil kısımlarından hidroliz eder. Sindirim, kimotripsin ve diğer enzimlerin zimojenlerinin aktivasyonu gibi biyolojik olaylarda büyük rol oynar [73].



Şekil II.14. Tripsin

Tripsin, inaktif formu tripsinojen şeklinde pankreasta üretilir. İdeal bir çalışma pH (yaklaşık 8) ve sıcaklığına sahiptir (37°C). Enzimatik mekanizması diğer serin proteinazlarla benzerdir. Bu enzimler, histidin-57, aspartat-102 ve serin-195 katalitik üçlü grubunu içerir. Tripsin ayrıca endopeptidaz olarak düşünülebilir, örneğin; yarıлма sondaki amino asitlerden daha çok polipeptidin içinde gerçekleşir [74].

10 tanesi lisin olan 231 amino asitten oluşur. Daha önce belirtildiği gibi, lisinler genellikle polimerin karboksil fonksiyonel grubu tarafından konjügasyonda kullanılır [75].

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
1	Phe	Pro	Thr	Asp	Asp	Asp	Asp	Cys	Ile	Val	Gly	Gly	Tyr	Thr	Cys	15
16	Ala	Ala	Asn	Ser	Ile	Pro	Tyr	Gln	Val	Ser	Leu	Asn	Ser	Gly	Ser	30
31	His	Phe	Cys	Gly	Gly	Ser	Leu	Ile	Asn	Ser	Gln	Trp	Val	Val	Ser	45
46	Ala	Ala	His	Cys	Tyr	Lys	Ser	Arg	Ile	Gln	Val	Arg	Leu	Gly	Glu	60
61	His	Asn	Ile	Asp	Val	Leu	Glu	Gly	Asn	Glu	Gln	Phe	Ile	Asn	Ala	75
76	Ala	Lys	Ile	Ile	Thr	His	Pro	Asn	Phe	Asn	Gly	Asn	Thr	Leu	Asp	90
91	Asn	Asp	Ile	Met	Leu	Ile	Lys	Leu	Ser	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Asn	105
106	Ser	Arg	Val	Ala	Thr	Val	Ser	Leu	Pro	Arg	Ser	Cys	Ala	Ala	Ala	120
121	Gly	Thr	Glu	Cys	Leu	Ile	Ser	Gly	Trp	Gly	Asn	Thr	Lys	Ser	Ser	135
136	Gly	Ser	Ser	Thr	Pro	Ser	Pro	Leu	Gln	Cys	Leu	Lys	Ala	Pro	Val	150
151	Leu	Ser	Asp	Ser	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Try	Pro	Gly	Gln	Ile	Thr	165
166	Gly	Asn	Met	Ile	Cys	Val	Gly	Phe	Leu	Glu	Gly	Gly	Lys	Asp	Ser	180
181	Cys	Gln	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Val	Val	Cys	Asn	Gly	Gln	Leu	195
196	Gln	Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Tyr	Gly	Cys	Ala	Gln	Lys	Asn	Lys	210
211	Pro	Gly	Val	Tyr	Thr	Lys	Val	Cys	Asn	Tyr	Val	Asn	Trp	Ile	Gln	225
226	Gln	Thr	Ile	Ala	Ala	Asn										

Şekil II.15. Tripsinin Amino Asit Dizilimi

BÖLÜM III

ÇALIŞMALAR

III.1. KULLANILAN KİMYASALLAR

2H,3H-perfloropentan (HPFP), Sigma Aldrich'ten satın alındı ve moleküler elekler vasıtasıyla kullanılmadan önce kurutuldu.

mPEG 500, PEG 600, PEG 1000 ve dmPEG 1000, Fluka'dan satın alındı ve kullanılmadan önce üç gün boyunca etüvde suyu uçuruldu.

Polipropilen oksit 1000 (PPO), Sigma Aldrich'ten satın alındı.

Etilen oksit-propilen oksit-etilen oksit blok kopolimeri (Pluronic® 1100), Sigma Aldrich'ten satın alındı.

MS(PEG)₁₂, Sigma Aldrich'ten satın alındı. 1g polimer 4mL DMSO içinde çözüldü ve buzdolabında saklandı.

N,N'-Karbonildiimidazol (CDI), Sigma Aldrich'ten satın alındı ve kahverengi şişe içerisinde buzdolabında saklandı. Kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirildi.

DMSO, Sigma Aldrich'ten satın alındı. Alındığı gibi kullanıldı.

THF, Sigma Aldrich'ten satın alındı ve kullanılmadan önce distilasyon yöntemi ile kurutuldu.

Poli(amidoamin) G2 ve G4 Sigma Aldrich'ten satın alındı ve alındığı gibi kullanıldı.

III.2. KULLANILAN CİHAZLAR

Sıcaklık kontrollü su banyosu

Liyo-filizatör

Döner evaporatör

¹H NMR (Bruker DPX 400 spectrometer)

FT-IR (Jasco FT-IR 660)

UV (Jasco V-570 Dual Beam Spectrometer)

Reometre (BoHLIN CS10)

III.3. FAZ DİYAGRAMLARI

HPFP içinde ağırlıkça %1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 konsantrasyonlarında mPEG 500, PEG 600, PEG 1000, dmPEG 1000, PPO 1000 ve Pluronic® 1100 çözeltileri hazırlandı. Sıcaklık kontrollü su banyosuna yerleştirildi ve sıcaklık 1'er derecelik artışla 25°C'den 50°C'ye kadar yükseltilerek çözünürlük davranışları incelendi. Örnekler oda sıcaklığına soğutulduktan sonra her birine 1mg tripsin eklendi ve yine aynı şekilde sıcaklık yükseltilerek tripsinin çözünürlüğü kontrol edildi.

III.4. TRİPSİNİN MS(PEG)₁₂ ile KONJÜGASYONU

5mg tripsin, 5mL DMSO içerisinde çözüldü. MS(PEG)₁₂ (1g/4mL DMSO) buzdolabından çıkartıldı ve oda sıcaklığına gelene kadar bekletildi. Gerekli PEG reaktif miktarı (6µL) aşağıdaki reaksiyona göre hesaplanarak (oran= 1 tripsin: 10 PEG reaktifi) tripsin çözeltisine eklendi ve yarım saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Reaksiyon karışımı daha sonra 12000-14000 g/mol molekül ağırlıklı diyaliz membranı kullanılarak saf suya karşı 1gün boyunca saflaştırıldı ve liyo-filizatör ile mevcut su uzaklaştırıldı.

Şekil III.1. Tripsinin MS(PEG)₁₂ ile Konjügasyonu

III.5. TRİPSİNİN REAKTİF mPEG 500 ile KONJÜGASYONU

1g mPEG, balon içerisinde 5mL kuru THF'de (tetrahidrofur) çözüldü. Reaksiyon balonuna CDI (%10 aşırı) eklendi ve azot gazı altında, 24 saat, 40°C sıcaklıkta manyetik olarak karıştırıldı. Daha sonra, döner evaporatör ile THF uzaklaştırıldı. Amin-reaktif bileşik oluşturmak üzere, mPEG'in hidroksil grubu CDI ile reaksiyona girdi. Elde edilen ürün soğuk koşullar altında saklandı.

Tripsin (5mg) 5mL 50mM'lık NaHCO₃ (pH~8) tampon çözeltisi içinde çözüldü ve reaktif mPEG'in %15 aşırısı ile karıştırıldı. Reaksiyon 24 saat boyunca oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Reaksiyona girmemiş tripsin, reaktif mPEG ve yan ürünler saf suya karşı diyaliz ile 1 günde uzaklaştırıldı. Daha sonra liyo-filizatör ile su uçurularak konjüge tripsin elde edildi.

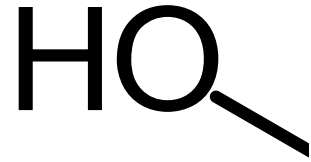
Şekil III.2. mPEG'in Aktivasyonu ve Tripsin ile Konjügasyonu

III.6. TRİPSİNİN REAKTİF PPO 1000 ile KONJÜGASYONU

1g PPO, balon içerisinde 5mL kuru THF'de (tetrahidrofur) çözüldü. Reaksiyon balonuna CDI (%10 aşırı) eklendi ve azot gazı altında, 24 saat, 40°C sıcaklıkta manyetik olarak karıştırıldı. Daha sonra, döner evaporatör ile THF uzak-

laştırıldı. Amin-reaktif bileşik oluşturmak üzere, PPO'nun hidroksil grubu CDI ile reaksiyona girdi. Elde edilen ürün soğuk koşullar altında saklandı.

Tripsin (5mg) 5mL 50mM'luk NaHCO_3 (pH~8) tampon çözeltisi içinde çözüldü ve reaktif PPO'nun %15 aşırısı ile karıştırıldı. Reaksiyon 24 saat boyunca oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Reaksiyona girmemiş tripsin, reaktif PPO ve yan ürünler saf suya karşı diyaliz ile 1 günde uzaklaştırıldı. Daha sonra liyo-filizatör ile su uçurularak konjüge tripsin elde edildi.

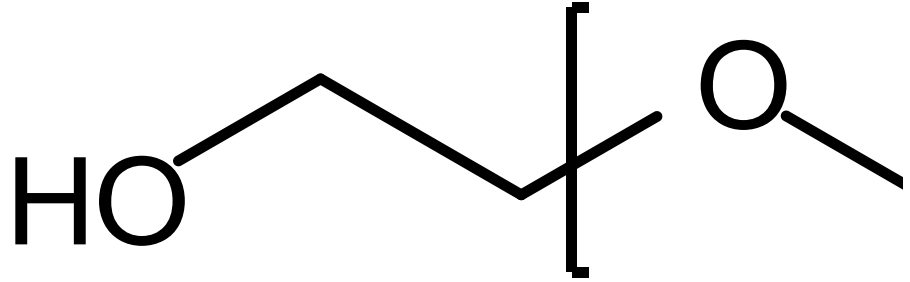


Şekil III.3. PPO'nun Aktivasyonu ve Tripsin ile Konjügasyonu

III.7. TRİPSİNİN REAKTİF Pluronic® 1100 ile KONJÜGASYONU

1g Pluronic®, balon içerisinde 5mL kuru THF’de (tetrahydrofuran) çözüldü. Reaksiyon balonuna CDI (10% aşırı) eklendi ve azot gazı altında, 24 saat, 40°C sıcaklıkta manyetik olarak karıştırıldı. Daha sonra, döner evaporatör ile THF uzaklaştırıldı. Amin-reaktif bileşik oluşturmak üzere, Pluronic®’in hidroksil grubu CDI ile reaksiyona girdi. Elde edilen ürün soğuk koşullar altında saklandı.

Tripsin (5mg) 5mL 50mM’lık NaHCO₃ (pH~8) tampon çözeltisi içinde çözüldü ve reaktif Pluronic’in %15 aşırısı ile karıştırıldı. Reaksiyon 24 saat boyunca oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Reaksiyona girmemiş tripsin, reaktif Pluronic® ve yan ürünler saf suya karşı diyaliz ile 1 günde uzaklaştırıldı. Daha sonra liyofilizatör ile su uçurularak konjüge tripsin elde edildi.

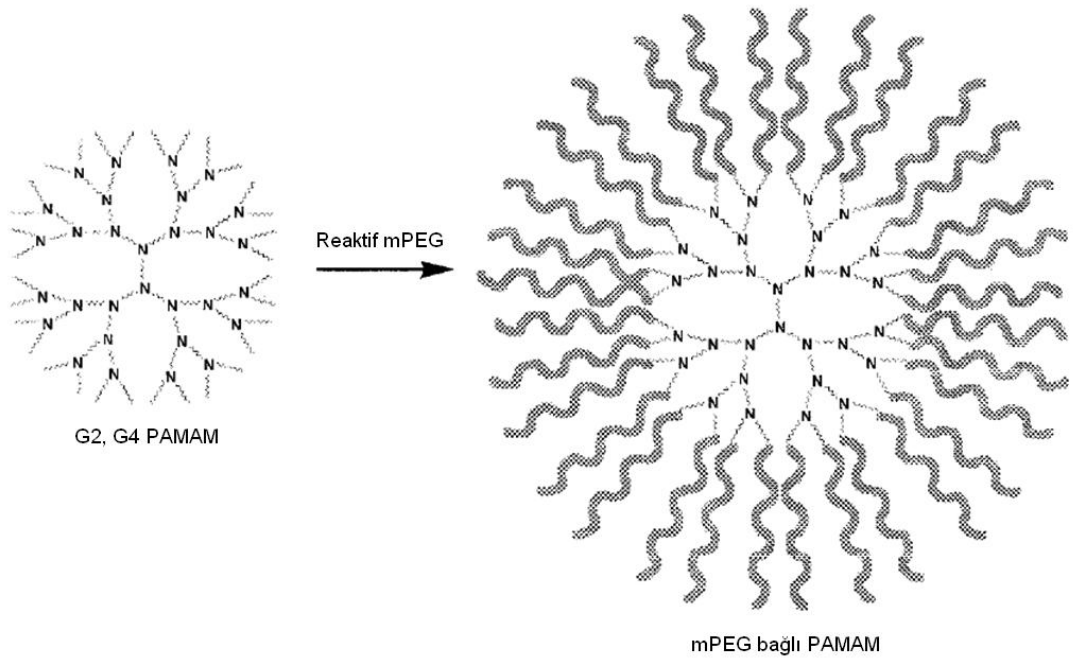


Şekil III.4. Pluronic®’in Aktivasyonu ve Tripsin ile Konjügasyonu

III.8. G2 PAMAM'IN REAKTİF mPEG ile KONJÜGASYONU

G2 PAMAM 16 tane reaktif uç gruba sahiptir ve PAMAM'ın bir ekuivalentlik amino grubuna karşılık iki ekuivalent reaktif mPEG kullanıldı (Şekil III.5). 100mg G2 PAMAM, 10mL DMSO içinde çözüldü ve 584mg reaktif mPEG eklendi. Çözelti 3 gün oda sıcaklığında karıştırıldı. Reaksiyon sonrası, karışım 12000-14000 g/mol molekül ağırlıklı diyaliz membranı kullanılarak saf suya karşı 1 gün diyaliz edildi ve liyofilizatör ile mevcut su uzaklaştırıldı. (%100 modifikasyon)

%50 modifikasyon için, G2 PAMAM'ın 1 ekuivalentlik amino grubuna karşılık ½ ekuivalent reaktif mPEG kullanıldı. 100mg G2 PAMAM, 10mL DMSO içinde çözüldü ve 168mg reaktif mPEG eklendi. Karışım oda sıcaklığında 3 gün manyetik olarak karıştırıldı. Reaksiyon bittikten sonra, 12000-14000 g/mol molekül ağırlıklı diyaliz membranı kullanılarak saf suya karşı 1 gün boyunca diyaliz edildi. Daha sonra mevcut su liyofilizatörle uzaklaştırıldı.



Şekil III.5. PAMAM'ın mPEG ile Konjügasyonu

III.9. G4 PAMAM'IN REAKTİF mPEG ile KONJÜGASYONU

G4 PAMAM 64 tane reaktif uç gruba sahiptir ve PAMAM'ın bir ekuivalentlik amino grubuna karşılık iki ekuivalent reaktif mPEG kullanıldı (Şekil III.5). 100mg G4 PAMAM, 10mL DMSO içinde çözüldü ve 535mg reaktif mPEG eklendi.

Çözelti 3 gün oda sıcaklığında karıştırıldı. Reaksiyon sonrası, karışım 12000-14000 g/mol molekül ağırlıklı diyaliz membranı kullanılarak saf suya karşı 1 gün diyaliz edildi ve liyo-filizatör ile mevcut su uzaklaştırıldı. (%100 modifikasyon)

%50 modifikasyon için, G4 PAMAM'ın 1 ekuvalentlik amino grubuna karşılık ½ ekuvalent reaktif mPEG kullanıldı. 100mg G4 PAMAM, 10mL DMSO içinde çözüldü ve 168mg reaktif mPEG eklendi. Karışım oda sıcaklığında 3 gün manyetik olarak karıştırıldı. Reaksiyon bittikten sonra, 12000-14000 g/mol molekül ağırlıklı diyaliz membranı kullanılarak saf suya karşı 1 gün boyunca diyaliz edildi. Daha sonra mevcut su liyo-filizatörle uzaklaştırıldı.

III.10. POLİMER-TRİPSİN KONJÜGE ÜRÜNLERİNİN HPFP İÇİNDEKİ ÇÖZÜNÜRLÜKLERİ

1mg mPEG-Tripsin, PPO-Tripsin ve Pluronic®-Tripsin konjüğe ürünleri 1 mL HPFP içine eklendi. İlk etapta su banyosunda sıcaklık 1 derecelik artışla 20°C'den 50°C'ye kadar yükseltilerek çözünüp çözünmediği kontrol edildi.

Daha sonra bu ürünlerden aynı konsantrasyonda üçer örnek hazırlandı. İlk mPEG-Tripsin, PPO-Tripsin ve Pluronic®-Tripsin üçlüsünün oda sıcaklığında (20°C) dengeye gelmesi beklendi. Diğer örneklerin de buzdolabında (4°C) ve su banyosunda (37°C) dengeye gelmesi beklendi. Ortam koşullarında, çözünmeyen kısımlar süzüldü, 55°C'de HPFP su banyosu içinde buharlaştırıldı. Her bir örneğin üzerine 700µL saf su eklendi ve UV spektrofotometresiyle 280nm'de absorpsiyonu ölçüldü. Bilinmeyen konsantrasyonlar, kalibrasyon eğrisi kullanılarak ayrı ayrı hesaplandı. Kalibrasyon eğrisi: 1, 2, 3, 4, 5 x 10⁻⁵M konsantrasyonlarında, su içinde standart tripsin çözeltileri hazırlandı ve bu çözeltilerin 280nm'deki UV absorpsiyonları ölçüldü. Konsantrasyona karşı absorpsiyon grafiği çizilerek kalibrasyon eğrisi elde edildi.

III.11. PEG-PAMAM KONJÜGE ÜRÜNLERİNİN HPFP İÇİNDEKİ ÇÖZÜNÜRLÜKLERİ

Modifiye olmamış G2 ve G4 PAMAM HPFP içinde çözünmemektedir. 1mg %50 ve %100 G2 PAMAM-PEG ile %50 ve %100 G4 PAMAM, 1mL HPFP içine eklendi. Su banyosunda sıcaklık 1 derecelik artışla 20°C'den 50°C'ye yükseltilerek çözünürlük davranışları incelendi.

Her bir konjügasyon ürününün HPFP içinde, oda sıcaklığındaki çözünürlük limiti bulundu. Tüm örnekler için çözünürlük limitinin ağırlıkça 1/10, ½, 2 ve 5 katı konsantrasyonlarında karışımlar hazırlanarak 5'er örnek elde edildi. Daha sonra bu örneklerin su banyosunda sıcaklık, bir derecelik artışla, 20°C'den 40°C'ye kadar yükseltılarak çözünürlük davranışı incelendi. Yine aynı şekilde örneklerin reometrede, bir derecelik azalmayla, sıcaklık 20°C'den 4°C'ye düşürülerek çözünürlük davranışları incelendi. Elde edilen veriler grafiğe geçirildi.

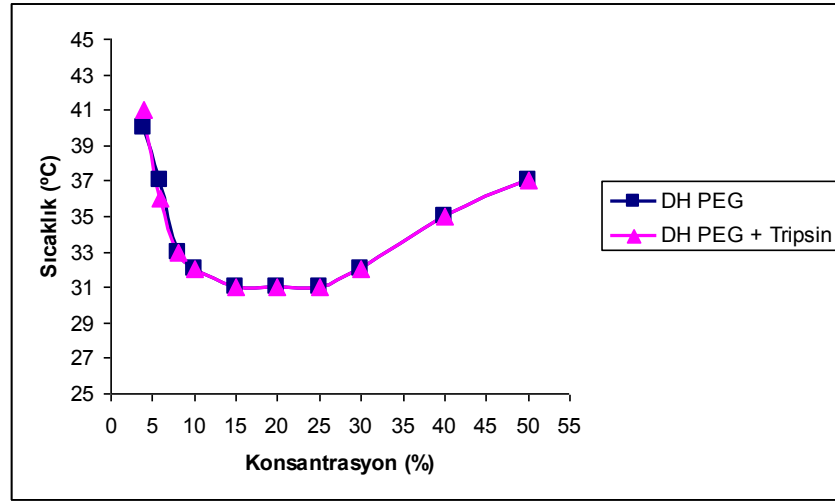
III.11.1. %50 Modifiye mPEG-PAMAM G2/G4 Örneklerinin Hazırlanması

1mg örnek 1mL aseton içinde çözüldü (stok çözelti). Bu stok çözelti seyreltilerek istenen konsantrasyonlar hazırlandı. Aseton buharlaştırıldı ve kuru örneklerin üzerine 1mL HPFP eklendi.

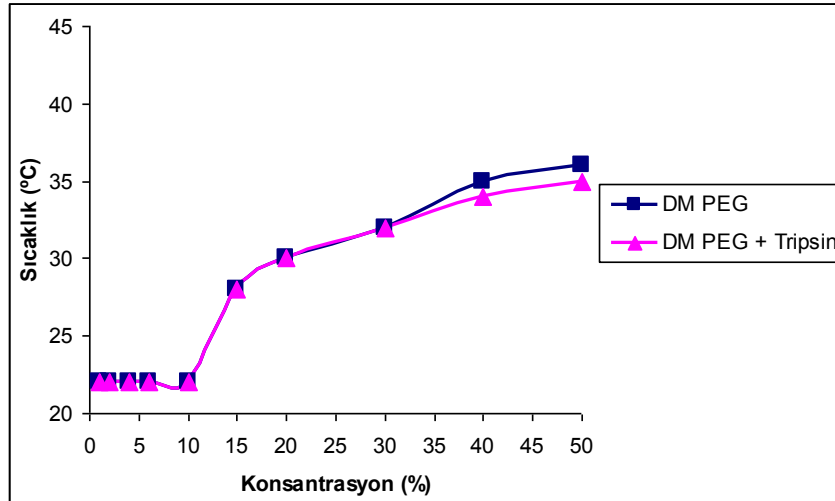
BÖLÜM IV

SONUÇLAR ve TARTIŞMA

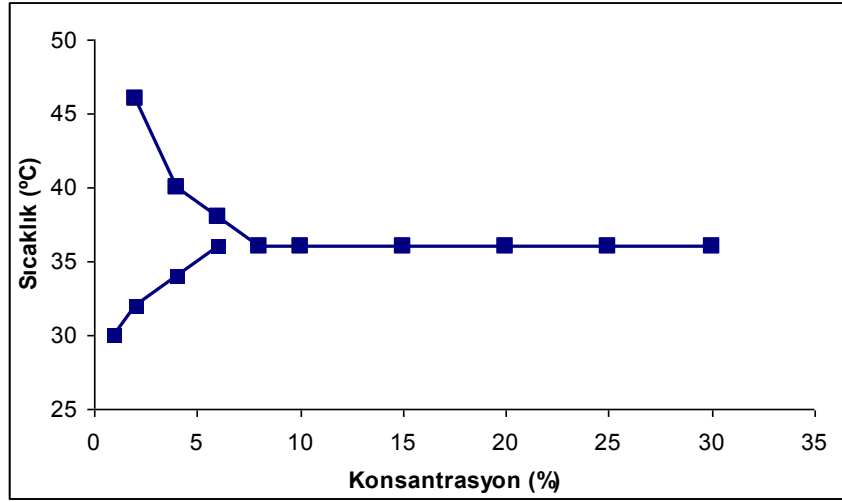
IV.1. FAZ DİYAGRAMLARI



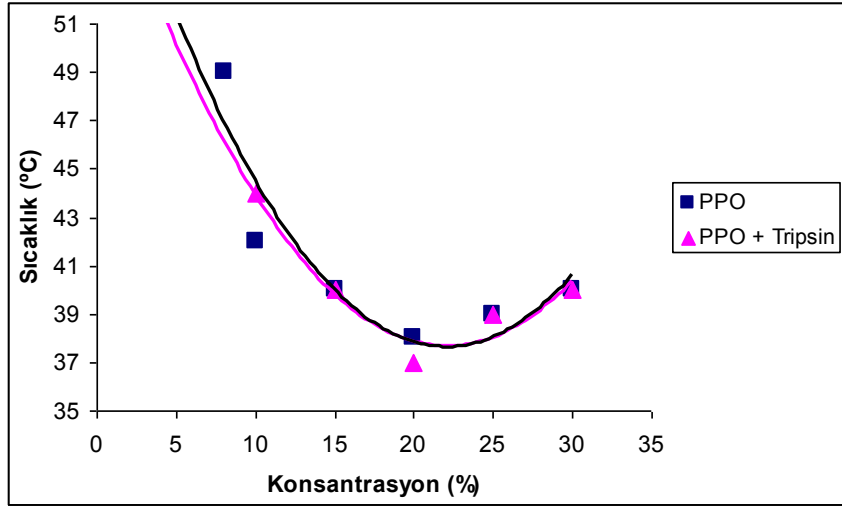
Şekil IV.1. DH PEG 600'un HPFP İçindeki Faz Davranışı



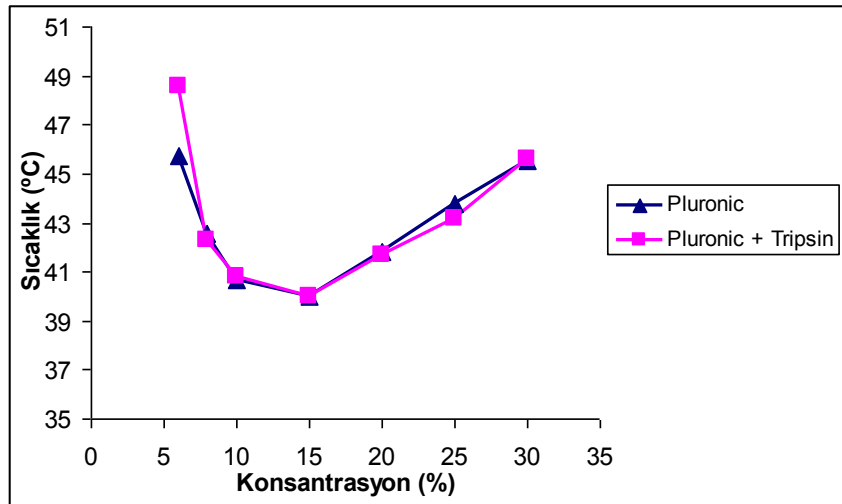
Şekil IV.2. DM PEG 1000'in HPFP İçindeki Faz Davranışı



Şekil IV.3. DH PEG 1000'in HPFP İçindeki Faz Davranışı



Şekil IV.4. PPO 1000'in HPFP İçindeki Faz Davranışı



Şekil IV.5. Pluronic® 1100'ün HPFP İçindeki Faz Davranışı

Değişik fonksiyonel gruplara ve molekül ağırlığına sahip polietilen glikol, polipropilen glikol ve Pluronic® polimerlerinin HPFP içerisinde konsantrasyon-sıcaklık grafikleri çizildi. Model protein olarak kullanılan tripsin HPFP içinde çözünür değildir. Belli miktar tripsin, polimer-HPFP çözeltilerine eklenerek, bu polimerlerin tripsinin çözünürlüğüne katkıda bulunup bulunmadığı incelendi.

mPEG 500 incelenen bütün konsantrasyon ve sıcaklıklarda HPFP içinde tamamen çözüldü. Oda sıcaklığına soğutulduktan sonra, tüm konsantrasyonlara 1mg tripsin eklendi ve çözünürlük davranışı sıcaklık yükseltilecek tekrar incelendi. Bütün mPEG örnekleri tüm sıcaklıklarda çözünürken tripsin çözünmedi.

Şekil IV.1 iki ucunda hidroksil grubu taşıyan PEG 600'ün HPFP içindeki faz davranışını göstermektedir. Sıcaklığın arttırılmasıyla, başlangıçta HPFP içinde çözünen dihidroksil PEG 600 bulanıklaştı. Oda sıcaklığında tüm örnekler 1mg tripsin eklenerek faz diyagramı aynı şekilde tekrar incelendi ve dihidroksil PEG 600'ün aynı çözünürlük davranışına sahip olduğu ve tripsinin çözünmediği görüldü.

Şekil IV.3 dihidroksil PEG 1000'in HPFP içindeki ilginç faz diyagramını göstermektedir. Başlangıçta HPFP içinde çözünmeyen dihidroksil PEG 1000, sıcaklığın arttırılmasıyla bulanık faz davranışı sergiledi. Şekil IV.3'te gösterildiği gibi, sadece düşük konsantrasyonlardaki (ağırlıkça %1-2-4) dihidroksil PEG 1000 30 ile 46°C arasında çözüldü ve ısıtılmaya devam edildikçe tekrar bulanıklaştı.

PPO, PEG'den farklı olarak, kendi zinciri üzerinde PEG'in bir hidrojeni yerine metil grubu taşır ve bu metil gruplarından dolayı, zincirin iki ucu da hidroksil olmasına rağmen, HPFP içinde PEG polimerlerinden daha fazla çözünür olması beklendi. Dihidroksil PEG 1000 ile karşılaştırıldığında, PPO HPFP içinde çözüldü ve sıcaklığın arttırılmasıyla bulanıklaştı (Şekil IV.4). PPO örneklerine 1mg tripsin eklenip sıcaklık arttırıldığında, PPO'nun faz davranışı değişmediği gibi tripsin de çözünmedi.

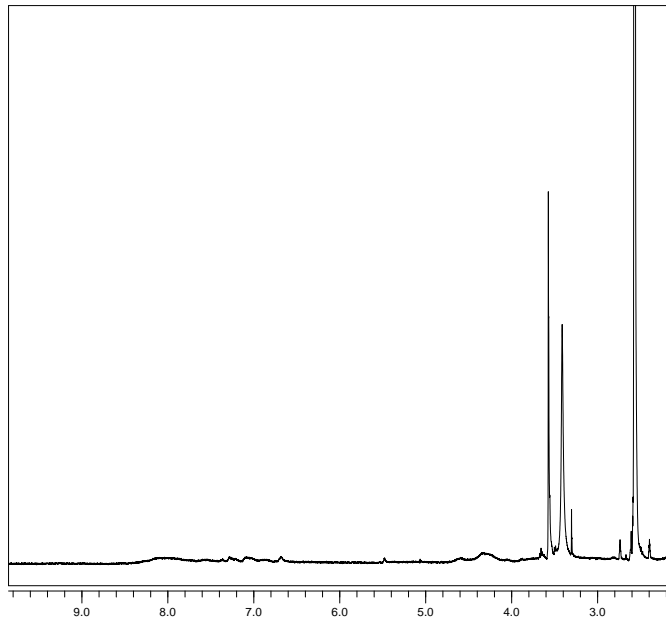
Pluronic®, iki polietilen oksit bloğunun arasında bir polipropilen oksit bloğu ve zincirin her iki ucunda hidroksil grubundan oluşur. Benzer şekilde, oda sıcaklığında HPFP içinde çözüldü ve sıcaklığın arttırılmasıyla bulanık faz davranışı gösterdi. 1mg tripsin eklendiğinde, Pluronic® aynı faz davranışına sahipti ve yine tripsin çözünmedi (Şekil IV.5)

Bu faz diyagramlarına göre, molekül ağırlığı arttıkça, çözünürlüğün azaldığı gözlemlendi. Ayrıca monometil ve dimetil uç gruplarına sahip PEG'ler dihidroksil uç gruplu PEG'lere nazaran daha çok çözünürdür. Bu durum, çözünürlüğün zincir

sonundaki uç gruplar veya zincir üzerindeki fonksiyonel gruplar ile çözücü arasındaki etkileşime bağlı olduğu ile açıklanabilir. Fonksiyonel grup ile çözücü arasında oluşan hidrojen bağları çözünürlüğü arttırmaktadır. Polimer-HPFP çözeltilerinde hidrojen bağına dayalı üç tip etkileşim düşünülebilir. Polimer-polimer arasında, polimer-çözücü arasında ve çözücü-çözücü arasında hidrojen bağları oluşabilir.

Yukarıda anlatıldığı gibi, polimer çözeltilerine tripsin eklendiğinde, proteinin çözünürlüğünde değişme gözlenmedi. Yani, kullanılan PEG, PPO ve Pluronic®, HPFP içinde tripsin ile fiziksel olarak karıştırıldığında aralarında herhangi bir reaksiyon gerçekleşmediğinden tripsinin çözünürlüğünü arttırmadı. Bu durum, polimerlerdeki hidroksil uç gruplarının, tripsindeki amin gruplarıyla kimyasal olarak reaksiyona girebilmesi için karbonil grubuna yükseltgenmesi gerektiğini önerdi. mPEG 500, incelenen tüm sıcaklık ve konsantrasyonlarda çözüldüğünden, tripsinin konjügasyonunda bu polimer kullanıldı.

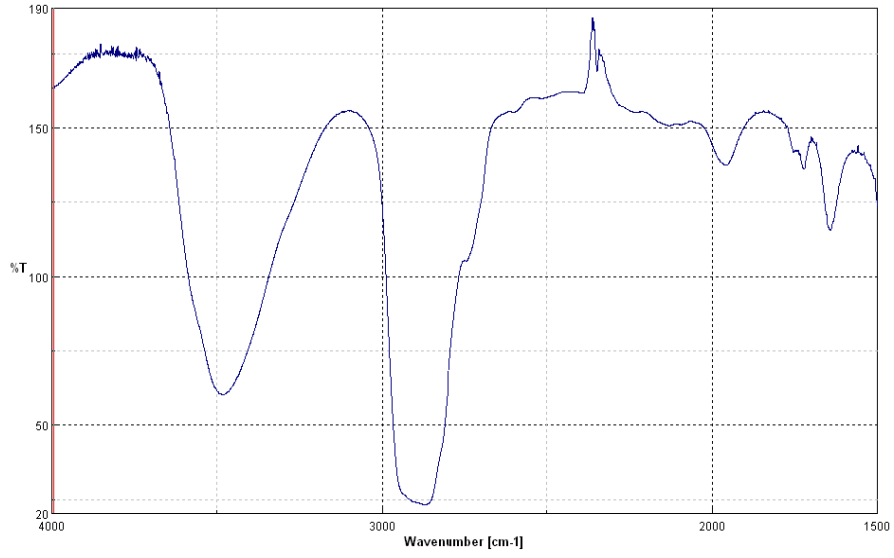
IV.2. TRİPSİNİN MS(PEG)₁₂ ile KONJÜGASYONU



Şekil IV.6. MS(PEG)₁₂ ile Konjüge Tripsinin ¹H NMR Spektrumu / d-DMSO

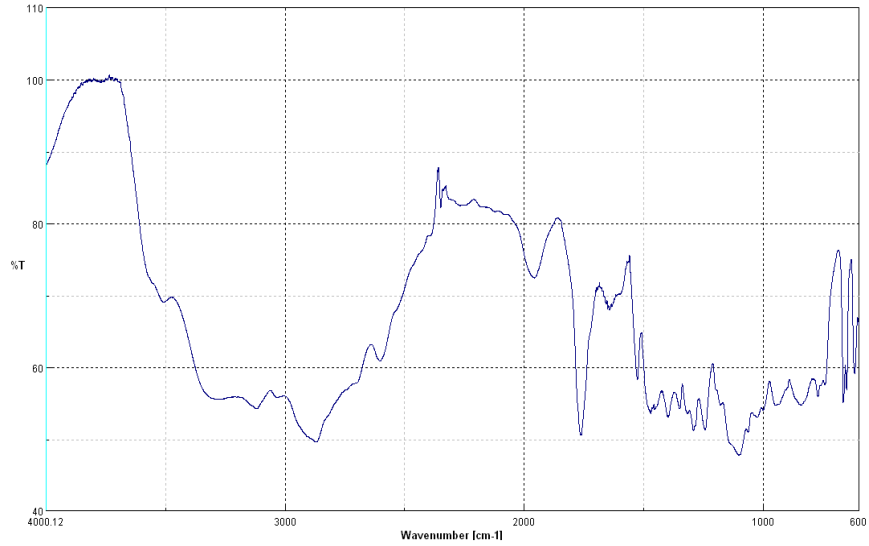
MS(PEG)₁₂-Tripsin, ¹H NMR (d-DMSO): 0.8-1.3ppm (-NH, tripsin), 3.0-4.0ppm (-O-CH₂-CH₂-, MS(PEG)₁₂)

IV.3. POLİMERLERİN AKTİVASYONU



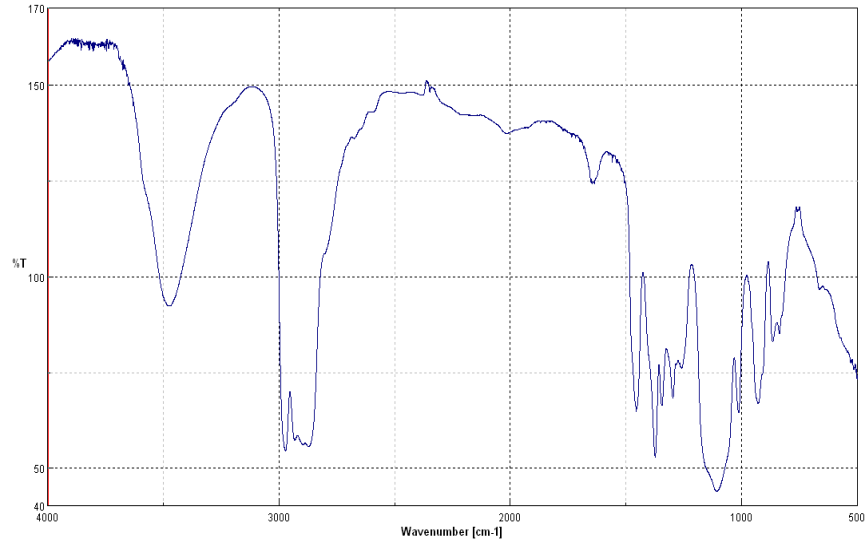
Şekil IV.7. mPEG'in FT-IR Spektrumu

mPEG, FT-IR (KBr): 3493cm^{-1} (-OH, mPEG), 1764cm^{-1} (doymuş C=O, imidazol), 2871cm^{-1} (doymuş -CH₂, PEG)



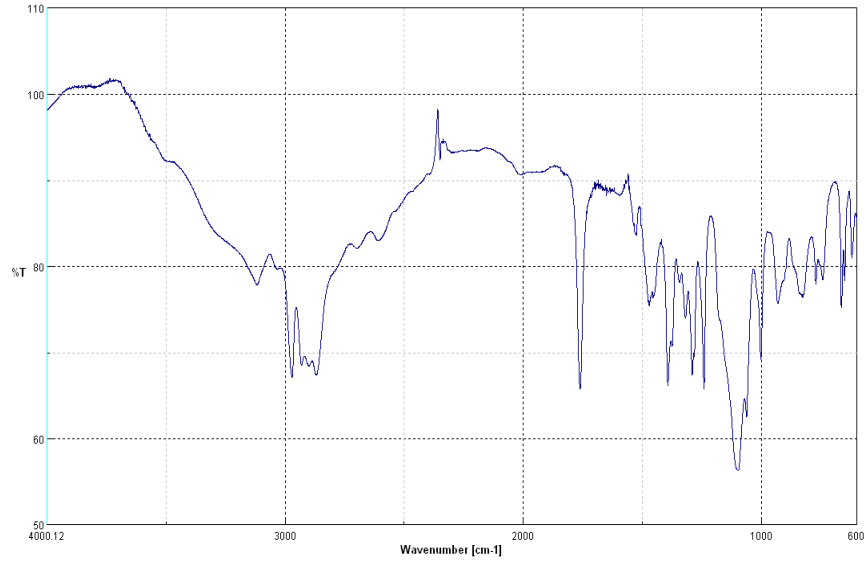
Şekil IV.8. Reaktif mPEG'in FT-IR Spektrumu

Reaktif mPEG, FT-IR (KBr): 1764cm^{-1} (doymuş C=O, imidazol), 2871cm^{-1} (doymuş -CH₂, PEG), 3118cm^{-1} (alken, imidazol)



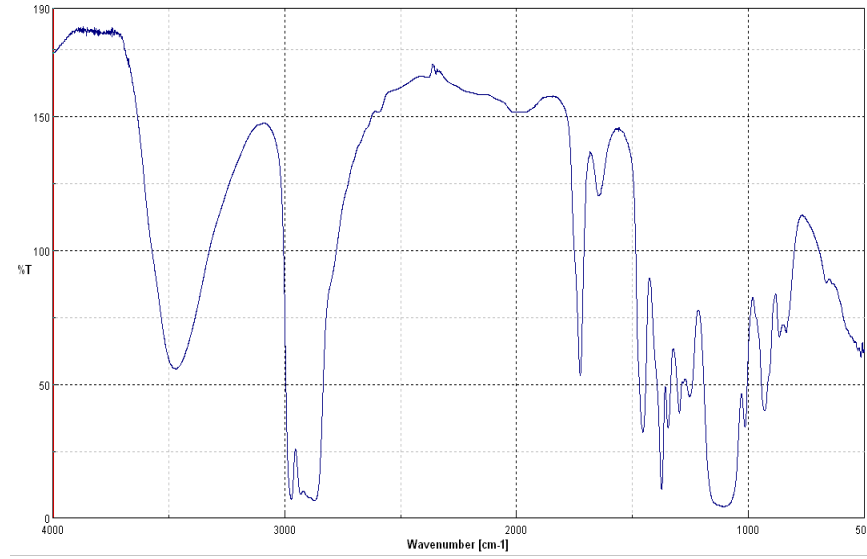
Şekil IV.9. PPO'nun FT-IR Spektrumu

PPO, FT-IR (KBr): 3490cm^{-1} (-OH, PPO) 1761cm^{-1} (doymuş C=O, imidazol), 2870cm^{-1} (doymuş $-\text{CH}_2-$, PPO), 2972cm^{-1} (doymuş $-\text{CH}_3$, PPO)



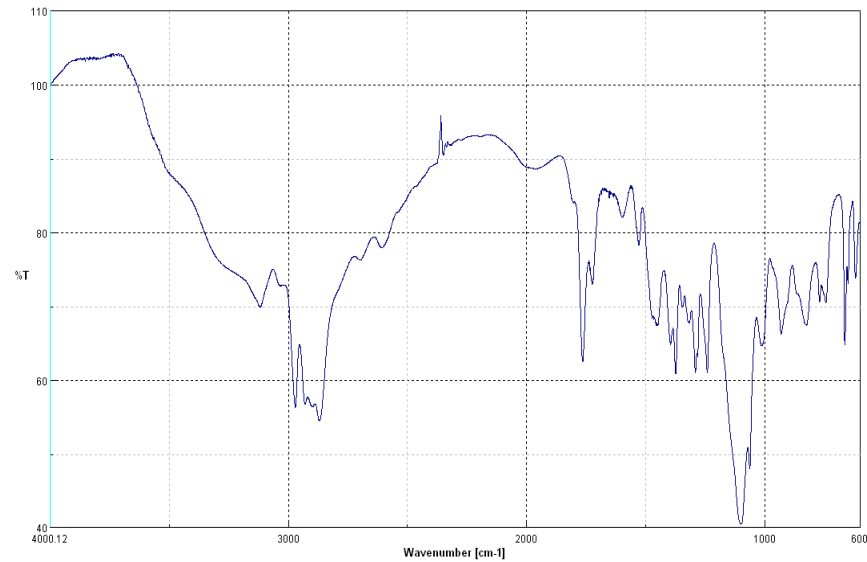
Şekil IV.10. Reaktif PPO'nun FT-IR Spektrumu

Reaktif PPO, FT-IR (KBr): 1761cm^{-1} (doymuş C=O, imidazol), 2870cm^{-1} (doymuş $-\text{CH}_2-$, PPO), 2972cm^{-1} (doymuş $-\text{CH}_3$, PPO), 3118cm^{-1} (alken, imidazol)



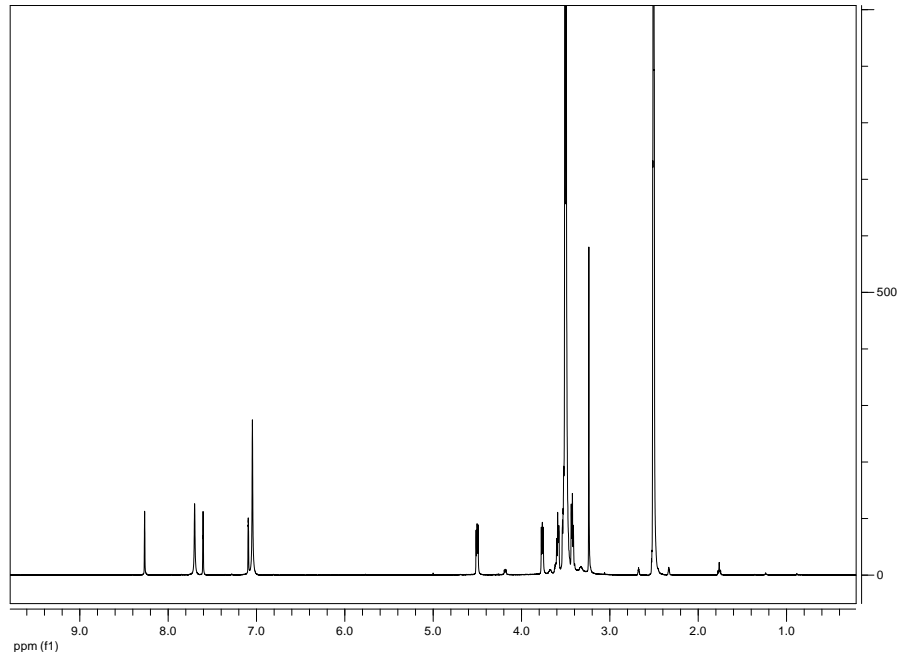
Şekil IV.11. Pluronic®'in FT-IR Spektrumu

Pluronic®, FT-IR (KBr): 3490cm^{-1} (-OH, Pluronic®) 2870cm^{-1} (doymuş -CH₂-, Pluronic®), 2971cm^{-1} (doymuş -CH₃, Pluronic®)



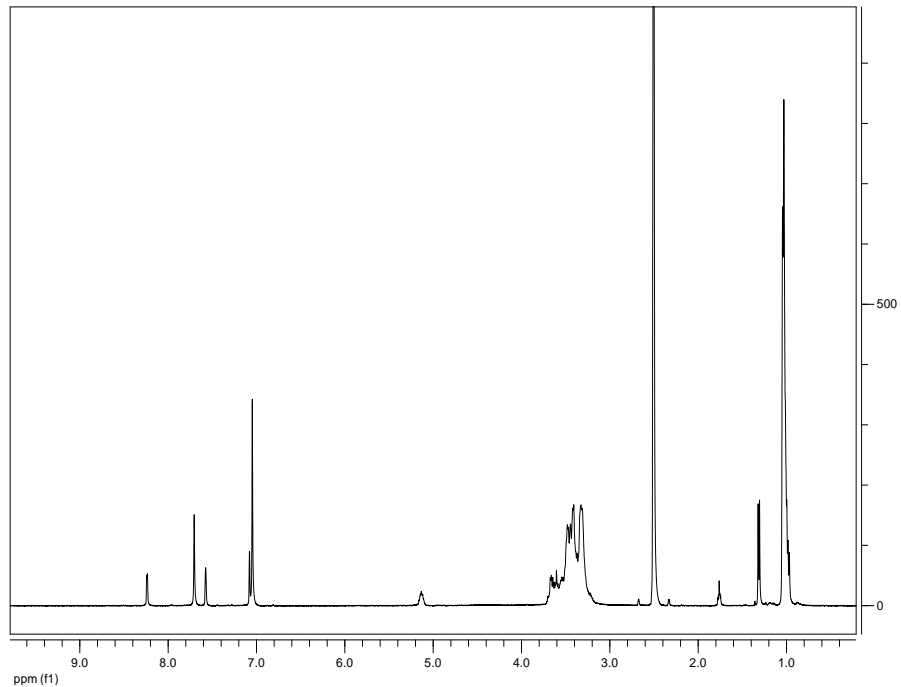
Şekil IV.12. Reaktif Pluronic®'in FT-IR Spektrumu

Reaktif Pluronic®, FT-IR (KBr): 1765cm^{-1} (doymuş C=O, imidazol), 2870cm^{-1} (doymuş -CH₂-, Pluronic®), 2971cm^{-1} (doymuş -CH₃, Pluronic®)



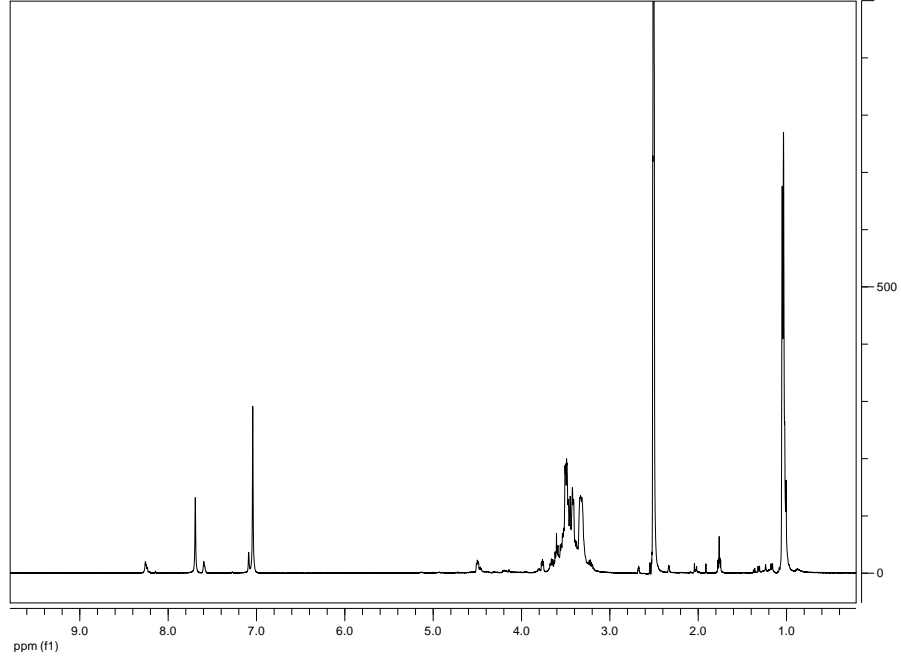
Şekil IV.13. Reaktif mPEG'in ^1H NMR Spektrumu / d-DMSO

Reaktif mPEG, ^1H NMR (d-DMSO): 3.0-4.0ppm (-O-CH₂-CH₂-, PEG), 7.0-8.2ppm (imidazol)



Şekil IV.14. Reaktif PPO'nun ^1H NMR Spektrumu / d-DMSO

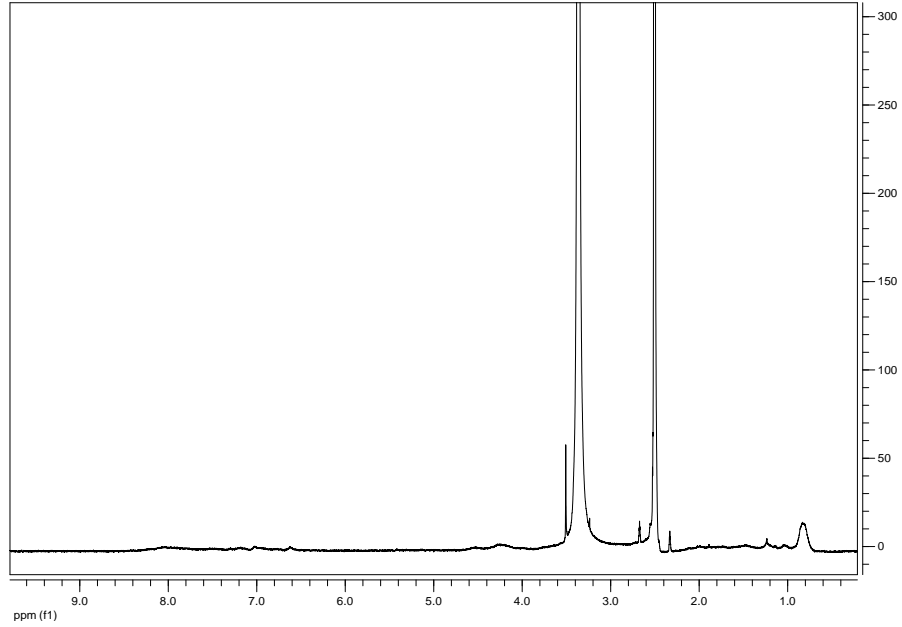
Reaktif PPO, ^1H NMR (d-DMSO): 1.0ppm (-CH₃, PPO), 3.0-4.0ppm (-O-CH-CH₂-, PPO), 7.0-8.2ppm (imidazol)



Şekil IV.15. Reaktif Pluronic®'in ^1H NMR Spektrumu / d-DMSO

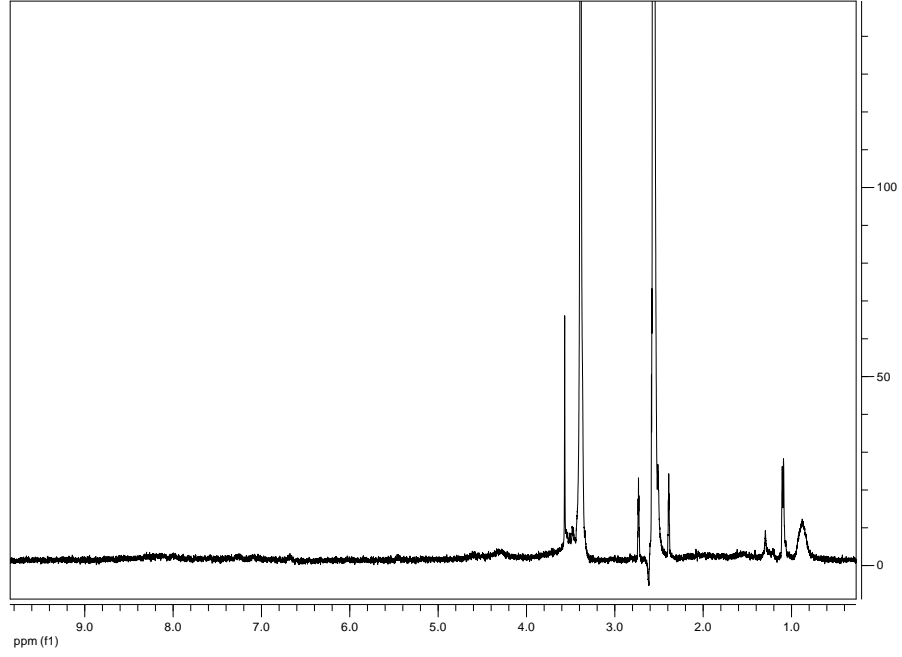
Reaktif Pluronic®, ^1H NMR (d-DMSO): 1.0ppm ($-\text{CH}_3$, PPO), 3.0-4.0ppm ($-\text{O}-\text{CH}-\text{CH}_2-$, PPO), 7.0-8.2ppm (imidazol)

IV.4. TRİPSİNİN REAKTİF POLİMERLER İLE KONJÜGASYONU



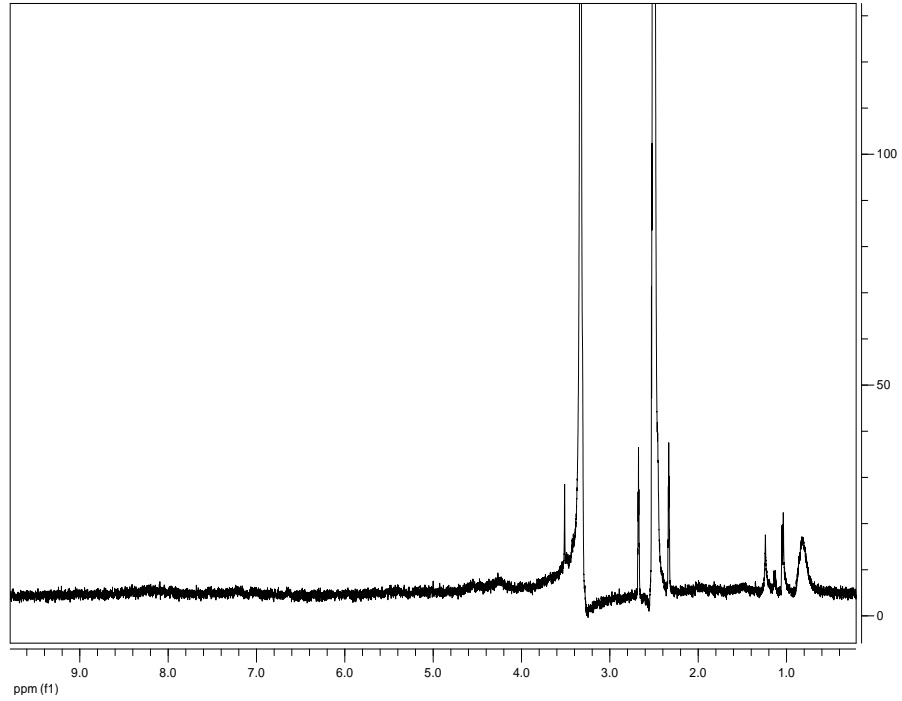
Şekil IV.16. mPEG ile Konjüge Tripsinin ^1H NMR Spektrumu / d-DMSO

mPEG-Tripsin, ^1H NMR (d-DMSO): 0.8-1.3ppm ($-\text{NH}$, tripsin), 3.0-4.0ppm ($-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, PEG)



Şekil IV.17. PPO ile Konjüge Tripsinin ^1H NMR Spektrumu / d-DMSO

PPO-Tripsin, ^1H NMR (d-DMSO): 0.8-1.3ppm (-NH, tripsin), 1.0ppm (-CH₃, PPO), 3.0-4.0ppm (-O-CH-CH₂-, PPO)



Şekil IV.18. Pluronic[®] ile Konjüge Tripsinin ^1H NMR Spektrumu / d-DMSO

Pluronic[®]-Tripsin, ^1H NMR (d-DMSO): 0.8-1.3ppm (-NH, tripsin), 1.0ppm (-CH₃, Pluronic[®]), 3.0-4.0 ppm (-O-CH₂-CH₂-, Pluronic[®])

IV.5. KONJÜGE TRİPSİN ÖRNEKLERİNİN HPFP İÇİNDEKİ ÇÖZÜNÜRLÜKLERİ

Tripsin, MS(PEG)₁₂, mPEG 500, PPO 1000 ve Pluronic® 1100 ile konjüge edildi. Her bir konjüge üründen 1mg tartılarak 1mL HPFP içine eklendi. Örnekler HPFP içinde bulanıktı. Su banyosu içine yerleştirilerek sıcaklığın çözünürlük üzerine etkisi araştırıldı. Ancak incelenen tüm sıcaklıklarda örnekler bulanık kaldı.

Tablo IV.1. Konjüge Tripsin Örneklerinin HPFP İçindeki Çözünürlükleri

<i>Örnek (1mg/1mL HPFP)</i>	<i>Çözünürlük</i>
MS(PEG) ₁₂ -Tripsin	Bulanık
mPEG-Tripsin	Bulanık
PPO-Tripsin	Bulanık
Pluronic®-Tripsin	Bulanık

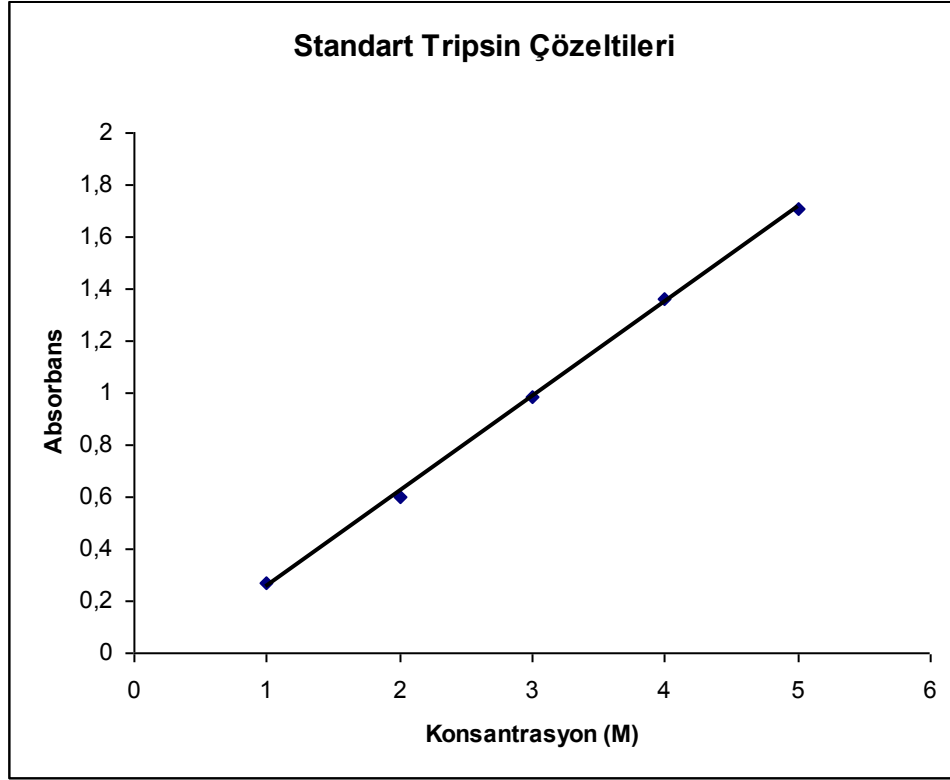
mPEG, PPO ve Pluronic® labotaruvar koşullarında CDI kullanılarak reaktif hale getirildi. MS(PEG)₁₂ Sigma Aldrich'ten satın alındı. Ticari olarak mevcut reaktif polimer ile laboratuvar koşullarında sentezlenen reaktif polimerler ile yapılan konjügasyon ürünleri birbiriyle karşılaştırıldığında elde edilen sonuç aynıdır.

IV.5.1. Örneklerin Kantitatif Analizi

UV spektrofotometresinde hazırlanan stok tripsin çözeltisinin öncelikle hangi dalga boyunda absorpsiyon verdiği bulundu (280nm). 1, 2, 3, 4, 5 x 10⁻⁵M standart tripsin çözeltileri hazırlandı ve UV spektrofotometresi ile 280nm dalga boyunda absorpsiyonları ölçüldü. Elde edilen bu verilerle kalibrasyon grafiği oluşturuldu.

Tablo IV.2. Standart Tripsin Çözeltilerinin 280nm'deki Absorbansları

<i>C (M x 10⁻⁵)</i>	<i>Absorbans (280nm)</i>
1	0.26717
2	0.60208
3	0.98304
4	1.36432
5	1.71013



Şekil IV.19. Standart Tripsin Çözeltilerinin Kalibrasyon Eğrisi

$$\text{Eğrinin Fonksiyonu: } y = 0.3648x - 0.1091 \quad (\text{IV.1})$$

$$x = \frac{y + 0.1091}{0.3648} \quad (\text{IV.2})$$

x: Konsantrasyon

y: Absorbans

mPEG-Tripsin, PPO-Tripsin ve Pluronic®-Tripsin ürünlerinde üçer adet 1mg/mL HPFP konsantrasyonunda numuneler hazırlandı. 4°C, 20°C ve 37°C sıcaklıklarda dengeye gelmesi beklendi. Ortam koşullarında çözünmeyen kısımlar süzüldü, her birine 700µL su eklenerek, 280nm’de UV absorbansları ölçüldü. Yukarıda denklemde ölçülen değerler yerine konarak çözünen miktar tayin edildi. Ayrıca karşılaştırmak için 3 tane 1mg tripsin/mL HPFP örneği hazırlandı. Yukarıdaki sıcaklıklarda, aynı metod kullanılarak HPFP içinde çözünen tripsin miktarı da hesaplandı (Tablo IV.3 ve Tablo IV.4)

Tablo IV.3. Farklı Konjüge Tripsinlerin Farklı Sıcaklıklardaki UV Absorbansları

<i>NUMUNE</i>	<i>4°C - Abs (nm)</i>	<i>20°C - Abs (nm)</i>	<i>37°C - Abs (nm)</i>
Tripsin	0.0195	0.0671	0.0354
PPO-Tripsin	0.0484	0.0620	0.0305
Pluronic® -Tripsin	0.0825	0.0420	0.0479
mPEG-Tripsin	0.1046	0.0447	0.0333

Tablo IV.4. Farklı Konjüge Tripsinlerin Farklı Sıcaklıklarda HPFP İçinde Çözünen Miktarları

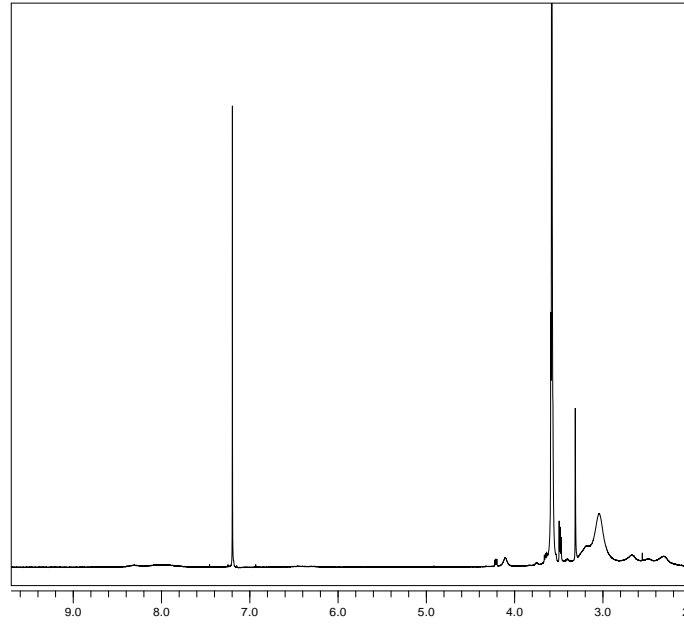
<i>NUMUNE</i>	<i>4°C - C (Mx10⁻⁵)</i>	<i>20°C - C (Mx10⁻⁵)</i>	<i>37°C - C (Mx10⁻⁵)</i>
Tripsin	0.352	0.483	0.396
PPO-Tripsin	0.432	0.469	0.383
Pluronic® -Tripsin	0.525	0.414	0.430
mPEG-Tripsin	0.586	0.422	0.390

Farklı polimer-tripsin konjüge ürünlerin farklı sıcaklıklardaki çözünürlükleri kantitatif olarak UV spektrofotometresi vasıtasıyla hesaplandı. HPFP içinde bulanık olan örneklerin sadece 4°C sıcaklıkta çözünürlüğünün biraz arttığı görüldü. mPEG, PPO, Pluronic® ve HPFP 280nm dalga boyunda pik vermemektedir. 280nm'de sadece tripsin, absorbans vermektedir. 1mg polimer-tripsin konjüge örneklerinde, sadece tripsin içeren örneğe (1mg/1mL HPFP) nazaran daha düşük miktarda tripsin bulunur. Ancak 280nm'de absorbansları ölçüldüğünde, konjüge ürünlerin daha fazla absorbans değeri verdiği görüldü. Bu da demek oluyor ki konjügasyon çok az da olsa çözünürlüğü arttırdı.

20°C ve 37°C'de ise sıcaklığın çözünürlük üzerine etkisi olmadığı görüldü.

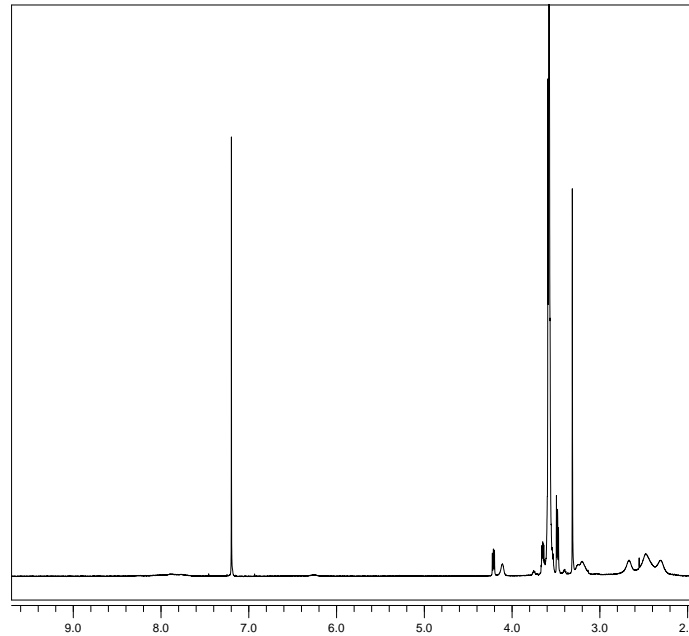
Son olarak, PPO ve Pluronic® zincirlerinin her iki ucunda hidroksil grubu vardır. Aktivasyon sırasında her iki hidroksil grubu da karbonil grubuna çevrilmiş olabilir ve tripsindeki 10 tane amin grubuyla reaksiyona girdiğinde çapraz bağlı yapı oluşmuş olabilir. Çapraz bağlı yapılar hiçbir solvent de çözünmez. mPEG'de bir tane hidroksil grubu, CDI ile reaktif karbonil grubuna dönüştü ancak çapraz bağlı yapı oluşmamasına rağmen HPFP içinde tripsinin çözünürlüğünü pek arttırmadı.

IV.6. G2 PAMAM'IN REAKTİF mPEG ile KONJÜGASYONU



Şekil IV.20. %50 Modifiye mPEG-PAMAM G2'nin ^1H NMR Spektrumu / CDCl_3

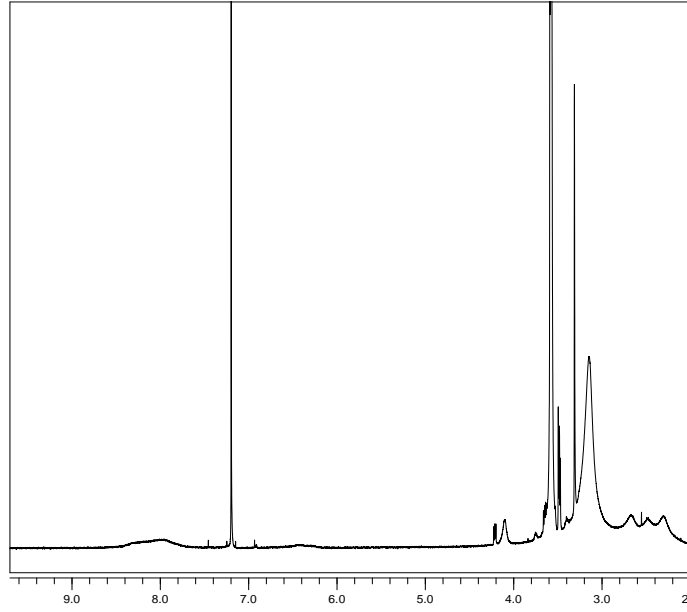
%50 mPEG-PAMAM G2, ^1H NMR (CDCl_3): 0.8-1.2ppm (-NH, PAMAM),
2.2-2.8ppm (PAMAM), 3.0-4.0ppm (-O-CH₂-CH₂-, PEG)



Şekil IV.21. %100 Modifiye mPEG-PAMAM G2'nin ^1H NMR Spektrumu / CDCl_3

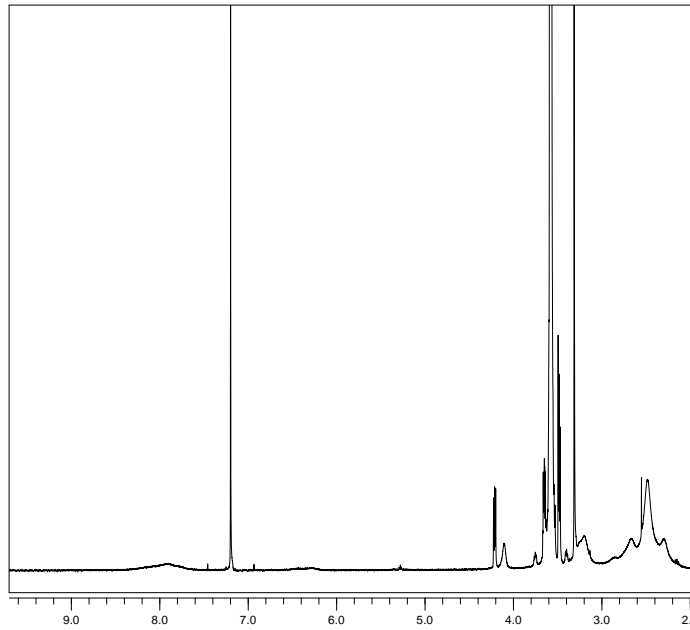
%100 mPEG-PAMAM G2, ^1H NMR (CDCl_3): 0.8-1.2ppm (-NH, PAMAM),
2.2-2.8ppm (PAMAM), 3.0-4.0ppm (-O-CH₂-CH₂-, PEG)

IV.7. G4 PAMAM'IN REAKTİF mPEG ile KONJÜGASYONU



Şekil IV.22. %50 Modifiye mPEG-PAMAM G4'ün ^1H NMR Spektrumu / CDCl_3

%50 mPEG-PAMAM G4, ^1H NMR (CDCl_3): 0.8-1.2ppm (-NH, PAMAM),
2.2-2.8ppm (PAMAM), 3.0-4.0ppm (-O-CH₂-CH₂-, PEG)



Şekil IV.23. %100 Modifiye mPEG-PAMAM G4'ün ^1H NMR Spektrumu / CDCl_3

%100 mPEG-PAMAM G4, ^1H NMR (CDCl_3): 0.8-1.2ppm (-NH, PAMAM),
2.2-2.8ppm (PAMAM), 3.0-4.0ppm (-O-CH₂-CH₂-, PEG)

IV.8. mPEG-PAMAM KONJÜGE ÜRÜNLERİNİN HPFP İÇİNDEKİ ÇÖZÜNÜRLÜKLERİ

1mg örnek tartılarak 1mL HPFP içine eklendi. Oda sıcaklığında, konjüge olmamış G2 PAMAM, G4 PAMAM, mPEG ile %50 konjüge G2 PAMAM ve G4 PAMAM HPFP içinde çözünmedi. %100 oranında mPEG yapılan konjügasyon ise G2-G4 PAMAM'ın HPFP içinde tamamen çözünmesini sağladı (Tablo IV.5).

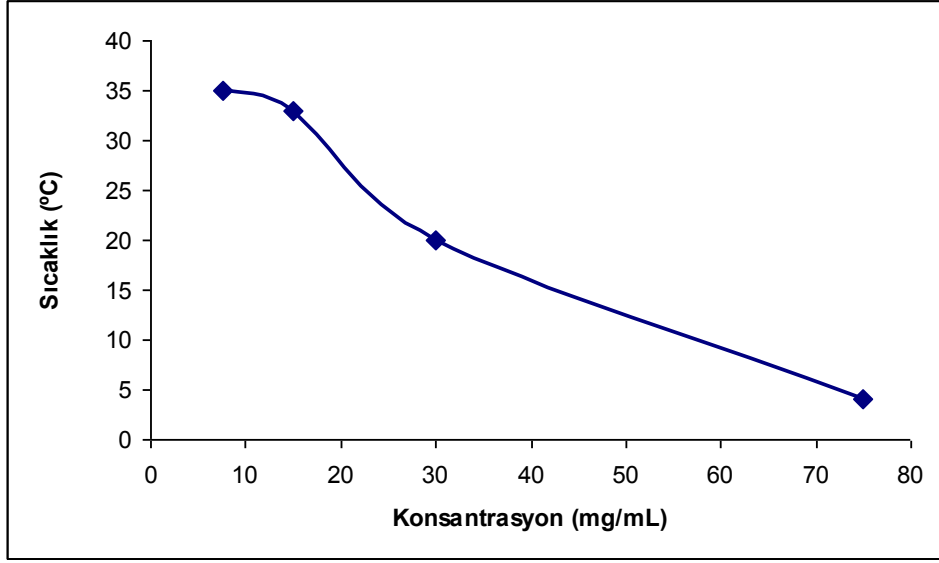
Tablo IV.5. mPEG-PAMAM Konjüge Ürünlerin HPFP İçindeki Çözünürlüğü

<i>Örnek</i>	<i>Konjügasyon Derecesi</i>	<i>Çözünürlük</i>
G2/G4 PAMAM	0	Çözünmez
G2 PAMAM	%50	Çözünmez
G2 PAMAM	%100	Çözünür
G4 PAMAM	%50	Çözünmez
G4 PAMAM	%100	Çözünür

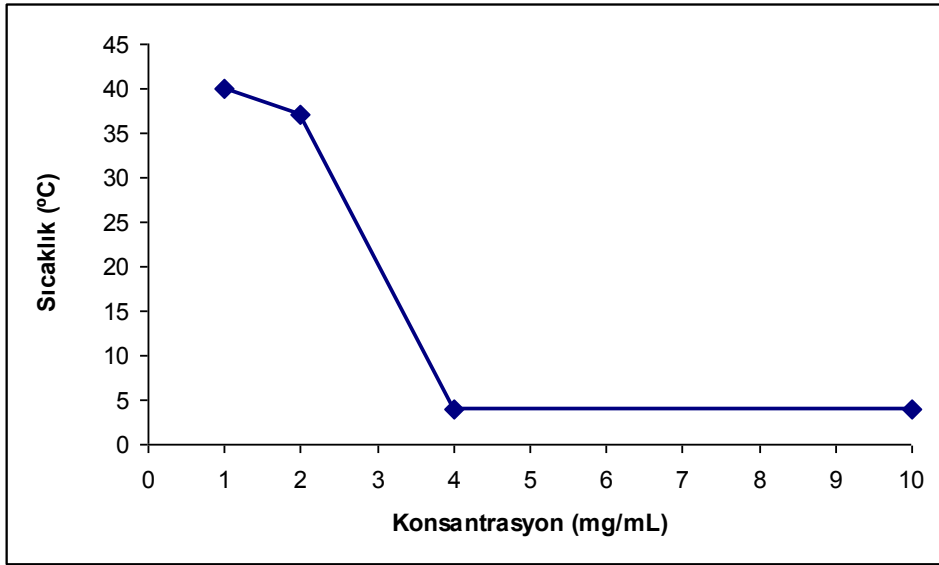
Daha sonra elde edilen konjügasyon ürünlerinin 1mL HPFP içindeki çözünürlük limitleri araştırıldı (Tablo IV.6). Her bir ürün için, çözünen miktarın 1/10, ½, 2 ve 5 katı miktarları tartılarak ayrı ayrı 1mL HPFP içine aktarıldı. 4°C ile 40°C arasındaki faz davranışları incelendi.

Tablo IV.6. mPEG-PAMAM G2-G4 Örneklerinin 1mL HPFP İçindeki Çözünürlük Limitleri

<i>Örnek</i>	<i>Çözünürlük limiti (mg/mL HPFP)</i>
mPEG-PAMAM G2 %50	0.1
mPEG-PAMAM G2 %100	15
mPEG-PAMAM G4 %50	0.1
mPEG-PAMAM G4 %100	2



Şekil IV.24. %100 Modifiye mPEG-PAMAM G2'nin HPFP İçindeki Çözünürlük Davranışı



Şekil IV.25. %100 Modifiye mPEG-PAMAM G4'ün HPFP İçindeki Çözünürlük Davranışı

mPEG-PAMAM G2 %100 için, 1.5, 7.5, 15, 30 ve 75mg/mL HPFP konsantrasyonları hazırlandı. 15mg/mL HPFP çözünürlük limitinin altındaki konsantrasyonlar oda sıcaklığında çözüldü, üstündeki konsantrasyonlar çözünür değildi. Örnekler su banyosuna yerleştirilerek, bir derecelik artış ile, 20°C'den 40°C'ye kadar yükseltildi. Sıcaklığın artmasıyla örnekler bulanıklaşmaya başladı. 15mg/mL örneği 33°C'de bulanıklaşırken, 7.5mg/mL örneği 35°C'de bulanık hale geldi.

1.5mg/mL örneği ise tüm sıcaklıklarda tamamen çözünür haldeydi. Sıcaklığı 20°C'den 4°C'ye düşürebilmek için reometre kullanıldı. Birer derecelik azalma ile soğuk koşullardaki çözünürlük davranışı da incelendi (Şekil IV.24). 20°C'de iki faz (örnek ve HPFP) halinde bulunan 75mg/mL konsantrasyonundaki örnek 4°C'ye inildiğinde bulanık hale geldi.

mPEG-PAMAM G4 %100 için, 0.2, 1, 2, 4 ve 10mg/mL HPFP konsantrasyonları hazırlandı. 2mg/mL HPFP çözünürlük limitinin altındaki konsantrasyonlar oda sıcaklığında çözüldü, üstündeki konsantrasyonlar çözünür değildi. Örnekler su banyosuna yerleştirildi ve sıcaklığın, bir derecelik artış ile, 20°C'den 40°C'ye kadar yükseltilmesiyle 1mg/mL örneği 40°C'de, 2mg/mL örneği 37°C'de bulanık hale geldi. 0.2mg/mL örneği tüm koşullarda çözünürlüğünü korudu. Daha sonra örnekler reometreye yerleştirilerek sıcaklık, bir derecelik azalma ile, 20°C'den 4°C'ye düşürüldü. Başlangıçta hiç çözünmeyen 10mg/mL örneği 4°C'de bulanıklaşırken, yine başlangıçta bulanık olan 4mg/mL örneği 4°C'de bulanık kaldı (Şekil IV.25).

mPEG-PAMAM G2 ve G4 %50 için, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2 ve 0.5mg/mL HPFP konsantrasyonları hazırlandı. Her iki örnek için de 0.1mg/mL HPFP çözünürlük limitinin altındaki örnekler uygulanan bütün sıcaklıklarda çözüldü, üstündekiler çözünür değildi. Diğer örneklerde olduğu gibi bir bulanıklaşma görülmedi.

BÖLÜM V

SON DEĞERLENDİRMELER ve ÖNERİLER

Günümüzde, basınç ölçekli doz inhalerler astım gibi çok çeşitli akciğer hastalıklarının tedavisinde ve bu hastalıklardan korunmada oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu tür inhalerlerde, kloroflorokarbonlar çözücü sistemini oluşturmaktadır. Ancak bu çözücüler klor içerdiğinden ozon tabakasına zarar vermektedirler. Dolayısıyla ilaç sektörü, daha çevre dostu çözücüler kullanma yoluna gitmekte ve araştırmalar yapmaktadır. Bu çalışmada da model çözücü olarak çevre dostu HPFP (2H,3H-perfloropentan) kullanıldı.

Değişik fonksiyonel gruplara ve molekül ağırlığına sahip polietilen glikol, polipropilen glikol ve Pluronic® polimerlerinin, HPFP içerisindeki faz davranışları incelendi. Çözünürlüğün molekül ağırlığına ve sahip olunan fonksiyonel gruplara bağlı olduğu anlaşıldı. Polimer çözeltilerine tripsin eklendiğinde, proteinin çözünürlüğünde değişme gözlenmedi.

Monometil PEG 500 tüm konsantrasyon ve sıcaklıklarda HPFP içerisinde çözüldü. Bu nedenle, tripsin ve PAMAM'ın konjügasyonu için, incelenen tüm PEG'ler arasından mPEG 500 seçilip kullanıldı. Tripsinin konjügasyonunda ayrıca PPO 1000 ve Pluronic® 1100 polimerleri de kullanıldı.

mPEG 500, PPO 1000 ve Pluronic® 1100, ilk etapta N,N'-karbonildiimidazol (CDI) kullanılarak -OH grupları reaktif hale getirildi. Reaksiyon karışımına saflaştırma işlemi uygulanmadı. Model protein tripsin sentezlenen reaktif polimerler ile konjüge edildi. Aktivasyon ve konjügasyon reaksiyonlarının başarılı bir şekilde gerçekleştiği FT-IR ve ¹H NMR spektrumları ile doğrulandı. Polimer-tripsin örnekleri HPFP içinde tamamen çözünmedi, bulanıktı.

Ayrıca, poli(amidoamin) G2 ve G4 dendrimerleri %50 ve %100 oranlarında mPEG ile modifiye edildi. Elde edilen ürünlerin yapısı ¹H NMR ile doğrulandı. mPEG-PAMAM konjüge ürünleri incelendiğinde, konjügasyon reaksiyonunun daha başarılı olduğu görüldü. PAMAM G2 ve G4 %50 oranında PEG ile konjüge

edildiğinde pek bir değişiklik olmazken, %100 oranında konjüge edildiğinde HPFP içerisinde tamamen çözüldü.

Proteinler genel olarak HPFP içinde çözüner değildir. Çözünürlüğün arttırılabilmesi için, bu çalışmada kullanılan polimerlerin fonksiyonel grupları değiştirilerek, tripsin tekrar konjüge edilebilir. Ayrıca bu teknik, insülin gibi farklı karakteristik özelliklere sahip bir protein için de uygulanabilir. İnsülinin HPFP içindeki çözünürlüğünün arttırılması sonucunda, basınç ölçekli inhalerlerde kullanılmak üzere ilaç sektöründe büyük adımlar atılmış olacaktır.

KAYNAKLAR

- [1] Kabanov A.V.; Batrakova E.V.; Alakhov V.Y.: “Pluronic® block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery”, *J. Controlled Release*, 82 (2002) 189-212
- [2] Haag R.; Kratz F.: “Polymer Therapeutics: Concepts and Applications”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 45 (2006) 1198-1215
- [3] Duncan R.: “The dawning era of polymer therapeutics”, *Nature Reviews Drug Discovery*, 2 (2003) 347-360
- [4] Duncan R.; Ringsdorf H.; Satchie-Fainary R.: “Polymer therapeutics-polymers as drugs, drug and protein conjugates and gene delivery systems: Past, present and future opportunities”, *J. Drug Targeting*, 14 (2006) 337-341
- [5] Twaites B.; Alarcon C.H.; Alexander C.: “Synthetic polymers as drugs and therapeutics”, *J. Mater. Chem.*, 15 (2005) 441-455
- [6] “Challenges and Opportunities in Emerging Drug Delivery Technologies”, Brunner C. S., *Product Genesis Inc.*, (2004)
<http://www.productgenesis.com> (09.06.2010)
- [7] Cleland L.J.; Daugherty A.; Mrsny R.: “Emerging protein delivery methods”, *Current Opinion in Biotechnology*, 12 (2001) 212-219
- [8] Cote M.: “Solubility and phase behaviour of selected pharmaceutical excipients in 2H, 3H-perfluoropentane”, PhD, Cardiff Uni, School of Chemistry (2008) 2-5
- [9] Grenha A.; Seijo B.; Remunan-Lopez C.: “Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery”, *European J. Pharmaceutical Sci.*, 25 (2005) 427-437
- [10] Patton J.S.; Platz R.M.: “Pulmonary delivery of peptides and proteins for systemic action”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 8 (1992) 179-196
- [11] Shoyele S.A.; Slowey A.: “Prospects of formulating proteins/peptides as aerosols for pulmonary drug delivery”, *Int. J. Pharmaceutics*, 314 (2006) 1-8

- [12] Smola M.; Vandamme T.; Sokolowski A.: “Nanocarriers as pulmonary drug delivery systems to treat and to diagnose respiratory and non respiratory diseases”, *Int. J. Nanomedicine*, 3 (2008) 1-19
- [13] Zeng X.M.; Martin G.P.; Marriott C.: “The controlled delivery of drugs to the lung”, *Int. J. Pharmaceutics*, 124 (1995) 149-164
- [14] Patton J.S.; “Mechanisms of macromolecule absorption by the lungs”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 19 (1996) 3-36
- [15] Forbes B., Ehrhardt C., “Human respiratory epithelial cell culture for drug delivery application”, *European J. Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 60 (2005) 193-205
- [16] <http://www.nature.com/nrd/journal/v6/n1/full/nrd2153.html> (08.06.2010)
- [17] Yang W.: “Inhaled nanoparticles-A current review”, *Int. J. Pharmaceutics*, 356 (2008) 239-247
- [18] Yang W., PhD, University of Texas at Austin, “Improvement in the Bioavailability of Poorly Water-Soluble Drugs via Pulmonary Delivery of Nanoparticles”, (2009) 2-5
<http://repositories.lib.utexas.edu/bitstream/handle/2152/6661/yangw85057.pdf?sequence=2> (09.06.2010)
- [19] Gonda I.; Schuster J.A.; Rubsamen R.M.; Lloyd P.; Cipolla D.; Farr S. J.: “Inhalation delivery systems with compliance and disease management capabilities”, *J. Controlled Release*, 53 (1998) 269-274
- [20] Patton J.S.; Fishburn C.S.; Weers J.G.; “The Lungs as a Portal of Entry for Systemic Drug Delivery”, *Proceedings of the American Thoracic Society*, 1 (2004) 338-344
- [21] Adjei A.; Gupta P.: “Pulmonary delivery of therapeutic peptides and proteins”, *J. Controlled Release*, 29 (1994) 361-373
- [22] Daniher D.I.; Zhu J.: “Dry powder platform for pulmonary drug delivery”, *Particuology*, 6 (2008) 225-238
- [23] <http://pats.atsjournals.org/cgi/content/full/1/4/321> (10:06.2010)
- [24] Dr. J. Green; Dr. E. Gommeren: *DuPont Central Research & Development*, J. Creazzo, Dr. K. Palmer, *DuPont Fluoroproducts*, “Pharmaceutical Aerosols – Enhancing the Metered Dose Inhalors”
<http://www.dupont.com> (09.06.2010)

- [25] Niven R.W.; Brain J.D.; “Some functional aspects of air-jet nebulizers”, *Int. J. Pharmaceutics*, 104 (1994) 73-85
- [26] Steckel H.; Eskandar F.: “Factors affecting aerosol performance during nebulization with jet and ultrasonic nebulizers”, *European J. Pharmaceutical Sci.*, 19 (2003) 443-455
- [27] Malcolmson R.J.; Embleton J.K.: “Dry powder formulations for pulmonary delivery”, *PSST*, 1 (1998) 394-398
- [28] Keller M.: “Innovations and perspectives of metered dose inhalers in pulmonary drug delivery”, *Int. J. Pharmaceutics*, 186 (1999) 81-90
- [29] Griffiths P.C.; Cote, M.; Rogueda P.G.A.: “Elaborating the phase behaviour of ethylene oxide oligomers and analogues in 2H, 3H-perfluoropentane”, *Int. J. Pharmaceutics*, 362 (2008) 147-152
- [30] http://www.netdoctor.co.uk/health_advice/facts/howtousemeter.htm (23.06.2010)
- [31] “*Novel Excipients for Inhalation Drug Delivery*”
<http://www.drugdeliverytech.com> (23.06.2010)
- [32] James R.: “Solubility of polymers in fluorinated liquids”, M.Phil., Cardiff Uni, School of Chemistry (2006) 17-40
- [33] Steckel H.; Wehle S.: “A novel formulation technique for metered dose inhaler (MDI) suspensions”, *Int. J. Pharmaceutics*, 284 (2004) 75-82
- [34] Paul A.; Griffiths P.C.; James R.; Willock D. J.; Rogueda P.G.: “Explaining the Phase Behaviour of the Pharmaceutically Relevant Polymers Poly(Ethylene Glycol) and Poly(Vinyl Pyrrolidone) in Semi-Fluorinated Liquids”, *J. Pharmacy and Pharmacology*, 57 (2005) 973-980
- [35] Krafft M. P.: “Fluorocarbons and fluorinated amphiphiles in drug delivery and biomedical research”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47 (2001) 209-228
- [36] Sandford G.; “Perfluoroalkanes”, *Tetrahedron*, 59 (2003) 437-454
- [37] Cote M.; Rogueda P.G.A.; Griffiths P.C.: “The effect of molecular weight and end-group nature on the solubility of ethylene oxide oligomers in 2H, 3H-decafluoropentane and its fully fluorinated analogue perfluoropentane”, *J. Pharmacy and Pharmacology*, 60 (2008) 593-599
- [38] Riess J.G.: “Fluorous micro- and nanophases with a biomedical perspective”, *Tetrahedron*, 58 (2002) 4113-4131

- [39] <http://en.wikipedia.org> (29.05.2010)
- [40] <http://www.answers.com/topic/chlorofluorocarbon> (21.06.2010)
- [41] <http://www.ciesin.org/TG/OZ/cfcozn.html> (29.05.2010)
- [42] http://www.ace.mmu.ac.uk/eae/ozone_depletion/older/ (29.05.2010)
- [43] <http://hfc.net/> (29.05.2010)
- [44] <http://science.jrank.org/pages/3448/Hydrochlorofluorocarbons.html>
(29.05.2010)
- [45] <http://www.opencarbonworld.com/wiki/hydrofluorocarbons-hfcs.html>
(29.05.2010)
- [46] <http://www.bdigital.ufp.pt/dspace/bitstream/10284/368/1/perfluorocarbons>
(29.05.2010)
- [47] “Introduction and overview of peptide and protein pegylation”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54 (2002) 453-456
- [48] “The case for PEG conjugation”, *American Peptide Company, Inc.*, (2008)
- [49] Treeharnmathurot B.; Ovartharnporn C.; Wungsintaweekul J.; Duncan R.; Wiwattanapatapee R.: “Effect of PEG molecular weight and linking chemistry on the biological activity and thermal stability of PEGylated trypsin”, *Int. J. Pharmaceutics*, 357 (2008) 252-259
- [50] Haris J. M.; Chess R.B.: “Effect of PEGylation on Pharmaceuticals”, *Nature Reviews*, 2 (2003) 214-221
- [51] Duncan R.; Gilbert H.R.P.; Carbajo R.J.; Vicent M.J.: “Polymer masked-unmasked protein therapy. 1. Bioresponsive dextrin-trypsin and -melanocyte stimulating hormone conjugates designed for alpha-amylase activation”, *Biomacromolecules*, 9 (2008) 1146-1154
- [52] Pasut G.; Veronese F.M.: “Polymer–drug conjugation, recent achievements and general strategies”, *Prog. Polym. Sci.*, 32 (2007) 933-961
- [53] Veronese F.M.; Pasut G.: “PEGylation, successful approach to drug delivery”, *Drug Discovery Today Reviews*, 10 (2005) 1451-1458
- [54] “Peptide and protein PEGylation III: advances in chemistry and clinical applications”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60 (2008) 1-2
- [55] Fee C.J.; Van Alstine J.M.: “PEG-proteins: Reaction engineering and separation issues”, *Chemical Engineering Sci.*, 61 (2006) 924-939

- [56] Katre N.V.: “The conjugation of proteins with polyethylene glycol and other polymers. Altering properties of proteins to enhance their therapeutic potential”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 10 (1993) 91-114
- [57] <http://www.sigmaaldrich.com/materials-science/material-scienceproducts.html?TablePage=20204110> (24.06.2010)
- [58] Bailon P.; Berthold W.: “Polyethylene glycol-conjugated pharmaceutical proteins”, *PSST*, 1 (1998) 352-356
- [59] Roberts M.J.; Bentley M.D.; Haris J.M.: “Chemistry for peptide and protein PEGylation”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54 (2002) 459-476
- [60] Zalipsky S.: “Chemistry of polyethylene glycol conjugates with biologically active molecules”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 16 (1995) 157-182
- [61] <http://pba-jkt.com/ppg.html> (06.07.2010)
- [62] Ulrich H.: “Introduction to Industrial Polymers”, München; Wien: Hanser, (1982) 90-91
- [63] Molineux G.: “Pegylation: engineering improved pharmaceuticals for enhanced therapy”, *Cancer Treatment Reviews*, 28 (2002) 13-16
- [64] Zhu S.; Hong M.; Tang G.; Qian L.; Lin J.; Jiang Y.; Pei Y.: “Partly PEGylated polyamidoamine dendrimer for tumor-selective targeting of doxorubicin: The effects of PEGylation degree and drug conjugation style”, *Biomaterials*, 31 (2010) 1360-1371
- [65] Wang P.; Zhao X.; Wang Z.; Meng M.; Li X.; Ning Q.: “Generation 4 polyamidoamine dendrimers is a novel candidate of nano-carrier for gene delivery agents in breast cancer treatment”, *Cancer Letters*, (2010) 1-16
- [66] Kojima C.; Kono K.; Maruyama K.; Takagishi T.: “Synthesis of Polyamidoamine Dendrimers Having Poly(ethylene glycol) Grafts and Their Ability To Encapsulate Anticancer Drugs”, *Bioconjugate Chem.*, 11 (2000) 910-917
- [67] Eichman J.D.; Bieliska A.U.; Kukowska-Latallo J.F.; Baker J.R.: “The use of PAMAM dendrimers in the efficient transfer of genetic material into cells”, *PSST*, 3 (2000) 232-245
- [68] <http://www.dendritech.com/pamam.html> (05.07.2010)
- [69] Pasut G.; Caboi F.; Schrepher R.; Tonon G.; Schiavon O.; Veronese F.M.: “New active poly(ethylene glycol) derivative for amino coupling”, *Reactive and Functional Polymers*, 67 (2007) 529-539

- [70] Hermanson G. T.: “Bioconjugate Techniques”, *Elsevier*, (1996) 605-619
- [71] Veronese F.M.: “Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions”, *Biomaterials*, 22 (2001) 405-417
- [72] Whelan J.: “Beyond PEGylation”, *News and Comment*, 10 (2005) 301
- [73] Klomklao S.; Benjakul S.; Visessanguan W.; Kishimura H.; Simpson B.K.; Saeki H.: “Trypsins from yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) spleen: Purification and characterization”, *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 144 (2006) 47–56
- [74] <http://en.wikipedia.org/wiki/Trypsin> (03.07.2010)
- [75] Gilbert H.R.P.: “Bioresponsive polymer-protection conjugates as a unimolecular drug delivery system”, PhD, Centre of Polymer Therapeutics, Welsh School of Pharmacy, (2007) 73-78

ÖZGEÇMİŞ

15.07.1986 tarihinde Merkez/Kütahya'da doğdum. 1992 yılında İstanbul'a taşındıktan sonra öğrenim hayatıma burada devam ettim. 2000 yılında Yeşilbahar İlköğretim Okulu, 2004 yılında Kadir Has Anadolu Lisesi, 2008 yılında Marmara Üniversitesi Kimya bölümünden mezun oldum.

Lisans öğrenimim sırasında 2005 ve 2006 yılı yaz aylarında Marshall Boya ve Vernik A.Ş.'de stajyer olarak çalıştım.

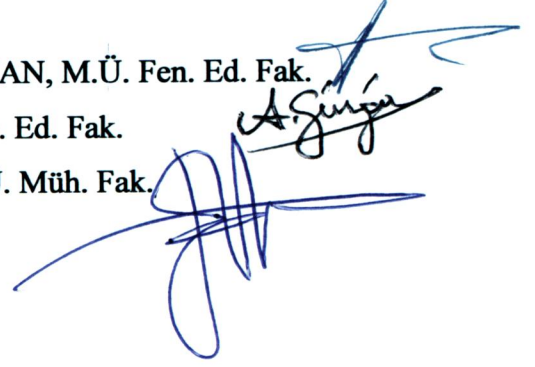
Yine 2008 yılında Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde Kimya Anabilim Dalı Organik Kimya Programı'nda yüksek lisansa başladım. Yüksek lisans eğitimimin ilk yılında tüm ders ve sınavlarımı başarıyla tamamladıktan sonra, ikinci yıлымda Erasmus öğrenci değişim programına başvurarak, tez çalışmamı İngiltere Cardiff Üniversitesi'nde yaptım.

T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KABUL ve ONAY BELGESİ

Filiz ÖZYÜREK'in **Protein Konjüasyonu, Yeni Bir Formülasyon Çalışması** başlıklı Lisansüstü tez çalışması, M.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun...14.09.2010...tarih ve 2010/19-04...sayılı kararı ile oluşturulan jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Organik Kimya Programında YÜKSEK LİSANS Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Nilhan KAYAMAN APOHAN, M.Ü. Fen. Ed. Fak.
1. Üye : Prof. Dr. Atilla GÜNGÖR, M.Ü. Fen. Ed. Fak.
2. Üye : Doç Dr. Ebru TOKSOY ÖNER, M.Ü. Müh. Fak.



Tezin Savunulduğu Tarih: 20.09.2010

ONAY

M.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun...27.09.2010...tarih ve 2010/20-03...sayılı kararı ile Filiz ÖZYÜREK'in Kimya Anabilim Dalı Organik Kimya Programında Y.Lisans (MSc) derecesi alması onanmıştır.

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Meral ÜNAL
Müdür

