

**T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİRİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ECZACILIK TEKNOLOJİSİ BÖLÜMÜ
FARMASÖTİK TEKNOLOJİ YÜKSEK LİSANS(TEZLİ)
PROGRAMI**

**PROTEİNİK İLAÇ ETKİN MADDELERİNİN
GASTROİNTESTİNAL KANALDA STABİLİTELERİNİN
ARTTIRILMASI İÇİN ENTERİK ENKAPSÜLASYON
METODUNUN UYGULANMASI**

Cankat ERDOĞAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Nefise Özlen ŞAHİN

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından BAB-SBE
ET(CE) 2006-3 YL nolu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No:.....

MERSİN-2008

Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan “**Proteinik İlaç Etkin Maddelerinin Gastrointestinal Kanalda Stabiliteilerinin Arttırılması İçin Enterik Enkapsülasyon Metodunun Uygulanması**” başlıklı çalışma, jürimiz tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 20/06/2008

Doç. Dr. Serap Yahn

Mersin Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi

Biyokimya Anabilim Dalı

Jüri Başkanı

Yrd. Doç. Dr. Nefise Özlen Şahin

Mersin Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi

Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Tadeusz Librowski

Jagellonian Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi

Farmakodinami Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulununtarih vesayılı kararı ile kabul edilmiştir.



TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Mersin Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Eczacılık Teknolojisi Bölümü, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'nda yapılmıştır.

Yüksek lisans eğitimime başladığım andan itibaren ve tez çalışmam süresince engin bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, yardım ve katkılarını esirgemeyen değerli hocam ve danışmanım Sn. Yrd. Doç. Dr. Nefise Özlen Şahin'e şükranlarımı ve saygılarımı sunarım.

Farmasötik Teknoloji eğitimimdeki değerli katkıları ve özellikle partikül büyüklüğü ölçüm çalışmalarımındaki yardımından dolayı Sn. Yrd. Doç. Dr. Altan Yüksel'e teşekkür ederim. Mikroküre formülasyonunda kullanılan maddelerin FTIR ve DTA/TG ile karakterizasyonunda teknik destek sağlayan Mersin Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Bilimler Bölümü'nden Doç. Dr. Hakan Arslan ile Eczacılık Meslek Bilimleri Bölümü, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı Başkanı Yrd. Doç. Dr. Öztekin Algül'e yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Fizikokimyasal karakterizasyon çalışmalarımın bir kısmını Polonya'da Prof. Dr. Barbara Filipek ve Yrd. Doç. Dr. Tadeusz Librowski'nin gözetiminde yapma imkanı sağlayan Erasmus/Socrates öğrenci değişim programına da teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi çalışmam sırasında hiçbir zaman sevgi ve anlayışlarını esirgemeyen ve her konuda yanımda olan AİLEME sonsuz teşekkürler. Ayrıca, ilgi ve desteklerinden dolayı Ecz. Kamer Mut ve Yüksek lisans öğrencisi Sema Altan'a çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|-----|
| Kabul ve Onay | ii |
| TEŞEKKÜR | iii |
| İÇİNDEKİLER | iv |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | x |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | xi |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ | xii |
| ÖZET | xiv |
| ABSTRACT | xv |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1. Proteinler | 3 |
| 2.1.1. Protein Yapısı | 3 |
| 2.1.1.1. Primer Yapı | 4 |
| 2.1.1.2. Sekonder Yapı | 4 |
| 2.1.1.3. Tersiyer Yapı | 5 |
| 2.1.1.4. Kuarterner Yapısı | 6 |
| 2.2. Proteinlerin Sınıflandırılması | 7 |
| 2.2.1. Fiziksel Yapılarına Göre | 7 |
| 2.2.1.1. Fibröz Proteinler | 7 |
| 2.2.1.2. Globular Proteinler | 7 |
| 2.2.2. Tiplerine göre | 8 |
| 2.3. İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Formülasyonlarının Geliştirilmesinde Etkin Protein Molekülüne Ait Faktörler | 8 |
| 2.3.1. Molekül Yapısı ve Şekli | 8 |
| 2.3.2. Yarı Ömrü | 9 |
| 2.3.3. Stabilite | 9 |
| 2.3.3.1. Protein Stabilitesini Etkileyen Faktörler | 10 |
| 2.3.3.1.1. Hidrofobik Etkileşimler | 10 |

| | |
|--|----|
| 2.3.3.1.2. Hidrojen Bağları | 10 |
| 2.3.3.1.3. Konformasyonel Entropi | 11 |
| 2.3.3.1.4. Tuz Köprüleri | 12 |
| 2.3.3.1.5. Aromatik Yapılar Arasındaki Etkileşimler | 12 |
| 2.3.3.1.6. Metal Bağlama | 12 |
| 2.3.3.1.7. Disülfid Bağları | 13 |
| 2.3.3.2. Kimyasal Bozunma | 13 |
| 2.3.3.2.1. Oksidasyon ve Redüksiyon Reaksiyonları | 14 |
| 2.3.3.2.2. Deamidasyon | 15 |
| 2.3.3.2.3. Kovalent Bağ Oluşumu | 15 |
| 2.3.3.2.4. Proteoliz | 16 |
| 2.3.3.2.5. Rasemizasyon | 16 |
| 2.3.3.3. Fiziksel Bozunma | 17 |
| 2.3.3.3.1. Denatürasyon | 17 |
| 2.3.3.3.2. Çökme | 17 |
| 2.3.3.3.3. Adsorpsiyon | 17 |
| 2.3.3.4. Protein Stabilitesini Etkileyen Önformülasyon ve Formülasyon Koşulları | 18 |
| 2.3.3.4.1. Sıcaklık | 18 |
| 2.3.3.4.2. pH | 18 |
| 2.3.3.4.3. İyonik Güç | 19 |
| 2.3.3.4.4. Yardımcı Maddeler | 19 |
| 2.3.3.5. Protein Moleküllerinin Kararlılığını Arttırmak İçin Kullanılabilecek Yöntemler | 20 |
| 2.4. Proteinik İlaçları Uygulama Yolları | 21 |
| 2.4.1. Oral Uygulama | 22 |
| 2.4.2. Parenteral Uygulama | 23 |
| 2.4.3. Rektal ve Vajinal Uygulama | 24 |
| 2.4.4. Dermal ve Transdermal Uygulama | 24 |
| 2.4.5. İntranazal Uygulama | 25 |
| 2.4.6. Bukkal Uygulama | 25 |

| | |
|--|-----------|
| 2.4.7. Akciğerlere Uygulama | 26 |
| 2.5. Proteinik İlaçların Formülasyonunda Kullanılan Taşıyıcı Sistemler | 27 |
| 2.5.1. Kontrollü Salım Yapan Sistemler | 28 |
| 2.5.1.1. Ozmotik basınçla çalışan ilaç taşıyıcı sistemler | 28 |
| 2.5.1.2. Boncuklar | 29 |
| 2.5.1.3. Lipozomlar | 29 |
| 2.5.1.4. Mikrokapsüller ve Mikroküreler | 29 |
| 2.5.1.4.1. Mikroküreler | 32 |
| 2.5.1.4.1.1. Mikroküre Formülasyonlarında Kullanılan Polimerler | 32 |
| 2.5.1.4.1.2. Mikroküre Hazırlama Yöntemleri | 34 |
| 2.5.1.4.1.2.1. Polimerizasyon Yöntemleri | 35 |
| 2.5.1.4.1.2.1.1. Emülsiyon Polimerizasyonu | 35 |
| 2.5.1.4.1.2.1.2. Dispers Fazda Jelleşme ve Çapraz Bağlanma Yöntemi | 36 |
| 2.5.1.4.1.2.2. Emülsiyon Oluşturma/Çözücü Buharlaştırma Yöntemi | 37 |
| 2.5.1.4.1.2.2.1. Su İçinde Yağ Tipi Emülsiyon Oluşturma/Çözücü Buharlaştırma Yöntemi | 37 |
| 2.5.1.4.1.2.2.2. Yağ İçinde Su Tipi Emülsiyon Oluşturma/Çözücü Buharlaştırma Yöntemi | 37 |
| 2.5.1.4.1.2.2.3. Çoklu Emülsiyon Oluşturma/Çözücü Buharlaştırma Yöntemi | 38 |
| 2.5.1.4.1.3. Mikrokürelerin Eczacılık ve Tıpta Uygulamaları | 38 |
| 2.6 Çalışmanın Amacı | 39 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM | 40 |
| 3.1. Gereçler | 40 |
| 3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler | 40 |
| 3.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler | 40 |
| 3.1.3. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler | 41 |
| 3.1.4. Kullanılan İstatistik Yöntemler ve Bilgisayar Programları | 41 |
| 3.1.4.1. Kullanılan İstatistik Yöntemler | 41 |
| 3.1.4.2. Kullanılan Bilgisayar Programları | 41 |

| | |
|--|----|
| 3.2. Yöntemler | 41 |
| 3.2.1. Mikrokürelerin Hazırlanmasında Kullanılan Maddelerin Karakterizasyonu | 42 |
| 3.2.1.1. Selüloz Asetat Ftalat'ın Karakterizasyonu | 42 |
| 3.2.1.1.1. Selüloz Asetat Ftalat'ın Erime Derecesi Tayini | 42 |
| 3.2.1.1.2. Selüloz Asetat Ftalat'ın FT-IR Spektrumu | 42 |
| 3.2.1.1.3. Selüloz Asetat Ftalat'ın DTA/TG Analizi | 42 |
| 3.2.2. Boş Mikrokürelerin Hazırlanması | 42 |
| 3.2.2.1. Boş Mikrokürelerin Karakterizasyonu | 43 |
| 3.2.2.1.1. Partikül Boyutu Tayini | 43 |
| 3.2.2.1.2. Mikrokürelerin Şekillerinin Belirlenmesi | 43 |
| 3.2.2.1.3. Boş Mikrokürelerin FT-IR Spektrumu | 43 |
| 3.2.3. Mikrokürelerin Hazırlanmasında Kullanılan Etkin Maddenin Karakterizasyonu | 43 |
| 3.2.3.1. Bovin Serum Albuminin (BSA) Karakterizasyonu | 43 |
| 3.2.3.1.1. Bovin Serum Albuminin Erime Derecesi Tayini | 43 |
| 3.2.3.1.2. Bovin Serum Albuminin FT-IR Spektrumu ve DTA/TG Analizi | 44 |
| 3.2.3.2. Bovin Serum Albuminin Miktar Tayini | 44 |
| 3.2.3.2.1. Bovin Serum Albuminin Miktar Tayini İçin Standart Doğrunun Çizilmesi | 44 |
| 3.2.4. BSA İçeren Mikrokürelerin Hazırlanması | 45 |
| 3.2.4.1. BSA İçeren Mikrokürelerin Karakterizasyonu | 45 |
| 3.2.4.1.1. Partikül Boyutu Tayini | 45 |
| 3.2.4.1.2. Mikrokürelerin Şekillerinin Belirlenmesi | 45 |
| 3.2.4.1.3. BSA İçeren Mikrokürelerin FT-IR Spektrumu | 46 |
| 3.2.4.1.4. BSA İçeren Mikrokürelerin DTA/TG Analizi | 46 |
| 3.2.4.1.5. Hazırlama Verimi | 46 |
| 3.2.4.1.6. Mikrokürelerde Tutulan BSA Miktarının Belirlenmesi | 46 |
| 3.2.4.2. Mikrokürelerde Saklama Koşullarında Stabilite Çalışmaları | 46 |
| 3.2.4.3. Mikrokürelerden In Vitro Koşullarda BSA Salım Çalışmaları | 47 |

| | |
|--|-----------|
| 3.2.4.4. Mikrokürelere In Vitro Koşullarda BSA Salımının Kinetiğinin İncelenmesi | 47 |
| 4. BULGULAR | 48 |
| 4.1. Mikrokürelere Ait Çalışmalar | 48 |
| 4.1.1. Mikrokürelere Hazırlanmasında Kullanılan Maddelerin Karakterizasyonu | 48 |
| 4.1.1.1. Selüloz Asetat Ftalat'ın Karakterizasyonu | 48 |
| 4.1.1.1.1. Selüloz Asetat Ftalat'ın Erime Derecesi Tayini | 48 |
| 4.1.1.1.2. Selüloz Asetat Ftalat'ın FT-IR Spektrumu | 48 |
| 4.1.1.1.3. Selüloz Asetat Ftalat'ın DTA/TG Analizi | 48 |
| 4.1.2. Boş Mikrokürelere Hazırlanması | 50 |
| 4.1.2.1. Boş Mikrokürelere Karakterizasyonu | 50 |
| 4.1.2.1.1. Partikül Boyutu Tayini | 50 |
| 4.1.2.1.2. Mikrokürelere Şekillerinin Belirlenmesi | 50 |
| 4.1.2.1.3. Boş Mikrokürelere FT-IR Spektrumu | 50 |
| 4.2. Mikrokürelere Hazırlanmasında Kullanılan Etkin Maddelerin Karakterizasyonu | 52 |
| 4.2.1. Bovin Serum Albuminin (BSA) Karakterizasyonu | 52 |
| 4.2.1.1. Bovin Serum Albuminin Erime Derecesi Tayini | 52 |
| 4.2.1.2. Bovin Serum Albuminin FT-IR Spektrumu | 52 |
| 4.2.1.3. Bovin Serum Albuminin DTA/TG Analizi | 52 |
| 4.2.2. Bovin Serum Albuminin Miktar Tayini Yöntemi | 54 |
| 4.2.2.1. Bovin Serum Albuminin Miktar Tayini İçin Standart Doğrunun Çizilmesi | 54 |
| 4.3. Bovin Serum Albumin İçeren Mikrokürelere Hazırlanması | 54 |
| 4.3.1. BSA İçeren Mikrokürelere Karakterizasyonu | 54 |
| 4.3.1.1. Partikül Boyutu Tayini | 54 |
| 4.3.1.2. Mikrokürelere Şekillerinin Belirlenmesi | 56 |

| | |
|--|----|
| 4.3.1.3. Bovin Serum Albumin İçeren Mikrokürelerin FT-IR Spektrumu | 56 |
| 4.3.1.4. BSA İçeren Mikrokürelerin DTA/TG Analizi | 56 |
| 4.3.1.5. Hazırlama Verimi | 58 |
| 4.3.1.6. Mikrokürelerde Tutulan BSA Miktarının Belirlenmesi | 58 |
| 4.3.2. Mikrokürelerde Saklama Koşullarında Stabilite Çalışmaları | 59 |
| 4.3.3. Mikrokürelerden In Vitro Koşullarda Bovin Serum Albumin Salım Çalışmaları | 59 |
| 4.3.4. Mikrokürelerden In Vitro Koşullarda BSA Salımının Kinetiğinin İncelenmesi | 61 |
| 5. TARTIŞMA | 65 |
| 6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER | 66 |
| 7. KAYNAKLAR | 82 |
| ÖZGEÇMİŞ | 83 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|--|----|
| Şekil 2.1. Primer yapının şematik gösterimi. | 4 |
| Şekil 2.2. α -heliksin şematik gösterimi. | 5 |
| Şekil 2.3. β – tabakanın şematik gösterimi. | 5 |
| Şekil 2.4. Tersiyer yapının şematik gösterimi | 6 |
| Şekil 2.5. Kuarterner yapının şematik gösterimi. | 7 |
| Şekil 2.6. Katlanmış molekülün açılmasında etkili bağların şematik gösterimi. | 10 |
| Şekil 2.7. Tersiyer yapıdaki hidrojen bağları. | 11 |
| Şekil 2.8. Tuz köprüsü. | 12 |
| Şekil 2.9. β -merkaptöetanol varlığında meydana gelen redüksiyon reaksiyonunun şematik gösterimi. | 15 |
| Şekil 2.10 Ozmatik Basınçla Çalışan OROS® Üç Tabakalı Sistem | 29 |
| Şekil 2.11. Lipozomun şematik gösterimi. | 30 |
| Şekil 4.1. Selüloz Asetat Ftalat'ın FT-IR spektrumu | 49 |
| Şekil 4.2. Selüloz Asetat Ftalat'ın DTA/TG diyagramı | 49 |
| Şekil 4.3. Boş mikrokürelerin polarize ışık mikroskobu ile çekilen fotoğrafı. | 51 |
| Şekil 4.4. Boş mikrokürelerin FT-IR spektrumu. | 51 |
| Şekil 4.5. Bovin serum albuminin yapısının şematik gösterimi. | 52 |
| Şekil 4.6. Bovin serum albuminin FT-IR spektrumu. | 53 |
| Şekil 4.7. Bovin serum albuminin DTA/TG diyagramı | 53 |
| Şekil 4.8. Bovin serum albuminin miktar tayini standart doğrusu. | 55 |
| Şekil 4.9. BSA içeren mikrokürelerin polarize ışık mikroskobu ile çekilmiş fotoğrafı. | 56 |
| Şekil 4.10. Bovin serum albumin içeren mikrokürelerin FT-IR spektrumu. | 57 |
| Şekil 4.11. Bovin serum albumin içeren mikrokürelerin DTA/TG diyagramı. | 57 |
| Şekil 4.12. Bovin serum albumin (BSA) içeren farklı mikroküre formülasyonlarından BSA salım profilleri (pH = 6.8) | 60 |
| Şekil 4.13. Bovin serum albumin (BSA) içeren farklı mikroküre formülasyonlarından BSA salım profilleri (pH = 1.2) | 60 |
| Şekil 4.14. Enkapsüle edilmemiş Bovin serum albumin'in (BSA) farklı pH değerlerinde (pH = 1.2 ve 6.8) disolüsyon profilleri. | 61 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | |
|--|----|
| Çizelge 2.1 Protein moleküllerinde sıklıkla karşılaşılan kimyasal bozunma reaksiyonları | 14 |
| Çizelge 2.2. Protein stabilitesini arttıran yardımcı maddelerin başlıcaları | 20 |
| Çizelge 2.3 İlaç pazarında mikroküre formunda ticari ürünü bulunan proteinik etkin maddeler | 31 |
| Çizelge 2.4. Biyoparçalanır polimerler. | 33 |
| Çizelge 2.5 Biyoparçalanır polimerler kullanılarak enkapsüle edilen biyoteknolojik etkin maddelerin başlıcaları | 34 |
| Çizelge 2.6 Proteinik etkin madde içeren mikrokürelerin hazırlanmasında kullanılan yöntemlere örnekler. | 36 |
| Çizelge 3.1. Mikroküre formülasyonlarının içerikleri ve kodları. | 45 |
| Çizelge 4.1. Boş mikrokürelerin ortalama partikül boyutları | 50 |
| Çizelge 4.2. BSA içeren mikrokürelerin partikül boyutu dağılımı. | 55 |
| Çizelge 4.3. Mikroküre hazırlama verimleri. | 58 |
| Çizelge 4.4. Mikrokürelerde tutulan Bovin serum albumin (BSA) miktarı. | 58 |
| Çizelge 4.5. Mikrokürelerin stabilite çalışmasında BSA miktarında meydana gelen değişmeler. | 59 |

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

- Asn:** asparajin
Asp-Xaa: asparajin-herhangi bir amino asit
BSA: Bovin Serum Albümin
CAP: Selüloz Asetat Ftalat
DNA: Deoksiribonükleik asit
DNAaz: Deoksiriboneükleaz
DTA/TG: Diferansiyel termal analiz/termal gravimetri
DT: difteri toksoidi
FT-IR: Infrared Spektrofotometrisi
G: Gibbs serbest enerjisi
G_f: Rölatif serbest enerji
Gln: glisin
Glu: Glutamik asit
G_u: polipeptid yapısı açılmış molekülün serbest enerjisi
H: entalpi
hGH: insan büyüme hormonu
hCG: İnsan koryonik gomadotropin
HSA: İnsan serum albumini
IGF-1: İnsülin Benzeri büyüme faktörü
JEV: Japon ensefalit virüsü
K: Kelvin cinsinden sıcaklık birimi
KSS: Kontrollü Salım Sistemleri
ku : protein molekülünün açılması reaksiyonunda denge sabitesi.
Lys: lizin
PLA: poli(L-laktik asit)
PLGA: Poli(laktik-ko-glikolik asit)
R: herhangi bir alifatik grup
rhBMP: Rekombinant insan morfojenetik protein-2

rhEGF: Rekombinant insan epidermal büyüme faktörü
rhEPO: Rekombinant insan eritropoietini
S: entropi
SDS: Sodyum Dodesil Sülfat
T: mutlak sıcaklık (°K)
TGFβ: Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta
TRH: Troid serbestleyici hormon
TT : tetanoz toksoid
UV: Ultraviöle
USP XXII: Amerikan Farmakopesi Yirmi İkinci Baskı
VC: kolera aşısı
VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
Xaa-Pro: herhangi bir amino asit-prolin

ÖZET

Rekombinant DNA teknolojisi ve genetik mühendisliğindeki gelişmeler, önemli terapötik etkiye sahip protein ve peptid yapısında ilaç etkin maddelerinin geliştirilmesini sağladı. Biyoteknolojik ilaç etkin maddelerinin çoğunun, hızla faz I ve II klinik çalışmaları yapılmaktadır. Günümüzde, bu tip ilaçların klinik kullanımının yaygınlaşmasının önündeki en büyük engeller; in vitro koşullarda, depolama ve üretim esnasında ve in vivo şartlarda (ör.: enzimatik hidroliz) ortaya çıkan stabilite sorunları ve bunlara bağlı olarak ilaç etkin maddesinin terapötik etkisini yitirebilme durumudur. Bu stabilite sorunları, etkin maddenin enkapsülasyonu ile ortadan kaldırılabilir. Formülasyon açısından bakılacak olursa, enkapsülasyon, proteinik ilaç etkin maddelerinin fizyolojik ortamdan korunmasını ve etki bölgesine hedeflendirerek burada optimal terapötik etkinliğin sağlanmasını mümkün kılar. Bazı proteinler, gastrik ortamdan olumsuz etkilenir. Bu stabilite sorununu önlemek için, bu çalışmada, model protein olarak seçilen bovin serum albuminin selüloz asetat ftalat kullanılarak emülsiyon çözücü ekstraksiyonu yöntemi ile enkapsülasyonu önerilmektedir. Mikrokürelerin yükleme kapasiteleri ortalama %52 olarak bulunmuştur. Hazırlanan enterik mikrokürelerin boyutları ise elek yöntemi ile saptanmıştır ve $525 \pm 1.38 \mu\text{m}$ bulunmuştur. Mikrokürelerin mikroskop altında fotoğrafları çekilmiştir. Mikrokürelere in vitro koşullarda ilaç salımı çalışmaları, $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$, pH 1.2 ile pH 6.8'de 100 rpm hızda pedal metodu ile gerçekleştirilmiştir. Fourier Transform Infrared (FTIR) ve Diferansiyel Termal Analiz /Termal Gravimetri (DTA/TG) çalışmalarının sonuçları ise, selüloz asetat ftalat mikrokürelerinin üretim işlemi süresince ve vücuda uygulandıktan sonra, etkin maddeyi gastrik ortamda koruyabileceğini göstermektedir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar ışığında, selüloz asetat ftalat kullanılarak hazırlanacak enterik mikrokürelerin proteinik etkin maddelerin kolona hedeflendirilmesinde yararlı olacağı söylenebilir.

ABSTRACT

Developments in recombinant DNA technology and genetic engineering have led to development of potent therapeutic proteins and peptides. Many biotechnology derived drugs have been rapidly entering phase I and II of clinical studies. At present, the biggest obstacles to the widespread utilization of these drugs are in vitro (during storage and manufacturing) and in vivo (e.g. enzymatic hydrolysis) instability, which may lead to a loss of biological activity. This instability problem may be overcome by encapsulation. From a formulation perspective, proteins are encapsulated to provide: 1) efficient protection for the active protein moiety against a physiological environment; 2) targeting to the site of action allowing optimal therapeutic efficiency. Some proteins are influenced by gastric medium. In order to prevent this instability, we suggest preparing cellulose acetate phthalate (CAP) microspheres to encapsulate a model protein: Bovine Serum Albumin, employing emulsion solvent evaporation method. Loading capacity was found 52%. Particle size distribution of enteric microspheres was determined by sieving ($525 \pm 1.38 \mu\text{m}$). Electron micrographs were taken. In vitro release studies were conducted using pedal method at $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ (pH 1.2 and 6.8, 100 rpm). FTIR and DTA/TG studies indicated that CAP microspheres can help proteinous drug substances maintain their integrity throughout the manufacturing process, and protecting them from the influence of gastric media.. Thus, based on the obtained data in this study, enteric encapsulation using CAP and emulsion/solvent evaporation method can be utilized for targeting proteinous active moiety to colon.

1. GİRİŞ

Son yıllarda, farmasötik teknoloji alanında meydana gelen gelişmeler geleneksel ilaçların kullanımından kaynaklanan sorunları azaltmaya yönelik yaklaşımların geliştirilmesini sağlamıştır (1). Bilim adamları, çalışmalarını modern terapötik sistemler olarak adlandırılan mikroküre, mikrokapsül, nanopartikül, lipozom vb. ilaç taşıyıcı sistemler üzerinde yoğunlaştırmıştır. Bu ilaç şekilleri, düşük dozla farmakoterapötik etki elde etmeyi amaçlamaktadır. Bunun yanı sıra, söz konusu ilaç taşıyıcı sistemler kullanılarak ilacın formüle edilmesiyle etkin maddenin kararlılığının sağlanması, yan etkilerinin azaltılması ve salımın istenen şekilde programlanabilmesi de mümkün olmaktadır (1-3).

Son yirmi yıldır moleküler biyolojide meydana gelen gelişmeler, farmasötik biyoteknoloji alanına da yansımış, biyoteknolojik etkin maddelerin ilaç olarak formülasyonunu mümkün kılarak sağlık alanında çığır açmıştır (4). Farmasötik biyoteknolojide en çok kullanılan etkin maddeler, proteinler ve peptidlerdir (4). Proteinler ve bazı basit peptidler, vücut fonksiyonlarının çoğunu kontrol eden ajanlardır. İnsan sağlığının korunması, vücudun uygun bölgesinde, uygun zamanda, bu maddelerin doğru ve yeterli miktarlarda bulunması ile mümkün olur. Ancak, bu maddeler, normal koşullarda, insan vücudunun belli bir noktasında, çok küçük miktarlarda sentezlenir ve bu noktadan etki bölgesine difüzyon ya da aktif transportla taşınır (5, 6). Etki bölgesinde ise, spesifik bir molekül veya reseptörle etkileşerek fizyolojik yanıt oluşturur (6).

Protein ve peptid yapısındaki ilaçların da hedef dokulara küçük miktarlarda uygun dozaj şekilleri ile taşınıp etki göstermesi istenir. Bu tip ilaçların hedeflendirilmesi ise pek çok gücülüğü beraberinde getirir (4).

Protein ve peptid yapılı ilaçların klinikte yaygın kullanılabilmesini engelleyen en önemli unsurlar; bu etkin maddelerin formülasyon, nakil ve depolama esnasında stabilitesinin düşük olması, gastrointestinal sistemde enzimler tarafından parçalanmasıdır (4). Fiziksel ve kimyasal kararsızlıkları ise, terapötik etkinin kaybına dahi yol açabilir. Bu sorunların çözümü açısından en uygun yaklaşım, mikroküre veya mikrokapsül gibi kontrollü salım yapan dozaj şekillerinin hazırlanmasıdır (1,2,4).

Yarılanma ömürlerinin kısa oluşu da düşünülecek olursa, bu ilaçların kontrollü salınım sistemleriyle vücuda verilmesi büyük avantaj sağlayacaktır (1,4).

Mikroküreler, mikropartiküler sistemler arasında en çok incelenen ve kullanılanlardır (1). Pek çok hastalığın tedavisinde kullanılmaları mümkündür. Plazma – ilaç düzeylerinin istenen süre boyunca istenen düzeyde kalmasını sağlarlar. Doz sıklığı azdır. Mikrokürelerle düşük dozda optimum terapötik etki elde etmek mümkündür. Doz sıklığı azaldığı için hasta uyuncu da artar (1,2). Tüm bunlara ilaveten, formülasyonda kullanılan polimerin özelliğine bağlı olarak enkapsüle edilen maddeyi enzimlerden koruma özelliğine de sahiptir (7, 8). Proteinlerin gastrik ortamda enzimatik degradesyona uğradığı düşünülecek olursa, enterik mikroküre formülasyonu içinde proteinik yapıdaki bir etkin maddenin verilmesi, etkin maddenin gastrik stabilitesinin artırılması açısından büyük avantaj sağlayacaktır.

Bu çalışmada, oral yolla uygulanacak proteinik ilaçların gastrik stabilitesini arttırmak ve kontrollü salım sağlamak amacıyla selüloz asetat ftalat mikrokürelerinin hazırlanması önerilmekte ve incelenmektedir. Selüloz türevleri, enterik tablet hazırlamada sağladıkları avantajlardan dolayı enterik mikroküre hazırlanmasında da kullanılmaktadır ve bugüne kadar geleneksel ilaç etkin maddeleriyle yapılan çalışmalarda olumlu sonuçlar vermiştir. Bu nedenle, selüloz asetat ftalat polimeri ile emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak model protein olarak seçilen bovin serum albuminin enterik mikroküreleri çalışmamızda hazırlanmış ve karakterize edilmiştir.

2. GENEL BİLGİ

2.1. Proteinler

Proteinler, enzimatik kataliz, taşıma ve depolama, koordine hareket, mekanik destek, immun koruma, sinir uyarılarının oluşturulması ve taşınması, büyüme ve başkalaşımın kontrolü gibi hemen hemen her biyolojik olayda önemli rol oynarlar (9-10). Hücre içerisinde gerçekleşen olaylar; yüzbinlerce farklı proteinin kendilerine verilmiş olan görevleri mucizevi bir şekilde yerine getirmeleri ile devam eder. Örneğin, kanda bulunan hemoglobin proteini dokulara gerekli oksijeni taşımakta, antikor denilen proteinler vücudun savunma sisteminin temelini oluşturmakta, insülin hücrelere glukoz/şeker alımını sağlamakta, keratin saç ve tırnak yapısını meydana getirmekte, enzim adı verilen proteinler ise, hücre içi kimyasal reaksiyonları mükemmel bir hız ve doğrulukta yerine getirmektedir (9, 10).

2.1.1. Protein Yapısı

Proteinler, amino asit adı verilen ve karbon, hidrojen, oksijen ve azot atomlarından meydana gelen moleküllerin boncuk taneleri gibi yan yana dizilmeleri ile oluşur (9). Diğer bir deyişle, proteinler, makromoleküllerdir (9, 10). Amino asitlerden başlıca 20 tanesi protein yapımında görev alır. Bu standart 20 amino asitin farklı sayıda dizilişleri neticesi yüzbinlerce farklı yapı ve yükümlülüğe sahip proteinler oluşmaktadır (10). Aynı alfabedeki 29 harfin farklı dizilişleri ile farklı kelime ve cümlelerin yazılabilmesi gibi; 20 aminoasit ile de sonsuz sayıda farklı protein üretmek mümkündür(9, 10).

Proteinlerin 50 kadar aminoasit içeren türlerinden, binlerce amino asit içeren türlerine kadar yüzbinlerce çeşidi vardır (4, 9, 10). Hücrelerde protein sentezi sonrasında üretilen aminoasitlerin birbirine bağlanarak oluşturdukları düz zincir, daha sonra aminoasitler arasındaki kimyasal bağlar neticesi katlanarak proteine son şeklini verir. Proteinlerin bazıları heliks/sarmal yapıda olabileceği gibi küresel veya antikorlar gibi Y şeklinde de olabilirler (9). Proteinler üç boyutlu yapılarındaki girinti çıkıntılar sayesinde ya başka proteinlere ya da alıcı moleküllere bağlanarak hücre içi faaliyetleri gerçekleştirirler. Anahtar-kilit ilişkisine benzer sistemlerle proteinlerin birbirlerine ya da diğer moleküllere bağlanıp ayrılması, proteinlerin üç boyutlu yapılarını çok önemli kılar

(10). Bir proteinin aktif bölgesindeki sadece bir amino asidin bile yerinin değişmesi, proteinin şeklini değiştirip iç gormesini engellemektedir. Bu nedenle, protein sentezi sonrası zincir gibi olan aminoasit dizisinin katlanarak asıl şeklini alması çok önemlidir(10).

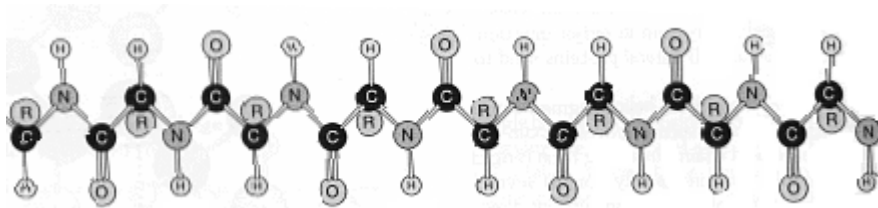
Proteinlerin yapısı, fiziksel ve kimyasal stabiliteleri ile aktivitelerini etkileyen en önemli faktördür (11). Proteinler peptid bağlarıyla bağlı amino asit dizileridir (9). Amino asitler bir amino asitin α -karboksil grubuyla diğer amino asitin α -amino grubu ile amid bağları olan peptid bağları ile kovalent olarak bağlanırlar (10).

Boyuta bağlı olarak, dipeptid, tripeptid, oligopeptid ve polipeptidler olarak sınıflandırılırlar (9, 10).

Proteinlerin 4 organizasyon düzeyi vardır (9, 10). Bunlar; primer, sekonder, tersiyer, kuaterner yapılarıdır.

2.1.1.1.Primer Yapı

Primer yapı, bir proteindeki amino asitlerin polipeptid oluşturacak şekilde dizilişine denir (şekil 2.1) (9, 10). şekilde de gürldüğü gibi, polpeptid zinciri yalnızca amino asit moleküllerinin kovalent bağlarla birbirine bağlanarak yan yana dizilmesinden oluşmaktadır (4, 9-11).Yapıda R harfiyle gösterilen bölge " Radikal " grubunu temsil ediyor olup amino asitten amino asite bu moleköl grubu değişmektedir. Örneğin, alanin amino asitinde R grubu CH_3 yani metil grubudur. Fakat, iyodotronin amino asitinde metil grubunun yerini iyotlu bir bileşik alır. Primer yapı, kuvvetli asitler, alkaliler ve proteolitik enzimlerle bozunur.

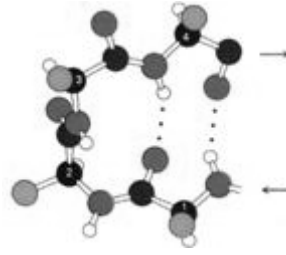


şekil 2.1. Primer yapının şematik gösterimi.

2.1.1.2.Sekonder Yapı

Sekonder yapı, primer yapıya kıyasla biraz daha kompleks bir yapıdır (12). Sekonder yapı, lineer dizide birbirine yakın olan amino asitlerin kurallı düzenlenmesiyle oluşur. α -heliks, β -tabaka ve β -kıvrım olmak üzere değişik formlarda gürölür (10).

Tıpkı DNA zinciri gibi heliks dönümleri yapan formuna α -heliks adı verilir (Şekil 2.2) (9, 10). Şekilde α - heliks, kıvrılmasının ilk aşaması görülmektedir. Bu aşamada, zincir bükülmeye başlar ve COOH yani karbonil grubu ile NH' yani amino grubu arasında hidrojen bağı oluşmaya başlar (9). Bu bağ, fiziksel olarak kuvvetli bir bağ değildir ve dışarıdan verilen ısı veya fiziksel bir hareket ile koparılabilir. Kopmanın etkisiyle zincir yine eski düz halini almaya başlar (10).



Şekil 2.2. α -heliksın şematik gösterimi.

Şekil 2.3'de görülen yapı ise, proteinin sekonder formunun daha değişik bir şekli olan ve β - tabakası adı verilen bir konfigürasyondur (10). Bu konfigürasyonda primer zinciri meydana getiren amino asitler heliks yapmak yerine kıvrılmalar yaparak akordiyon gibi bir hal almıştır(10).



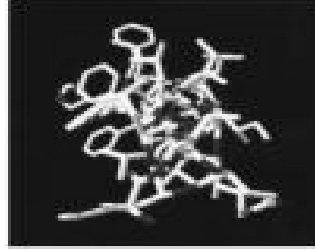
Şekil 2.3. β - tabakanın şematik gösterimi.

Proteinler, ayrı ayrı konfigürasyonlara sahip olabildiği gibi her iki konfigürasyona sahip proteinler de vardır (9). Örneğin bazı proteinlerin %70'i sekonder α -heliks yapısından, geri kalan %30'nu ise sekonder β - tabakasından meydana gelmektedir (10).

2.1.1.3. Tersiyer Yapı

Sekonder yapıyı takip eden bu konfigürasyonda proteinin yapısı daha da kompleks bir hal almaya başlar (10). Tersiyer yapıda ise, amino asitlerin yukarıda belirttiğimiz R (radikal) yan zincirleri arasında meydana gelen bağlar ile şeklini kazanmaya başlar. Birbirinden uzak amino asitlerin düzenlenmesi ile tersiyer yapı

oluşur (Şekil 2.4) (9, 10).



Şekil 2.4. Tersiyer yapının şematik gösterimi.

Proteinler, sekonder yapılarında aldıkları şekilden sonra birbirlerine yaklaşan veya uzaklaşan amino asitlerin etkisiyle bükülmeye, katlanmaya ve bazen de ani dönüşler yaparak yepyeni şekiller almaya başlarlar. İşte, bu şekilde, proteinin işlevi için son derece önemli olan üç boyutlu şekli meydana getirirler. Bu bükülme ve katlanmanın nedeni; amino asitlerin yan zincirlerinin arasındaki etkileşimlerdir (9, 10).

Proteinlerdeki amino asitlerin yan zincirleri bazı etkiler sonucu birbirlerini çekerler veya iterler. Bu çekme ve itme hareketinin oluşumunda beş önemli etken rol oynar (4, 9-11). Bu beş etki; hidrojen bağları, disülfid bağlar, iyonik bağlar, Van der Waals kuvvetleri ve yan zincirlerin diğer etkileşimleri kutupsal ve kutupsal olmayan etkiler olarak özetlenebilir (9-10).

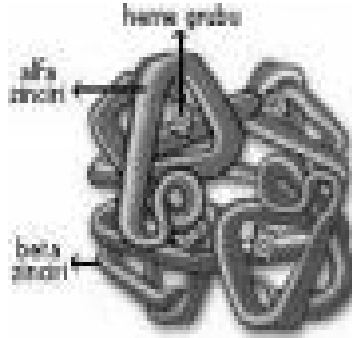
Bu özel bağlar sayesinde, amino asitlerin bazı bölümleri birbirlerine yaklaşır, amino asit zinciri kendi üzerine katlanır, proteinlerin belirli zamanlama ve açılarla bükülmeleri sağlanır, protein molekülünün üç boyutlu yapısı kararlı kalır ve hücre dışındaki ortamda çözülmesi engellenir (9, 10).

Tersiyer yapı, sekonder yapının kıvrılmış halidir. Sekonder yapı içerisinde heliks düzeni ve beta düzeninin her ikisi de bulunabilir. Hatta, bunlara ilave olarak bazı bölgeler, primer ve “Kangal” adı verilen daha değişik konfigürasyonlara sahip olabilir (10).

2.1.1.4.Kuarterner Yapı

Proteinler, bazı durumlarda içiçe girmiş telefon kordonları gibi oldukça karmaşık biçimde bükülmeler yaparak birbirleriyle birleşip kuarterner yapıyı oluşturur. Bir başka

deyimle, tersiyer yapıya sahip subünitelerin birleşmesiyle de kuarterner yapı meydana gelir (Şekil 2.5) (9-10).



Şekil 2.5. Kuarterner yapının şematik gösterimi.

Birçok protein ancak bu birleşmeyi gerçekleştirdikten sonra görevini yerine getirebilecek hale gelir (9). Fakat, proteinlerin birbirleriyle birleşerek dev moleküller meydana getirebilmeleri için de çok hassas dengelerin sağlanması gereklidir. Eğer iki protein birleşecekse, ikisinin de şekli birbirine el ve eldiven kadar uyumlu olmalıdır (10). Böyle olmadığında, biraraya gelip bağlanmaları mümkün olmaz.

2.2. Proteinlerin Sınıflandırılması

Proteinler; fiziksel yapıları, boyutları ve tiplerine göre sınıflandırılabilir (9-10).

2.2.1. Fiziksel Yapılarına Göre

Proteinler, fiziksel yapıları itibarıyla, iki ana gruba ayrılırlar:

2.2.1.1. Fibröz Proteinler

Bu proteinler, özellikle deri, tendon (kasları kemiğe bağlayan sert doku) ve kemik dokularında bulunur (9). Fibröz protein suda çözünmemekle birlikte, fiziksel olarak oldukça dayanıklı bir yapıya sahiptir (9).

2.2.1.2. Globüler Proteinler

Fibröz proteinin aksine, suda çözünebilirler ve fiziksel olarak dayanıklı değildirler (9, 10).

Globüler proteinler çoğunlukla, "enzim" yapısındadırlar. Enzimler ise, hücre içerisindeki sitoplazmada kimyasal reaksiyonları katalizlerler (10).

2.2.2.Tiplerine göre

Proteinlerin enzimler, reseptör proteinleri, glikoproteinler, lipoproteinler, plazma proteinleri (albuminler, globulinler) gibi farklı işlevsel yapıya sahip tipleri mevcuttur (9-10). Ayrıca; insülin, glukagon, kollajen, hemoglobin gibi spesifik görevleri olan proteinlerde vardır (9-10).

2.3. İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Formülasyonlarının Geliştirilmesinde Etkin Protein Molekülüne Ait Faktörler

Proteinik yapıdaki ilaçların formülasyonu sırasında karşılaşılan en büyük sorunlar, bu etkin maddelerin moleküler özellikleri ile ilgilidir (4):

- a. Büyük molekül yapısı ve şekli
- b. Proteolitik enzimlere duyarlılığı
- c. Hızlı plazma kleransı
- d. Doz-yanıt ilişkisinin belirsizliği
- e. İmmunojenisite
- f. Biyouyum
- g. Fiziksel bozunma
- h. Kimyasal bozunma

2.3.1. Molekül Yapısı ve Şekli

Proteinlerin molekül ağırlığı birkaç bin ile birkaç milyon Dalton arasında değişir (4, 9-10, 13-14). Çoğu globüler şekilde olmakla birlikte, fibröz yapıda olanları da vardır. Bunun yanı sıra, pentamerik örümcek şeklinde olan moleküllere de rastlanmaktadır. İmmunoglobulin M bunun en güzel örneğidir (15).

Proteinlerin büyük molekül ağırlığında olması, barsak gibi biyolojik membranlardan geçişini de olumsuz yönde etkiler (4, 16-17). Yine, aynı nedenle, bukkal, nazal, rektal ve vajinal yolla uygulama da zorluklarla karşılaşılır (18-26). Bu sorunu çözmek için, çoğu zaman penetrasyon arttırıcıların kullanılması önerilir (4, 27-29).

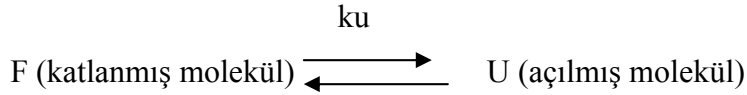
2.3.2. Yarı Ömrü

Çoğu protein molekülünün in vivo yarı ömrü, birkaç saniye ya da dakika gibi kısa bir süredir (30). Bu, kısmen, protein molekülünün karaciğer, böbrekler, vasküler endotel ve diğer dokulardaki degradasyonundan kaynaklanır. Protein moleküllerinin kısa yarı ömre sahip olması, bu etkin maddeleri kontrollü salım sistemleri ile formüle etme açısından uygun aday haline getirmektedir (1).

Sadece, ilaç uygulama bölgesinde protein molekülünü enzimatik degradasyondan korumak, plazma protein konsantrasyonunu maksimum düzeye çıkartmaya yetmeyebilir. Uzun süren ve sabit plazma düzeylerinde bir terapötik etki elde etmek için en iyi çözüm bu molekülleri içeren kontrollü salım sistemlerinin hazırlanmasıdır (1, 4, 31-35). Kontrollü salım yapan dozaj şekilleri iki amaç taşır: yavaş ilaç salımı sağlamak ve ilaç etkin maddesini hem in vitro hem de in vivo koşullarda degradasyon ve denatürasyondan korumak.

2.3.3. Stabilite

Protein stabilitesinde en önemli husus termodinamik kararlılıktır. Burada, protein molekülü açılır ve yeniden katlanır. Bu olay, geri dönüşümlü ve basit bir mekanizmayla gerçekleşebilir (36-37):



k_u : molekülün açılması reaksiyonunda denge sabitesidir.

Proteinin stabilitesi, Gibbs serbest enerjisindeki farklılıklarla (ΔG) ortaya çıkar. Burada stabiliteyi etkileyen faktörler; katlanmış molekülün rölatif serbest enerjisi (G_f) ile açılmış molekülün serbest enerjisidir (G_u). Katlanma reaksiyonuna ait serbest enerji farkı, ne kadar büyük ve pozitif olursa, protein denatürasyona o kadar çok dayanır.

$$\Delta G_u = G_u - G_f \quad (1)$$

Gibbs'in serbest enerjisi, entalpi (H) ve entropi (S)'den ibarettir:

$$G = H - TS \quad (2)$$

T: sıcaklık (°K)

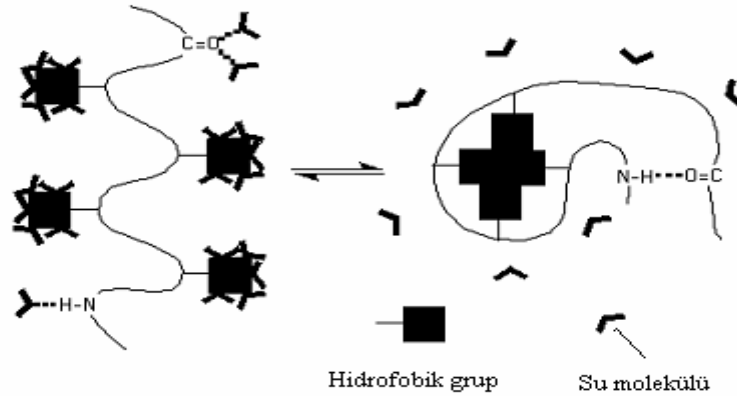
Katlanma reaksiyonuna ait serbest enerji farkı (ΔG_u), genellikle küçüktür: globüler proteinler için 5- 15 kcal/mol.

Protein aşırı sıcaklık ve organik çözücüler gibi stress koşullarında da işlevini yerine getirebilecek kadar dayanıklı mı? Bu sorunun yanıtı termodinamik stabilite ile verilebilir ve molekülün geri dönüşümlü, geri dönüşümsüz veya çok yavaş bir şekilde açılmasına bağlıdır.

Eğer, bir protein molekülü geri dönüşümlü olarak açılırsa ve yüksek sıcaklıkta inaktif ise, oda sıcaklığına soğutulduğunda yeniden katlanır, aktivitesini de geri kazanır. Bu, molekülün termostabil olduğunu gösterir (36-37).

2.3.3.1. Protein Stabilitesini Etkileyen Faktörler

Protein stabilitesini etkileyen faktörler; hidrofobik etkileşimler, hidrojen bağları, konformasyonel entropi, tuz köprüleri, aromatik yapılar arasındaki etkileşimler, metal bağları ve disülfid bağlarıdır (Şekil 2.6) (38).



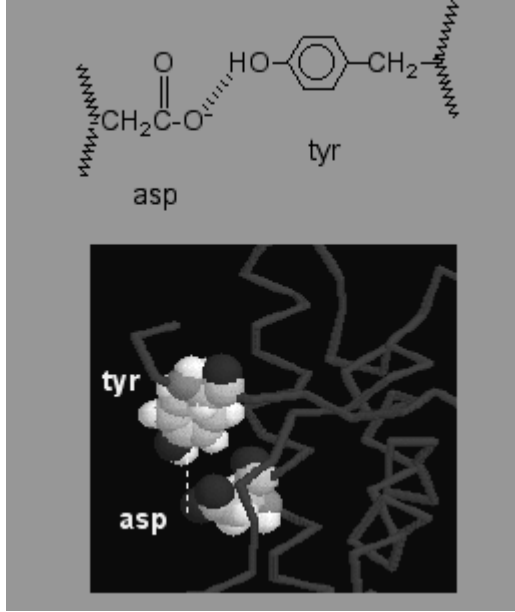
Şekil 2.6. Katlanmış molekülün açılmasında etkili bağların şematik gösterimi.

2.3.3.1.1. Hidrofobik Etkileşimler

Hidrofobik etki, globüler proteinlerin katlanmasında tetikleyici rol oynar. Hidrofobik kısımların molekülün iç kısmında kalmasını sağlar (39-41).

2.3.3.1.2. Hidrojen Bağları

Hidrojen bağı, azot ve oksijen gibi iki elektronegatif atom arasında oluşur (Şekil 2.7). Burada, hidrojen, genellikle, donör adı verilen bir atoma kovalent bağ ile bağlıdır. Ancak, reseptör adı verilen diğer atomla elektrostatik etkileşime girer. Bu etkileşim, elektronegatif atomlar ile proton arasındaki dipolden kaynaklanır (41).



Şekil 2.7 Tersiyer yapıdaki hidrojen bağları

Protein molekülü katlandığında, protein-su hidrojen bağları kırılır ve sadece bir kısmı intra-protein hidrojen bağları ile yer değiştirir. Proteinlerde sadece amino gruplarının %1.3'ü ile karbonil gruplarının %1.8'i hidrojen bağı oluşturamazken, karbonil zincirinin %80'i ikinci bir hidrojen bağı oluşturmayı başaramaz (42). Dolayısıyla, entalpi tek başına ele alındığında, katlanmış protein yapısının destabilizasyonuna neden olmaktadır.

Globüler proteinlerde, amid ve karbonil gruplarının H bağlarının büyük bir kısmı, α -heliks ve β -tabaka yapılarının oluşumu ile gerçekleşir. Bunlar da yapının %80-90'nını oluşturur (42- 43).

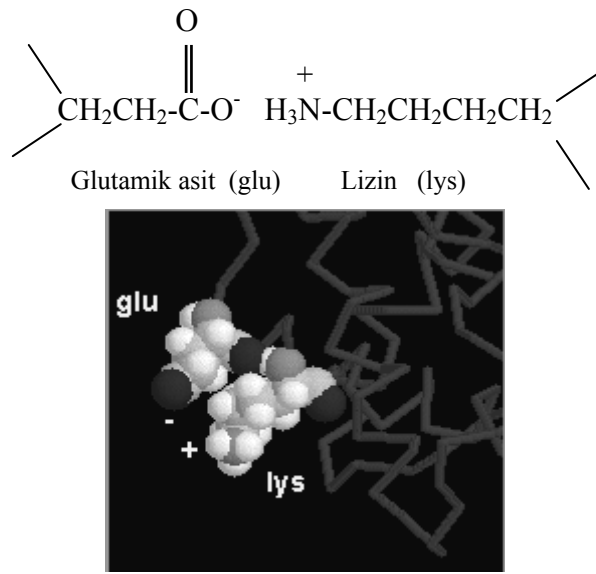
2.3.3.1.3 Konformasyonel Entropi

Protein molekülünün açılmış haldeyken stabilitesine en çok katkısı olan faktör, konformasyonel entropidir (44). Katlanmamış zincirin prolin süstitüsüyonu veya glisin

ile yer değiştirmesi neticesinde konformasyonel esnekliğinin azalması, katlanmış molekülün stabilitesinin artmasına neden olacaktır. Bu, enzimlerde görülebilir.

2.3.3.1.4.Tuz Köprüleri

Tuz köprüleri ya da iyon çiftleri, iki elektrik yüklü rezidüe arasında etkileşimi sağlayan güçlü hidrojen bağlarının özel bir şeklidir (46-49) (Şekil 2.8). Bunların protein stabilitesine katkısı ise, tartışmalı bir konudur. Yüksek sıcaklıklarda, tuz köprülerinin stabiliteye katkısı daha fazladır (47-49).



Şekil 2.8 Tuz köprüsü.

2.3.3.1.5.Aromatik Yapılar Arasındaki Etkileşimler

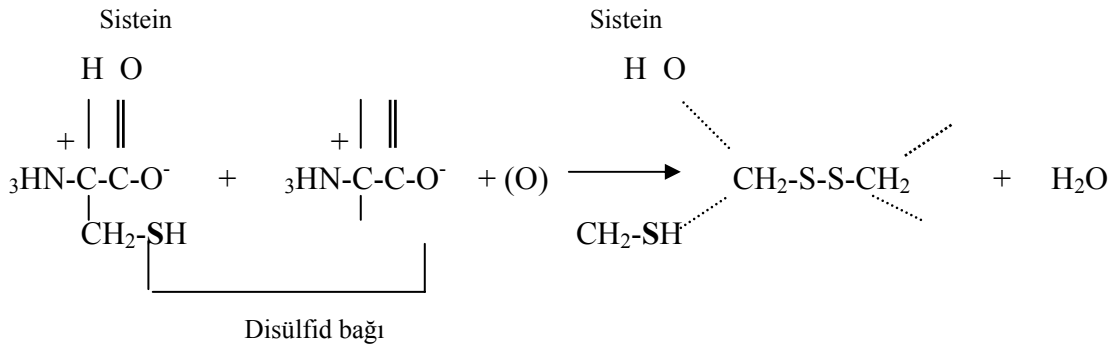
Proteinlerde bulunan aromatik yan zincirlerin yaklaşık %60'ı (fenil , tirozin, ve triptofan), aromatik çift yapı taşır. Model bileşiklerle yapılan çalışmalar, optimal geometrinin dikey olduğunu, bundan dolayı, aromatik halkanın kenarında yer alan kısmen pozitif yük taşıyan hidrojenlerin pi elektronları ve diğer aromatik yapının kısmen negatif yüklü karbonlarıyla reaksiyona girebildiğini göstermiştir (50). Buna göre, aromatik yapılar arasındaki etkileşimlerin protein molekülünün stabilitesi açısından önemlidir (51).

2.3.3.1.6.Metal Bağlama

Proteinlerin katlanmış hallerinin stabilizasyonunu sağlayan diğer bir metot ise, metal bağlanmasıdır (52-54).

2.3.3.1.7. Disülfid Bağları

Disülfid bağları, iki sistein rezidüesinin intra- ve intermoleküler köprülerle bir kovalent sülfür – sülfür bağı oluşturmak üzere oksidasyonu ile meydana gelir (52) :



Kovalent disülfid bağının entalpisi çok yüksek olduğundan, stabilizeye katkısı da büyüktür. Ancak, bu bağ, molekülün hem katlanmış hem de katlanmamış halinde mevcuttur. Dolayısıyla, bunun serbest enerjiye entalpik katkısı göz ardı edilebilir. Bir disülfid bağının stabilize edici etkisinin, molekülün katlanmamış haldeyken sahip olduğu konformasyonel entropideki azalmadan kaynaklandığı düşünülmektedir (44).

Hiper-termostabil proteinlerde, disülfid bağları nadiren mevcuttur (55). Bunun nedeni, yüksek sıcaklıklarda bu moleküllerin kimyasal açıdan dayanıklı olmalarıdır. Disülfid bağları kinetik stabilizeye de etki ederler (56).

2.3.3.2. Kimyasal Bozunma

Bir protein molekülündeki fonksiyonel grupların bazıları molekülü degradasyon yani bozunmaya ve inaktivasyona duyarlı hale getirir (55). Bir protein molekülünün kimyasal degradasyonu çeşitli kimyasal reaksiyonlar meydana gelir (Çizelge 2. 1). Bu reaksiyonlar bazı faktörlere bağlı olarak gerçekleşir (35):

- sıcaklık
- degradasyona yol açan etkenle temas süresinin uzunluğu
- amino asit içeriği
- molekülün sekansı ve üç boyutlu yapısı.

Kimyasal etkenle temasa maruz kalacak gruplar genellikle molekülün iç kısmında yer alır. Bu nedenle, üç boyutlu yapı stabilite açısından büyük önem taşımaktadır (9-10).

Dayanıklı bir protein, katlanmış halinin dayanıklı hale getirilmesi ile oluşur. Burada, kovalent bozunma söz konusudur. Çünkü; protein stabilitesinin dayanıklılığının sınırlarını bu belirler (55). Yüksek sıcaklıklarda (80 - 120°C), Asn (asparagin) ve Gln

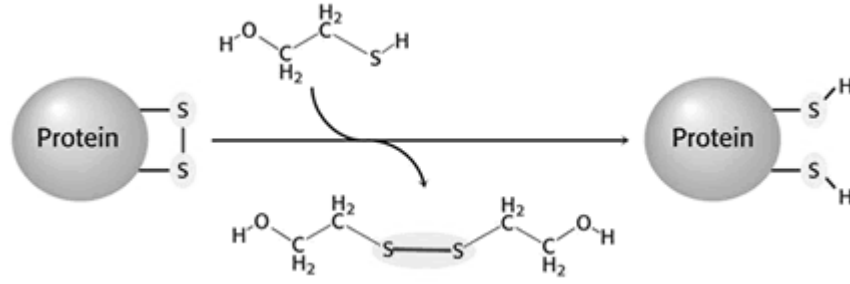
Çizelge 2. 1 Protein moleküllerinde sıklıkla karşılaşılan kimyasal bozunma reaksiyonları

| Reaksiyon | Reaktant kısım |
|--|----------------------------|
| Deamidasyon | Asparagin, glutamin |
| Peptid bağının hidrolizi | Özellikle aspartik asit |
| β -eliminasyon | Sistin |
| Oksidasyon | Sistein ve metiyonin |
| Disülfid bağlarının yeniden oluşması | Sistein |
| Çapraz bağlanma | Lizin |
| Tiyol-disülfid değişimi | Sistin ve sistein |
| Agregasyon | Protein molekülünün tamamı |
| Molekül içi konformasyonel değişiklikler | Protein molekülünün tamamı |

(glisin) deamidasyona uğrar. Asp-Xaa peptid bağları, hidrolize, disülfid bağlarının kopmasına hassastır. Xaa-Pro (Xaa: herhangi bir amino asit) peptid bağları ise, cis-trans izomerizasyonuna uğrar. Kimyasal bozunma, molekülün terapötik aktivitesini yitirmesine neden olabileceğinden büyük önem taşır. Bu nedenle, başlıca kimyasal bozunma reaksiyonları aşağıda detaylarıyla açıklanmıştır (55).

2.3.3.2.1.Oksidasyon ve Redüksiyon Reaksiyonları

Protein moleküllerinde yer alan bazı fonksiyonel gruplar, oksidasyon ve redüksiyona hassastır (4, 9-10) (Şekil 2.9). Oksidasyon, genellikle, proteinlerin izolasyonu, sentezi ve depolanması sırasında meydana gelir (9-10). Buna en güzel örnek, sisteindir. Tiyol grupları da nötral pH'da oksidasyona uğrar. Ayrıca, tiyoller eser elementlerin varlığında kendiliğinden okside olur (57).



Şekil 2.9 β -merkптоetanol varlığında meydana gelen redüksiyon reaksiyonunun şematik gösterimi.

Metiyonin ise, asidik koşullarda atmosferik oksijen varlığında, okside olan bir amino asittir. Bunun yanı sıra, hidrojen peroksit, periyodat, iyodür ve dimetil sülfoksit de protein moleküllerinin oksidasyonuna yol açan maddelerdir. Belli bazı koşullar altında, aspartik asidin karboksil grubu ve glutamik asit, alkollere indirgenme özelliği gösterir. Triptofanın indol halkası ise, geri dönüşümsüz olarak okside olma eğilimine sahiptir (57).

Amino asitlerdeki bu oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları, çoğunlukla, terapötik etkinliğin yitirilmesine yol açar. Örneğin, kortikotropin, kalsitonin, gastrin ve hGH'nin oksidasyonu, bu moleküllerin terapötik etkinliklerini kaybetmelerine neden olur (58-61). Ancak, glukagon gibi bazı proteinler, oksidasyona uğrasalar da terapötik etkinliklerini yitirmezler (62).

2.3.3.2.2. Deamidasyon

Glutamin ile aspartamin amid yan zincirleri, deamidasyona hassastır ve bu reaksiyon sonucunda sırasıyla; glutamat ve aspartata dönüşürler. Bazı araştırmacılar deamidasyon hızı ile protein molekülünün biyolojik yarı-ömrü arasında bir ilişki olabileceğini göstermiştir (63). Yine, molekülün termal inaktivasyonu da deamidasyonla ilişkilendirilmiştir (64). Ancak, deamidasyonun protein molekülünün terapötik etkinliği ile immunojenik özelliğini etkilemediği durumlar da mevcuttur. Örneğin, bovin veya porsin kaynaklı insülinin bazı formülasyonları yüksek sıcaklıklara maruz bırakıldığında, deamidasyona uğrarlar ve agregatlar oluştururlar. Ancak, bu esnada, molekül, terapötik etkinliğini yitirmez ve immunojenik özelliği artış göstermez (65-67).

2.3.3.2.3. Kovalent Bağ Oluşumu

Protein molekülleri içerisinde kovalent bağların oluşumu, özellikle yüksek sıcaklıklarda, N-, C-, R- ve diğer grupların aktifliği ile tetiklenebilir (67). Eğer, bunun sonucunda çapraz bağlanma oluşursa, molekül terapötik etkinliğini yitirebilir (68). Çapraz bağlanma, en çok, disülfid bağlarıyla ya da mevcut S-S bağlarının yeniden düzenlenmesi ile meydana gelir. Alkali pH'da, moleküller arası S-S bağı değişimi, agregasyona yol açabilir (69). Serbest anomerik karbon içeren glikoproteinlerin bazı karbonhidrat grupları da terminal N ile çapraz bağlanma yapar. İlaç formülasyonu açısından, agregasyon önem taşır (70, 71). Çünkü, protein molekülü bunun sonucunda immunojenik özellik taşıyabilen inaktif yapılara dönüşebilir (57, 72-73).

2.3.3.2.4. Proteoliz

Bir protein molekülünün omurgasında yer alan peptid bağlarının hidrolizi, o molekülün terapötik etkinliğini azaltabilir veya tamamen ortadan kaldırabilir (38). Bu, çoğunlukla, protein molekülünün aşırı pH (aşırı asit veya alkali), yüksek sıcaklık ya da proteolitik enzimlere uzun süre maruz kalması sonucu olur (74). Protein molekülleri, genellikle, gastrik ortamda, tripsin ve kimotripsin gibi endopeptidazlar ile ekzopeptidazların varlığında, amino asitlere ve küçük peptidlere ayrışacak şekilde hidrolize uğrar (75-76). Normal koşullarda yani nötral pH ve oda sıcaklığında, peptid bağları hidrolize dayanıklıdır. Ancak, bazı proteinler, otoproteolitik etkiye sahiptir. Bunlar, kendi kendilerini proteolize uğramış gibi degrade ederler. Bu durum, özellikle in vivo koşullar altında, protein molekülünün konsantrasyonu kontrol altında tutmak açısından önemli olabilir. Formülasyon koşulları, proteinik yapıda bir ilacın bu şekilde otokatalitik aktivitesini en aza indirecek biçimde belirlenmelidir (77).

2.3.3.2.5. Rasemizasyon

Glisin hariç tüm amino asitler, kiral yapıya sahiptirler ve rasemizasyona uğrarlar (9-10, 38, 78). Rasemizasyon, baz katalizörlü bir reaksiyondur. Rasemizasyon sonucu moleküller çoğu zaman terapötik etkinliklerini yitirir (4, 79). Hatta, bazı durumlarda, metabolize olamayan protein moleküllerinin oluşmasına bile sebep olabilir.

2.3.3.3. Fiziksel Bozunma

2.3.3.3.1. Denatürasyon

Bir protein molekülünün doğal yapısında meydana gelen değişimler, denatürasyon olarak nitelendirilir (9-10, 38). Bu değişimler, genellikle, sekonder, tersiyer ve kuarterner yapılarda meydana gelir ve katlanmış olan molekülün açılmasına yol açar. Sıcaklık, pH, iyonik güç ve çözücü, denatürasyonu indükleyici unsurlar arasındadır (4, 9-10, 80).

pH'nın değişmesi, karboksilik asit ve amino gruplarının iyonizasyonuna yol açar (81). Bu da, molekülün taşıdığı elektriksel yükün dansitesini etkiler. Moleküller üzerinde yer alan benzer elektriksel yüklerin artması, elektrostatik itmeye; bu da, katlanmış yapıdaki molekülün açılmasına ve dolayısıyla, terapötik etkisini yitirmesine neden olur. Molekülün taşıdığı elektriksel yük, iyonik güçten etkilenir.

Sıcaklığın artırılması, termal enerjiyi artırır. Bu da moleküler yapıda açılmaya yol açar. Termal enerjideki artış belli bir düzeye eriştiğinde ise, molekülün sekonder, tersiyer ve quarterner yapılarını stabilize eden hidrojen bağları kopar (4, 80,82).

Eğer, çözücü su iken alkol/su, aseton/su, kloroform/su veya kloroform/hekzan/suya değiştirilirse, molekül denatüre olur (38, 83). Denatürasyon, geri dönüşümlü olabildiği gibi geri dönüşümsüz olarak da gerçekleşebilir.

2.3.3.3.2. Çökme

Belli koşullar altında, yanlış katlanmış ya da doğal yapısını muhafaza etmiş haldeyken protein subünitelerinin kendiliğinden organize olup yeni bir düzen oluşturması sonucu agregasyon veya çökme meydana gelebilir (38). Her iki durumda da protein konsantrasyonu azalabilir ya da molekül terapötik aktivitesini yitirebilir. Agregasyon ve çökme, protein çözeltisinin temas ettiği yüzeylerin hidrofilik ya da hidrofobik oluşundan etkilenir (4). Çözünebilen agregatlar, protein stabilitesini olumlu ya da olumsuz yönde değiştirir.

2.3.3.3.3. Adsorpsiyon

Proteinler, yapı olarak amfilik özellikte maddelerdir. Hava/katı, hava/su veya sıvı/katı arayüzeylerinde adsorplanma eğilimi gösterirler (4, 38, 84). Molekölün hidrofilik ve polar amino asit kısımları, suya doğru; apolar hidrofobik amino asitleri içeren kısımları ise, hidrofobik yüzeylere (örneğin: havaya ya da cam veya plastik bir kap içerisindeyse bu kapların yüzeylerine) doğru yönelerek düzenlenir (4, 38). Hidrofobik yüzeylere adsorpsiyon; genellikle, van der Waals kuvvetleri, hidrofobik etkileşimler ve iyon çifti etkileşimleri gibi kısa mesafede etkili bağ kuvvetleriyle gerçekleşir. Bu da, protein molekülünün denatüre olmasına ve bunun neticesinde de terapötik etkinliğini yitirmesine, ilaç içerisindeki konsantrasyonun azalmasına sebep olur (85, 86). Bu, genellikle, saflaştırma, formülasyon, depolama, ve nakil esnasında gerçekleşir. Buna en güzel örnek, insülinin pompa yüzeyine adsorbe olmasıdır (87).

2.3.3.4. Protein Stabilitesini Etkileyen Önformülasyon Ve Formülasyon Koşulları

2.3.3.4.1. Sıcaklık

Proteinlerin çoğu sıcaklık artışıyla geri dönüşümlü olarak denatüre olur (4, 38, 88). Sıcaklık aşırı arttırılırsa, bu denatürasyon artık geri dönüşümsüz hale gelir. Literatürde ısı ile proteinlerin denatürasyonunun incelenmesine dair çalışmalar mevcuttur (4, 15, 38, 89-91). Enzimler üzerinde yapılan bu çalışmalar, protein moleküllerinin katlı üç boyutlu yapılarının açılması ve yeniden katlanmasının sonucunda orijinal yapıdan farklılıklar gösteren yeni yapıların oluştuğunu göstermektedir. Sıcaklık aşırı derecede arttırıldığında, mevcut S-S bağları bozulmakta ve yenileri oluşmaktadır. Bu da molekülü denatüre eder (15). Aşırı sıcaklık kadar çok düşük sıcaklık da protein moleküllerinin denatüre olabilmesine neden olmaktadır (92-94). Dolayısıyla, ön formülasyon çalışmalarında protein molekülünün fiziksel özellikleri ile terapötik etkinliğinin sıcaklığın bir fonksiyonu olarak incelenmesi gerekir (4). Albumin gibi bazı proteinler, oda sıcaklığında günlerce kararlı kalabilir (4, 15, 77). Lipoproteinler ise, bu kadar dayanıklı değildirler. Saf gama interferon ise, 4°C ve (-20)°C'da kararlılığını yitirir (95).

2.3.3.4.2. pH

Formülasyonun pH'sı, protein molekülünün çözünürlüğü, katlanması ve kararsızlığa yol açabilecek kimyasal reaksiyonların gelişmesine etki edebilir (4, 38). Protein molekülü içeren bir ilaç formülasyonu hazırlarken molekülün yüksek çözünürlük ve kararlılık gösterdiği ve aynı zamanda doğal yapısını muhafaza ettiği tek bir pH değerini kullanabilmek her zaman mümkün olmayabilir. Bazı durumlarda, protein molekülü, yapısı terapötik etkiyi değiştirmeyecek şekilde farklılaşsa da kimyasal modifikasyon veya proteolizin minimum düzeyde olduğu bir pH değerinde formüle edilir (77). Örneğin, interferon gamanın maksimum aktivite gösterdiği pH değeri 6.0'dır (96).

2.3.3.4.3. İyonik Güç

Moleküller arasında ve molekül içinde yer alan elektrostatik etkileşimler de ön formülasyon çalışmalarında önemle incelenmesi gereken bir faktördür; çünkü, iyonik güç, protein kararlılığı ve çözünürlüğünü önemli ölçüde etkileyebilen bir unsurdur (4, 38). Bunu en iyi Debye–Huckle teorisi açıklamaktadır. Protein molekülünün formülasyonda etkileştiği iyonların tipi de önemlidir. Örneğin, guanidyum hidroklorür proteindeki kovalent olmayan bağları kopararak molekülün denatüre olmasına sebep olurken, guanidyum sülfat protein molekülünün daha kararlı olmasını sağlamaktadır (98).

2.3.3.4.4. Yardımcı Maddeler

Kararlı ve optimum terapötik etkinliğe sahip bir farmasötik formülasyonun geliştirilmesi, uygun yardımcı maddelerin seçimi ile mümkün olur (4). Bunların başlıcaları, fizyolojik açıdan uygun tamponlar, tuzlar, antioksidan maddeler, yüzey etkin maddeler, çözücüler, yardımcı çözücüler, koruyucular ve dağıtıcı ajanlardır. Kullanılacak yardımcı maddeler, inert olmalı ve etkin madde ile etkileşmemelidir. Bunu sağlamak ise, proteinik etkin madde içeren bir ilacı formüle ederken çok zordur (4). Çünkü, yardımcı maddelerin proteinlerin fizikokimyasal özellikleri üzerine etkileri tamamen araştırılmamıştır ve net olarak bilinmemektedir.

Gliserol ve polietilen glikol, protein molekülünü dehidrate etmesine rağmen, protein yapısını kararlı hale getirmek için bu maddelerin ilavesi bazı durumlarda tercih edilmektedir (99-102). Burada, sistemin entropisi artarken, çözücü ile temas halinde

olan protein yüzeyi azalır. Bu azalma neticesinde ise, polipeptid zincirleri katlanarak kararlı bir yapı oluşturur.

2.3.3.5. Protein Moleküllerinin Kararlılığını Arttırmak İçin Kullanılabilecek Yöntemler

Bazı yardımcı maddeler, protein formülasyonlarının kararlılığını artırır (Çizelge 2.2). Tuzlar, polialkoller, karbonhidratlar, iyonik ve noniyonik yüzey etkin maddeler (SDS, Tweenler), kelat yapıcı ajanlar, redüktör maddeler, amino asitler, yağ asitleri ve diğer bazı protein moleküllerinin ilavesi formülasyonunun kararlılığına pozitif katkı sağlayabilir (103-119).

Çizelge 2.2. Protein stabilitesini arttıran yardımcı maddelerin başlıcaları

| Yardımcı maddeler |
|------------------------|
| Sukroz |
| Trehaloz |
| Glukoz |
| Laktoz |
| Gliserol |
| Etilen glikol |
| Propilen glikol |
| Mannitol |
| Sorbitol |
| İnnositol |
| 2-metil-2,4-pentandiol |
| Polietilen glikol |
| Betain |
| Sarkozin |
| Trimetilamin-N-oksit |
| Amino asitler |
| İnorganik tuzlar |

Örneğin; interferon betanın, bir noniyonik yüzey etkin madde olan Laureth-12 ve fosfat tamponuyla birlikte formüle ilave edilmesiyle intramusküler, subkütan ve intravenöz uygulanabilen kararlı formülasyonların hazırlanması mümkün olmuştur (120).

Tuz ilavesi, protein moleküllerinde denatürasyonu azaltarak kararlılığı artırır; agregasyon ve denatürasyonu azaltır (118, 121). Proteinlerin çoğu, liyofilizasyon işlemi ile daha kararlı halde formüle edilmektedir. Bu şekilde, raf ömürlerinin uzatılması mümkün olmaktadır. Örneğin, insan büyüme hormonu, deamidasyon, agregasyon ve oksidasyon gibi degradasyon reaksiyonlarını engellemek için liyofilize toz halinde formüle edilir (122-123). Su ve sıcaklığın minimum düzeyde tutulması da bazı kimyasal reaksiyonların gerçekleşmesini engelleyerek formülasyonun dayanıklılığını arttırmaktadır (96, 123) .

Protein moleküllerinin çoğu, oral olarak vücuda verildiğinde gastrointestinal kanalda enzimatik degradasyona uğrar (124). Bu sorun, enterik kaplama veya mikroenkapsülasyon ile çözümlenebilir (7-8, 125-135). Protein moleküllerinin enterik mikrokürelerinin hazırlanmasında kullanılan polimerlerin başlıcaları, aljinat, Eudragit ve selüloz türevleridir (126). Örneğin, son yıllarda kanser tedavisinde kullanılan lektinin, gastrik stabiliteyi ve oral uygulamada biyoyararlanımı arttırmak için aljinat/kitozan mikroküreleri ile Eudragit kullanılarak enterik kaplı granülleri hazırlanmıştır (127). Enterik aljinat/kitozan mikroküreleri, lektinin gastrik ortamda stabilitesini arttırmış, kontrollü salım özelliği kazandırmıştır. Enterik kaplı granüller ise, gastrik stabilitenin yanısıra ideal salım profilinin elde edilmesini sağlamış, üretim işlemi esnasında lektinin sitotoksik etkisinde kaybın önemsenmeyecek kadar az olmasını mümkün kılmıştır. Selüloz türevleri (selüloz asetat ftalat, selüloz asetat butirat, selüloz asetat trimellitit), geleneksel ilaçların formülasyonunda enterik kaplama ve mikroküre hazırlama materyali olarak çok kullanılmılmaktadırlar (1-2, 5). Ancak, proteinlerin enkapsülasyonunda kullanılmalarına dair detaylı bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır.

2.4. Proteinik İlaçları Uygulama Yolları

İlaç uygulama yolları genelde, enteral uygulama yolları ve parenteral uygulama yolları olmak üzere ikiye ayrılır (5). Enteral uygulama yolları; oral, rektal, sublingual, bukkal uygulama yollarıdır. Parenteral ilaç uygulama yolları ise; inhalasyon, intraarteriyel, intradermal, intramüsküler, intravenöz, intraartiküler gibi değişik uygulama yollarını kapsar.

Bu uygulama yolları ile hastaya verilen peptid ve proteinlerin formülasyonlarında bazı sorunlarla karşılaşmaktadır (4, 128). Bunların başlıcaları:

- a. proteinlerin büyük ve dayanıksız moleküller olmaları,
- b. plastik yüzeylere adsorbe olmaları,
- c. ışığa, ısıya, seyreltilere, karıştırmaya, sürtünmeye ve basınca duyarlı olmaları,
- d. katkı maddeleri ile geçimsizlik gösterebilmeleri,
- e. kan dolaşımında yarı ömürlerinin kısa olmasıdır.

Protein yapısındaki ilaçların formülasyonu ve uygulanmasında karşılaşılan en büyük sorun, stabiliteleri ile ilgilidir. Bu da fiziksel dayanıksızlıkları ve kimyasal dayanıksızlıkları olmak üzere iki başlık altında toplanabilir (128). Fiziksel dayanıksızlıkları denatürasyon, kümeleşme, çökme ve adsorpsiyon; kimyasal dayanıksızlıkları ise hidroliz, deaminasyon, oksidasyon, disülfid ayrılması, deglikolizasyon, izomerizasyon ve rasemizasyonu kapsar.

2.4.1.Oral Uygulama

Oral yol, en popüler ilaç uygulama yoludur (5). Peptid ya da protein yapısındaki ilaçların çoğu, oral yolla uygulandığında, biyoyararlanımları çok düşük (< 1-2%) olur (4, 14-17, 30, 136-139) . Oral yol ile uygulandığında protein ve peptidler hepatik ilk-geçiş etkisine uğrayarak elimine olurlar. Bu da biyoyararlanımlarını düşürür. İlacın daha yüksek dozlarda verilmesini gerektirir (136-138). Özellikle peptid yapısındaki ilaçların oral absorpsiyonunu ve dolayısıyla, biyoyararlanımını arttırmak için proteaz inhibitörleri ve absorpsiyon arttııcıların formülasyona katılması önerilmektedir (140-141). Ayrıca, gastrointestinal kanaldaki enzimatik bariyerde biyoyararlanım açısından olumsuz etki yapar. Gastrointestinal kanalda yer alan endopeptidazlar (tripsin ve kimotripsin) ile eksopeptidazlar (amino ve karboksipeptidazlar) proteinik yapıdaki ilaçların hidrolize uğramasına neden olurlar (4, 17-30, 136). Bunun yanı sıra, asit katalizli bozunma reaksiyonları da oral yolla uygulanan proteinik ilaçların biyoyararlanımı üzerine olumsuz etki eder.

Tablet halinde basıldıklarında ise basım esnasında uygulanan kuvvet ve de yaş granülizasyonda ilave edilen bağlayıcıdan dolayı denatüre olabilirler.

Bu sorunları çözmek için, konformasyonel değişiklikler, terminal N'u açılma veya alkilleme, terminal C'u redüksiyon ya da amid oluşumu ile değişikliğe uğratma, peptid bağının ters çevrilmesi ya da yeni bir peptid bağının oluşturulması, her bir amino asidin kiralitesinin değiştirilmesi gibi kimyasal değişiklikler yapılabilir ya da doğal olmayan amino asitlerin substitüsyonu, proteaz inhibitörü ile birlikte kullanım, enzimatik ortamdan koruyacak şekilde formüle etmek suretiyle (emülsiyonlar, lipozomlar, enterik kaplama, mikroenkapsülasyon, vb.) formülasyonda değişikliklere gidilebilir. Örneğin, insülin, polialkilsiyanoakrilat nanokapsülleri halinde formüle edilerek oral biyoyararlanımın artırılması başarılmıştır (142-144).

2.4.2. Parenteral Uygulama

Protein ve peptidlerin çoğu parenteral yolla uygulanmaktadır (4, 14-17, 136, 145). Böylece, sindirim işlemini ve savunma mekanizmalarını atlayıp dokulara ya da kan dolaşımına direkt enjeksiyon mümkündür. Bu da biyoyararlanımı % 100 kılar.

Parenteral uygulama yolu, hasta uyuncu açısından tercih edilen bir yol olmamakla beraber, protein yapısındaki ilaçların aynı biyoyararlanım düzeyinde verilmesini sağlayacak alternatif bir yol olmaması nedeniyle önerilmektedir. Protein moleküllerinin büyük olması, oral uygulamada gastrointestinal absorpsiyonun az oluşu, proteolitik degradasyon, immunojenisite ve denatürasyon gibi nedenlerden ötürü, parenteral uygulama yolu dışında kalan uygulama yolları pek tercih edilmemektedir.

Parenteral preparatların formülasyonunda ve hastaya uygulanmasında klasik ilaçlara benzer bazı koşulların uygulanması zorunludur (4, 5, 136). Parenteral uygulanacak protein yapısındaki bir ilaç formülasyonu; steril, izotonik, izohidrik, apirojenik, partikül içermeyen, stabil, basit liyofilize halde hazırlanmış ve validasyonu yapılmış olmalıdır (5). Ayrıca; tam ve doğru dozlamaya sahip olmalı, tekrarlanabilir olmalı, patojen içermemeli, biyoyum göstermeli, enjeksiyon bölgesi ile reaksiyona girmemeli, kontrollü salım sisteminlerinde tekrarlanabilir salım hızına sahip olmalıdır (5, 136). Bu yolla uygulanan başlıca dozaj formları ise, sulu çözeltiler, emülsiyonlar ve liyofilize tozlardır.

Bir ilacın parenteral yolla organizmaya verilmesi, istenen bölgeye hedeflendirilmesine de imkan verir (5). Hedeflendirme, ilacın yan etkilerinin

azaltılmasını sağlar (5, 146-148). Bunun yanı sıra, hassas proteinleri degradasyondan korur, uzatılmış etki veya pulsatil etki elde edilmesini mümkün kılar. Klinik açıdan ise, doz sıklığı azalacağından hasta uyuncu artar. Plazma ilaç konsantrasyonunun istenen süre boyunca istenen düzeyde tutulmasına imkan verir (1, 5). Protein yapısındaki ilaçlar, hedeflendirme için ideal moleküllerdir. Bu makromoleküller yapıdaki ilaç etkin maddelerinin parenteral yolla hedeflendirilmiş tedavide kullanılabilmesi için, mikrokapsüller, nanokapsüller, nanopartiküller, lipozomlar, mikroemülsiyonlar, eritrositler ve aşılarda ilaç taşıyıcı sistemler hazırlanmıştır (1-5, 136, 148-180).

2.4.3. Rektal ve Vajinal Uygulama

Rektal ve vajinal uygulama ise, parenteral uygulama gibi bazı avantajlara sahiptir (5). Sistemik dolaşıma direk uygulama ile hepatik ilk-geçiş etkisini atlayarak enzimatik aktiviteden daha az etkilenmeyi sağlar. Lenflere protein absorpsiyonu mümkündür. Hedeflendirme yapılabilir (4, 136). Kontrollü salım sistemleri hazırlanabilir (1). Peptidlerin rektumdan önemli ölçüde fazla absorpsiyonu olduğu tespit edilmiştir (4, 136). Bu uygulama yolunda dikkat edilmesi gereken önemli bir husus uzayan etkili ilaçlarda permeasyon artırıcı ajanların kullanılmasıdır. Bu, doz sıklığının azaltılmasını sağlayarak, hasta uyuncunu daha da iyileştirecektir. Bu uygulamalara örnek olarak insulin içeren niozomlar, interferon β supozituarları ve leuprolid'in vajinal uygulamasını verebiliriz (25, 181-183).

2.4.4. Dermal ve Transdermal Uygulama

İlaçların, hepatik ilk geçiş etkisine uğramaması ve gastrointestinal sistemin degrade edici etkisinden uzak olmasından dolayı, dermal ve transdermal uygulama, protein yapısındaki ilaçların uygulanması için alternatif olarak önerilebilir (5, 14-17). Oral uygulamaya oranla doz sıklığı az olduğu için hasta uyuncu yüksektir. Kontrollü salım sistemleri hazırlanabilir. Bu uygulama yolunda uyulması gereken koşullar:

- a. etken maddenin kısa biyolojik yarılanma ömrüne sahip olması,
- b. düşük klinik dozda yüksek aktivite göstermesi,
- c. derinin komponentleri ile ilaç taşıyıcı sistemin vehikülü arasında dağılım ya da çözünürlük açısından uygunluğun olması,
- d. ilaç konsantrasyonu ve ilaç taşıyıcı sistemin temas alanı arasında uygunluğun sağlanmasıdır.

Bu uygulama yolunda karşılaşılan en büyük problem, proteinlerin oldukça yüksek olan molekül ağırlığından dolayı deriden emilimlerinin güç oluşudur. Bu problem ise, küçük protein ve peptidler için iyonotoforez uygulama ve de penetrasyon arttırıcıların ilavesi ile çözülebilir (1, 4, 5, 14-17) . Bu yolla uygulanan ilaçlara örnek olarak epidermal büyüme faktörleri, TGF β (bandaj, sargı bezi, çözelti), testosteron, estradiyol verilebilir (184-196).

2.4.5. İntranazal Uygulama

Biyoyararlanımın yüksek olduğu bir diğer uygulama ise, intranazal yol ile akciğerlere uygulamadır (1, 4-5, 22, 136). En önemli avantajları, sistemik dolaşıma hızlı geçiş ve hepatik ilk-geçişin atlanması, nazal mukozanın yüksek geçirgenliğidir. Nazal kavitede gastrointestinal kanala oranla enzimatik degradasyon çok daha düşük oranda gerçekleşir.

Nazal yolla uygulanan proteinik ilaç etkin maddelerinin biyoyararlanımında belirleyici faktör, molekül ağırlığıdır (1, 4-5, 22, 136). Parenteral uygulamadan %1-10 oranında daha azdır. Nazal absorpsiyonu iyileştirmek ve biyoyararlanımı arttırmak için penetrasyon arttırıcı maddelerin kullanılması gerekir (28, 197). Ancak, bu maddelerin bazıları mukozal ve/veya silyar toksisiteye yol açtığından uzun süreli tedavi için önerilmezler.

En çok kullanılan nazal dozaj şekilleri; sulu çözelti, nazal jel (23), toz (19) ve mikropartiküler sistemlerdir (mikroküreler, nanopartiküller). Bu uygulamada dikkat etmemiz gereken hususlar; aerosol partiküllerinin fizikokimyasal özellikleri ve moleküler ağırlıktır. Karşılaşılan en önemli sorunlar ise; nazal kaviteden absorpsiyonun değişken olması ve uygulanan ilacın yüksek moleküler ağırlığa sahip olmasıdır. Bu sorunlar; absorpsiyon hızlandırıcılar ve penetrasyon arttırıcıların ilavesi, biyoadhesifler ve sulu olmayan propellent sistemlerin hazırlanması ile çözülebilir.

Uygulamalara örnek olarak lokal etki için küçük molekül ağırlığında maddeler yani steroidler ve DNAaz, sistemik etki için vazopresin, oksitosin, leuprolid asetat gibi polipeptidler, interleukin ve de insulin verilebilir (197-203).

2.4.6. Bukkal Uygulama

Bukkal yolla uygulanan ilaçlarda hepatik ilk geçiş etkisi gerçekleşmeden sistemik etki ortaya çıkar (1, 4-5). Bu açıdan, bukkal uygulama, oral uygulamaya alternatif teşkil etmektedir (204). Ancak, proteinik ilaç etkin maddelerinin bukkal absorpsiyonları az olduğundan biyoyararlanımları parenteral uygulamadan çok daha düşüktür (2, 4, 15, 30, 121, 136, 145). Bu sorun, adesif tablet (205) ve yama (206)dozaj şekilleri kullanılarak çözülebilir. Biyoyapışır dozaj şekilleri, oral mukozaya yapışarak etki gösterir. Protein molekülünün bukkal membranlardan geçişi, nazal uygulamada olduğu gibi penetrasyon arttırıcı maddeler kullanılarak sağlanabilir.

Bukkal uygulamada dikkate alınması gereken hususlar; fiziksel, anatomik ve enzimatik bariyerler, biyofizik faktörler, proteinik ilaç etkin maddesinin fizikokimyasal özellikleri ve kullanılan absorpsiyon arttırıcı maddelerin etkinliğidir (4, 136, 204).

Oksitosin, vazopresin, tiroid serbestleyici hormon (TRH), insülin, sandostatin, bukkal uygulamada terapötik etkinliğin sağlanabildiği proteinik ilaçlara birkaç örnek teşkil eder (206-209).

2.4.7. Akciğerlere Uygulama

Akciğerlere (Pulmoner) uygulama yolu, son yıllarda, özellikle, peptid ve protein yapısındaki ilaç etkin maddelerinin verilmesinde kullanılan önemli bir alternatif haline gelmiştir (4, 136, 210). Bunun en önemli nedenleri; akciğerlerin oldukça ince (0.1 µm – 0.2 µm) bir mukozal membrana ve geniş bir absorpsiyon yüzey alanına sahip olmasıdır (100 m²). Bunun yanısıra, organın kanlanması yüksek oluşu da bu non-invazif yolun tercih edilmesine sebep olmaktadır (1, 5, 136).

Akciğerlere ilaç uygulaması iki teknikle gerçekleşir (210-211):

- a. İntranazal uygulamada da kullanılan aerosol inhalasyon tekniği
- b. İntratrakeal instilasyon.

Aerosol tekniği ile daha homojen ilacın dağılımı ve derin penetrasyon sağlanabilmektedir (210-212). İlaç, akciğerlerin periferal ve alveolar kısımlarına kadar hedeflendirilebilmektedir. Ancak, bu ilaç formülasyonunun maliyetini arttırmakta, akciğerlere ulaşan dozun hesaplanmasını ise güçleştirmektedir. İnstilasyon tekniğinde ise, ilaç homojen dağılım göstermemektedir. Az miktarda çözeltinin bir enjektör yardımıyla akciğerlere uygulanmasından ibarettir. Teknik oldukça basit ve ekonomiktir.

Akciğerlere uygulanan ilaçlar, hızla absorbe olur (5). Ancak, makromoleküler yapıya sahip olan proteinik maddeler, mukozal membrandan geçişleri güç olduğundan veya enzimatik degradasyona uğradıklarından az absorbe olurlar ve bu nedenle, biyoyararlanımları düşüktür (210-211). Bu sorun, penetrasyon arttırıcılar kullanılarak çözülebilir. Örneğin, insülinin pulmoner absorpsiyonu glikokolat, surfaktin, Span 85 ve nafamostat gibi adjuvanlarla arttırılmıştır (211-214). Yine, kalsitoninin, bazı yağ asitleri, yüzey etkin maddeler ve proteaz inhibitörleri ile birlikte formüle edildiğinde, pulmoner absorpsiyonun arttığı tespit edilmiştir. Doğrudan alveolar kısma instilasyon tekniği ile uygulanan proteinik ilaçların %40 ve üzerinde biyoyararlanım sağladığı rapor edilmiştir (215-222). Nebülasyon ile bu oran arttırılabilir (210-212).

2.5. Proteinik İlaçların Formülasyonunda Kullanılan Taşıyıcı Sistemler

Proteinik etkin madde içeren kararlı bir farmasötik formülasyonun hazırlanması için etkin madde molekülünün kararlılığını negatif yönde etkilemeyecek bir taşıyıcı sistem ve bunu hazırlama yönteminin kullanılması gerekir (1, 4, 136). Küçük moleküllü etkin maddelere kıyasla, proteinik etkin maddeler için gerçekleştirilen ön-formülasyon ve formülasyon çalışmaları oldukça karmaşıktır (36). Proteinler, büyük molekulardır ve pek çok fonksiyonel yapı içerirler. Doğal hallerinde ve kararlıyken, proteinler çoğu zaman heterojen özelliktedirler.

Bu moleküllerin kararlı formülasyonlarının hazırlanması için seçilecek dozaj şekli, molekülün biyofizik, biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri ile kimyasal, fiziksel ve biyolojik kararlılığını, ilaç vücuda verilmeden önce, raf ömrü süresince; ilaç vücuda verildikten sonra, etki bölgesine ulaşana kadar belirlenen süreç boyunca muhafaza edebilecek özellikte olmalıdır (4, 14-17, 136). Pek çok klasik etkin maddenin aksine, diğer biyoteknolojik maddeler gibi proteinler de çoğunlukla basit parenteral çözelti formunda formüle edilirler. Bu ise, hasta uyuncu açısından olumlu bir durum değildir.

Protein moleküllerinin proteolize aşırı duyarlı oluşu ve retiküloendotelial sistem tarafından kan dolaşımından hızla uzaklaştırılmaları, ilaç etki bölgesine ulaşmaya dek onu in vivo ortamda koruyabilecek kontrollü salım sistemlerinin kullanılmasının gerekliliğini ortaya koymuştur (1, 4, 136). Bunun için bugüne kadar, hidrojeller, otodiffüzyonel sistemler, biyoparçalanır polimerler, poröz membranlar, mikroküreler, mikrokapsüller, nanopartiküller, mikropartiküller ve lipozomlar gibi pek çok kontrollü

salım sistemi önerilmiş ve çalışılmıştır (15, 30, 123). Bu sistemlerin hazırlanması esnasında kullanılan yöntem ve yardımcı maddelerin seçiminde de protein molekülünün kararlılığının bozulmamasına dikkat etmek gerekir. Örneğin, L-asparajınazın faz ayrışma yöntemi ve bu yöntemde de çapraz bağlama için glutaraldehid kullanılarak mikrokapsülleri hazırlandığında, enzimin terapötik aktivitesinin %90 oranında azaldığı tespit edilmiştir (223).

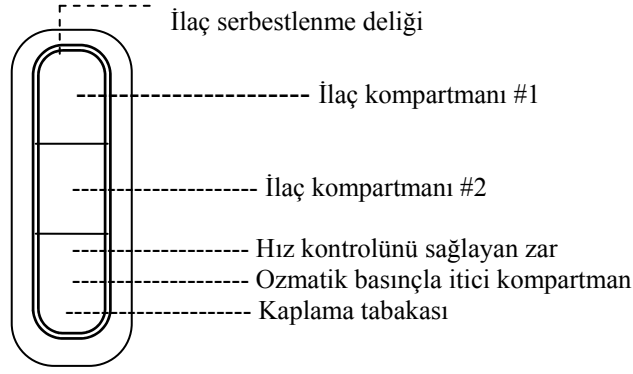
Farmasötik formülasyonların çoğu oral yolla uygulanmaktadır (5). Ancak, proteinler gibi biyoteknolojik etkin maddelerin oral yolla verilmesi in vivo stabilteleri açısından sorun yaratmaktadır (4). Burada karşılaşılan en önemli sorunlardan biri de enzimatik degradasyondur. Bunun önlenmesi için, enterik dozaj şekilleri hazırlanabilir ya da ilaç doğrudan mide yerine barsaklara hedeflendirilebilir. Bunun için mikroküre ya da mikrokapsüllerden yararlanılabilir.

2.5.1. Kontrollü Salım Yapan Sistemler

Protein ve peptidlerin klasik dozaj şekillerinden çok kontrollü salım yapan sistemleri hazırlanır (1, 4, 123). Bu sistemler terapötik etkinin uzun süre devam ettirilebilmesini sağlarlar. Hedeflendirme yapılabilir. Daha az sıklıkta ilaç alımı ile daha iyi hasta uyuncu sağlanır. Farklı şekil ve büyüklüklerde dizayn edilebilmeleri mümkündür. Kontrollü ilaç salımı gerçekleştirilebilir (1, 136).

2.5.1.1. Osmotik basınçla çalışan ilaç taşıyıcı sistemler

Osmotik basınçla çalışan sistemler, kontrollü ilaç salımı sağlayan sistemlerden biridir (1). Bu sistemlerde, ilaç, vehikül içine giren suyun yarattığı basınçla ilaç taşıyıcı sistemden serbestlenir; serbestlenme hızı hidrostatik basıncın bir fonksiyonudur (5). Bu sistemde karşılaşılabilecek problemler ise komşu dokularda püskürtmenin oluşturacağı olası bir korozif etki ve püskürtücünün ucundaki deliğin tıkanması olabilir. Uygulamalara örnek olarak Oros™ (oral), Osmet™ (parantral) verilebilir (Şekil 2.10).



Şekil 2.10 Ozmatik Basınçla Çalışan OROS® Üç Tabakalı Sistem

2.5.1.2. Boncuklar

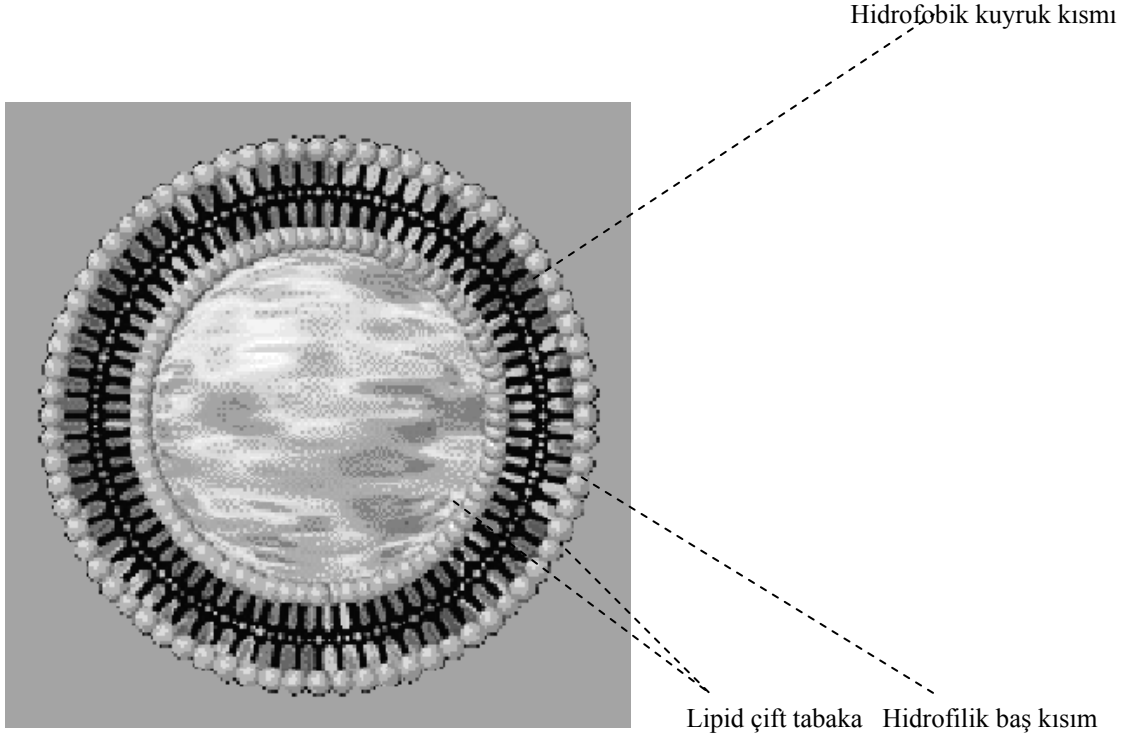
Diğer bir kontrollü salım sağlayan sistem ise boncuklardır (1). Boncuklar; sodyum aljinat ve pektin gibi müsilaj yapısındaki maddelerin divalent katyonlarla iyonik jelyasyonu ile oluşan küresel ilaç taşıyıcı sistemler olarak hazırlanabildiği gibi kitozanın asit ortamda oluşturduğu mikropartiküler sistemler de boncuk olarak formüle edilebilir (127, 131, 133, 134, 136, 224). Boncuklar kontrollü salım, enzimlerden koruma ve hedeflendirme sağlarlar. Örnek olarak insülin boncukları verilebilir (224).

2.5.1.3. Lipozomlar

Lipozomlar lipid çift tabaka ve sulu faz olmak üzere iki kısımdan oluşan kolloidal taşıyıcı sistemlerdir (Şekil 2.11) (1). Lipid çift tabaka tek veya çok sayıda olabilir. Lipozomların kontrollü salım sistemi olarak avantajları; hedeflendirme yapılabilmesi, kontrollü salımın sağlanması, immunojenik ve toksik etki göstermemeleri ve etkin maddeyi enzimatik etkilerden korumalarıdır (2-3, 5). Lipozomlar, peptid ve protein yapısındaki ilaç etkin maddelerinin hedeflendirilmesinde tercih edilen farmasötik dozaj şekilleridir (171, . Örnek olarak lipozom-protein aşılı (225-226), interleukin-2 (198), kalsitonin (176-177) ve asetilkolin esteraz içeren lipozomlar (227) verilebilir.

2.5.1.4. Mikrokapsüller ve mikroküreler

Mikropartiküler sistemlerden mikrokapsüller ve mikroküreler, protein ve peptid formülasyonunda en yaygın kullanılan ilaç taşıyıcı sistemlerdir (1-2, 4, 15, 30, 77, 121, 132, 136, 145, 147-148). Biyoparçalanır veya biyoparçalanmayan polimerler kullanılarak sürekli etki sağlayan çeşitli formülasyonlar hazırlanmıştır (1-2).



Şekil 2.11. Lipozomun şematik gösterimi.

Biyoparçalanmayan polimerler, toksik olmaları, ilaç salımı gerçekleşikten sonra uygulama bölgesinden uzaklaştırılmalarının zor oluşu ve sabit ilaç salım hızının elde edilemeyişi gibi sorunlardan ötürü, daha az tercih edilirler (1-2, 228). Biyoparçalanır polimerlerin geliştirilmesi, 1970'lerde, bu soruna bir çözüm üretmek amacıyla gerçekleştirilmiştir (229).

Polipeptid yapısında ilaç etkin maddesi içeren ve biyoparçalanır polimerlerle hazırlanmış sürekli etkili dozaj şekli ilk kez Youlle ve arkadaşları tarafından formüle edilmiştir (229). O zamandan bu yana protein enkapsülasyonunda büyük gelişmeler kaydedilmiştir (1-2, 15). Yirminci yüzyılın sonlarında proteinik etkin madde içeren mikropartiküler sistemler, ilaç pazarına girmeyi başarmıştır (Çizelge 2.3) (149). Bunların çoğu, kanser tedavisinde kullanılan ve ayda bir uygulama ile istenen terapötik etkinin sağlanmasını mümkün kılan ürünlerdir. Bunun yanı sıra, viral ve bakteriyel enfeksiyonlar ile doğum kontrolü ve AIDS tedavisinde kullanılmak üzere de ürünler geliştirilip pazara sunulmuştur (230-233). Genetik mühendisliğinde meydana gelişmeler de rekombinant HIV proteinleri gibi etkin maddelerin aşı olarak mikropartiküler sistemler halinde formüle edilmesine olanak vermiştir (234).

Çizelge 2.3 İlaç pazarında mikroküre formunda ticari ürünü bulunan proteinik etkin maddeler

| Proteinik etkin madde | Ticari ürün ismi | Üretici firma | Uygulama yolu ve şekli | Terapötik etki |
|----------------------------------|-------------------------|----------------------|---|--------------------------------------|
| Leuprolid asetat | Lupron Depot® | Takeda-Abbott | Parenteral süspansiyon (3 ay etkili tek doz uygulama) | Anti-kanser etkili (prostat kanseri) |
| Rekombinant insan büyüme hormonu | Nutropin Depot® | Genentech-Alkermes | Parenteral (sc) | Hormon yetersizliği |
| Goserelin asetat | Zoladex® | ICI | s.c. implant | Anti-kanser etkili (prostat kanseri) |
| Oktreotid asetat | Sandostatin LAR® Depot | Novartis | Parenteral süspansiyon (s.c. enjeksiyon) | Anti-kanser etkili (GH baskılanması) |
| Triptorelin | Decapeptyl® | Debiopharm | Parenteral (depo etkili) | LHRH agonist |
| Rekombinant bovin somatotropin | Posilac® | Monsanto | Parenteral (yağ bazlı preparat) | Sığırlarda süt üretimini arttırmak |

Poliesterler, polianhidridler, poliortoesterler, polifosfosfazenler ve psödopoliamino asitler gibi biyoparçalanır polimerler, proteinik etkin maddelerin enkapsülasyonunda sık kullanılmaktadır (1, 15, 136). Sentetik polimerlerin yanı sıra, doğal ve yarı sentetik polimerler de protein moleküllerinin enkapsülasyonunda kullanılmaktadır (136). Albumin mikroküreleri ve selüloz asetat ftalat (CAP) mikroküreleri bunlara örnek verilebilir. Burada en önemli unsur, protein ile polimerin uyumlu olması yani polimerin inert yapıya sahip olmasının gerekliliğidir. Bu sağlanamazsa, enkapsüle edilen protein molekülü, depolama veya in vivo salım esnasında stabilite sorunları ile karşı karşıya kalacaktır (15, 136). Protein moleküllerinin enkapsülasyonunda kullanılan sentetik bir poliester olan PLGA (poli-laktik-ko-glikolik asit), midenin asidik ortamında hidrolize olup bozunmaya uğrar. Laktik asit ve glikolik asit açığa çıkar. Enkapsüle ettiği protein molekülünün salımının biyoerozyon fazında gerçekleşen bu olay, protein molekülünün de denatüre olmasına yol açar. Bu sorun, protein molekülünü tampon ve stabilite arttırıcı maddelerle birlikte enkapsüle ederek ya da PLGA polimerinin kimyasal yapısını kararlı hale getirerek çözümlenebilir.

Mikroenkapsülasyonda en çok kullanılan yöntemlerin başlıcaları; püskürtürerek kurutma, çoklu emülsiyon oluşturma ve faz ayrışması yöntemleridir (1-2). Burada

dikkat edilmesi gereken en önemli husus; kompleks koaservasyon ile enkapsülasyon hazırlama yönteminde kullanılan organik solvanların proteini denatüre edebilmeleridir.

Mikropartiküler sistemlerin avantajları; kontrollü salım gerçekleştirmeleri, hedeflendirme yapılabilmesi, enterik kaplanabilmeleri ve böylece, daha iyi hasta uyuncunun sağlanmasıdır (1-2).

2.5.1.4.1. Mikroküreler

Mikroküreler, çapları birkaç mikrometre ile yüz mikrometre arasında değişen, monolitik yapıda, mikrot taşıyıcı sistemlerdir (1-2). Başlıca avantajları; etkin maddenin kontrollü salımının sağlanması, bu esnada yapı ve aktivitesinin değişmemesi, etkin maddeyi hedef, organ, doku ve hücrelere taşıyabilmesi, hedefe ulaşana kadar etkin maddenin sızıntısının olmaması, in vitro ve in vivo koşullarda dayanıklı olması, düşük dozlarda terapötik etkinlik sağlayabilmesi, buna bağlı olarak toksisitesinin az olması, biyouyumlu ve biyoparçalanır olması, parçalanma ürünlerinin toksik olmamasıdır. Mikroküreler, homojen ve küresel bir yapıya sahiptir. Yüzeyleri pürüzsüzdür (1-2).

2.5.1.4.1.1. Mikroküre Formülasyonlarında Kullanılan Polimerler

Mikroküre formülasyonunda yararlanılan polimerler, biyoparçalanır veya biyoparçalanmaz özelliklerine göre sınıflandırılırlar (1-2, 5). Sentetik ya da doğal kaynaklı olan biyoparçalanır polimerler, parenteral uygulama için idealdir (Çizelge 2.4) (236). Bu polimerler, enzimatik veya farklı bozunma yolları ile vücutta hedeflenen etki bölgesinde etkin madde salımını istenen sürede gerçekleştirdikten sonra, degrade olup biyouyumlu ve toksik olmayan metabolitlere dönüşürler (235). Bu metabolitler, normal fizyolojik yollarla kolayca vücuttan atılırlar. Biyoparçalanır polimerlerin daha çok tercih edilmesine yol açan diğer nedenler ise; termoplastik özellikte olmaları, kontrollü kristallenme yapabilmeleri, kontrollü bozunma hızı ve hidrofilik özelliğe sahip olmalarıdır.

Doğal polimerler, biyoparçalanır özelliktedir (5). Biyouyumlu polimerlerdir. Başlıcaları; lipitler, aminopolisakkaritler, proteinler ve karbonhidratlardır. Kolayca metabolize olurlar (2). Dayanıklılıkları ve boyutları kontrol edilebilir özelliklerindedir. Suda çözünen etkin maddeleri yüksek oranda yükleme kapasitesine sahiptirler.

Çizelge 2.4. Biyoparçalanır polimerler.

| | |
|------------------------------------|---|
| Sentetik Biyoparçalanır Polimerler | Poliortoesterler Polianhidridler Poliamidler Polialkilsiyanoakrilatlar Poliesterler: a. Laktid/glikolidler b. Polikaprolaktonlar Polifosfosfazenler Psödopoliaminoasitler |
| Doğal Biyoparçalanır Polimerler | Proteinler: a. Albumin, b. Globulin, c. Jelatin, d. Kollajen, e. Kazein Polisakkaritler: a. Nişasta b. Selüloz c. Kitozan d. Dekstran e. Aljinik asit |

Genellikle, kontrollü salım yapan ve hedeflendirilmiş sistemlerin hazırlanmasında kullanılırlar (1).

Doğal polimerlerden kollajen, toksik olmaması, büyük miktarlarda kolaylıkla elde edilebilmesi ve saflaştırılması, fiziksel, kimyasal ve immünolojik özelliklerinin istenen biçimde olması ve yüksek biyouyumluluğuna rağmen (237), bazı durumlarda protein enkapsülasyonu açısından dezavantajlar teşkil etmektedir. Bu dezavantajlar; in vivo koşullarda şişme özelliğinden dolayı, stabilitesinin, mekanik direncinin ve elastikiyetinin düşük olması; antijenik reaksiyonlara yol açması ve kullanılan çapraz bağlama ajanlarından ötürü dokuda iritasyona neden olmasıdır (1-2, 9-10).

Mikroküre hazırlamada kullanılan doğal polimerlerden albumin ise, genellikle, teşhis amaçlı olarak yararlanılan radyofarmasötiklerin formülasyonunda kullanılır (1-2). Bozunma ürünleri, toksik değildir; antijenik reaksiyona yol açmaz. Albumin, kolayca elde edilebilen bir polimerdir (9-10).

Jelatin ile hazırlanan ve proteinik etkin madde içeren mikrokürelerin sayısı, albuminle hazırlananlardan daha azdır (136). Oysa, jelatin, önemli avantajlara sahiptir. İlaçla etkileşimi daha azdır. Antijenik reaksiyon pek görülmez.

Sentetik polimerler ise, istenilen özelliklerde büyük miktarlarda ve yüksek saflıkta sentezlenebilme avantajına sahiptir (1-2, 128, 169, 235, 238). Hazırlama ve saklama süresince dayanıklı kalabilme özellikleri vardır (5).

Tüm bu özelliklerinden dolayı, biyoparçalanır polimerler proteinik ilaç etkin maddelerinin enkapsülasyonunda tercih edilirler (Çizelge 2.5).

2.5.1.4.1.2. Mikroküre Hazırlama Yöntemleri

Mikrokürelerin hazırlanmasında çok değişik yöntemler kullanılmaktadır (Çizelge 2.6) (1-2). Bunların her biri avantaj ve dezavantajlara sahiptir (1). Hazırlama yöntemi, elde edilen mikrokürelerin özelliklerini etkileyen önemli bir faktördür. Bu yüzden, istenen özelliklere sahip mikroküreler elde edebilmek için uygun yöntemin seçilmesine özen gösterilmesi gerekir.

Seçilen yöntem, mikroküreler içinde optimum düzeyde ilaç tutulmasını sağlayan, yüksek verimle elde edilebilen, enkapsüle ettiği proteinin stabilitesine olumsuz etkisi olmayan, istenen özellikte salım profili elde edilmesini mümkün kılan, akışkanlığı iyi

Çizelge 2.5 Biyoparçalanır polimerler kullanılarak enkapsüle edilen biyoteknolojik etkin maddelerin başlıcaları

| | |
|-------------------|--|
| Aşılar | GBS aşıları (Grup B Streptococcus aşıları) TT (tetanoz toksoid) JEV (Japon ensefalit virüsü) DT (difteri toksoidi) VC (kolera aşısı) |
| Terapötik ajanlar | Prolidaz β -lactoglobulin Interferonlar İnsülin Lizozim Kalsitonin İnsan büyüme hormonu |

mikroküreler üretilmesine imkan veren, seriler arasında ve seri içinde tekrarlanabilirlik özelliğine sahip, kolayca valide edilebilen bir yöntem olmalıdır. Enkapsülasyon kapasitesi proteinler için yüksek olmalıdır (136). Yüksek miktarda proteini düşük miktarda polimer kullanarak mikroküre elde edilmesine imkan vermelidir. Elde edilen mikroküreler, istenen boyutlarda olmalıdır. Burada çoğu zaman hedeflenen, enjektör iğnesini tıkamayacak büyüklüktür. Üretim işlemi süresince protein molekülü stabilitesini koruyabilmelidir. Bu yüzden, denatürasyona yol açabilecek organik çözücü miktarının az olduğu veya hiç kullanılmadığı yöntemlerin seçilmesi tercih edilir. Yapılacak ufak değişikliklerle farklı salım özelliklerine sahip mikrokürelerin elde edilmesine imkan verecek bir yöntem olmalıdır. Kullanılan çözücü ya toksik olmamalı ya da işlemin sonunda kolayca uzaklaştırılabilmelidir (1-2).

2.5.1.4.1.2.1. Polimerizasyon Yöntemleri

2.5.1.4.1.2.1.1. Emülsiyon Polimerizasyonu

Polimerizasyon işlemi, sulu ortamda emülsifyan maddelerin oluşturduğu miçeller içinde gerçekleştirilir (1-2). Monomer molekülleri, dispersiyon ortamından miçellerin içine diffüze olur. Daha sonra, dispersiyon ortamında çözünmüş halde bulunan ve sıcaklık artışı ile aktif hale geçerek miçellerin içine göç eden polimerizasyon başlatıcı moleküllerin etkisiyle polimerizasyon reaksiyonu gerçekleşir (1-2). Reaksiyon, monomer damlacıkları tamamen yok olan kadar sürer. Çoğu zaman, etkin madde yüklemesi bu esnada yapılır. Suda çözüldürülen ya da disperse edilen etkin madde, yağlı fazda dağıtılır. Monomerler, düşük sıcaklıklarda eklenir. Bu esnada, arayüzeyde hızla polimerizasyon reaksiyonu gerçekleşir ve mikroküreler meydana gelir.

Bu yöntemle elde edilen mikrokürelerin boyutları, ortalama 25-250 μm 'dir. İdeal formülasyonun hazırlanabilmesi, uygun emülsifyanın seçimi ve optimum konsantrasyonda kullanımı ile gerçekleşir. Bu, oldukça önemli bir unsurdur. Çünkü, uygun miçellerin oluşması ve oluşan emülsiyonun dayanıklılığı da kullanılan emülsifyanı bağlıdır (1-2).

Çizelge 2.6 Proteinik etkin madde içeren mikrokürelerin hazırlanmasında kullanılan yöntemlere örnekler.

| Yöntem | Protein | Polimer |
|--|--|----------------------|
| Emülsiyon yöntemi | Rekombinant insan epidermal büyüme faktörü (rhEGF) | PLA |
| | Ribozimler | PLA, PLGA, PCL |
| | Rekombinant insan eritropoietini (rhEPO) | LPLG-PBO-LPLG |
| | Protein C | PLA |
| | İnsülin Benzeri büyüme faktörü (IGF-1) | PLGA-PEG |
| | Ovalbumin | PLGA |
| | İnsan koryonik gomadotropin (hCG) | PLA PLGA |
| | İnsan serum albumini (HSA) | PLA PELA |
| | Rekombinant insan morfojenetik protein-2 (rhBMP) | PLGA |
| | Bovin serum albumin (BSA) | PLG |
| Kalsitonin | PLGA | |
| Püskürterek kurutma | Vapreotid | PLGA |
| Emülsiyon oluşturma /çözücü buharlaştırma yöntemi | Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) | PLGA/PEG |
| Dispersiyon/çözücü ekstraksiyonu/buharlaştırma yöntemi | Orntid asetat (LHRH analogu) | PLA PLGA |

2.5.1.4.1.2 Dispers Fazda Jelleşme ve Çapraz Bağlanma Yöntemi

Jelatin, albumin ve nişasta mikroküreleri bu yöntemle hazırlanmıştır (1-2, 5). Albumin mikrokürelerinin hazırlanmasında, doğal bir polimer olan albumin kullanılır. Albumin ve enkapsüle edilecek proteinik etkin madde, pamuk yağı içinde homojenize edilir. Böylece, polimerin jelleşmesi ve denatüre olması sağlanır. Elde edilen mikroküreler, yüksek sıcaklığa maruz bırakılarak veya glutaraldehit gibi çapraz bağlayıcı maddelerle muamele edilerek sertleştirilir. Yağın aşırısı ise, eterle yıkanarak uzaklaştırılır; süzülür ve kurutulur (1-2).

Bu yöntemle elde edilen mikrokürelerin boyutuna eki eden faktörlerin başlıcaları; kullanılan yağın viskozitesi ve miktarı, protein miktarı, sulu fazın miktarı ve karıştırma hızıdır (5). Kullanılan yağın viskozitesi azaldığında, mikroküre boyutu artar.

Aynı şekilde, yağ, protein ve sulu faz miktarları ile karıştırma hızının artırılması da daha büyük mikrokürelerin elde edilmesine yol açar. Kullanılan yüzey etkin maddenin özellikleri ise, mikroküre boyutunu etkilemez (1).

Etkin madde miktarı ise, oluşan mikrokürelerin yüzey morfolojisini etkiler (1-2). Örneğin, etkin madde konsantrasyonunun %25 veya daha az olan formülasyonlarda, daha düzgün yüzeyli ve küresel mikroküreler elde edilir. Etkin madde miktarının %65'in üstünde olduğu formülasyonlarda ise, yüzeyde etkin madde kristalleri görülür ve salım profilinde patlama etkisi ortaya çıkar.

2.5.1.4.1.2.2. Emülsiyon Oluşturma/Çözücü Buharlaştırma Yöntemi

Bu yöntemle, önce, su içinde yağ (y/s), yağ içinde su (y/s) veya çoklu emülsiyon (s/y/s) tipi emülsiyonlar hazırlanır ve daha sonra, bu emülsiyonlardan hareketle mikroküreler elde edilir (1-2).

Bu yöntemde kullanılan çözücü; polimeri ve etkin maddeyi çözebilmeli, dispersiyon ortamı ile kolayca karışabilmeli, kaynama derecesi ve toksisitesi düşük olmalıdır (1-2, 5). Dispersiyon ortamı ise, polimeri ve etkin maddeyi çözmemeli, dispers faz çözücüsü ile karışmamalı ve toksisitesi düşük olmalıdır.

2.5.1.4.1.2.2.1. Su İçinde Yağ Tipi Emülsiyon Oluşturma/ Çözücü Buharlaştırma Yöntemi

Bu yöntemle mikroküre hazırlanırken, önce polimerin uygun bir organik çözücüde çözeltisi hazırlanır. Daha sonra, bu çözeltiye etkin madde ilave edilip çözündürülür veya süspande edilir (1-2, 5, 136). Diğer yanda, bu karışımla çözünmeyen bir sıvı içerisinde emülsifyan çözündürülür. İki karışım birbirine ilave edilir. Bunun sonucunda ortamda damlacıklar oluşur. Çözücü oda sıcaklığında karıştırılarak, sıcaklık veya vakum uygulanarak sistemden uzaklaştırılır. Elde edilen mikroküreler, filtrasyon ya da santrifüj ile ayrılıp yıkanarak kurutulur.

2.5.1.4.1.2.2.2. Yağ İçinde Su Tipi Emülsiyon Oluşturma/ Çözücü Buharlaştırma Yöntemi

Bu yöntemle suda çok çözünen etkin maddelerin enkapsülasyonu gerçekleştirilir (1-2). Polar çözücüye ilave edilen polimer ve etkin maddeyle hazırlanan dispersiyon

fazı, içerisinde yüzey etkin madde çözündürülmüş lipofilik dispers fazla karıştırılarak emülsiyon hazırlanır. Homojenizasyon işlemi sırasında, organik çözücünün buharlaşması ile ortamda mikroküreler oluşur. Bu yöntemin en önemli sakıncası, yağın uzaklaştırılması için organik çözücü ile yıkama işleminin yapılmasının gerekli oluşudur.

2.5.1.4.1.2.2.3. Çoklu Emülsiyon Oluşturma/ Çözücü Buharlaştırma Yöntemi

Çoklu emülsiyon oluşturma yöntemi ile biyoteknolojik etkin maddelerin formülasyonu mümkündür (1-2, 15, 136). Önce, etkin maddenin sulu çözeltisi hazırlanır ve polimer çözeltisi içinde disperse edilir. Daha sonra, bu dispersiyona y/s tipi emülsifiyanın sulu çözeltisi ilave edilip homojenize edilir. Elde edilen çoklu emülsiyon (s/y/s) sisteminden çözücünün buharlaşması ile etkin maddenin sulu çözeltisini içeren mikroküre dispersiyonu elde edilir. Daha sonra, bu dispersiyon filtre edilerek mikroküreler ayrılır, santrifüjlenir, yıkanır ve kurutulur. Burada kullanılan emülsifiyanın en önemli görevi, disperse edilen polimer damlacıklarının kısa süreli dayanıklılığını sağlamaktır. Böylece, agregasyon ve koalesans önlenmiş olur. Bu yöntemle mikroküre hazırlanmasında kullanılan polimerlerin başlıcaları; jelatin, polivinil alkol ve metil selülozdur. Kullanılan y/s tipi emülsifiyanların başlıcaları ise; Tween 80, sodyum oleat ve sodyum dodesil sülfattır. Burada, kullanılan emülsifiyanın konsantrasyonunun optimum değerinde olması önemlidir (136). Aksi halde, etkin maddenin polimerdeki çözünürlüğünü istenmeyen oranda arttırabilir.

2.5.1.4.1.3. Mikrokürelerin Eczacılık ve Tıpta Uygulamaları

Mikroküreler, ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasının yanısıra; hastalıkların teşhisinde, pulmoner perfüzyon maddesi olarak, dolaşım sistemi fonksiyonlarının tetkikinde, damar çaplarının ölçülmesinde, anjiyografide, hücre kültüründe, biyoafinite ve kolon kromatografisinde kullanılmaktadır (1-2).

Mikroküreler, genellikle, oral ve parenteral yolla uygulanır. Parenteral yolla uygulanan mikroküreler, kontrollü veya geciktirilmiş etkin madde salımı sağlarken hedeflendirmeyi de mümkün kılar (5). Oral uygulamada ise, hedeflendirme ve kontrollü salımın yanısıra, etkin maddenin dayanıklılığının arttırılması da mümkündür (1).

Mikrokürelerin hedeflendirilmesi pasif veya aktif yöntemlerle gerçekleştirilir (1-2). Böylece, etkin madde, vücudun istenen doku, hücre ya da organına gönderilebilmektedir. Antikanser ilaçlardan 5-fluorourasilin mikroküreleri kanser tedavisinde tümöre hedeflendirilerek düşük dozda etkin tedavi ve daha az yan etki sağlanmaktadır.

Mikroküreler, peptid ve protein yapısındaki ilaç etkin maddelerinin formülasyonu için de en uygun dozaj şekillerindedir (4, 136). Salmon kalsitoninin PLGA ile hazırlanan mikroküreleri buna en güzel örnektir (181, 239-248). Bu şekilde, enkapsüle edilen proteinlerin ve peptidlerin stabilitesinin artırılması ve kontrollü salımın sağlanması mümkün olmaktadır.

2.6 Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada proteinik etkin maddelerin gastrik ortamda stabilitesini arttırmak için enterik mikrokürelerin hazırlanması amaçlanmaktadır. Bunun için model ilaç olarak bovin serum albumin (BSA), enterik polimer olarak selüloz asetat ftalat, hazırlama yöntemi olarak da emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma yöntemi seçilmiştir. Literatürde selüloz asetat ftalat ile proteinik etkin madde içeren enterik mikroküre hazırlanmasına dair kayıt olmamasından ötürü çalışmanın bilimsel alanda önemli bir boşluğu dolduracağı düşünülmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

| | |
|--------------------------------|------------------------------------|
| Bovin Serum Albumin | Sigma Chemical Co., St. Louis, ABD |
| Span 80 | E. Merck, Almanya |
| Mineral yağ | Sigma Chemical Co., St. Louis, ABD |
| Selüloz Asetat Ftalat | Eastman Kodak, İngiltere |
| Aseton | E. Merck, Almanya |
| Dietil eter | E. Merck, Almanya |
| Folin C Reaktifi | E. Merck, Almanya |
| Bakır sülfat | E. Merck, Almanya |
| Sodyum Klorür | E. Merck, Almanya |
| Disodyum hidrojen ortofosfat | E. Merck, Almanya |
| Potasyum dihidrojen ortofosfat | E. Merck, Almanya |
| Sodyum hidroksit | E. Merck, Almanya |
| Sodyum karbonat | E. Merck, Almanya |
| Potasyum tartarat | E. Merck, Almanya |

3.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

| | |
|-----------------------------|---|
| Analitik terazi | O'Haus Advanturer, Almanya |
| Buzdolabı | Regal, Nofrost, Türkiye |
| Çeker ocak | Nurgaz, Türkiye |
| Disolüsyon cihazı | DT GE, Aymes, Türkiye |
| Distile su cihazı | Milipore, ABD |
| DTA/TG cihazı | Shimadzu DT-40 Thermal Analyser, Japonya |
| Elek seti (vibrasyonlu) | Fritsch analysette, Almanya |
| Erime derecesi tayin cihazı | Thomas Hoover Capillary Melting Point Apparatus, İngiltere |
| Etüv | Binder, Almanya |

| | |
|-----------------------------|---------------------------|
| FT-IR Spektrofotometre | Perkin Elmer 1720 X, ABD |
| Manyetik karıştırıcı | Velp Scientifica, Almanya |
| Otomatik mikropipetler | Eppendorf, Almanya |
| pHmetre | Mettler Toledo, ABD |
| Polarizan mikroskop | Nikon, Japonya |
| UV-Visible spektrofotometre | Shimadzu, Japonya |
| Vorteks | MVS-1 Multimixer, Almanya |

3.1.3. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

Fizyolojik fosfat tamponu: 6.8 g potasyum dihidrojen fosfat 250 ml distile suyun içerisinde çözüldürüldü. Bu çözeltiliye 0.1 N NaOH çözeltisinden 112 ml ilave edilip hacmi distile su ile 1litreye tamamlandı. Elde edilen tampon çözeltisinin pH'sı ölçüldüğünde 6.8 olduğu tespit edildi.

3.1.4. Kullanılan İstatistik Yöntemler ve Bilgisayar Programları

3.1.4.1. Kullanılan İstatistik Yöntemler

Tez çalışması kapsamında, farklı mikroküre serileri arasındaki etkin madde tutma kapasitesi açısından farklılığın anlamlı olup olmadığının belirlenmesi amacıyla Student t-testi kullanıldı. "p" değerinin 0.05'den küçük olması aradaki farkın anlamlı olması şeklinde tanımlandı.

3.1.4.2. Kullanılan Bilgisayar Programları

Tez metninin yazılması, grafiklerin çizimi, çizelgelerin oluşturulması ve istatistik hesaplarının yapılmasında aşağıda belirtilen bilgisayar programları kullanıldı.

- a. Microsoft Word 2000 (Microsoft Corp., ABD)
- b. Microsoft Excel 2000 (Microsoft Corp., ABD)
- c. SigmaStat 1.0 İstatistik programı (Jandel Corp., ABD)

3.2. Yöntemler

3.2.1. Mikrokürelerin Hazırlanmasında Kullanılan Maddelerin Karakterizasyonu

3.2.1.1. Selüloz Asetat Ftalat'ın Karakterizasyonu

Bu bölümde, mikroküre formülasyonlarında kullanılan selüloz asetat ftalatın (CAP) fizikokimyasal özelliklerinden söz edilmektedir.

3.2.1.1.1. Selüloz Asetat Ftalat'ın Erime Derecesi Tayini

Bir ucu kapalı bir tüpün dibine CAP konarak erime derecesi tayin cihazına yerleştirildi. Daha sonra, alet açılıp 6 devirde çevrilerek ısıtıldı. Erime durumu termometre kontrolü ile saptandı.

3.2.1.1.2. Selüloz Asetat Ftalat'ın FT-IR Spektrumu

Selüloz Asetat Ftalat'ın KBr tableti basılıp FT-IR spektrumu, 4000-400 cm^{-1} dalga sayısı aralığında elde edildi.

3.2.1.1.3. Selüloz Asetat Ftalat'ın DTA/TG Analizi

Termal analiz işlemi, 200-2000 K arasında gerçekleştirilmiştir. $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ referans olarak kullanılmıştır. Analiz, 10 k/dak ısıtma hızında 8-10 mg numune kullanılarak azot akımı ($60 \text{ cm}^3/\text{dak}$) altında gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. Boş Mikrokürelerin Hazırlanması

Terapötik etkin madde içeren mikroküre hazırlanmasına geçmeden önce, optimum koşulların belirlenmesi amacıyla, boş mikroküreler hazırlanıp karakterize edildi. Mikroküreler, emülsiyon oluşturma/ çözücü buharlaştırma yöntemiyle hazırlandı. CAP'ın asetonadaki çözeltisi hazırlanıp 30 dakika süreyle manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Karışım daha sonra, %1 oranında Span 80 içeren ve paletli karıştırıcı ile sürekli karıştırılan mineral yağa porsiyonlar halinde ilave edildi. Elde edilen emülsiyon, 400 rpm'de asetonun tamamı buharlaşınca kadar karıştırıldı. Oluşan mikroküreler, süzülüp dietil eterle yıkandı ve açık havada, oda sıcaklığında kurutuldu.

3.2.2.1. Boş Mikrokürelerin Karakterizasyonu

3.2.2.1.1. Partikül Boyutu Tayini

Hazırlanan mikrokürelerin ortalama partikül boyutu, elek yöntemi ile belirlendi. Ölçümler, mikroküreler hazırlandıktan sonra 24 saat içerisinde gerçekleştirildi. Elde edilen mikroküreler, 20 µm – 1 mm mesh aralığında ve azdan çoğa doğru dizilmiş elek setinin en üstüne yerleştirildi ve 5 ayar noktasında 5 dakika süreyle vibrasyon uygulandı. Her elek üstünde kalan mikroküre tartılıp partikül boyutu dağılımı incelendi.

3.2.2.1.2. Mikrokürelerin Şekillerinin Belirlenmesi

Elde edilen mikrokürelerin polarize ışık mikroskobu kullanılarak şekilleri incelenip fotoğrafları çekildi.

3.2.2.1.3. Boş Mikrokürelerin FT-IR Spektrumu

Boş mikrokürelerin FT-IR spektrumu, 4000-400 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında elde edildi.

3.2.3. Mikrokürelerin Hazırlanmasında Kullanılan Etkin Maddenin Karakterizasyonu

3.2.3.1. Bovin Serum Albuminin Karakterizasyonu

Bu bölümde, mikroküre formülasyonlarında model etkin madde olarak kullanılan Bovin Serum Albuminin (BSA) fizikokimyasal özelliklerinden söz edilmektedir.

3.2.3.1.1. Bovin Serum Albuminin Erime Derecesi Tayini

Bir ucu kapalı bir tüpün dibine BSA konarak erime derecesi tayin cihazına yerleştirildi. Daha sonra, alet açılıp 6 devirde çevrilerek ısıtıldı. Erime durumu termometre kontrolü ile saptandı.

3.2.3.1.2. Bovin Serum Albuminin FT-IR Spektrumu ve DTA/TG Analizi

Bovin Serum Albuminin FT-IR spektrumu, 4000-400 cm^{-1} dalga sayısı aralığında elde edildi. DTA/TG analizi ise, Bölüm 3.2.1.1.3'deki gibi yapıldı.

3.2.3.2. Bovin Serum Albuminin Miktar Tayini Yöntemi

Model ilaç etkin maddesi olarak seçilen BSA'nın formülasyonlarda ve salım ortamındaki miktarlarının belirlenebilmesi amacıyla miktar tayini yöntemi geliştirildi. Bunun için Lowry yöntemi kullanıldı (249).

Lowry yönteminde; fosfomolibdotungstik asit çözeltisinin (Folin belirteci) tirozin bakiyeleri ile reaksiyona girerek oluşturduğu mavi renkli kompleksin spektrofotometrik olarak absorbans değerlerinin ölçümü yapılarak mikrokürelerde tutulan BSA miktarı tespit edildi. Burada reaksiyon, bakır ile BSA molekülü arasında kompleks oluşumu ile başlar ve alkali çözeltide, oda sıcaklığında 5-10 dakika süresinde tamamlanır.

3.2.3.2.1. Bovin Serum Albuminin Miktar Tayini İçin Standart Doğrunun Çizilmesi

Öncelikle, bu yöntemde kullanılacak tüm cam eşyalar yıkama asidi ile yıkanıp bol distile su ile durulandı. Kontaminasyonu önlemek için çalışma boyunca eldiven kullanıldı.

Lowry miktar tayini yönteminin yapılabilmesi için aşağıdaki çözeltiler taze hazırlandı:

- a. Sodyum karbonatın 0.1 N NaOH içinde %2 (a/h)'lik çözeltisi: A belirteci
- b. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 'nun %1'lik potasyum tartarat çözeltisi içinde %0.5 (a/h) konsantrasyonda çözeltisi: B belirteci
- c. 50 ml A belirteci ile 1 ml B belirteci karışımı: C belirteci
- d. 1 hacim Folin belirteci + 2 hacim distile su: D belirteci

Çalışmaya uygun konsantrasyonda olacak şekilde 0.5 ml hacminde standart çözeltiler (20, 80, 140, 200, 280, 340, 400 $\mu\text{g/ml}$), kör örnek ve protein örnekleri hazırlandı ve bunların her birine 5'er ml C belirteci ilave edilip karıştırıldı. Elde edilen karışımlar, oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Daha sonra, D belirtecinden 0.5 ml alınıp hızla bu karışıma ilave edilip vorteksle karıştırıldı. Elde edilen karışım 30 dakika

karanlıkta bekletildi. Son olarak, her birinin absorbanası 660 nm’de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Bulunan absorbanans değerleri ile standart doğru grafiği çizildi

3.2.4 Bovin Serum Albumin İçeren Mikrokürelerin Hazırlanması

Terapötik etkin madde içeren mikroküreler, Bölüm 3.2.2’de verilen emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak hazırlandı. Karıştırma hızı ve etkin madde miktarının mikrokürenin etkin madde tutma kapasitesi üzerine etkisini incelemek için farklı formülasyonlar geliştirildi (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Mikroküre formülasyonlarının içerikleri ve kodları.

| Formülasyon Kodu | Etkin Madde Miktarı (mg) | Karıştırma Hızı (rpm) |
|------------------|--------------------------|-----------------------|
| F01300 | 100 | 300 |
| F01400 | 100 | 400 |
| F05300 | 500 | 300 |
| F05400 | 500 | 400 |

Hesaplı miktar BSA, CAP’ın asetondaki çözeltisine ilave edilerek etkin madde içeren mikroküreler hazırlandı.

3.2.4.1. Bovin Serum Albumin İçeren Mikrokürelerin Karakterizasyonu

3.2.4.1.1. Partikül Boyutu Tayini

Hazırlanan mikrokürelerin ortalama partikül boyutu, Bölüm 3.2.2.1.1.’de belirtildiği gibi elek yöntemi ile belirlendi.

3.2.4.1.2. Mikrokürelerin Şekillerinin Belirlenmesi

Elde edilen mikrokürelerin polarize ışık mikroskobu kullanılarak şekilleri incelenip fotoğrafları çekildi.

3.2.4.1.3. Bovin Serum Albumin İçeren Mikrokürelerin FT-IR Spektrumu

BSA içeren mikrokürelerin FT-IR spektrumu, 4000-400 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında elde edildi.

3.2.4.1.4. Bovin Serum Albumin İçeren Mikrokürelerin DTA/TG Analizi

Mikrokürelerin içerisinde tutulan Bovin Serum Albuminin stabilitesini hazırlama yönteminin olumsuz yönde etkileyip etkilemediğini anlamak için etkin madde içeren mikrokürelerin DTA/TG analizleri Bölüm 3.2.1.1.3’de verilen yöntemle gerçekleştirildi.

3.2.4.1.5. Hazırlama Verimi

Kullandığımız emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma yöntemindeki üretim kapasitesini değerlendirmek için formülasyondaki toplam katı miktardan hareketle, aşağıdaki formül kullanılarak mikrokürelerin verimleri hesaplandı.

$$\%Verim = A/B \times 100 \quad (3)$$

Bu denklemde yer alan A: elde edilen mikrokürelerin ağırlığını (g); B: formülasyonda kullanılan katı madde ağırlığını (g) ifade etmektedir.

3.2.4.1.6. Mikrokürelerde Tutulan Bovin Serum Albumin Miktarının Belirlenmesi

BSA içerecek şekilde hazırlanan her bir mikroküre serisinden 100 mg tartılıp porselen havana alındı. Havan eli ile iyice toz edildikten sonra, pH 7.4 fosfat tamponu ile ekstraksiyon yapıldı. Elde edilen ekstredeki BSA miktarı, Lowry yöntemi kullanılarak belirlendi. Buradan o serinin tümünde tutulan etkin madde miktarı standart doğru denklemi kullanılarak hesaplandı. Her bir seri için en az 6 ölçüm yapıp ortalaması alındı.

3.2.4.2. Mikrokürelerde Saklama Koşullarında Stabilitate Çalışmaları

Emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan mikroküre serilerinden seçilen formülasyonlar, buzdolabı (4 ± 1°C) ve etüv (60 ± 1°C)’de saklanmıştır. 30 ve 45. günlük saklama sürelerinin sonunda, Bölüm 3.2.4.1.6’da belirtilen yöntemle mikrokürelerin tuttuğu BSA miktarı belirlenmiştir.

3.2.4.3. Mikrokürelerden In Vitro Koşullarda Bovin Serum Albumin Salım Çalışmaları

İn vitro koşullarda, mikrokürelerden BSA salımını değerlendirme çalışmalarında, USP XXII'de tanımlanan palet yöntemi kullanıldı (250).

Her bir formülasyona ait her bir seriden 100 mg BSA içerecek şekilde hesaplı miktar mikroküre tartıldı. Disolüsyon çalışmaları, 900 ml çözünme ortamında (pH = 1.2 ve 6.8), $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 'de, 100 rpm'de yapılmıştır. Çözünme ortamından belirli aralıklarla alınan 5 ml'lik örneklerin, 0.2 µm'lik selüloz nitrat filtre ile süzülükten sonra, UV-visible spektrofotometrede Lowry yöntemi kullanılarak absorbans değerleri ölçülmüştür. Sink koşullarını sağlamak amacıyla her defasında ortama alınan örnek hacmi kadar fosfat tamponu ilave edilmiştir. Her bir çalışma en az 6 kez tekrarlanmıştır.

3.2.4.4. Mikrokürelerden In Vitro Koşullarda Bovin Serum Albumin Salımının Kinetiğinin İncelenmesi

Bölüm 3.2.4.3'de belirtildiği gibi gerçekleştirilen salım çalışmaları sonucunda elde edilen bulguların önce, zamana karşı yüzde salım grafikleri çizildi. Daha sonra, sıfırıncı, birinci derece ve Higuchi kinetiğine uygunluğu araştırıldı (5, 251).

4. BULGULAR

4.1. Mikrokürelere Ait Çalışmalar

4.1.1. Mikrokürelerin Hazırlanmasında Kullanılan Maddelerin Karakterizasyonu

4.1.1.1. Selüloz Asetat Ftalat'ın Karakterizasyonu

4.1.1.1.1. Selüloz Asetat Ftalat'ın Erime Derecesi Tayini

Bölüm 3.2.1.1.1'de anlatıldığı gibi CAP'ın erime derecesi tayini çalışması yapıldı ve erime derecesi 494 °C olarak bulundu. Bulunan değer literatüre uygun olduğu tespit edildi (252).

4.1.1.1.2. Selüloz Asetat Ftalat'ın FT-IR Spektrumu

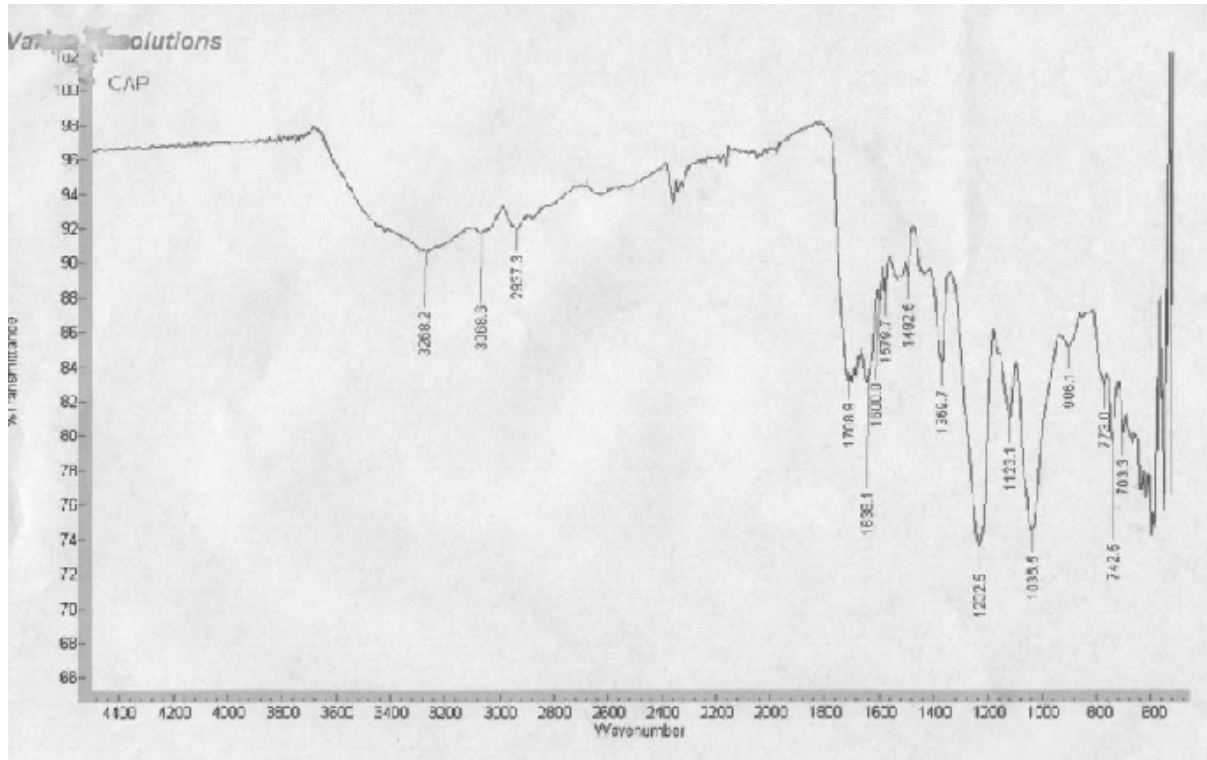
Selüloz Asetat Ftalat'ın 4000-400 cm^{-1} dalga sayısı aralığında Fourier Transform Infrared Spektrumu çekildi. 742.5, 906.1, 1123.1, 1036.5, 1232.5, 1369.7, 1492.5, 1579.7, 1708.9, 2937.3 cm^{-1} 'de CAP'a özgü pikler saptandı (Şekil 4.1).

4.1.1.1.2. Selüloz Asetat Ftalat'ın DTA/TG Analizi

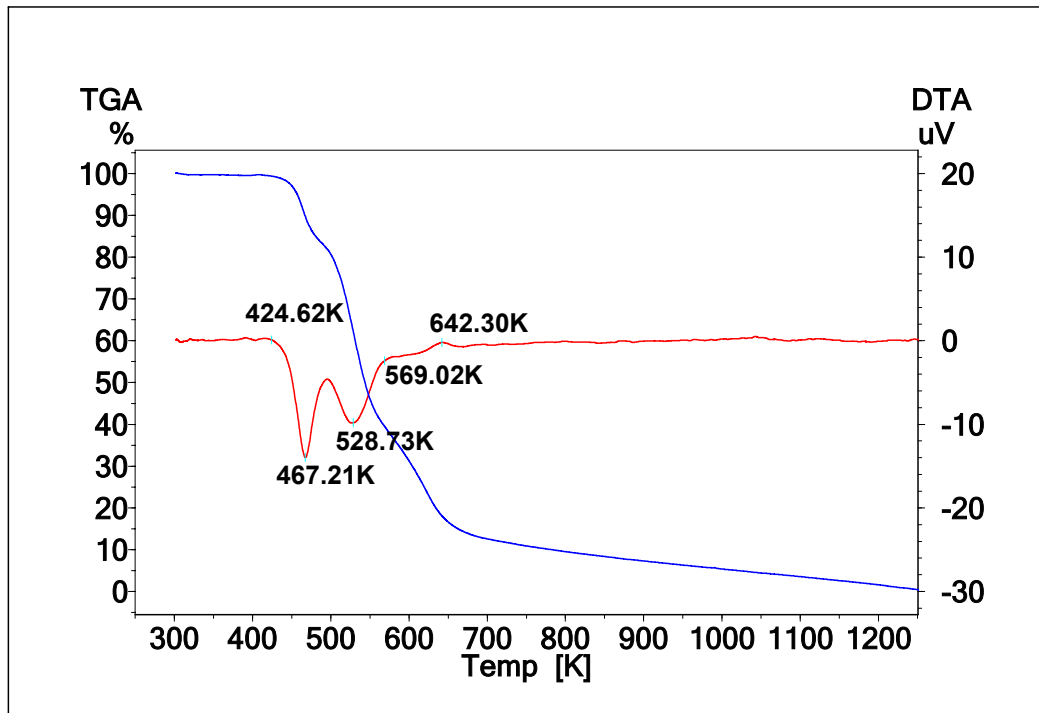
Selüloz Asetat Ftalat'ın DTA/TG analizi, 300-1200 K aralığında gerçekleştirildi (Şekil 4.2). TG grafiği, CAP'ın orijinal kütlesinin %99.9'unu 298 - 1250°K arasında yitirdiğini göstermektedir. Bu sıcaklık aralığında, bonzuma, üç aşamada gerçekleşmektedir:

- İlk bozunma, 426-496°K aralığında meydana gelmektedir ve madde, kütlesinin %16.6'sını yitirmektedir.
- İkinci bozunma ise, 496-598°K aralığında olur. Bu aralıkta, %45.5 oranında kütle kaybı meydana gelir.
- Üçüncü ve son bozunma aşaması ise, 578-1250 °K aralığında gerçekleşir. Madde, bu aralıkta kütlesinin %37.7'sini kaybeder.

CAP'a ait DTA profilinde, iki adet egzotermik ve bir adet endotermik pik görülmektedir. Bu piklerden ilki, 426-495°K aralığındadır ve 467°K'de maksimum



Şekil 4.1. Selüloz Asetat Fthalat'ın FT-IR spektrumu.



Şekil 4.2. Selüloz Asetat Fthalat'ın DTA/TG diyagramı.

verir. İkinci pik ise, 495-578°K aralığında bulunmaktadır ve 611°K'de maksimuma ulaştığı görülmektedir.

4.1.2. Boş Mikrokürelerin Hazırlanması

Terapötik etkin madde içeren mikroküre hazırlanmasına geçmeden önce, optimum koşulların belirlenmesi amacıyla, boş mikroküreler hazırlanıp karakterize edildi. Mikroküreler, 300 (F300) ve 400 (F400) rpm karıştırma hızında hazırlandı.

4.1.2.1. Boş Mikrokürelerin Karakterizasyonu

4.1.2.1.1. Partikül Boyutu Tayini

Bölüm 3.2.2.1.1'de anlatıldığı gibi, partikül boyutu dağılımları belirlendi. Ortalama partikül boyutları Çizelge 4.1'de verildi.

Çizelge 4.1. Boş mikrokürelerin ortalama partikül boyutları

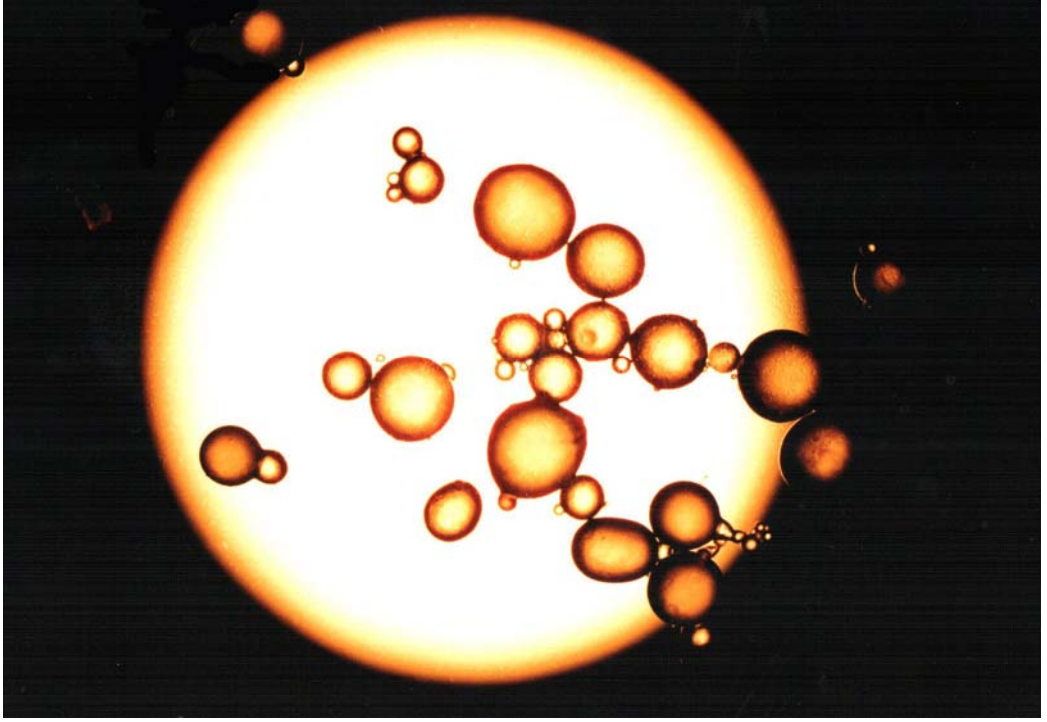
| Formülasyon | Ortalama Partikül Boyutu Aralığı ($\mu\text{m} \pm \text{SD}$) | Partikül Boyutu Dağılımı (%) |
|--------------------|--|---|
| F300 | 500-1000 | 72.7 |
| F400 | 250-500 | 27.6 |

4.1.2.1.2. Mikrokürelerin Şekillerinin Belirlenmesi

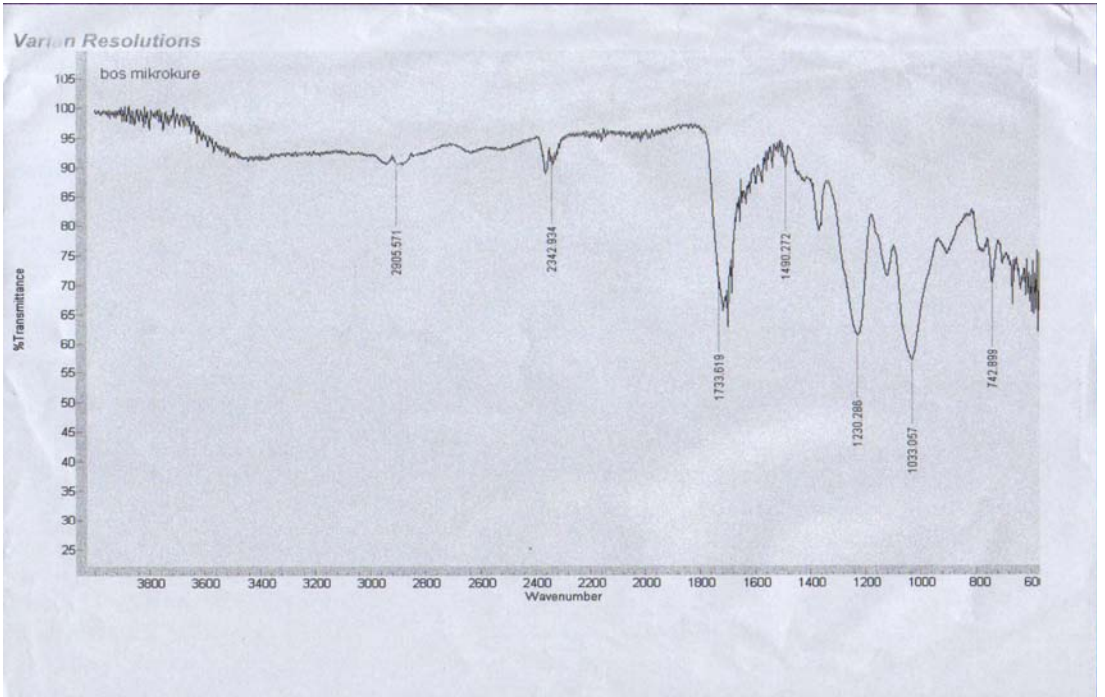
Elde edilen mikrokürelerin polarize ışık mikroskobu kullanılarak şekilleri incelenip fotoğrafları çekildi (Şekil 4.3). Mikrokürelerin küresel şekilli ve pürüzsüz yüzeyli olduğu tespit edildi.

4.1.2.1.3. Boş Mikrokürelerin FT-IR Spektrumu

Boş mikrokürelerin FT-IR spektrumu, 4000-400 cm^{-1} dalga sayısı aralığında elde edildi (Şekil 4.4). Mikroküre hazırlanmasında kullanılan CAP'a spesifik ana pikler burada da görülmektedir.



Şekil 4.3. Boş mikrokürelerin polarize ışık mikroskobu ile çekilen fotoğrafı.

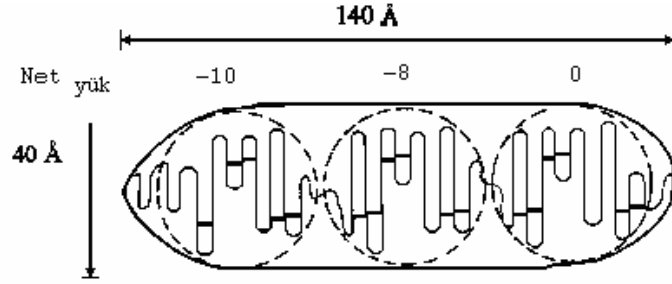


Şekil 4.4. Boş mikrokürelerin FT-IR spektrumu.

4.2. Mikrokürelerin Hazırlanmasında Kullanılan Etkin Maddenin Karakterizasyonu

4.2.1. Bovin Serum Albuminin Karakterizasyonu

Bu bölümde, mikroküre formülasyonlarında model etkin madde olarak kullanılan Bovine Serum Albuminin (BSA) fizikokimyasal özelliklerinden söz edilmektedir (254). BSA, %55 oranında alfa-heliks konformasyonu içerir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Bovin serum albuminin yapısının şematik gösterimi.

4.2.1.1. Bovin Serum Albumin'in Erime Derecesi Tayini

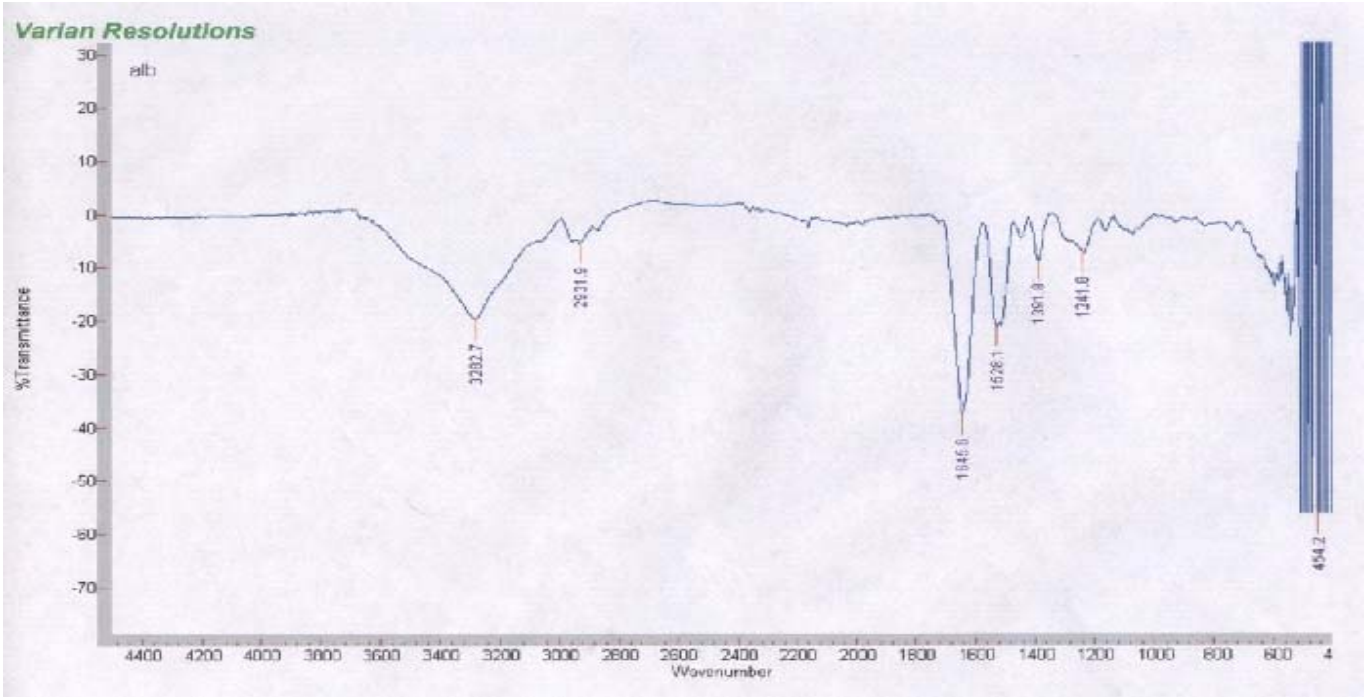
Bölüm 3.2.2.1.1'de anlatıldığı gibi çalışılarak model etkin madde olarak kullanılan BSA ısıtılırken, 65°C'nin üstüne çıkıldığında erime gösterdi (253).

4.2.1.2. Bovin Serum Albumin'in FT-IR Spektrumu

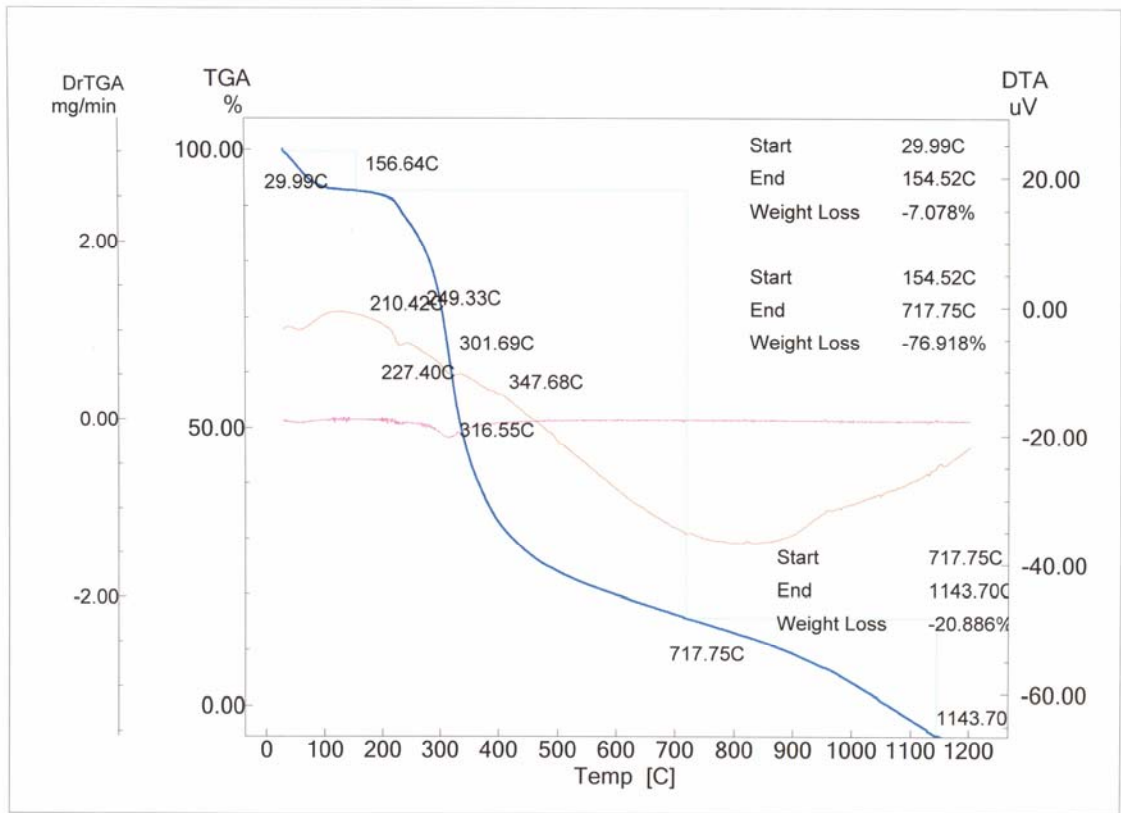
Bovin Serum Albumin'in FT-IR spektrumu, 4000-400 cm^{-1} dalga sayısı aralığında elde edildi (Şekil 4.6) 3282.7 cm^{-1} 'de hidrojen bağı (N-H grubu), 1545.6 cm^{-1} ve 1528.1 cm^{-1} 'de proteinik yapıya özgü amid bağları, 1391.8 cm^{-1} 'de karboksil bağı ve son olarak, 1241.8 cm^{-1} 'de ise, C—O bağına varlığını gösteren pikler saptandı. Elde edilen piklerin literatürle uygunluk gösterdiği belirlendi (254-255)

4.2.1.3. Bovin Serum Albuminin DTA/TG Analizi

Bu çalışmada model ilaç etkin maddesi olarak kullanılan BSA'nın DTA/TG profili Şekil 4.7'de gösterilmiştir. BSA, 282°C'de dekompoze olmaktadır. Bovin serum albuminin DTA profili, iki endotermik pik verdi.



Şekil 4.6. Bovin Serum Albuminin FT-IR spektrumu



Şekil 4.7. BSA'nın DTA/TG grafiği

Numunenin TG grafiği, bozunmanın 29-1143°K aralığında üç aşamada gerçekteştiğini göstermiştir:

a. İlk bozunma, 29 -154°K aralığında ve %7.078 kütle kaybı ile meydana gelmektedir.

b. İkinci bozunma, 154-717°K aralığında olmakta ve maddenin kütlesinin %76.918'i yitirilmektedir.

c. Üçüncü bozunma ise, 717-1143°K aralığında meydana gelmektedir.

4.2.2. Bovin Serum Albumin Miktar Tayini Yöntemi

Model ilaç etkin maddesi olarak seçilen BSA'nın formülasyonlarda ve salım ortamındaki miktarlarının belirlenebilmesi amacıyla Bölüm 3.2.3.2'de anlatılan miktar tayini yöntemi geliştirildi. Bunun için Lowry yöntemi kullanıldı (249).

4.2.1.3.1. Bovin Serum Albumin Miktar Tayini İçin Standart Doğrunun Çizilmesi

Bölüm 3.2.3.2.1'de anlatıldığı gibi çalışılarak BSA miktar tayininde kullanılacak standard doğru ve denklemi ($y = -3,1349 \cdot 10^{-2} + 4,456x$) ile eğim ($m = 4.456$), keşişim noktası ($b = -3,1349$) ve korelasyon katsayısı ($r = 0.99989$) ($r^2 = 0,9998$) elde edildi (Şekil 4.8).

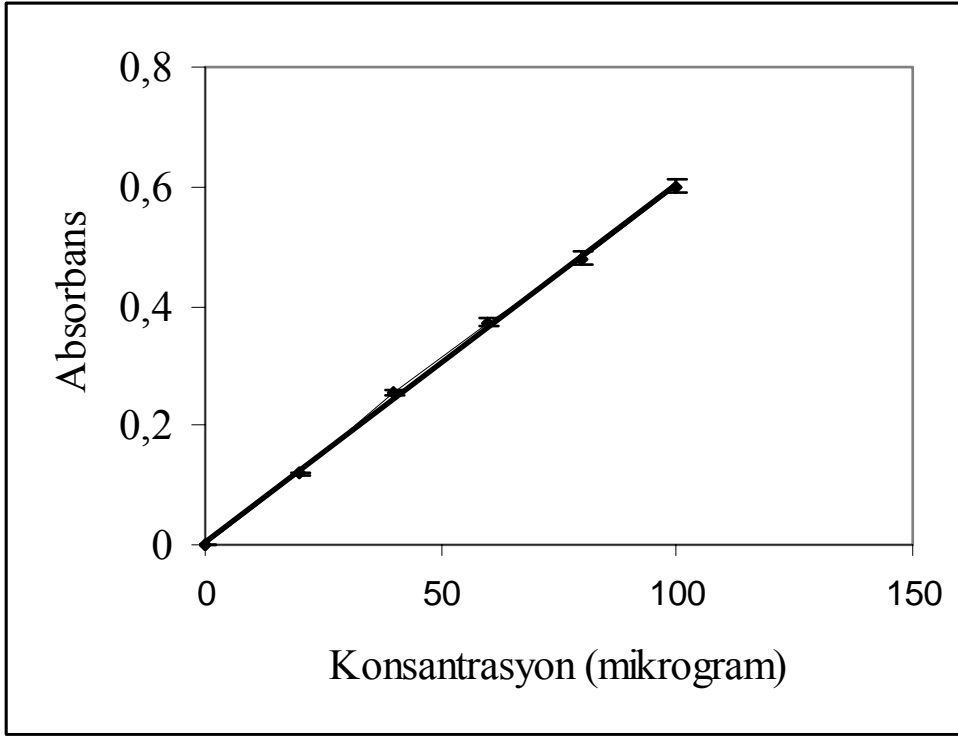
4.3 Bovin Serum Albumin İçeren Mikrokürelerin Hazırlanması

Terapötik etkin madde içeren mikroküreler, Bölüm 3.2.2'de verilen emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak hazırlandı (1, 256-257). Aynı etkin maddeyi farklı konsantrasyonlarda içeren ancak, farklı karıştırma hızları kullanılarak değişik mikroküre formülasyonları elde edildi.

4.3.1. Bovin Serum Albumin İçeren Mikrokürelerin Karakterizasyonu

4.3.1.1. Partikül Boyutu Tayini

Hazırlanan mikrokürelerin partikül boyutu dağılımı, Bölüm 3.2.4.1.1.'de belirtildiği gibi elek yöntemi ile belirlendi. Sonuçlar, Çizelge 4.2'de verildi.



Şekil 4.8. Bovin serum albumin miktar tayini standart doğrusu.

Çizelge 4.2. BSA içeren mikrokürelerin partikül boyutu dağılımı

| Formülasyon | Ortalama Partikül Boyutu Aralığı (μm) | Partikül Boyutu Dağılımı (%) |
|-------------|---|------------------------------------|
| F01300 | ≥ 1000 | 37.4 |
| | 500-1000 | 54.9 |
| F01400 | ≥ 1000 | 12.88 |
| | 500-1000 | 68.5 |
| | 250-500 | 12.88 |
| F05300 | ≥ 1000 | 27.5 |
| | 500-1000 | 57.7 |
| F05400 | ≥ 1000 | 8.7 |
| | 500-1000 | 10.2 |
| | 250-500 | 78.27 |

4.3.1.2. Mikrokürelerin Şekillerinin Belirlenmesi

Elde edilen mikrokürelerin polarize ışık mikroskobu kullanılarak şekilleri incelenip fotoğrafları çekildi (Şekil 4.9). BSA içeren mikrokürelerin küresel şekilli, pürüzsüz yüzeyli olduğu ve yüzeyinde etkin madde kristali içermediği görüldü.



Şekil 4.9. BSA içeren mikrokürelerin polarize ışık mikroskobu ile çekilmiş fotoğrafı

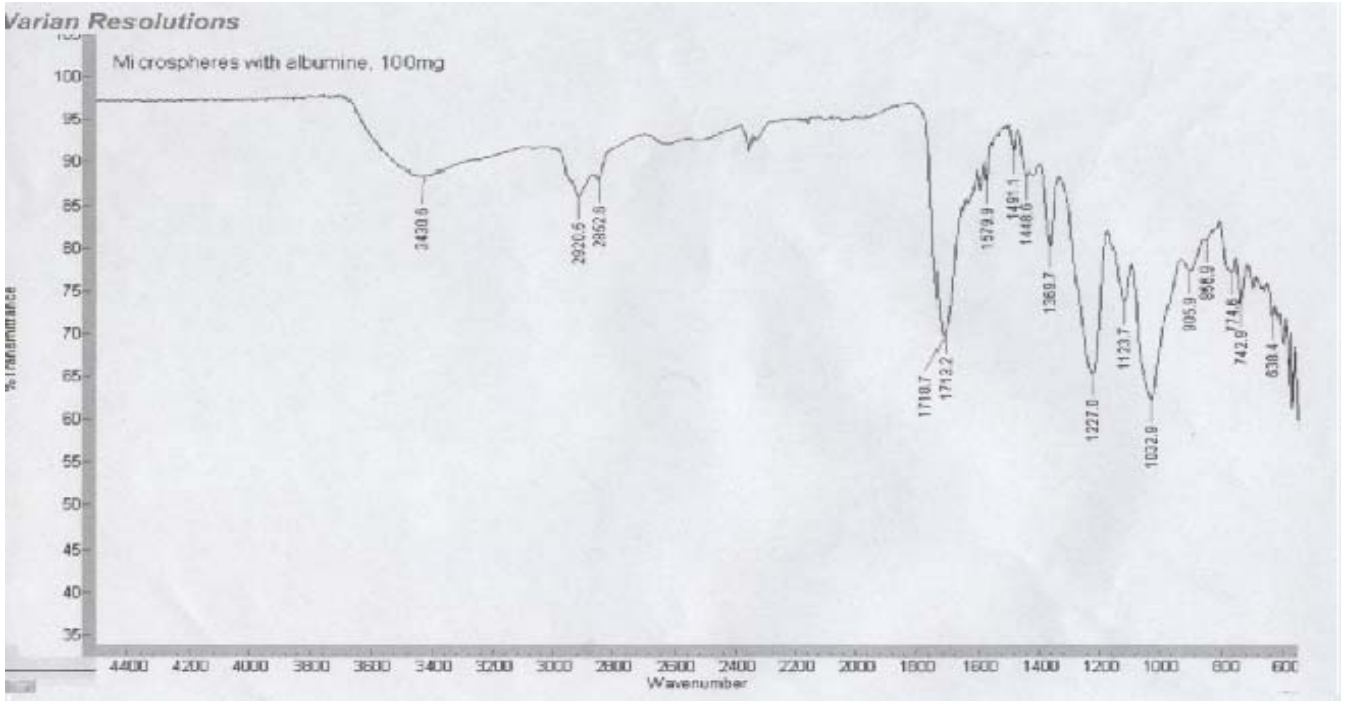
4.3.1.3. Bovin Serum Albumin İçeren İçeren Mikrokürelerin FT-IR Spektrumu

BSA içeren mikrokürelerin FT-IR spektrumu, $4000-400\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığında elde edildi (Şekil 4.10). Elde edilen spektrum, mikroküre oluşumu esnasında BSA ile CAP arasında kimyasal bir etkileşimin gerçekleşmediğini göstermektedir.

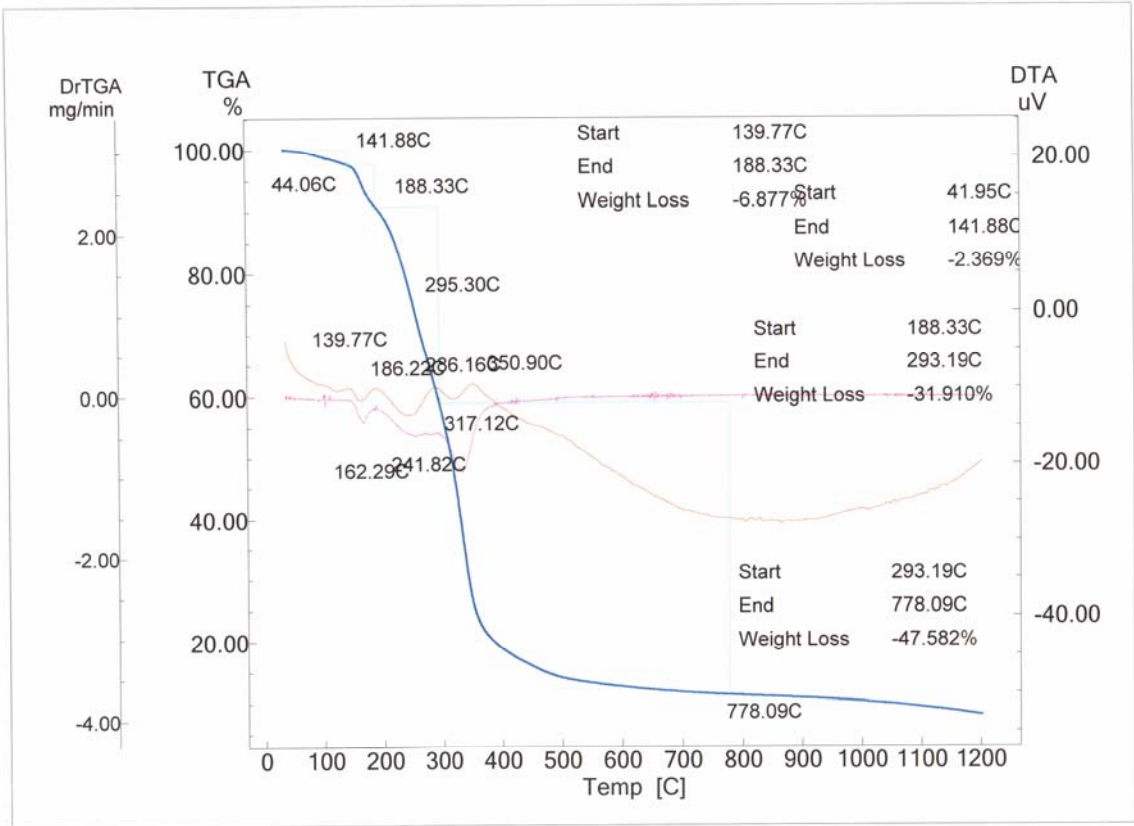
4.3.1.4. BSA İçeren Mikrokürelerin DTA/TG Analizi

Bovin serum albumin içeren mikrokürelerin TG grafiği (Şekil 4.11), mikrokürelerin termal bozunmasının $41.95-778.09^\circ\text{K}$ aralığında üç aşamada gerçekleştiğini göstermektedir:

- Birinci aşama, $41.95-188.33^\circ\text{K}$ aralığında gerçekleşmekte ve mikrokürelerde %8.877 oranında kütle kaybı meydana gelmektedir.
- İkinci bozunma, $188.33-293.19^\circ\text{K}$ aralığında gerçekleşmekte ve mikrokürelerde %31.91 oranında kütle kaybı olmaktadır.



Şekil 4.10. Bovin serum albumin içeren mikrokürelerin FT-IR spektrumu.



Şekil 4.11. Bovin serum albumin içeren mikrokürelerin FT-IR spektrumu.

c. Üçüncü ve son bozunma ise, 293.19-778.09°K aralığında meydana gelmekte ve mikrokürelerin kütlelerinde %47.582 oranında kayıp olmaktadır.

İlaç etkin maddesi olarak model protein içeren mikrokürelerin DTA profilleri incelendiğinde, BSA ve CAP'a ait piklerin varlığı görülmektedir. Bu da polimer ile model ilacın mikroküre oluşumu esnasında herhangi bir kimyasal bir tepkimeye girmediğini, ilacın mikroküre matrisi içinde tutulduğunu göstermektedir. Bu durum, enkapsüle edilen proteinin üretim esnasında stabilitesini korumasının göstergesidir.

4.3.1.5. Hazırlama Verimi

Kullandığımız emülsiyon oluşturma/çözücü buharlaştırma yöntemindeki üretim kapasitesini değerlendirmek için formülasyondaki toplam katı miktardan hareketle mikrokürelerin verimleri Bölüm 3.2.4.1.5'de verilen denklem kullanılarak hesaplandı. Bulgular, Çizelge 4.3'te verildi.

Çizelge 4.3. Mikroküre hazırlama verimleri.

| Formülasyon | Hazırlama Verimi (%) |
|-------------|----------------------|
| F01300 | 55.7 |
| F01400 | 96.2 |
| F05300 | 48.3 |
| F05400 | 56.1 |

4.3.1.6. Mikrokürelerde Tutulan BSA Miktarının Belirlenmesi

Her bir mikroküre serisinde tutulan BSA miktarı, Bölüm 3.2.4.1.6'te verilen yöntemle tespit edildi. Deney bulguları, ortalamaları alınarak standart sapmaları ile birlikte Çizelge 4.4'te verildi.

Çizelge 4.4. Mikrokürelerde tutulan Bovin serum albumin (BSA) miktarı

| Formülasyon | Tutulan BSA Miktarı (%) |
|-------------|-------------------------|
| F01300 | 72.69 ± 3.55 |
| F01400 | 86.43 ± 1.32 |
| F05300 | 56.31 ± 3.46 |
| F05400 | 62.57 ± 4.61 |

4.3.2. Mikrokürelerde Saklama Koşullarında Stabilité Çalışmaları

Mikrokürelerin depolama koşullarındaki stabilitelerini araştırmak amacıyla Bölüm 3.2.4.2’de anlatılan şartlarda çalışılmıştır. Elde edilen bulgular Çizelge 4.5’de verilmiştir.

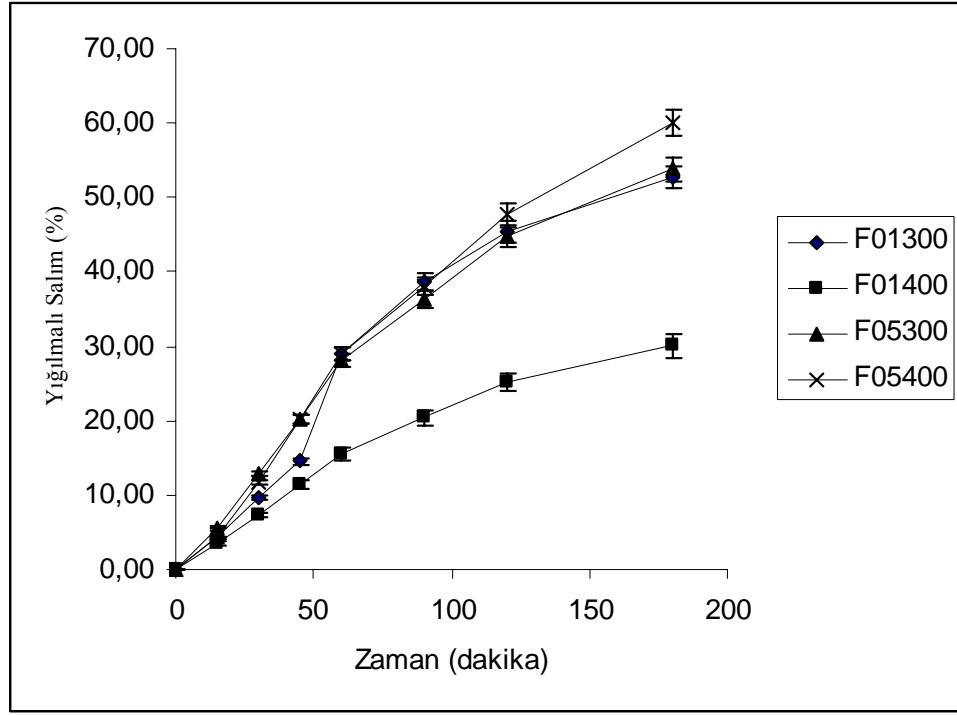
Burada, depolama süresi sonunda mikroküreler tarafından tutulan etkin madde miktarındaki değişiklik esas alınmıştır. Stabilité çalışması için hazırlanan mikroküreleri etüv ve buzdolabına koymadan önce her bir serideki BSA miktarı saptandı ve daha sonra, elde edilen bu bulgular, depolama süresi bitiminde tespit edilen BSA miktarları ile kıyaslandı. Ayrıca, depolama süresi sonunda mikrokürelerin organoleptik özellikleri de incelenmiştir. Buna göre, 60°C’da tutulan 100 mg BSA içeren F01300 ve F01400 formülasyonlarında büyük ölçüde değişiklik olmazken, 500 mg BSA içeren F05300 ve F05400 formülasyonlarında sararma şeklinde renk değişimi meydana gelmiştir. Bu da 60°C’da BSA’daki bozunmayı gösterir. 4°C’da depolanan mikrokürelerde ise, herhangi bir renk veya şekil değişikliği gözlenmemiştir.

Çizelge 4.5. Mikrokürelerin stabilité çalışmasında BSA miktarında meydana gelen değişmeler.

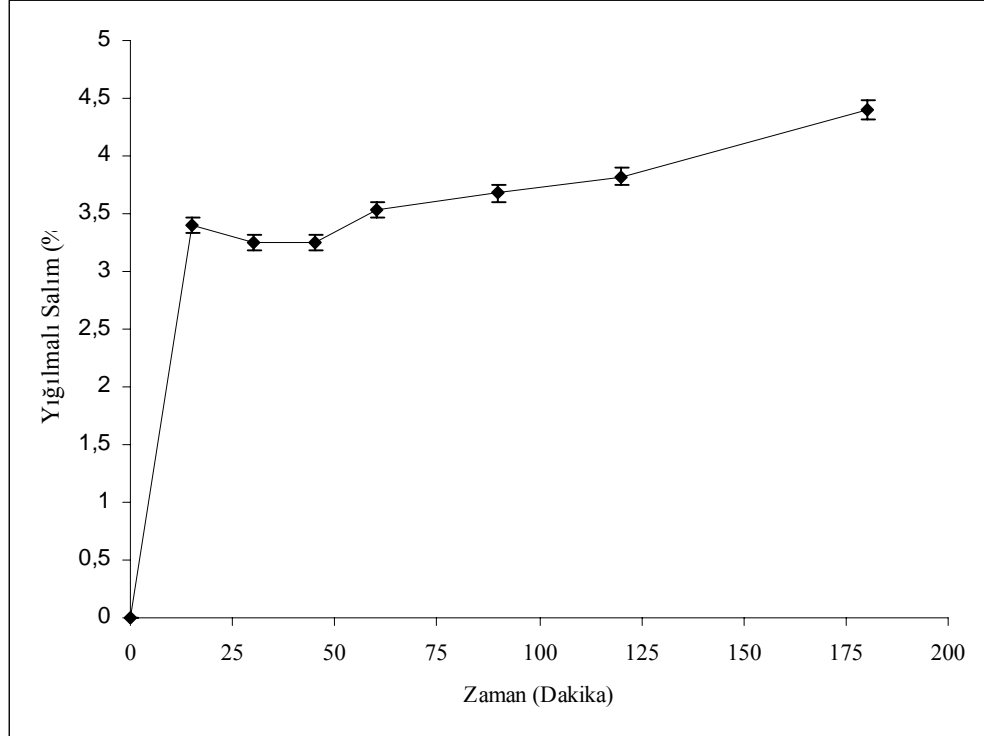
| Formülasyon | Tutulan BSA Miktarı (%) | | | |
|-------------|-------------------------|--------------|--------------|--------------|
| | 4°C | | 60°C | |
| | 0.gün | 45. gün | 0.gün | 45. gün |
| F01300 | 72.69 ± 3.55 | 58.36 ± 1.52 | 72.69 ± 3.55 | 16.08 ± 1.02 |
| F01400 | 86.43 ± 1.32 | 71.42 ± 1.26 | 86.43 ± 1.32 | 24.47 ± 1.36 |
| F05300 | 56.31 ± 3.46 | 47.35 ± 2.33 | 56.31 ± 3.46 | 36.71 ± 2.84 |
| F05400 | 62.57 ± 4.61 | 53.78 ± 1.35 | 62.57 ± 4.61 | 38.98 ± 1.36 |

4.3.3. Mikrokürelerden İn Vitro Koşullarda Bovin Serum Albumin Salım Çalışmaları

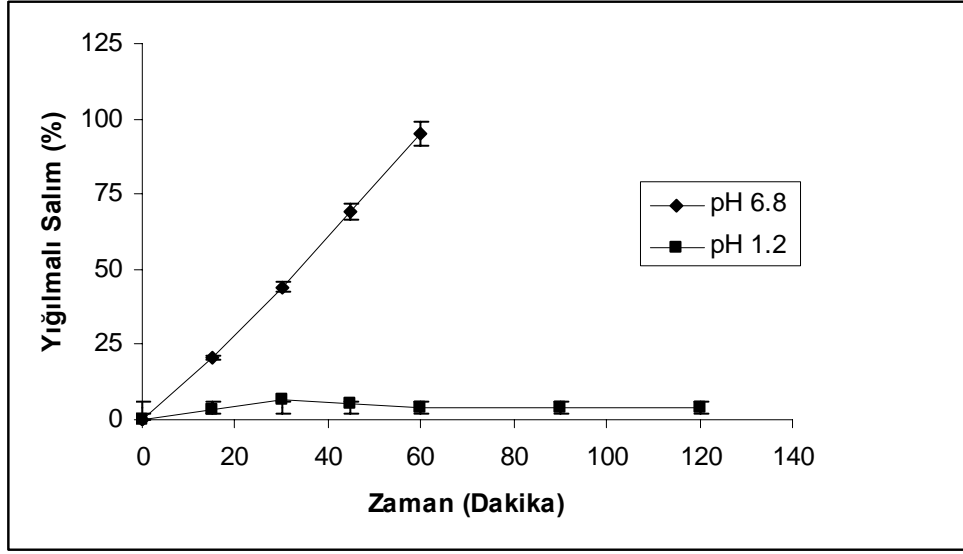
İn vitro koşullarda, mikrokürelerden BSA salımını değerlendirme çalışmaları, USP XXII’de tanımlanan palet yöntemi kullanıldı (250). Bölüm 3.2.4.3’de açıklanan yöntem ile yapılan salım deneylerinin sonuçları esas alınarak % salım yığılmalı BSA miktarının zamana karşı grafiği çizildi (Şekil 4.12 ve 4.13). Elde edilen salım profili, enkapsüle edilmemiş etkin maddenin aynı koşullarda bulunan salım profili ile kıyaslandı (Şekil 4.14).



Şekil 4.12. Bovin serum albumin (BSA) içeren farklı mikroküre formülasyonlarından BSA salım profilleri (pH = 6.8)



Şekil 4.13. Bovin serum albumin (BSA) içeren farklı mikroküre formülasyonlarından BSA salım profilleri (pH = 1.2)



Şekil 4.14. Enkapsüle edilmemiş Bovin serum albumin'in (BSA) farklı pH değerlerinde (pH = 1.2 ve 6.8) disolüsyon profilleri.

4.3.1.8. Mikrokürelere In Vitro Koşullarda BSA Salımının Kinetiğinin İncelenmesi

Bölüm 3.2.3.1.7'de belirtildiği gibi gerçekleştirilen salım çalışmaları sonucunda elde edilen bulgular, sıfırıncı, birinci derece ve Higuchi kinetiğine uygunluğu araştırıldı. Buna göre, mikrokürelere BSA salımının difüzyon kontrollü gerçekleştiği saptandı.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, proteinlerin gastrik ortamdaki proteolitik enzimlerin degrade edici etkisinden korunmalarını sağlamak amacıyla, enterik mikrokürelere hazırlandı. Bunun için, daha ziyade enterik tablet hazırlamada yararlanılan selüloz asetat ftalat polimeri mikroküre oluşturmak için kullanıldı. Mikrokürelere hazırlanması, emülsiyon oluşturma - çözücü buharlaştırma yöntemiyle gerçekleştirildi. Enkapsülasyon işlemine başlamadan önce, mikroküre hazırlanması için kullanılması düşünülen polimerin uygunluğu ön formülasyon çalışmaları ile test edildi.

Yeni bir dozaj şeklinin geliştirilmesinde ön formülasyon çalışmaları büyük önem taşımaktadır. Bu kısımda, en önemli kriter, dozaj şeklinin hazırlanması için seçilen polimerin inert olması koşuludur. Diğer bir deyişle, polimerin ilaç etkin maddesi ile kimyasal reaksiyona girmemesi ve onun stabilitesini olumsuz yönde etkilememesi gerekir (1-2, 5). Polimer ile ilaç etkin maddesinin etkileşip etkileşmediğinin tespiti ise, FT-IR, DTA/TG, DSC ve X-ışını difraksiyon analizi ile yapılır (5). Bu çalışmada da mikrokürelere hazırlanmasında kullanılan polimer olan selüloz asetat ftalatın (CAP) model ilaç etkin maddesi olarak seçilen BSA ile etkileşip etkileşmediğini tespit etmek için BSA, CAP ve BSA içeren mikrokürelere FT-IR spektrumları alınıp DTA/TG analizleri yapıldı.

FT-IR analizinde elde edilen pikler, mikroküre oluşumu esnasında CAP'ın BSA'nın yapısını bozmadığını kanıtlamıştır. Bu sonuca dayanarak, CAP'ın proteinik etkin maddelerin enkapsülasyonu için uygun bir polimer olduğu söylenebilir.

Literatürde proteinik etkin maddelerin CAP ile enkapsülasyonuna ait termal incelemeleri kapsayan ön formülasyon çalışmasına rastlanmamıştır. Bu açıdan, tezde elde edilen veriler, bilimsel literatürde önemli bir boşluğu doldurmaktadır. Ayrıca, DTA/TG analizinde elde edilen bulgular, mikroenkapsülasyon işlemi sırasında ilaç etkin maddesinin yapısının bozunup bozunmadığına dair de bilgi vermektedir. Bu çalışmada, model ilaç olan BSA'nın mikroküre oluşumu esnasında bozunmaya uğramadığı görülmüştür. Bu da üretim koşullarının proteinik etkin maddenin stabilitesi açısından uygun olduğunun göstergesidir.

Daha sonra, farklı etkin madde konsantrasyonu (100-500 mg) ve karıştırma hızlarında (300 ve 400 rpm) mikroküre formülasyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan

mikrokürelerin polarize ışık mikroskobu ile fotoğrafları çekilmiştir. Fotoğraflar incelendiğinde, küresel şekilli ve pürüzsüz yüzeyle oldukları görülmektedir. Mikrokürelerin yüzeyinde etkin madde kristallerine rastlanmamıştır.

Formülasyona etkin madde konsantrasyonunun etkisi incelendiğinde; etkin madde konsantrasyonu arttıkça, mikroküre veriminin azaldığı tespit edilmiştir. Ancak, etkin madde konsantrasyonunun mikroküre boyutu üzerine önemli bir etkisi olmadığı belirlenmiştir. Mikrokürelerin hemen hemen monomodal bir dağılım gösterdiği görülmüştür. Elde edilen mikrokürelerin çoğunun boyutu 500-1000 µm aralığındadır. Öte yandan, karıştırma hızının mikroküre boyutu üzerinde etkili bir parametre olduğu belirlenmiştir. Karıştırma hızı arttıkça, daha küçük mikrokürelerin elde edilmesi mümkün olmuştur. Ayrıca, mikrokürelerin enkapsüle ettiği BSA miktarı etkin madde konsantrasyonu arttıkça azalmıştır.

4° ve 60°C’da yapılan hızlandırılmış stabilite çalışmaları ise, sıcaklığın proteinik etkin madde içeren ilaçların raf ömrünün belirlenmesinde en önemli faktör olduğunu göstermektedir. Protein moleküllerinin sıcaklığa hassas olduğu bilinmektedir. Ancak, oda sıcaklığında bile birkaç gün stabil kalabilen BSA, hızlandırılmış stabilite çalışmasında, sıcaklık açısından oluşturulan stres koşullarında 60°C’da 45 günde bozunma göstermiş, enterik enkapsülasyon yüksek sıcaklıkta yeterli koruyucu etki sağlayamamıştır.

4 ve 60°C’da yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen veriler ışığında Arrhenius denklemi kullanılarak BSA içeren mikrokürelerin raf ömrü ve saklama koşulları belirlenebilir. Buna göre, BSA içeren mikrokürelerin 4°C’da daha uzun süre stabil kalabildiği tespit edilmiştir. Stabilite açısından önemli bir diğer husus ise, yüksek karıştırma hızı ile hazırlanan mikrokürelerin nispeten daha düşük stabiliteye sahip olmalarıdır.

İn vitro salım çalışmaları ise, USP XXII’ye göre pedal yöntemi kullanılarak pH 1.2 ve 6.8’de yapılmıştır. Etkin madde konsantrasyonu ve karıştırma hızı açısından farklılıklar gösteren formülasyonların in vitro salım çalışmalarından elde edilen veriler, salım profiline bu faktörlerin etkisinin olmadığını, benzer profilin elde edildiğini göstermiştir. pH 6.8’de yapılan çalışmalarda 90 dakika sonunda dahi etkin maddenin henüz ortalama %40’nın salınmış olması, kontrollü salım sağlayan dozaj şeklinin oluşturulduğunun kanıtıdır. Mikrokürelerden etkin madde salımı, tipik iki aşamalı salım profilini göstermektedir. BSA salımının başlangıçta hızlı bir hidrasyon ile daha sonra ise,

difüzyon kontrollü olarak gerçekleştiği belirlenmiştir. Difüzyon fazında salım oldukça yavaştır. Bunun nedeni, mikroküre matriksinin degradasyonu ile ilacın difüzyonundan dolayı olabilir.

Bovin serum albumin içeren mikrokürelerin pH 1.2'de salım profilleri incelendiğinde model ilacın mikrokürelerden önemli ölçüde salım yapmadığı gözlenmiştir (%6.8). Bu da mikrokürelerin gastrik ortamda dayanıklı olduğunu göstermektedir. Ayrıca, pH 1.2'de yapılan in vitro salım çalışması sonunda ortamdan alınan mikroküreler mikroskop altında incelendiğinde herhangi bir organoleptik değişim gözlenmemiştir.

Stabilite ve salım çalışmaları ışığında, proteinik etkin maddelerin formülasyonu için selüloz asetat ftalat mikroküreleri, gastrik ortamdan koruyucu etkisi ve kontrollü salım sağlaması nedeniyle uygun bir dozaj şekli olarak önerilebilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Son yıllarda, farmasötik biyoteknoloji ve ona paralel olarak farmasötik teknoloji alanındaki önemli gelişmelere rağmen, oral yolla proteinlerin stabil formda uygulanmasını sağlayacak bir dozaj şekli henüz tam anlamıyla geliştirilmemiştir. Bu tez projesi, literatürde var olan bu önemli boşluğu doldurmak amacıyla planlanmıştır. Büyük çaplı üretime elverişli, proteinik etkin maddeleri gastrointestinal sistemde enzimatik hidrolizden koruyabilecek ve kontrollü salım sağlayan bir dozaj şeklinin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Bunun için, protein molekülünün enkapsülasyon işlemi sırasında stabilitesini olumsuz yönde etkilemeyecek, inert bir polimer seçilmiştir. Selüloz asetat ftalat, enterik tablet formülasyonlarında, etkin maddeyi gastrik ortamdan koruyucu etkisi nedeniyle kullanılan bir polimerdir. Bu çalışmada, selüloz asetat ftalatın proteinik etkin madde içeren enterik mikroküre hazırlanmasındaki etkinliği, protein molekülünün stabilitesi ve kontrollü salımın sağlanması açısından incelenmiştir. Bu çalışmada, mikroküre hazırlamada kullanılan emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemi; basit, hızlı, büyük çaplı üretime elverişli, tekrarlanabilir, ekonomik ve protein moleküllerinin stabilitesi açısından uygun olduğundan seçilmiştir. Yüksek molekül ağırlıklı olması sebebiyle protein molekülünün midede asidik ortamda CAP mikrokürelerinden salımı güç olmakta ve matriks içinde salınmadan kalmaktadır. Böylece, etkin maddenin gastrik ortamda korunması mümkün olmaktadır. CAP mikrokürelerinden suni barsak vasatında pH 6.8'de etkin maddenin salımı incelendiğinde ise, difüzyon kontrollü olarak gerçekleştiği tespit edilmiştir.

FT-IR ve DTA/TG analizleri, mikroküre hazırlamada kullanılan polimerin inert olduğunu ve yöntemin protein stabilitesini olumsuz yönde etkilemediğini göstermiştir.

BSA içeren mikroküreler ile yapılan hızlandırılmış stabilite çalışmaları da CAP mikrokürelerinin nakliye ve depolama esnasında enkapsüle edilen proteinik etkin maddeyi 4°C'da uzun süre dayanıklı muhafaza edebileceğini göstermektedir.

Bu çalışmada elde edilen veriler ışığında, proteinik ilaç etkin maddelerinin oral uygulamasında CAP mikrokürelerinin kullanılabilirliğini ileri sürmek mümkündür. Bu

Çalışmada elde edilen bulgular, laboratuvarımızda sürmekte olan in vivo çalışmalarla da desteklenecektir.

7. KAYNAKLAR

1. **Gürsoy, A**, Kontrollü Salım Sistemleri. İstanbul: Elma Bilgisayar Basım ve Ambalaj San Tic Ltd Şti, **2002**.
2. **Chien, YW**, Novel Drug Delivery Systems: Fundamentals, Developmental Concepts, Biomedical Assessments. New York: Marcel Dekker Inc, **1982**.
3. **Mozafari, MR, Mortazavi, SM**, Nanoliposomes: From Fundamentals to Recent Developments. Oxford: Trafford Publishing, **2005**.
4. **Gorves, MJ**, Pharmaceutical Biotechnology. New York: Taylor & Francis LLC Group, CRC Press, **2006**.
5. **Gürsoy, A**, Farmasötik Teknoloji: Temel Konular ve Dozaj Şekilleri. İstanbul: Pikel Bilişim Matbaacılık Reklamcılık ve Filimcilik Hizmetleri Ltd. Şti. , **2004**.
6. **Kayaalp, O**, Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Ankara: Hacettepe-Taş yayıncılık, **2002**.
7. Eastman Kodak Publication. Cellulose Acetate Phthalate. N. EFC-202-C, **1994**
8. **Şahin NÖ, Arslan H**. A Formulation Study For Enteric Microspheres of Tenoxicam Using Cellulose Acetate Phthalate Part II: Modulation of ulcerogenic effect. *Asian Journal of Chemistry*, **2007**; 19(7): 5718-5726.
9. **Devlin, T**, Textbook of Biochemistry With Clinical Correlations. New York: Wiley Publishers, **2005**.
10. **Champe, PC, Harvey, RA, Ferrier, DR**, Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry. New York: Lippincott Williams & Wilkins, **2004**.
11. **Richardson JS**. The anatomy and taxonomy of protein structure. *Adv. Prot. Chem.*, **1981**; 34: 167-339.
12. **Garnier J, Gibrat JF, Robson B**. GOR Method for Predicting Protein Secondary Structure from Amino Acid Sequence. *Meth. Enz.*, **1996**; 266: 540-553.
13. **Zhou XH, Po ALW**. Peptide and protein drugs: I Therapeutic applications, absorption and parenteral administration. *Int. J Pharm*, **1991a**; 75: 97-115.
14. **Zhou XH, Po ALW**. Peptide and protein drugs: II Non-parenteral routes of delivery. *Int J Pharm*, **1991b**; 75: 117-130.
15. **Lee VHL**. Changing need in drug delivery in the era of peptide and protein drugs. In: Lee, VH, Ed, *Peptide and Protein Drug Delivery*, New York: Marcel Dekker, Inc., **1991**: 1-56.
16. **Ringrose MJ, Humphrey PS**. Peptides and related drugs: a review of their absorption, metabolism and excretion. *Drug Met Rev*, **1986**; 17: 283-310.
17. **Gonella PA, Walker WA**. Macromolecular absorption in the gastrointestinal tract. *Adv. Drug. Del. Rev*, **1987**; 1: 235-248.
18. **Ishida M, Machida Y, Nambu N, Nagai T**. New mucosal dosage forms of insulin. *Chem Pharm Bull*, **1981**, 29: 810-816.

19. **Nagai T, Nishimoto Y, Nambu N, Suzuki Y, Sekine K.** Powder dosage form of insulin for nasal administration. *J Controlled Rel.*, **1984**; 1: 15-22.
20. **Nagai T, Machida Y.** Mucosal adhesive dosage forms. *Pharm Int*, **1986**; 6: 196-200.
21. **McMartin C, Huchthinson LFE, Hyde R, Peters GE.** Analysis of structural requirements for the absorption of drugs and macromolecules from the nasal cavity. *J Pharm Sci*, **1987**, 76: 535-540.
22. **Harris AS, Nilsson IM, Wagner IG, Alkner V.** Intranasal administration of peptides: nasal deposition, biological response, and absorption of desmopressin. *J Pharm Sci*, **1986**, 75: 1085-1088.
23. **Sandow J, Petri W.** Biological activity and therapeutic efficacy, in transdermal systemic medications. Amsterdam: Elsevier, **1985**: 183-199.
24. **Warshaw AL, Walker WA, Isselbacher KJ.** Protein uptake by the intestine: evidence for absorption on intact macromolecules. *Gastroenterology*, **1974**; 66: 987-992.
25. **Okada H, Yamazaki I, Ogawa Y, Hirai S, Yashiki T, Mima H.** Vaginal absorption of a potent leuteinizing hormone releasing hormone analog (Leuprolide) in rats I: Absorption by various routes and absorption enhancement. *J Pharm Sci*, **1982**; 71: 1367-1371.
26. **Sanders LM, Mathews HB.** Vaginal absorption of polyvinylalcohol in fischer 344 rats. *Human and Exp. Tox.*, 1990, 9: 71-77.
27. **Nisahihata T, Okamura Y, Kamada A, Higuchi T, Yagi T, Kawamori R, Shichiri M.** Enhanced bioavailability of insulin after rectal administration with enamine as adjuvant in depancreatized dogs. *J Pharm Pharmacol*, **1985**, 37: 22-26.
28. **Gordon GS, Moses AC, Siver RD, Flier JS, Carey MC.** Nasal absorption of insulin: enhancement by hydrophobic bile salts. *Proc. Natl Acad Sci*, **1985**; 82: 7419-7423.
29. **Muranushi N, Takagi N, Muranushi S, Sezaki H.** Effect of fatty acids and monoglycerides on permeability of lipid bilayer. *Chem Phys Lipids*, **1981**; 28: 269-279.
30. **Lee VHL.** Peptide and Protein Drug Delivery: Opportunities and challenges. *Pharm. Int.*, **1986**; 7:208-212.
31. **Hsieh DST, Rhine WD, Langer R.** Zero order controlled release polymer matrices for micro and macromolecules. *J Pharm Sci*, **1983**; 72: 17-22.
32. **Langer R.** Biomaterilas: new perspectives on their use in the controlled delivery of polypeptides. *Pharm Technol*, **1985**; 9(10): 35, 40, 48.
33. **Sanders LM, Kell BA, McRae GI, Whitehead GW.** Prolonged controlled release of nafarelin, a leutenizing hormone releasing hormone analogue, from biodegradable polymeric implants: influence of composition and molecular weight of polymer. *J Pharm Sci*, **1986**; 75: 356-360.
34. **Hutchinson FG, Furr BJA.** Biodegradable carriers for the sustained release of polypeptides. *TIBTECH*, **1987**; 5: 102-106.
35. **Singh ON.** Complex coacervate microencapsulation for protein drug delivery. Doktora Tezi, University of Illinois At Chicago, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Chicago, Illinois, ABD, **1992**.
36. **Manning MC, Patel K, Borchardt RT.** Stability of protein pharmaceuticals. *Pharm Res*, **1989**; 6: 903-918.

37. **Sugita Y, Kitao A.** Dependence of Protein Stability on the Structure of the Denatured State: Free Energy Calculations of I56V Mutation in Human Lysozyme. *Biophys J*, **1998**; 75: 2178-2187.
38. **Nosoh Y, Sekiguchi T.** Protein stability and stabilization through protein engineering. In: Wiesman A, Ed. *Ellis Horwood Series In Biochemistry and Biotechnology*. New York: Ellis Horwood, **1991**.
39. **Kellis, JR, JT, Nyberg, K, Sali, D, Fersht, AR.** Contribution of hydrophobic interactions to protein stability. *Nature*, **1988**; **333**(6175):784–786.
40. **Sandberg WS, Terwilliger TC.** Influence of interior packing and hydrophobicity on the stability of a protein. *Science*, **1989**; 245(4913):54–57.
41. **Pace C.** Evaluating the contribution of hydrogen bonding and hydrophobic bonding to protein folding. *Methods Enzymol.*, **1995**; 259, 538-554.
42. **McDonald I, Thornton J.** Satisfying hydrogen bonding potential in proteins. *J Mol Biol*, **1994**; 238, 777-93.
43. **Shi Z, Krantz BA, Kallenbach N, Sosnick TR.** Contribution of Hydrogen Bonding to Protein Stability Estimated from Isotope Effects. *Biochemistry*, **2002**; 41 (7), 2120 -2129.
44. **Matthews B, Nicholson H, Becktel W.** Enhanced protein thermostability from site-directed mutations that decrease the entropy of unfolding. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1987**; 84, 6663-6667.
45. **Watanabe K, Masuda T, Ohashi H, Mihara H, Suzuki Y.** Multiple proline substitutions cumulatively thermostabilize *Bacillus cereus* ATCC7064 oligo-1,6-glucosidase. Irrefragable proof supporting the proline rule. *Eur J Biochem*; **1994**; 226,277-83.
46. **Tanner J, Hecht R, Krause K.** Determinants of enzyme thermostability observed in the molecular structure of *Thermus aquaticus* D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase at 25 Angstroms Resolution. *Biochemistry*, **1996**; 35, 2597-609.
47. **Perutz M, Raidt H.** Stereochemical basis of heat stability in bacterial ferredoxins and in haemoglobin A2. *Nature*, **1975**; 255, 256-59.
48. **Perutz M.** Electrostatic effects in proteins. *Science*, **1978**; 201, 1185-91.
49. **Dekker K, Yamagata H, Sakaguchi K, Udaka S.** Xylose (glucose) isomerase gene from the thermophile *Thermus thermophilus*: cloning, sequencing, and comparison with other thermostable xylose isomerases. *J. Bacteriol.*, **1991**; 173, 3078-83.
50. **Serrano L, Kellis J, Cann P, Matouschek A, Fersht A.** The folding of an enzyme. II. Substructure of barnase and the contribution of different interactions to protein stability. *J Mol Biol*, **1992**; 224, 783-804.
51. **Horovitz A, Fersht A.** Strategy for analysing the co-operativity of intramolecular interactions in peptides and proteins. *J. Mol. Biol.*, **1990**; 214, 613-617.
52. **Braxton S.** In Protein Engineering: In: Cleland J, Craik C, Eds. *Principles and Practice*, New York: Wiley-Liss, **1996**.
53. **Kuroki R, Taniyama Y, Seko C, Nakamura H, Kikuchi M, Ikehara M.** Design and creation of a Ca²⁺ binding site in human lysozyme to enhance structural stability. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1989**; 86, 6903-6907.

54. **Kellis J, Todd R, Arnold F.** Protein stabilization by engineered metal chelation, *Bio/Technology*, **1991**; 9, 9945.
55. **Vieille C, Zeikus J.** Thermozyymes: identifying molecular determinants of protein structural and functional stability. *Trends in Biotechnology*, **1996**; 14, 183-90.
56. **Clarke J, Fersht A.** Engineered disulfide bonds as probes of the folding pathway of barnase: increasing the stability of proteins against the rate of denaturation. *Biochemistry*, **1993**; 32, 4322-4329.
57. **Creighton TE.** *Proteins: Structures and molecular properties*. San Francisco: WH Freeman and Company, **1983**: 79-86.
58. **Dedman ML, Farmer TH, Morris CJOR.** Studies on pituitary adrenocorticotropin. 3. Identification of the oxidation-reduction center. *Biochem J*, **1961**; 78: 348-352.
59. **Riniker VB, Neher R, Maier R, Kahnt PGH, Byfield TV, Galante L, MacIntyre I.** Menschliches calcitonin I. Isolierung and charakterisierung, *Hel Chem Acta*, **1968**; 51: 1738-1742.
60. **Morley JS, Tracey HJ, Gregory RA.** Structure function relationships in the active C-terminal tetrapeptide sequence of gastrin. *Nature*, **1965**; 207: 1356-1359.
61. **Teh LC, Murphy LJ, Huq NL, Surus AS, Friesen HG, Lazarus L, Chapman GE.** Methionine oxidation in human growth hormone and human chorionic somatomammotropin. *J Biol Chem*, **1987**; 262: 6472-6477.
62. **Privalov PL** Stability of proteins. *Adv Protein Chem*, **1979**; 33: 167-241.
63. **Robinson AB.** Evolution and distribution of glutamyl and asparaginyl residues in proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1974**; 71: 885-888.
64. **Ahern TJ, Klibanov AM.** The mechanism of irreversible enzyme inactivation at 100°C. *Science*, **1985**; 228: 1280-1284.
65. **Fisher BV, Porter PB.** Stability of bovine insulin. *J Pharm Pharmacol*, **1981**; 33: 203-206.
66. **Schlichtkrull J, Pingel M, Heding LG, Brange J, Jorgensen KH.** *Handbook of Experimental Pharmacology*, New York: Springer-Verlag, **1975**.
67. **Shirley BA.** *Protein Stability and Folding: Theory and Practice*. Totowa: Humana Press, **1995**.
68. **Volkin DB, Mach H, Middaugh CR.** Degradative Covalent Reactions Important to Protein Stability. *Methods In Molecular Biology*, **1995**; 40:35-63.
69. **Khan RH, Rasheedi S, Haq SK.** Effect of pH, temperature and alcohols on the stability of glycosylated and deglycosylated stem bromelain. *J Biosciences*, **2003**; 28:709-714.
70. **Robinson PA.** Protein stability and aggregation in Parkinson's disease. *Biochem J*, **2008**; 413(1):1-13.
71. **Liu WR, Langer R, Klibanov AM.** Moisture-Induced Aggregation Of Lyophilized Proteins In The Solid-State. *Biotechnology And Bioengineering*, **1991**; 37: 177-184.
72. **Costantino HR, Langer R, Klibanov AM.** Solid-Phase Aggregation Of Proteins Under Pharmaceutically Relevant Conditions. *J Pharm Sci*, **1994**; 83: 1662-1669.
73. **Metzler DE.** *Biochemistry: The chemical reactions of living cells*. New York: Academic Press, **1977**.

74. **Klibanov AM.** Stabilization of enzymes against thermal inactivation. *Adv Appl Microbiol*, **1983**; 29: 1-28.
75. **Appel W.** Peptidases. In: Bergameyer HV, Ed. *Methods of Enzymatic Analysis. Vol II.* Verlag Chemie Weinheim. New York: Academic Press, **1974**: 949-999.
76. **Ganapathy V, Burckhardt G, Leibach FH.** Characteristics of glycylsarcosine transport in rabbit intestinal brush-border membrane vesicles. *J Biol Chem*, **1984**; 259: 8954-8959.
77. **Oeswein JQ, Shire SJ.** Physical biochemistry of protein drugs. In: Lee VH, ED. *Peptide Protein Drug Delivery*, New York: Marcel Dekker Inc., **1991**: 167-201.
78. **Larsen B, Viswantha V, Chang SY, Hruby VJ.** Reverse phase high pressure liquid chromatography for the separation of peptide hormone diastereoisomers. *J Chromatogra Sci*, **1978**; 16: 207-210.
79. **Khosla MC, Hall MM, Smegy RR, Bumpus FM.** Factors that influence the antagonistic properties of angiotensin II antagonists *J Med Chem*, **1973**; 16: 829-832.
80. **Nguyen VT, Morange M, Bensaude O.** Protein denaturation during heat shock and related stress. Escherichia coli beta-galactosidase and Photinus pyralis luciferase inactivation in mouse cells. *J Biol Chem*, **1989**; 264(18):10487-92.
81. **Haque I, Singh R, Moosavi-Movahedi AA, Ahmad F.** Effect of polyol osmolytes on ΔG_D , the Gibbs energy of stabilisation of proteins at different pH values. *Biophys. Chem.*, **2005**; 117: 1-12.
82. **Sadeghi M, Naderi-Manesh N, Zarrabi M, Ranjbar B.** Effective factors in thermostability of thermophilic proteins, *Biophys. Chem*, **2006**; 119: 256-270.
83. **Thomas PD, Dill KA.** Local and nonlocal interactions in globular proteins and mechanisms of alcohol denaturation. *Protein Sci.*, **1993**; 2(12): 2050–2065.
84. **Hlady V V, Buijs J.** Protein adsorption on solid surfaces. *Curr Opin Biotechnol.*, **1996**; 7(1):72-7.
85. **Wisniewski N, Reichert M.** Methods for reducing biosensor membrane biofouling. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2000; 18(3-4):197-219.
86. **McLeod AG, Walker IR, Zheng S, Hayward CP.** Loss of factor VIII activity during storage in PVC containers due to adsorption. *Haemophilia*, **2000**; 6(2):89-92.
87. **Brennan JR, Gebhart SS, Blackard WG.** Pump-induced insulin aggregation. A problem with the Biostatator. *Diabetes*, **1985**; 34(4):353-9.
88. **Narhi LO, Philo JS, Sun B, Chang BS, Arakawa T.** Reversibility of heat-induced denaturation of the recombinant human megakaryocyte growth and development factor. *Pharm Res.*, **1999**; 16(6):799-807.
89. **Chodankar S, Aswal VK, Kohlbrecher J, Vavrin R, Wagh AG.** Structural evolution during protein denaturation as induced by different methods. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, **2008**; 77:031901.
90. **Griko Y, Sreerama N, Osumi-Davis P, Woody RW, Woody AY.** Thermal and urea-induced unfolding in T7 RNA polymerase: calorimetry, circular dichroism and fluorescence study. *Protein Sci.*, **2001**; 10(4):845-53.
91. **Smeller L.** Pressure-temperature phase diagrams of biomolecules. *Biochim Biophys Acta*, **2002**; 1595(1-2):11-29.

92. **Privalov PL.** Cold denaturation of proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol.*, **1990**; 25(4):281-305.
93. **Sabelko J, Ervin J, Gruebele M.** Cold-Denatured Ensemble of Apomyoglobin: Implications for the Early Steps of Folding. *J. Phys. Chem. B*, **1998**; 102 (10): 1806 -1819.
94. **Lopez CF, Darst RK, Rosky PJ.** Mechanistic Elements of Protein Cold Denaturation. *J. Phys. Chem. B*, **2008**; 112 (19): 5961 -5967.
95. **Chen MYS, Wiranowska SM, Von WP, Stewart WE.** *Antiviral Res.*, **1981**; 1: 24-29.
96. **Pearlman R, Nguyen TH.** Pharmaceutics of protein drugs. *J Pharm Pharmacol*, **1992**; 44: 178-185.
97. **Atkins PW, Paula de J.** *Atkin's Physical Chemistry*. 7.baskı, Oxford: Oxford University Press, **2002**.
98. **Sahin NO.** Interfacial Properties of Emulsion Stabilizers. Doktora Tezi, University of Illinois At Chicago, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Chicago, Illinois, ABD, **1996**.
99. **Meng FG, Hong YK, He HW, Lyubarev AE, Kurganov BI, Yan YB, Zhou HM.** Osmophobic effect of glycerol on irreversible thermal denaturation of rabbit creatine kinase. *Biophys J*, **2004**; 87 (4):2247-54.
100. **Tsai AM, Neumann DA, Bell LN.** Molecular dynamics of solid-state lysozyme as affected by glycerol and water: a neutron scattering study. *Biophys J.*, **2000**; 79 (5):2728-2732.
101. **Cleland JL, Jones AJ.** Stable formulations of recombinant human growth hormone and interferon-gamma for microencapsulation in biodegradable microspheres *Pharm. Res.*, **1996**; 13: 1464–1475.
102. **Kerwin BA, Chang BS, Gregg CV, Gonnelli M, Li T, Stambini GB.** Interactions between PEG and type I soluble tumor necrosis factor receptor: Modulation by pH and by PEGylation at the N terminus *Protein Sci.*, **2002**; 11: 1825–1833.
103. **Lee JC, Timasheff SN.** The stabilization of proteins by sucrose. *J Biol Chem*, **1981**; 256:7193–7201.
104. **Lin TY, Timasheff SN.** On the role of surface tension in the stabilization of globular proteins. *Protein Sci.*, **1996**; 5: 372–381.
105. **Xie G, Timasheff SN.** The thermodynamic mechanism of protein stabilization by trehalose. *Biophys Chem*, **1997**; 64: 25–43.
106. **Arakawa T, Timasheff SN.** Stabilization of protein structure by sugars. *Biochemistry*, **1982**; 21: 6536–6544.
107. **Gekko K, Timasheff SN.** Mechanism of protein stabilization by glycerol: preferential hydration in glycerol-water mixtures. *Biochemistry*, **1981**; 20: 4667–4676.
108. **Gekko K, Morikawa T.** Thermodynamics of polyol-induced thermal stabilization of chymotrypsinogen. *J Biochem*, **1981**; **90**: 51–60.
109. **Gekko K, Kogan S.** The stability of protein structure in aqueous propylene glycol: amino acid solubility and preferential solvation of protein. *Biochem Biophys Acta*, **1984**; 786: 151–160.
110. **Xie G, Timasheff SN.** Mechanism of the stabilization of ribonuclease A by sorbitol: preferential hydration is greater for the denatured than for the native protein. *Protein Sci*, **1997**; 6: 211–221.

111. **Pittz EP, Timasheff SN.** Interaction of ribonuclease A with aqueous 2-methyl-2,4-pentanediol at pH 5.8. *Biochemistry*, **1978**; 17: 615–623.
112. **Lee JC, Lee LLY.** Preferential solvent interactions between proteins and polyethylene glycols. *J Biol Chem*, **1981**; 256: 625–631.
113. **Arakawa T, Bhat R, Timasheff SN.** Why preferential hydration does not always stabilize the native structure of globular proteins. *Biochemistry*, **1990**; 29: 1924–1931.
114. **Arakawa T, Timasheff SN.** The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophys J*, **1985**; 47: 411–414.
115. **Lin Y, Timasheff SN.** Why do some organisms use a urea-methyl-amine mixture as osmolyte? Thermodynamic compensation of urea and trimethylamine-N-oxide interactions with protein. *Biochemistry*, **1994**; 33: 12695–12701.
116. **Arakawa T, Timasheff SN.** The mechanism of action of Na glutamate, lysine HCl and piperazine-N, N¹-bis (2-ethanesulfonic acid) in the stabilization of tubulin and microtubule formation. *J Biol Chem*, **1984**; 259: 4979–4986.
117. **Kita Y, Arakawa T, Lin TY, Timasheff SN.** Contribution of the surface free energy perturbation of protein-solvent interactions. *Biochemistry*, **1994**; 33: 15178–15189.
118. **von Hippel PH, Schleich T.** The effects of neutral salts on the structure and conformational stability of macromolecules in solution. In: Timasheff SN, Fasman GD, Eds. *Structure and Stability of Biological Macromolecules*, vol 2, New York: Dekker, **1969**: 417–574.
119. **Arakawa T, Bhat R, Timasheff SN.** Preferential interactions determine protein stability in three-component solutions: the Mg Cl₂ system. *Biochemistry*, **1990**; 29: 1914–1923.
120. **Hershenson S, Stewart T, Carroll C, Shaked Z.** Formulation of interferon-β using Laureth-12, a novel non-ionic surfactant. In: Marshak D, Lin D, Eds. *Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Delivery, and Targeting*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, **1989**: 31-36.
121. **Burgess DJ.** Drug delivery aspects of biotechnology products. In: Pezzuto JM, Johnson ME, Manasse HR, Eds. *Biotechnology and The Practice of Pharmacy*, New York: VCH Publishers, **1992**.
122. **Pearlman R, Nyugen TH.** Formulation strategies for recombinant proteins: human growth hormone and tissue plasminogen activator. In: Marshak D, Lin D, Eds. *Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Delivery, and Targeting*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, **1989**: 31-36.
123. **Lee JC.** Biopharmaceutical formulation. *Current Opinion in Biotechnology*, **2000**; 11(1): 81-84.
124. **Büssing A.** Biological and pharmacological properties of *Viscum album* L; From tissue flask to man. In: Büssing A, Ed. *Mistletoe, genus *Viscum* & other genera, Medicinal and aromatic plants industrial profiles*, Netherlands: Harwood Academic Publishers, **2000**: 45-60.
125. **Dupeyrón D, González M, Sáez V, Ramón J, Rieumont J.** Nano-encapsulation of protein using an enteric polymer as carrier. *IEE Proc Nanobiotechnol.*, **2005**; 52(5):165-8.
126. **Singh M, O'Hagan D.** The preparation and characterization of polymeric antigen delivery systems for oral administration. *Adv. Drug Del Rev*, **1998**; 34: 285-304.
127. **Lyu SY, Kwon YJ, Joo HJ, Park WB.** Preparation of alginate/chitosanmicrocapsules and entericcoated granules of mistletoe lectin. *Arch Pharm Res*, **2004**; 27: 118-126.

128. **Delgado A, Lavelle EC, Hartshorne M, Davis SS.** PLG microparticles stabilized using enteric coating polymers as oral vaccine delivery systems. *Vaccine*, **1999**; 16: 2927-2938.
129. **Marschutz MK, Bernkop-Schnurch A.** Oral peptide drug delivery: polymer-inhibitor conjugates protecting insulin from enzymatic degradation in vitro. *Biomaterials*, **2000**; 21: 1499-1507.
130. **McClellan S, Prosser E, Meehan E, O'Malley D, Clarke N, Ramtoola Z, Brayden D.** Binding and uptake of biodegradable poly-D,L-lactide micro- and nanoparticles in intestinal epithelia. *Eur J Pharm Sci*, **1998**; 6: 153-163.
131. **Polk AE, Amsden B, Scaratt DJ, Gonzal A, Okhamafe AO, Goosen MFA.** Oral delivery in aquaculture: controlled release of proteins from chitosalginate microcapsules. *Aquacult. Eng.*, **1994**; 13: 311-323.
132. **Reddy SM, Sinha VR, Reddy DS.** Novel oral colon specific drug delivery systems for pharmacotherapy of peptide and nonpeptide drugs. *Drugs Today*, **1999**, 35: 537-580.
133. **Sezer AD, Akbuga J.** Release characteristics of chitosan treated alginate beads: I. Sustained release of a macromolecular drug from chitosan treated alginate beads. *J Microencapsul*, **1999**; 16, 195-203.
134. **Tiourina OP, Sukhorukov GB.** Multilayer alginate/protamine microsized capsules: encapsulation of α -chymotrypsin controlled release study. *Int J Pharm*, **2002**; 251: 155-161.
135. **Zhou S, Deng X, Li X.** Investigation on a novel core-coated microspheres protein delivery system. *J Control Rel*, **2001**; 75: 27-36.
136. **Şahin NO, Teke B.** Farmasötik Biyoteknoloji ders notları, Mersin: Fon Matbaacılık, **2008**.
137. **Sharma EJM, Peumans DWJ, Sarsfield P, Schumacher U.** Lektin binding reveals divergent carbohydrate expression in human and mouse Peyer's patches. *Histochem Cell Biol*, **1996**; 105: 459-465.
138. **Psutzai A, Grant G, Gelencsér E, Ewen SWBU, Pfüller U, Eiffler R, Bardocz S.** Effects of an orally administered mistletoe (type-2 RIP) lectin on growth, body composition, small intestinal structure, and insulin levels in young rats. *J Nutr Biochem*, **1998**, 9:31-36.
139. **Paulesu L, Corradeschi F, Nicoletti C, Bocci V.** Oral administration of human recombinant interferon- α_2 in rats. *Int J Pharm*, **1988**; 46: 199-202.
140. **Saffron M, Kumar GS, Savariar C, Burnham JC, Williams F, Neckers DC.** A new approach to the oral administration of insulin and other peptide drugs. *Science*, **1987**; 233: 1081-1084.
141. **Saffron M, Bedra C, Kumar GS, Neckers DC.** Vasopressin: A model for the study of effects of additives on the oral and rectal administration of peptide drugs. *J Pharm Sci*, **1988**; 77: 33-38.
142. **Demge C, Michael C, Aprahamihan M, Couvreur P.** Advantages of a new colloidal drug delivery system in the insulin treatment of streptozotocin-induced diabetes rats. *Diabetologia*, **1986**, 29: 531A.
143. **Demge C, Michael C, Aprahamihan M, Couvreur P.** Polyalkylcyanoacrylate nanocapsules as drug carriers: Advantage in insulin treatment of streptozotocin-induced diabetes rats. *Adv Biomaterials*, **1987**; 7: 643-648.
144. **Demge C, Michael C, Aprahamihan M, Couvreur P.** New approach for oral administration of insulin with polyalkylcyanoacrylate microcapsules as drug carrier. *Diabetes*, **1988**; 37: 246-251.

145. **Goddard P.** Therapeutic proteins- a pharmaceutical perspective. *Adv Drug Delivery Rev*, **1991**; 6: 103-131.
146. **Tomlinson E, McVie JG.** New directions in cancer chemotherapy 2. Targeting with microspheres. *Methods in Enzymology*, **1985**; 112: 27-43.
147. **Tomlinson E.** Biological opportunities for site specific drug delivery using particulate carrier. In: Johnson P, Lloyd J, Eds. *Drug Delivery Systems: Fundamentals and Techniques*, Chichester: Ellis Horwood, **1986**: 32-65.
148. **Tomlinson E.** Theory and practice of site-specific drug delivery. *Adv Drug Delivery Rev*, **1987**; 1: 87-198.
149. **Sinha VR, Trehan A.** Biodegradable microspheres for protein delivery *Journal of Controlled Release*, **2003**; 90(3): 261-280.
150. **Blanco MD, Alonso MJ.** Development and characterization of protein-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanospheres. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **1997**; 43(3): 287-294.
151. **Park TG, Lee HY, Nam YS.** A new preparation method for protein loaded poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres and protein release mechanism study. *Journal of Controlled Release*, **1998**; 55(2-3): 181-191.
152. **Hanes J, Chiba M, Langer R.** Degradation of porous poly(anhydride-co-imide) microspheres and implications for controlled macromolecule delivery. *Biomaterials*, **1998**; 19: 2: 163-172.
153. **Di Silvio L, Gurav N, Kayser MV, Braden M, Downes S.** Biodegradable microspheres: A new delivery system for growth hormone. *Biomaterials*, **1994**; 15: 11, 931-936.
154. **Mehta RC, Jeyanthi R, Calls S, Thanoo BC, Burton KW, De Luca PP.** Biodegradable microspheres as depot system for parenteral delivery of peptide drugs. *Journal of Controlled Release*, **1994**; 29(3): 375-384.
155. **Park TG, Lu W, Crotts G.** Importance of in vitro experimental conditions on protein release kinetics, stability and polymer degradation in protein encapsulated poly (D,L-lactic acid-co-glycolic acid) microspheres. *Journal of Controlled Release*, **1995**; 33(2): 211-222.
156. **Woo BH, Kostanski JW, Gebrekidan S, Dani BA, Thanoo BC, DeLuca, PP.** Preparation, characterization and in vivo evaluation of 120-day poly(D,L-lactide) leuprolide microspheres. *Journal of Controlled Release*, **2001**; 75(3): 307-315.
157. **Genta I, Perugini P, Pavanetto F, Maculotti K, Modena T, Casado B, Lupi A, Iadarola P, Conti B.** Enzyme loaded biodegradable microspheres in vitro: ex vivo evaluation. *Journal of Controlled Release*, **2001**; 77(3): 287-295.
158. **Mullerad J, Cohen S, Voronov E, Apte RN.** Macrophage activation for the production of immunostimulatory cytokines by delivering interleukin 1 via biodegradable microspheres. *Cytokine*, **2000**; 12(11): 1683-1690.
159. **Packhaeuser CB, Schnieders J, Oster CG, Kissel T.** In situ forming parenteral drug delivery systems: an overview. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **2004**; **58(2)**: 445-455.
160. **Bevan A, Yun A, Giaccia AJ.** Improving the ODDs: protein delivery to hypoxic tissue. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*, **2001**; 51(3): 81-85.

161. **Dai C, Wang D, Zhao H.** Microencapsulation peptide and protein drugs delivery system. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2005**; 41 (2-3): 117-120.
162. **Dhanaraju MD, Vema K, Jayakumar R, Vamsadhara C.** Preparation and characterization of injectable microspheres of contraceptive hormones. *International Journal of Pharmaceutics*, **2003**; 268(1-2): 23-29.
163. **Jorgensen L, Moeller EH, van de Weert M, Nielsen HM, Frokjaer S.** Preparing and evaluating delivery systems for proteins. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2006**; 29(3-4): 174-182.
164. **Bodmer D, Kissel T, Traechslin E.** Factors influencing the release of peptides and proteins from biodegradable parenteral depot systems. *Journal of Controlled Release*, **1992**; 21(1-3): 129-137.
165. **Chiba M, Hanes J, Langer R.** Controlled protein delivery from biodegradable tyrosine-containing poly(anhydride-co-imide) microspheres. *Biomaterials*, **1997**; 18(13): 893-901.
166. **Morlock M, Koll H, Winter G, Kissel T.** Microencapsulation of rh-erythropoietin, using biodegradable poly(D,L-lactide-co-glycolide): protein stability and the effects of stabilizing excipients. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **1997**; 43(1): 29-36.
167. **Meinel L, Illi OE, Zapf J, Malfanti M, Merkle HP, Gander B.** Stabilizing insulin-like growth factor-I in poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. *Journal of Controlled Release*, **2001**; 70 (1-2): 193-202.
168. **Herrmann J, Bodmeier R.** Somatostatin containing biodegradable microspheres prepared by a modified solvent evaporation method based on W/O/W-multiple emulsions. *International Journal of Pharmaceutics*, **1995**; 126 (1-2): 129-138.
169. **Rosas JE, Hernández RM, Gascón AR, Igartua M, Guzman F, Patarroyo ME, Pedraz JL.** Biodegradable PLGA microspheres as a delivery system for malaria synthetic peptide SPf66. *Vaccine*, **2001**; 19(31): 4445-4451.
170. **Meng M, Liu Y, Wang YB, Wang JC, Zhang H, Wang XQ, Zhang X, Lu WL, Zhang Q.** Increase of the pharmacological and pharmacokinetic efficacy of negatively charged polypeptide recombinant hirudin in rats via parenteral route by association with cationic liposomes. *J Control Release*, **2008**; 128(2):113-9.
171. **Martins S, Sarmiento B, Ferreira DC, Souto EB.** Lipid-based colloidal carriers for peptide and protein delivery--liposomes versus lipid nanoparticles. *Int J Nanomedicine*, **2007**;2(4):595-607.
172. **Jorgensen L, Moeller EH, van de Weert M, Nielsen HM, Frokjaer S.** Preparing and evaluating delivery systems for proteins. *Eur J Pharm Sci.*, **2006**;29(3-4):174-82.
173. **Shi Y, Li LC.** Current advances in sustained-release systems for parenteral drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv.*, **2005**;2(6):1039-58.
174. **Conti S, Polonelli L, Frazzi R, Artusi M, Bettini R, Cocconi D, Colombo P.** Controlled delivery of biotechnological products. *Curr Pharm Biotechnol.*, **2000**;1(4):313-23.
175. **Killion JJ, Fidler IJ.** Systemic targeting of liposome-encapsulated immunomodulators to macrophages for treatment of cancer metastasis. *Immunomethods*, **1994**;4(3):273-9.
176. **Fukunaga M, Miller MM, Deftos LJ.** Factors influencing the enhanced hypocalcemic action of liposome-entrapped calcitonin. *Calcif Tissue Int.*, **1990**;47(6):373-7.
177. **Fukunaga M, Miller MM, Hostetler KY, Deftos LJ.** Liposome entrapment enhances the hypocalcemic action of parenterally administered calcitonin. *Endocrinology*, **1984**;115(2):757-61.

178. **Almeida AJ, Souto E.** Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins. *Adv Drug Deliv Rev.*, **2007**;59(6):478-490.
179. **Pinto Reis C, Neufeld RJ, Ribeiro AJ, Veiga F.** Nanoencapsulation II. Biomedical applications and current status of peptide and protein nanoparticulate delivery systems. *Nanomedicine*, **2006**;2(2):53-65.
180. **Degim IT, Celebi N.** Controlled delivery of peptides and proteins. *Curr Pharm Des.*, **2007**;13(1):99-117.
181. **Rochira M, Miglietta MR, Richardson JL, Ferrari L, Beccaro M, Benedetti L.** Novel vaginal delivery systems for calcitonin: II. Preparation and characterization of HYAFF® microspheres containing calcitonin. *International Journal of Pharmaceutics*, **1996**; 144(1): 19-26.
182. **Ning M, Guo Y, Pan H, Yu H, Gu Z.** Niosomes with sorbitan monoester as a carrier for vaginal delivery of insulin: studies in rats. *Drug Deliv.*, **2005**;12(6):399-407.
183. **Uchaikin V, Cherednichenko T, Malinovskaya V, Orlova T, Kovalev O, Kharlamova F, Chaplygina G, Konev V, Voronina F, Delenian N.** Use of recombinant alpha-2b-interferon in combination with antioxidants in the form of rectal suppositories (viferon) in children with chronic hepatitis B and C. *Acta Virol.*, **2000**;44(2):79-83.
184. **Pietrzak A, Miturski R, Krasowska D, Postawski K, Lecewicz-Toruń B.** Concentration of an epidermal growth factor in blood serum of males during topical treatment of psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.*, 1999;12(1):1-5.
185. **Babül A, Gönül B, Dinçer S, Erdoğan D, Ozoğul C.** The effect of EGF application in gel form on histamine content of experimentally induced wound in mice. *Amino Acids*, **2004**;27(3-4):321-326.
186. **Gönül B, Erdoğan D, Ozoğul C, Koz M, Babül A, Celebi N.** Effect of EGF dosage forms on alkali burned corneal wound healing of mice. *Burns*, **1995**;21(1):7-10.
187. **Sheardown H, Clark H, Wedge C, Apel R, Rootman D, Cheng YL.** A semi-solid drug delivery system for epidermal growth factor in corneal epithelial wound healing. *Curr Eye Res.*, **1997**;16(3):183-190.
188. **Brown GL, Nanney LB, Griffen J, Cramer AB, Yancey JM, Curtsinger LJ 3rd, Holtzin L, Schultz GS, Jurkiewicz MJ, Lynch JB.** Enhancement of wound healing by topical treatment with epidermal growth factor. *N Engl J Med.*, **1989**;321(2):76-79.
189. **Kwon YB, Kim HW, Roh DH, Yoon SY, Baek RM, Kim JY, Kweon H, Lee KG, Park YH, Lee JH.** Topical application of epidermal growth factor accelerates wound healing by myofibroblast proliferation and collagen synthesis in rat. *J Vet Sci.*, **2006**;7(2):105-109.
190. **Behre HM, Heinemann L, Morales A, Pexman-Fieth C.** Rationale, design and methods of the ESPRIT study: Energy, Sexual desire and body Proportions wIth AndroGel, Testosterone 1% gel therapy, in hypogonadal men. *Aging Male*, **2008**;11(2):101-106.
191. **Davis S, Papalia MA, Norman RJ, O'Neill S, Redelman M, Williamson M, Stuckey BG, Wlodarczyk J, Gard'ner K, Humberstone A.** Safety and efficacy of a testosterone metered-dose transdermal spray for treating decreased sexual satisfaction in premenopausal women: a randomized trial. *Ann Intern Med.*, **2008**;148(8):569-577.
192. **Raynaud JP, Aumonier C, Gualano V, Betea D, Beckers A.** Pharmacokinetic study of a new testosterone-in-adhesive matrix patch applied every 2 days to hypogonadal men. *J Steroid Biochem Mol Biol.*, **2008**;109(1-2):177-184.

193. **Gordon C, Wallace DJ, Shinada S, Kalunian KC, Forbess L, Braunstein GD, Weisman MH.** Testosterone patches in the management of patients with mild/moderate systemic lupus erythematosus. *Rheumatology*, **2008**;47(3):334-338.
194. **Geng H, Zhang H, Zhang W, Nieswandt B, Bray PF, Leng X.** Transdermal 17-beta estradiol replacement therapy reduces megakaryocyte GPVI expression. *Thromb Res.*, **2008** (Baskıda).
195. **Huang A, Yaffe K, Vittinghoff E, Kuppermann M, Addis I, Hanes V, Quan J, Grady D.** The effect of ultralow-dose transdermal estradiol on sexual function in postmenopausal women. *Am J Obstet Gynecol.*, **2008**;198(3):265-267.
196. **Park JS, Park YJ, Kang HW, Kim CK.** Solvent effects on physicochemical behavior of estradiols recrystallized for transdermal delivery. *Arch Pharm Res.*, **2008**;31(1):111-116.
197. **Fisher AN, Farraj NF, O'Hagan DT, Jabbal-Gill I, Johansen BR, Davis SS, Illum L.** Effect of L- α -lysophosphatidylcholine on the nasal absorption of human growth in three animal species. *Int J Pharm*, **1991**; 74:147-156.
198. **Ten RM, Anderson PM, Zein NN, Temesgen Z, Clawson ML, Weiss W.** Interleukin-2 liposomes for primary immune deficiency using the aerosol route. *Int Immunopharmacol.*, **2002**;2(2-3):333-344.
199. **Fewtrell MS, Loh KL, Blake A, Ridout DA, Hawdon J.** Randomised, double blind trial of oxytocin nasal spray in mothers expressing breast milk for preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.*, **2006**;91(3):F169-74.
200. **Pontiroli AE.** Peptide hormones: Review of current and emerging uses by nasal delivery. *Adv Drug Deliv Rev.*, **1998**;29(1-2):81-87.
201. **Shahiwala A, Misra A.** Preliminary investigation of the nasal delivery of liposomal leuporelin acetate for contraception in rats. *J Pharm Pharmacol.*, **2006**;58(1):19-26.
202. **Suzuki Y, Makino Y.** Mucosal drug delivery using cellulose derivatives as a functional polymer. *J Control Release*, **1999**;62(1-2):101-7.
203. **Adjei A, Sundberg D, Miller J, Chun A.** Bioavailability of leuprolide acetate following nasal and inhalation delivery to rats and healthy humans. *Pharm Res.*, **1992**;9(2):244-9.
204. **Sudhakar Y, Kuotsu K, Bandyopadhyay AK.** Buccal bioadhesive drug delivery--a promising option for orally less efficient drugs. *J Control Release*, **2006**;114(1):15-40.
205. **Takahashi Y, Takeda C, Seto I, Kawano G, Machida Y.** Formulation and evaluation of lactoferrin bioadhesive tablets. *Int J Pharm.*, **2007**;343(1-2):220-7.
206. **Cui F, He C, He M, Tang C, Yin L, Qian F, Yin C.** Preparation and evaluation of chitosan-ethylenediaminetetraacetic acid hydrogel films for the mucoadhesive transbuccal delivery of insulin. *Biomed Mater Res A.*, 2008 (baskıda).
207. **Landgraf R.** Plasma oxytocin concentrations in man after different routes of administration of synthetic oxytocin. *Exp Clin Endocrinol.*, **1985**;85(2):245-8.
208. **Schurr W, Knoll B, Ziegler R, Anders R, Merkle HP.** Comparative study of intravenous, nasal, oral and buccal TRH administration among healthy subjects. *J Endocrinol Invest.*, **1985**;8(1):41-4.
209. **van der Bijl P, van Eyk AD, Thompson IO, Stander IA.** Diffusion rates of vasopressin through human vaginal and buccal mucosa. *Eur J Oral Sci.*, **1998**;106(5):958-62.

210. **Agu RU, Ugwoke MI, Armand M, Kinget R, Verbeke N.** The lung as a route for systemic delivery of therapeutic proteins and peptides. *Respir Res.*, **2001**;2(4):198-209.
211. **Yu J, Chien YW.** Pulmonary drug delivery: physiologic and mechanistic aspects. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.*, **1997**;14(4):395-453.
212. **Lucas P, Anderson K, Staniforth JN.** Protein deposition from dry powder inhalers: fine particle multipliers as performance modifiers. *Pharm Res.*, **1998**;15(4):562-9.
213. **Huang YY, Wang CH.** Pulmonary delivery of insulin by liposomal carriers. *J Control Release*, **2006**;113(1):9-14.
214. **Mahesh Kumar T, Misra A.** Formulation and evaluation of insulin dry powder for inhalation. *Drug Dev Ind Pharm.*, **2006**;32(6):677-86.
215. **You Y, Zhao M, Liu G, Tang X.** Physical characteristics and aerosolization performance of insulin dry powders for inhalation prepared by a spray drying method. *J Pharm Pharmacol.*, **2007**;59(7):927-34.
216. **Clark A, Kuo MC, Newman S, Hirst P, Pitcairn G, Pickford M.** A comparison of the pulmonary bioavailability of powder and liquid aerosol formulations of salmon calcitonin. *Pharm Res.*, **2008**;25(7):1583-90.
217. **Youn YS, Kwon MJ, Na DH, Chae SY, Lee S, Lee KC.** Improved intrapulmonary delivery of site-specific PEGylated salmon calcitonin: optimization by PEG size selection. *J Control Release.*, **2008**;125(1):68-75.
218. **Yamamoto H, Kuno Y, Sugimoto S, Takeuchi H, Kawashima Y.** Surface-modified PLGA nanosphere with chitosan improved pulmonary delivery of calcitonin by mucoadhesion and opening of the intercellular tight junctions. *J Control Release*, **2005**;102(2):373-81.
219. **Mahesh Kumar T, Misra A.** Pulmonary absorption enhancement of salmon calcitonin. *J Drug Target.*, **2004**;12(3):135-44.
220. **Kobayashi S, Kondo S, Juni K.** Pulmonary delivery of salmon calcitonin dry powders containing absorption enhancers in rats. *Pharm Res.*, **1996**;13(1):80-3.
221. **Morimoto K, Katsumata H, Yabuta T, Iwanaga K, Kakemi M, Tabata Y, Ikada Y.** Gelatin microspheres as a pulmonary delivery system: evaluation of salmon calcitonin absorption. *J Pharm Pharmacol.*, **2000**;52(6):611-7.
222. **Chang, TMS.** Biodegradable semipermeable microcapsules containing enzymes, hormones, vaccines, and other biologicals. *J Bioeng.*, **1976**; 1: 25-32.
223. **Musabayane CT, Munjeri O, Bwititi P, Osim EE.** Orally administered, insulin-loaded amidated pectin hydrogel beads sustain plasma concentrations of insulin in streptozotocin-diabetic rats. *Journal of Endocrinology*, **2000**;164(1): 1-6 .
224. **Childers NK, Zhang SS, Michalek SM.** Oral immunization of humans with dehydrated liposomes containing *Streptococcus mutans* glucosyltransferase induces salivary immunoglobulin A2 antibody responses. *Oral Microbiol Immunol.*, **1994**;9(3):146-53.
225. **Cheng G, Zhao X, Yan W, Wang W, Zuo X, Huang K, Liu Y, Chen J, Wang J, Cong W, Liu M, Gao H, Chen J, Lu Y, Zheng Z.** Alpha interferon is a powerful adjuvant for a recombinant protein vaccine against foot-and-mouth disease virus in swine, and an effective stimulus of in vivo immune response. *Vaccine*, **2007**; 25 (28): 5199-5208.

226. **Bhowmick S, Ali N.** Recent developments in leishmaniasis vaccine delivery systems. *Expert Opin Drug Deliv.*, **2008**;5(7):789-803.
227. **Cho Y, Ko TS, Cha SH, Sok DA.** Properties of acetylcholinesterase reconstituted in liposomes of a different charge. *Neurochemical Research*, **1995**; 20(6): 681-687.
228. **Jalil R, Nixon, JR.** Biodegradable poly(lactic acid) and poly(lactide-co-glycolide) microcapsules: problems associated with preparative techniques and release properties. *J Microencapsul.*, **1990**; 7: 297-325.
229. **Yolles S, Eldridge JE, Woodland JHR.** Sustained delivery of drugs from polymer drug mixtures. *Polym News*, **1971**; 1: 9-12.
230. **Sanders LM, McRae GI, Vitale KM, Kell BA.** Controlled delivery of LHRH analogues from biodegradable injectable microspheres. *J Control Rel*, **1985**;2: 187-195.
231. **Brannon-Peppas L, Grosvenor AL, Smith BS.** Drug delivery of penicillin and β -estradiol from biodegradable microparticles within degradable and nondegradable films. The 21st International Meeting of The Controlled Release Society. Nice, France, June, **1994**: 27-30.
232. **Cowsar DR, Tice TR, Giley RM, English JP.** Poly(lactide-co-glycolide) microcapsules for controlled release of steroids, *Methods Enzymol*, **1985**; 112: 101-116.
233. **Eldridge JH, Staas JK, Gettic A, Marx PA, Tice TR, Giley RM.** Protection against vaginal SIV transmissions with microencapsulated vaccine. *Science*, **1993**;260: 1323-1326.
234. **Moore A, McGuirk P, Adams S, Jones WC, McGee JP, O'Hagon DT, Mills KH.** Immunization with a soluble recombinant HIV protein entrapped in biodegradable microparticles induces HIV-specific CD⁸⁺ cytotoxic T lymphocytes and CD⁴⁺ Th1 cells. *Vaccine*, **1995**; 13: 1741-1749.
235. **Miller RA, Brady JM, Cutright DE.** Degradation rates of oral resorbable implants (polylactates and polyglycolates): rates modification with changes in PLA/PGA copolymers ratio. *J Biomed Mater Res.*, **1997**; 11: 711-719.
236. **Murthy RSR.** Biodegradable polymers. In: Jain NK, Ed. *Controlled and Novel Drug Delivery*, New Delhi: CBS Publishers and Distributors, **1997**: 27-51.
237. **Ramachandran GN, Reddi AH.** *Biochemistry of Collagen*, New York: Plenum, **1976**: 55-78.
238. **Lewis DH.** Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers. In: Chasin M, Langer R, Eds. *Biodegradable Polymers As Drug Delivery Systems, Drugs and Pharmaceutical Sciences*, New York: Marcel Dekker, **1990**: 1-41.
239. **Geng Y, Yuan W, Wu F, Chen J, He M, Jin T.** Formulating erythropoietin-loaded sustained-release PLGA microspheres without protein aggregation. *J Control Release*, **2008** (baskıda).
240. **Giteau A, Venier-Julienne MC, Marchal S, Courthaudon JL, Sergent M, Montero-Menci C, Verdier JM, Benoit JP.** Reversible protein precipitation to ensure stability during encapsulation within PLGA microspheres. *Eur J Pharm Biopharm.*, **2008** (baskıda).

241. **Sivadas N, O'Rourke D, Tobin A, Buckley V, Ramtoola Z, Kelly JG, Hickey AJ, Cryan SA.** A comparative study of a range of polymeric microspheres as potential carriers for the inhalation of proteins. *Int J Pharm.*, **2008**;358(1-2):159-67.
242. **Barat A, Ruskin HJ, Crane M.** 3D Multi-agent models for protein release from PLGA spherical particles with complex inner morphologies. *Theory Biosci.*, **2008**;127(2):95-105.
243. **Zhu XH, Wang CH, Tong YW.** In vitro characterization of hepatocyte growth factor release from PHBV/PLGA microsphere scaffold. *J Biomed Mater Res A.*, **2008** (baskıda)
244. **Taluja A, Bae YH.** Role of a novel multifunctional excipient poly(ethylene glycol)-block-oligo(vinyl sulfadimethoxine) in controlled release of lysozyme from PLGA microspheres. *Int J Pharm.*, **2008**;358(1-2):50-9.
245. **Murata N, Takashima Y, Toyoshima K, Yamamoto M, Okada H.** Anti-tumor effects of anti-VEGF siRNA encapsulated with PLGA microspheres in mice. *J Control Release*, **2008**;126(3):246-54.
246. **Jaklenec A, Hinckfuss A, Bilgen B, Ciombor DM, Aaron R, Mathiowitz E.** Sequential release of bioactive IGF-I and TGF-beta 1 from PLGA microsphere-based scaffolds. *Biomaterials*, **2008**;29(10):1518-25.
247. **Giteau A, Venier-Julienne MC, Aubert-Pouëssel A, Benoit JP.** How to achieve sustained and complete protein release from PLGA-based microparticles? *Int J Pharm.*, **2008**;350(1-2):14-26.
248. **Xu FH, Zhang Q.** Recent advances in the preparation progress of protein/peptide drug loaded PLA/PLGA microspheres. *Yao Xue Xue Bao*, **2007**; 1: 14-26.
249. **Hartree EE.** Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem.*, **1972**; 48: 422-427.
250. *US Pharmacopoeia XXII*, The United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, **1994**.
251. **Hsieh DS, Rhine WD, Langer R.** Zero-order controlled-release polymer matrices for micro- and macromolecules. *J Pharm Sci.*, **1983**;72(1):17-22.
252. **Şahin NÖ, Arslan H.** A Formulation Study For Enteric Microspheres of Tenoxicam Using Cellulose Acetate Phthalate Part I: DTA/TG Analysis. *Asian Journal of Chemistry*, **2007**; 19(6): 4889-4894.
253. **Peters TJr.** Serum Albumin. *Adv. Protein Chem.*, **1985**; 37; 161-245.
254. **Maréchal Y.** *Vibrational Spectra and Structure*, Part 16; Durig, JR, Ed. Amsterdam: Elsevier, **1987**: 311-356.
255. **Grdadolnik J, Maréchal Y.** Bovine serum albumin observed by infrared spectrometry. I. Methodology, structural investigation, and water uptake. *Biopolymers*, **2001**;62(1):40-53.

256. **Merkel HP, Speiser P.** Preparation and in vitro evaluation of cellulose acetate phthalate. *J Pharm Sci.*, **1973**;62 (10), 1444-1448.

257. **Beyger JW, Naira JG.** Some factors affecting the microencapsulation of pharmaceuticals with cellulose acetate phthalate. *J Pharm Sci.*, **1986**;75: 573-578.

ÖZGEÇMİŞ

19 Ekim 1981 yılında Tarsus'ta doğmuştur. İlkokul öğrenimini Sadık Eliyeşil İlkokulu'nda, orta ve lise öğrenimini ise Abdulkerim Bengi Anadolu Lisesi'nde tamamlamıştır. 1999 -2004 yılları arasında Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitimini tamamlamıştır. 2005 yılında Mersin Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Teknolojisi Bölümü'nde yüksek lisans eğitimine başlamış 2006 yılında araştırma görevlisi kadrosuna atanmıştır.

Halen Mersin Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Teknolojisi Bölümü'nde yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.