



Evaluation of a PEG-endosome disruptive peptide conjugate as a potential doxorubicin delivery system

Selin Şen^{ID}, Ayben Top^{ID}*

Department of Chemical Engineering, İzmir Institute of Technology, İzmir, 35430, Turkey

Highlights:

- Solid phase peptide and PEG conjugation with high efficiency
- Preparation of pH sensitive drug delivery systems
- Formation of self-assembled nanostructures

Keywords:

- TAT-derived peptide
- Drug delivery systems
- Self-assembly
- Doxorubicin
- Polyethylene glycol

Article Info:

Research Article

Received: 03.10.2019

Accepted: 29.02.2020

DOI:

10.17341/gazimmfd.629183

Acknowledgement:

This project was partially supported by İzmir Institute of Technology Scientific Research Projects Coordination Unit (BAP Project Number = 2017IYTE53)

Correspondence:

Author: Ayben Top
e-mail: aybentop@iyte.edu.tr
phone: +90 232 750 6630

Graphical/Tabular Abstract

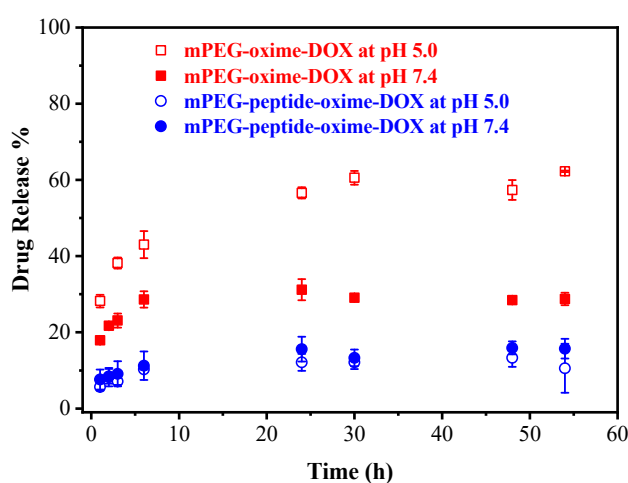


Figure A. DOX release curves of the mPEG-oxime-DOX and mPEG-peptide-oxime-DOX obtained at pH 7.4 and pH 5.0

Purpose: In this study, it was aimed to assess the physicochemical and doxorubicin (DOX) release properties of a PEGylated TAT-derived peptide carrier system as a preliminary investigation.

Theory and Methods:

TAT-derived peptide with a sequence of G₂RQR₃QR₃G₂S was synthesized using Fmoc strategy in solid state. mPEG-COOH (M_n = 1900 Da) was conjugated to N-terminus of the peptide on the resin. DOX was conjugated to the mPEG-peptide conjugate via acid labile oxime bond. DOX-release, self-assembly, and stability properties of the resultant drug delivery system (DDS) denoted as mPEG-peptide-oxime-DOX were evaluated at pH 5.0 and pH 7.4 and compared with those of the control DDS lack of peptide sequence, mPEG-oxime-DOX. Drug release profiles of the DDSs were obtained using dialysis method. Size distribution and stability of the DDSs were determined via dynamic light scattering.

Results:

MALDI-TOF-MS analysis results indicated that both the peptide and the conjugate were synthesized successfully. For mPEG-oxime-DOX, pH dependent DOX release was obtained confirming pH responsive property of oxime bond. mPEG-peptide-oxime-DOX seemed to exhibit quite low DOX release (~10-15 %) for both pH, which suggested possible interactions between DOX and the peptide preventing DOX to pass through dialysis membrane. Initial median size (D₅₀) value of the mPEG-oxime-DOX was measured as ~24 nm independent of pH. For mPEG-peptide-oxime-DOX, D₅₀ values were obtained as ~3 nm and ~6 nm at pH 5.0 and pH 7.4, respectively and indicated its pH controlled aggregation behavior. Sizes of both DDSs, tended to increase upon incubation at physiological conditions for 1 day.

Conclusion:

Comparison of the stability behavior of the similar mPEG-DOX and mPEG-peptide-DOX conjugates developed in our group indicated that longer PEG chains should be used to enhance the stability of these kinds of DDSs.



Potansiyel doksorubisin taşıyıcı sistemi olarak PEG-endozom parçalayıcı peptit konjugatının değerlendirilmesi

Selin Şen^{ID}, Ayben Top*^{ID}

İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, 35430 Urla, İzmir, Türkiye

Ö N E Ç İ K A N L A R

- Yüksek verimli katı faz peptit ve PEG konjugasyonu
- pH'ya duyarlı ilaç taşıyıcı sistemlerinin hazırlanması
- Kendiliğinden düzenlenen nano yapıların oluşumu

Makale Bilgileri

Araştırma Makalesi

Geliş: 03.10.2019

Kabul: 29.02.2020

DOI:

10.17341/gazimmfd.629183

Anahtar Kelimeler:

TAT türevi peptit,
ilaç taşıyıcı sistemleri,
kendiliğinden düzenlenme,
doksorubisin,
polietilen glikol

ÖZET

Bu çalışmada, PEG ile konjuge edilmiş TAT türevi hücre delici peptit (G₂RQR₃QR₃G₂S) bazlı doksorubisin (DOX) taşıyıcı sisteminin geliştirilmesi ve taşıyıcı sistemin ilaç salım, kendiliğinden düzenlenme ve stabilite özelliklerinin incelenmesi amaçlanmıştır. mPEG-peptit-oksım-DOX olarak isimlendirilen ilaç taşıyıcı sisteminin hazırlanmasında moleküler ağırlığı 1900 Da olan metokspolietilen glikol (mPEG) kullanılmıştır. DOX, mPEG-peptit taşıyıcı sistemine asit parçalanabilir oksım bağı ile bağlanmıştır. Peptidin, taşıyıcı sistemin fizikokimyasal ve DOX salım özelliklerine etkisini değerlendirmek için peptit içermeyen kontrol ilaç taşıyıcı sistemi de (mPEG-oksım-DOX) sentezlenmiştir. mPEG-oksım-DOX, 54 h sonunda pH 5,0 ve pH 7,4'te sırasıyla yaklaşık %68 ve %28 DOX salımı ile pH programlı bir DOX salımı sergilemiştir. Diğer taraftan, mPEG-peptit-oksım-DOX için her iki pH değerinde de oldukça düşük DOX salımı (yaklaşık %10-15) elde edilmiş ve bu davranışın nedeni DOX ile peptit arasındaki muhtemel etkileşimler olarak öngörülmüştür. mPEG-oksım-DOX'in başlangıçtaki medyan boyut değeri (D50) pH'tan bağımsız, yaklaşık 24 nm olarak ölçülmüştür. Buna karşın, mPEG-peptit-oksım-DOX için, peptit dizinindeki arjininler arasındaki itme kuvvetleri nedeniyle, oldukça düşük D50 değerleri (pH 5,0 ve pH 7,4 için sırasıyla ~3 nm ve ~6 nm) elde edilmiştir. Her iki ilaç taşıyıcı sisteminin boyutları fizyolojik koşullarda 1 gün boyunca inkübasyon sonunda artma eğilimi göstermiş ve mPEG-peptit-oksım-DOX ve mPEG-oksım-DOX sistemlerinin stabilitesini artırmak için daha uzun PEG zincirlerinin kullanılmasının gerekli olduğu öngörülmüştür.

Evaluation of a PEG-endosome disruptive peptide conjugate as a potential doxorubicin delivery system

H I G H L I G H T S

- Solid phase peptide and PEG conjugation with high efficiency
- Preparation of pH sensitive drug delivery systems
- Formation of self-assembled nanostructures

Article Info

Research Article

Received: 03.10.2019

Accepted: 29.02.2020

DOI:

10.17341/gazimmfd.629183

Keywords:

TAT-derived peptide,
drug delivery systems,
self-assembly,
doxorubicin,
polyethylene glycol

ABSTRACT

In this study, it was aimed to develop a doxorubicin (DOX) carrier system based on a PEGylated TAT-derived cell penetrating peptide (G₂RQR₃QR₃G₂S) and to investigate drug release, self-assembly and stability properties of the carrier system. In the preparation of the drug delivery system, denoted as mPEG-peptide-oxime-DOX, methoxypolyethylene glycol (mPEG) with M_n=1900 Da was used. DOX was attached to the mPEG-peptide carrier system via acid cleavable oxime bond. Control drug delivery system, lack of the peptide (mPEG-oxime-DOX) was also synthesized to assess the effect of the peptide on the physicochemical and DOX release properties of the carrier system. mPEG-oxime-DOX exhibited a pH programmed DOX release with respective % DOX release values of ~68% and ~28% at pH 5.0 and at pH 7.4 at the end of 54 h. For the mPEG-peptide-oxime-DOX, on the other hand, quite low DOX release (~10-15 %) was observed for both pH values suggesting possible interactions between DOX and the peptide. Initial median size value (D50) of the mPEG-oxime-DOX was measured as ~24 nm, independent of pH. However, for the mPEG-peptide-oxime-DOX, quite lower D50 values (~3 nm and ~6 nm at pH 5.0 and pH 7.4, respectively) were obtained due to the repulsions between the arginines in the peptide sequence. Sizes of both drug delivery systems, tended to increase upon incubation at physiological conditions for 1 day suggesting that longer PEG chains should be used to enhance the stability of the mPEG-peptide-oxime-DOX and mPEG-oxime-DOX systems.

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: selinozkiyici@iyte.edu.tr, aybentop@iyte.edu.tr / Tel: +90 232 750 6630

1. GİRİŞ (INTRODUCTION)

Çoklu ilaç direnci (ÇİD) kemoterapinin etkisini azaltan en büyük sorunlardan biridir ve hücre içi ilaç alınmamasının düşük olması, hücre dışına ilaç akışının artması, detoksifikasyon sistemlerinin aktivitesi, gelişmiş DNA onarım mekanizmaları ve kusurlu apoptoz gibi nedenlerle ortaya çıkmaktadır. Kanser hücrelerindeki çoklu ilaç direncinin kemoterapi ilaçlarını hücreden dışarı pompalayıp hücre içi ilaç konsantrasyonunu azaltan P-glikoproteinlerin (P-gp) aşırı ekspresyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [1-5]. İlacın serum dozunun artırılması çoklu ilaç direncine bir çözüm olsa da aynı zamanda normal dokular üzerinde de toksik etkilerin açığa çıkması kaçınılmazdır. Bu nedenle, ÇİD'nin üstesinden gelmek için hızlı ilaç salım yapabilen, lizozomal kaçışı sağlayan ve P-gp ekspresyonunu engelleyen yeni ilaç taşıyıcı sistemleri geliştirilmektedir [4, 6, 7].

Yaygın olarak araştırılan ilaç taşıyıcı sistemi gruplarından biri, tümör hücrelerindeki pH değişimini kullanan pH'ya duyarlı sistemlerdir. Katı tümörlerde pH değerleri sitoplazma, endozom ve lizozom için sırasıyla 6,8-7,2, 5-6 ve 4,5-5,5 olarak belirtilmiştir [8-10]. Bu ilaç taşıyıcı sistemlerinin fizyolojik pH değerinde stabilitesini koruması beklenirken, asidik hücre içi bölmelerde hızlı bir şekilde ilaç salımını tetikleyecek şekilde tasarımı yapılmıştır. Bu sistemler, genellikle amin veya karboksilik asit grupları gibi iyonize olabilen fonksiyonel grupların yapıya eklenmesi veya asit parçalanabilir bağ kullanılarak pH'ya duyarlı hale getirilmektedir [11-13]. Yapılan çalışmalarda, pluronik polimerleri, D- α -tokoferil polietilen glikol süksinat (TPGS), siklodekstrin ve kurkumin gibi P-gp inhibitörlerini içeren pH'ya duyarlı sistemlerin ÇİD etkisini büyük ölçüde azalttığı gösterilmiştir [14-16]. Lipidler, pH'ya duyarlı ve endozomal tamponlayıcı polimerler ile katyonik hücre delici peptitler gibi endozom parçalayıcı özelliği olan moleküller, çoğunlukla nükleik asit taşıyıcı sistemlerinde kullanılmaktadır [17-19]. Ayrıca, bu tip endozomolitik ajanların kanser hücrelerinin ÇİD etkisinin üstesinden geldiği de ispatlanmıştır [20]. Örneğin, hücre delici peptit-ilaç konjugatlarının serbest ilaca kıyasla dirençli hücrelere karşı çok daha fazla toksik etki göstermesi bu konjugat sistemlerinin çoklu ilaç direncini tersine çevirme potansiyelini açık bir şekilde ortaya koymaktadır [21, 22]. Peptit-ilaç konjugatlarının düşük plazma ömrü, uygulamalarını sınırlandırır da bu eksikliğin 'PEG konjugasyonu' olarak adlandırılan polietilen glikol ile kimyasal modifikasyon ile giderilmesi mümkündür [23, 24]. Bu çalışmada, PEG ile konjuge edilmiş TAT türevi hücre delici peptit ve asit parçalanabilir oksim bağı içeren DOX taşıyıcı sistemi hazırlanmıştır. mPEG-peptit-oksim-DOX olarak isimlendirilen bu sistemin potansiyelini belirlemek için ilaç salımı, kendiliğinden düzenlenme ve stabilize özellikleri belirlenmiş ve peptit dizini içermeyen mPEG-oksim-DOX sisteminin özellikleri ile karşılaştırılmıştır. Bu çalışmanın sonuçları, kanser tedavisi için yeni nesil pH'ya duyarlı peptit-polimer bazlı ilaç salım sistemlerinin tasarımı için önemli bilgiler vermiştir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM (MATERIALS AND METHODS)

2.1. Materyaller (Materials)

Farklı fonksiyonel formlarda metokspolietilen glikol hazırlamak için polietilen glikol monometileter (mPEG-OH, M_n :1900 Da, Alfa Aesar), Sigma Aldrich'ten satın alınan sülfürik asit, moleküler elek zeolit 4Å, krom oksit (CrO_3), aseton, izopropil alkol, dietil eter (DEE), dimetil sülfoksit (DMSO), diklorometan (DCM), trietilamin (TEA) ve asetik anhidrit kullanılmıştır. Model anti-kanser ilacı olarak seçilen doksorubisin.HCl (DOX) Medkoo Biosciences firmasından temin edilmiştir. Katı faz peptit sentezi (SPPS) için düşük fonksiyonel grup kapasitesine sahip rink amid MBHA reçinesi (NovaBiochem), dimetil formamid (DMF, Sigma Aldrich) ve piperidin (Acros) kullanılmıştır. N,N-diizopropiletilamin (DIEA), 1-[bis(dimetilamino) metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b] pirdinyum 3-oksit hekzaflorofosfat (HATU), O-(1H-6-klorobenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluroniyum hekzaflorofosfat (HCTU), ve Fmoc-LGln(Trt)-OH Carl Roth firmasından satın alınmıştır. Peptit sentezinde korumalı amino asit olarak Fmoc-Ser(tBu)-OH (Aldrich), Fmoc-L-Gly-OH ve Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH (NovaBiochem) kullanılmıştır. Peptidi reçineden ayırma ve koruma gruplarının uzaklaştırma reaksiyonlarında, sentez kalitesinde trifloroasetik asit (TFA, Sigma Aldrich), anisol, tiyoanisol (Carl Roth) ve 1,2-etandiol (EDT, Fluka) kullanılmıştır. Tampon çözeltiler, sodyum fosfat monobazik, sodyum fosfat dibazik, sodyum klorür, sodyum hidroksit (Sigma Aldrich), asetik asit ve hidroklorik asit (Merck) ile hazırlanmıştır. Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) ve nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi analizlerinde örneklerin hazırlanmasında sırasıyla FTIR spektroskopisi kalitesinde potasyum bromür (KBr, Sigma Aldrich) ve dötero-kloroform ($CDCl_3$, Merck) kullanılmıştır.

2.2. Yöntemler (Methods)

2.2.1. mPEG-oksım-DOX sentezi (Synthesis of the mPEG-oxime-DOX)

mPEG-oksım-DOX konjugatının sentezinin ilk aşamasında, mPEG-OH Albright Goldman oksidasyon reaksiyonu kullanılarak metokspolietilen glikol aldehite (mPEG-COH) yükseltgenmiştir. İkinci aşamada ise, DOX'in amin grubu ve mPEG-COH'in aldehit grubu arasındaki Schiff baz oluşum reaksiyonu ile model anti-kanser ilacı DOX, mPEG aldehite bağlanmıştır.

mPEG-COH molekülü, Lin ve arkadaşları (1994) tarafından uygulanan yönteme benzer bir şekilde sentezlenmiştir [25]. Reaksiyona başlamadan önce, DMSO aktifleştirilmiş zeolit 4Å üzerinde kurutulmuştur. 2,0 g (~1,05 mmol) vakumla kurutulmuş mPEG-OH, 8,82 mL DMSO içerisinde çözülüp 0,218 mL (2,3 mmol) asetik anhidrit ilave edilmiştir. Çözelti, oda sıcaklığında 30 h boyunca karıştırılmış ve daha sonra, soğuk DEE üzerinde çökeltilip santrifüjlenmiştir. DCM içerisinde çözülen çökelti yeniden DEE'de çökeltilip

santrifüjlenmiş ve bu işlem iki kez tekrar edilmiştir. Son olarak, izole edilen çökelti oda sıcaklığında vakum etüvünde kurutulup -20°C 'de muhafaza edilmiştir. Verim = %74; FTIR: $\nu = 1242, 1280, 1342, 1468, 2889 \text{ cm}^{-1}$ (C-H titreşimleri), $\nu = 3450 \text{ cm}^{-1}$ (OH gerilmesi), $\nu = 1113 \text{ cm}^{-1}$ (C-O-C titreşimleri), $\nu = 1738 \text{ cm}^{-1}$ (C=O gerilmesi); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 3,38 \text{ ppm}$ (3H, $-\text{OCH}_3$), $\delta = 3,65 \text{ ppm}$ ($[4 \times n]\text{H}$, $[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}]_n$), $\delta = 4,16 \text{ ppm}$ (2H, CH_2CHO), $\delta = 5,55 \text{ ppm}$ (1H, mPEG-OH), $\delta = 9,70 \text{ ppm}$ (1H, w, mPEG-COH); M_n ($^1\text{H NMR}$) = 2156 Da; % aldehit fonksiyonel grubu = %70.

mPEG-oksim-DOX sentezinde, 20 mg mPEG-COH (0,0105 mmol) ve 8,7 mg (0,015 mmol) DOX.HCl 2 mL DMSO içerisinde çözülmüş ve 6,3 μL TEA ilave edilmiştir. Elde edilen çözelti, 40°C ve 150 rpm'de 24 h boyunca çalkalanmıştır. Daha sonra, çözelti soğuk DEE üzerinde çökeltip santrifüjlenmiştir. Çökelti, renksiz yıkama çözeltisi elde edilene kadar DEE ile yıkanmış ve santrifüjle izole edilmiştir. Daha sonra, mPEG-oksim-DOX konjugatında kalan DEE çeker ocakta buharlaştırılmıştır. En son aşamada ise örnek, deiyonize suda çözülmüş, liyofilizasyon işlemine tabi tutulmuş ve -20°C 'de saklanmıştır. Verim = %80; % DOX içeriği: %67.

2.2.2. mPEG-peptit-oksim-DOX sentezi (Synthesis of the mPEG-peptide-oxime-DOX)

mPEG-peptit-oksim-DOX konjugatı aşağıda verilen adımları kullanarak sentezlenmiştir:

- Jone oksidasyonu yöntemiyle karboksilik asit fonksiyonel grubuna sahip mPEG (mPEG-COOH) hazırlanması
- Katı faz peptit sentezi ve reçine üzerinde mPEG-COOH'in peptit ile konjugasyonu
- Albright-Goldman oksidasyonu kullanılarak aldehit formunda mPEG-peptit (mPEG-peptit-COH) konjugatının sentezi
- Doksorubisin mPEG-peptit-COH'ye konjugasyonu ile mPEG-peptit-oksim-DOX elde edilmesi

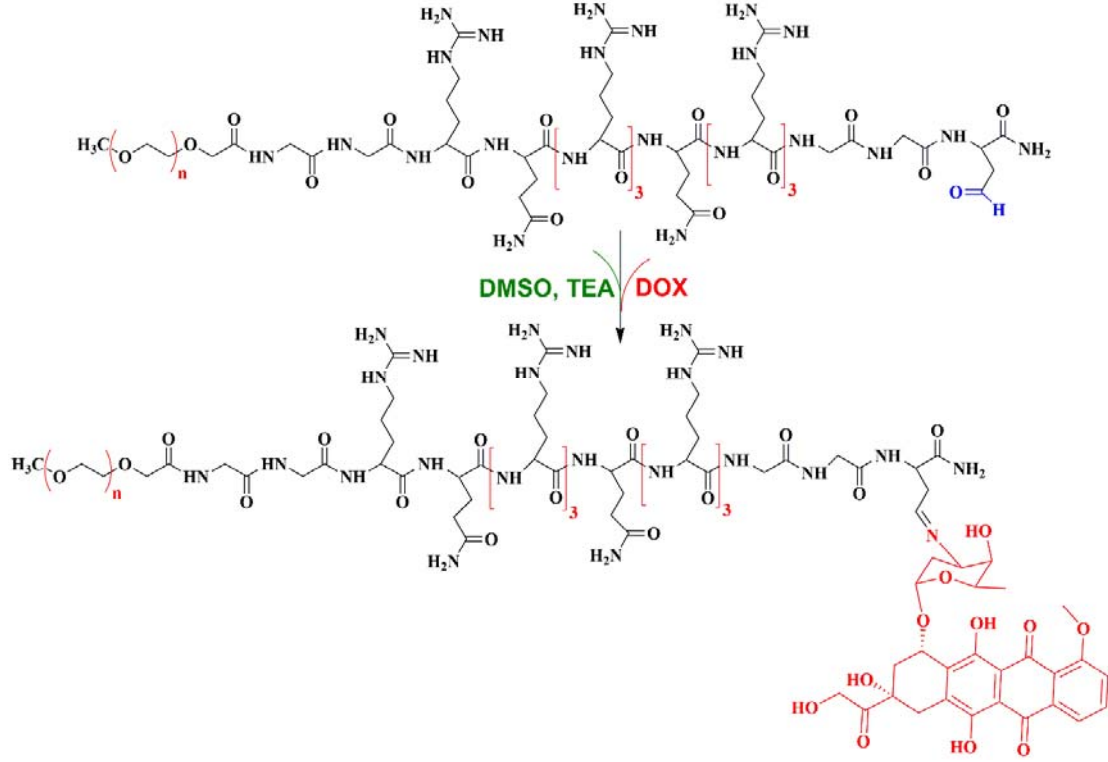
mPEG-COOH, Lele ve Kulkarni (1998) tarafından geliştirilen yöntem kullanılarak hazırlanmıştır [26]. 7 g (0,07 mol) krom oksit (CrO_3) 50 mL deiyonize su içinde çözülüp karışıma yavaş yavaş 6,1 mL H_2SO_4 ilave edilmiş ve 10 min boyunca buzlu su banyosunda karıştırılıp Jone ajanı hazırlanmıştır. Tipik bir oksidasyon reaksiyonunda, 50 mL aseton içinde 5 g mPEG-OH ($\sim 0,0025 \text{ mol}$) çözülmüş ve bu çözeltiye oda sıcaklığına getirilmiş 2,125 mL Jone ajanı eklenmiştir. Çözelti, gece boyunca oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra reaksiyonu sonlandırmak için 1,25 mL izopropil alkol eklenmiştir. mPEG türevlerini izole etmek için önce çözeltideki krom tuzu çöktürmeleri filtre edilmiştir. Kalan krom tuzlarını adsorbe etmek için filtrelenmiş çözeltiye 0,5 g aktif karbon eklenmiş ve çözelti 2 h karıştırılmıştır. Daha sonra, aktif karbon filtrelenmiş ve adsorpsiyon işlemi renksiz bir çözelti elde edilene kadar tekrarlanmıştır. Çözelti içindeki asetonun büyük bir kısmı, döner buharlaştırıcı ile giderilmiş ve polimer, petri kabı

içinde kurutulmuş ve bu işlem iki kez tekrar edilmiştir. Son olarak, katılaşmış üründe kalan çözücü vakum altında 40°C 'de buharlaştırılmıştır. Verim = %64; FTIR: $\nu = 1242, 1280, 1342, 1468, 2889 \text{ cm}^{-1}$ (C-H titreşimleri), $\nu = 3450 \text{ cm}^{-1}$ (OH gerilmesi), $\nu = 1113 \text{ cm}^{-1}$ (C-O-C titreşimleri), $\nu = 1749 \text{ cm}^{-1}$ (C=O gerilmesi); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 3,38 \text{ ppm}$ (3H, $-\text{OCH}_3$), $\delta = 3,64 \text{ ppm}$ ($[4 \times n]\text{H}$, $[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}]_n$), $\delta = 4,16 \text{ ppm}$ (2H, CH_2COOH); M_n ($^1\text{H NMR}$) = 2191 Da; % karboksilik asit fonksiyonel grubu = %70.

$\text{G}_2\text{RQR}_3\text{QR}_3\text{G}_2\text{S}$ dizinine sahip peptit, katı faz peptit sentezinde (SPPS) Fmoc stratejisi kullanılarak sentezlenmiştir. Reaksiyon AAPTEC Focus XI model otomatik peptit sentezi cihazı üzerinde gerçekleştirilmiştir. Fmoc koruyucu grupları, reçineyi DMF içinde hacimce %20'lik piperidin çözeltisine tabi tutarak uzaklaştırılmıştır. Her bir aminoasit için çift eşleşme reaksiyonu uygulanmıştır. Bu reaksiyonlarda organik baz olarak DIEA, eşleşme ajanı olarak da birinci ve ikinci eşleşme reaksiyonlarında sırasıyla HCTU ve HATU kullanılmıştır. Aminoasitlerin eklenmesi tamamlandıktan sonra, sentezlenen peptidin analizleri için reçinenin yaklaşık dörtte biri ayrılmıştır. Peptidin PEG konjugasyonu, kalan reçine üzerinde mPEG-COOH ile peptidin N-terminalindeki amin grubunun HATU ve DIEA destekli reaksiyonu ile gerçekleştirilmiştir. Sentez tamamlandıktan sonra, reçine DCM ile yıkanıp oda sıcaklığında vakum etüvünde kurutulmuştur. Peptidin ve mPEG-peptit konjugatının reçineden ayırma ve koruyucu gruplarını uzaklaştırma reaksiyonları %90 TFA, %5 tiyoanisol, %3 EDT ve %2 anisol içeren kokteyl kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Daha sonra, reçine filtre edilip sıvı faz soğuk DEE üzerine çökeltiştir. Çökelti DEE ile yıkanıp santrifüjlenmiş ve bu işlem üç kez tekrarlanmıştır. İzole edilmiş peptit ve mPEG-peptit konjugatı içeriğindeki DEE oda sıcaklığında azot gazı akışı kullanılarak buharlaştırılmıştır. Elde edilen ürünler deiyonize su içinde çözülmüş, dondurularak kurutulmuş ve -20°C 'de muhafaza edilmiştir. Aldehit fonksiyonel grubuna sahip mPEG-peptit, mPEG-COH sentezine benzer bir şekilde DMSO-asetik anhidrit oksidasyonu ile sentezlenmiştir. Bu reaksiyonda, peptit dizinindeki serinin hidroksil grubu aldehite oksitlenmiştir. 30 mg (0,00815 mmol) vakumla kurutulmuş mPEG-peptit, 2 mL kurutulmuş DMSO içerisinde çözülüp üzerine 2 μL (0,0188 mmol) asetik anhidrit ilave edilmiştir. Çözelti oda sıcaklığında 30 h boyunca karıştırılmıştır. mPEG-peptit türevleri, DEE üzerine çöktürme yöntemiyle izole edilmiştir (Verim = %76). Son aşamada, doksorubisin Şekil 1'de verilen Schiff bazı oluşumuyla mPEG-peptit konjugatının aldehit grubuna konjuge edilmiştir. Yaklaşık 9 mg (0,0025 mmol) mPEG-peptit-COH ve 2,5 mg (0,004 mmol) DOX.HCl, 1 mL DMSO içerisinde çözüldükten sonra 22 μL TEA eklenmiş ve mPEG-oksim-DOX konjugatının sentezinde kullanılan yöntem takip edilmiştir. Verim = %72; % DOX içeriği = %77.

2.3. Karakterizasyon (Characterization)

FTIR analizleri, Shimadzu IR Prestige-21 FTIR-8400S model spektrofotometrede, KBr pellet tekniği kullanılarak



Şekil 1. mPEG-peptit-oksim-DOX sentezinin reaksiyon şeması (Reaction scheme of the synthesis of the mPEG-peptide-oxime-DOX)

yapılmıştır. ^1H NMR spektrumları, Varian Vnmr 400 model cihaz kullanılarak alınmış ve veriler, ACDLAB 12, 1D NMR Processor yazılımı yardımıyla analiz edilmiştir. Peptidin ve mPEG-peptit konjugatının molar kütlelerini belirlemek için matris ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF) kullanılmıştır. Bu analizler Gebze Teknik Üniversitesi Kütle Analiz Laboratuvarı ve İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyolojik Kütle Spektrometresi ve Proteomik Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. İlaç taşıyıcı sistemlerinin DOX içerikleri önceki çalışmamızda kullanılan yöntem ile belirlenmiştir [27]. Örneklerin DOX salım profilleri, diyaliz metodu kullanılarak elde edilmiştir. Deiyonize su içerisinde 2 mg/mL derişiminde hazırlanan örnekler, pH 5,0'te 20 mM asetik asit ve 300 mM NaCl içeren 2 × asetat tampon veya pH 7,4'te 20 mM fosfat ve 300 mM NaCl içeren 2 × fosfat tampon (2 × PBS) ile iki kat seyreltikten sonra 0,5 ml alınıp molekül ağırlığı ayırma sınırı (MWCO) 3,5 kDa olan diyaliz membranının içine transfer edilmiştir. Membran, 12,5 mL tampon çözelti (pH 5,0'te 1 × acetate tamponu veya pH 7,4'te 1 × fosfat tamponu) içeren cam şişenin içine yerleştirilmiştir. Çözeltiler, 37°C ve 150 rpm'de çalkalanarak inkübe edilmiş ve belirli zaman aralıklarında (1 h, 2 h, 3 h, 6 h, 24 h, 30 h, 48 h, 54 h), 105 µL örnek alınarak yerine eşit hacimde tampon çözeltisi eklenmiştir. Her salım profili için iki bağımsız deney gerçekleştirilmiştir. Ortama salınan DOX'ın zamana bağlı derişim değerleri, floresans spektroskopisi yöntemiyle belirlenmiştir. Floresans emisyon şiddeti ölçümleri VarioScan Flash Multimode Reader (Thermo Scientific) model mikroparka üzerinde 590 nm'de

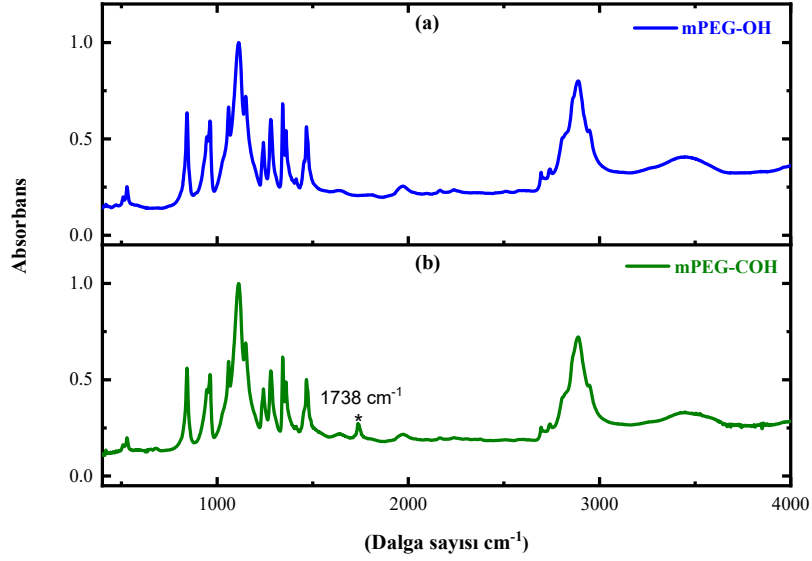
gerçekleştirilmiştir. Eksitasyon dalga boyu 480 nm'ye ayarlanmıştır.

mPEG-oksim-DOX ve mPEG-peptit-oksim-DOX konjugatlarının boyut dağılımları Malvern ZetaSizer Nano ZS model cihaz kullanılarak belirlenmiştir. Örneklerin her biri, derişimi 2 mg/mL olacak şekilde deiyonize su içinde çözülmüş ve pH 5,0'te 2 × asetat tamponu veya pH 7,4'te 2 × PBS ile iki kat seyreltilmiştir. 0,2 µm gözenek boyutunda şırınga filtresi ile filtrelenen örneklerin korelasyon fonksiyonları hazırlandıktan hemen sonra ve 37°C'de bir gün boyunca inkübe edildikten sonra elde edilmiştir. Örneklerin zamana bağlı boyut dağılımları CONTIN yöntemine göre belirlenmiş, D10, D50 ve D90 değerleri üç ölçümün ortalaması alınarak hesaplanmıştır.

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA (RESULTS AND DISCUSSION)

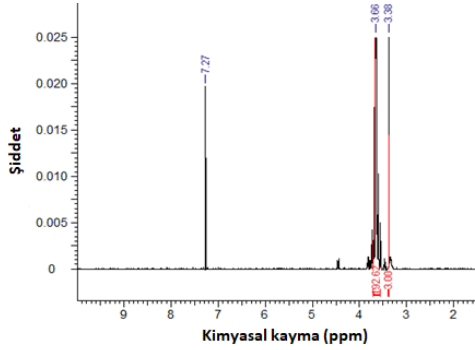
3.1. mPEG Türevlerinin Yapısal Karakterizasyonu (Structural Characterization of the mPEG Derivatives)

Aldehit ve karboksilik asit fonksiyonel grubuna sahip mPEG türevleri (mPEG-COH ve mPEG-COOH) sırasıyla mPEG-oksim-DOX ve mPEG-peptit sentezinde kullanılmıştır. Her iki fonksiyonel mPEG türevinin hazırlanmasında mPEG-OH kullanılmıştır. mPEG-OH ve mPEG-COH örneklerinin FTIR spektrumları Şekil 2'de gösterilmiştir. Aldehit fonksiyonel grubunun oluşumu 1738 cm^{-1} dalga sayısında gözlenen karbonil gerilme bandıyla teyit edilmiştir.

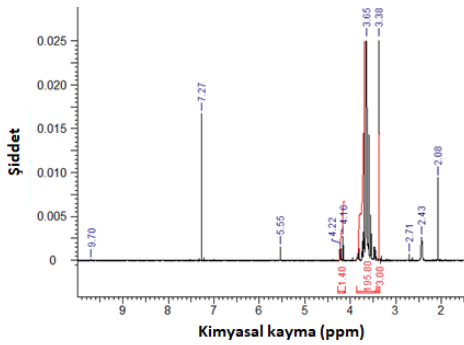


Şekil 2. (a) mPEG-OH ve (b) mPEG-COH örneklerinin FTIR spektrumları (FTIR spectra of the (a) mPEG-OH and (b) mPEG-COH samples)

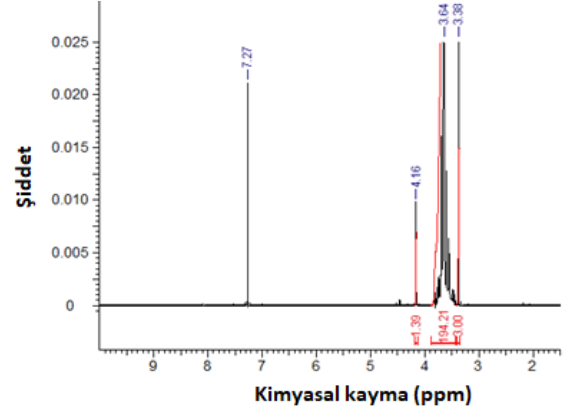
¹H NMR analizi, mPEG türevlerinin molar kütlelerinin ve fonksiyonel grup yüzdelerinin belirlenmesinde kullanılmıştır. mPEG-OH, mPEG-COH ve mPEG-COOH örneklerinin ¹H NMR spektrumları sırasıyla Şekil 3, 4 ve 5'te verilmiştir. Bütün örneklerde 3,65 ppm ve 3,38 ppm civarında görülen pikler, sırasıyla polietilen oksidin



Şekil 3. mPEG-OH örneğinin ¹H NMR spektrumu (¹H NMR spectrum of the mPEG-OH sample)



Şekil 4. mPEG-COH örneğinin ¹H NMR spektrumu (¹H NMR spectrum of the mPEG-COH sample)



Şekil 5. mPEG-COOH örneğinin ¹H NMR spektrumu (¹H NMR spectrum of the mPEG-COOH sample)

omurga protonları ($[CH_2CH_2O]_n$) ve uç grubundaki metoksi protonlarına ($-OCH_3$) karşılık gelmektedir. Bu iki pikin alanlarının karşılaştırılmasıyla mPEG-OH, mPEG-COH ve mPEG-COOH örneklerinin molar kütleleri sırasıyla 2120 Da, 2156 Da ve 2191 Da olarak elde edilmiştir. mPEG-COH örneğinin NMR spectrumunda 4,16 ppm civarında gözlenen pik, aldehit grubunun yanındaki karbona bağlı 2 protonun (CH_2CHO) kimyasal kayması dolayısıyladır. Bu pikin alanının metoksi protonlarının pikinin alanına oranı kullanılarak örneğin aldehit fonksiyonel grup miktarı %70 olarak belirlenmiştir. Aldehit protonunun çözücüdeki döteryum ile hızlı bir şekilde değişmesi sonucu 9,70 ppm'deki aldehit protonuna ait kimyasal kaymanın şiddeti oldukça düşük olarak gözlenmiştir. mPEG-COOH örneğinin karboksilik asit fonksiyonel grubunun yüzdesini belirlemek için karboksilik asit grubuna komşu karbona bağlı protonlara (CH_2COOH) ait 4,16 ppm civarında gözlenen pikin alanı metoksi protonlarının kimyasal kaymasının alanına

oranlanmıştır. Karboksilik asit fonksiyonel grubu miktarı %70 olarak bulunmuştur. mPEG-COOH örneğinin FTIR spectrumu Şekil 6a'da verilmiş ve karboksilik asit fonksiyonel grubu, 1749 cm^{-1} dalga sayısında gözlenen karbonil gerilme bandının oluşumuyla da teyit edilmiştir.

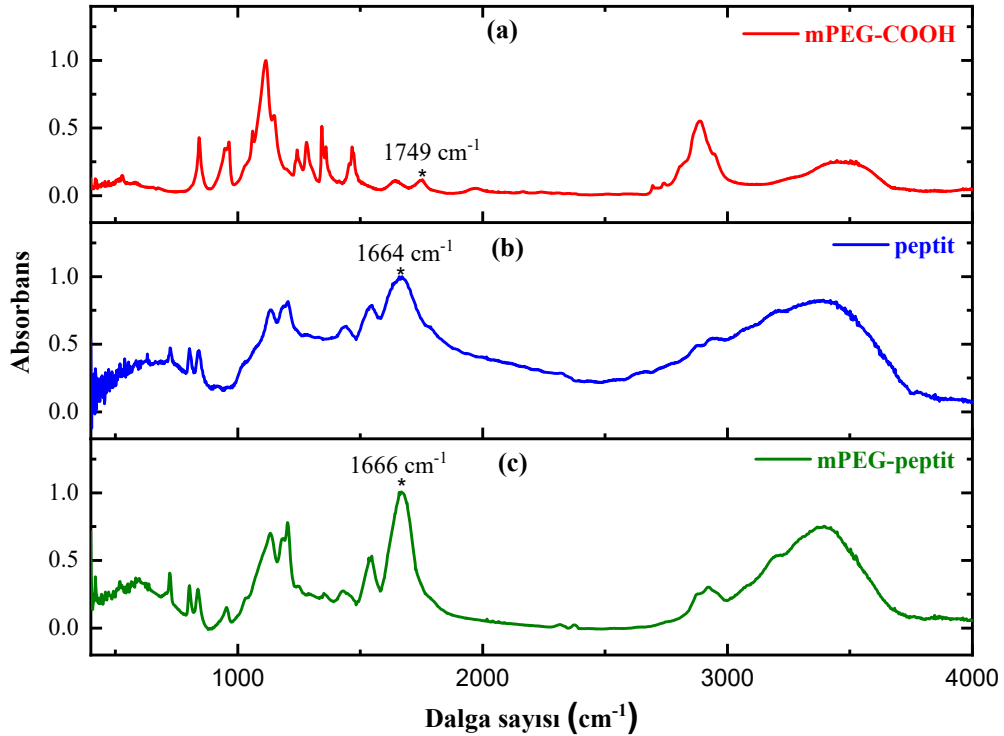
3.2. TAT Türevi Peptidin ve mPEG-Peptit Konjugatının Karakterizasyonu

(Characterization of the TAT-Derived Peptide and the mPEG-Peptide Conjugate)

Bu çalışmada kullanılan $G_2RQR_3QR_3G_2S$ dizinine sahip peptidin tasarımında, endozom parçalayıcı özelliğe sahip TAT peptidinin 48. ve 57. amino asitleri arasındaki GRKKRRQRRR dizininin esinlenilmiştir. Geliştirilen bu peptidin C-terminalindeki serin, doksorubisin konjugasyonunu sağlamak için kullanılmıştır. Serin amino asidi, yapısındaki hidroksil grubunun aldehite dönüştürüldükten sonra doksorubisindeki amin grubuyla reaksiyonu sonucunda asidik ortamda bozunur oksim bağı elde etmek için dizine eklenmiştir. N-terminalinde yer alan ve C-terminalinde serinden önce gelen glisinler, PEG ve DOX konjugasyonu sırasındaki sterik engellemeleri azaltmak amacıyla tercih edilmiştir. TAT peptidinin orijinal dizinindeki KK grubundaki amin grupları DOX konjugasyon reaksiyonuna müdahil olabileceği için bu iki lizin, benzer bazik özelliklerde fakat aldehit grubuyla reaksiyona girmeyen RQ amino asitleriyle değiştirilmiş ve PEPFOLD3 yazılımıyla bu değişikliğin peptidin sarmal ikincil yapısını bozmadığı teyit edilmiştir [28]. Peptidin PEG konjugasyonu

katı fazda, yani reçine üzerinde gerçekleştirilmiştir. Peptidin ve mPEG-peptit konjugatının ikincil yapısını belirlemek ve saflıklarını doğrulamak için sırasıyla FTIR ve MALDI-TOF-MS analizleri uygulanmıştır. mPEG-COOH, peptit ve mPEG-peptit konjugatının FTIR spektrumları Şekil 6'da verilmiştir. mPEG-peptidin FTIR spektrumunda hem karakteristik PEG titreşimleri hem de peptidin amid bantları açıkça görülmektedir. Peptit ve mPEG-peptit için amid I bandı sırasıyla 1664 cm^{-1} ve 1666 cm^{-1} dalga sayılarında gözlenmiştir. Bu değerler hem peptit hem de konjugatın sarmal, temel olarak ise 3-10 heliks ikincil yapıya sahip olduğunu işaret etmektedir [29]. Dolayısıyla, peptit dizinindeki KK amino asitleri RQ ile değiştirilse de teorik olarak tahmin edildiği gibi sarmal yapının korunduğu deneysel olarak gösterilmiştir. Ayrıca, literatürdeki diğer çalışmalarda da gözlemlendiği üzere, N-terminal PEG konjugasyonunun peptit ve polipeptitlerin temel ikincil yapısını çok değiştirmedeği sonucuna varılmıştır [30, 31].

Peptit ve mPEG-peptit konjugatının MALDI-TOF kütle spektrumları sırasıyla Şekil 7a ve Şekil 7b'de verilmiştir. Peptidin kütle spektrumunda, monoisotopik kütle piki, $(M+H)^+$, $1682,3\text{ Da}$ 'da ve teorik $(M+H)^+$ değerine ($M = 1680,9\text{ Da}$) çok yakın olarak gözlenmiştir. Bu sonuç, peptidin başarılı bir şekilde sentezlendiğini göstermektedir. mPEG-peptit konjugatının spektrumunda ise $(M+H)^+$ piki, PEG'in polidispersitesi nedeniyle merkezi 3543 Da civarında geniş bir pik olarak elde edilmiştir. Bu değer mPEG-peptidin teorik molar külesine ($3582\text{ Da} = 1682\text{ Da} + 1900\text{ Da}$) oldukça yakındır. Konjugatın spektrumunda



Şekil 6. (a) mPEG-COOH, (b) peptit ve (c) mPEG-peptit örneklerinin FTIR spektrumları
(FTIR spectra of the (a) mPEG-COOH, (b) peptide and (c) mPEG-peptide)

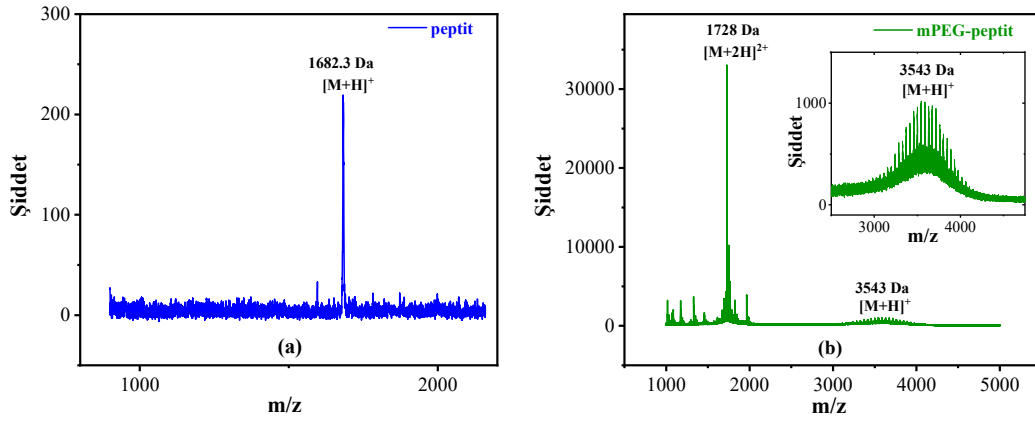
1682 Da m/z değerinde peptide ait pik gözlenmemiştir. Merkezi 1728 Da civarında gözlenen pikler konjugatın $(M+2H)^{2+}$ değerlerine karşılık gelmektedir. Dolayısıyla, mPEG ve peptit konjugasyonu yüksek bir verimle gerçekleştirilmiştir.

3.3. DOX Konjuge Edilmiş İlaç Taşıyıcı Sistemlerinin Karakterizasyonu (Characterization of the DOX-Conjugated Drug Delivery Systems)

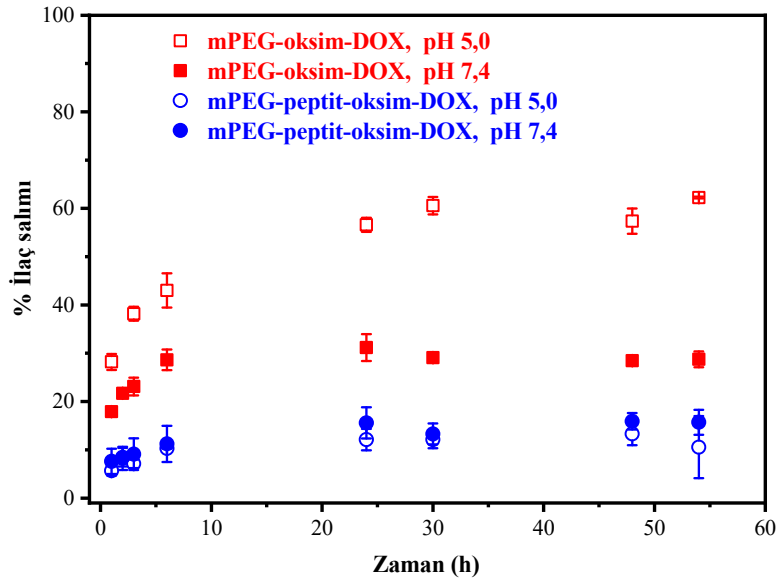
mPEG-oksim-DOX ve mPEG-peptit-oksim-DOX'in, pH 5,0 ve pH 7,4'te DOX salım profilleri Şekil 8'de verilmiştir. mPEG-oksim-DOX'in maksimum % DOX salım değerleri pH 5,0 ve pH 7,4 için sırasıyla $62,3 \pm 0,2$ ve $28,7 \pm 1,6$ olarak elde edilmiştir. Bu sonuç ilacın asit parçalanabilir oksim bağı ile kontrol edilen pH programlanmış salımını göstermektedir. Zhang ve arkadaşları (2016) tarafından geliştirilen mPEG2000-oksim-DOX sistemi için de benzer

ilaç salım profili elde edilmiştir [32]. Grubumuz tarafından geliştirilen bir başka asit parçalanabilir bağ olan hidrazon bağı içeren mPEG5000-DOX sistemi ise pH 5,0'te bu çalışmada sentezlediğimiz mPEG-oksim-DOX sistemine göre daha düşük % DOX salımı sergilemiştir [33]. Bu fark, bağların stabilitesindeki ve/veya mPEG moleküllerinin zincir uzunluğundaki farklarla açıklanabilir.

Öte yandan, mPEG-peptit-oksim-DOX, pH'tan bağımsız olarak oldukça düşük (~ 15) DOX salımı gerçekleştirmiştir. Bu sonuç, mPEG-oksim-DOX sistemiyle doğrulanmış oksim bağının asitle parçalanabilme özelliği dikkate alındığında, salınan DOX'in peptitle fiziksel etkileşimleri (kation- π etkileşimleri ve/veya hidrojen bağı) dolayısıyla taşıyıcı sistemde kalıp membrandan geçememesi şeklinde açıklanabilir. Nitekim son zamanlarda yapılan bir çalışmada DOX'in insan serum albümininin içeriğindeki arjininle hidrojen bağı oluşturabileceği gösterilmiştir [34]. Bu



Şekil 7. (a) Peptit ve (b) mPEG-peptit örneklerinin MALDI-TOF-MS sonuçları
(MALDI-TOF-MS results of the (a) peptide and (b) mPEG-peptide samples)

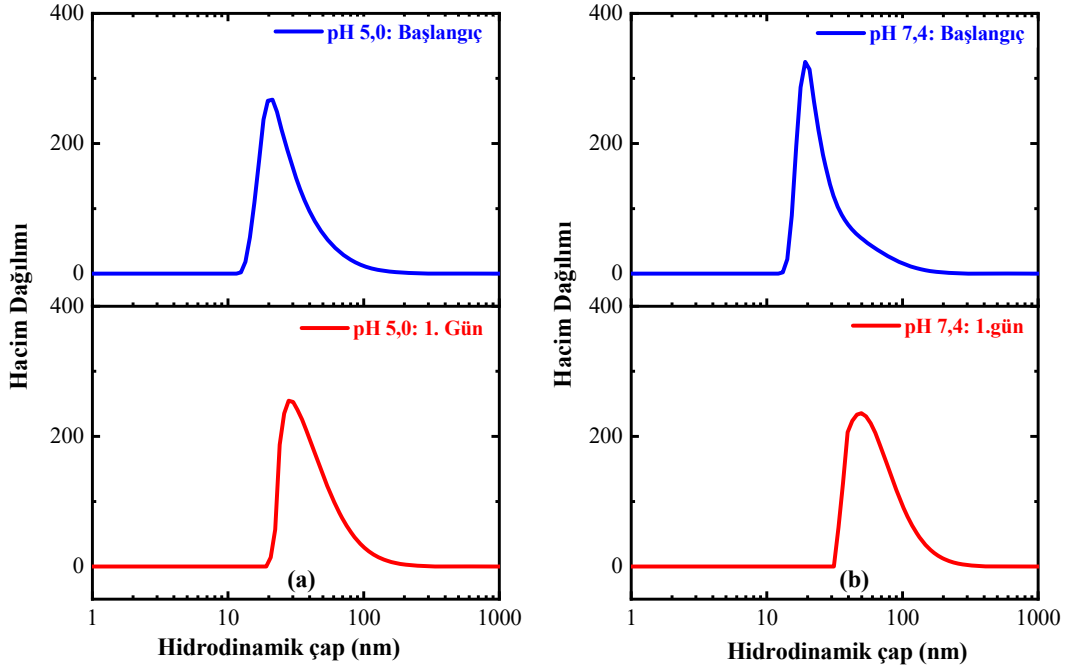


Şekil 8. pH 7,4 ve pH 5,0'te mPEG-oksim-DOX ve mPEG-peptit-oksim-DOX'in DOX salım eğrileri
(DOX release curves of the mPEG-oxime-DOX and mPEG-peptide-oxime-DOX obtained at pH 7.4 and pH 5.0)

hipotezi doğrulamak için, ilaç salımı HPLC sistemi kullanılarak izlenmelidir. pH 5,0 ve pH 7,4'te mPEG-oksim-DOX ve mPEG-peptit-oksim-DOX'in zamana bağlı boyut dağılımları, ilaç taşıyıcı sistemlerinin tampon çözeltide çözüldükten hemen sonra ve 37°C'de 24 h süreyle inkübe edilmesinin ardından belirlenmiştir. mPEG-oksim-DOX için pH 5,0 ve pH 7,4'de elde edilen sonuçlar sırasıyla Şekil 9a ve Şekil 9b'de verilmiştir. D10, D50 ve D90 değerleri Tablo 1'de özetlenmiştir. pH 7,4 ve pH 5,0'te mPEG-oksim-DOX'in başlangıçtaki D50 değerleri (medyan boyutu) sırasıyla 23 ± 2 nm ve 24 ± 4 nm olarak elde edilmiştir. Molar kütlesi 1900 Da olan PEG'nin yaklaşık 2,6 nm olarak hesaplanan hidrodinamik çapı dikkate alındığında, ölçülen boyut değerleri, mPEG zincirine DOX konjugasyonunun kendiliğinden düzenlenmeyi tetiklediğini göstermiştir. Grubumuzda daha önce geliştirilen mPEG5000-hidrazon-DOX ve mPEG5000-amid-DOX sistemlerinin ortalama boyut değerleri sırasıyla 8 ± 1 nm ve 17 ± 2 nm olarak elde edilmiştir [27, 33]. Bu çalışmada sentezlenen mPEG-oksim-DOX'in daha büyük boyut değerleri daha kısa mPEG zincirine sahip olmasına bağlanabilir. Zhang ve arkadaşları (2016) tarafından geliştirilen mPEG2000-oksim-DOX'in ortalama boyutu bu çalışmada hazırlanan mPEG1900-oksim-DOX'in boyutundan çok daha yüksek, yaklaşık 160 nm olarak ölçülmüştür [32]. Bu boyut farkının, örneklerin

derişimlerindeki ve örnek hazırlama yöntemleri arasındaki farklar dolayısıyla olduğu öngörülmektedir.

Bir gün boyunca, 37°C'de inkübasyonun ardından, mPEG-oksim-DOX'in medyan boyut değerleri pH 5,0 ve pH 7,4'te sırasıyla 36 ± 2 nm ve 57 ± 4 nm'ye yükselmiştir. Bu sonuçlar, kendiliğinden düzenlenen yapıların yüksek sıcaklıkta (37°C) moleküler hareketliliğinin artmasıyla zincir değişimi yoluyla birbiriyle etkileşime girerek daha büyük yapılar oluşturmasıyla açıklanabilir. Diğer yandan, mPEG5000-hidrazon-DOX ve mPEG5000-amid-DOX'in başlangıçta oluşan kümelenmiş yapılarının boyutları fizyolojik koşullarda 24 h inkübasyondan sonra önemli ölçüde değişmemiştir [27, 33]. Bu çalışmaların sonuçları karşılaştırıldığında, kararlı doksorubisin taşıyıcı sistemi elde etmek için 1900 Da molar kütleyle sahip mPEG zincirinin yeterli olmadığı ve daha yüksek molar kütleyle sahip mPEG zincirinin gerekli olduğu öngörülmüştür. pH 7,4 ve pH 5,0'te ölçülen peptit içeren mPEG-peptit-oksim-DOX sisteminin, boyut dağılımları Şekil 10'da verilmiştir. D10, D50 ve D90 değerleri Tablo 2'de özetlenmiştir. Hazırlanan örneklerin medyan büyüklükleri, pH 5,0 ve pH 7,4 için sırasıyla $3 \pm 0,4$ nm ve 6 ± 1 nm olarak elde edilmiştir. pH 5,0'te elde edilen boyut değeri, PEG1900'ün hidrodinamik çap değerine çok yakın olarak elde edilmiştir. Bununla birlikte, pH 7,4'te



Şekil 9. (a) pH 5,0 ve (b) pH 7,4'te mPEG-oksim-DOX'in boyut dağılımları
(Size distributions of the mPEG-oxime-DOX at (a) pH 5.0 and (b) pH 7.4)

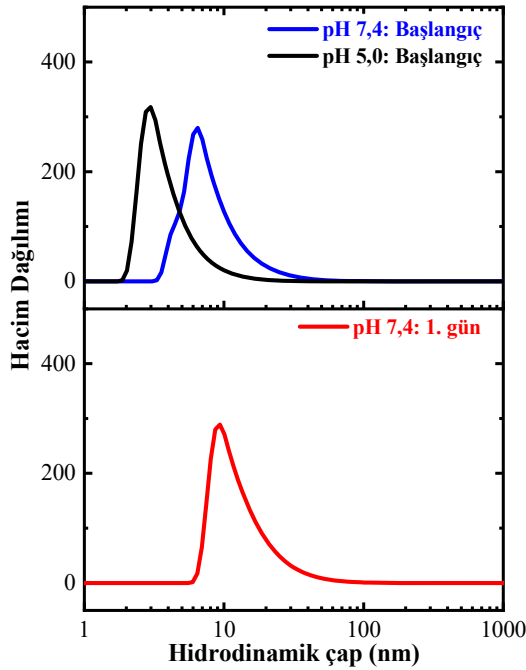
Tablo 1. mPEG-oksim-DOX'in D10, D50 ve D90 değerleri (D10, D50 and D90 values of the mPEG-oxime-DOX)

	mPEG-oksim-DOX, pH 5,0		mPEG-oksim-DOX, pH 7,4	
	Başlangıç	1. gün	Başlangıç	1. gün
D10 (nm)	17 ± 2	24 ± 1	16 ± 1	38 ± 3
D50 (nm)	24 ± 4	36 ± 2	23 ± 2	57 ± 4
D90 (nm)	50 ± 7	71 ± 4	53 ± 4	108 ± 7

Tablo 2. mPEG-peptit-oksim-DOX'in D10, D50 ve D90 değerleri
(D10, D50 and D90 values of the mPEG-peptide-oxime-DOX)

	mPEG-peptit-oksim-DOX, pH 5,0		mPEG-peptit-oksim-DOX, pH 7,4	
	Başlangıç	1. gün	Başlangıç	1. gün
D10 (nm)	2 ± 0,3	NA	5 ± 0,5	8 ± 0,5
D50 (nm)	3 ± 0,4	NA	6 ± 1	11 ± 1
D90 (nm)	6 ± 1	NA	13 ± 1	22 ± 2

boyut değerlerinin iki katına çıkması, mPEG-peptit-oksim-DOX'in kümelenme eğiliminde olduğunu göstermektedir. Bu boyut değerleri, mPEG-oksim-DOX sisteminin boyutlarıyla karşılaştırıldığında oldukça düşüktür. Bu fark, peptit içeren taşıyıcı sistemi içeriğindeki pozitif yüklü arjininler arasındaki itme kuvvetleri dolayısıyladır. pH değerine bağlı olarak mPEG-peptit-oksim-DOX'in kümelenme durumundaki değişim ise, DOX'in iyonlaşma durumu ile açıklanabilir. Doksorubisinin amin ($-NH_2$) ve fenol ($Ar-OH$) grupları için sırasıyla 7,84 ve 10,04'te iki pKa değerine sahip olduğu belirtilmiştir [35]. Bu değerlere göre, pH arttıkça doksorubisinin daunosamin grubunun deprotonasyonu artmaktadır. Bir başka deyişle, pozitif yüklü daunosamin popülasyonu azalmaktadır. Dolayısıyla, DOX molekülleri arasındaki itme kuvvetlerinin nötral pH değerinde azalması mPEG-peptit-oksim-DOX'in pH 7,4'te gözlenen kendiliğinden düzenlenme eğilimine katkıda bulunmaktadır.

**Şekil 10.** mPEG-peptit-oksim-DOX'in boyut dağılımı
(Size distribution of the mPEG-peptide-oxime-DOX)

Öte yandan, pH 5,0'te ise pozitif yüklü arjininlere pozitif yüklü daunosamin gruplarının eklenmesiyle artan itme kuvvetleri, kümelenmiş yapıların oluşumunu azaltmaktadır. Her ne kadar oksim bağının pH hassasiyeti diyaliz metodu

kullanılarak algılanamasa da mPEG-peptit-oksim-DOX sisteminin daunosamin grubunun yüküyle kontrol edilen pH hassasiyetine sahip olduğunun gösterilmesi de bu çalışmanın bir diğer önemli bulgusudur. 37°C'de 1 gün inkübasyon sonunda mPEG-peptit-oksim-DOX örneğinin pH 7,4 tampon çözeltisinde ölçülen boyutu tıpkı mPEG-oksim-DOX örneğinde gözlemlendiği gibi artma eğilimi göstermiştir. pH 5,0'te ise ölçüm alınmamıştır.

4. SONUÇLAR (CONCLUSIONS)

Bu çalışmada, mPEG-peptit-oksim-DOX konjugatı bazlı ilaç taşıyıcı sistemi sentezlenmiş, kendiliğinden düzenlenme, ilaç salım ve stabilite özellikleri mPEG-oksim-DOX olarak adlandırılan peptit içermeyen kontrol ilaç taşıyıcı sisteminin özellikleriyle karşılaştırılmıştır. DOX, asit parçalanabilir oksim bağı ile her iki ilaç taşıyıcı moleküle bağlanmıştır. Peptit sentezi ve peptidin PEG konjugasyonu reçine üzerinde gerçekleştirilmiştir. Peptidin ve PEG-peptit konjugatının saflıkları MALDI-MS ile doğrulanmıştır. İlaç taşıyıcı sistemlerinin DOX salım profilleri, pH 5,0 ve pH 7,4'te elde edilmiştir. mPEG-oksim-DOX, asidik pH'ta oksim bağının bozulması nedeniyle nötral şartlara göre daha fazla miktarda DOX salımı yaparak pH duyarlılığı göstermiştir. Öte yandan, mPEG-peptit-oksim-DOX'in pH'tan bağımsız olarak az miktarda DOX salımı yapması, DOX'in taşıyıcı sistemdeki peptit ile olası etkileşimlerinden dolayı diyaliz membranından ortama geçememesine bağlanmıştır. mPEG-oksim-DOX'in boyut dağılımı sonuçları kendiliğinden düzenlenen yapıların oluştuğunu göstermektedir. Hem pH 5,0 hem de pH 7,4 değerinde, mPEG-peptit-oksim-DOX konjugatı için mPEG-oksim-DOX sistemine göre daha düşük boyutlar elde edilmiştir ve peptit dizisinde bulunan arjininler arasındaki itme kuvvetleriyle açıklanmıştır. Bununla birlikte, pH 5,0 ve pH 7,4'te alınan boyut verileri, mPEG-peptit-oksim-DOX konjugatının içeriğindeki doksorubisine ait daunosamin grubunun iyonizasyonu ile kontrol edilebilen pH'ya duyarlı bir taşıyıcı sistemi olduğunu işaret etmektedir. Fizyolojik şartlarda bir günlük inkübasyon sonunda, her iki ilaç taşıyıcı sisteminin boyutlarında artma eğilimi gözlenmiştir. Grubumuzda geliştirilen benzer kendiliğinden düzenlenen kararlı mPEG-DOX konjugatları ile karşılaştırılınca, fizyolojik koşullarda ilaç taşıyıcı sistemlerinin stabilitesini sağlamak için konjugasyonda kullanılan mPEG molekülünün 1900 Da'dan daha yüksek molar kütleyle sahip olması gerektiği sonucuna varılmıştır. Bundan sonraki çalışmalarda, peptide hidrofobik aminoasitler eklenip ilaç taşıyıcı sisteminin kümelenme eğilimi artırılacak ve daha uzun mPEG zincirleri kullanılacaktır. Ayrıca, yapısındaki pozitif yüklü arjininler

sayesinde mPEG-peptit-oksim-DOX'in nükleik asit taşıyıcı sistemi olarak kullanılması da mümkündür.

TEŞEKKÜR (ACKNOWLEDGEMENT)

Bu proje kısmen İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP Proje Numarası = 2017İYTE53) tarafından desteklenmiştir. MALDI-TOF kütle spektroskopisi analizini gerçekleştirdiği için Prof. Dr. Talat YALÇIN'a teşekkür ederiz. Ayrıca, DLS ve UV-Vis spektroskopisi deneyleri için İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR (REFERENCES)

1. Brigger I., Dubernet C., Couvreur P., Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 64, 24-36, 2012.
2. Yin Q., Shen J., Zhang Z., Yu H., Li Y., Reversal of multidrug resistance by stimuli-responsive drug delivery systems for therapy of tumor, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 65 (13-14), 1699-1715, 2013.
3. Sun T., Zhang Y.S., Pang B., Hyun D.C., Yang M., Xia Y., Engineered nanoparticles for drug delivery in cancer therapy, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 53 (46), 12320-12364, 2014.
4. Daglioglu C., Enhancing tumor cell response to multidrug resistance with pH-sensitive quercetin and doxorubicin conjugated multifunctional nanoparticles, *Colloids Surf., B*, 156, 175-185, 2017.
5. Mihanfar A., Aghazadeh Attari J., Mohebbi I., Majidinia M., Kaviani M., Yousefi M., Yousefi B., Ovarian cancer stem cell: A potential therapeutic target for overcoming multidrug resistance, *J. Cell. Physiol.*, 234 (4), 3238-3253, 2019.
6. Han M., Diao Y.Y., Jiang H.L., Ying X.Y., Chen D.W., Liang W.Q., Gao J.Q., Molecular mechanism study of chemosensitization of doxorubicin-resistant human myelogenous leukemia cells induced by a composite polymer micelle, *Int. J. Pharm.*, 420 (2), 404-411, 2011.
7. Zhou M., Zhang X., Xie J., Qi R., Lu H., Loporatti S., Chen J., Hu Y., pH-sensitive poly(β -amino ester)s nanocarriers facilitate the inhibition of drug resistance in breast cancer cells, *Nanomaterials*, 8 (11), 952, 2018.
8. Schmaljohann D., Thermo-and pH-responsive polymers in drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 58 (15), 1655-1670, 2006.
9. Mura S., Nicolas J., Couvreur P., Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery, *Nat. Mater.*, 12 (11), 991, 2013.
10. Kanamala M., Wilson W.R., Yang M., Palmer B.D., Wu Z., Mechanisms and biomaterials in pH-responsive tumour targeted drug delivery: A review, *Biomaterials*, 85, 152-167, 2016.
11. Liu J., Huang Y., Kumar A., Tan A., Jin S., Mozhi A., Liang X. J., pH-sensitive nano-systems for drug delivery in cancer therapy, *Biotechnol. Adv.*, 32 (4), 693-710, 2014.
12. Liu Y., Wang W., Yang J., Zhou C., Sun J., pH-sensitive polymeric micelles triggered drug release for extracellular and intracellular drug targeting delivery, *Asian J. Pharm. Sci.*, 8 (3), 159-167, 2013.
13. Tang H., Zhao W., Yu J., Li Y., Zhao C., Recent development of pH-responsive polymers for cancer nanomedicine, *Molecules*, 24 (1), 4, 2019.
14. Qiu L., Qiao M., Chen Q., Tian C., Long M., Wang M., Li Z., Hu W., Li G., Cheng L., Enhanced effect of pH-sensitive mixed copolymer micelles for overcoming multidrug resistance of doxorubicin, *Biomaterials*, 35 (37), 9877-9887, 2014.
15. Shi Q., Zhang L., Liu M., Zhang X., Zhang X., Xu X., Chen S., Li X., Zhang J., Reversion of multidrug resistance by a pH-responsive cyclodextrin-derived nanomedicine in drug resistant cancer cells, *Biomaterials*, 67, 169-182, 2015.
16. Zhang J., Zhao X., Chen Q., Yin X., Xin X., Li K., Qiao M., Hu H., Chen D., Zhao X., Systematic evaluation of multifunctional paclitaxel-loaded polymeric mixed micelles as a potential anticancer remedy to overcome multidrug resistance, *Acta Biomater.*, 50, 381-395, 2017.
17. Dominska M., Dykxhoorn D.M., Breaking down the barriers: siRNA delivery and endosome escape, *J. Cell Sci.*, 123 (8), 1183-1189, 2010.
18. Degors I.M., Wang C., Rehman Z.U., Zuhorn I.S., Carriers break barriers in drug delivery: Endocytosis and endosomal escape of gene delivery vectors, *Acc. Chem. Res.*, 2019.
19. Ni R., Feng R., Chau Y., Synthetic approaches for nucleic acid delivery: Choosing the right carriers, *Life*, 9 (3), 59, 2019.
20. Li Z., Wang M., Xie M., Shen H., Shen S., Wang X., Guo X., Yao M., Jin Y., The role of endosome evasion bypass in the reversal of multidrug resistance by lipid/nanoparticle assemblies, *J. Mater. Chem. B*, 1 (10), 1466-1474, 2013.
21. Liang J.F., Yang V.C., Synthesis of doxorubicin-peptide conjugate with multidrug resistant tumor cell killing activity, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 15 (22), 5071-5075, 2005.
22. Şen-Çağlar G.P., Yalçın S., Gündüz U., Synthesis and cytotoxicity of a TAT peptide-doxorubicin conjugate for breast cancer treatment, *J. Drug Des. Res.*, 2 (1), 1007, 2015.
23. Böhmová E., Machova D., Pechar M., Pola R., Venclíková K., Janoušková O., Etrych T., Cell-penetrating peptides: A useful tool for the delivery of various cargoes into cells, *Physiol. Res.*, 67, S267-S279, 2018.
24. Top A., Zhong S., Yan C., Roberts C.J., Pochan D.J., Kiick K.L., Controlling assembly of helical polypeptides via PEGylation strategies, *Soft Matter*, 7 (20), 9758-9766, 2011.
25. Lin Y.S., Hlady V., Gölander C.G., The surface density gradient of grafted poly (ethylene glycol): Preparation, characterization and protein adsorption, *Colloids Surf., B*, 3 (1-2), 49-62, 1994.

26. Lele B., Kulkarni M., Single step room temperature oxidation of poly (ethylene glycol) to poly (oxyethylene)-dicarboxylic acid, *J. Appl. Polym. Sci.*, 70 (5), 883-890, 1998.
27. Şentürk N., Top A., PEG-peptide conjugate containing cathepsin B degradation unit as a doxorubicin carrier system, *Turk. J. Chem.*, 42 (2), 385-400, 2018.
28. Lamiable A., Thévenet P., Rey J., Vavrusa M., Derreumaux P., Tufféry P., PEP-FOLD3: Faster de novo structure prediction for linear peptides in solution and in complex, *Nucleic Acids Res.*, 44 (W1), W449-W454, 2016.
29. Kong J., Yu S., Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures, *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 39 (8), 549-559, 2007.
30. Bhagwat N., Kiick K.L., Polymer-peptide templates for controlling electronic interactions of organic chromophores, *J. Mater. Chem. C*, 1 (32), 4836-4845, 2013.
31. Top A., Roberts C.J., Kiick K.L., Conformational and aggregation properties of a PEGylated alanine-rich polypeptide, *Biomacromolecules*, 12 (6), 2184-2192, 2011.
32. Zhang Y., Yang C., Wang W., Liu J., Liu Q., Huang F., Chu L., Gao H., Li C., Kong D., Co-delivery of doxorubicin and curcumin by pH-sensitive prodrug nanoparticle for combination therapy of cancer, *Sci. Rep.*, 6, 21225, 2016.
33. Balcı B., Top A., PEG and PEG-peptide based doxorubicin delivery systems containing hydrazone bond, *J. Polym. Res.*, 25 (4), 104, 2018.
34. Shalbfan M., Rezaei Behbehani G., Ghasemzadeh H., Study of interaction of human serum albumin with doxorubicin (anti-cancer drug) by docking simulation, *Chem. Methodol.*, 3 (3, pp. 276-391), 348-353, 2019.
35. Sanli S., Altun Y., Guven G., Solvent effects on pKa values of some anticancer agents in acetonitrile-water binary mixtures, *J. Chem. Eng. Data*, 59 (12), 4015-4020, 2014.