



**İRGD PEPTİDİNİN *IN SITU* JEL FARMASÖTİK PREPERATTAN
ANALİZİ İÇİN KAPİLER ELEKTROFOREZ İLE YÖNTEM
GELİŞTİRİLMESİ VE VALİDASYONU**

Yüksek Lisans Tezi

Aslıhan KUBİLAY

Eskişehir 2022

**İRGD PEPTİDİNİN *IN SITU* JEL FARMASÖTİK PREPERATTAN
ANALİZİ İÇİN KAPİLER ELEKTROFORZ İLE YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ
VE VALİDASYONU**

Aslıhan KUBİLAY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Analitik Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Erol ŞENER

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Şubat 2022

ÖZET

iRGD PEPTİDİNİN *IN SITU* JEL FARMASÖTİK PREPERATTAN ANALİZİ İÇİN KAPİLER ELEKTROFORZ İLE YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ VE VALİDASYONU

Aslıhan KUBİLAY

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Şubat 2022

Danışman: Doç. Dr. Erol ŞENER

iRGD 9 aminoasitten oluşan siklik bir peptittir. Tümör hücrelerine penetrasyonundan dolayı antikanser formülasyon çalışmalarında yardımcı olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmada *in situ* jelleşen bir formülasyonda iRGD peptidinin gösterilmesi için yeni bir kapiler elektroforez yöntemi geliştirilmiştir. Çalışmada 50 cm efektif toplamda ise 58.5 cm uzunluğa, 75 µm iç hacme sahip bir kapiler kolon kullanılmıştır. Dedeksiyon foto diyot dizilimi (DAD) dedektör ile sağlanmış ve kapilerin sıcaklığı 20°C olarak ayarlanmıştır. Optimizasyon çalışmaları sonunda 20mM fosfat tamponu (pH 2.11) ve 23 kV potansiyel seçilmiştir. iRGD peptide uygun olması için iç standart denenmiş ve en uygun iç standardın olanzapin olduğuna karar verilmiştir. Analizler sonucunda; ortalama olanzapinin göç zamanı 5.82 dk, iRGD peptidinin göç zamanı ise 7.51 dk olarak bulunmuştur.

Yöntemin geçerliliğinin gösterilmesi için doğrusallık, doğruluk, kesinlik, duyarlılık, kararlılık ve sağlamlık testleri yapılmıştır. Doğrusallık analizleri sonucunda iRGD peptidinin 5.27×10^{-6} M ile 6.33×10^{-5} M arasında doğrusal olduğu gösterilmiştir. Kesinlik ve doğruluk parametreleri için geri kazanım yüzdesi ve %BSS değerleri hesaplanmıştır. Sisteme uygunluk parametreleri de gösterilmiştir.

Sonuç olarak da yöntem formülasyona uygulanmış ve formülasyonda iRGD peptidinin piki gösterilmiştir. Bu yöntem iRGD peptidinin analizi için geliştirilen ilk kapiler elektroforez yöntemidir.

Anahtar Sözcükler: iRGD peptidi, *In situ* jel formülasyon, Kapiler Elektroforez.

ABSTRACT

METHOD DEVELOPMENT BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS FOR ANALYSIS OF iRGD PEPTIDE FROM *IN SITU* GEL PHARMACEUTICAL PREPERATION AND VALIDATION

Aslıhan KUBİLAY

Department of Analytical Chemistry

Anadolu University, Institute of Health Sciences, February 2022

Supervisor: Assoc. Prof. Erol ŞENER

iRGD is a cyclic peptide consisting of 9 amino acids. It is used as an aid in anticancer formulation studies due to its penetration into tumor cells.

In this study, a new capillary electrophoresis method was developed to display the iRGD peptide in an *in situ* gelling formulation. In the study, a capillary column with an effective length of 50 cm and a total length of 58.5 cm and an inner diameter of 75 µm was used. Detection photodiode array (DAD) was provided with the detector and the capillary temperature was set to 20°C. At the end of the optimization studies, 20mM phosphate buffer (pH 2.11) and 23 kV potential. The internal standard was tested for iRGD peptide compatibility and olanzapine was determined as the most appropriate internal standard. As a results of analyzes; The mean migration time of olanzapine was 5.82 minutes, and the migration time of iRGD peptide was 7.51 minutes.

To demonstrate the validity of the method, linearity, accuracy, precision, stability and robustness tests were performed. As a result of linearity analysis, it was shown that the iRGD peptide is linear between 5.27×10^{-6} M and 6.33×10^{-5} M. Percentage of recovery and %BSS values were calculated for precision and accuracy parameters. Compatibility parameters to the system are also shown.

As a result, the method was applied to the formulation and the peak of the iRGD peptide was shown in the formulation. This method is the first capillary electrophoresis method developed for the analysis of iRGD peptide.

Keywords: iRGD peptide; In situ gel formulation; Capillary Electrophoresis.

TEŞEKKÜR

Bilime ve bilim dünyasında kadına verdiği değerden dolayı bugün bu yolda emin adımlarla yürüyebildiğim için, fikirleri ve düşünceleriyle her zaman bu yola ışık tuttuğu için Ulu Önder Gazi Mustafa Kemal ATATÜRK’e,

Yüksek lisans hayatım boyunca bilgi birikimi ve tecrübesi ile yanımda olan, ilgi ve sabırla bana yol gösteren ve katkı sağlayan sevgili Danışman Hocam Doç. Dr. Erol ŞENER’e,

Akademik deneyimini bana aktaran, her zaman manevi desteğiyle yanımda olan, motivasyonumu yüksek tutmamı sağlayan sevgili hocam Prof. Dr. Leyla YURTTAŞ’a,

Çalışmam boyunca karşılaştığım her sorunda sabırla ve ilgiyle bana yardımcı olan sevgili hocam Arş. Gör. Sakine ATİLA KARACA’ya,

Yüksek lisansa başladığım günden beri bana bütün bilgi ve birikimini aktaran arkadaşım Öğr. Gör. Asaf Evrim EVREN’e,

Bu süreçte yanımda olan ve bana destek olan bütün arkadaşlarıma,

Tezimde bulunan şekillerin düzenlemelerinde benden yardımını esirgemediği ve bana verdiği manevi desteği için Sinan KALDAN’a,

Her zaman maddi ve manevi desteğini arkamda hissettiğim, her koşulda yanımda olan, bana olan güveni ve inancının tam olduğuna inandığım sevgili aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
TEZ BAŞLIĞI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK BİLGİSİ	2
2.1. iRGD Peptidi	2
2.2. iRGD Peptidinin Özellikleri	3
2.3. iRGD ile Yapılan Analiz Çalışmaları	3
2.4. Kapiler Elektroforez	4
2.4.1 Kapiler elektroforez sistemi.....	5
3. GEREÇLER.....	7
3.1. Kullanılan Maddeler	7
3.2. Kullanılan Cihazlar	8
4. YÖNTEMLER	9
4.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması.....	9
4.2. Cihaz İle İlgili Koşullar	9
4.3. Optimizasyon Koşulları	9
4.3.1. Çalışma tamponu	10
4.3.2. Çalışma tamponundaki organik çözücü oranı	10

	<u>Sayfa</u>
4.3.3. Potansiyel.....	11
4.4. Yöntemin Validasyon	11
4.4.1. Doğrusallık	12
4.4.2. Kesinlik.....	12
4.4.3. Doğruluk.....	12
4.4.4. Duyarlılık.....	12
4.4.5. Kararlılık.....	12
4.4.6. Sağlamlık	12
4.5. Formülasyonun Hazırlanması	12
5. BULGULAR ve TARTIŞMALAR.....	14
5.1. KE Çalışmaları.....	14
5.1.1. Optimizasyon Çalışmaları.....	14
5.1.2. Sisteme Uygunluk Parametreleri.....	16
5.1.3. Validasyon Çalışmaları.....	16
5.1.3.1. Doğrusallık	16
5.1.3.2. Kesinlik ve Doğruluk	17
5.1.3.3. Duyarlılık.....	18
5.1.3.4. Kararlılık.....	18
5.1.3.5. Sağlamlık	19
5.1.4. Yöntemin Formülasyona Uygulanması.....	20
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	21
KAYNAKÇA	23
ÖZGEÇMİŞ	

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 5.1. Sisteme uygunluk parametreleri	16
Tablo 5.2. Doğrusallık sonuçları	17
Tablo 5.3. Kesinlik ve doğruluk sonuçları.....	18
Tablo 5.4. Stabilitate çalışmasının sonuçları	18
Tablo 5.5. Sağlamlık sonuçları	19



ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. iRGD peptidi molekülü	2
Şekil 2.2. iRGD peptit 3 boyutlu yapısı.....	3
Şekil 2.3. iRGD peptidinin tümöre penetrasyonu.....	4
Şekil 2.4. Kapiler elektroforezde elektroosmotik akış şeması	6
Şekil 2.5. Kapiler elektroforezde boyutu aynı moleküllerin yüklerine göre göç süreleri	6
Şekil 2.6. Kapiler elektroforez sistemi	7
Şekil 5.1. pH 3.0, 2.5 ve 2.11'e ait iRGD pikleri	13
Şekil 5.2. Tamponda değişen MeOH oranı ile iRGD analizi elektroferogramı	14
Şekil 5.3. Optimizasyon sonu OLA ve iRGD pikleri	15
Şekil 5.4. Doğrusallık grafiği	16
Şekil 5.5. Formülasyonun elektroferogramı	20

KISALTMALAR DİZİNİ

α	: Seçicilik Faktörü
AO	: Alan Oranı
Arg	: Arjinin
Asp	: Aspartat
a/a	: Kütle/kütlece yüzdesi
a/h	: Kütle/hacimce yüzdesi
BSS	: Bağlı Standart Sapma
Cys	: Sistein
dk	: Dakika
Gly	: Glisin
ICH	: Uluslararası Uyumlandırma Konferansı
iRGD	: İçselleştirilmiş RGD
KE	: Kapiler Elektforez
KS	: Kütle Spektrometrisi
LOD	: Tayin Sınırı (Limit of Detection)
LOQ	: Gözlenebilme Sınırı (Limit of Quantification)
Lys	: Lizin
MeOH	: Metanol
N	: Teorik Tabaka Sayısı
OLA	: Olanzapin
Pro	: Prolin
PVDF	: Polivinilidenflorit
R	: Rezolüsyon
S/N	: Sinyal/Gürültü
SDS-Page	: Sodyum Dodesil Sülfat- Poliakrilamid Jel Elektforez
SK	: Sıvı Kromatografisi
SK-KS	: Sıvı Kromatografisi- Kütle Spektrometrisi
T	: Kuyruklanma Faktörü
TAE	: Tris-Asetat EDTA
TF-YPSK	: Ters Faz- Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
TFA	: Trifloroasetik asit

t _i RGD	: iRGD peptidinin alıkonma zamanı
t _{OLA}	: Olanzapin alıkonma zamanı
UPLC-MS	: Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi- Kütle Spektrometrisi
USP	: Amerikan Farmakopesi
UV	: Morötesi (Ultraviyole)
YPSK	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi



1. GİRİŞ VE AMAÇ

İçselleştirici RGD peptidi (iRGD); tümör hedeflendirme penetrasyonuna sahip 9 aminoasitli siklik bir peptittir. RGD peptit ailesinden olan bu peptit, integrin reseptörlerine hedeflendirmede kullanılmaktadır. Ruoslahti ve arkadaşlarının tanımladığı iRGD peptidi, yapısında proteaz tanıma bölgesi, vasküler hedef arama motifi (RGD) ve tümör hücresi hedefleme motifi (CendR) taşımaktadır (Sugahara vd. 2009). Tümör hücrelerini veya vasküler tümör sistemini hedeflemek, kanser tedavisine ve teşhisine yönelik çalışmalarda odak noktası olmuştur (Teesalu, Sugahara, Ramana, ve Ruoslahti, 2009; Teesalu, Sugahara, ve Ruoslahti, 2013).

iRGD peptidi analizine yönelik literatürde yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK) (Cho vd. 2016, 2019; Peng ve Kopeček 2014), sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi (Pooladanda vd. 2021), UV spektrofotometresi (Değer 2020), agaroz jel elektroforez (Przysiecka vd. 2016) ve sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid jel elektroforez (SDS-Page) (J. Yang, Wei, vd. 2019; J. Yang, Yin, vd. 2019) yöntemi kullanılmıştır. iRGD peptidi için literatürde kromatografik yöntemler bulunsa da KE yöntemi ile ilgili herhangi bir çalışma yer almamıştır.

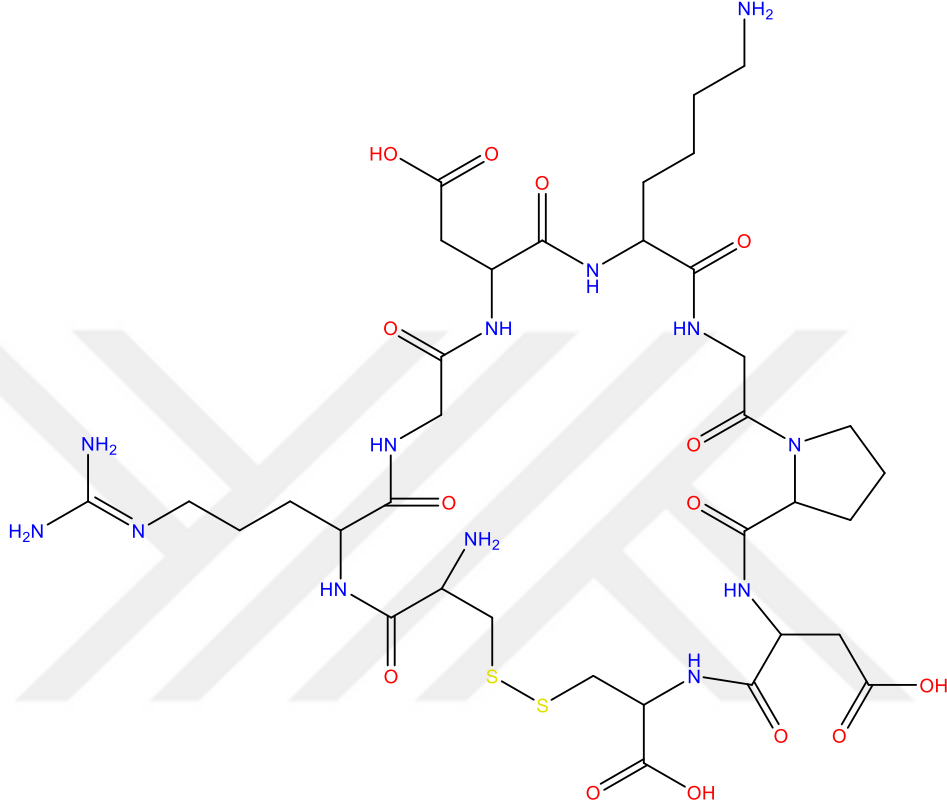
Kapiler elektroforez yöntemi (KE), iletken bir çözelti içerisinde yüklü/yüksüz parçacıkların veya moleküllerin kapiler içinde elektriksel bir alan etkisiyle ilerlemesine dayanan bir yöntemdir. Diğer yöntemlere kıyasla daha yüksek verimle çalışılabilmesi, çok düşük hacimlerde numune kullanılması, hızlı analiz yapılabilmesi ve madde sarfiyatının az olması nedeniyle avantajlıdır (Baker, 1995). Aynı zamanda başta inorganik katyon ve anyonlar olmak üzere aminoasitler, ilaçlar, vitaminler, karbonhidratlar, proteinler, peptitler gibi birçok numunenin analizi yapılabilmektedir (Ontario, 2015).

Bu çalışmanın amacı KE yöntemi kullanılarak iRGD peptidinin analizi için hızlı, seçici ve basit bir yöntem geliştirilmesi ve yöntemin geçerliliğinin gösterilmesidir. Yöntemin geçerliliği için doğrusalılık, kesinlik, doğruluk, duyarlılık, sağlamlık, stabilite parametreleri uygulanmıştır. Geliştirilen bu metot farmasötik preperatta kullanılan iRGD peptidine uygulanmıştır.

2. KAYNAK BİLGİSİ

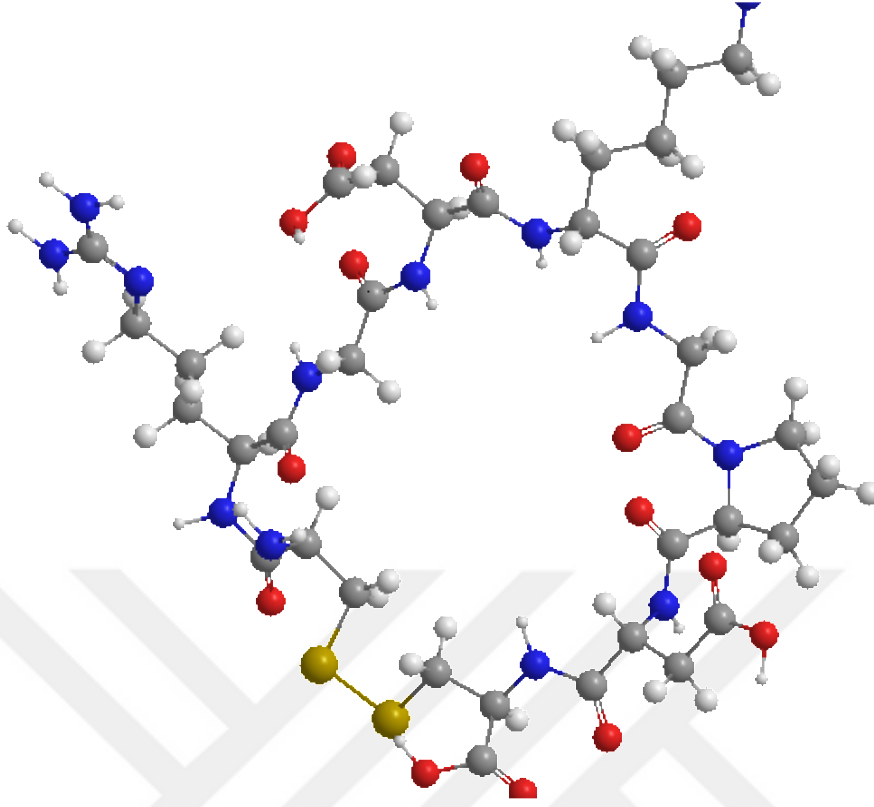
2.1. iRGD Peptidi

iRGD peptidi, $C_{35}H_{57}N_{13}O_{14}S_2$ kapalı formülüne ve 948.04 g/mol molekül ağırlığına sahip 9 aminoasitli siklik bir yapıdadır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. iRGD peptidi molekülü

Siklo Cys-Arg-Gly-Asp-Lys-Gly-Pro-Asp-Cys dizilimindedir ve sistein 1 ile sistein 9 arasında disülfid bağı vardır. Kimyasal adı (6S,9S,15S,18R,23R,26S,29S)-18-amino-6-(4-aminobutil)-9,26-bis(karboksimetil)-15-[3-(diaminometilidenamino)propil]-2,5,8,11,14,17,25,28-oktaokso-20,21-ditiya-1,4,7,10,13,16,24,27-oktazabisiklo[27.3.0]dotriacantane-23-karboksilik asittir (Şekil 2.2). Suda ve DMSO da çözünebilen beyaz katı formdadır.

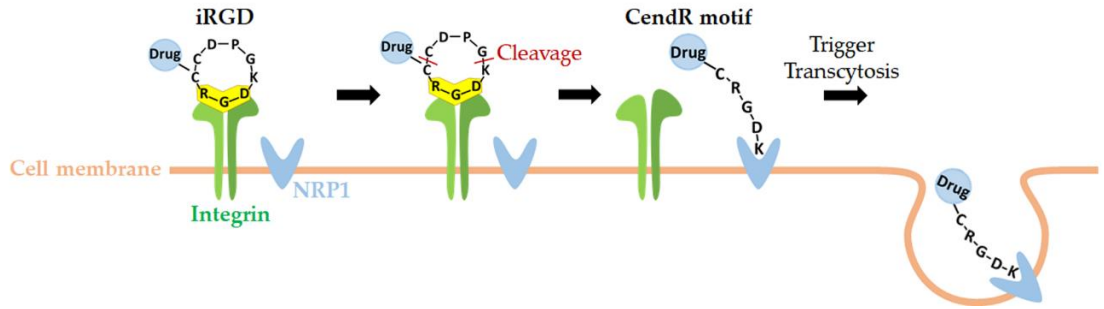


Şekil 2.2. iRGD peptit 3 boyutlu yapısı

2.2. iRGD Peptidinin Özellikleri

RGD isimli peptit dizisinin keşfinden sonra (Ruoslahti 2003; Pierschbacher ve Ruoslahti 1984), bu peptidin tümör hedefleme özelliğine ek olarak etkili hücre ve doku penetrasyonu gösteren iRGD peptidi (içselleştirilmiş RGD peptidi) adında yeni bir versiyonu bulunmuştur (Sugahara vd., 2009). iRGD peptidi, RGD peptidine göre antikorlar veya nanoparçacıklar içeren yüklerin, antikanser ilaçların veya küçük moleküllerin taşınmasında daha üstün olduğu görülmüştür (Song vd., 2020).

iRGD peptidi; hücre adezyonunda, sinyalleşmesinde ve anjiyogeneze rol oynayan integrin reseptörlerine spesifik olarak bağlanan özel bir yapıdadır (Arduino vd., 2021). Birkaç basamakta tümöre penetrasyonu gerçekleşir. iRGD peptidinin yapısında bulunan RGD ucu öncelikle α_v integrinlerle etkileşime girer. Daha sonra tümör kaynaklı proteaz bölünmesi yardımıyla C ucu (CendR) (R/KXXR/K, R arg, K lys, X herhangi bir aminoasittir.) ortaya çıkar. Açığa çıkan bu CendR motifi, glioma hücreleri tarafından aşırı eksprese edilen NRP-1'e bağlanmasını sağlar (Şekil 2.2). Bu sayede iRGD'ye bağlı yüklerin taşınmasını, vasküler ve doku penetrasyonunu sağlar (Kadonosono vd. 2015; Simón-Gracia vd. 2016; Zhang vd., 2017).



Şekil 2.3. iRGD peptidinin tümöre penetrasyonu (Kang, Lee, ve Park 2020)

2.3. iRGD ile Yapılan Analiz Çalışmaları

Literatürde iRGD ilaç taşıyıcı sistemlerde sıkça kullanılan yardımcı bir peptit olarak yer almıştır. Geliştirilen yeni formülasyonlarda literatürde iRGD'nin kalitatif analizlerine yer verilmektedir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK), UV spektrofotometrisi ve sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid jel elektroforez (SDS-Page) yöntemleri kullanılmıştır.

Yapılan bir TF-YPSK analizinde Agilent ZORBAX SB-C8 kolonunda (150×4.6 mm, 5µm partikül boyutu), enjeksiyon hacmi 10µL ve akış hızı 1mL/dk ile gradient olarak iRGD analizi gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak sulu %0.1'lik trifloroasetik asit (TFA) ve %0.1'lik TFA içeren asetonitril kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 25°C'ye ayarlanmıştır. Analiz sonucunda iRGD peptidinin pikinin alıkonma zamanı 17.3 dk olarak bulunmuştur (Hu, Huang, ve Chen 2019). Yapılan başka bir YPSK analizinde; XBridge BEH C18 kolonu (partikül boyutları 10 µm, 150 mm × 4.6 mm) bir dakikada 1mL akış hızıyla, hareketli faz 20 dakikalık bir gradyan %10-80 çözücü B'nin ardından 5 dakikalık sabit %100 çözücü B akışı (çözücü A, su içinde %0.1TFA; solvent B, asetonitril içinde %0.1 TFA) ile analiz yapılmıştır. 230nm'de absorbens ölçülmüştür (Cho vd., 2016).

iRGD peptidinin ile nimbolid lipozomlarının konjugasyonu ile ilgili yapılan bir çalışmada LC-MS kullanılmıştır. Karakterizasyonu ve konjugasyonunun gösterilmesi amaçlanmıştır. Sonuç olarak da %24.23±%0.53 konjugasyonun gerçekleştiği bulunmuştur (Pooladanda vd., 2021).

Literatürde yer alan çalışmalardan biri de UV spektrofotometresiyle yapılmıştır. Miktar tayini için 5-100 µg/mL hazırlanan çözeltilerden kalibrasyon grafiği çıkarılmıştır. Dalga boyu 220 nm olarak seçilmiş ve absorbens değerleri ile grafik hazırlanmıştır (Değer, 2020).

Çalışmalarda iRGD ile ilgili yeni geliştirilen formülasyonlara yönelik araştırmalar yapılmıştır. Bu çalışmalardan birinde agaroz jel elektroforez yöntemi kullanılmıştır. iRGD ve QD kompleksinden oluşan formülasyonun analizi için 100V'da 15 dakika boyunca TAE tamponu (40 mM Tris-asetat, 1 mM EDTA, pH 8.0) içinde %5 agaroz jel üzerinden analiz edilmiştir. Dedektör olarak UV dedektörü kullanılmıştır. Kompleksin karakterizasyonu bu şekilde yapılmıştır (Przysiecka vd., 2016).

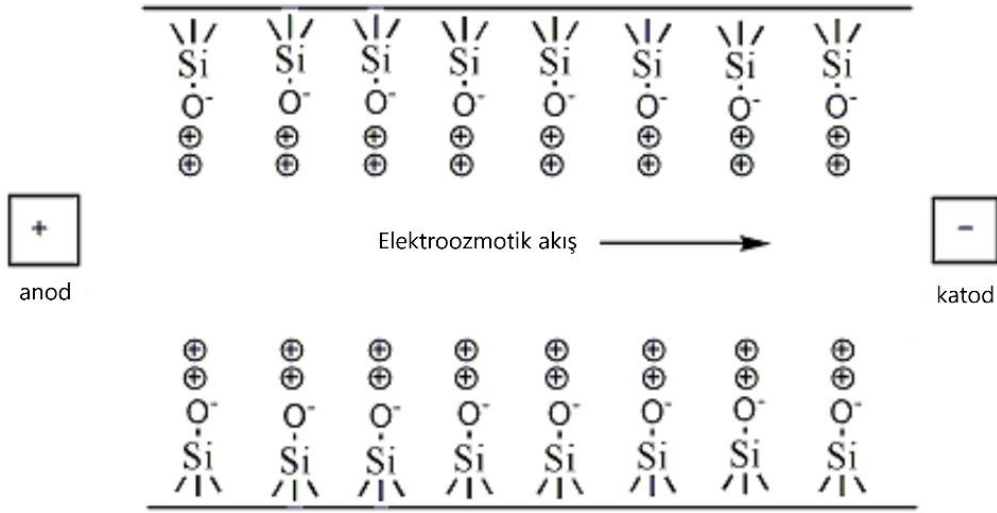
iRGD peptidiyle ilgili yapılan çalışmalarından birinde de SDS-Page yöntemi kullanılmıştır. IL-24-iRGD adlı polimerin sentezinden sonra saflaştırılması için %15'lik SDS-Page ile saflaştırılmıştır (J. Yang, Wei, vd. 2019; J. Yang, Yin, vd., 2019).

Rekombinant protein yapımında kullanılan iRGD peptidi *E.coli* suşlarına indüklenerek Coomassie mavisi yardımıyla SDS-Page'de 30KDa'da bant şeklinde saflaştırılmıştır (Song vd., 2020).

2.4. Kapiler Elektroforez

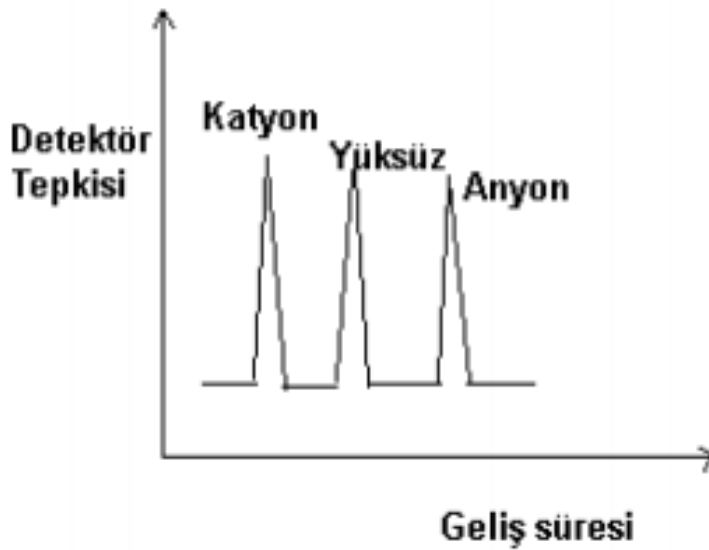
Kapiler elektroforez; fiziki temelleri elektroforeze, tekniği ve ekipmanları açısından kromatografiye dayanan modern bir analitik yöntemdir. Elektroforez, yüklü veya yüksüz parçacıkların iletken sıvı ya da yarı katı içerisinde elektrik alan varlığında farklı hızlarda hareket etmesine dayanan bir ayırma tekniğidir.

Kapiler elektroforez, kapiler adında küçük çaplı, içi silika kaplı ince kılcal borunun içinde gerçekleştirilen elektroforezdir. Bu ince kılcal boru, uygun bir pH'da olan tampon çözeltisiyle doldurulur ve kılcal borunun uçları aynı tampon çözeltiden oluşan iki vialin içerisine daldırılır. Bu viallerden biri giriş tamponu diğeri ise çıkış tamponu ile doludur. Numune enjeksiyonu yapılır ve kapilerin üzerine belirli bir süre voltaj uygulanır. Kılcal boruya uygulanan bu potansiyelle içinde bir akış oluşur ve elektroozmotik akış adı verilen bu akış ile çözelti giriş vialinden dedektöre sonrasında da çıkış vialine doğru ilerler. Akışın yönü negatif yüklü katoda doğrudur. Elektroozmotik akış Şekil 2.4'de gösterilmiştir (Baker, 1995).



Şekil 2.4. Kapiler elektroforezde elektroozmotik akış şeması

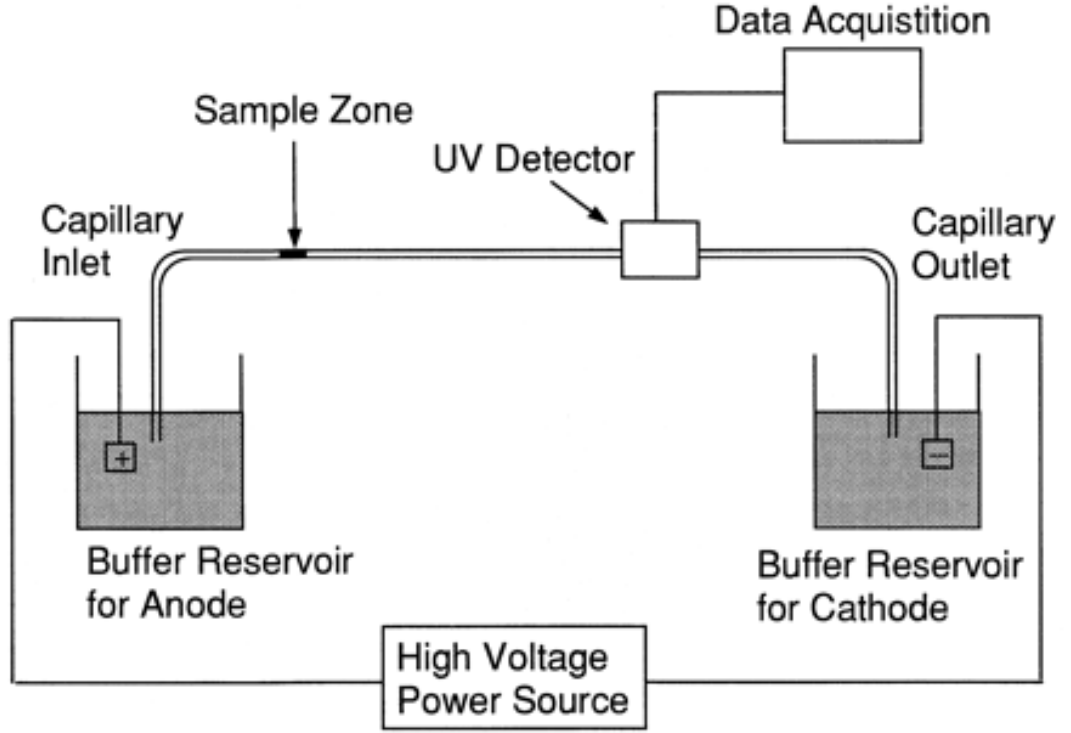
Elektroozmotik akışın yanı sıra kapilere bir de elektroforetik göç etki eder. Bu göç; katyonların katoda doğru çekilerek daha hızlı hareket etmesini sağlar. Nötr maddeler bu göçten etkilenmezken anyonlar anoda doğru göç ederler (Şekil 2.5.). Göç hızları, iyonların yük/boyut oranı ile değişir. Yükleri aynı olan iki molekülden büyük olanın göç hızı, küçük moleküle göre daha küçüktür. Boyutları aynı olan iki molekülden ise, büyük yüklü olan daha hızlı göç eder. Nötr moleküller elektrik alandan etkilenmeyeceği için elektroozmotik akış ile ilerler (Baker, 1995).



Şekil 2.5. Kapiler elektroforezde boyutu aynı moleküllerin yüklerine göre göç süreleri

2.4.1. Kapiler elektroforez sistemi

Kapiler elektroforez; 1960'larda Hjerten tarafından 3mm'lik delikli kolonlar kullanılarak tanımlanmıştır (Lele vd., 2003). 1981 yılında Jorgensen ve Lukacs tarafından iyi bir ayırma yöntemi olarak değerlendirilen ve 30 kV voltaj kullanılarak ayırma yapılan çalışmayla popüler bir teknik haline gelmiştir (Jorgenson ve Lukacs, 1981). Bu ayırma yönteminin temel bileşenleri ise; giriş ve çıkış olmak üzere iki tane tampon vialı, yüksek voltaj kaynağı (1-60 kV), yüksek voltajı ileten giriş ve çıkış vialine daldırılan iki tane elektrot, elektroforetik ve elektroozmotik akışın meydana geldiği kapiler kolon, detektör ve bilgisayar gibi veri görüntüleme cihazından oluşmaktadır (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Kapiler elektroforez sistemi (Glynn vd. 1998)

Kapiler elektroforezin diğer kromatografik yöntemlere göre birçok üstünlüğü vardır. Numune miktarının pikolitre veya nanolitre düzeyinde olması hem daha küçük hacimlerle çalışabilmesini sağlar hem de madde sarfiyatını azaltmaktadır. Analiz süresi oldukça kısa ve verimliliği de yüksektir (Şekil 2.7.).

3. GEREÇLER

3.1. Kullanılan Maddeler

iRGD peptidi	: MedChemExpress, ABD
NaH ₂ PO ₄	: Sigma-Aldrich, Almanya
HCl	: Sigma-Aldrich, Almanya
NaOH	: Merck, Almanya
Fosforik asit	: Merck, Almanya
Olanzapin	: Sigma-Aldrich, Almanya

3.2. Kullanılan Cihazlar

Buzdolabı	: Arçelik, No Frost & Electronic, Türkiye
Filtre	: Millex Syringe Filter, PVDF 0.22µm 4mm, Almanya
Hassas terazi	: Mettler Toledo, XP205, İsviçre
Kapiler	: Agilent Technologies, ABD
Kapiler elektroforez	: Agilent Technologies, CE7100, ABD
Otomatik pipet	: Eppendorf, Almanya
pH metre	: Mettler Toledo, Seven Compact pH/ion meter S220, İsviçre
Ultra saf su cihazı	: Millipore Ultrapure Water System, Fransa
Ultrasonik banyo	: Bandelin Electronic, RK510 H, Almanya
Vorteks	: Jeio Tech, VM 96 B, Güney Kore
Ultraviyole lambası	: Camag, Cabinet, İsviçre
Vorteks	: Wisemix, Güney Kore

4. YÖNTEMLER

4.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Yöntemde kullanılmak üzere iRGD peptit için uygun bir çözücü araştırılmıştır. Literatür bilgileri ve ön denemelerde de suyun en uygun çözücü olduğu görülmüştür. 1mg/mL iRGD peptit stok çözeltisi olarak hazırlanmıştır. Stok çözeltisi karıştırıcıda 10 dakika bekletilmiştir. 10^{-3} M düzeyinde hazırlanan bu ana stok çözeltisinden su ile uygun seyreltmeler yapılarak çalışma çözeltisi hazırlanmıştır.

Çalışmada iç standart olarak kullanılmak üzere birçok madde denenmiş ve en uygunu olanzapin olarak belirlenmiştir. Olanzapin için aynı şekilde su içinde hazırlanmıştır fakat çözünürlük düştüğü için öncelikle 1M HCl asit içerisinde çözülmüştür. Seyreltme işlemleri analitle aynı şekilde hazırlanmıştır.

4.2. Cihaz ile İlgili Koşullar

Yöntemin optimizasyonu sırasında DAD dedektörü kullanılmış ve dalga boyu olarak 210 nm, 225 nm, 230 nm ve 254 nm’de dedeksiyon yapılmıştır. Ayrım için 50 cm efektif uzunluğa sahip (toplam uzunluğu 58.5 cm) 75 µm iç çapı olan kapiler kolon kullanılmıştır. Kapiler ilk takıldığı anda 30 dakika 1M NaOH ile şartlanmıştır.

Cihaz günlük olarak her kullanımdan önce 10 dakika 0.1M NaOH, 10 dakika distile su ve 10 dakika çalışma tamponu ile yıkanmıştır. Analiz aralarında 2 dakika 0.1M NaOH, 2 dakika distile su ve 2 dakika çalışma tamponu ile şartlanması sağlanmıştır. Cihaz günlük kullanımı sonrasında 10 dakika 0.1M NaOH, 5 dakika distile su ve 2 dakika da hava çekilerek kapatılmıştır.

Enjeksiyon için hidrodinamik enjeksiyon yöntemi kullanılmış ve 10s 50mbar basınçla numune enjeksiyonu yapılmıştır.

4.3. Optimizasyon Çalışmaları

Optimizasyon çalışmaları için 1mg/mL iRGD peptit stok çözeltisi (1.05481×10^{-3} M) 10 dakika vorteks karıştırıcıda tutularak çözündürülmüştür. Stok çözeltisinden 100 µL alınıp 900 µL su eklenerek 10 dakika vorteks yardımıyla çözülmüştür. Bu sayede ara stok çözeltileri (1.05481×10^{-4} M) oluşturulmuştur. Stok çözeltisi -80°C’de ve ara stok çözeltileri -20°C’de saklanmıştır. Gerekli seyreltmeler ara stok çözeltileri üzerinden yapılmıştır.

Yöntemin optimizasyonu için çalışma tamponu derişimi, çalışma tamponunun pH'ı, çalışma tamponunun organik bileşen oranı ve numuneye uygulanan potansiyel parametreleri incelenmiştir.

4.3.1. Çalışma tamponu

Yöntemin optimizasyonu sırasında pH 2.0 ile 9.0 aralığında tamponlar denenmiştir. pH 9.0 ve 8.5 için borat tamponu, 8.0, 7.5, 7.0, 6.5, 2.5 ve 2.0 için fosfat tamponu, 5.5, 5.0, 4.5 ve 4.0 için asetat tamponu, 3.5 ve 3.0 için format tamponu kullanılmıştır. Borat tamponları için sodyum tetraborat ve borik asit kullanılmıştır. Fosfat tamponları hazırlanırken istenilen pH'a göre sodyum dihidrojen fosfat ya da disodyum hidrojen fosfat çözeltisi hazırlanarak pH'ı fosforik asitle ayarlanmıştır. Asetat tamponları sodyum asetat ve asetik asit ile hazırlanmıştır. Format tamponları ise sodyum format ve formik asidin uygun miktarları ile istenilen pH'lara getirilmiştir. Kullanılan her bir tampon 50mM stok çözeltisi şeklinde hazırlanıp sonrasında istenilen derişimlere seyreltilmiştir. Hazırlanan tampon çözeltileri cihaza verilmeden 0.45 µm'lik filtreden süzölmüştür.

4.3.2. Çalışma tamponundaki organik çözücü oranı

Çalışma tamponundaki organik çözücü miktarının ayırma etkisini görebilmek için içerisinde %10 metanol, %20 metanol ve %30 metanol içeren 20 mM fosfat tamponu (pH 2.11) ile 3'er tekrarlı analizler gerçekleştirilmiştir. Göç zamanları ve pik morofolojileri değerlendirilerek metanol oranının göç zamanlarını çok uzattığı görölmüştür.

4.3.3. Potansiyel

Potansiyelin seçilmesi için iRGD-OLA karışımının pH'ı 2.11 olan 20 mM fosfat tamponu ile 20 kV, 23 kV, 25 kV potansiyel altında 3'er analizi gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen analizler sonrasında analiz süreleri ve pik morfolojileri değerlendirilerek uygun potansiyel seçilmiştir.

4.4. Yöntemin Validasyonu

Geliştirilen yöntemin geçerliliğinin gösterilmesi için validasyon çalışmaları yapılmıştır. Doğrusallık, doğruluk, kesinlik, kararlılık ve sağlamlık parametreleri yapılmıştır. Validasyon hesaplamaları için alan oranları (AO) ($AO = \frac{Alan_{madde}}{Alan_{IS}}$) kullanılmıştır. Validasyon çalışmalarının hepsinde IS'nin derişimi 16.00×10^{-6} M olacak şekilde ayarlanmıştır.

4.4.1. Doğrusallık

Yöntemin geçerliliğinin gösterilmesi için önce doğrusallık parametresi uygulanmıştır. 1.055×10^{-6} M, 5.27×10^{-6} M, 1.055×10^{-5} M, 2.11×10^{-5} M, 3.16×10^{-5} M, 4.22×10^{-5} M, 6.33×10^{-5} M, 8.44×10^{-5} M ve 1.06×10^{-4} M iRGD çözeltisi hazırlanarak analiz edilmiştir.

Doğrusal aralık belirlendikten sonra kalibrasyon için 5.27×10^{-6} M, 1.055×10^{-5} M, 2.11×10^{-5} M, 3.16×10^{-5} M, 6.33×10^{-5} M çözeltiler hazırlanmıştır. Bu molaritedeki çözeltiler gün içi ve günler arası olmak üzere 3 tekrarlı analiz edilmiştir.

4.4.2. Kesinlik

Yöntemin kesinliğinin için derişimi 5.27×10^{-6} M, 2.11×10^{-5} M ve 4.22×10^{-5} M olan iRGD numuneleri hazırlanmıştır. Gün içi 6 tekrarlı analizi gerçekleştirilmiştir.

4.4.3. Doğruluk

Doğruluk parametresi için son derişimleri 5.27×10^{-6} M, 2.11×10^{-5} M ve 4.22×10^{-5} M olan çözeltiler hazırlanmış ve 6 tekrarlı analizleri yapılmıştır.

4.4.4. Duyarlılık

Yöntemin duyarlılık parametresi için S/N oranları kullanılmıştır. LOD hesaplamasında S/N oranını 3,3, LOQ hesaplamasında ise 10 olarak alınmıştır.

4.4.5. Kararlılık

Yöntemin kararlılığı için 5.27×10^{-6} M, 2.11×10^{-5} M ve 4.22×10^{-5} M çözeltileri hazırlanmıştır. Uzun dönem kararlılık testi için -20°C 'de 1 ay bekletilmiş çözeltiler 3 tekrarlı analiz edilmiştir. Kısa dönem kararlılık testi için 24 saat oda sıcaklığında bekletilmiş çözeltilerle 3 tekrarlı analiz yapılmıştır. -20°C 'de dondurulan çözeltiler 3 döngüde don-çöz şeklinde 3 tekrarlı analiz edilmiştir.

4.4.6. Sağlamlık

Sağlamlık testi için 2.11×10^{-5} M iRGD peptidi hazırlanmıştır. Optimum koşullarda yapılan küçük değişikliklerle analizler gerçekleştirilmiştir.

Optimizasyon sonucunda bulunan dalga boyu (225 nm) ve tampon derişimi (20 mM) parametreleri ± 2 , tampon pH'ı (2.11) ± 0.1 ve son olarak da voltaj (23 kV) ± 0.5 değiştirilerek 3 tekrarlı analizler yapılmıştır.

4.5. Formülasyonun Hazırlanması

In situ jelleşen sistemin hazırlanmasında kitosan ve poloksamer polimerleri kombine halde kullanılmıştır. Öncelikle soğuk hazırlama yöntemi ile %20 (a/a) poloksamer çözeltisi hazırlanmıştır. Sonrasında ise %1 (a/h) asetik asit çözeltisi

kullanılarak %1 derişime sahip kitosan çöztisi hazırlanmıştır. Poloksamer çöztisinin derişimi kitosan çöztisi ile %18 (a/a)'a ayarlanmıştır. Diğer bir tarafta ise MEIS-inhibitor 2 isimli antikanser madde yüklü albümin nanopartikülleri hazırlanarak liyofilize toz haline getirilmiştir. Bu tozdan 6 mg tartılarak in situ jelleşen sisteme eklenmiş ve sistem içinde dağıtılmıştır. Formülasyonun iRGD içermeyen bu hali ve iRGD peptidi eklenerek tam formülasyon hali analiz edilmiştir. Formülasyon 1/10 oranında su ile seyreltilerek analiz edilmiştir.



5. BULGULAR ve TARTIŞMALAR

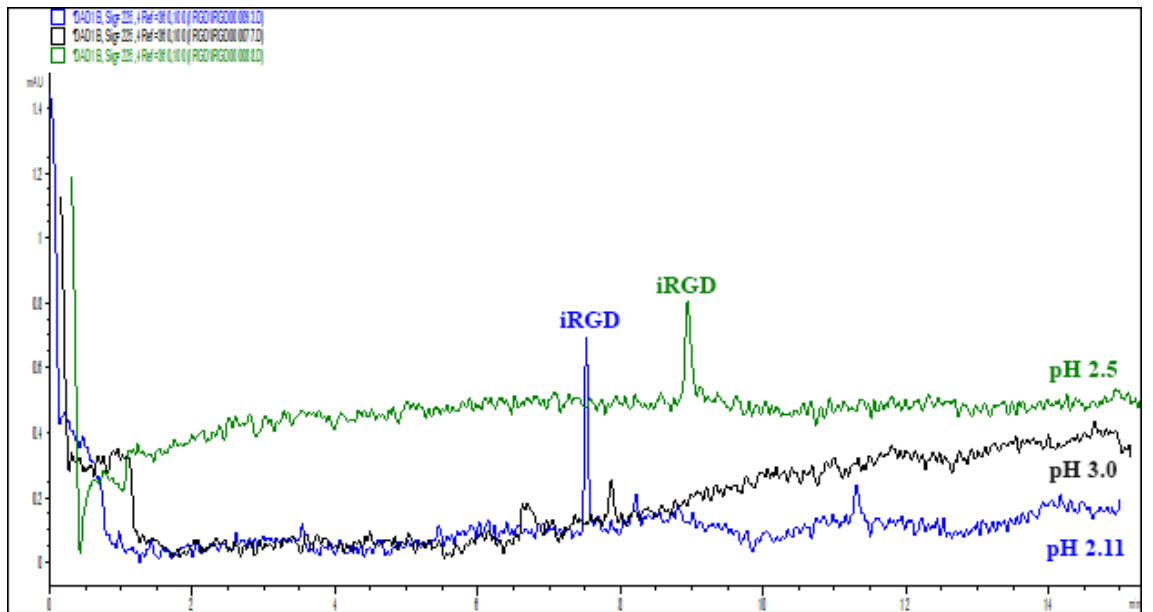
5.1. KE Yöntemi

KE yönteminde dedektör olarak DAD kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda iRGD peptidi için farklı dalga boylarında çalışıldığı görülmüştür (Cho vd., 2016, 2019; Y. Yang vd., 2018; Ye vd., 2011). Bu nedenle optimizasyon sırasında 210 ile 254 nm arasında 4 farklı dalga boyu taranmıştır. Pikler incelenerek en uygun dalga boyunun 225 olduğu karar verilmiştir. Kolon için 75µm iç çapına, 50cm efektif uzunluğa ve toplamda 58.5cm uzunluğa sahip kapiler kullanılmıştır. Çalışma boyunca kapiler kaset sıcaklığı 20°C’de sabit tutulmuştur. Örnek hidrokinamik enjeksiyon yöntemiyle 10sn boyunca 50mbar basınçla sisteme verilmiştir.

5.1.1. Optimizasyon çalışmaları

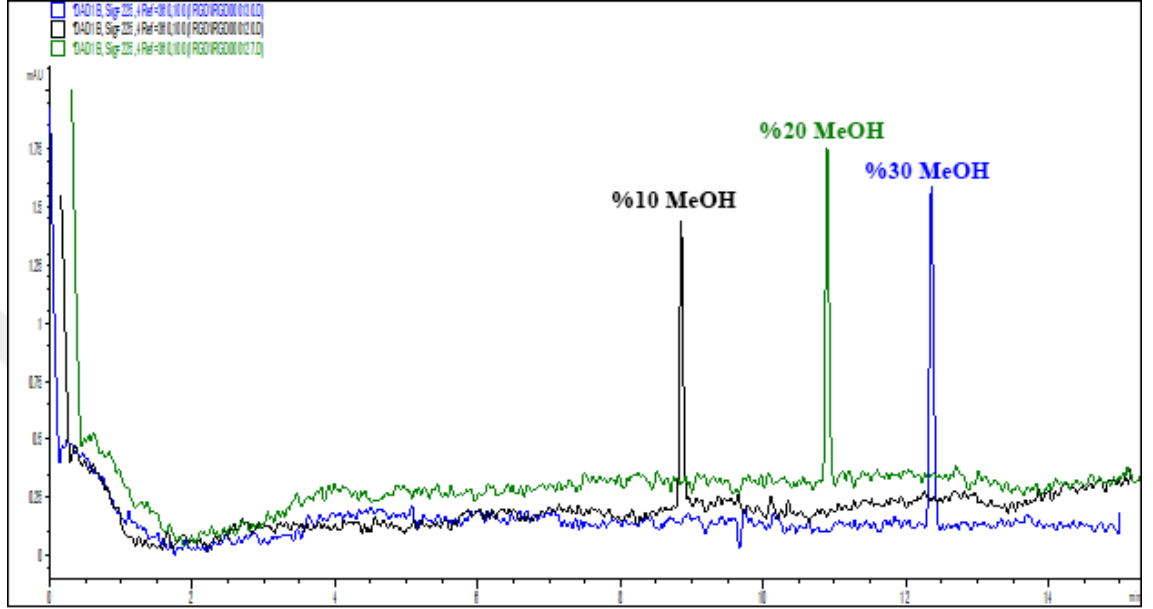
KE yöntemiyle iRGD peptidinin en optimal koşulları araştırılmıştır. Bu nedenle çalışma tamponu pH’ı, organik çözücü oranı ve uygulanan potansiyel parametreleri değiştirilerek en uygun değerler belirlenmeye çalışılmıştır.

Çalışma tamponu pH’ı için birçok tampon çözeltisi denenmiştir. pH değeri 2 ile 9 arasında yapılan çalışmalar sonucunda en uygun pH’ın 2.11 olduğu karar verilmiştir. pH 3.0, 2.5 ve 2.11’e ait elektroferogramlar Şekil 5.1.’de gösterilmiştir.



Şekil 5.1. pH 3.0, 2.5 ve 2.11’e ait iRGD pikleri

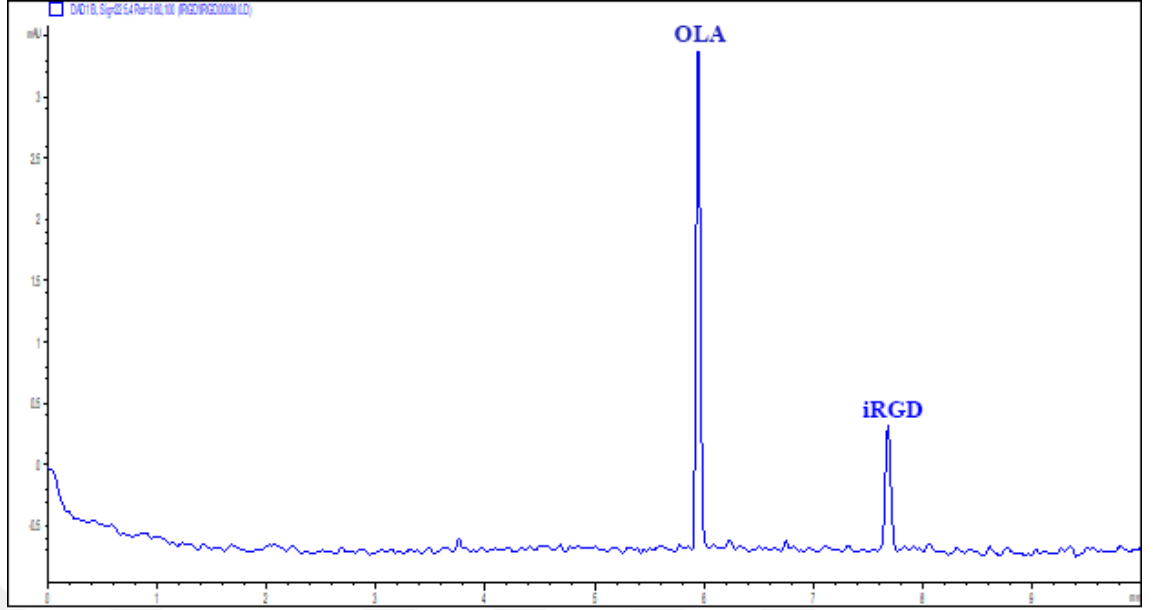
Organik çözücü oranı denemeleri için; tampon %10 MeOH, %20 MeOH ve %30 MeOH içerecek şekilde hazırlandı. Yapılan tekrarlı analizler sonucunda alıkonma zamanının artması pik morfolojisinin değişmemesi nedeniyle organik çözücü kullanılmamasına karar verilmiştir (Şekil 5.2).



Şekil 5.2. Tamponda değişen MeOH oranı ile iRGD analizi elektroferogramı

Uygulanacak potansiyelin seçimi için 20 kV, 23 kV ve 25 kV potansiyel 20mM fosfat tamponuna uygulanmıştır. Analiz süresi açısından en iyi ayrımın 25 kV’da olduğu görülmüştür fakat yüksek potansiyel uygulamasından dolayı oluşabilecek Joule ısınmasını engellemek amacıyla uygulanacak olan potansiyel 23 kV olarak seçilmiştir.

Optimizasyon çalışmaları sonucunda 20mM fosfat tamponu pH’ı 2.11 ve uygulanacak potansiyelde 23 kV olarak seçildikten sonra yöntemin geçerliliğini arttırmak amacıyla bir iç standart seçilmiştir. İç standart olarak aynı koşullarda karbamazepin, lamotrijin, 4-amino-3-hidroksi benzoik asit, olanzapin denenmiştir. En uygun ayrımın gözlemlendiği iç standart olanzapin olarak belirlenmiştir (Şekil 5.3).



Şekil 5.3. Optimizasyon sonu OLA ve iRGD pikleri

5.1.2. Sisteme Uygunluk Parametreleri

Yapılan yöntemin sisteme uygunluk parametreleri ve kabul sınırları Çizelge 5.1’de verilmiştir. Verilen parametreler kabul sınırları içinde olduğu görülmektedir.

Tablo 5.1. Sisteme uygunluk parametreleri (2.11×10^{-5} M, $n=3$).

Göç Zamanı (dk)	Rezolüsyon (Half-Widht Metodu) (R)	Teorik tabaka sayısı (N)	Kuyruklanma faktörü (USP’ye göre) (T)
7.627	20.362	109829	1.11017
7.633	20.371	110021	0.71139
7.681	20.443	108752	1.06944
7.685	21.014	111563	1.11905
7.679	21.014	108752	1.08824
Kabul sınırları		>2000	<1.5

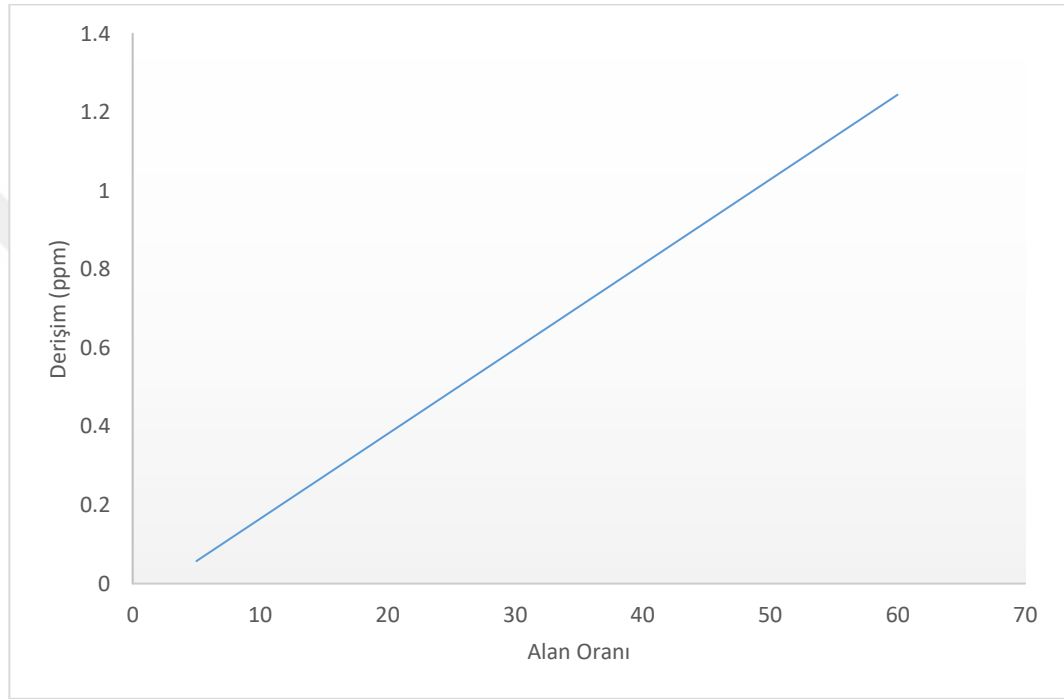
5.1.3. Validasyon çalışmaları

Optimum koşullar belirlendikten sonra validasyon parametreleri uygulanmıştır. ICH yönergelerine göre doğrusallık, kesinlik, doğruluk, duyarlılık, stabilite ve kararlılık parametreleri optimizasyon sonucunda elde edilen değerlerle analiz edilmiştir.

Hesaplamalarda AO kullanılmıştır. Bunun yanı sıra sisteme uygunluk parametreleri de hesaplanmıştır.

5.1.3.1. Doğrusallık

Doğrusallık parametresi için derişimleri 1.055×10^{-6} M, 5.27×10^{-6} M, 1.055×10^{-5} M, 2.11×10^{-5} M, 3.16×10^{-5} M, 4.22×10^{-5} M, 6.33×10^{-5} M, 8.44×10^{-5} M ve 1.06×10^{-4} M olan 9 farklı çözelti hazırlanmıştır. Analizler sonucunda iRGD peptidin 5.27×10^{-6} M ile 6.33×10^{-5} M arasında doğrusal olduğu bulunmuştur ve doğrusallık grafiği Şekil 5.4’de verilmiştir.



Şekil 5.4. Doğrusallık grafiği

Birbirini takip eden 3 gün, 3 tekrarlı ve 5 farklı derişimden oluşan doğrusallık analizleri sonucunda gün içi ve günler arası elde edilen regresyon değerleri Tablo 5.2’de verilmiştir.

Tablo 5.2. Doğrusallık sonuçları.

Parametreler	Gün içi (1 gün, n=6)	Günler arası (tüm günler, n=18)
Eğim	0.023095437	0.021590285
Kesim	-0.078200926	-0.050655717
Tayin katsayısı (R^2)	0.992728603	0.990322593

5.1.3.2. Kesinlik ve Doğruluk

Yöntemin kesinliği ve doğruluğu için derişimleri 5.27×10^{-6} M, 2.11×10^{-5} M ve 4.22×10^{-5} M çözeltileri birbirini takip eden 3 gün ve her bir derişim 6 kez analiz edilmiştir. Analiz sonuçlarında kesinlik çalışması için %BSS değeri, doğruluk çalışması için ise %hata ve %geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Bu değerler Tablo 5.3’de verilmiştir.

Tablo 5.3. Kesinlik ve doğruluk sonuçları.

	Eklenen derişimi (M)	Doğruluk		Kesinlik
		Bulunan derişimi (M)	iRGD %Geri kazanım	
Gün içi (1 gün, n=6)	5.27×10^{-6}	5.19×10^{-6}	100.04	0.88
	2.11×10^{-5}	2.13×10^{-5}	87.75	1.63
	4.22×10^{-5}	4.08×10^{-5}	97.88	1.49
Günler arası (Tüm günler, n=18)	5.27×10^{-6}	5.268×10^{-6}	100.60	1.97
	2.11×10^{-5}	2.043×10^{-5}	96.87	1.26
	4.22×10^{-5}	4.153×10^{-5}	98.43	0.46

5.1.3.3. Duyarlılık

Yöntemin duyarlılığının belirlenmesi için S/N oranından faydalanılmıştır. S/N oranı LOD için 3.3 LOQ için ise 10 alınarak yapılan hesaplamalar sonucunda LOD 1.1256×10^{-6} M, LOQ ise 3.7521×10^{-6} M olarak hesaplanmıştır.

5.1.3.4. Kararlılık

Kararlılık parametresi için derişimleri 5.27×10^{-6} M, 2.11×10^{-5} M ve 4.22×10^{-5} M olan çözeltiler 3 farklı koşulda bekletilerek analiz edilmiştir. 3 tekrarlı yapılan kararlılık testleri için öncelikle kısa dönem kararlılık testi uygulanmıştır. Bunun için oda sıcaklığında 24 saat bekletilmiş çözeltiler analiz edilmiştir. Uzun dönem kararlılığı için 1 ay -20’de bekletilen çözeltiler kullanılmış ve son olarak da 3 döngü dondurma-eritme kararlılığına bakılmıştır. Geri kazanım yüzdesi ve %BSS değerleri hesaplanmıştır ve Tablo 5.4 ‘da verilmiştir.

Tablo 5.4. Stabilité çalışmasının sonuçları (n=3).

Saklama koşulları	Eklenen (M)	derişim	Geri (%)	kazanım	BSS (%)
Kısa dönem kararlılığı (oda sıcaklığında, 24 saat)	5.27x10 ⁻⁶		101.5		1.92
	2.11x10 ⁻⁵		100.3		0.96
	4.22x10 ⁻⁵		98.1		3.03
Uzun dönem kararlılığı (-20°C`de, 1 ay)	5.27x10 ⁻⁶		100.5		0.43
	2.11x10 ⁻⁵		101.3		1.59
	4.22x10 ⁻⁵		100.		1.13
Dondurma-eritme kararlılığı (3 döngü)	5.27x10 ⁻⁶		96.6		2.62
	2.11x10 ⁻⁵		100.7		1.45
	4.22x10 ⁻⁵		98.73		0.34

5.1.3.5. Sağlamlık

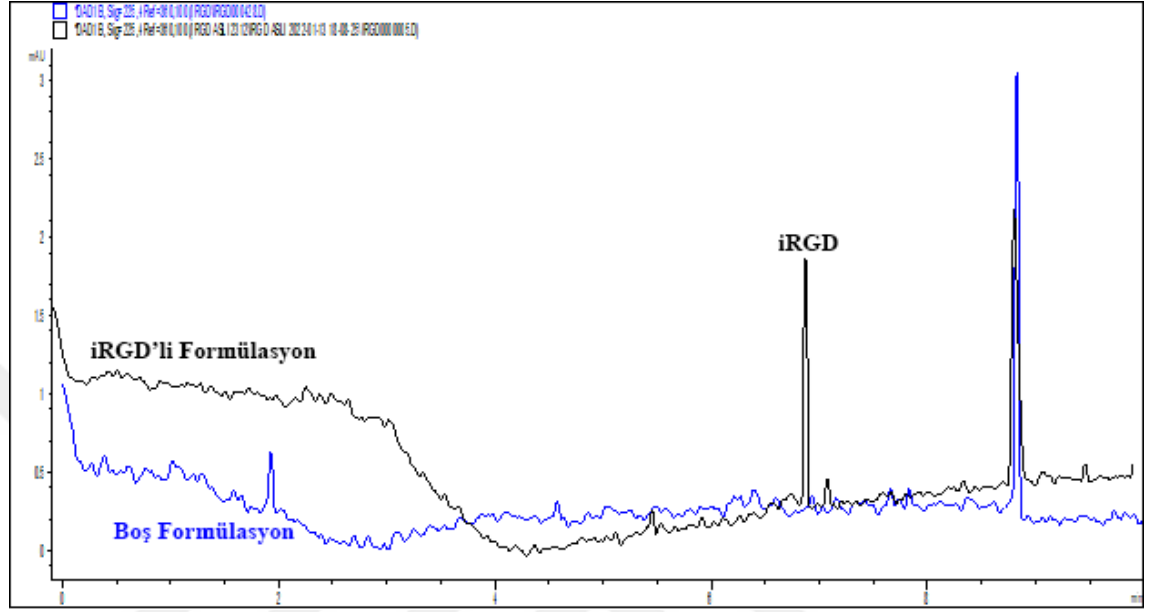
Sağlamlık parametresi için optimizasyonda elde edilen dalga boyunda (225 nm), pH`da (2.11), tampon derişiminde (20 mM) ve potansiyelde (23 kV) ufak değışiklikler yaparak analizler gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizler sonucu optimum koşullardaki iRGD analizlerinin geri kazanım yüzdesi değerleri hesaplanmıştır. Sağlamlık çalışmasının sonuçları Tablo 5.6`de verilmiştir.

Tablo 5.5. Sağlamlık sonuçları (2.11x10⁻⁵ M, n=3).

Parametre		%Geri	kazanım
Voltaj (kV)	22.5	90.03	
	23.5	96.62	
Tampon derişimi (mM)	18	88.67	
	22	87.76	
Tampon pH`ı	2.0	88.87	
	2.2	90.72	
Dalga boyu (nm)	223	102.01	
	227	74.08	

5.1.4. Yöntemin formülasyona uygulanması

Yöntemin formülasyona uygulanması için öncelikle peptit içermeyen in situ jel formülasyonu analizi yapılmıştır. 3 tekrarlı boş formülasyon analizinden sonra iRGD içeren formülasyonun analizi de yapılmıştır. Formülasyonda yöntemin geçerli olduğu ve iRGD pikinin varlığı Şekil 5.5’de gösterilmiştir.



Şekil 5.5. Formülasyonun elektroferogramı

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu çalışmada biyoteknolojik anlamda bir tümör hedefleme motifi olarak kullanılan iRGD peptidinin analizi için yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Analiz çapı 75 µm olan efektif uzunluğu 50cm toplam uzunluğu 58.5 cm olan bir kapiler kolonda gerçekleşmiştir. En iyi sonuçlar yapılan deneyler sonucu derişimi 20 mM ve pH'ı 2.11 olan fosfat tamponu ile 23 kV voltaj kullanılarak elde edilmiştir. Bu koşullarda iRGD'nin alıkonma zamanı ortalama 7.51 dk, iç standart olarak kullanılan OLA'nın alıkonma zamanı iste 5.82 dk olarak bulunmuştur.

iRGD analizi için; yüksek performanslı sıvı kromatografisi (YPSK) (Cho vd., 2016, 2019; Peng ve Kopeček, 2014), sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi (Pooladanda vd., 2021), ultra performanslı sıvı kromatografisi- kütle spektrometrisi (UPLC-MS) (Lu vd., 2020), kütle spektrometrisi (Cho vd., 2019), UV spektrofotometrisi (Cho vd., 2019) ve sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez (SDS-Page) (Przysiecka vd., 2016; J. Yang, Wei, vd., 2019; J. Yang, Yin, vd., 2019) yöntemleri literatürde yer almaktadır. Bu çalışma iRGD peptidi analizi için geliştirilen ilk kapiler elektroforez yöntemidir.

Yöntemin validasyon parametreleri ICH ve USP'ye göre yapılmıştır. Doğrusallık, doğruluk, kesinlik, kararlılık ve sağlamlık testleri yapılmıştır. Doğrusallık testleri sonucunda iRGD peptidinin analizinde 5.27×10^{-6} M ile 6.33×10^{-5} M arasında doğrusal olduğu görülmüştür. Günler arası regresyon değerleri hesaplanmış ve günler arası R^2 değeri 0.99 olarak bulunmuştur. Doğruluk ve kesinlik için %geri kazanım ve %BSS değerleri hesaplanmıştır. Kararlılık testi 3 şekilde yapılmıştır. Kısa dönem kararlılık testi için 24 saat oda koşullarında bekletilmiş, %BSS ve %geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. %geri kazanım değeri %98.1-100.5 arasında değişmektedir. Uzun dönem kararlılık testi için 1 ay -20°C'de bekletilmiş çözeltiler kullanıldı. %BSS ve %geri kazanım hesaplandı. %geri kazanım değeri %100-101.3 arasında bulunmuştur. Dön-çöz kararlılık testi 3 döngü şeklinde yapılmış %BSS ve %geri kazanım hesaplanmıştır. %geri kazanım değeri %96.6-100.7 arasında olduğu görülmüştür. Sağlamlık testleri de yapılmış ve %geri kazanım hesaplanmıştır. Sisteme uygunluk parametreleri de verilmiştir ve değerler kabul sınırları içindedir.

Yöntemin geçerliliği bulunduktan sonra formülasyona uygulanmıştır. Formülasyon içerisinde iRGD içeren ve içermeyen şekilde hazırlanmıştır. Poloksamer, kitosan, MEIS-inhibitör 2 isimli kanser ilacı ve bu ilacın yüklü olduğu albumin nanopartikülleri içeren boş formülasyon 3 tekrarlı analiz edilmiştir. Aynı şekilde

hazırlanmış formülasyona iRGD peptide eklenerek peptit içeren formülasyonda 3 tekrarlı analiz edilmiştir. Boş formülasyonda ve peptitli formülasyonda bulunan pik elektroferogramda gösterilmiştir (Şekil 5.5). Peptit içeren elektroferogramda da peptidin piki net olarak gözlemlenmiştir.

Yapılan bu yöntem iRGD peptidinin analizi için geliştirilen ilk kapiler elektroforez yöntemidir. iRGD peptide günümüzde antikanser formülasyonlarında önemli bir tümör tanımlama motifi olarak kullanılmaktadır. Analizi de gelecekte yapılacak çalışmalarda önemli bir yer tutacaktır.



KAYNAKÇA

Arduino, I., Liu Z., Iacobazzi, R.M., Lopedota, A.A., Lopalco, A., Cutrignelli, A., Laquintana, V., Porcelli, L., Azzariti, A., Franco, M., Santos, H.A., Denora, N. (2021). Microfluidic preparation and in vitro evaluation of iRGD-functionalized solid lipid nanoparticles for targeted delivery of paclitaxel to tumor cells. *International Journal of Pharmaceutics*, (610), 121246.

Baker, D.R. (1995). *Capillary electrophoresis*. New York: John Wiley&Sons Inc.

Cho, H. J., Lee, S.J., Park, S.J., Paik, C.H., Lee, S.M., Kim, S., Lee, Y.S. (2016). Activatable iRGD-based peptide monolith: Targeting, internalization, and fluorescence activation for precise tumor imaging. *Journal of Controlled Release*, (237), 177–184.

Cho, H.J., Park, S.J., Lee, Y.S., Kim, S., (2019). Theranostic iRGD peptide containing cisplatin prodrug: Dual-cargo tumor penetration for improved imaging and therapy. *Journal of Controlled Release*, (300), 73–80.

Glynn, J.R., Belongia, B.M., Arnold, R.G., Ogden, K.L., Baygents, J.C. (1998). Capillary electrophoresis measurements of electrophoretic mobility for colloidal particles of biological interest. *Applied and Environmental Microbiology*, (64)(7), 2572–2577.

Hu, C., Huang, Y. ve Chen, Y. (2019). Targeted Modification of the Cationic Anticancer Peptide HPRP-A1 with iRGD to Improve Specificity, Penetration, and Tumor-Tissue Accumulation. *Molecular Pharmaceutics*, (16)(2), 561–572.

Jorgenson, J.W. ve Lukacs, K.D.A. (1981). High-resolution separations based on electrophoresis and electroosmosis. *Journal of Chromatography A*, (218)(C), 209–216.

Kadonosono, T., Yamano, A., Goto, T., Tsubaki, T., Niibori, M., Kuchimaru, T., Kondoh, K.S. (2015). Cell penetrating peptides improve tumor delivery of cargos through neuropilin-1-dependent extravasation. *Journal of Controlled Release*, (201), 14–21.

Kang, S., Lee, S. ve Park, S. (2020). iRGD peptide as a tumor-penetrating enhancer for tumor-targeted drug delivery. *Polymers*, (12)(9), 1906.

Lele, M., Lele, S.M., Petersen, J.R., Mohammad, A. (2003). Capillary Electrophoresis: General Overview and Applications in the Clinical Laboratory. *Clinical and Forensic Applications of Capillary Electrophoresis*, 3–19.

Lu, L., Zhao, X., Fu, T., Li, K., He, Y., Luo, Z., Dai, L., Zeng, R., Cai, K. (2020). An iRGD-conjugated prodrug micelle with blood-brain-barrier penetrability for anti-

glioma therapy. *Biomaterials*, (230), 119666.

Meek, K.M., Quantock, A.J., Boote, C., Liu, C.Y., Kao, W.W.Y. (2003). An X-ray scattering investigation of corneal structure in keratocan-deficient mice. *Matrix Biology*, (22)(6), 467–475.

Ontario, O. F. (2015). *Report the. III*(4), 188–189.

Peng, Z.H. ve Kopeček, J. (2014). Synthesis and activity of tumor-homing peptide iRGD and histone deacetylase inhibitor valproic acid conjugate. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, (24)(8), 1928–1933.

Pierschbacher, M.D. ve Ruoslahti, E. (1984). Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature*, (309)(5963), 30–33.

Pooladanda, V., Thatikonda, S., Sunnapu, O., Tiwary, S., Vemula, P.K., Talluri, M.V.N.K., Godugu, C. (2021). iRGD conjugated nimbolide liposomes protect against endotoxin induced acute respiratory distress syndrome. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 33, 102351.

Przysiecka, Ł., Michalska, M., Nowaczyk, G., Peplińska, B., Jesionowski, T., Schneider, R., Jurga, S. (2016). iRGD peptide as effective transporter of CuInZnS₂ + x quantum dots into human cancer cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, (146), 9–18.

Simón-Gracia, L., Hunt, H., Scodeller, P., Gaitzsch, J., Kotamraju, V.R., Sugahara K.N., Tammik, O., Ruoslahti, E., Battaglia, G., Teesalu, T. (2016). iRGD peptide conjugation potentiates intraperitoneal tumor delivery of paclitaxel with polymersomes. *Biomaterials*, (104), 247–257.

Song, Y., Xu, M., Li, Y., Li, Y., Gu, W., Halimu, G., Fu, X., Zhang, H., Zhang, C. (2020). An iRGD peptide fused superantigen mutant induced tumor-targeting and T lymphocyte infiltrating in cancer immunotherapy. *International Journal of Pharmaceutics*, (586), 119498.

Sugahara, K.N., Teesalu, T., Karmali, P.P., Kotamraju, V.R., Agemy, L., Girard, O.M., Hanahan, D., Mattrey, R.F., Ruoslahti, E. (2009). Tissue-Penetrating Delivery of Compounds and Nanoparticles into Tumors. *Cancer Cell*, (16)(6), 510–520.

Teesalu, T., Sugahara, K.N., Ramana, V., Ruoslahti, E. (2009). C-end rule peptides mediate neuropilin-1-dependent cell , vascular , and tissue penetration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, (106)(38), 16157-16162.

Teesalu, T., Sugahara, K.N. ve Ruoslahti, E. (2013). Tumor-penetrating peptides. *Frontiers in Oncology*, (3), 1–8.

Yang, J., Wei, Y., Yin, H., Fang, L., Chai, D., Li, H., Li, H., Zhang, Q., Zheng, J. (2019). Modification of IL-24 by tumor penetrating peptide iRGD enhanced its antitumor efficacy against non-small cell lung cancer. *International Immunopharmacology*, (70), 125–134.

Yang, J., Yin, H., Wei Y, Fang L, Chai D, Zhang Q, Zheng, J. (2019). Tumor-Penetrating Peptide Enhances Antitumor Effects of IL-24 Against Prostate Cancer. *Translational Oncology*, (12)(3), 453–461.

Yang, Y., Wang, X., Liao, G., Liu, X., Chen, Q., Li, H., Lu, L., Zhao, P., Yu, Z. (2018). iRGD-decorated red shift emissive carbon nanodots for tumor targeting fluorescence imaging. *Journal of Colloid and Interface Science*, (509), 515–521.

Ye, Y., Zhu, L., Ma, Y., Niu, G., Chen, X. (2011). Synthesis and evaluation of new iRGD peptide analogs for tumor optical imaging. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, (21)(4), 1146–1150.

Zhang, L., Xing, Y., Gao, Q., Sun, X., Zhang, D., Cao, G. (2017). Combination of NRP1-mediated iRGD with 5-fluorouracil suppresses proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, (93), 1136–1143.

