

TEKNOFEST

HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ FESTİVALİ

BİYOTEKNOLOJİ İNOVASYON YARIŞMASI

PROJE DETAY RAPORU

ÜNİVERSİTE VE ÜZERİ SEVİYESİ PROJE

KATEGORİSİ

TAKIM ADI

PepCan

PROJE ADI

Meme Kanserine Yönelik Fotodinamik Terapi Uygulamalarında
Kullanılmak Üzere Peptid Tabanlı Enjekte Edilebilir Hidrojellerin

Geliştirilmesi

BAŞVURU ID

407320

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|----|
| 1. Proje Özeti (Proje Tanımı)..... | 2 |
| 2. Problem/Sorun | 3 |
| 3. Çözüm | 4 |
| 4. Yöntem | 5 |
| 4.1.İP1. Peptid Sentezi | 5 |
| 4.2.İP2. TAT Peptid ile Klorin e6 Konjugasyonu..... | 6 |
| 4.3.İP3. TAT Peptid-Klorin e6 ile PEGDA Hidrojelinin Konjugasyonu..... | 7 |
| 4.4.İP4. TAT-Klorin e6-PEGDA Hidrojelin Karakterizasyonu..... | 7 |
| 4.5.İP5. PEGDA Hidrojel Üretimi | 7 |
| 4.6.İP6. Peptid Hidrojellerin İçine Hücre Enkapsülasyonu | 8 |
| 4.7.İP7. Fotodinamik Terapi Uygulaması | 9, |
| 4.8.İP8. MTT Uygulanması..... | 9 |
| 4.9.İP9. Elde Edilen Verilerin İstatiksel Analizi | 9 |
| 5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü..... | 9 |
| 6. Uygulanabilirlik | 10 |
| 7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması..... | 11 |
| 8. Proje Fikrinin Hedef Kitle (Kullanıcılar) | 13 |
| 9. Riskler | 14 |
| 10. Kaynaklar | 15 |

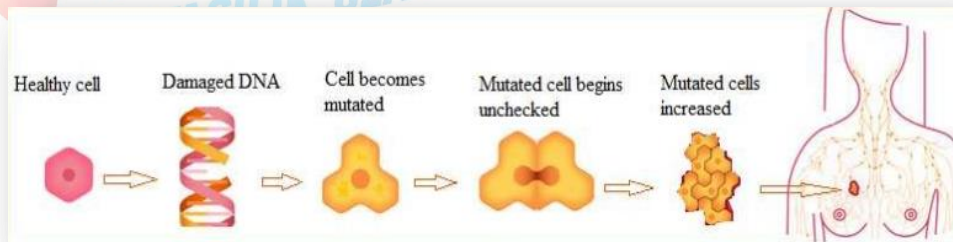
1. Proje Özeti (Proje Tanımı) (5 puan)

Dünya sağlık örgütünün 2020 yılı için yayınladığı verilere göre Dünya’da 684.996 kişi meme kanserinden dolayı hayatını kaybetmiştir. Geleneksel tedavi yöntemlerine ek olarak son zamanlarda meme kanserinin ilaç taşınım uygulamaları gibi doku mühendisliği yaklaşımı ile tedavisi var olan yöntemlerinin olumsuz etkilerini minimuma indirebilmek amacı ile hız kazanmıştır (Senapati, Mahanta, Kumar, Maiti, & therapy, 2018). Doku mühendisliğinde sıklıkla kullanılan hidrojeller, yüksek miktarda su tutan ve suda çözünür polimerlerin çapraz bağlanmasıyla oluşan üç boyutlu ağlardan meydana gelmektedir (Caló & Khutoryanskiy, 2015; Hoare & Kohane, 2008). Hidrojeller yüksek biyoyumluluk özelliklerinden dolayı ilgili ilacı hücre hattına iletebilmek için uygun platformu sağlarlar (Senapati et al., 2018). Poli(etilen glikol) diakrilat (PEGDA) hidrojeli PEG hidrojelinin diakrilat ile işlevselleştirilmesi sonucunda oluşur ve kontrollü ilaç taşınım uygulamalarında sıklıkla tercih edilmektedir (Ramanan, Chellamuthu, Tang, & Nguyen, 2006). İlaç taşınım ile tedavi yöntemlerinde tümör bölgesine spesifik ilacın lokal olarak iletilebilmesi için ilgili hedefin tanınması gerekir. Bu nedenle peptidin ilgili hücreyi tanıyabilmesi ve bağlandığı ilacı hedef hücre içerisine iletebilmesi için hücre geçirgen özelliğe sahip olması gerekir (Stewart, Horton, Kelley, & chemistry, 2008). TAT peptidi bazı tümör hücrelerinde var olan spesifik

reseptöre bağlanarak anti tümör etki yaratır (Fogal, Zhang, Krajewski, & Ruoslahti, 2008). Örneğin, MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin membranında bulunan spesifik p32 reseptörü TAT peptidi tarafından tanınır. Son zamanlarda fotodinamik terapinin enjekte edilebilir hidrojelleri ile entegre edilmesi ilaç taşınım uygulamalarında kullanılmaya başlanmıştır (Zhang, Xia, Chen, Chen, & Wu, 2017). Fotodinamik terapide ışığa duyarlı ajanlar (fotosensitizanlar) belirli dalga boylarındaki lazer ışınlarına maruz bırakılarak ışına maruz kalan dokularda etkinlik gösterir ve ilgili bölgede bulunan tümör hücrelerini öldürür (Agostinis et al., 2011). Bu sensitizanlardan klorin e6, 650-670nm dalgaboyu aralığındaki ışınları yüksek boyutta absorbe edebilme özelliğinden dolayı sıklıkla tercih edilmektedir (Juzeniene & therapy, 2009; Kumari, Rompicharla, Bhatt, Ghosh, & Biswas, 2019). Klorin e6'nın kanser hücrelerine spesifik biyoaktif moleküllerle kullanımının sadece ilgili tümör hücrelerinde etki göstermesi ile kullanılan dozu azaltılıp anti tümör etkinin artırılmasına dair çalışmalar mevcuttur (Josefsen & Boyle, 2008). Bu projenin amacı fotodinamik terapi ile TAT peptidi konjuge klorin e6 ile fonksiyonelleştirilmiş enjekte edilebilir PEGDA hidrojelinin meme kanseri hedefli antitümör etkisinin incelenmesidir. Projede ilk olarak TAT peptidi sentezlenecek ardından Klorin e6 ile konjuge edilecektir. TAT peptid konjuge Klorin e6 PEGDA hidrojeli ile birleştirilerek ve içerisine MDA-MB-231 meme kanseri hücresi enkapsüle edilecektir. Ardından 660 nm dalgaboyundaki lazer ile fotodinamik terapi uygulaması yapılacaktır. Tedavinin etkinliğini ölçmek için MTT testi ile hücre canlılık tayini yapılacaktır.

2. Problem/Sorun (5 puan)

Kadınlarda en çok görülen kanser türü olan meme kanserinin tedavisi için çeşitli tedavi yaklaşımları mevcuttur (Fahad Ullah & Resistance, 2019). Meme kanserinin tedavisine yönelik yapılan cerrahi operasyonlar esnasında lenf düğümlerinin çıkarılması ve radyasyon tedavisi gibi yöntemlerin hasta üzerinde birçok yan etkisi vardır (Waks & Winer, 2019). Yine sıklıkla tercih edilen geleneksel kemoterapi yöntemi ise kanser hücrelerinin DNA sentezine ve hücre bölünmesine müdahale ederek hücreyi öldürür ancak bu süreçte sağlıklı dokunun tümörlü dokudan ayırt edilmesi mümkün olmadığından işlem sırasında sağlıklı doku da fazlasıyla zarar görür.



Şekil 1. Meme Kanseri Oluşum Aşamaları (Al-Hagery & Research, 2016)

Günümüzde var olan klasik tedavi yöntemlerine ek olarak ilaç taşınım uygulamaları tercih edilmeye başlamıştır. Hidrojeller içerdikleri büyük gözenekli yapıları ve jel matrisindeki çapraz bağlarının fazlalığı gibi barındırdıkları fiziksel özellikleri ile ilaç taşıma uygulamalarında büyük önem taşımaktadırlar (Hoare & Kohane, 2008). Yerde

fotopolimerizasyon ile oluşan PEGDA hidrojel peritümöral enjekte edilebilirliği sayesinde ilaç iletimini minimal invaziv yolla gerçekleştirilmesine olanak sağlar (Chang et al., 2019). Ancak PEGDA hidrojelinin biyolojik olarak aktif bir molekül içermemesinden dolayı hücre üzerinde etkinliği yoktur (Lensen, Schulte, Diez, & InTech, 2011). PEGDA hidrojeline küçük bioaktif peptid moleküllerinin dahil edilmesi, bu peptitlerin pH veya sıcaklık değişikliklerine karşı yüksek direnç ve kimyasal bileşim üzerinde hassas kontrol kabiliyetleri gibi avantajları nedeniyle ilaç taşınım yaklaşıklarında sıklıkla tercih edilmektedir (Kurrikoff, Aphkhasava, & Langel, 2019; Laakkonen et al., 2004). Peptidler kanser tedavisinde belirli kanser hücrelerini hedef almada ve ilgili ilacın biyolojik bariyerleri aşarak hedeflenen bölgeye iletiminde doğal proteinleri taklit etmek için bir araç olarak kullanılması sebebi ile kanser tedavisinde büyük potansiyele sahiptirler. TAT peptidi MDA-MB-231 kanser hücresi hattına spesifik olarak bağlanabilme yeteneği sayesinde kanser tedavilerine yönelik ilaç salınım tedavilerinde son zamanlarda tercih edilmektedir. MDA-MB-231 kanser hattının hücre zarında var olan p32 reseptörüne bağlanarak etkileşim gerçekleşir ve ilaç taşınımı için hücre zarına nüfuz ederek çekirdek ve sitoplazmaya girebilir (Laakkonen et al., 2004; Timur, Bhattarai, Gürsoy, Vural, & Khaw, 2017). Fotodinamik terapi, Klorin e6 gibi fotosensitizanların belirli dalga boylarındaki aktivasyonu ile kanser tedavisinde kullanılır (Lamberti, Vittar, & Rivarola, 2014). Klorin e6, ışıktan aldığı enerjiyi moleküler oksijene taşıyarak reaktif oksijen türlerini oluşturur ve bunun sonucunda kanser hücreleri reaktif oksijen türleri tarafından direkt olarak öldürülebilir (Agostinis et al., 2011). Günümüzde meme kanserinde kullanılan çeşitli tedavilerin başında gelen kemoterapinin başlıca yan etkisi, içerdiği ajanlar nedeniyle kanser hücresiyle birlikte yanındaki sağlıklı hücreleri de öldürmesidir (Tanaka et al., 2009). İlaç dağıtımı tedavisindeki en temel amaç ilacın sağlıklı dokular üzerindeki olumsuz etkisini en aza indirirken aynı zamanda ilacı direkt olarak hedef bölgeye taşımaktır (Wang et al., 2017). Enjekte edilebilir hidrojel ile ilaçları lokal olarak diğer bir deyişle tümör hücrelerinin yanındaki sağlıklı dokuyu etkilemeden direkt olarak tümör hücresine serbest bırakarak var olan tedavi yöntemlerindeki problemleri minimuma indirmek hedeflenmektedir (Fan, Tian, & Liu, 2019).

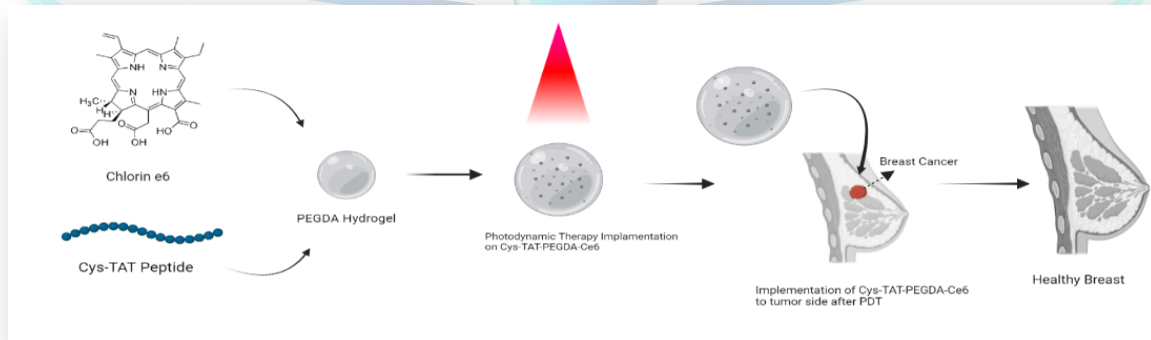
3. Çözüm (20 puan)

Bu projede TAT peptidi ile Klorin e6 konjugasyonunun PEGDA hidrojel ile birleştirilmesi sonucunda oluşan jelleşme ile MDA-MB-231 hücre hattının tedavisinde sağlıklı dokulara zarar vermeden lokal olarak kanser hücresini hedef alarak minimal invaziv yöntem ile tedavi amaçlanmaktadır. Meme kanseri tedavisinde var olan dezavantajlı tedavilere alternatif olarak enjekte edilebilir TAT konjuge Klorin e6/PEGDA hidrojelinin fotodinamik tedavi ile entegrasyonu ile kanser tedavisinde önemli bir başarı sağlayacağı düşünülmektedir. PEGDA hidrojelinin spesifik hücre tanımadaki eksikliği TAT ile entegre edilerek giderilebilir ve ilgili hücre hattına ilaç taşınımında etkinliği artırılabilir. Hücreyi öldürme mekanizması ise belirli dalga boylarındaki lazer ile aktif hale getirilen Klorin e6 fotosensitizanının içerdiği oksijen ile reaktif oksijen üretmesi prensibine dayanır (Josefsen & Boyle, 2008). Klorin e6'nın tümör hücresine spesifik bir moleküle entegre edilmesi sonucunda uygulama esnasında sağlıklı dokulara verilen zararı azaltılabilir. İlaç dağıtımı tedavisindeki en temel amaç ilacın sağlıklı dokular üzerindeki olumsuz etkisini en aza indirirken aynı zamanda ilacı direkt olarak hedef

bölgeye taşımaktır (Wang et al., 2017). Bu projede enjekte edilebilir hidrojel üretimi ile ilaçları lokal olarak diğer bir deyişle tümör hücrelerinin yanındaki sağlıklı dokuyu etkilemeden direkt olarak tümör hücresine serbest bırakarak var olan tedavi yöntemlerindeki problemleri minimuma indirmek hedeflenmektedir.

Proje çözümü doğrultusunda ulaşılması planlanan hedefler;

- 1-İlgili hücreyi tanıyarak PEGDA hidrojelinin hücre tutunma özelliğini arttıran TAT peptidinin sentezlenmesi
- 2-Kanser hücresi öldürmede etkili Klorin e6 'nın TAT ile konjugasyonu
- 3-MDA-MB-231 hücre hattını tanıyarak etkili TAT konjuge Klorin e6'nın PEGDA ile konjugasyonu
- 4-TAT konjuge Klorin e6 bağlı PEGDA hidrojelinin içerisine MDA-MB-231 hücre hattı enkapsülasyonu ve in vitro kültürasyonunun gerçekleştirilmesi
- 5-Üretilen TAT konjuge Klorin e6 bağlı PEGDA hidrojelinin MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattının üzerindeki etkisinin MTT analizi yardımıyla hücre canlılığı tayini yapılarak belirlenmesi
- 6-Üretilen TAT konjuge Klorin e6 bağlı PEGDA hidrojeli ile fotodinamik terapi uygulamasının MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattının üzerindeki etkisinin MTT analizi yardımıyla hücre canlılığı tayini yapılarak belirlenmesi



Şekil 2. TAT-PEGDA-Ce6'nın birleşimi sonucunda fotodinamik terapi uygulaması ardından meme kanseri bölgesine entegrasyonu sonucunda beklenen etkinin temsili şekli.

4. Yöntem (20 puan)

Projemizin Teknolojik hazırlık seviyesi başlangıç olarak THS 1 olarak belirlenmiştir. THS 1 aşamında Meme kanseri sorunu, var olan tedaviler ve bu tedavilerin çözümleri ve bunlara ek olarak var olan çözümlerin eksikleri gösterilmiştir. Projenin faaliyet aşamasında THS 6 seviyesine ulaşması hedeflenmektedir. Ardından THS 7 aşamasında prototip oluşturularak uygun ortam içerisinde test etmeyi planlamaktayız.

4.1.İP1. Peptid Sentezi

TAT peptidi (Tyr-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg) İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği Bölümü Doku Mühendisliği ve Rejeneratif Tıp Laboratuvarında, Fmoc ve Boc korumalı amino asitler ve Rink Amide AAPPTec rezin(sübstütüsyon=0.67 mol/g) kullanılarak sentezlenecektir. 4 mililitrelik Dimetilformamit

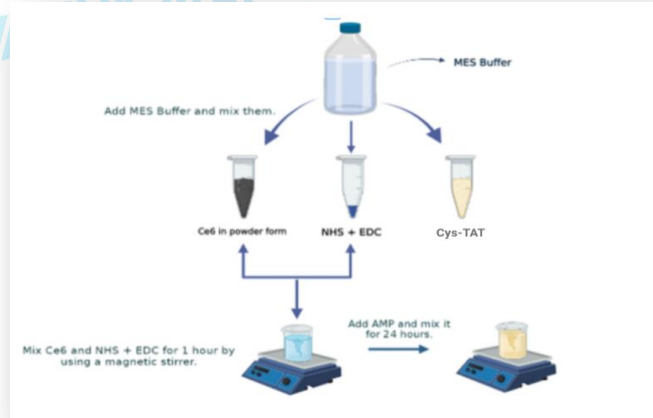
(DMF) solüsyonu içerisinde, 200 mg reçine 30 dakika boyunca bekletilip şişirilecektir. Daha sonra reçine, %20'lik piperidin-DMF solüsyonu içinde 15 dakika bekletilecek ve teker teker dizilimdeki aminoasitler eklenecektir. Reaksiyona girmeyen aminlerin varlığını kontrol etmek için belirli aşamalarda kaiser testi yapılacaktır. Pozitif çıkması durumunda %20'lik piperidine inkübasyondan pozitif sonuç alıncaya kadar devam edecektir. Bu işlem Fmoc koruma grubunun uzaklaştırıldığından emin olmak için yapılacaktır. Ardından reçine %95 TFA/ %2.5 TIPS/ %2.5 H₂O karışımında peptid çapraz bağlayıcısının reçineden ayrılması için iki saat boyunca bekletilecektir. Çözelti üç kez soğuk eter içerisine dökülecek ve santrifüj edilecek. Kalan sıvıların uçarak uzaklaşmasından sonra -20°C'de 24 saat bırakılacak ve katı kısım liyofilizasyon yapılarak kurutulacaktır (Luo et al., 2010).



Şekil 3. Sentezi Tamamlanan Katı Madde Aşamalı Cys-TAT Peptidi.

4.2.İP2. TAT Peptid ile Klorin e6 Konjugasyonu

Maleimid grubu içeren klorin e6 ticari olarak temin edilecektir. Tüm reaksiyonlar, oda sıcaklığında ve karanlıkta gerçekleştirilecektir. Klorin e6, peptid, ve EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide) sırasıyla molce 1:3:3 eşdeğer olacak şekilde hesaplanacaktır. 1 mol EDC için 2.5 mol NHS kullanılacaktır. Klorin e6 MES buffer (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid) içinde çözdürülecek ve Klorin e6'nın NHS esteri MES buffer içerisinde NHS ve EDC ile 1 saat tepkimeye sokulacaktır. Ardından TetraF2-RR peptidi MES bufferda çözdürülecek ve 1 saat bekletilen Klorin e6-NHS ester çözeltisine ilave edilecektir. 24 saat manyetik karıştırıcıda tepkimeye sokulacaktır. Ham konjugat solüsyonu daha sonra konjuge olmayan Klorin e6 ve peptidi uzaklaştırmak için distile su içerisinde 24 saat boyunca diyaliz edilecektir. Ardından liyofilize edilecek ve toz forma getirilecektir. Konjugatlar, PBS içinde uygun seyreltme sonrasında absorpsiyon spektroskopisi ile karakterize edilecektir.



Şekil 4. TAT peptidi ile Klorine6 konjugasyonunun temsili şekli.

4.3.İP3. TAT Peptid-Klorin e6 ile PEGDA Hidrojelinin Konjugasyonu

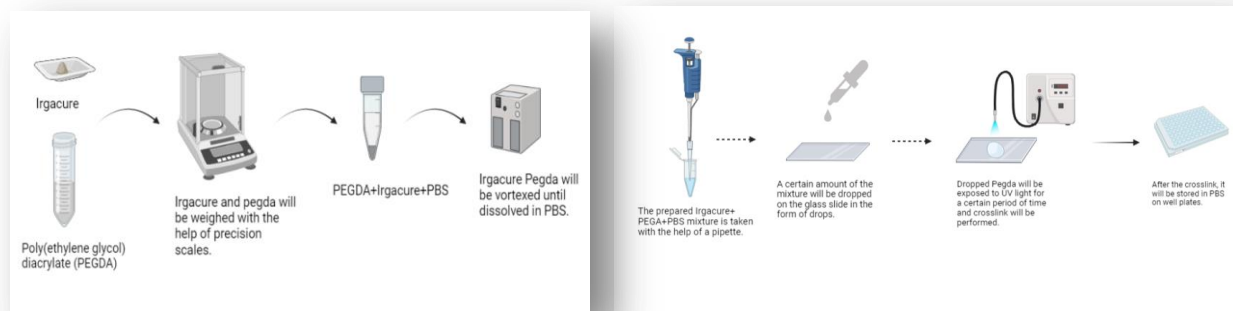
İlk olarak PEGDA, 100 mM sodyum fosfat tamponu (pH 8.0) içinde çözündürülecektir. PEGDA solüsyonu, sodyum fosfat tamponu içinde Cys-TAT peptidi ile 1.1 molar oranında reaksiyona girecek şekilde yapılacaktır. Peptidlerin C-terminal ucundaki sistin (Cys) , PEGDA ile Michael tipi ekleme reaksiyonuna izin vermektedir. Ardından çözelti ışıktan korunarak ve 24 saat karıştırılacaktır. Çözelti daha sonra 24 saat boyunca diyaliz ortamının düzenli olarak değiştirilmesiyle diyaliz hortumu kullanılarak Milli-Q suya karşı diyaliz edilecektir. Daha sonra çözelti -80 derecede dondurularak, liyofilize edilecektir ve bir sonraki kullanıma kadar 20°C'de saklanacaktır (Peter & Tayalia, 2016).

4.4.İP4. TAT-Klorin e6-PEGDA Hidrojelin Karakterizasyonu

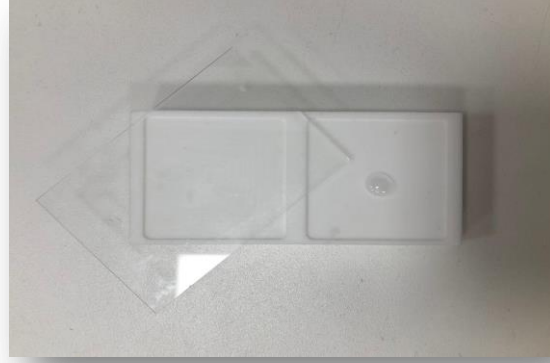
Peptid konjüge edilmiş PEGDA hidrojel reaksiyonunu sonrasında peptid'in üç boyutlu (3B) hidrojel yüzeyine kovalent bağlanmasının doğrulaması proje danışmanının daha önce kullandığı protokole bağlı kalınarak (Onak et al., 2018). Özetle, sentezlenen peptidler resin molekülünden koparılmadan önce fluoresin izotiyosiyanat (FITC) molekülü ile işaretlenecektir. İşaretleme (labeling) reaksiyonu peptid'in amino grubunda bulunan amin grupları ile FITC molekülündeki süksinimidil ester fonksiyonel grubu arasında gerçekleşecektir. Daha sonra FITC ile işaretlenen peptid kullanılarak hidrojel konjügasyonu yapılacaktır ve üretilen FITC-peptid-hidrojellerin yüzeyi inverted floresan mikroskop (Olympus, CKX41) ile görüntülenecektir. Kısaca, FITC ile işaretlenmiş peptidin PEGDA ile konjügasyonu gerçekleştirilecektir. Konjügasyon sonucunda elde edilen hidrojeller PBS içerisinde çözülerek floresan yoğunluğu 520 nm emisyon ve 495 nm eksitasyon dalga boylarında mikropilaka okuyucusu kullanılarak belirlenecektir. Elde edilen değerler FITC ile işaretlenmiş peptidin PBS içerisindeki belirli konsantrasyonları kullanılarak hazırlanan kalibrasyon eğrisi ile karşılaştırılarak peptid-hidrojel konjügasyonu reaksiyon verimliliği değerlendirilecektir.

4.5.İP5. PEGDA Hidrojel Üretimi

Projede kullanılacak PEGDA jellerinin üretimi PEGDA solüsyonlarına 2-hidroksi-4'-(2-hidroksietoksi)-2-metilpropiofenon (Irgacure 2959) solüsyonları karıştırılacaktır. Mekanik dayanım testlerinin sonuçları dahilinde 0.25µm filtreden geçirilecektir. Peptid-hidrojel konjügasyonuna hücre enkapsülasyonu gerçekleştirmiş hidrojel 8 mm çapındaki enjektöre istenilen kalınlıkta bir tabaka oluşturacak şekilde yerleştirilecektir. Daha sonra UV cihazı ile çapraz bağlama işlemi gerçekleştirilecektir.



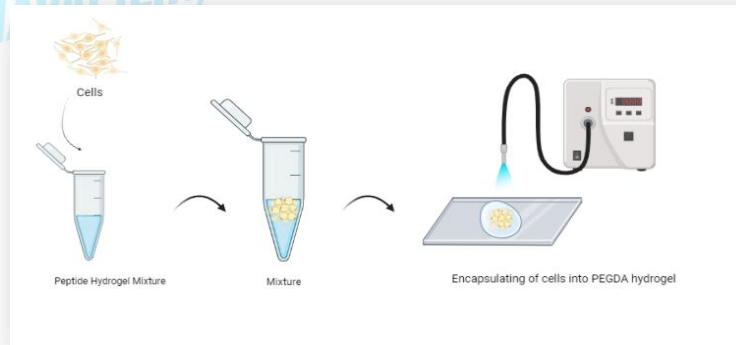
Şekil 5. PEGDA hidrojel üretiminin temsili şematik gösterimi.



Şekil 6. Üretimi tamamlanan PEGDA hidrojeni.

4.6.İP6. Peptid Hidrojellerin İçine Hücre Enkapsülasyonu

İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği Bölümü Doku Mühendisliği ve Rejeneratif Tıp Laboratuvarı'nda bulunana MDA-MB-237 hattı kullanılacaktır. Meme kanseri hücre besiyeri; DMEM besiyeri ortamı, %10 fetal sığır serumu (FBS), 100 U/ml penisilin ve 100 mg/ml streptomisinden oluşmaktadır. Hücreler bu besiyeri içerisinde standart polistiren hücre kaplarına ekilip ve daha sonra %5 CO₂ ve 37°C'de inkübe edilecek ve iki günde bir besiyeri ortamı değiştirilecektir. Hücre yoğunluğu %90'a ulaştığında pasajlama işlemi gerçekleştirilecektir. Pasajlama işlemi %0,25 tripsin/EDTA solüsyonu ile uygun pasaj oranında pasajlanacaktır. Yeterli miktarda stok oluşturabilmek için, meme kanseri hücreleri dondurma prosedürü uygulanarak dondurulacak ve sıvı azot tankında (ThermoScientific, Biocane 47) -196 °C'de stoklanacaktır (Karaman et al., 2016; Onak et al., 2018; Sendemir-Urkmez & Jamison, 2007). Hücreler steril PBS ile yıkanıp tripsinize edilecektir. 5x10⁶ hücre/mL hücre Irgacure 2959 içeren PEGDA solüsyonları içerisinde homojenize edilecektir. Hidrojel oluşumu için steril PTFE kalıp içerisine solüsyon dökülecek, UV ile jelleşme sağlandıktan sonra corkborer kullanılarak çapı 8 mm olan örnekler kesilecek ve 24 saat boyunca 37° C'de %5 CO₂ inkübatörde DMEM besiyeri varlığında kültive edilecektir. Vasat değişimi düzenli olarak yapılacak ve MDA-MB-231 hücreler dört hafta belirtilen besiyeri içerisinde kültive edileceklerdir.



Şekil 7. Peptid Hidrojellerin İçine Hücre Enkapsülasyonunun temsili gösterimi.

4.7.İP7. Fotodinamik Terapi Uygulaması

Klorin e6'nın 655 nm'de dalgaboyundaki dalgaboyunu absorbe edebildiğinden olduğundan dolayı, 655 nm dalgaboyundaki diyot lazer sistemi (PS4 III.LED; Changchun New Industries Optoelectronics Co. Ltd., Changchun, China) kullanılacaktır. Lazer cihazının optik fiberi, üzerinde MDA-MB-237 hücresi enkapsüle edilmiş hidrojelleri barındıran 96 kuyulu plakaların yerleştirildiği optik masaya dik olarak sabitlenecek ve optik masa üzerinde aydınlatma alanı belirlenecektir. Çıkış gücü, bir güç ölçer (Thorlabs, Almanya) ile 200 mW'a ayarlanacak ve hücreleri içeren tüm kuyucukların aynı miktarda lazer ışığı almasını sağlamak için her deneyden önce sistem kontrol edilecektir. Optimize edilecek güç yoğunluğu sabitlenip ardından ışığa maruz kalma süresi değiştirilerek farklı enerji yoğunluğunda uygulamalar yapılacaktır. Fotodinamik terapi uygulamalarında optimum enerji yoğunluğunu bulmak için belirlenen enerji yoğunluklarının etkisi MDA-MB-237 hücreleri üzerinde incelenecektir.

4.8.İP8. MTT Uygulanması

UV çaprazlama sonrasında elde edilen hidrojel yapılarının içerisine enkapsüle edilen hücrelerin hücre canlılığı analizini yapmak için MTT (Vybrant® MTT Cell Proliferation Assay Kit (Invitrogen) testi yapılacaktır (Liu vd., 1997). Bunun için 3-(4,5-dimetilazol-2-yl)-2,5-difenoltetrazol bromit) MTT 5 mg/mL lik fosfat tamponlu tuz çözeltisi içerisinde çözdürülecek ve 0.22 mm'lik şırınga kullanılarak filtre edilecektir. Her kuyucuğa MTT eklenecektir (her 450 µL besi ortamı için 50µL MTT). Plakalar 37°C'de 2 saat boyunca inkübe edilecek ardından besi ortamı kuyuculardan uzaklaştırılacaktır. Her kuyucuğa DMSO (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) ekledikten sonra mikro plaka okuyucu kullanarak 570 nanometrede optik yoğunluk ölçülecektir. (Synergy™ HTX- BioTek, Winooski, VT, USA).

4.9.İP9. Elde Edilen Verilerin İstatistiksel Analizi

Deney gruplarından minimum üçer örnek olmak üzere test edilecek ardından deneyler üç tekrarlı olacak şekilde yapılacaktır. Elde edilen sonuçların ortalama değerleri ve standart sapmaları alınacaktır. Standart hata değerleri rapora yazılacaktır. Gruplar arasındaki ikili ilişkiler Student t-test metodu kullanılarak yapılacak ve $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilecektir.

5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü (15 puan)

Meme kanseri tedavisinde uygulanan başlıca tedavilerden olan kemoterapi ve radyoterapi uygulamalarının kanseri tedavi etmesinin yanı sıra uygulanan bölgede önemli yan etkilere neden olur (Akram & Siddiqui, 2012; Nounou et al., 2015). Kemoterapide kullanılan ilacın yan etkisinin en büyük göstergesi saç dökülmesidir ve bu yan etki yaşam kalitesini büyük ölçüde olumsuz yönde etkilemektedir (Lemieux, Maunsell, Provencher, & Cancer, 2008). İleri teknoloji ile birlikte geleneksel radyoterapinin yan etkilerini minimuma indiren teknolojiler gelişmektedir. Bu teknolojilerden biri CyberKnife adlı teknolojidir, her ne kadar geleneksel

yöntemin dezavantajlarını minimuma indirmek için tasarlanmış olsa da baş ağrısı, katarak gibi sağlık sorunlarına sebep olabilir. Bunlara ek olarak yüksek maliyete ve özel eğitilmiş personele ihtiyaç duyulması en büyük dezavantajlarından biridir (Agarwal, Raghavan, Rathnadevi, & Rishi, 2019). Geleneksel ilaç taşıma tedavilerindeki var olan en önemli eksiklik ilacın tümör hücrelerine ulaşımındaki temel etken olan hücre tanıma seçiciliğinin az olmasıdır. Gelişen yöntemlerle birlikte hücre tanıma seçiciliğinin Fistenilen spesifik hedefleme boyutuna taşınması ile var olan eksikliğin giderilmesi beklenmektedir. İmplant bazlı meme kanseri tedavisi yaklaşımlarındaki meme rekonstrüksiyon tekniklerinin, hedef organın fiziksel olarak doğal halini yansıtmaması gibi avantajlarına rağmen kas dokusunda zedelenme, ağrı, implantın yerinden kaynaklı kas altında oluşan istenmeyen yan etkenler mevcuttur (Dhankhar et al., 2010). Enjekte edilebilir hidrojenlerin kullanımı doku uygulamalarında minimal invaziv bir yöntem olarak hücre ve ilaçların istenilen boyuttaki homojenize olarak kapsüllenmesine olanak sağlar. Onkoloji uygulamalarında hücre ve ilaç yüklü çeşitli hidrojenler kullanılmaktadır (Elias et al., 2015; Li, Rodrigues, & Tomas, 2012). Peptid bazlı hidrojenler biyouyumluluk, minimum toksisite ve biyoaktivite gibi önemli özellikleri sayesinde doku uygulamalarında yüksek potansiyele sahiptir (Liu, Zhang, Zhu, Liu, & Chen, 2019). Kanser tedavisi uygulamalarının olumsuz etkilerini iyileştirmeye yönelik ışığın kullanıldığı fotodinamik terapi uygulamaları hız kazanmıştır. Fotodinamik terapi spesifik dalga boylarındaki ışık ile aktifleşen fotosensitizanların kullanımı ile fotokimyasal tepkime sonucu hayati biyomoleküllerle etkileşime girerek kanser hücresinin öldürülmesine neden olur ancak fotokimyasal tepkime sonucu oluşan reaktif oksijenin yaşam süresinin kısa ve difüzyon yarıçapının küçük olmasından dolayı sınırlı uygulama alanına sahiptir. Bu sınırlamalardan dolayı bu projede Klorin e6 fotosentizanın hedeflenen bölgeye yerleştirilmesi ve istenilen sonucun alınması için tek başına uygulanması yeterli değildir. Bu noktada hidrojenler fotosensitizanların hedeflenen bölgeye teslimi için uygun platformu sağlayarak fotodinamik terapinin verimliliğini artırır (Zhang et al., 2017). Projenin yenilikçi yönü için, TAT peptidinin PEGDA hidrojeline entegre edilmesi ile MDA-MB-231 hücre hattında bulunan p32 reseptörünü spesifik olarak tanıyarak bağlanması sonucunda PEGDA hidrojeli ile, peptidin tanıdığı kanser hücresine ilaç taşınımının lokal olarak kontrollü bir şekilde yapılmasına olanak sağlanmayan minimal invaziv bir yöntem olarak ilaç taşınımında PEGDA hidrojin etkinliğinin artırılması sağlanacaktır (Ulijn et al., 2007).

6. Uygulanabilirlik (10 puan)

Projede elde edilecek sonuçlar doku mühendisliği ve biyomedikal mühendisliği gibi bilim dalları için değerli olup tıp biliminde önemli sorunlara çözüm niteliği taşımaktadır. Bu sonuçlar doğrultusunda “Meme Kanseri Yönelik Fotodinamik Terapi Uygulamalarında Kullanılmak Üzere Peptid Tabanlı Enjekte Edilebilir Hidrojelerin Geliştirilmesi” başlıklı makalenin SCI kapsamında dergilerde yayınlanması beklenmektedir. Diğer bir yandan klinik denemeler için önemli bir alt yapı oluşturacaktır. Proje kapsamında elde edilecek sonuçlar Biyomedikal Mühendisliği Topluluğu Toplantısı’nda (2022 BMES), her yıl düzenlenen Uluslararası Biyomedikal Bilim ve Teknoloji Konferansı’nda (BIOMED 2022) ve Medikal Teknolojileri Konferansı’nda (TIPTEKNO’22) sunulması beklenmektedir. Özellikle kadınlarda görülen meme kanserinin geleneksel tedavilerinin oluşturduğu dezavantajları

önlemek için geliştirilen enjekte edilebilir hidrojellerle ilaç taşınımı uygulamaları günden güne önem kazanmaktadır. Dünya sağlık örgütüne göre önümüzdeki 20 yıl içerisinde kadınlarda meme kanserinin %50.6 oranında artışı beklenmektedir. Bu oran göz önünde bulundurulduğunda meme kanseri tedavisinde hidrojel ile minimal invazif yolla ilaç taşınımı uygulaması önemli klinik etkiye sahiptir. Ülkemizde kullanılan implante edilebilir hidrojeller diğer birçok medikal ürün gibi büyük oranda ithal edilmektedir. Son zamanlarda dışa bağımlılığı minimuma indirmek için yerli üretime verilen çeşitli teşvik paketleri sonucu Ar-Ge tabanlı ürünlerin geliştirilmesi sağlanmaktadır. Bu konuda artan teşvik ve destekler göz önünde bulundurulduğunda proje kapsamında geliştirilecek olan peptid ile etkisi artırılmış ilaç yüklü hidrojelin meme kanseri tedavisinde medikal alanda önemli bir ürün olacağı kanaatindeyiz. Projenin sonuçlarına bağlı olarak peptid konjuge ilaçlı hidrojel üretimi ve kullanımına yönelik patent başvurusu yapılacaktır. Çalışma kapsamında yapılacak in vitro ve in vivo denemelerin başarılı sonuçlar vermesi durumunda klinik denemeler ile ürünün ticari bir model haline getirilmesine yönelik çalışmalar Bonegraft tarafından gerçekleştirilecektir. Proje kapsamında geliştirilecek enjekte edilebilir hidrojeller kullanılarak in vitro ve in vivo çalışmalarının ardından klinik çalışmalarına yönelik yeni projelerin hazırlanması proje ekibi tarafından planlanmaktadır. Ek olarak önümüzdeki dönemde açılacak olan COST proje çağrılarında meme kanseri tedavisinde ilaçlı doku iskelelerinin üretilmesine yönelik proje duyurusuna başvurulması planlanmaktadır.

7. Tahmini Maliyet ve Proje Zaman Planlaması (5 puan)

Tablo 1 . Proje Zaman Planlaması.

| No | İş Paketi | Kimler Tarafından Gerçekleşeceği | Zaman Aralığı |
|----|--|----------------------------------|---------------|
| 1 | Peptid Sentezi | Şerife ÖZCAN | 1-3 |
| 2 | TAT Peptid ile Clorine6 Konjugasyonu | Şerife ÖZCAN | 1-2 |
| 3 | TAT Peptid-Klorine6 ile PEGDA Konjugasyonu | Şerife ÖZCAN | 1-2 |
| 4 | TAT-Klorine6-PEGDA Hidrojelin Karakterizasyonu | Şerife ÖZCAN | 1-3 |

| | | | |
|---|---|--------------|-----|
| 5 | PEGDA Hidrojel Üretimi | Şerife ÖZCAN | 1-2 |
| 6 | Peptid Hidrojellerin İçine Hücre Enkapsülasyonu | Şerife ÖZCAN | 1-3 |
| 7 | Fotodinamik Terapi Uygulaması | Şerife ÖZCAN | 1-3 |
| 8 | MTT Uygulanması | Şerife ÖZCAN | 3-4 |
| 9 | Elde Edilen Verilerin İstatiksel Analizi | Şerife ÖZCAN | 1-2 |

Tablo 2. Tahmini Maliyet Tablosu.

| Malzeme Listesi | Maliyet | Kullanılacağı İş Paketi |
|---|---------|-------------------------|
| Pipet ucu, 1-10 ul hacimli, 1000 adet/poşet | 220 ₺ | İP 1-2 |
| Pipet ucu, 20-200 ul hacimli, 1000 adet/poşet | 240 ₺ | İP 1-2 |
| Pipet ucu, 100-1000 ul hacimli, 1000 adet/poşet | 300 ₺ | İP 1-2 |
| Eppendorf tüpleri 2 ml lik 500 adet/poşet | 250 ₺ | İP 1-2-3 |
| Eppendorf tüpleri 1,5 ml lik 1000 adet/poşet | 250 ₺ | İP 1-2-3 |
| Pudrasız Eldiven (küçük boy), 100 çift | 175 ₺ | Tüm iş paketlerinde |
| HATU (25 g) | 2500 ₺ | İP 1 |
| 50 mL Santrifüj Tüpü (200adet) | 740 ₺ | İP 1-2-3-4-5 |
| 15 mL Santrifüj Tüpü (200adet) | 740 ₺ | İP 1-2-3-4-5 |
| 96 kuyucuklu plaka (50 adet) | 1480 ₺ | İP 6 |
| 24 kuyucuklu plaka (50 adet) | 1500 ₺ | İP 6 |
| 2-Hydroxy-4'-(2-hydroxyethoxy)-2-methylpropiophenone (İrgacure 2959) 10 g | 1800 ₺ | İP 5 |
| Selüloz Membran Diyaliz Tüpü (6-8 kD) | 4520 ₺ | İP 3 |
| Klorin e6 (250 mg) | 5000 ₺ | İP 2-3-4 |
| EDC (N-Ethyl-diisopropylamine)5 g | 2540 ₺ | İP 2-3-4 |

| | | |
|--|---------------------|-------------------------|
| N-Hidroksisukkinimid(N-Hydroxysuccinimide) (NHS) 5 g | 1800 ₺ | İP 2-3-4 |
| Diklorometan (DCM) 2 L | 4000 ₺ | İP 1 |
| N,N-Dimetilformamid (DMF) 2L | 4000 ₺ | İP 1 |
| Triethanolamine Buffer (120 mL) | 2500 ₺ | İP 3 |
| MES 1-hydrate (100 g) | 5500 ₺ | İP 3 |
| MTT Kit | 7400 ₺ | İP 8 |
| Rink Amide MBHA Resin (25 g) | 12800 ₺ | İP 1 |
| Fmoc-Gln(Trt)-OH | 2400 ₺ | İP 1 |
| Fmoc-Tyr(<i>t</i> Bu)-OH (25g) | 2750 ₺ | İP 1 |
| Fmoc-Lys(Boc)-OH (25g) | 2000 ₺ | İP 1 |
| Fmoc-Arg(Pbf)-OH (25 g) | 3500 ₺ | İP 1 |
| Fmoc-Gly-OH | 2100 ₺ | İP 1 |
| Poly(ethylene glycol) diacrylate | 200 ₺ | İP 5 |
| Serological Pipet (5 ml/50 adet) | 1250 ₺ | İP 6 |
| Trypsin-EDTA solution (100ml) | 850 ₺ | İP 6 |
| Penicillin-Streptomycin (100 ml) | 750 ₺ | İP 6 |
| Diethyl ether (1L) | 450 ₺ | İP 1 |
| Flask (75 cm ² /18 adet) | 3050 ₺ | İP 6 |
| Flask (25 cm ² /25 adet) | 5200 ₺ | İP 6 |
| 5 mL Serological Pipet (50 adet) | 1250 ₺ | İP 2-3 |
| 10 mL Serological Pipet (50 adet) | 1150 ₺ | İP 2-3 |
| 25 mL Serological Pipet (50 adet) | 1710 ₺ | İP 2-3 |
| N,N-Diisopropylethylamine (100 mL) | 925 ₺ | İP 1 |
| Cyclohexylamine (2,5 L) | 1200 ₺ | İP 1 |
| Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM) (500 mL/2 adet) | 320 ₺ | İP 6 |
| FBS | 4600 ₺ | İP 6 |
| | Toplam Birim Fiyatı | Toplam Tutar+ KDV(% 18) |
| | 95.910 ₺ | 113.173,8 ₺ |

8. Proje Fikrinin Hedef Kitlesi (Kullanıcılar) (5 puan)

Türkiye’de 7.161 kişi meme kanserinden dolayı hayatını kaybetmiştir Günümüzde oldukça yaygın olarak görülen meme kanseri özellikleri kadınların hayatlarını önemli derecede olumsuz yönden etkilemektedir. Var olan geleneksel tedavi yöntemleri meme kanserinin tedavisi yanında bir çok yan etkiyi beraberinde getirmektedir. Özellikle kadınları etkilediği meme kanseri tedavisine yenilikçi bakış açısıyla geliştirilecek olan peptid-hidrojel-chlorine6 ile minimal invazif yöntem kullanılarak ilgili bölgeye enjeksiyonu ile var olan tüm tedavilerin olumsuz etkilerini minimuma indirgeyerek kadınların sağlıklı yaşantılarına en kısa sürede ulaşmaları hedeflenmektedir.

9. Riskler (10 puan)

Tablo 1. Olası risk analiz tablosu.

*.Aşağıda belirtilen risklerin puanı risk skoru belirleme matrisinden yararlanılarak değerlendirilmiştir.

| No | En Büyük Riskler | Risk Yönetimi (B Planı) | Risk Skoru |
|----|---|--|------------|
| 1 | Katı madde aşamalı peptid sentezi ile üretilecek peptid dizileri, saflaştırma ve karakterizasyon işlemlerinde belirlenebilecek peptid dizisinde sekans hatası olması halinde peptidin etkinliğini etkileyebileceğinden potansiyel bir risk oluşturmaktadır. | Sekans hatalarının oluşumu genellikle sentez sırasında amino asitlerin yan reaktif gruplarıyla bir önceki aminoasitin reaksiyona girmesi veya dizide eklenmesi diğer amino asitlere göre daha zor olan çoklu arjinin, sistin ve metionin gibi amino asitlerin varlığından kaynaklanmaktadır. Spesifik bir amino asitin peptid zincirine eklenmesinde zorluk çekilmesi durumunda N-ethyl-diisopropylamine (DIEA) ve HBTU (O-benzotriazole-N,N,N,N'-tetramethyl uronium- hexafluoro-phosphate) gibi etkin ekleme ajanlarının (coupling agents) literatürde belirtilen farklı konsantrasyonlarda birlikte kullanımı ile reaksiyon tekrarlanacaktır. | 2 |
| 2 | PEGDA hidrojel oluştururken UV ışınına maruz bırakıldığında jel haline gelmemesi problemi yaşanabilir. | UV parametreleri, mesafe, süre değiştirilerek PEGDA'nın jelleşme probleminin düzelmesi sağlanacaktır. | 4 |
| 3 | Peptidlerin hidrojellerin yüzeyine konjugasyon reaksiyonundan verimin yeterli olmaması ve peptid yüzey konsantrasyonunun düşük olması hidrojel tabakalarının immobilize etkinliklerinin etkilemesi önemli bir risk oluşturur. | Önerilen yöntemlerin peptid konjugasyonunda etkin konjugasyon sağlanamaması durumunda EDC/NHS (3-Glycidylxypropyl) trimethoxysilane veya (3-Aminopropyl)triethoxysilane ile alternatif reaksiyonlar denenecektir. | 6 |

| | | | |
|---|---|--|---|
| 4 | PEGDA hidrojelinde Klorin e6 konsantrasyonun yeterli gelmemesi ilgili anti kanser yanıtının oluşmasını engelleyebilir | TAT 1 peptidine Klorin e6 conjugasyonu esnasında Klorin e6 konsantrasyonunun artırılması denenecektir. İlgili konsantrasyon bu durumda da sağlanmazsa reaksiyon verimini arttırmak için Klorin e6' da bulunan maleimid grublarının artırılmasına yönelik çalışmalar gerçekleştirilecektir. | 9 |
|---|---|--|---|

| <i>RISK SKORU BELİRLEME MATRİSİ</i> | | | | | |
|-------------------------------------|-----------------------|-----------------------|--------------|--------------|-----------------------|
| <i>OLASILIK</i> | 1 ÇOK HAFIF | 2 HAFIF | 3 ORTA | 4 CİDDİ | 5 ÇOK CİDDİ |
| 1 ÇOK AZ | 1 İHMAL EDİLEBİLİR | 2 İHMAL EDİLEBİLİR | 3 DÜŞÜK | 4 DÜŞÜK | 5 DÜŞÜK |
| 2 AZ | 2 İHMAL EDİLEBİLİR | 4 DÜŞÜK | 6 DÜŞÜK | 8 ORTA | 10 ORTA |
| 3 ORTA | 3 DÜŞÜK | 6 DÜŞÜK | 9 ORTA | 12 ORTA | 15 YÜKSEK |
| 4 YÜKSEK | 4 DÜŞÜK | 8 ORTA | 12 ORTA | 16 YÜKSEK | 20 YÜKSEK |
| 5 ÇOK YÜKSEK | 5 DÜŞÜK | 10 ORTA | 15 YÜKSEK | 20 YÜKSEK | 25 TOLERE EDİLEMEZ |

Tablo2. Risk skoru belirleme matrisi.

10. Kaynaklar (5 puan)

- Agarwal, A., Raghavan, V., Rathnadevi, R., & Rishi, P. J. I. J. o. O. (2019). Treatment of circumscribed choroidal hemangioma using CyberKnife: A viable alternative. *67*(5), 704.
- Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. A., Foster, T. H., Girotti, A. W., Gollnick, S. O., . . . Kessel, D. J. C. a. c. j. f. c. (2011). Photodynamic therapy of cancer: an update. *61*(4), 250-281.
- Akram, M., & Siddiqui, S. J. I. j. o. c. (2012). Breast cancer management: past, present and evolving. *49*(3), 277.
- Al-Hagery, M. A. H. J. I. J. o. A. B., & Research. (2016). Classifiers' Accuracy Based on Breast Cancer Medical Data and Data Mining Techniques. *7*(2), 760-772.
- Caló, E., & Khutoryanskiy, V. V. J. E. p. j. (2015). Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *65*, 252-267.
- Chang, G., Zhang, H., Li, S., Huang, F., Shen, Y., Xie, A. J. M. S., & C, E. (2019). Effective photodynamic therapy of polymer hydrogel on tumor cells prepared using methylene blue sensitized mesoporous titania nanocrystal. *99*, 1392-1398.

- Dhankhar, R., Vyas, S. P., Jain, A. K., Arora, S., Rath, G., Goyal, A. K. J. A. C., Blood Substitutes, & Biotechnology. (2010). Advances in novel drug delivery strategies for breast cancer therapy. *38*(5), 230-249.
- Elias, P. Z., Liu, G. W., Wei, H., Jensen, M. C., Horner, P. J., & Pun, S. H. J. J. o. c. r. (2015). A functionalized, injectable hydrogel for localized drug delivery with tunable thermosensitivity: synthesis and characterization of physical and toxicological properties. *208*, 76-84.
- Fahad Ullah, M. J. B. C. M., & Resistance, D. (2019). Breast cancer: current perspectives on the disease status. 51-64.
- Fan, D.-y., Tian, Y., & Liu, Z.-j. J. F. i. c. (2019). Injectable hydrogels for localized cancer therapy. 675.
- Fogal, V., Zhang, L., Krajewski, S., & Ruoslahti, E. J. C. r. (2008). Mitochondrial/cell-surface protein p32/gC1qR as a molecular target in tumor cells and tumor stroma. *68*(17), 7210-7218.
- Hoare, T. R., & Kohane, D. S. J. p. (2008). Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *49*(8), 1993-2007.
- Josefsen, L. B., & Boyle, R. W. J. M.-b. d. (2008). Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers. 2008.
- Juzeniene, A. J. P., & therapy, p. (2009). Chlorin e6-based photosensitizers for photodynamic therapy and photodiagnosis. *2*(6), 94-96.
- Karaman, O., Kumar, A., Moeinzadeh, S., He, X., Cui, T., Jabbari, E. J. J. o. t. e., & medicine, r. (2016). Effect of surface modification of nanofibres with glutamic acid peptide on calcium phosphate nucleation and osteogenic differentiation of marrow stromal cells. *10*(2), E132-E146.
- Kumari, P., Rompicharla, S. V. K., Bhatt, H., Ghosh, B., & Biswas, S. J. N. (2019). Development of chlorin e6-conjugated poly (ethylene glycol)-poly (d, l-lactide) nanoparticles for photodynamic therapy. *14*(7), 819-834.
- Kurrikoff, K., Aphkhazava, D., & Langel, Ü. J. C. o. i. p. (2019). The future of peptides in cancer treatment. *47*, 27-32.
- Laakkonen, P., Åkerman, M. E., Biliran, H., Yang, M., Ferrer, F., Karpanen, T., . . . Ruoslahti, E. J. P. o. t. N. A. o. S. (2004). Antitumor activity of a homing peptide that targets tumor lymphatics and tumor cells. *101*(25), 9381-9386.
- Lamberti, M. J., Vittar, N. B. R., & Rivarola, V. A. J. W. J. o. C. O. (2014). Breast cancer as photodynamic therapy target: Enhanced therapeutic efficiency by overview of tumor complexity. *5*(5), 901.
- Lemieux, J., Maunsell, E., Provencher, L. J. P. O. J. o. t. P., Social, & Cancer, B. D. o. (2008). Chemotherapy-induced alopecia and effects on quality of life among women with breast cancer: a literature review. *17*(4), 317-328.
- Lensen, M. C., Schulte, V. A., Diez, M. J. B. P., & InTech, C. (2011). Cell Adhesion and spreading on an intrinsically anti-adhesive PEG biomaterial. 397-414.
- Li, Y., Rodrigues, J., & Tomas, H. J. C. S. R. (2012). Injectable and biodegradable hydrogels: gelation, biodegradation and biomedical applications. *41*(6), 2193-2221.
- Liu, C., Zhang, Q., Zhu, S., Liu, H., & Chen, J. J. R. a. (2019). Preparation and applications of peptide-based injectable hydrogels. *9*(48), 28299-28311.

- Luo, G., Yu, X., Jin, C., Yang, F., Fu, D., Long, J., . . . Lu, W. J. I. j. o. p. (2010). LyP-1-conjugated nanoparticles for targeting drug delivery to lymphatic metastatic tumors. *385*(1-2), 150-156.
- Nounou, M. I., ElAmrawy, F., Ahmed, N., Abdelraouf, K., Goda, S., Syed-Sha-Qhattal, H. J. B. c. b., & research, c. (2015). Breast cancer: conventional diagnosis and treatment modalities and recent patents and technologies. *9*, BCBCR. S29420.
- Onak, G., Şen, M., Horzum, N., Ercan, U. K., Yaralı, Z. B., Garipcan, B., & Karaman, O. J. S. r. (2018). Aspartic and glutamic acid templated peptides conjugation on plasma modified nanofibers for osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: a comparative study. *8*(1), 1-15.
- Peter, M., & Tayalia, P. J. R. a. (2016). An alternative technique for patterning cells on poly (ethylene glycol) diacrylate hydrogels. *6*(47), 40878-40885.
- Ramanan, R. M. K., Chellamuthu, P., Tang, L., & Nguyen, K. T. J. B. p. (2006). Development of a temperature-sensitive composite hydrogel for drug delivery applications. *22*(1), 118-125.
- Senapati, S., Mahanta, A. K., Kumar, S., Maiti, P. J. S. t., & therapy, t. (2018). Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance. *3*(1), 1-19.
- Sendemir-Urkmez, A., & Jamison, R. D. J. J. o. B. M. R. P. A. (2007). The addition of biphasic calcium phosphate to porous chitosan scaffolds enhances bone tissue development in vitro. *81*(3), 624-633.
- Stewart, K. M., Horton, K. L., Kelley, S. O. J. O., & chemistry, b. (2008). Cell-penetrating peptides as delivery vehicles for biology and medicine. *6*(13), 2242-2255.
- Tanaka, T., Decuzzi, P., Cristofanilli, M., Sakamoto, J. H., Tasciotti, E., Robertson, F. M., & Ferrari, M. J. B. m. (2009). Nanotechnology for breast cancer therapy. *11*(1), 49-63.
- Timur, S. S., Bhattarai, P., Gürsoy, R. N., Vural, İ., & Khaw, B.-A. J. P. r. (2017). Design and in vitro evaluation of bispecific complexes and drug conjugates of anticancer peptide, LyP-1 in human breast cancer. *34*(2), 352-364.
- Ulijn, R. V., Bibi, N., Jayawarna, V., Thornton, P. D., Todd, S. J., Mart, R. J., . . . Gough, J. E. J. M. t. (2007). Bioresponsive hydrogels. *10*(4), 40-48.
- Waks, A. G., & Winer, E. P. J. J. (2019). Breast cancer treatment. *321*(3), 316-316.
- Wang, Y., Cheetham, A. G., Angacian, G., Su, H., Xie, L., & Cui, H. J. A. d. d. r. (2017). Peptide–drug conjugates as effective prodrug strategies for targeted delivery. *110*, 112-126.
- Zhang, X., Xia, L.-Y., Chen, X., Chen, Z., & Wu, F.-G. J. S. C. M. (2017). Hydrogel-based phototherapy for fighting cancer and bacterial infection. *60*(6), 487-503.