

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın yapılmasının her aşamasında bilgisi ve becerisi ile beni yönlendiren, eşsiz desteği ile bana her konuda yardımcı olan, akademik kariyerimde bugüne gelmemde emeği olan değerli hocam ve danışmanım Biyomühendislik Bölümü Başkan Yardımcısı Yrd. Doç. Dr. Zeynep Akdeste'ye,

Engin bilgisi ve yapmış olduğu değerlendirmeleri ile çalışmamızın her yönde önünü açan, ileri laboratuvar olanaklarını kullanabilme fırsatını bizlere sağlayan, çalışmalarında bana her konuda destek olan, beni yönlendiren, geliştiren, bilgi, beceri ve tecrübelerini aktaran, tezimin hazırlanmasında değerli katkılarıyla bana yol gösteren ve akademik kariyerime adım atmamı sağlayan, bir ömür minnettar olacağım Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Başkanı değerli hocam Prof. Dr. Mehmet Mustafa Akdeste'ye,

Gerek Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Laboratuvarları'ndaki deney çalışmalarım sırasındaki işbirliği, gerekse tezimin hazırlanma aşamasında asla esirgemediği büyük destekleri ile her zaman yanımda olan sevgili arkadaşım Yasemin Budama Battal'a,

Deneysel çalışmalarım sırasında verdikleri destek ve işbirliklerinden dolayı çalışma arkadaşlarım, Banu Mansour, Zafer Özdemir, Murat Topuzoğulları, Kadriye Kızılbey, Namık Akkılıç, Yunus Sarıçay ve diğer arkadaşlarıma,

Beni bugünlere kadar getirmek için büyük emekler veren, akademik kariyer yapmam için yüreklendiren, hayattan yorulduğumu hissettiğim zamanlarda sıcaklıklarıyla beni motive eden ve her türlü desteğini esirgemeyen biricik anneciğim ve babacığım Ayla İşcanı ve Abdullah İşcanı'na ve bu koskoca şehirde varlıklarıyla dünyamı zenginleştiren canlarım, kardeşlerim Burcu ve Begüm İşcanı'na,

Sadece tezimin hazırlanmasındaki ilgisi ve desteği için değil, aynı zamanda pozitif enerjisiyle hayatımın her evresinde yanımda olan, can yoldaşım, sevgili arkadaşım Leyla Türker Şener'e,

Tezimin hazırlanması sırasındaki çok değerli emeklerinden dolayı H. Barış Eroğlu'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Tez çalışmamızda, Hepatit B virüsüne ait yüzey antijeni peptidi (HBsAg) epitoplarından 95-109 amino asit dizisinin sentezi yapılmıştır. Bu peptidin sentetik polianyonlar ile farklı yöntemler (Sulu ortamda ve organik ortamda mikrodalga destekli) kullanılarak sentezlenen biyokonjugatlarının fizikokimyasal özellikleri incelenmiştir. Hepatit B virüsünün yüzey antijen epitopuna ait 95-109 amino asit dizisi:

WLVLLDYQGMLPVCPL şeklindedir.

Bu peptidin sentezi, Merrifield tarafından geliştirilen Katı Faz Peptid Sentezi (SPPS) yöntemi ile Liberty Mikrodalga Peptid Sentezi Cihazında (CEM), Fmoc kimyası kullanılarak yapılmıştır. Literatürde bulunmayan yeni bir yaklaşımla, ilk kez Hepatit B yüzey antijen epitoplarından 95-109 amino asit dizisinin amino ucuna Triptofan amino asidi eklenmiştir. Böylelikle sentezlenen peptide floresans özellik kazandırılarak, sentezlenen peptidin floresans spektrofotometre cihazı ile incelenmesine olanak sağlanmıştır.

Tez çalışmamızda, yüksek immünejenikliğe sahip peptid konjugatlarını elde etmek için yeni bir yaklaşım olarak; antijenik peptid moleküllerinin konjugasyonunda taşıyıcı olarak kendiliğinden adjuvant etkisine sahip olan sentetik polianyonlar kullanılmıştır. Peptid antijeni olarak HBsAg'nin hidrofobik özellikli ve tek bir amin grubu içeren 95-109 dizisinin seçilmesi, gerek temel fizikokimyasal araştırmalar gerekse de daha immunojenik biyokonjugatların geliştirilebilmesi için varsayılmıştır.

HBsAg'nin 95-109 amino asit dizisinin biyopolimerlerle sulu ortamda yapılan biyokonjugasyonlarında, farklı başlangıç mol oranları ($n_{\text{Peptid}}/n_{\text{Polimer}} = 1, 3, 5, 7, 9$) ve farklı aktivasyon mekanizmaları kullanılarak, biyokonjugatların fizikokimyasal davranışları incelenmiştir. Ayrıca susuz organik ortamda, mikrodalga destekli yöntemle sentezlenen polimer-peptid konjugatı da, yeni bir yöntem olarak incelenmiştir. Sentezlenen biyokonjugatların yapı ve karakterizasyonunu HPLC, VISCOTEK [Dört Detektörlü-UV, Refraktif İndeks, Viskozite ve Işık Saçılması, kromatografik Sistem] ve FTIR gibi spektroskopik ve flourimetrik (Floresans Spektrofotometre cihazı ile) yöntemlerle incelenmiştir. Aktivasyon ve konjugasyonun mekanizması ve oluşan konjugatların yapı modelleri tartışılmaktadır.

Anahtar kelimeler: Katı faz peptid sentezi, sentetik peptidler, biyokonjugasyon, polielektrolit

ABSTRACT

In this study, we have synthesized the 95-109 region of the antigenic part of Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg) Peptide by using Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS). The amino acid composition of this sequence is:

WLVLDDYQGMLPVCPL.

The synthesis of the 95-109 region of the highly hydrophobic and antigenic part of Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg) Peptide was performed by Liberty Microwave Peptide Synthesizer (CEM Corp.) using Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS) methods and Fmoc chemistry developed by B. Merrifield. For the first time, differently from literature, we have synthesized the region of 95-109 of the epitopes of HbsAg peptide with including Tryptophan amino acid in N-terminus of the peptide in order to have gained fluorescence properties to the peptide molecule. The final product peptide was characterized by various chromatographic methods.

In our study, we have developed new approaches to get highly immunogenic peptide conjugates: Synthetic polyanions carry out the carrier molecule and adjuvant roles simultaneously and used for the conjugation with the peptide molecules. Using the 95-109 region of HBsAg peptide that highly hydrophobic and containing one amino group as an antigen, has been chosen for both physicochemical researches and developing more immunogenic bioconjugates.

The bioconjugates were synthesized using different activation mechanisms and the different initial molar ratios ($n_{\text{peptide}}/n_{\text{polymer}} = 1, 3, 5, 7, 9$) of the polyanions and the peptide. And physicochemical properties of the bioconjugates were investigated. Also this peptide was conjugated with synthetic polyanions by using microwave method. The structure and characterization of the synthesized conjugates was analyzed by various chromatographic and fluorometric methods such as HPLC (High Performance Liquid Chromatography), VISCOTEK (Size Exclusion Chromatography including 4 different detector: Ultra Violet, Refractive Index, Right Angle Light Scattering and Viscometer detectors) and Fluorescence Spectrometer. The mechanisms of the activation and conjugation steps and the structures of the synthesized conjugates will be discussed.

Keywords: Solid phase peptide synthesis, synthetic peptides, bioconjugation, polyelectrolytes.

1. GİRİŞ

Kontrollü ilaç salınımı, doku mühendisliği, aşı geliştirme ve hücre üretimi gibi fonksiyonel uygulamalarda kullanılan suda çözünmeyen polimerik sistemlerin yanısıra suda çözünebilen polimer-biyomolekül konjugatları; enzim kararlılığının artırılması, biyosensör yapımı, DNA'nın hücre içi transferi ve antijenlerin immünojenliğinin düzenlenmesi amacıyla protein modifikasyonlarında kullanılmaktadırlar (Ogata vd., 1996, Morris vd., 1994, Langer, 1990, 1991, Lee vd., 1977, Abu vd., 1977, Petrov vd., 1992).

Bu tür yapıları polimerler adjuvant (yardımcı) özelliği taşımamaktadırlar. Bununla beraber yüksek molekül ağırlıklı sentetik polielektrolitler (PE), negatif ve pozitif yüklenmiş veya ortamın fizyolojik şartlarına göre yüklenebilen polimerler, polibazlar, poliasitler ve bunların kopolimerleri, bu kopolimerler monomerlerinin kimyasal yapılarından bağımsız olarak benzer adjuvant etkisi (immüniteyi stimüle eden) göstermektedirler (Kabonov 1984, Mustafaev 1990, 1992, 1996a, 1996b, 1996c, ; Özeroğlu, 1996a, 1996b; Saraç, 1995a, 1995b, 1997).

Sentetik oligopeptidler, virüs partiküllerinin protein yapılarında varolan benzer antijen dizisini taklit etmeleri dolayısıyla, aşı özelliği taşıyabilen peptidlere dayalı immünojenik preparatlar geliştirilmektedir.

Aşı çalışmalarında kullanılan sentetik peptidler, bölgeye özgü antikorların oluşturulmasında oldukça ilgi çekici bir öneme sahiptir ve en büyük avantajları, herhangi bir enfekte edici maddeye ihtiyaç duymaksızın güvenilir olmaları, aynı zamanda da kimyasal olarak tamamen tanımlanabilmeleridir. Ayrıca sentetik peptid aşıları toksik değildir ve daha ucuzdurlar (Mustafaev ve Mustafaeva, 2002).

Proteinlerin ve peptidler gibi sentetik antijenlerin aşı olarak kullanılmasının, viral ve bakteriyel aşılarla göre birçok avantajı bulunmaktadır. Ancak sentetik peptid antijenlerden maksimum immünojenik yanıtın alınabilmesi için, bu peptidin bir taşıyıcıya (protein, hapten, polimer vb.) bağlanması gerekmektedir (Mustafaev, 2004).

Bu çalışmada ise; ilk kez, Hepatit B yüzey antijeni epitoplarından 95-109 peptid dizisi, bu dizinin amino-ucuna Triptofan (Trp) amino asidi eklenerek sentezlenmiş ve böylece peptide floresans özellik kazandırılmıştır. Peptidin sentezinde, ilk kez B. Merrifield'in geliştirdiği Katı Faz Peptid Sentezi (SPPS) metodundan yararlanılmış ve sentezde Fmoc kimyası kullanılmıştır.

Sentezlenen bu peptidin immunjenliğinin arttırılmasını sağlamak üzere yapılan konjugasyonlarında ise, yeni bir yöntem olarak, klasik adjuvantlar yerine sentetik polianyonlar kullanılmıştır. Biyokonjugatların sentezlenmesi sırasında, farklı yöntemlerin (sulu ortamda ve organik ortamda mikrodalga enerjisi ile) kullanılması, biyokonjugatların fizikokimyasal davranışlarının incelenmesine olanak sağlamıştır. Sentezlenen bu biyokonjugatların fizikokimyasal davranışları ve yapıları, çeşitli kromatografik ve florometrik yöntemler yardımıyla incelenmiştir.

Sentetik peptid antijen ve anyonik polielektrolitlere dayalı biyokonjugatların geliştirilmesinin, ileri çalışmalarda yapılacak olan tanı kitleri (immunodiagnostik) ve yapay Hepatit B aşısı gibi kullanılmasına fayda sağlayacağı düşünülmektedir (Dilgimen, 1998).

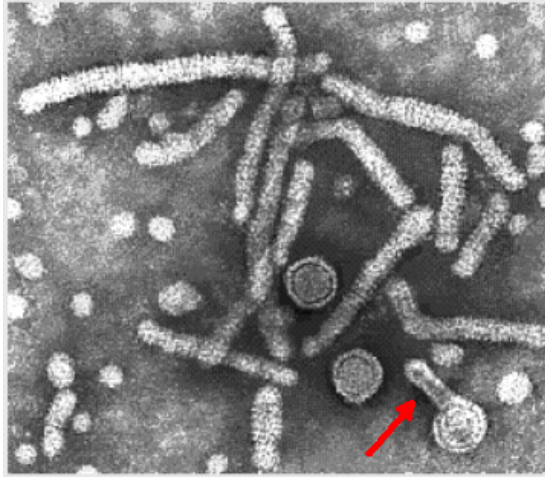
2. GENEL BİLGİ

2.1 Hepatit B Virüsü

Hepatit B, tüm dünyada milyonlarca insanı etkileyen oldukça yaygın ve ciddi bir karaciğer hastalığıdır. Dünyada toplam olarak 350 milyon insan Hepatit B ile kronik olarak veya taşıyıcı olmak üzere infektidir. Bu virüs, karaciğerin fonksiyonlarına zarar vermektedir. Her yıl, 4 milyonun üstünde akut Hepatit B virüsü hastası ve taşıyıcılarının yaklaşık %25'i, yani yılda 1 milyon kişi, kronik hepatit, siroz ya da karaciğer kanseri hastalıklarından ölmektedir.

Hepatit B hastalığına, kısmen çift sarmallı dairesel bir genoma (DNA) sahip ve *Hepadnavirus* ailesinde sınıflandırılan kılıflı Hepatit B virüsü neden olmaktadır.

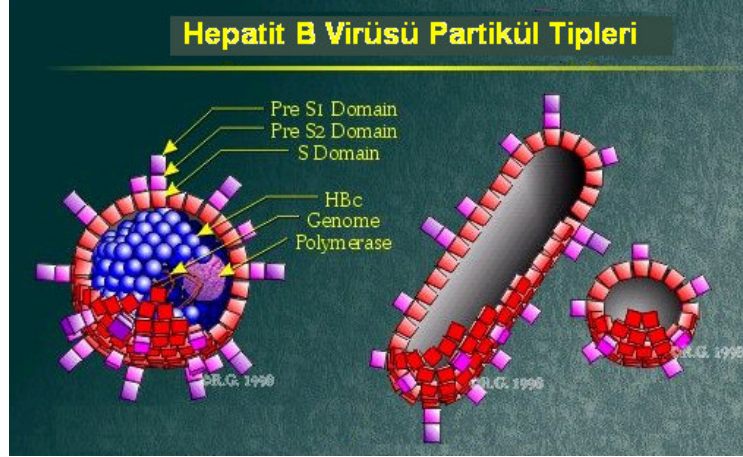
Hepatit B virüsü, 42 nm çapındadır ve 27 nm çapındaki çekirdek (HBcAg) nükleokapsidine sahiptir ve **yüzey antijenini** içeren bir dış lipoprotein kılıf (zarf olarak bilinen) ile çevrelenmiştir. Bu viral protein kılıf, “**Yüzey antijeni (Hepatitis B Surface Antigen=HBsAg)**” olarak bilinir. Yüzey antijeni kanda genellikle çubuk şeklinde (ipliksi) ya da küresel parçacıklar halinde bulunur. Çubuksu parçacıklar, değişik uzunluklara ve 22 nm çapına sahiptir ve viral kuyrukları ile tanınmaktadırlar.



Şekil 2.1 Hepatit B virüsünün mikroskopik görünüşü (World Health Organization, 2002).

Hepatit B virüsünün en çok rastlanan tipi; küçük, yuvarlak, bulaşıcı olmayan ve HBsAg'i içeren 17- 25 nm boyutlarında partiküllerdir.

Tübüler, farklı uzunluklara sahip çubuksu formu da, HBsAg polipeptidlerini içerir. Üçüncü morfolojik form, 42 nm hepatit B Virionu bir komplekstir, küresel, çift kabuklu bir partiküldür. Dış zarfa sahiptir ve büyük (L), orta (M) ve pre-S1 ve pre-S2 olarak bilinen küçük (S) yüzey proteinlerini yani bütün S geni polipeptidlerini içerir.



Şekil 2.2 Hepatit B virüsünün farklı morfolojik türlerinin gösterimi (1).

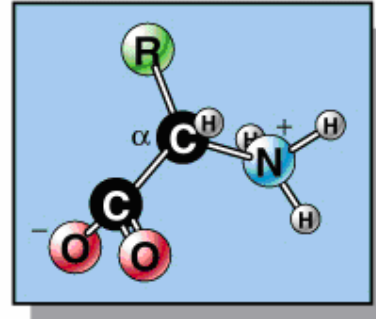
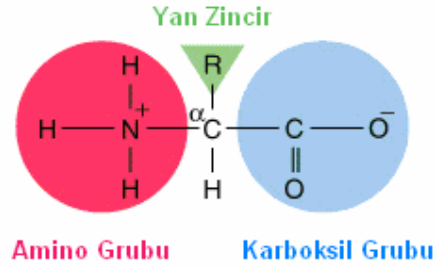
Bu polipeptidler birbirlerine disülfid bağı ile bağlanmış durumdadır ve hidrofobik yapıya sahiptirler.

Bütün HBV kılıf proteinleri, oldukça immunojenik ve anti-HBs (humoral bağışıklık) oluşumunu teşvik eden HBsAg'i içerir (World Health Organization, 2002).

3. PEPTİDLER

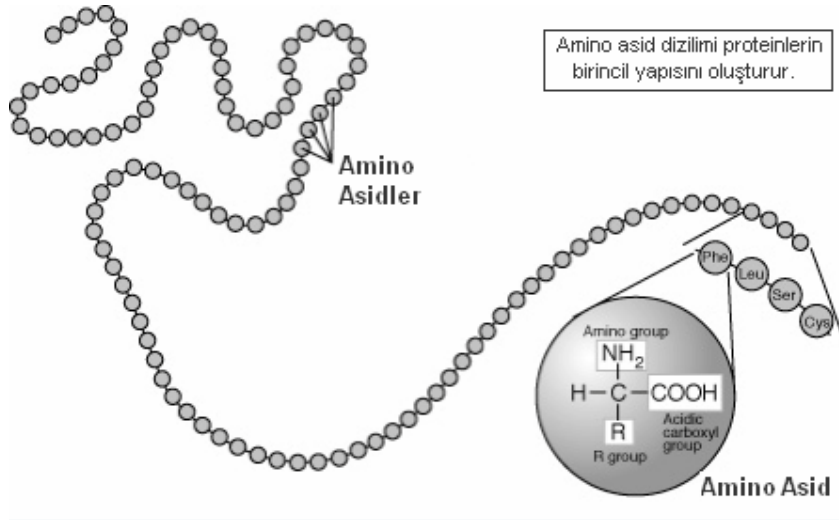
3.1 Amino Asidler

Proteinler, amino asitlerin dehidrate (su kaybetmiş) polimerleridir. Her bir amino asit kalıntısı yanındakine özel bir tip kovalent bağla (peptid bağı) bağlanmaktadır. Proteinlerde bulunan 20 standart amino asidin hepsi de α -amino asiddir. Aynı karbon atomuna (α -karbon) bağlanmış bir karboksil grubu ve amino grubuna sahiptir (Nelson ve Cox, 2005).



Şekil 3.1 Bir amino asidin kimyasal formül ile gösterimi (2)

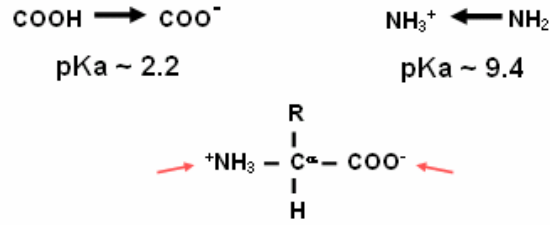
Amino asit dizilimi proteinlerin birincil yapılarını oluşturur.



Şekil 3.2 Peptidlerin birincil yapısını oluşturan amino asitlerin şematik gösterimi (3).

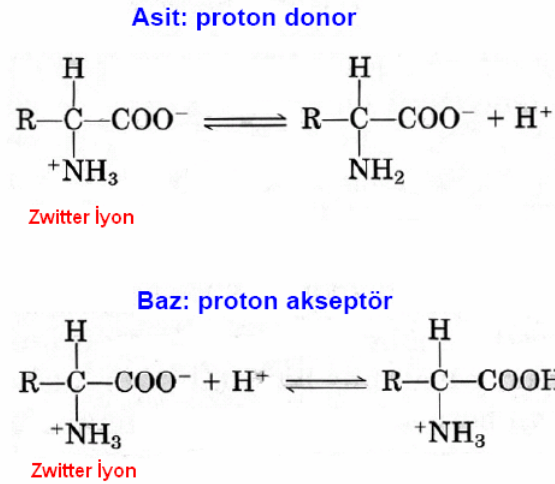
3.1.1 Amino asidlerin Asid- Baz Özellikleri

Amino asidler asit ve baz gibi davranabilirler çünkü yapılarında hem zayıf bazik bir amino grubu ($-\text{NH}_2$), hem de zayıf asidik bir karboksil ($-\text{COOH}$) grubu bulundurlar. Amino ve karboksilik gruplarının farklı pK_a 'ları vardır (4).



Şekil 3.3 Amino asidlerin asidik ve bazik özelliği.

Bir amino asid suda çözündüğünde veya fizyolojik (hücredeki) pH 'da, dipolar iyon veya zwitter iyon olarak bulunurlar. Bir zwitter iyon asit (proton vericisi) gibi veya baz (proton alıcısı) gibi davranabilir:

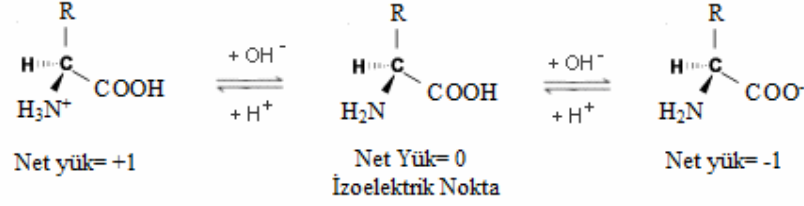


Şekil 3.4 Amino asidlerin zwitter iyonik formları.

Bu çift yönlü yapıya sahip maddeler **amfoterik** veya **amfolitler** (amfotelik elektrolitler) olarak adlandırılır.

Bir amino asidin dış çevreye karşı yüksüz olduğu pH , **izoelektrik nokta** olarak adlandırılır ve

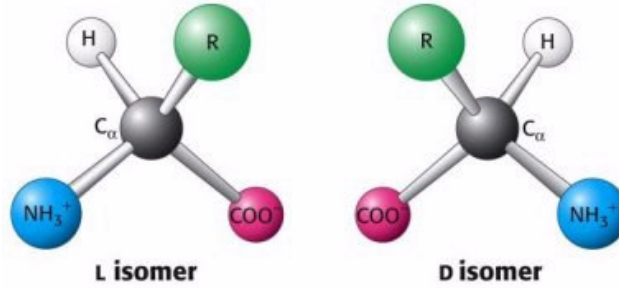
pI ile gösterilir. İzoelektrik noktada amino asit üzerindeki pozitif ve negatif yükler birbirine eşittir (Murray vd., 1993).



Şekil 3.5 Amino asitlerin izoelektrik noktası.

3.1.2 Amino asitlerin Optik Özellikleri

Glisin dışındaki tüm amino asitlerde α -karbon atomu; Karboksil grubu, Amino grubu, R grubu ve Hidrojen atomu olmak üzere 4 bağ yapar. α -karbon atomu bir kiral merkezdir. α -karbon atomunun çevresindeki orbitaller tetrahedral düzende bağlandıklarından, dört farklı grup, ayna görüntüsü kendisiyle çakışmayan iki farklı uzaysal düzenlenim oluşturulur.



Şekil 3.6 Amino asitlerin stereoizomerleri (5)

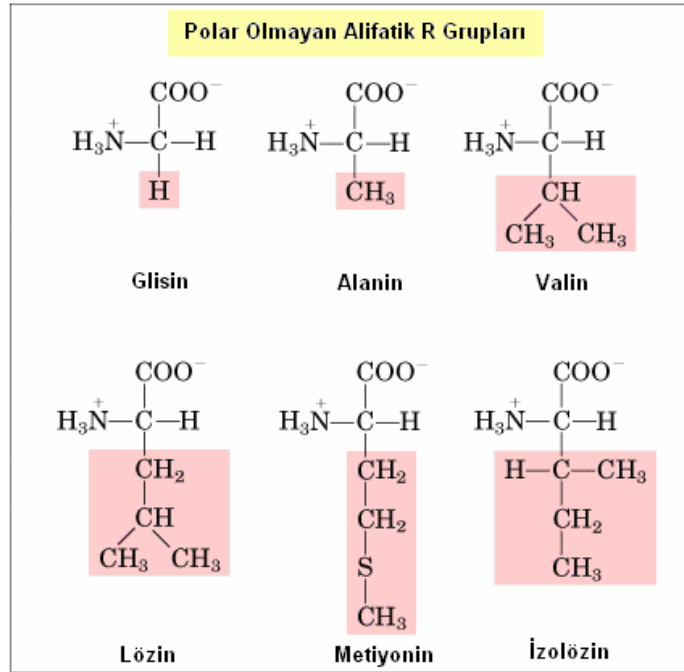
Bu iki form, bir tür stereoizomer olup, “**enantiyomerler**” olarak tanımlanır. Kiral merkeze sahip tüm moleküller optikçe aktiftir; yani düzlemsel polarize ışığı çevirirler. Kiral merkezi edolan biyolojik bileşiklerin hemen hepsi, doğada D (Dekstrorotator= Işığ $\ddot{\text{ı}}$ sağı çeviren) veya L (Levorotator= Işığ $\ddot{\text{ı}}$ sola çeviren) şeklinde tek bir stereoizomerik formda bulunur. Proteinlerdeki amino asit kalıntıları L-stereoizomerik formda bulunurlar.

3.1.3 Amino asitlerin sınıflandırılması

Amino asitlerin sudaki çözünürlüğünü etkileyen elektrik yükü, büyüklük ve yapısal yönden farklı olan yan zincirleri veya R gruplarıyla ayrılır. Amino asitleri; R gruplarının özelliklerine göre, özellikle polariteleri veya biyolojik pH'da suyla tepkimeye girme eğilimlerine göre 5 ana sınıfta gruplandırılabiliriz:

3.1.3.1 Polar Olmayan Alifatik R grupları

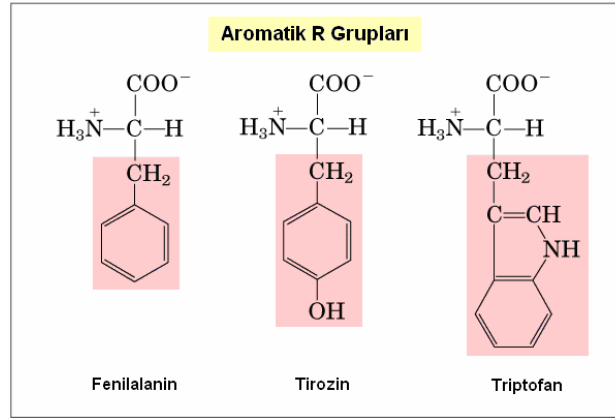
Bu amino asit sınıfındaki R grupları polar olmayan ve **hidrofobiktir**. Proteinlerde alanin, Valin, Lösin, İzölösinin yan grupları bir araya gelip kümeleşerek, hidrofobik etkileşimlerle protein yapısını sabitler. Glisin en basit yapıya sahiptir. Resmen polar olmamasına karşın, çok küçük yan zinciri hidrofobik etkileşimlere katılmaz. Sülfür içeren iki amino asiden biri olan metiyonin ise yan zincirinde polar olmayan tiyoeter grubu içerir.



Şekil 3.7 Polar olmayan (Hidrofobik) alifatik yan zincire sahip amino asitler (6)

3.1.3.2 Aromatik R Grupları

Aromatik yan zincirde, fenil alanin tirozin ve triptofan göreceli polar olmayan (**hidrofobik**)lardır. Hepsi **hidrofobik etkileşimlere** katılabilir. Tirozinin hidroksil grubu hidrojen bağı yapabilir ve bu bazı enzimler için önemli bir işlevsel gruptur. Tirozin hidroksil grubundan, triptofanda indol halkasındaki azottan dolayı, fenil alanine göre daha polardır. Triptofan ve tirozin bir dereceye kadar da fenil alanin, ultraviyole (UV) ışığı absorplar. Bu, 280 nm dalga boyunda birçok proteinin ışığı karakteristik absorptiyasını açıklar, bu özellik proteinlerin tanımlanmasında araştırmacılara yardımcı olur.



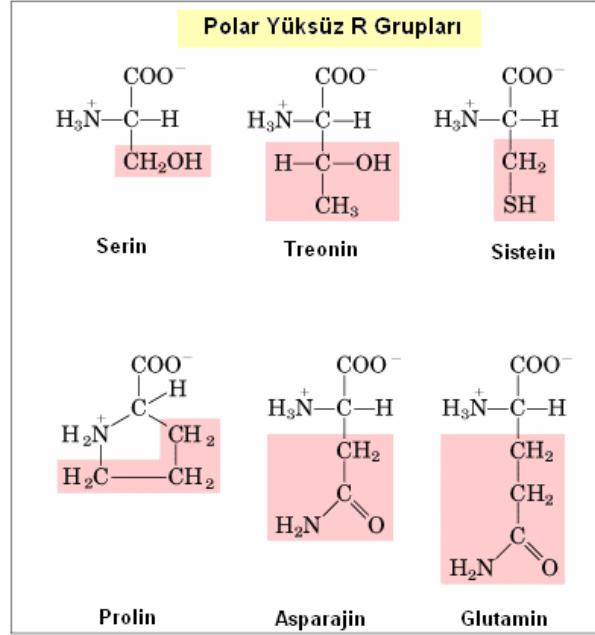
Şekil 3.8 Aromatik yan zincire sahip amino asitler (6)

3.1.3.3 Polar Yüksüz R Grupları

Bu grup amino asitler polar olmayan amino asitlere göre suda daha çözünür ve daha hidrofiliktir, çünkü içerdikleri işlevsel gruplar suyla hidrojen bağı yapar. Bu grup amino asitler **Serin**, Treonin, Sistein, Prolin, Asparajin ve Glutamin kapsar. Serin ve Treonin hidroksil gruplarıyla, Sistein sülfidril grubuyla, Asparajin ve Glutamin ise amid gruplarıyla ılımlı polariteye katkıda bulunurlar. Prolin ise, farklı bir halka yapısına sahiptir ve yalnızca ılımlı polardır. Prolin kalıntısındaki ikincil amino grubu (imino), prolin içeren polipeptid bölgelerinde yapısal esnekliği azaltıp, katı konformasyona neden olur.

Asparajin ve glutamin, proteinlerde bulunan diğer amino asitlerden aspartat ve glutamatın amidleridir, asparajin ve glutamin asit veya bazlarla kolayca hidrolizlenip bu amino asitlere dönebilir. Sistein ise kolaylıkla, kovalent bağlı dimerik amino asit olan sistine oksitlenir.

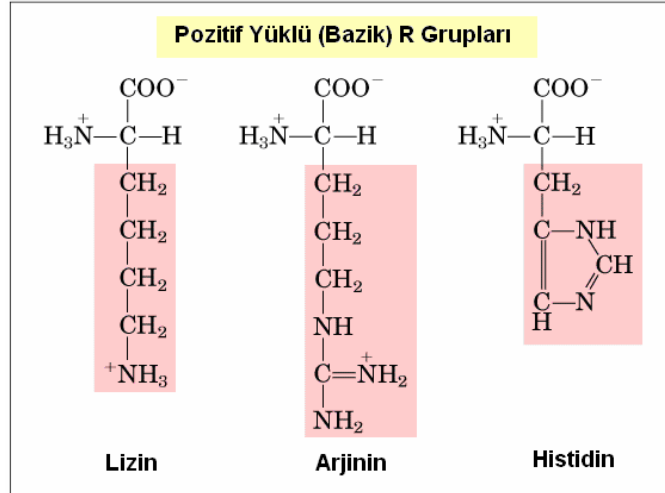
Sistin iki sistein molekülünün veya kalıntısının disülfid bağıyla bağlanmış halidir. Polar olmayan bu disülfid bağı kalıntı, **kuvvetli hidrofobiktir**. Disülfid bağları, protein molekülünün bölümleri arasında veya farklı protein zincirleri arasında kovalent bağ yaparak birçok proteinin yapısı için özel bir rol oynar.



Şekil 3.9 Polar yüksüz yan zincire sahip amino asitler (6)

3.1.3.4 Pozitif Yüklü (Bazik) R Grupları

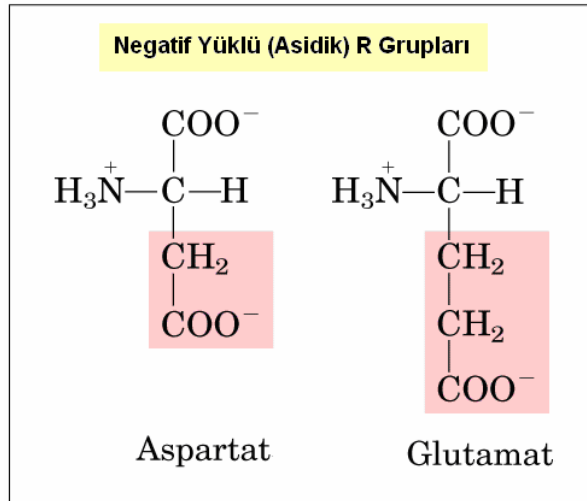
Hidrofilik R gruplarının çoğu, pozitif veya negatif yüklüdür. Alifatik zincirinin ϵ pozisyonunda ikinci birincil amino grubuna sahip Lizin, pozitif yüklü bu guanidin grubuna sahip arjinin ve imidazol grubu içeren histidin pH 7.0' da pozitif yüklü R grubu içeren amino asitlerdir. Histidin nötrale yakın pKa değerine sahip iyonize olabilen yan zincir içeren tek standart amino asidir. Birçok enzim katalizli tepkimede, His kalıntısı proton alıcısı/vericisi olarak tepkimeyi kolaylaştırır.



Şekil 3.10 Pozitif yüklü (bazık) yan zincire sahip amino asitler (6)

3.1.3.5 Negatif Yüklü (Asidik) R Grupları

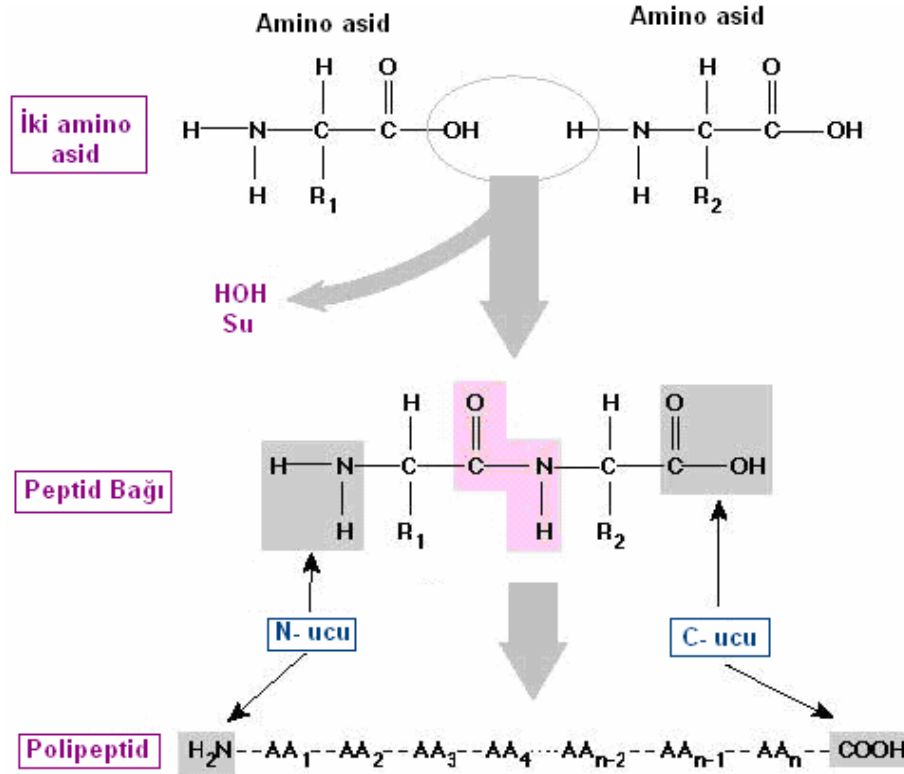
İkinci karboksil grubuna sahip Aspartat ve glutamat pH 7.0' de negatif yüke sahip R grubu içeren iki amino asittir (Nelson ve Cox, 2005).



Şekil 3.11 Negatif yüklü (asidik) yan zincire sahip amino asitler (6)

3.2 Peptidler ve Peptid Bağı

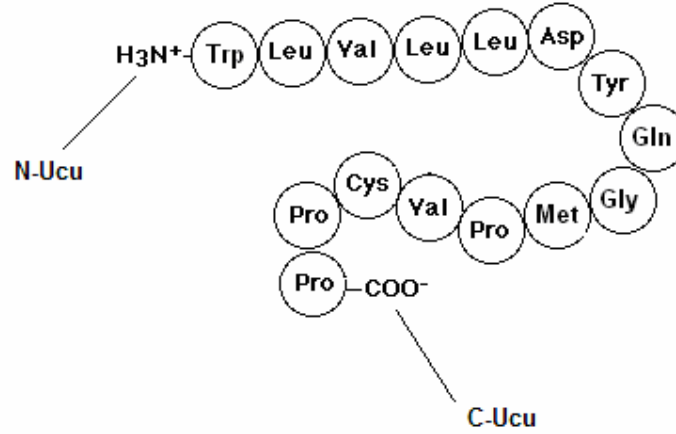
Peptid bağı, amino asitlerin peptidlere ve proteinlere polimerleşmesine yol açan kondenzasyon reaksiyonları sonucunda oluşan bağıdır. İki amino asidin birleşmesiyle oluşan yapıya **dipeptid** denir. Basit bir dipeptid; bir amino asidin karboksil grubuyla diğer amino asidin amino grubu arasında kovalanet bağ oluşması ve aralarından 1 mol suyun ayrılmasıyla oluşur (7).



Şekil 3.12 İki amino asid arasında peptid bağı oluşumu

Üç amino asidin iki peptid bağıyla bağlanmasıyla **tripeptid** meydana gelir. Bu şekilde az sayıda amino asidin bağlanmasıyla oluşan yapılar **oligopeptid**ler, çok sayıda peptidin bağlanmasıyla oluşan, molekül ağırlıkları 10.000'in altında olan yapılar ise, **polipeptid**ler olarak adlandırılır (Nelson ve Cox, 2005).

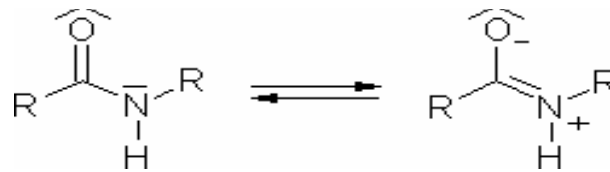
Polipeptidler lineer polimerlerdir. Bir polipeptid zincirinin ucundaki amino asit kalıntısı, serbest -NH_3^+ grubu, amino asit kalıntısının diğer ucu ise serbest -COO^- grubuna sahiptir. Bu iki grup, N-ucu (N-terminus) ve C-ucu (C-terminus) olarak adlandırılırlar (Solomons ve Fryhle, 2004) :



Şekil 3.13 Hepatit B virüsü yüzey antijeni 95-109 dizisine ait peptid zincirinin N- ucu ve C- ucu

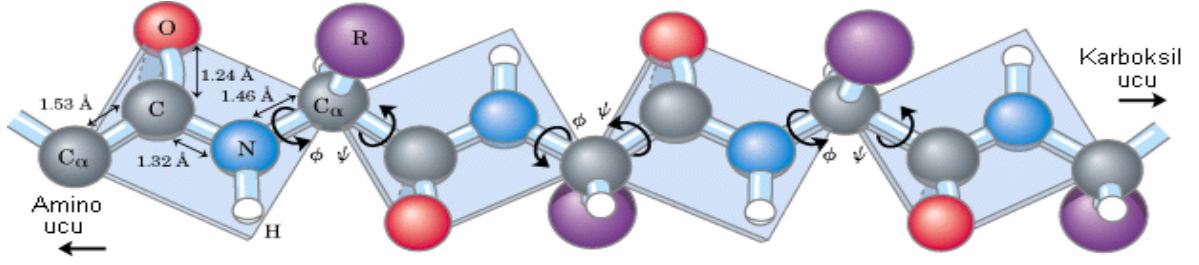
Peptidler her zincirin bir ucunda sadece bir serbest α -amino grubu ve bir serbest α -karboksil grubu içerirler. Bu gruplar serbest amino asitlerdeki gibi iyonize olurlar. Uçlar dışındaki tüm amino asitlerin α -amino ve α -karboksil grupları kovalent bağlanıp peptidleri oluşturdukları için, iyonize olarak peptidlerin toplam asit-baz davranışlarına katkıda bulunmazlar. Fakat bazı amino asitlerin R grupları iyonize olabilir ve molekülün asit- baz özelliğini etkiler. Serbest amino asitlerinkine benzer şekilde, peptidlerinde izoelektrik noktaları (pI) mevcuttur (Nelson ve Cox, 2005).

Peptid bağı, kısmi (%40) çift bağ karakteri taşır. Çünkü yapısındaki karbonil grubuna ait elektronegatif oksijen atomu, azot atomunun elektronlarını kendine doğru çeker.



Şekil 3.14 Peptid bağının rezonans yapısının gösterimi

Peptid bağının bu çift bağ karakteri polipeptid zincirinin rijitliği ve dolayısıyla da polipeptid zincirinin katlanması üzerinde etkilidir. C-N bağının uzunluğu (1.32 Å), C α -N bağından (1.46 Å) daha kısadır. C=O bağı ise normal bir karbonil bağının uzunluğundan daha fazladır (1.24 Å) (8).

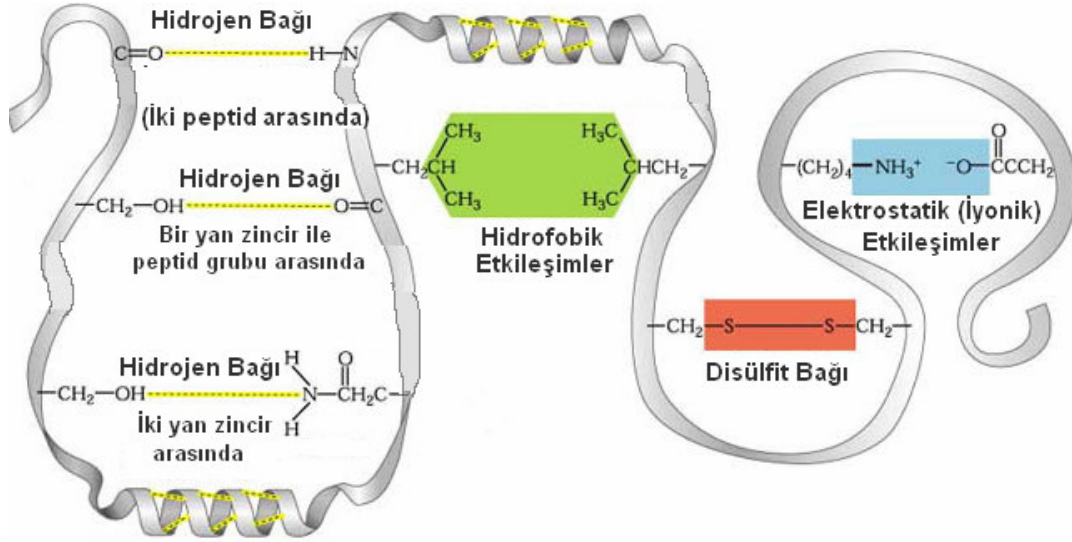


Şekil 3.15 Bir peptidin oluşturan atomlara ait bağ uzunlukları ve dönme açıları (8)

Peptid bağının özel elektronik yapısına bağlı olarak, peptidin her iki ucundaki atomlar bağın etrafında dönemezler. Bu nedenle, $O=C-N-H$ grubuna ait atomlar peptid düzlemi olarak bilinen düzlemde yer alır. Bu düzlemin tamamı, $N-C\alpha$ bağı etrafında döndüğünde Φ açısı ya da $C-C\alpha$ dönmesiyle ψ açısı meydana gelir [27].

3.3 Proteinlerin ve Peptidlerin Yapısını Etkileyen Kovalent Olmayan Etkileşimler

Kovalent olmayan bağlarla bağlanmış atomlar arasındaki etkileşimler (yani non-covalent etkileşimler) doğal protein yapısı ve kararlılığını belirlemede önemli rol oynar. Termodinamik ve spektroskopik çözümler, bu kovalent olmayan etkileşimleri tespit etmek ve anlamak için kullanılır. Doğal ve katlanmış proteinler arasındaki serbest enerji genellikle birbirleri ile dengede olan entropik ve entalpik düzenlenmelerden kaynaklanır (Franks, 2002). Kovalent olmayan etkileşimler, proteinlerin yapılanmasında çok büyük önem taşırlar. Hidrojen bağı, hidrofobik etkileşimler, elektrostatik bağlar ve Van der Waals kuvvetleri protein konformasyonunda önemli bir etkiye sahip olan kovalent olmayan etkileşimlerdir (9).



Şekil 3.16 Proteinleri bir arada tutan kovalent karakter taşımayan kuvvetler (10)

Bu kovalent olmayan etkileşimler, kovalent bağlardan çok daha zayıftır. Örneğin 1 mol (6×10^{23}) C-C bağı kırma için 350 kJ enerji gerekirken, 1 mol van der Waals bağı kırma için 4 kJ enerji yeterlidir.

Hidrofobik etkileşimler, kovalent bağlardan oldukça zayıfsalar da, yüksek polariteye sahip çözücülerde (örneğin derişik tuz çözeltilerinde) bu etkileşimler çok kuvvetli hale gelir. İyonik etkileşimler ve hidrojen bağları çözücünün polarlığına bağlı olarak değişik kuvvette olabilirler ancak bütün bu etkilere rağmen yinede kovalent bağlardan daha zayıf olurlar.

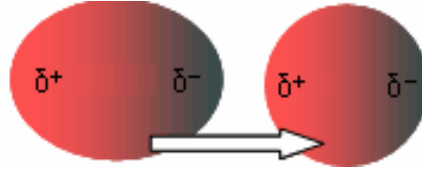
Bu zayıf bağların herbirinin oluşması, sistemin serbest enerjisinde net bir azalma yaratır. Makromoleküllerin en kararlı (doğal) yapıları, zayıf bağ oluşturabilme yetilerinin en yüksek olduğu halleridir. Tek bir polipeptid zincirinin üç boyutlu şekilde katlanması, bu esasa göre belirlenir. Antijenin özel bir antikora bağlanması bir çok zayıf etkileşimin toplam etkisiyle olur.

Birbirleriyle moleküler düzeyde etkileşim içersinde bulunan biyomoleküller arasındaki bütünleyicilik, moleküllerin yüzeyinde bulunan polar, yüklü ve hidrofobik gruplar arasındaki etkileşimleri ve bütünleyiciliği yansıtır.

3.3.1 Van der Waals Etkileşimleri

İki tane yüksüz atom birbirine çok yaklaştırılırsa, yüzeylerindeki elektron bulutları birbirini etkiler. Bir çekirdeğin etrafındaki elektronların konumlarının rastgele değişikliği, geçici bir

elektrik dipolü oluşturabilir; buarada çok yakınında bulunan bir diğer atom ise, dipole zıt bir elektrik dipol oluşturabilir. Oluşan bu iki zıt dipol birbirlerini zayıf bir etkilşimle çekerek, iki çekirdeği birbirine daha da yakınlaştırır. Bu zayıf güçteki çekimlere “**Van der Waals Etkileşimleri (ya da London kuvvetleri)**” adı verilir.

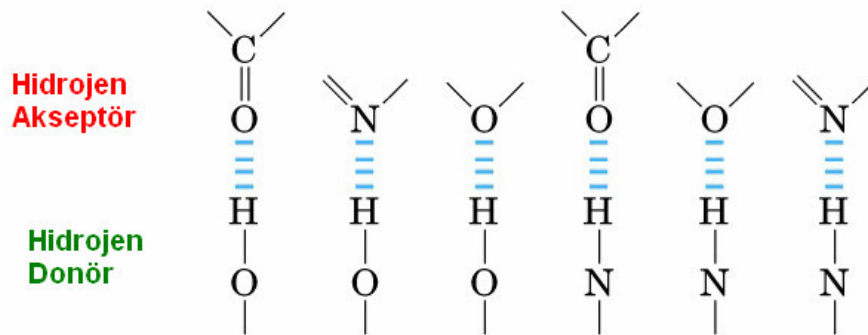


Şekil 3.17 Van der Waals kuvvetlerinin iki atom arasında oluşması (11)

İki çekirdek birbirine daha yakın bir duruma geldiklerinde, elektron bulutları birbirlerini itmeye başlar. Van der Waals çekiminin bu itiş kuvvetiyle dengeye ulaştığı noktada, çekirdeklerinin birbiriyle van der Waals temasında olduğu söylenir (Nelson ve Cox, 2005).

3.3.2 Hidrojen Bağları

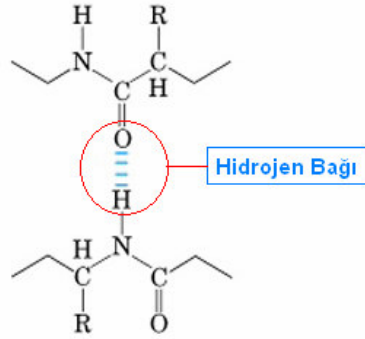
Bir hidrojen bağı, azot ve oksijen gibi elektronegatif atomların hidrojenle etkileşime girmesiyle meydana gelir (McDonald, 1994; Pace vd., 1996).



Şekil 3.18 Farklı moleküller arasında oluşabilecek Hidrojen bağlarının gösterimi (12)

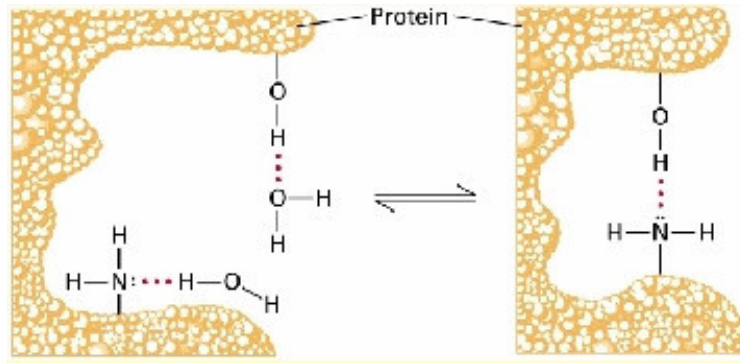
Hidrojen bağları, proteinlerin üç boyutlu yapısının belirlenmesinde önemli bir rol oynar. Bu makromoleküllerde; makromolekülün bazı kısımları arasında meydana gelen bağlar

sonucunda oluşan özel formdaki katlanmalar, makromoleküllerin fiziksel ve biyokimyasal rollerini belirler. Proteinlerde hidrojen bağları, bir ana zincirdeki oksijenler ile diğer zincirdeki amid hidrojenleri arasında meydana gelir (Siegbahn vd., 1996).



Şekil 3.19 İki peptid molekülü arasında oluşabilecek H Bağı

Bir hidrojen bağının enerjisi yaklaşık olarak 2 ile 20 kJ/mol arasındadır. Bu enerji, bir protein molekülünün katlanmasının stabilizasyonu için yeterli bir enerji değildir. Bir protein katlanmasında, protein ile su molekülü arasında oluşan hidrojen bağı kırılır ve bazılarının yerini molekül içi hidrojen bağları alır ve çözücünün entropisi azalır (McDonald, 1994; Pace vd., 1996).



Şekil 3.20 Protein domainleri arasında oluşabilecek H Bağı

Ayrıca proteinlerin yan zincirleri de, proteinin yüzeyinde hidrojen bağları oluşturabilme özelliğine sahiptir (9). Bazı amino asitler yan zincirlerinde taşıdıkları fonksiyonel gruplara göre, aralarında hidrojen bağları oluşturabilirler.

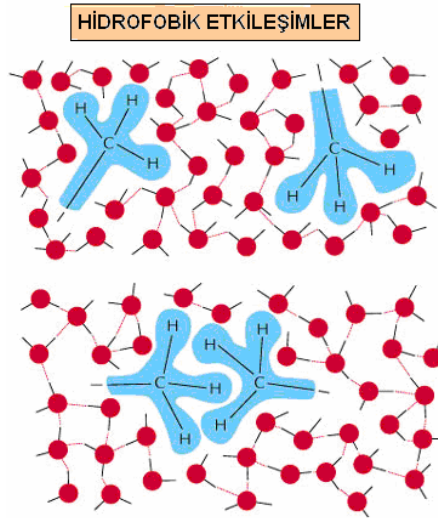
Örneğin:

- Alkol grubu içeren iki amino asid arasında: Serin, Treonin ve Tirozin,
- Biri alkol biri asid içeren iki amino asid arasında: Tirozin ve Asparajin
- İkiside asid grubu içeren amino asidler arasında: Asparajin ve Glutamik asid
- Biri alkol biri amin grubu taşıyorsa : Serin ve Lizin
- Biri alkol biri amid grubu içeriyorsa : Serin ve Asparajin (13).

3.3.3 Hidrofobik Etkileşimler

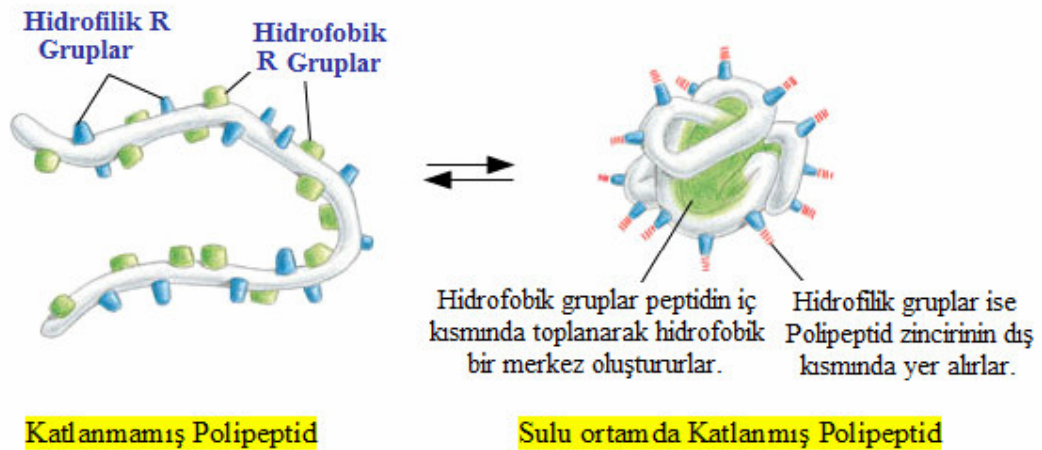
Polar olmayan gruplar, su ile etkileşmeyi pek tercih etmezler çünkü su ile hidrojen bağı oluşturmazlar. Polar olmayan grupların su molekülleri ile etkileşiminin olmaması, polar olmayan moleküllerin kendi aralarında etkileşime girmesi ile sonuçlanır; yani polar olmayan moleküller polar olmayan bir ortamı tercih ederler. Polar olmayan bu grupların başka polar olmayan gruplarla etkileşimleri “**Hidrofobik Etkileşimler**” olarak adlandırılır. Hidrofobik etkileşimler, protein molekülünün sulu ortamdaki kararlı yapısının oluşmasına sebep olan katlanmalarının en önemli sebebidir (Patthy, 1999).

Hidrofobik etkileşimler, molekülleri bir arada tutarlar. İki ya da daha fazla hidrofobik grup, su molekülleriyle çevrildiklerinde, birleşme eğilimi gösterirler. Su molekülleri, su ağındaki hidrojen bağlarının engelleyici etkisini azaltmak için hidrofobik grupları bir araya getirir. Bu yolla hidrofobik grupların su molekülleri tarafından itilmesi ve bu şekilde bir arada tutulması, “hidrofobik bağlar” ile açıklanmıştır.



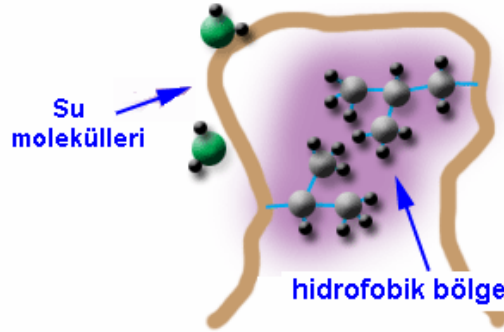
Şekil 3.21 Yüksüz moleküller arasında meydana gelen hidrofobik etkileşimler (14)

Hidrofobik etkileşimler, globular proteinlerin katlanması ve 3 boyutlu yapısını almasında en önemli kuvvetlerden biridir ve amino asitlerin hidrofobik yan zincirlerinin proteinin iç kısımlarına gömülmesi ile sonuçlanır. Frank ve Evans'ın (Franks ve Evans, 1945) polar olmayan türdeki moleküllerin, sudaki düşük çözünürlüklerini açıkladıkları çalışmalarına bağlı olarak, Kauzmann ilk kez 1950'lerin sonlarında proteinlerin katlanmalarının karmaşıklığını “**hidrofobiklik**” kavramıyla açıklamıştır (Kauzmann, 1959).



Şekil 3.22 Sulu ortamda hidrofobik kısımlar içeren lineer yapıdaki peptid zincirinin hidrofobik kısımların bir araya gelmesi sonucu katlanması (15)

Hidrofobik etkileşimler, proteinlerin özel üç boyutlu bir yapı oluşturarak, fonksiyonel hale gelmek üzere katlanmasında en önemli faktördür. Amino asitlerin dizilişleri otomatik olarak, proteinin üç boyutlu yapısını belirler. Deneysel olarak da bilindiği gibi, katlanma eğilimindeki proteinlerin hidrofobik yan zincirleri su moleküllerinden uzaklaşarak, proteinin iç kısımlarına çekilir.

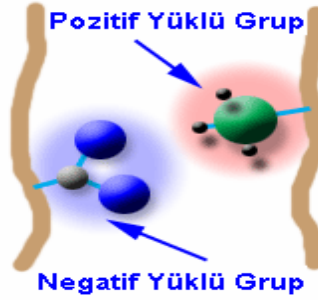


Şekil 3.23 Hidrofobik kısımlar içeren bir peptidde hidrofobik kısımların bir araya gelmesi
(16)

Hidrofobik etkileşimleri bu kadar tercih edilebilir kılan şey ise, hidrofobik etkileşimlerin kendiliğinden meydana gelmesi ve evrenin entropisinde azalmaya neden olmasıdır (Campbell ve Farrell, 2006).

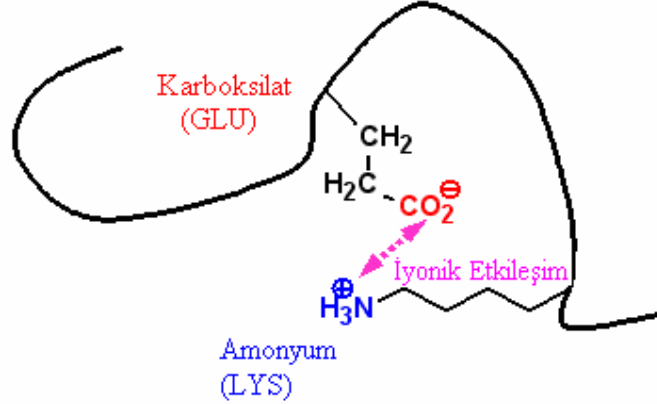
3.3.4 Elektrostatik (İyonik) Etkileşimler

Elektrostatik çekimler tarafından ortaya çıkan iyonik etkileşimler, iki karşıt yüklü ya da benzer yüklü moleküller arasında meydana gelir. Amino asit yan zincirleri, lizin, arjinin ve histidin amino asitlerinde olduğu gibi pozitif yük taşıyabilir veya aspartat ve glutamat amino asitlerindeki gibi negatif yük taşıyabilirler. Ayrıca, proteinlerin veya peptid zincirlerinin NH_2 -ucu ve COOH -ucu çoğunlukla iyonize formda bulunduklarından, protein veya peptid molekülleri pozitif veya negatif yükler taşıyabilirler.



Şekil 3.24 Zıt yüklü iki peptid zinciri arasında oluşan iyonik etkileşimler (16)

Bütün bunlar proteinin yapısında elektrostatik etkileşimlerin meydana gelmesini sağlar. Yüklü moleküller genellikle, proteinin suyla etkileşime girebileceği yüzeyinde yerleşmiş durumdadırlar. Proteinin yüzeyindeki bu yüklü gruplar arasında meydana gelen etkileşimler “elektrostatik etkileşimler” yada “tuz köprüleri” olarak adlandırılırlar. Ve bu etkileşimler proteinin stabilizasyonunda çok önem taşırlar (9). Bu etkileşimlere örnek olarak, pozitif yüklü lizin molekülünün, negatif yüklü glutamat molekülüyle etkileşimi şekilde gösterilmektedir.

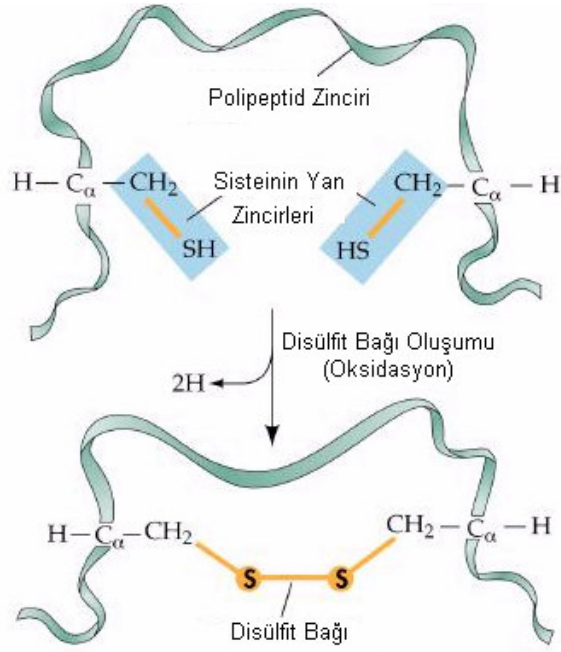


Şekil 3.25. Pozitif yüklü Lys ile negatif yüklü Glu arasında meydana gelen iyonik etkileşim

3.3.5 Disülfid Bağları

Disülfid bağı, iki sülfür atomu arasında meydana gelen kovalent bir bağıdır. Bu kovalent bağlar, birincil dizilimde farklı pozisyonlarda yerleşmiş sistein amino asitlerinin R grupları arasında meydana gelir. Bu bağlar proteinlerin katlanması, yapısı ve fonksiyonu açısından oldukça önemlidir (Mustafaev ve Mustafaeva, 2002).

Her sistein amino asidi, yan zincirinde fonksiyonel grup olarak tiyol grubu (-SH) taşır. Amino asidlerden birindeki sülfür atomu ile, amino asid diziliminde farklı bir pozisyonundaki sistein amino asidine ait sülfür atomu arasında, tersinir (geri dönüşümlü) bir kovalent bağ meydana gelir. Ve tiyol grupları okside olarak disülfid bağını (S-S) meydana getirirler.



Şekil 3.26 Bir peptid zincirinin farklı iki Cys bölgesi arasında meydana gelen disülfid bağı
(17)

Disülfid bağları, proteinlerin dördüncül yapılarının oluşmasında önemli role sahiptirler.

4. PEPTİD SENTEZİ

Peptid ismi ilk kez, 1906'da Emil Fischer tarafından bulunmuştur (Nispen, 1987).

Bir peptid, 3-50 amino asidin bir araya geldiği bir zincirdir. Peptidlerin biyokimya, farmakoloji ve nörobiyolojide yapısal ve fonksiyonel olarak anahtar rolleri vardır ve enzimoloji, immunoloji ve moleküler biyoloji araştırmaları için önemli bir yere sahiptirler (Barany vd., 2004).

Birçok peptid, potansiyel olarak yararlı bir ajandır ve ticari bir öneme sahiptir. Peptidler genel olarak,

- Dokudan saflaştırma yoluyla (ancak bu yöntem dokulardaki bazı peptitlerin düşük konsantrasyonlarından dolayı zordur);
- Genetik mühendisliği yöntemleri ile,
- Doğrudan kimyasal sentez yöntemleri ile

olmak üzere 3 yolla sentezlenebilirler. Bu yöntemlerin kullanılmasında pek çok zorluğun bulunması, kimyasal sentezi birçok açıdan önemli bir tercih haline getirmiştir. Ayrıca kimyasal sentez, ticari uygulamalara ilaveten, büyük proteinlerin özgül bölgelerinin sentezi, proteinin yapısı ve işlevinin çalışılması açısından artan bir öneme sahiptir. Bu teknolojiye ana katkı 1962'de R. Bruce Merrifield'den gelmiştir (Nelson ve Cox, 2005).

4.1 Mikrodalga Yöntemi

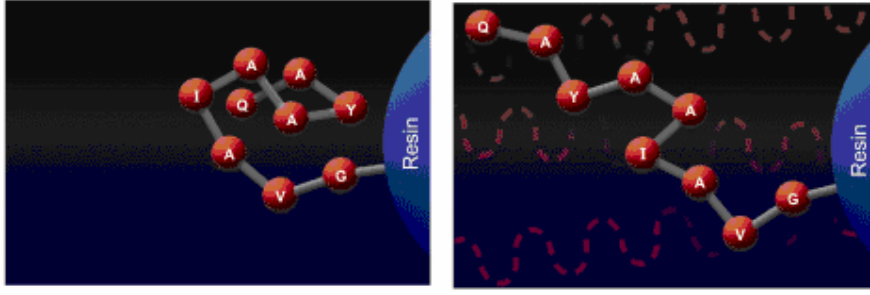
Mikrodalga yöntemi ile ısı enerjisi transferi, klasik yüzeysel ısıtıcılardan ya da ısıtma mantolarından oldukça farklıdır. Mikrodalga enerjisi, örneği doğrudan aktivasyonla ısıtır.

Klasik ısıtma yöntemleri enerjinin reaksiyon kabından dışarı taşınmasına olanak sağlar ve oldukça yavaş ve spesifik olmayan bir enerji transfer türüdür. Mikrodalga yönteminde ise, enerji transferi her bir döngünün enerji transferi için 9-10 sn'de gerçekleşir. Ve kinetik olarak durulma süresi de yaklaşık olarak 10-15 sn'dir. Bu nedenle de, reaksiyondaki moleküllere verimli bir şekilde büyük miktarda enerji uygulanabilir.

Mikrodalga ile ısıtmada enerji, doğrudan çözeltinin içindeki reaksiyon bileşenlerine transfer edilir ve bunun başlıca iki yararı vardır: 1) Reaksiyon kabının yerine doğrudan reaksiyon karışımına transfer edilir, 2) reaksiyonun merkezindeki reaksiyon bileşenleri, reaksiyon kabının duvarlarındaki bileşenlerle aynı anda ve aynı derecede ısıtılırlar.

Peptid sentezinde, peptid zincirinin toparlanması sırasında, reaksiyon hızının birden düştüğü gözlenir. Bazı durumlarda tekrarlanan veya uzatılan reaksiyon zamanı ile bile, zincirin bir araya gelmesinde bir gelişmenin olmadığını gösterir.

İkincil yapıdaki agregatların oluşmasının peptid-polimer matriksinin çok düşük çözünürlüğüne bağlı olarak meydana geldiği düşünülür. Ancak, bir peptid zinciri rezin üzerinde büyürken, kendisinden ya da rezine bağlı diğer zincirlerden kaynaklanan bir agregasyon meydana gelebilir. Peptidlerde N-ucuna ait amin grubu ve peptid zinciri, mikrodalga alanından etkilenecek polar bir yapıya sahiptir. Bu enerji, peptid sentezi sırasında zincirler arasında ve zincir içinde gerçekleşebilecek birleşmelere neden olan agregasyonu önlemeye yardımcı olabilir ve böylece reaktiflerin büyüyen zincirin uç noktasına daha kolay ulaşması sağlanır.



Şekil 4.1 Mikrodalga enerjisinin peptid zincirinin oluşması sırasında meydana gelebilecek agregasyonlara etkisi (18)

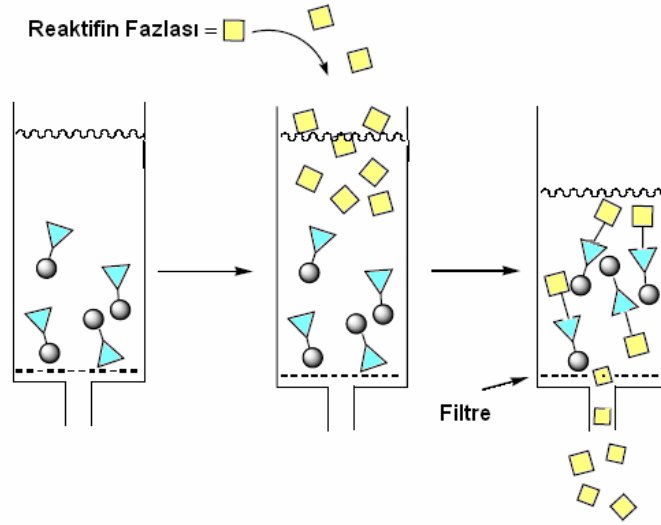
Başarılı bir peptid sentezi, her döngünün veriminin yaklaşık % 100'e yakın olmasını gerektirir ve mikrodalga enerjisi bu reaksiyonların ilerlemesi için en verimli yolu sağlar. SPPS'de karşılaşılan, özellikle de agregasyondan kaynaklanan en yaygın problemler, sentezin başından sonuna kadar harcanan zaman ve kimyasal miktardır. Mikrodalga enerjisi hızlı ve verimli alternatif bir enerji sağlar ve hem koruma gruplarının uzaklaştırıldığı (deprotection) hem de bağlanma (coupling) basamakları için oldukça verimli bir enerji türüdür (18).

4.2 Katı Faz Peptid Sentezi

Katı faz peptid sentezinin geliştirilmesi, klasik organik yöntemlerle sentezlenen peptidlerde karşılaşılan bir çok sorunun aşılmasına neden olmuştur ve bu metod 50 amino aside kadar yapılan sentezlerde bir standart metod haline gelmiştir.

Merrifield 1962’de, polipeptidlerin çözünmeyen katı bir polimer destek (Reçine=Rezin) üzerine bağlanarak, kimyasal olarak sentezlenmesini araştırmıştır (Merrifield, 1963) ve geliştirdiği bu metodla 1984 yılında Nobel ödülü almıştır (Solomons ve Fryhle, 2004). Bu yeni metod, zincirdeki ilk amino asidin kovalent bağla katı bir polimere bağlanmasına, istenen dizi bir araya gelene kadar, takip eden amino asidlerin adım adım bağlanmasına ve sonunda sentezlenen peptidin katı polimerden ayrılmasına dayanır. Büyüyen peptid zinciri, sağlam bir şekilde ve tamamen çözünmeyen katı parçacığa bağlandığında, reaksiyona girmeden kalan serbest reaktifler ve reaksiyon sonucu oluşan yan ürünler, filtre edilerek ve yıkanarak uzaklaştırılabilirler. Böylece safsızlıkların uzaklaştırılmasıyla, ara ürün peptidler, yeniden kristallendirilmelerine gerek kalmadan saflaştırılmış olur (Merrifield, 1963).

Katı faz kimyası, çözelti-fazı kimyası kadar gelişmemesine rağmen, çözelti-fazındaki senteze göre bazı avantajları vardır. Birincisi, katı faz sentezinde, reaktifin fazlası filtrasyonla yada yıkanarak uzaklaştırılabilirler. İkincisi, reaktiflerin ve ürünlerin iyi ayrılabilmesinden dolayı, katı faz peptid sentezi çözelti fazında gerçekleşen organik reaksiyonlara göre çok daha kolaylıkla otomatikleştirilebilir. Katı faza bağlanmış olan bileşiklerin çözeltilen ayrılması, basit bir filtrasyonla tamamlanabilir.



Şekil 4.2 Peptid sentezi sırasında, ortama eklenen reaktiflerin bağlanmayan kısımlarının filtrasyonla ortamdaki ayrıştırılması (Giraldés, 2003)

Katı faz (rezin), başlangıç reaktiflerine geri dönüşümlü olarak bağlanan ve çözünmeyen bir materyali tanımlar. Katı faz reaksiyonları, katı partiküllerin yüzeyinde ya da partikülün içinde gerçekleşebilir. Reaksiyonların rezinin yüzeyinde gerçekleşmesine olanak tanıyan çok çeşitli materyaller vardır.

Merrifield'ın başlangıçta kullandığı polistirenin %2'lik divinil benzen (DVB) ile kopolimeri olan rezinden sonra, çok çeşitli rezinler geliştirilmiştir. Rezinin seçimi, reaksiyonun tipine ve elde edilmek istenen ürüne bağlı olarak yapılır. Farklı reaksiyonlar için farklı tipte rezinler seçilebilir. Örneğin, dallanmış yapıdaki polietilen glikol (PEG) gibi bazı rezinlerin kullanımı, polar çözücüler için uygunken, polistiren (PS) rezinler polar olmayan çözücülerde kullanılır (Giraldés, 2003).

Suda çözünmeyen katı destek (Rezin), genellikle amino metil gibi bir reaktif gruba fonksiyonel hale getirilir. Böylece ilk amino asit, bir ara bağlayıcı (linker= handle) aracılığıyla bu fonksiyonel gruba bağlanmış olur. "Handle", ucunda rezindeki amino metil grubuyla birleşecek bir karboksil grubu içeren bir bifonksiyonel arabulucuyu tanımlamaktadır. İlk amino asit; daha sonra bu handle'a, ilgilenilen peptidin C-ucunun asit yada amid olmasına bağlı olarak ester ya da amid bağı ile C^α- karboksil grubundan bağlanır. Her amino asit N^α- amino grubunda geçici bir koruma grubuna ve eğer yan-zincirinde reaktif bir grup varsa, yan-zincir koruma grubuna sahiptir. Peptid zinciri daha sonra, bir sonraki korunmuş amino asitle birleşebilmesi için N^α- amino grubunun korumasının kaldırıldığı tekrarlayan döngülerle

$C \rightarrow N$ yönünde ilerler. Bu korumanın kaldırılması/ birleşme (deprotection/coupling) döngüleri, peptiddeki bütün amino asidler için tekrarlanır. Daha sonra peptid, polimerik destekten yani rezinden ayrılır ve geçici koruma grupları da uzaklaştırılır. Bu son iki işlem, genellikle tek basamakta yapılır (Barany, 2004).

Peptid sentezinde izlenen temel adımlar kısaca;

- Debloklama (deprotection),
- Yıkama (wash),
- Aktivasyon (activation),
- Bağlanma (coupling),
- Kırılma (cleavage) ve koruma gruplarının ayrılması (deprotection) olarak özetlenebilir.

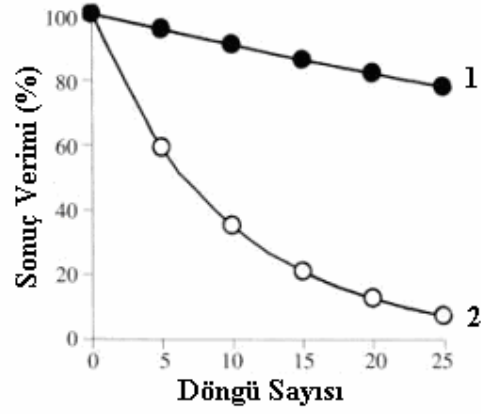
Peptid sentezinde, her bir basamağın veriminin son ürün olan peptidin verimine olan etkisi oldukça önemlidir.

Çizelge 1. Her basamağın veriminin son ürün olan peptidin verimine olan etkisi

Dizideki Amino Asid Sayısına Bağlı Olarak Her Bir Basamağın Verimi	Toplam Reaksiyon Verimi (%)					
(%)	10-mer	20-mer	30-mer	40-mer	50-mer	60-mer
99	90	82	74	67	61	55
98	82	67	55	45	36	30
95	60	36	21	13	8	5
80	11	1	0	0	0	0

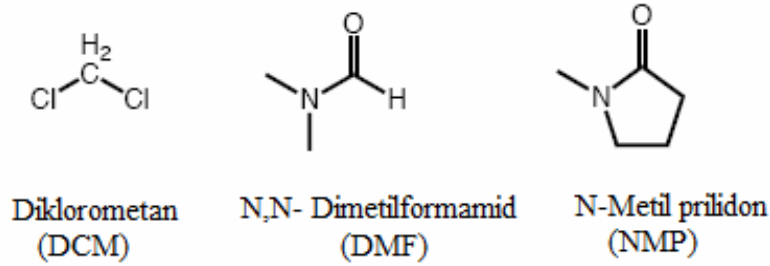
(Dr. Rita P.-Y. Chen Institute of Biological Chemistry Academia Sinica)

Toplam 25 döngü sonunda, her bir amino asidin bağlanmasının % 90 ve % 99 verimle gerçekleştiği durumlarda elde edilen peptidin verimi, Şekil 4.3'te grafik şeklinde gösterilmektedir.



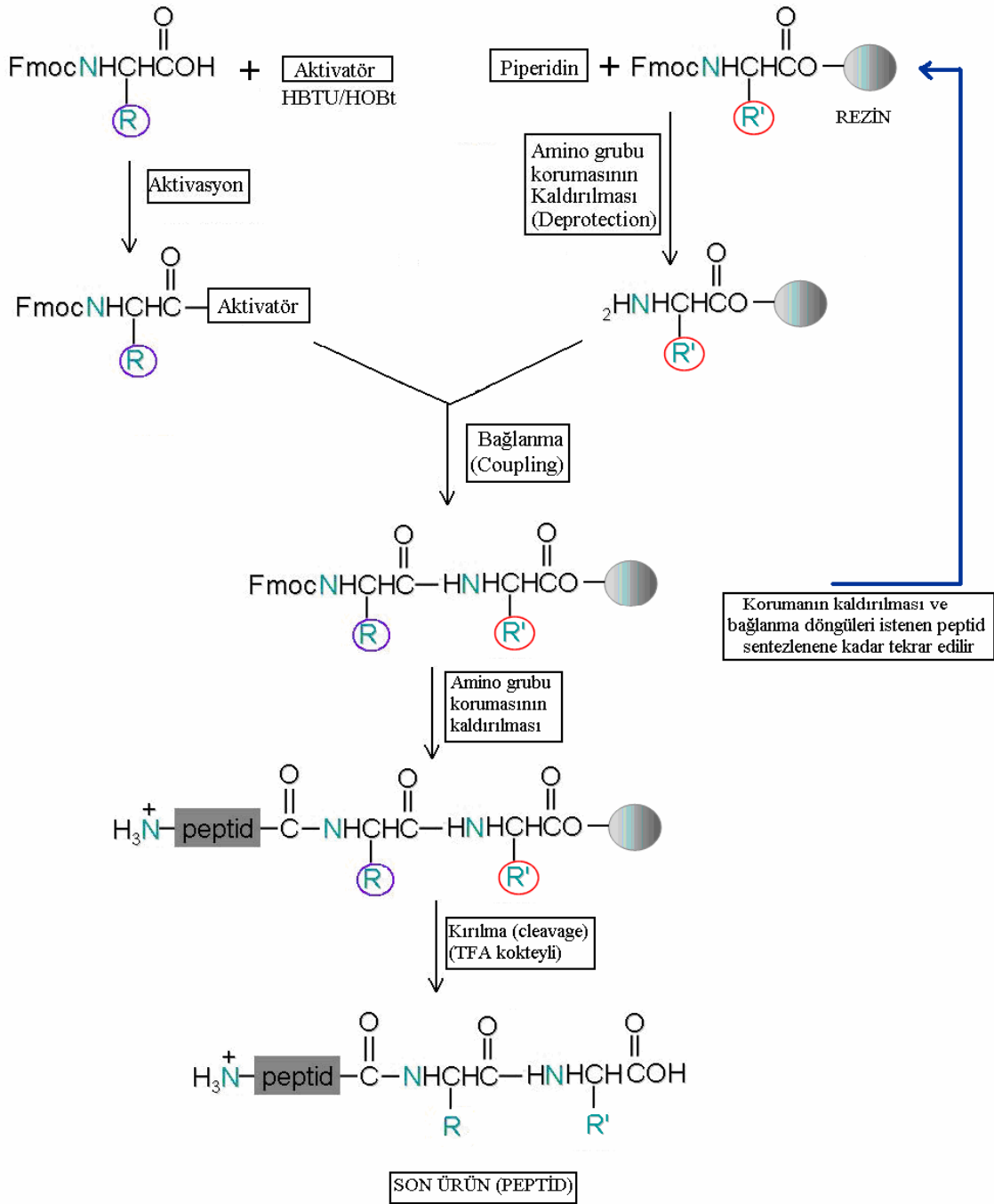
Şekil 4.3 Peptid sentezinde her basamağın veriminin (1) % 99, (2) % 90 olmasının sentez sonundaki toplam verime olan etkisi.

Peptid sentezinde ana çözelti ve yardımcı çözeltiler olarak en çok kullanılan kimyasallar, Diklorometan (DCM), Dimetilformamid (DMF) ve N-Metilprilidon (NMP)'dir.



Şekil 4.4 Peptid sentezinde kullanılan solventler

Bizim çalışmamızda, peptid sentezinde ana çözücü olarak DMF, ikinci çözelti ve yıkama çözeltileri olarak DCM ve yardımcı çözelti olarak da NMP kullanılmıştır.



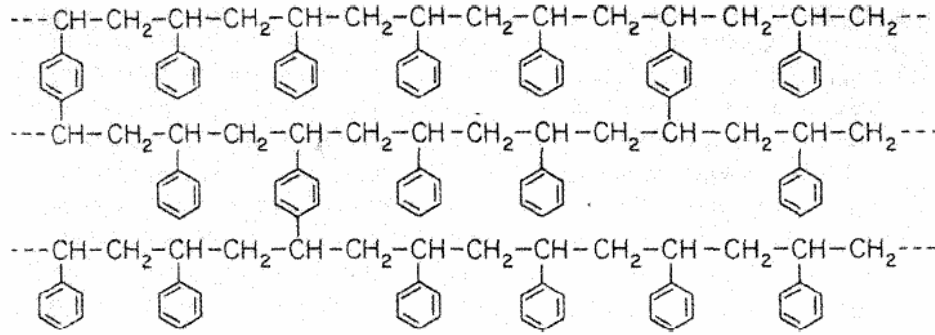
Şekil 4.5 Peptid sentezinde izlenen adımlar

4.2.1 Katı (Polimerik) Destek

“**Katı Destek** (Solid Support)” terimi genellikle, üzerinde kimyasal reaksiyonların yapıldığı matriksi ifade etmekte kullanılır. Çünkü gerçekte, katı faz reaksiyonları, sadece “**katı**”

polimerin yüzeyinde gerçekleşmez, aynı zamanda bu partiküllerin içinde de meydana gelir. Bu **katı destek** terimi, polimerin filtrasyona ya da santrifüje olanak veren ve bu sebeple de reaktiflerin üründen ayrılmasını sağlayan, çözünmeyen (insoluble) olma özelliğini ifade etmek de uygundur.

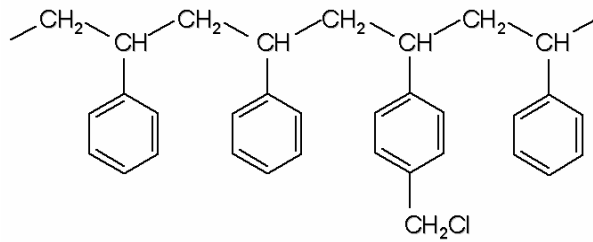
Katı faz peptid sentezinin başlangıç çalışmaları için kullanılan çapraz bağlı polistiren ile %2'lik divinil benzen (DVB)'nin kopolimeri, B. Merrifield tarafından geliştirmiştir (Albericio ve Kates, 2000).



Stiren- Divinil benzen Kopolimeri
(Merrifield Rezini)

Şekil 4.6 B. Merrifield'in geliştirdiği ve peptid sentezinin ilk aşamalarında kullandığı çapraz bağlı polimerik destek (Merrifield, 1984)

Merrifield daha sonra, bu kopolimeri klorometilleyerek, yan zincirde klorometil grubu oluşmasını sağlamıştır. Yan zincirdeki klor (-Cl), kolay ayrılabilen bir gruptur ve böylece rezin, SN2 tipinde bir nükleofilik katılma reaksiyonu verebilecek bir reaktife dönüşür.



Şekil 4.7 Fonksiyonel bir yan zincire sahip polimerik destek (Merrifield, 1984)

Polistiren matriks ve ona bağlı peptid molekülü, kimyasal reaksiyonlar boyunca, bütün

reaktiflerin iyice diffüze olabilmelerini sağlamak için oldukça iyi çözünmüş olmalıdır. Reaksiyonlar polimerin sadece yüzeyinde değil, aynı zamanda ve hatta daha çoğunlukla çapraz bağlı polimerik matriksin içinde gerçekleşir (Merrifield, 1984).

Merrifield'ın peptid sentezinin başlangıç çalışmalarında kullandığı polistiren- DVB rezininden bu yana, çok çeşitli katı destekler geliştirilmiştir.

Sadece tek bir özellikteki polimer desteğin kullanılması, istenen biyomolekülün iyi bir verimle sentezlenebilmesi için yeterli değildir ve başka polimer desteklerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmuştur. Yeni rezinlerde olması istenen özellikler, şişme özelliklerinin, rijitliğinin (mekanik gücü) ve kimyasal olarak inertliğinin artırılmış olmasıdır. Geleneksel SPPS, kırılma işleminden sonra asid peptidler ya da amid peptidlerin oluştuğu, peptid ile rezinin arasında ara bağlayıcıların olduğu rezinlerden faydalanır. Rezinlerde ara bağlayıcı olarak genellikle farklı fonksiyonlardaki bağlayıcılar ya da iyi ayrılan gruplar (Br ve I gibi) kullanılır.

Verimli bir katı destek (yani rezin) de olması gereken özellikler şunlardır:

1. Rezinin fiziksel büyüklüğü ve yapısı, manipülasyona izin verecek şekilde partiküller şeklinde olmalı ve sıvılardan hızlı bir şekilde filtre edilebilmelidir. Ayrıca fiziksel olarak kararlı olmalıdır.
2. Sentez boyunca kullanılan bütün çözücülere ve reaktiflere karşı inert olmalıdır.
3. Sentezde kullanılan çözücülerin içinde iyi şişme özelliğine sahip olmalıdır ve bütün reaktifler, rezin petiküllerinin içine kolaylıkla girebilmelidir. Kuru polimerik matriksin uygun çözücüler ile etkileşimleri, genişlemiş (şişmiş) bir yapının oluşmasına sebep olur.
4. Polimerik destek, ilk amino asidin bağlanmasına izin verecek şekilde kolaylıkla modifiye edilebilmelidir. Bu amaçla çeşitli bağlama grupları (linker ya da handle) ve stratejileri kullanılabilir. Bunlardan biri, ara bağlayıcı grubun korumalı amino aside ya da peptide bağlanması ve daha sonra fonksiyonel polimerle reaksiyona girmesi olabilir. Alternatif olarak, bu ara bağlayıcı grup, başlangıçta polimerin kendi yapısında da bulunabilir. Başlangıçtaki bağlama ünitesi, sonraki reaksiyonlardaki reaktifler için kısıtlayıcı olabilir. İlk reaktif için başlangıç “yükleme” seviyesinin uygun bir şekilde seçilmesi, sentezin veriminin maksimum olmasını belirleyebilir. SPPS’de, çok sayıda zincirin polimerik matrikse doğru yayılması, her bir kimyasal basamağın verimini;

- Sterik engellemeler,
- Yan zincirler arasında meydana gelebilecek reaksiyonlar,
- Reaktiflerin difüzyonunun azalması ve
- Sistemin çözünürlüğünün değişmesi gibi nedenlere bağlı olarak azaltabilir.

Bu da gösterir ki, yüksek yüklemeler (=high loadings) (polistiren rezin için 0.8 – 2 mmol/g) 10-20 arası döngüden sonra sentetik hatalarla sonuçlanabilir. Bu nedenle de, düşük seviyedeki yüklemeler (=lower loadings) (0.3 – 0.5 mmol/g) yaygın olarak kullanılmaktadır.

Polimerik katı destekleri fiziksel özelliklerine göre sınıflandırmak mümkündür:

- **Jel tipindeki destekler (Gel-type supports):** Katı faz peptid sentezinde en çok kullanılan rezinlerdir. Oluşturdukları inert polimer ağı, oldukça esnektir ve büyük moleküllerin bir araya gelmesi için çok idealdir. Ayrıca bu tipteki rezinler, jelin içinde büyüyen molekülü taşımak üzere, çözücüyü içlerine alarak şişebilirler.

Jel rezinleri 4 grupta inceleyebiliriz:

- **Polistiren Rezinler (PS):** Hidrofobik özellikteki polistiren rezinler, stiren moleküllerinin % 1 ya da % 2'lik divinilbenzen (DVB) ile çapraz bağlanmasıyla elde edilirler ve çeşitli fonksiyonellikteki gruplarla substitüye olabilirler.
- **Poliakrilamid Rezinler:** Polistiren rezinlere alternatif olan hidrofobik poliakrilamid rezinler, poli-N,N-dimetilakrilamid, bis-N,N'-açiloiletildiamin ve N-akriolsarkosin metil esterinin çapraz bağlanmasıyla elde edilirler. Bu ester polimerizasyondan sonra, fonksiyonel gruba dönüştürülür.
- **Polietilen Glikol (PEG)- Aşı (Grafted) Rezinler:** PEG-PS rezinler mekanik olarak oldukça kararlı rezinler olarak geliştirilmiştir. PEG-PS polistiren patikülleri üzerinde aşı polimerizasyonu ile (Tentagel) yada oligooksietilenlerin, aminometillenmiş polistiren tanecikleriyle reaksiyonuyla elde edilir.
- **PEG Bazlı Rezinler:** PEG bazlı rezinler, ya PEG-Polipropilen glikol (PPG) ağıyla ya da az miktardaki poliamid veya polistirenin PEG ile kombinasyonu ile meydana oluşturulur.

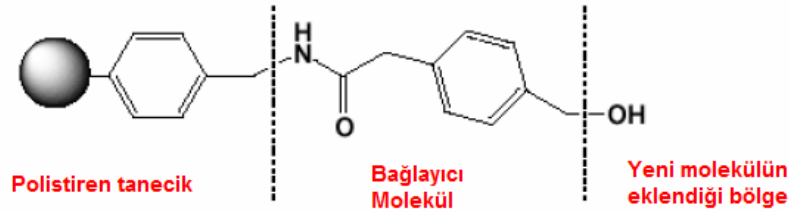
- **Yüzey-Tipindeki Destekler:** Yüzeyin fonksiyonelleştirilmesinde, polietilen, selüloz fiberler, gözenekli çapraz bağlı polistiren ya da polimetakrilat ve silika gibi birçok farklı materyalden yapılmış olanlar kullanılabilirler.
- **Kompozitler ve Desteklenmiş Jeller:** Polimerin mekanik kararlılığını arttırmak için Jel tipindeki rezinler rijit matrikslerle desteklenebilir. Örneğin teflon membranlar, kararlı akışkanlık elde etmek için polimetakrilat ile modifiye edilmişlerdir.
- **Brush Polimerler:** Polistiren gibi lineer bir bileşen, bir polietilen film ya da tüp üstüne bağlanır. Polimer zincirleri, fırçaya benzer bir düzende rijit yüzey üzerinde uzarlar. Fonksiyonelleştirme yalnızca zincirlerin uzamasıyla sağlanabilir ve fonksiyonel gruplar daha sonra, solid faz sentezinde önemli olan arabağlayıcılar ile modifiye edilebilir (Albericio ve Kates, 2000).

4.2.2 Bağlayıcı (Linker / Handle) Moleküller

Katı faz peptid sentezinde kullanılan bağlayıcı (linker ve ya handle) moleküller, peptid ile polimerik destek arasında bağlanma sağlar (Dilgmen, 1998).

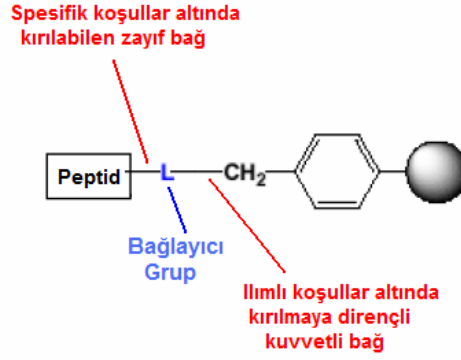
Bu bağlayıcı molekülleri içeren rezinler ticari olarak; sadece bağlayıcının polimerik desteğe bağlandığı veya sentezlenecek dizinin ilk amino asidinin bu ara bağlayıcı vasıtasıyla polimerik desteğe bağlandığı şekilde (preloaded) satılmaktadırlar.

Amino asid kalıntısının C-ucunun katı faza bağlanması, polimerik desteğin fonksiyonelliği veya genellikle amid bağıyla aminometil polistirene bağlanan bir arabağlayıcı yoluyla gerçekleştirilir. Sentezleyeceğimiz hedef molekül için uygun rezinin seçilmesi için, bu ara bağlayıcı molekülün sahip olması gereken birkaç önemli özellik bulunmaktadır: verimli bir prosedürünün olması, ilk amino asidin eklenmesinde rasemizasyon ihtimali bulunmaması, kırılma koşulları ve son ürün olan peptidin C-ucunun fonksiyonelliğini belirlemesi gibi (20).



Şekil 4.8 Polimerik desteğe bağlı bulunan ve fonksiyonel grup taşıyan ara bağlayıcı molekülün gösterimi (19)

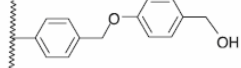
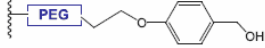
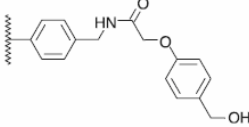
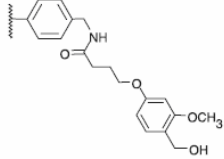
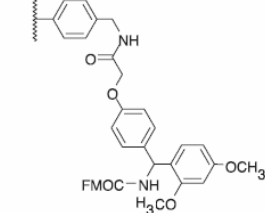
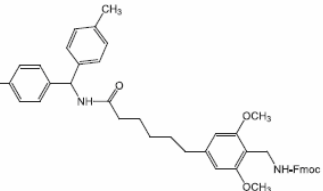
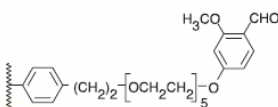
Peptidin polimerik destekle birleşmesi sırasında bağlayıcı molekül, sentez koşullarına dayanıklı olmalı ve sentez bittikten sonra da peptidin polimerden kolayca ayrılabilmesini sağlamalıdır (Dilgmen, 1998).



Şekil 4.9 Bağlayıcı molekülün rezinden ayrılması (19)

Fmoc kimyasına dayalı peptid sentezinde yaygın olarak kullanılan ara bağlayıcı moleküller Çizelge 2’de verilmiştir:

Çizelge 2. Peptid ile polimerik desteği birbirine bağlamakta kullanılan bağlayıcı moleküller

Ara Bağlayıcı Moleküller	Yapı	Son Ürün	Kırılma Koşulları
Wang		Peptid asidleri	TFA (Tutucuları)
PHB		Peptid asidleri	TFA (Tutucuları)
HMPA		Peptid asidleri	TFA (Tutucuları)
HMPB		Korunmuş peptid asidleri	Seyreltik TFA (%1-5)
Rink Amid (RAM)		Peptid karboksiamidler	TFA (Tutucuları)
PAL		Peptid karboksiamidler	TFA (Tutucuları)
FMP		Peptid Amidleri Peptid Asidleri	TFA (Tutucuları)

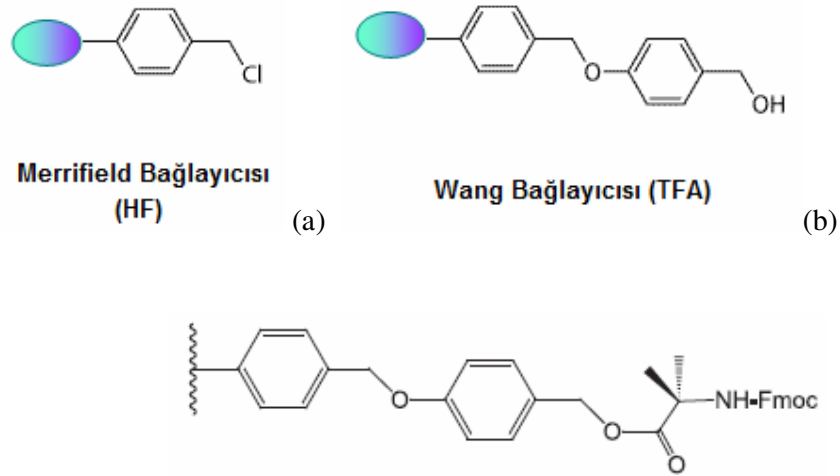
4.2.2.1 Wang Bağlayıcı İçeren Rezinler

S. Wang, 1973'de Merrifield'in rezinini 4-fenoksibenzilalkol ile modifiye ederek Wang rezinleri geliştirmiştir (21).

Wang olarak adlandırılan 4-hidroksimetilfenoksiasetik asid ara bağlayıcıların kullanıldığı katı destekler, Fmoc/t-Bu koruma metodunda %95'lik TFA ile kolaylıkla kırılabilen ve peptid sentezinde son ürün olarak peptid asidlerin olduğu sentezler için kullanılırlar. Fmoc amino

asidler, bu bağlayıcı ile epimerizasyon en aza indirilerek bağlanırlar. Wang rezinlerin polimerik matriksi, polistirenin %1’lik DVB ile çapraz bağlanmasıyla oluşan kopolimerdir (20).

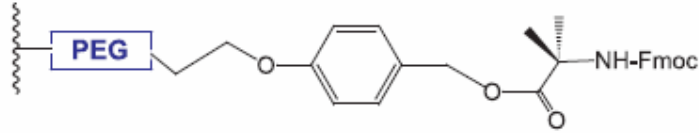
Merrifield ile Wang bağlayıcıları arasındaki en önemli fark, kırılma basamağındadır. Benzen halkasındaki para konumundaki oksijen atomunun mezomerik etkisi, asidin karbonil grubundaki elektron yoğunluğunun artmasıyla sonuçlanır ve bu durum HF’e göre, DCM içindeki %50’lik TFA ile daha iyi kırılmasına olanak sağlar (21).



Şekil 4.10 (a) Merrifield’in ilk peptid sentezi çalışmalarında kullandığı ara bağlayıcı molekül
(b) Wang bağlayıcı (c) İlk amino asidin rezine yüklenmiş olduğu (Preloaded) Wang rezin
(20).

4.2.2.2 PHB Bağlayıcı İçeren Rezinler

PHB bağlayıcısı (PHB = *p*-hidroksibenzil alkol), Fmoc-/tBu SPPS stratejisinde peptid asidlerini oluşturmak üzere kullanılan ve asitle çok iyi dercede kırılabilme özelliğine sahip bir moleküldür. Sentezlenen peptidden %95’lik TFA ile ayrılabilir. Bu bağlayıcının kullanıldığı, ticari olarak çok bilinen rezinler : TentaGel® PHB ve HypoGel® PHB’dir. TentaGel® PHB rezinine ait polimerik matriks; PEG’nin PS taneciklerine düşük çapraz bağlarla bağlanmasından oluşur.



Şekil 4.11 PHB bağlayıcı molekülün gösterimi (20)

4.2.2.3 HMPA (4-hidroksimetil-3-metoksiFenoksi) asetik asid) Bağlayıcı İçeren Rezinler

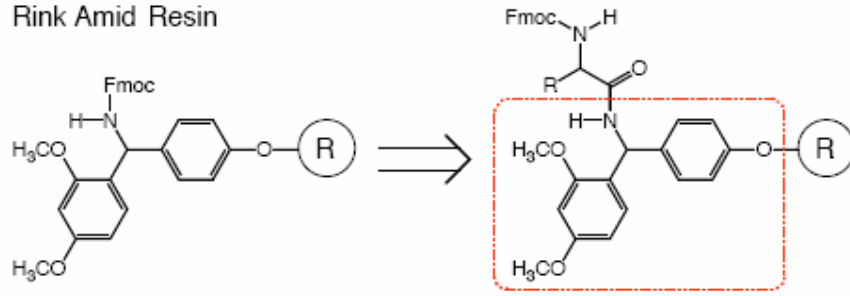
Bu polimer destekler, Wang bağlayıcılarla benzer olarak son ürün olan peptidden, % 95'lik TFA ile kolaylıkla ayrılabilir. Arabağlayıcı molekül ile aminometil polistiren arasındaki amid bağı, SPPS'de oluşan araürünlerden kaynaklanan aside karşı hassas benzil fenil eter bağının oluşmasını engeller.

4.2.2.4 HMPB (4-hidroksimetil-3-metoksiFenoksi) butanoik asid) Bağlayıcı İçeren Rezinler

Bu bağlayıcılarla hazırlanan HMBP rezinler, korunmuş (protected) peptid asid fragmentlerinin hazırlanmasında çok iyi birer araçtırlar ve Diklorometan (DCM) içindeki % 1-5'lik TFA ile kolaylıkla kırılabilirler (20).

4.2.2.5 Rink Amide (RAM) Bağlayıcı İçeren Rezinler

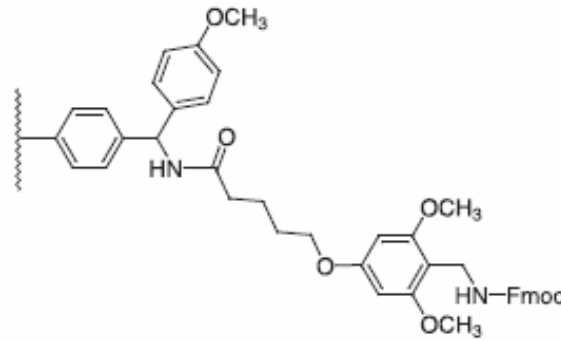
SPPS'de Fmoc kimyası kullanıldığında ve sentezlenen son ürün peptidin karboksil ucunun peptid amid olması istendiğinde bu bağlayıcıyı içeren rezin kullanılır. Sentez bittiğinde ise, peptidin rezinden ayrılması için TFA kullanılır (22).



Şekil 4.12 RAM bağlayıcı molekülün gösterimi (22).

4.2.2.6 PAL (Peptide Amide Linker) Bağlayıcı İçeren Rezinler

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda PAL bağlayıcı içeren rezinler, peptid karboksi amidlerin sentezi için oldukça yararlı araçlar olarak kullanılmıştır (20). PAL bağlayıcıların serbest ucundaki amino grubu, Fmoc grubu ile korunmuştur. Sentezin ilk döngüsünde bu koruyucu grup ayrılır ve peptid bağı oluşumu ile ilk amino asidin bağlanması gerçekleşir (Dilgmen,1998). PAL bağlayıcıların kırılma koşulları RAM rezinlerle benzerlik gösterir (% 95 TFA).



Şekil 4.13 PAL bağlayıcı molekülün gösterimi (20).

4.2.3 Koruma Grupları (Protecting Groups)

Peptid sentezinin en önemli basamaklarından biri de, ilk amino asidin amino grubunun, diğer amino asid aktive edilmeden önce korunmuş olmasıdır. Amino grubunun korunması, bu grubun nükleofilik özelliğinin, reaksiyona girmeyecek bir açıl türevine dönüştürülmesi

anlamını taşır (Solomons ve Fryhle 2004).

İki amino asid peptid molekülünü oluşturmak üzere birleşirken, amino asidlerin taşıdıkları fonksiyonel grupların (amino, karboksil ve yan zincirdeki gruplar), reaktivitelerinin peptid bağına katılmaması için baskılanmış olması gerekmektedir. Bu baskılama, her gruba daha sonra ortamdan ayrılması kolay olan başka bir bileşiğin bağlanmasıyla sağlanır. Bu bileşiklere **“Koruma Grupları (Protecting Groups)”** adı verilir. Peptid sentezi için başlangıç materyalleri, koruma gruplarına sahip amino asidlerdir (Benoiton, 2005).

İki tane benzer yapıya sahip amino asidin birleşmesi sırasında, bir amino asidin amino grubuyla, diğer amino asidin karboksil grubunun birleşme reaksiyonuna (coupling reaction) katılması, bu koruma grupları sayesinde önlenir. Ayrıca koruma grupları, amino asidlerin ve peptidlerin zwitter iyonik yada dipolar karakterine bir zarar gelmesinin engellenmesinde önemli bir role sahiptirler.

Bu koruma grubu dikkatlice seçilmeli ve 2. amino asid ile bağlanma basamağına gelmeden önce kolaylıkla ayrılabilir özellikte olmalıdır. Ayrıca bu ayrılma koşulları da, peptid bağını etkilememelidir (Solomons ve Fryhle 2004). Koruma grupları, peptid sentezi koşullarında kimyasal olarak kararlı bir yapıya sahip olmalı, bitişindeki kiral merkezi (glisin hariç diğer bütün amino asidlerdeki), resemizasyondan korumalı ve sentez reaksiyonunun sonunda veya ara ürün basamaklarındaki ılımlı koşullarda kolayca uzaklaştırılabilir olmalıdır.

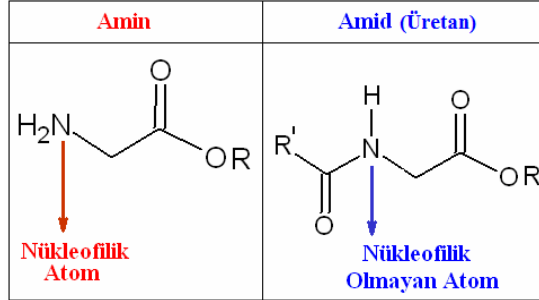
İstenen peptid zincirinin sentezinin tamamlanmasına kadar yapıda yer alan koruma grupları **“Kalıcı (permanent) gruplar”**, ara ürün basamaklarında uzaklaştırılan koruma grupları ise, **“Geçici (Temporary) gruplar”** olarak adlandırılırlar (Atherton ve Sheppard, 1989). Geçici koruma grupları genellikle, α -amino gruplarının korunmasında kullanılır. Kalıcı koruma gruplarının ise, yan zincirlerin korunmasında kullanılır; çünkü meydana gelebilecek yan reaksiyonların önlenmesi amacıyla sentezin başından sonuna kadar kalması istenir.

4.2.3.1 α - Amino Koruma grupları

Kimyasal peptid sentezinin en önemli gereklerinden biri de, amino asidlerin α -amino grubunu, bir sonraki bağlanma gerçekleşene kadar, geçici olarak koruyacak grupların uygun olarak seçilmesi ve kullanılmasıdır. Bu geçici koruma, katı faz sentezi için zorunludur, çünkü α -amino grubu, bir nükleofil gibi davranarak, ortamdaki başka bir karboksil grubuyla reaksiyona girebilir.

Amid grubuna ait azot atomu ise, amin grubuna göre daha az nükleofilik karakter taşır. Bu

nedenle de, amid türevleri (üretanlar ya da Karbamatlar) koruma grupları olarak kullanılabilirler. Çünkü amid grubundaki azot atomu nükleofilik özellik taşımadığından, yani reaktif olmadığından ortamdaki herhangi bir karboksil grubuyla reaksiyona girmez.

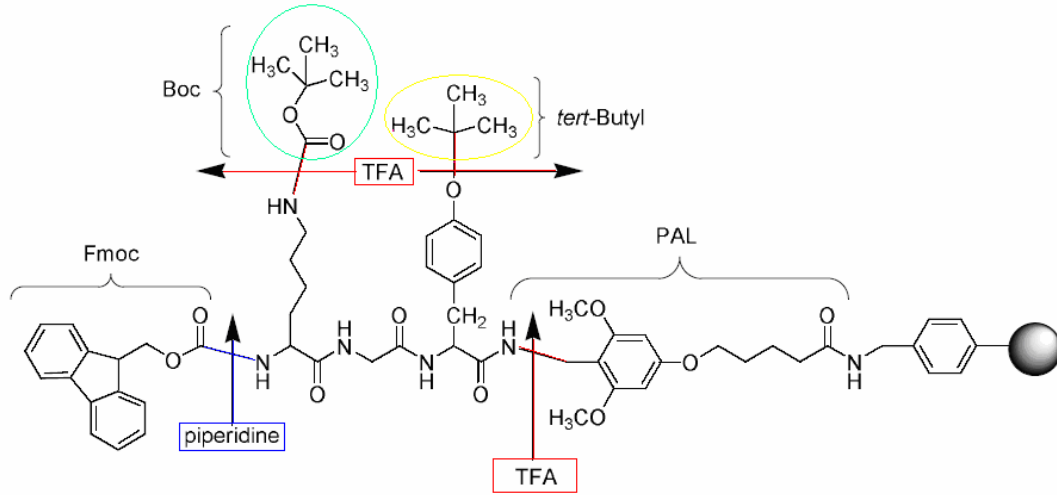


Şekil 4.14 Peptid sentezinde nükleofil karakter taşıyan ve taşımayan atomların gösterimi

Peptid sentezinin başlangıcında, üretan koruma gruplarının amino grubunu korumada kullanılabileceği düşünülmüştür. Bu fikir 1932 yılında ilk kez Bergmann ve Zervas tarafından geliştirilmiştir ve benzioksi karbonil amino asitler (Z-amino asitler) peptid sentezinde önemli ara ürünleri oluşturmuştur. Üretandaki azot atomu, peptid sentezi koşullarında genellikle inerttir. Daha önemlisi benzioksi karbonil grubu, yeni oluşan peptid bağıni etkilemeyen bir asidik katalizle kolaylıkla kırılabilir. Bu ılımlı kırılma, benzioksi karbonil fonksiyonunu geçici koruma grubu olması açısından ideal kılar (Atherton ve Sheppard, 1989).

Son 30 yılda çok çeşitli alternatif N^α-koruma grubu geliştirilmiştir. Özellikle bazla kırılan (base-labile) üretanlar, β-eliminasyonu ile uzaklaştırılabilirler. Diğer gruplar (üretan olması gerekmeksizin) ise, fotoliz, elektroliz, nükleofilik kırma, indirgeme ve metalle kırma gibi alternatif metodlarla uzaklaştırılabilmek üzere tasarlanmışlardır.

Asidle iyi kırılma (lability) özelliğine sahip alternatif üretanların en önemlisi, tert-bütiloksi karbonil (t-Boc) grubudur. Bu grubun Merrifield tarafından benimsenmesi ve katı faz sentezde anahtar bileşen olarak kullanılması, modern peptid sentezine ve araştırmalarının başarılı olmasına büyük ölçüde katkı sağlamıştır (Albericio ve Kates 2000). Bazla iyi kırılabilen Fmoc grubunun geliştirilmesi ve asidle kırılabilen t-Boc grubu ile birlikte kullanılması, ortogonal stratejinin temelini oluşturur ve kırılma işleminin reaksiyon koşullarına ve ortamına göre seçimli bir metod olarak kullanılmasına olanak sağlar.



Şekil 4.15 Katı faz peptid sentezinde Fmoc/Boc koruma grupları stratejisi (Giraldés, 2003).

SPPS’de kullanılacak geçici koruma grubu, katı faz sentezinin başarılı olmasını sağlayacak bazı önemli gereklilikleri yerine getirmelidir:

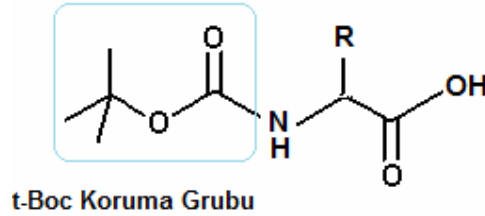
- Bu grup, amino asit türevlerinin optik özelliklerini etkilememelidir.
- Koruma grubu, katı faz sentezinin yapıldığı bütün koşullarına karşı dayanıklı olmalıdır.
- Yan zincir reaksiyonlarına neden olmamalıdır ve reaksiyon koşulları altında, herhangi bir amino asidin yan zincir koruma grubunun (kalıcı=permanent) ayrılmasını etkilemeyecek şekilde hızlı, verimli ve seçici olarak ayrılabilmelidir (Albericio ve Kates 2000).

Katı faz peptid sentezinde, α -amino grubunu korumak üzere, en çok kullanılan gruplar Florenilmetoksikarbonil (9-Fluorenylmethoxycarbonyl= Fmoc), t-bütoksikarbonil (t-butoxycarbonyl= t-Boc)’dir.

4.2.3.1.1 Tersiyer-Butiloksi Karbonil (t-Boc) Grubu

t-Boc grubu, ürean tipindeki koruma gruplarına bir örnektir (23) ve Carpino tarafından geliştirilmiştir (Pennington ve Dunn 1994). Yapısındaki tert-butil grubunun büyük bir grup olmasından dolayı daha az reaktiftir. Asit ortamında, karbonil grubu protonlanabilir ve bu da onu daha iyi ayrılabilen bir grup yapar. t-Boc grubu, nükleofilik ataklara dirençlidir ancak aside karşı hassastır [$(\text{CH}_3)_3\text{C}^+$ grubunu kaybeder] (23).

Tert-Butiloksikarbonil (t-Boc) grubu, birleşme bağına ya da diğer koruma gruplarına minimal zarar vererek, diklorometan (DCM) içindeki % 50'lik Trifloroasetik asid (TFA) ile tamamen uzaklaştırılabilir. Sonuçta oluşan araürün, α -amin tuzu, diizopropil etilendiamin (DIEA) gibi bir tersiyer amin ile nötralize edilir ve rezin-amino asid bağının serbest amino grubu, ikinci Boc-amino asid ile birleşmeye hazır hale gelir (Merrifield, 1984).



Şekil 4.16 t-Boc koruma grubu ile korunmuş bir amino asidin gösterimi

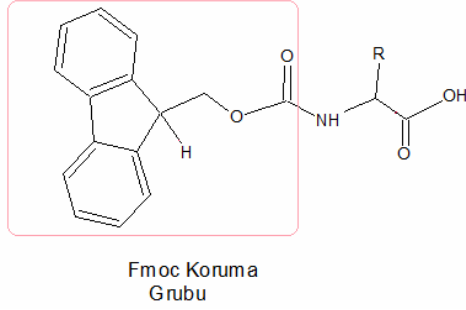
Fmoc grubunun geliştirilmesi ve ortogonal koruma stratejinin kullanılmasından sonra, t-Boc grubu daha çok yan zincir koruma grubu olarak kullanılmıştır.

4.2.3.1.2 Fmoc Grubu

Fmoc grubu, Carpino ve arkadaşları tarafından 1972'de geliştirilen, katı faz peptid sentezinde alifatik ve aromatik aminlerin korunmasında yaygın olarak kullanılan koruma gruplarından. Fmoc grubu, sıvı fazda yapılan sentez için uygun bir kimyasal değildir çünkü korumanın kaldırılması (deprotection) işlemi sırasında uçucu olmayan yan ürünler (dibenzofulven gibi) oluşabilir (Zaragoza, 2002).

Fmoc koruma grubu, piperin gibi bir organik baz kullanılarak nötralizasyon basamağı gerektirmeksizin kolaylıkla kırılabilir. Ayrıca güçlü bir UV absorpsiyonunun olması, bu grubun kullanıldığı sentezlerin analitik yöntemlerle kontrolü açısından büyük önem taşımaktadır (Allen, 1995).

Fmoc grubunun elektron çekici floren halka sistemindeki beta karbonuna ait hidrojen atomu oldukça asidiktir ve bu nedenle de zayıf bir bazla kolaylıkla ayrılabilir. Floren halka sisteminin 9 konumundaki bu asidik proton, β -eliminasyonu ile oldukça reaktif dibenzofulven ara ürünü oluşturur. Dibenzofulven kararlı bir ürün oluşturmak üzere, amin yapıdaki kırılma ajanlarıyla (scavengers) baskılanabilir (Pennington ve Dunn, 1994).



Şekil 4.17 Fmoc koruma grubu ile korunmuş bir amino asidin gösterimi

Fmoc grubu genellikle DMF veya NMP içindeki % 20-50'lik piperidin ile uzaklaştırılır (22).

Çeşitli amino asitlerin Fmoc-türevleri birçok firma tarafından çok yüksek verimlerle sentezlenmektedir. İstenen özellikteki maddeleri sentezleyen bu firmalar sayesinde, laboratuvar bazında sentez yapma zorunluluğu ortadan kalkmıştır.

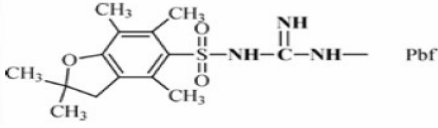
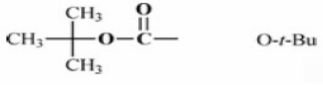
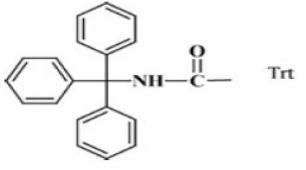
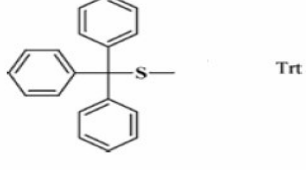
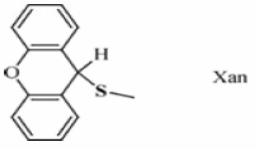
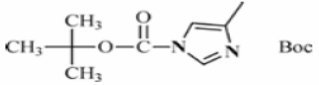
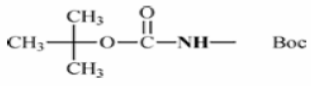
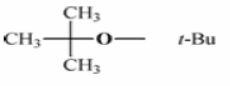
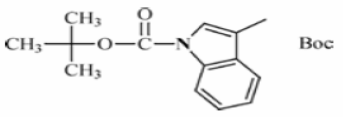
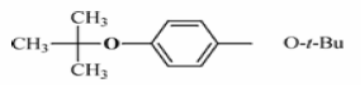
4.2.3.2 Yan zincir koruma grupları

Katı faz peptid kimyasının en zor kısımlarından biri de, lizin, glutamik asit ve sistein gibi yan zincirinde fonksiyonel gruplar taşıyan amino asitlerin yan zincir reaksiyonlarının önlenmesidir. Bu yan zincir reaksiyonlarını önlemek için, “**Yan zincir koruma grupları**” kullanılır. Bu gruplar, bağlanma (coupling) ve kırılma (cleavage) koşullarında kararlı olmalı ancak son ürün olan peptidin rezinden ayrılmak üzere kırıldığı koşullarda, peptidde bulunan tüm koruma gruplarının kırılması için kolay ayrılabilir olmalıdır (Giraldés, 2003). N-amino grubunun korunmasında kullanılan Fmoc prosedüründe, asid ortamında kararsız olan bileşikler, yan zincirdeki fonksiyonel grupları korumakta kullanılırlar. Yan zincir koruma grupları olarak, genellikle t-bütil bileşikleri kullanılır: t-bütil eterleri Ser, Thr ve Tyr için, t-bütil esterleri Asp ve Glu için, ve t-Boc grubu His ve Lys amino asitleri için kullanılırlar. Ayrıca, tritil (Trt) grubu Cys, Asn ve Gln amino asitlerinin yan zincirlerini korumak için kullanılabilirler (Bhagavan, 2002).

Peptid sentezinde kullanılan amino asitler genellikle ticari olarak, α -amino grupları ve yan zincirdeki fonksiyonel grupları korunmuş şekilde satın alınmaktadır.

Amino asitlerin fonksiyonel yan zincirleri için kullanılan bazı koruma grupları Çizelge 3'te verilmiştir.

Çizelge 3. Bazı amino asidlere ait yan zincir koruma grupları (Giraldés, 2003).

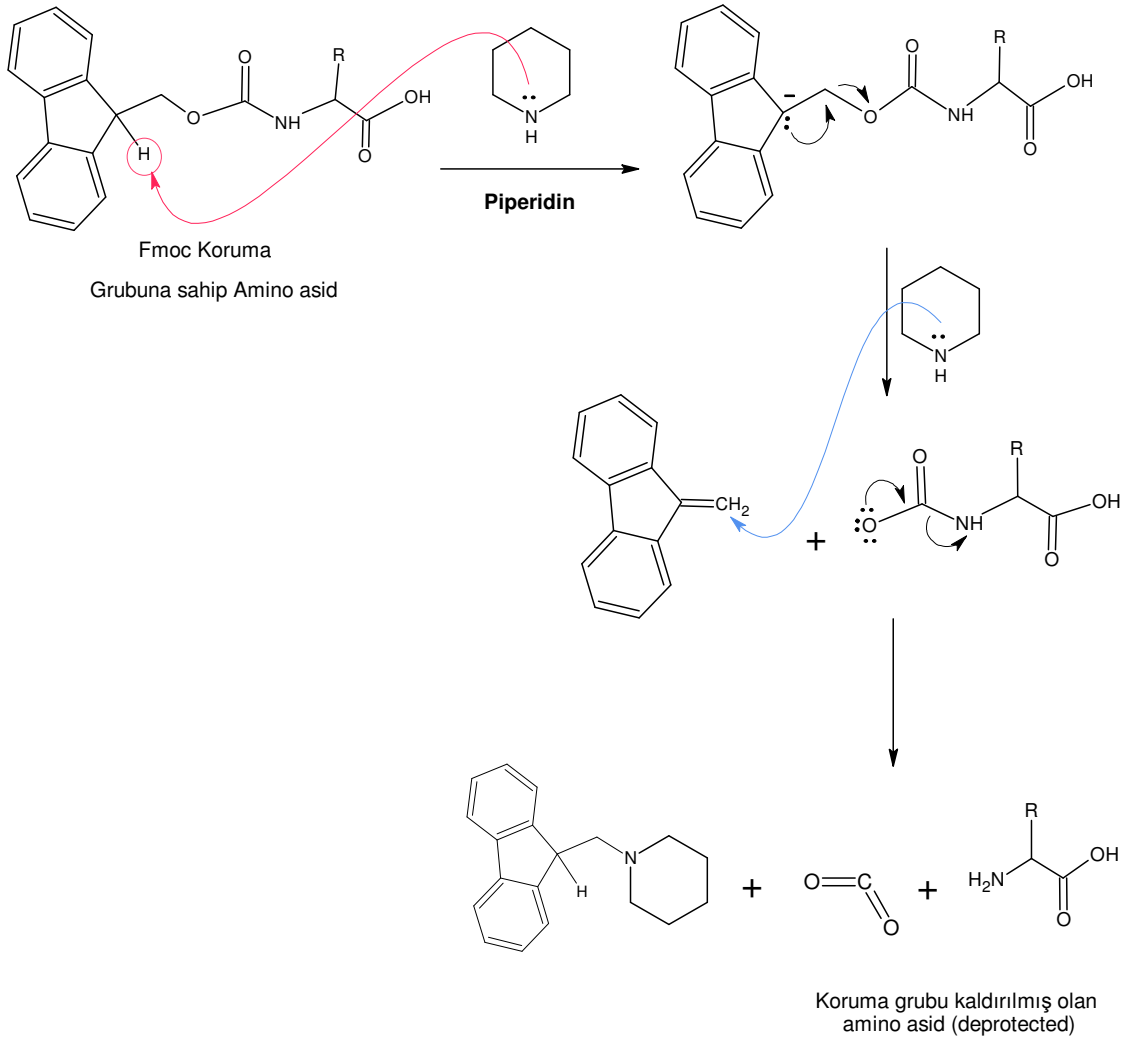
Amino asid ve Koruma Grubu	Kısaltma	Kararlı Olduğu Koşullar	Kimyasal Yapısı
Arjinin 2,2,4,6,7-Pentametildihidro benzofuran-5-sülfonil	Arg(Pbf)	Piperidin Pd(0) Hidrazin	
Aspartamik /Glutamik asid t-Bütül	Asp/Glu(O- <i>t</i> -Bu)	Piperidin Pd(0) Hidrazin	
Asparajin/ Glutamin Trifenilmetil	Asn/Gln(Trt)	Piperidin Pd(0) Hidrazin	
Sistein Trifenilmetil	Cys(Trt)	Piperidin Pd(0) Hidrazin	
9-Ksantenil	Cys(Xan)	Piperidin Pd(0) Hidrazin	
Histidin t-Bütüloksikarbonil	His(Boc)	Piperidin Pd(0) Hidrazin	
Lizin t-Bütüloksikarbonil	Lys(Boc)	Piperidin Pd(0) Hidrazin	
Serin/Treonin t-Bütül	Ser/Thr(<i>t</i> -Bu)	Piperidin Pd(0) Hidrazin	
Triptofan t-Bütüloksikarbonil	Trp(Boc)	Piperidin Pd(0) Hidrazin	
Tirozin t-Bütül	Tyr(<i>t</i> -Bu)	Piperidin Pd(0) Hidrazin	

4.2.3.3 Korumanın Kaldırılması (Deprotection)

α -Amino grubu korumasının kaldırılması, peptid sentezine başlanılan ilk adım olduğu için oldukça önem taşımaktadır. Rezine bağlı ilk amino asidin α -amino grubu korunmuş olduğundan, sentez reaksiyonuna başlanmadan önce bu grubun uzaklaştırılması ve yan zincir koruma gruplarına ve peptid bağına zarar vermeden ayrılması gerekmektedir.

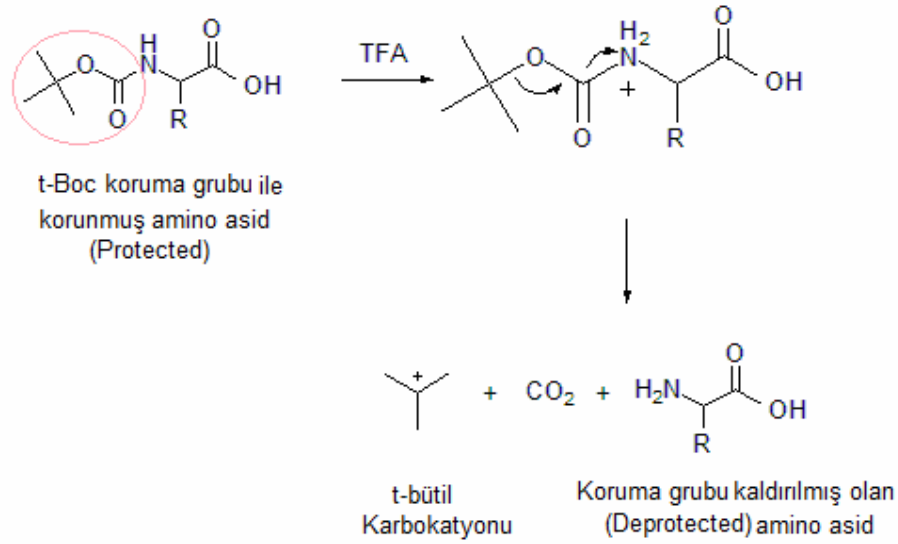
Yan zincir korumasında kullanılacak reaktifler, α -amino fonksiyonu için kullanılacak olan koruma grubuna bağlı olarak seçilir. Çünkü zincir uzaması için N-ucundaki amino asidin koruması kaldırıldığında, yan zincirlerin fonksiyonel gruplarının korunması gerekmektedir. α -amino grubunun korunması için Fmoc grubu kullanıldığında, yan zincir koruma grupları için t-boc grubu kullanılır. Çünkü Fmoc grubu piperidin gibi organik bir bazla ayrılabilirken, t-boc yan zincir koruma grupları asid yardımıyla uzaklaştırılır. Bu yöntem, “**Fmoc/t-Boc Ortogonal Koruma Stratejisi**” olarak adlandırılır ve korumanın kaldırılması işlemi, iki fazlı şekilde ilerler ve bu strateji otomasyon için oldukça uygundur (Donan, 2002).

Fmoc grubu, ikincil bir amin varlığında β -eliminasyonu ile hemen ayrılır. Fmoc grubunun amino asiden ayrılmasında, en çok ikincil bir amin olan piperidin kullanılır. Bu ayrılma işlemi aşağıdaki şekilde açık olarak gösterilmiştir:



Şekil 4.18 Fmoc Grubunun Piperidinle ayrılma mekanizması

Yan zincir koruma grubu olan t-Boc grubu ise, genellikle HF veya TFA gibi asidlerin yardımıyla uzaklaştırılmaktadır. Bu reaksiyonlar sonucunda, oldukça reaktif t-butil karbokatyonu oluşmakta ve bu karbokasyon, kırılma kokteyline eklenen tutucu (scavengers) kimyasallarla baskılanmaktadır.



Şekil 4.19 Boc Grubunun TFA ile ayrılma mekanizması

4.2.3.4 Karboksil Gruplarının Aktivasyonu ve Bağlama Reaktifleri (Coupling Reagents)

İki amino asid kalıntısının peptid oluşturmak üzere bir araya gelmesi için “**Bağlama Yöntemleri**” kullanılır. Bağlanma, bir amino asid kalıntısının amino grubunun, elektron çekici bir grup taşıyan ve elektrofilik karbonil karbonuna sahip karboksil grubu içeren diğer amino aside nükleofilik atağı ile gerçekleşir ve bir **bağlanma reaktifi** (coupling agents) kullanarak esterleşme reaksiyonu ile bağlanma gerçekleştirilir (21).

Karboksilik asid ve karboksil grubu normalde çok reaktif değildir. Bir amino asidle bağlanmanın gerçekleşerek amid (peptid) bağı oluşabilmesi için, diğer amino asidin karboksil grubunun aktifleştirilmesi gerekmektedir.

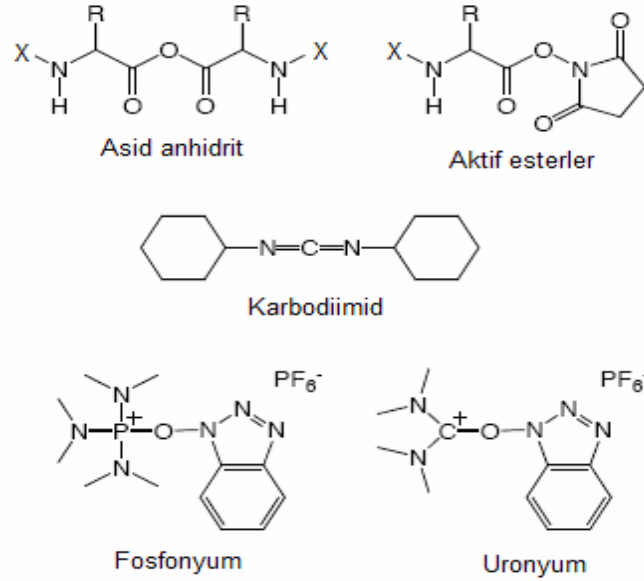
Amino asidlerin karboksil gruplarının aktivasyonunda, C-ucundaki karboksilik asidin -OH ya da $-O^-$ grubunun, kolay ayrılabilen bir gruba dönüştürülmesi sağlanmaktadır (Solomons ve Fryhle, 2004).

Karboksil grubunun aktivasyonunda;

- Karbodiimidler,
- Simetrik anhidritler,
- Aktif esterler,

- Fosfonyum reaktifleri,
- Uronyum reaktifleri en çok kullanılan kimyasallar olarak bilinmektedirler.

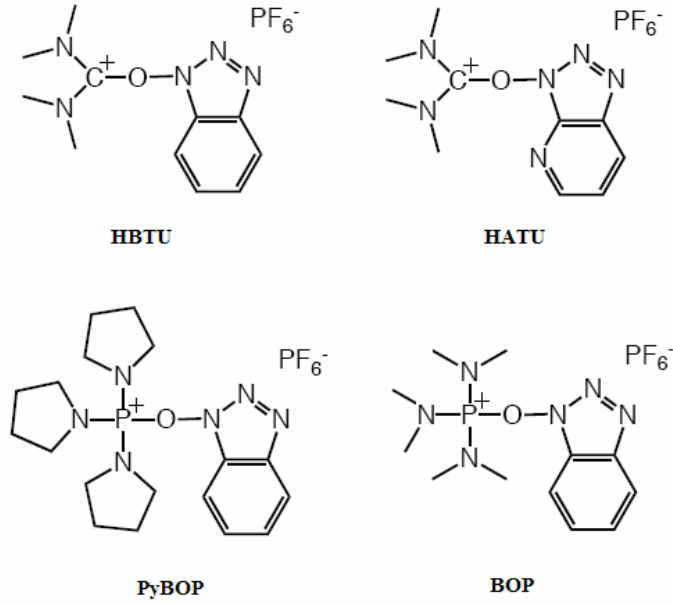
Bu reaktiflerin hepsinin kendine has özellikleri ve kapasiteleri vardır (22).



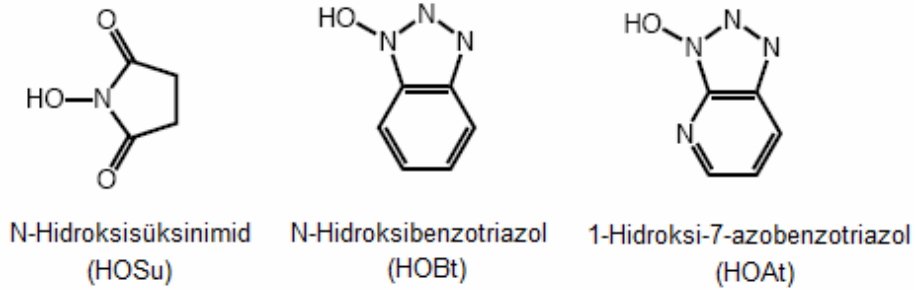
Şekil 4.20 Karboksil grubunun aktivasyonunda yaygın olarak kullanılan bağlama reaktifleri.

Karbodiimidler, peptid sentezinde karboksil grubunun aktivasyonu için ilk geliştirilen aktivasyon ajanlarıdır. En yaygın olarak kullanılanları, Disikloheksilkarbodiimid (DCC) ve Diizopropilkarbodiimid (DIC)'dir. Karboksilat grubunun elektrofilik karakterini arttırmak üzere, öncelikle negatif yüklü oksijen atomu, iyi ayrılabilen bir gruba dönüştürülerek aktive edilmelidir. Bu amaçla, negatif yüklü oksijen atomu, Karbodiimidin merkezindeki karbon atomuna saldırır. Karbodiimid karboksil grubuna geçici olarak bağlanarak bir aktif ester grubu oluşturur ve bu aktif ester grubu da eklenen yani amino aside amino grubundan nükleofilik atakta bulunur. Böylece bağlanma gerçekleşir. Karbodiimidler oldukça reaktif moleküllerdir ve amino asitlerin rasemizasyonuna neden olabilirler. Bu nedenle, aktivasyon için başka reaktiflerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmuştur.

Özellikle rasemizasyon problemini aşmak üzere, fosfonyum ve uronyum reaktifleri geliştirilmiş ve bu reaktifler yardımıyla aktif ester oluşturulması hedeflenmiştir. Bu moleküller komşu grupların etkisinden (neighbouring effect) dolayı çok tercih edilirler. En yaygın olarak kullanılan fosfonyum ve uronyum reaktifleri aşağıda verilmiştir.



Şekil 4.21 Karboksil grubunun aktivasyonunda yaygın olarak kullanılan fosfonyum reaktifleri.



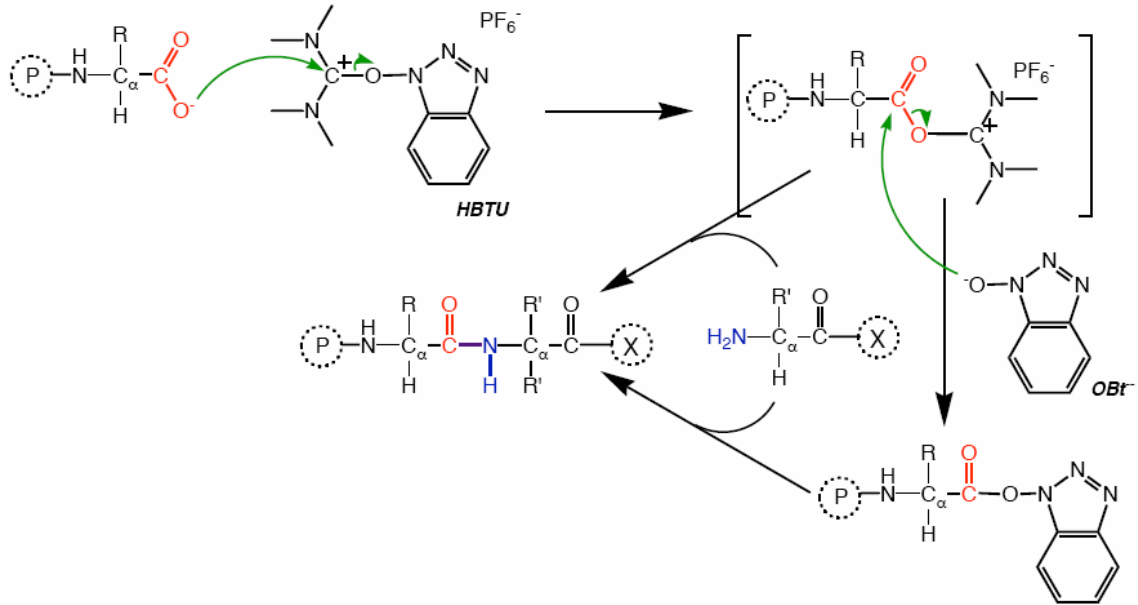
Şekil 4.22 Karboksil grubunun aktivasyonunda kullanılan uronyum reaktifleri

Fosfonyum ve uronyum reaktifleri benzer kimyasal yapıya sahiptirler. PF_6^- ve BF_4^- gibi organik çözünebilir tuzları şeklinde bulunurlar. Yüksek reaktiviteye sahiptirler ve kolaylıkla arabağlayıcılık yapabilirler. Uronyum veya fosfonyum bağlanma moleküllerinin önemli yan reaksiyonları saptanmamıştır.

HOBt reaktifi, rasemizasyonu önlediği ve iyi ayrılabilen bir aktif ester grubu oluşturduğu için, verimli bir bağlanma sağlar ve bu yüzden de daha çok tercih edilmektedir.

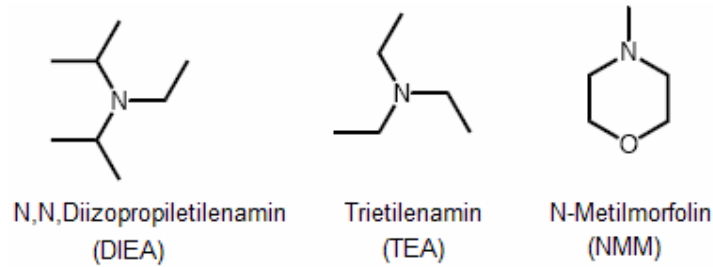
HATU molekülünün 7 konumundaki azot atomu, bağlanma reaksiyonunu hızlandırır.

Ancak, rezin- primer amin bağı ile reaksiyon verebileceğinden, aktivasyon için HBTU ve HATU gibi uronyum bazlı reaktiflerin fazlası kullanılmamalıdır (Chang ve White, 2000).



Şekil 4.23 Peptid bağı oluşumunda kullanılan bağlama reaktiflerinin etki mekanizması

Bağlanma işleminde kullanılan diğer kimyasallar ise; aktivatör bazlar, eklenen aktivatörler ve ana solventlerdir.



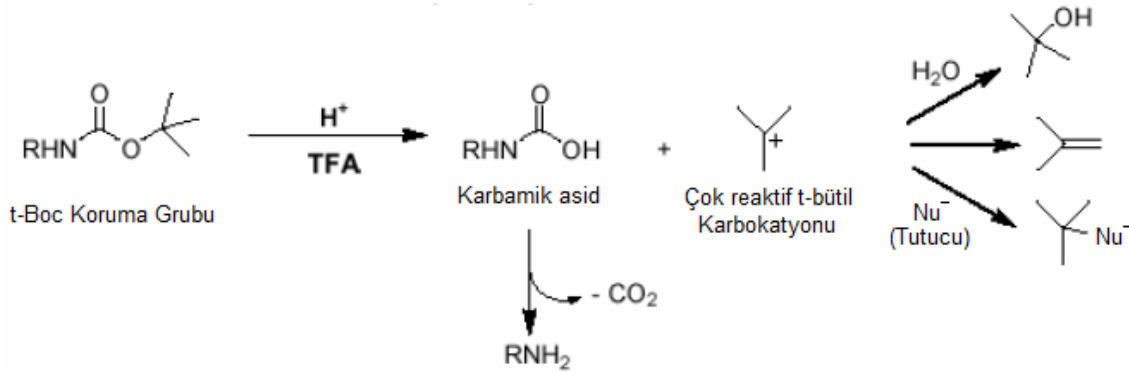
Şekil 4.24 Karboksil grubunun aktivasyonunda kullanılan aktivatör bazlar.

4.2.3.5 Kırılma (Cleavage) İşlemi

Korunmuş bir peptid sentezlendiğinde, istenen peptidin saf olarak elde edilebilmesi için, rezin destekten ayrılması ve yan zincir koruma gruplarının uzaklaştırılması gerekir. Fmoc SPPS'in

bu basamağında, “**Kırılma (Cleavage) İşlemi**” uygulanır ve peptidil resin, TFA içeriği yüksek bir kırılma kokteyli ile muamele edilerek polimerik destekten ayrılması sağlanır.

Bu proses boyunca, koruma gruplarından ve resin üzerindeki bağlayıcı gruplardan kaynaklanan, oldukça reaktif katyonik maddeler meydana gelir. Bu durumda, eğer bu katyonik maddeler baskılanmazsa; Trp, Met, Tyr ve Cys gibi nükleofilik fonksiyonel grupları içeren amino asit kalıntıları ile reaksiyona girebilirler. Bunu önlemek için, “**Tutucular (Scavengers)**” olarak bilinen çeşitli nükleofilik reaktifler (Nu^-), bu iyonların etkisini azaltmak üzere TFA içeren kırılma kokteyline eklenir.



Şekil 4.25 Kırılma işleminde oluşan kararlı katyonların, tutucular (Scavengers) yardımıyla baskılanması

DMF ortamında yapılan sentezlerde, peptidin bağlı olduğu resin DMF’ten tamamen uzaklaştırılmalıdır. Çünkü DMF, kırılma işleminde kullanılan TFA’nın asidik etkisini azaltabilir. Bu nedenle resinin kırılma işleminden önce, yıkanmış ve kurutulmuş olması gereklidir.

Optimum kırılma koşulları, peptiddeki amino asit kalıntılarının sayısına, dizilimlerine, yan zincirlerinde taşıdıkları koruma gruplarına ve rezine bağlandıkları ara bağlayıcı (linker) moleküllerin yapısına bağlı olarak değişmektedir (Zaragoza, 2002).

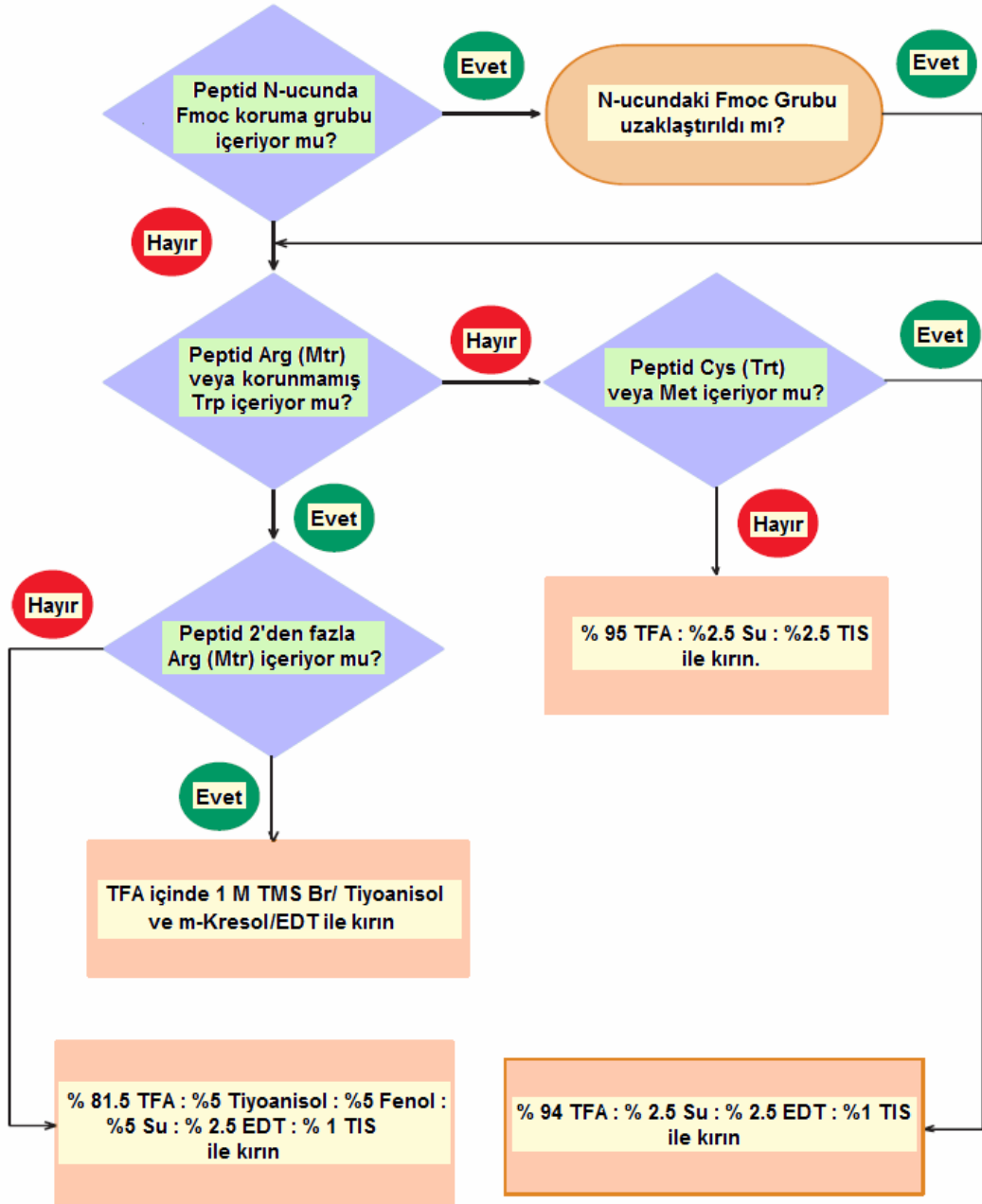
Metiyonin, Sistein ve Triptofan oldukça kırılma basamağında oluşan katyonlar tarafından alkilasyona karşı oldukça hassastırlar. Trp, Met ve Cys’nin t-bütil katyonları ile reaksiyonu, son ürün olan peptidin modifikasyonu ile sonuçlanır. Bu katyonların ara bağlayıcı (linker) moleküllerle bağlanması ise, peptidin rezine geri dönüşümsüz bir şekilde bağlanmasına neden olur (Atherton ve Sheppard, 1989). Kırılma kokteyline eklenen tutucu maddelerle, bu yan reaksiyonlar büyük ölçüde baskılanır. Trp’nin, Mtr ve Pmc ile korunan Arginin kalıntılarının kırılması ile oluşan ürünler tarafından sülfolanması bir istisnadır. Bu yan zincir reaksiyonları,

koruma grupları içeren Fmoc-Trp (Boc) amino asidi kullanılarak önlenebilir.

Sülfonil bazlı koruma grupları, genellikle N-sülfolanmış Arg ve O-sülfolanmış Ser ve Thr gruplarında kullanılmaktadır (24).

Yan zincir koruma grupları, tBu (Asp, Glu, Ser, Thr, Tyr), Boc (His, Lys), Tmob (Asn, Cys, Gln), Trt (Asn, Cys, Gln, His) ve bağlayıcı maddeler (Wang, HMBP, PAL gibi Fmoc kimyasında kullanılanlar) TFA ile kırılırlar. Bu kırılmalar t-Bu ve t-Boc gruplarında, ter-bütil katyonların ve ter-bütil triflorasetat oluşumuyla gözlenir. Bu yapılar, Trp'nin inidolünün, Met tiyoeterinin ve çok az da olsa Tyr'nin ter-bütilasyonuna neden olabilir. Bu modifikasyonlar, TFA ile kırılma sırasında 1,2-Etanditiyol (EDT) ile önlenir (Dilgimen, 1998).

EDT, kırılma işleminde en çok kullanılan tutuculardan biridir. Sadece t-bütil katyonları için iyi bir tutucu olduğu için değil, aynı zamanda tritil koruma grubunun uzaklaştırılmasına da yardım ettiği için ve özellikle de Trp kalıntılarının oksidasyonuna neden olan asit katalizini de önlediği için iyi bir tutucudur.



Şekil 4.26 Fmoc-SPPS’de kullanılacak olan kırılma kokteyllerine ait akış şeması (24)

Sentezi yapılan peptidin yapısına göre yukarıdaki prosedür takip edilerek, kırılma işlemi için kullanılacak kırılma kokteylinin yapısı hakkında bilgi edinilebilir.

TFA kokteylleri, kırma işlemi yapıldıktan sonra, Rotary Evaporatör konsantre edilir. Kırma işleminden sonra, peptidin saflaştırılması ve karakterizasyonu yapılır.

5.1 Biyopolimerler

Biyopolimer terimi, çeşitli maddeleri tanımlamada kullanılabilir.

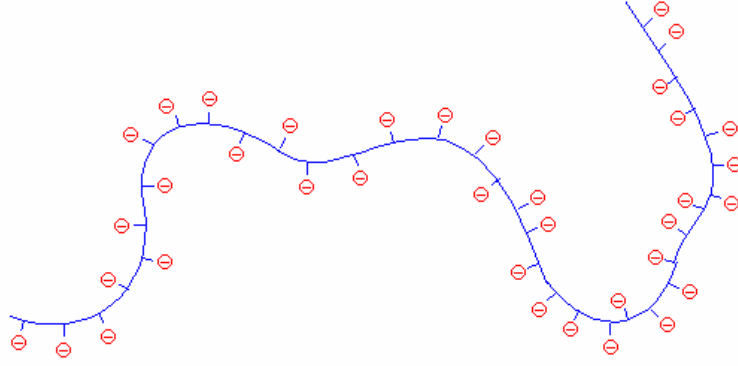
Genelde biyopolimerler iki kategoriye ayrılabilir:

- Mikroorganizmalar, hayvanlar ve bitkiler gibi biyolojik sistemlerde üretilenler,
- Amino asitler, şekerler, doğal yağlar gibi bir biyolojik başlatıcı madde kullanılarak kimyasal yolla sentezlenenler.

Polielektrolit komplekslerinin doğada önemli bir rolü vardır. Canlı organizmalardaki kompleks oluşumunu taklit ederek, ilaç salınımı, gen terapisi gibi tıpla ilgili konularda yeni metodlar geliştirilmiştir. Bu komplekslerin çözünürlükleri ve kararlı olduğu koşulların incelemesi, bu komplekslerin nasıl oluştuğunu anlamak için oldukça önemlidir. Polielektrolitin asit ya da baz karakterinin gücü ve sudaki kararlılığı çok önemlidir. Ayrıca polielektrolitin bulunduğu çözeltinin pH'sı ve iyonik gücü de sistemi etkiler (25).

Polielektrolitler, yapısında tekrarlanan üniteler olarak iyonize olabilen grupları taşıyan uzun polimer zincirleridir. Zincirde bulunan olabilen merkezlerinin hepsinin anyonik, hepsinin bazik yada asidik veya katyonik grupların karışımı olmasına bağlı olarak, **Poliasitler (Polianyonlar)**, **Polibazlar (Polikasyonlar)** ve **Poliamfotitler** olarak adlandırılabilirler. Polielektrolitler suda çözüldüklerinde, polimerin yüzeyindeki iyonize olabilen gruplar ile çözeltideki küçük iyonlar arasında elektriksel etkileşimler meydana gelir ve buna bağlı olarak makromolekülün yapısında değişimler gözlemlenir.

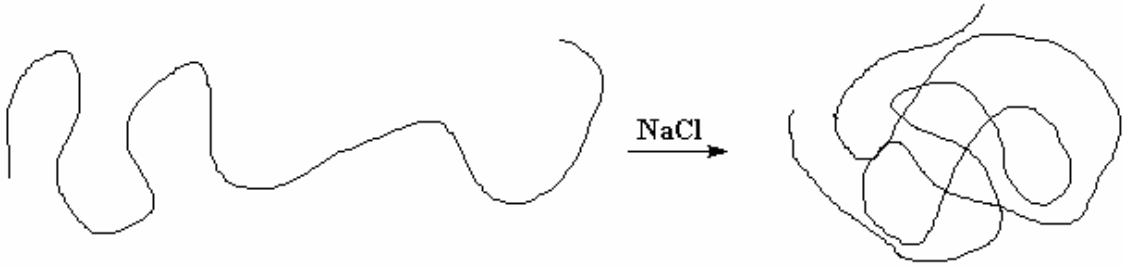
Zincirdeki gruplar kısmi olarak iyonlaşabiliyorsa, titre edilebilirler ve buna bağlı olarak polimerin yükü artış yada azalma gösterebilir. Bir polielektrolit seyreltildiğinde, özellikle ortama eklenmiş düşük molekül ağırlıklı tuzların yokluğunda, yüklü gruplardaki counter-iyonların, kendi aralarında daha kuvvetli bir etkileşime girmek üzere, zincirdeki polimerin yüklü bölgelerinden uzaklaştığı gözlenir. Bu durum, makromolekülün konformasyonunun değişerek daha açık bir hal almasına yol açar ve sistemin viskozitesinin değişmesine sebep olur (Sélégny vd., 1974).



Şekil 5.2 Bir polianyonun tuz içermeyen çözeltideki durumları

Bu yapıdaki polielektrolit molekülleri, çözeltide toparlanmış hallerine göre daha çok yer kaplarlar. Dolayısıyla da, çözeltide akmaya karşı gösterdikleri direnç daha fazladır ve çözelti yoğun ve viskoz bir hal alır.

Ortamda tuz olduğunda, polielektrolitler sulu ortamdaki formlarından farklı bir hal alırlar. Sulu ortamda Na^+ and Cl^- iyonlarına ayrılan NaCl tuzu, poliakrilik asid gibi negatif yüklü polielektrolitlerle etkileşime girer. Na^+ iyonları, polimer zinciri üzerindeki negatif yüklerle etkileşir ve bu durum onun konformasyonunda ve viskozitesinde bazı değişimlere neden olur.



Şekil 5.3 Tuz içeren ortamda polielektrolitlerin konformasyonundaki değişim

5.2 Biyokonjugasyon

Polimer konjugasyonu özellikle ilaç kimyasında, basit yapılardan yada peptidler, enzimler ve oligonükleotidler gibi kompleks bileşiklerden yeni ilaçların geliştirilmesinde önemli bir yere sahiptir. Uzun süreli ilaçlar, özellikle anti-tümör aktivitesine sahip olanlar, kanda kalma sürelerinin arttırılması amacıyla doğal ya da sentetik polimerler ile birleştirilmiştir.

Biyokonjugasyon Ringsdorf'un çalışmalarının öncülük etmesinden bu yana, ilaç kimyasındaki merkez konulardan biri haline gelmiştir. Özellikle maddelerin dolaşımdaki kararlılıklarının sağlanmasında, kararsız bileşiklerin enzimatik bozunmalardan korunmasında, polipeptidlerin immunojenliğinin azaltılmasında ve hücre içine madde girişinde yeni yollar kullanılması ve oldukça spesifik tanıma (diagnostic) ajanların geliştirilmesinde kullanılmaktadır. Biyokonjugasyon, istenen biçimde, yapıda, molekül ağırlığında ve zincirde istenen pozisyonlardaki birleşmeyi sağlayacak fonksiyonel gruplara sahip yeni polimerlerin dizaynı sayesinde gelişmiştir (Veronese ve Morpurgo, 1999).

Doğal veya sentetik makromoleküllerin konjugatları, ilaç salınımı, enzimlerin immobilize edilmeleri, hücre biyoreaktörleri olarak kullanılmaları bakımından tıp ve biyoteknoloji alanlarında büyük öneme sahiptirler. Ayrıca polielektrolitler, mikroorganizma antijenleri ile yaptıkları konjugatlarda, güçlü koruyucu özellik gösterirler. Bu nedenle de, bu sistemin yeni aşılar geliştirilmesine yönelik çalışmalarda kullanılması düşünülmektedir (Dilgimen vd., 2001).

Farmosötik uygulamalar için proteinlerle yapılan polimer konjugasyonun mantığı, düşük molekül ağırlıklı ilaçların tanımlanmasına benzerdir. Bu durumda, çözünebilen ve biyoyumlu polimerlerin eklenmesindeki amaç, protein kararlılığını sağlamak ve bu proteinlerin farmakokinetik özelliklerinin modifiye edilmesidir. Ancak tedavide biyolojik olarak aktif proteinlerin kullanılmasının en önemli sakıncası, bu moleküllerin vücutta kalma sürelerinin kısa olması ve böbreklerdeki ultrafiltrasyonla hızlı bir şekilde uzaklaştırılması ya da immun sistem veya plazma enzimleri tarafından inaktive edilmesidir. Genellikle polimer konjugasyonundan sonra, proteinin farmakokinetik profili ve kararlılığı, düşük molekülüllü ilaçlarda olduğu gibi artar. Polimer ilacın hacmini artırır, onu enzimatik ve hidrolitik bozunmalardan koruduğu gibi, proteinin immunojenik epitoplarını da korur. Polimer molekülü biyokonjugatı aynen düşük molekül ağırlıklı ilaçlarda olduğu gibi, spesifik bir organa veya vücudun bir bölgesine yönlendirir (Veronese ve Morpurgo, 1999).

5.3 Polimerin Aktivasyonu

Protein-protein ve protein-lineer polielektrolit kovalent konjugatlarının geleneksel olarak sentezinin, makromoleküllerin sulu çözeltide aktive edilmiş fonksiyonel grupları arasındaki reaksiyonlara dayandığı bilinmektedir (Dilgimen vd., 2001). Bu amaçla, sulu ortamda yapılan

konjugasyon reaksiyonlarında çapraz bağlama reaktifleri gibi birtakım kimyasal ajanlar kullanılmaktadır.

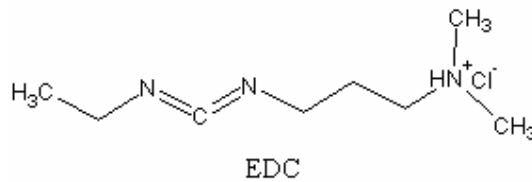
5.3.1 Çapraz Bağlama Reaktifleri

Biyokonjugasyon için kullanılan küçük kullanışlı reaktif sistemleri “**Zero-Length Çapraz Bağlayıcılar**” olarak adlandırılırlar. Bu bileşikler, iki molekülün, herhangi bir atom eklenmeksizin, birbirine bağlanması yani konjugasyonunda arabuluculuk yaparlar. Böylelikle, bir moleküldeki atom, herhangi bir bağlayıcı ya da arabulucu olmaksızın diğer moleküldeki atoma kovalent olarak bağlanır.

5.3.1.1 Karbodiimidler

Karbodiimidler, karboksilat ve amin grupları arasında amid bağı oluşturmak üzere en çok kullanılan çapraz bağlayıcı reaktiflerdir. Karbodiimidler, suda çözünebilenler ve suda çözünmeyenler olmak üzere 2 tipte olabilirler. Biyolojik orjinli birçok makromolekül sulu çözeltilerde çözünebildiğinden, biyokimyasal konjugasyonlarda en çok suda çözünebilen karbodiimidler kullanılır. Bu reaksiyonlarda sadece karbodiimidin kendisi değil, aynı zamanda reaksiyonun ara ürünü olan izoüre de, suda çözünebilir özelliktedir ve kolayca reaksiyon ortamından uzaklaştırılabilir. Suda çözünemeyen karbodiimidler ise, çoğunlukla peptid sentezinde ve organik solventlerde çözünebilen molekülleri içeren diğer konjugasyonlarda kullanılırlar. Ancak hem suda çözünebilen hem de çözünemeyen karbodiimidlerin izoüre ara ürünleri, suda çözünebilir.

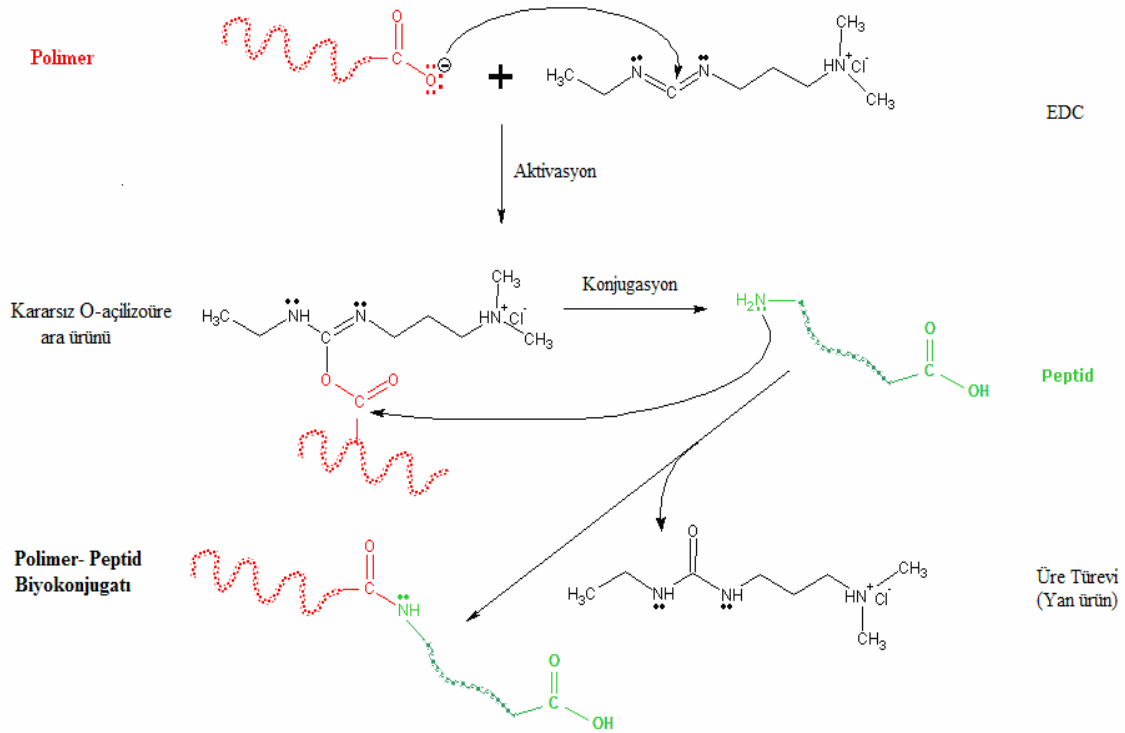
1-(3-Dimetilaminopropil)-3-etil karbodiimid (EDC), biyolojik maddelerin konjugasyonunda en çok kullanılan karbodiimidlerden biridir. Birçok kaynakta, EDC'nin pH'ın 4.7 ile 6 arasında olduğu optimal koşullarda reaksiyon verdiği tanımlanmıştır. Karbodiimidin arabuluculuğunda oluşan amid bağı formu da, pH 4.5 ile 7.5 arasında etkili bir şekilde meydana gelir (Hermanson, 1996).



Şekil 5.4 Suda çözünebilen bir karbodiimid olan EDC

Karboksil grubunun karbodiimide bağlı aktivasyon reaksiyonunun basit mekanizması, polimerin karboksil grubu ile proteinin amino grubu arasında gerçekleşen ve iki basamaktan oluşan bir kondenzasyon reaksiyondur (Dilgimen vd., 2001).

Karbodiimid ilk olarak, polimer molekülündeki karboksil grupları ile reaksiyona girer ve oldukça aktif o-açil-izoüre ara ürününü meydana getirir. EDC ile aktive olan karboksil grupları, amid bağı oluşturmak üzere peptiddeki amino grubuna saldırır ve bu reaksiyondan suda çözünebilir özellikteki üre türevleri yan ürün olarak oluşur.



Şekil 5.5 Polimerin EDC varlığında aktivasyonu ve peptid molekülleriyle konjugasyon mekanizması

Çapraz bağlanma reaksiyonları sonucunda oluşan izoüre ara ürünü ve reaktifin fazlası suda çözünebilir özellikte olduklarından, diyalizle ya da jel filtrasyonu ile kolaylıkla uzaklaştırılabilir (Hermanson, 1996).

6. DENEYSEL KISIM

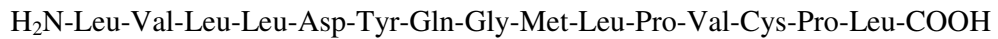
6.1 Hepatit B Yüzey Antijen Peptidi 95-109 Dizisinin Katı Faz Peptid Sentezi Yöntemi ile Sentezi

Peptid sentezi, Liberty Mikrodalga Peptid sentez Cihazı (CEM) ile yapılmıştır. Cihaz 0.1-1 mmol aralığında sentez yapılabilen ve Fmoc kimyasına dayalı bir cihazdır. Cihaz bağlı bulunduğu bilgisayar sistemi ve programı sayesinde bütün sentezi otomatik olarak yapabilme özelliğindedir. Sentezi yapılacak peptid dizisi, rezinin özellikleri, kullanılacak kimyasallar programa kaydedildikten sonra, kullanılması gereken kimyasal (amino asitler, aktivatörler ve sentezde kullanılan diğer çözeltiler) miktarları bilgisayar programı tarafından hesaplanır.



Şekil 6.1 Liberty Mikrodalga Peptid Sentezi Cihazı (26)

Tez çalışmamızda sentezlenen peptid, Hepatit B yüzey antijenine (HBsAg) ait 95-109 dizisidir. 15 amino asitten meydana gelmektedir ve bu dizinin amino asit kompozisyonu aşağıda verilmiştir:



Sentezde kullanılan bütün amino asitler CEM firmasından alınmış olup, α -amino grupları Fmoc grubu ile korunmuş haldedir.

Peptid dizisinin karboksil ucunda bulunan ilk amino asit olan lösin (Leu), rezine bağlı

(preloaded) şekilde bulunmaktadır. Ayrıca dizinin C-ucuna Trp amino asidi bağlanarak, peptide floresans özellik kazandırılmıştır ve floresans spektrofotometre cihazı ile analizine olanak sağlanmıştır.

Sentezde, polimerik destek olarak, Novabiochem firmasından alınan Fmoc-Leu-Wang Rezin LL rezin kullanılmıştır.

Sentezde kullanılan diğer kimyasallar ise şöyledir:

- **N,N'-Dimetil formamid (DMF):**

Fmoc peptid sentezinde ana çözücü olarak kullanılır. Fluka firmasından alınmıştır.

- **Diklorometan (DCM):**

Diklorometan sentezde yardımcı çözücü olarak ve ikinci yıkamayı sağlayan reaktan olarak kullanılır. Asidik içeriği oldukça düşük olmalıdır. Merck firmasından alınmıştır.

- **1-Hidroksibenzotriazol (HOBt):**

Peptid sentezinde, eklenen her peptidin karboksil grubunun aktivasyon işleminde kullanılan bir kimyasaldır. CEM firmasından alınmıştır.

- **2-(1H-Benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronyum hekzaflurofosfat (HBTU):**

Peptid sentezinde, eklenen her peptidin karboksil grubunun aktivasyon işleminde kullanılan bir kimyasaldır. CEM firmasından alınmıştır.

- **Diizopropil etilendiamin (DIEA):**

Sentezde aktivatör baz olarak kullanılan bir kimyasaldır. Fluka firmasından alınmıştır.

- **N-Metil pirilidon (NMP):** Aktivatör bazın içinde çözüldüğü bir kimyasal olarak kullanılır. Sigma firmasından alınmıştır.

- **Piperidin:** Amino asidlerin koruma grubu olan Fmoc grubunun ayrılmasında kullanılan bir çözücüdür. DMF ile hacimce % 20'lik çözeltisi hazırlanarak kullanılır. Merck firmasından alınmıştır.

Peptid sentezine başlamadan 1 gün önce, gereken miktardaki rezin tartılır, 50 mL hacimli santrifüj tüpüne konur ve üzerine yaklaşık 5-6 mL DMF eklenerek 1 gece oda sıcaklığında karışmaya bırakılır. Amino asidler ve aktivatörler tartılarak, uygun miktarlardaki DMF'te iyice çözülürler. Gereken miktarlarda aktivatör baz çözeltisi ve Fmoc korumasının

kaldırılmasında kullanılan (deprotection) çözeltiler hazırlanır. Hazırlanan bütün kimyasallar ve çözeltiler, Liberty peptid sentez cihazındaki uygun bölgelere bağlanır ve bilgisayar programı yardımıyla bütün programlamalar ve kontroller yapıldıktan sonra sentez başlatılır. Peptid sentezinin bitme süresi, sentezlenmek istenen peptidin uzunluğuyla doğru orantılıdır. Sentez bittiğinde, cihaz rezinin üzerinde bağlı durumdaki peptid zincirini, tek bir tüpte toplayarak sentezi bitirir.

6.1.1 Kırılma (Cleavage) İşlemi

Kırılma (Cleavage) yani polimerik destek üzerinde büyüyen peptid zincirinin bu destekten ayrılması işlemi, peptid sentezinin en önemli aşamalarından biridir. Bu nedenle seçilecek olan kırılma kokteylinin kompozisyonu oldukça önemlidir. Kırılma kokteyline, ana reaktif olan TFA'nın yanında, yarıma sırasında oluşan karbonyum iyonlarının bazı amino asitlere (Met, Cys, Trp ve Tyr gibi) zarar verici etkisini engellemek üzere, bazı kimyasallar eklenmektedir. Bu işlem için detaylı bir literatür çalışması yapıldıktan sonra, TFA: EDT: Su: Tiyoanisol (v:v), 94: 2.5: 2.5 :1 oranlarında kullanılmıştır.

Kırılma kokteylinde kullanılan kimyasalların özellikleri aşağıda verilmiştir:

- **Trifloroasetikasid (TFA):** Kırılma işleminin ana reaktifi olan TFA olukça kuvvetli bir asiddir. Merck firmasından alınmıştır.
- **1,2-Etanditiyol (EDT):** Kırılma işleminde baskılayıcı (Scavengers) olarak kullanılan bir kimyasaldır ve Aldrich firmasından alınmıştır.
- **Tiyoanisol:** Kırılma işleminde baskılayıcı (Scavengers) olarak kullanılan bir kimyasaldır ve Fluka firmasından alınmıştır.
- **Su:** Laboratuvarımızda bulunan Milipore-Q Gradient Ultra Saf Su cihazında damıtılan ultra saf su kullanılmıştır.

Kırılma işlemlerinde kullanılan cihazlar ise şunlardır:

- Çalkalama işlemleri için: Heidolph Multi Reax marka çalkalayıcı
- Evaporasyon işlemleri için: Heidolph Laborota 4010-digital Rotary Evaporatör
- Kurutma İşlemleri için: Büchi Glass Oven B-585 Cam Fırını
- Santrifüj İşlemleri için: Heraeus Biofuge Stratos Ultra Santrifüj

Peptid sentez cihazı peptid sentezini tamamladıktan sonra, peptidin bağlı bulunduğu rezin

önce DMF (3 X 30 mL) ile daha sonra DMF:DCM (1:1) (3X 30 mL) çözeltileriyle ve son olarak da tek başına DCM (3 X 30 mL) ile yıkanır ve süzülür, süzüntüler atılır. Yıkanmış rezin, cam fırınında (glass oven), vakum altında iyice kurutulur. Kuru rezin, dibi yuvarlak bir balona aktarılarak üzerine hazırlanan kırılma (cleavage) kokteyli eklenir. Yaklaşık 2 saat oda sıcaklığında, çalkalayıcıda çalkalanır ve peptidin polimerik reçineden ayrılması sağlanır. Kırılma işlemi bittikten sonra, reçine vakum yardımıyla bir krozeden süzülür ve birkaç kez tekrar kırılma kokteyli ile yıkanır. Süzüntü, kırılma kokteylindeki TFA uçana kadar Rotary Evaporatörde evapore edilir. TFA uçurulduktan sonra geride kalan süzüntü, birkaç kısma ayrılarak soğuk Dietil eter (Merck) ile (-20 °C) çöktürülür ve birkaç kez dekante edilerek santrifüjlenir. Üst fazlar ayrılır ve çöken peptidler, cam fırınında kurutulduktan sonra tartımları alınır. Kuru peptidlerden hazırlanan örnekler, preparatif HPLC, LC-MS cihazlarında analiz edilirler.

Katı faz peptid sentezinde kullanılan kimyasal miktarları aşağıdaki Çizelge 4 'da toplu olarak gösterilmektedir:

Çizelge 4. HBsAg 95-109 Peptid dizisinin sentezinde kullanılan kimyasallar

KULLANILAN KİMYASAL		KULLANILAN MİKTAR (mL)	KULLANILAN MİKTAR (gr)
Rezin			
	Fmoc-Leu-Wang Rezin LL	-	0.370
Amino asid			
	Aspartik asid (Asp)	5	0.411
	Sistein (Cys)	5	0.586
	Glutamin (Gln)	5	0.611
	Glisin (Gly)	5	0.297
	Lösın (Leu)	12	0.848
	Metiyonin (Met)	5	0.371
	Prolin (Pro)	7	0.472
	Triptofan (Trp)	5	0.527
	Tirozin (Tyr)	5	0.460
	Valin (Val)	7	0.475
Aktivatör (40 mL)			
	HBTU	-	1.621
	HOBt	-	4.559
Aktivatör Baz (25 mL)			
	DIEA	8.7	-
	NMP	16.3	-
Korumanın Kaldırılması (Deprotection)			
	Piperidin	80	-
	DMF	320	-
Kırılma Kokteyli (100 mL)			
	TFA	94	-
	Tiyoanisol	1	-
	EDT	2.5	-
	Su	2.5	-

6.1.2 Peptidin Saflaştırılması ve Yapı Tayini

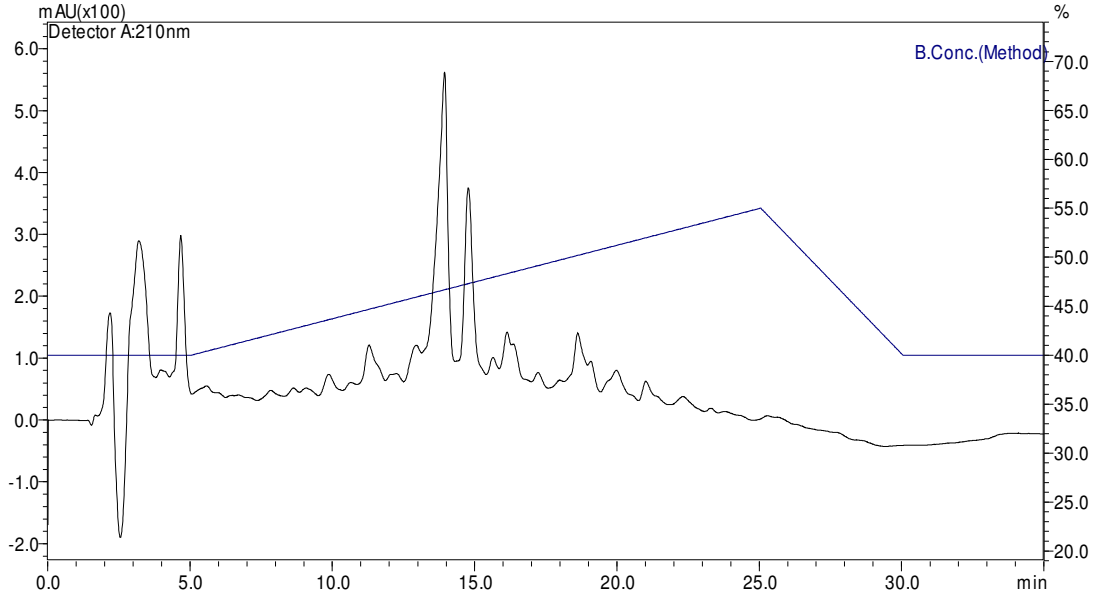
6.1.2.1 LC-MS Analizi Analizi

MS günümüzde biyolojik maddelerin analizinde en çok başvurulanan laboratuvar cihazlarından biridir. Bunun altında yatan sebepler; düşük konsantrasyonlarda analize imkan vermesi, yapısal analizi olanaklı kılması, otomatik olarak kullanılabilmesi vs. gelmektedir. Ayırma teknikleri (HPLC, GC, kapiler elektroforez) ile birlikte kullanılarak; fizyolojik sıvıların, ilaç etkileşimlerinin incelenmesi, proteinlerin ve peptidlerin yapı analizleri yapılabilmektedir. HPLC, kütle spektrometresine bağlandığında, kolondan birçok bileşen çıkarken her birinin kütle spektrumu aynı anda alınabilir. Bazı durumlarda, eğer ölçümler yeterli doğrulukla yapılırsa, protein veya peptidin hangi protein veya peptid olduğu saptanabilir.

Kütle spektrometresinde aslında molekülün kütlesi değil, kütle/yük (m/z) oranı tayin edilmektedir. Kütle spektrumu ise, iyon miktarıyla m/z arasında çizilen bir grafikdir. Molekülün yüke sahip olması için iyonlaştırılması gerekmektedir ve bu işlem gaz fazında gerçekleştirilir.

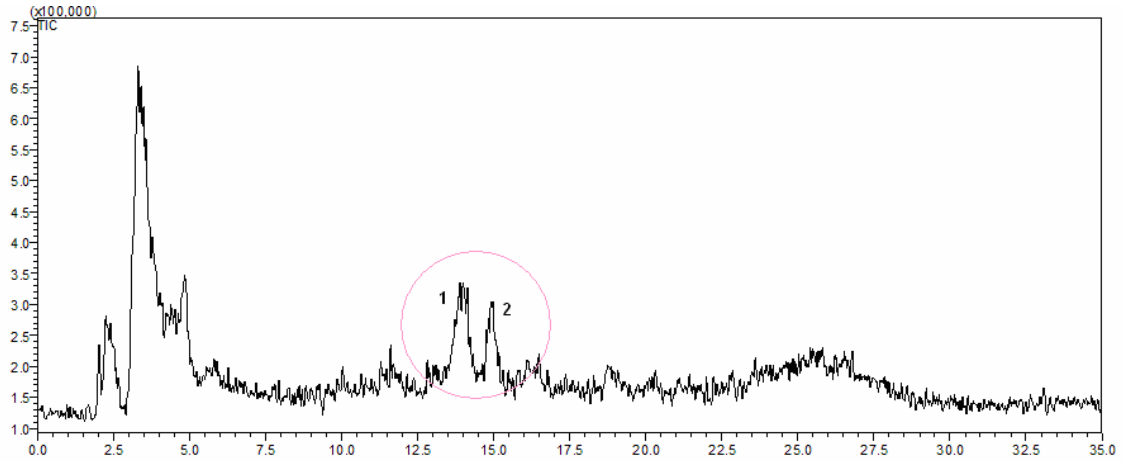
HPLC-MS cihazı 4 temel kısımdan oluşmaktadır. Bu kısımlar sırasıyla HPLC, iyonlaştırıcı, kütle analizörü ve dedektördür.

Sentezlenen peptid çöktürülüp kurutulduktan sonra saflaştırılma işlemi, Shimadzu LCMS-2010EV, HPLC-MS (ESI iyonlaştırıcı) cihazında, Teknokroma Tracer Excel 120 ODS-A ($5\mu\text{m}/20\times 0,21$) kolunu kullanılarak bölümümüz tarafından yapılmıştır.

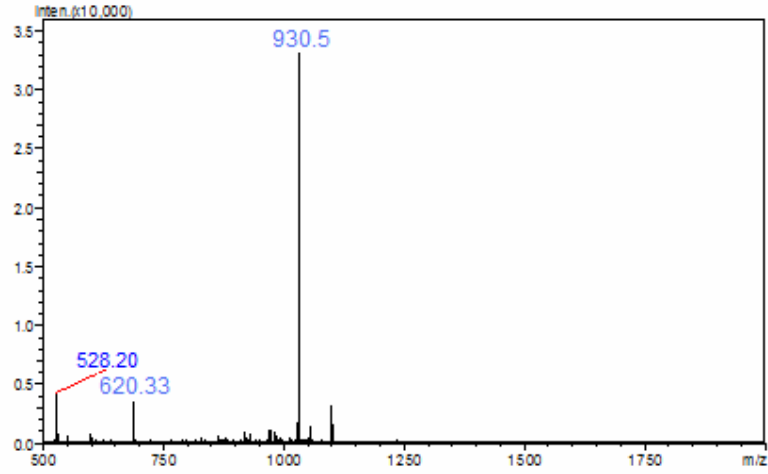


Şekil 6.2 Sentezlenen HBsAg peptid 95-109 dizisinin LC-MS cihazında HPLC detektörü ile yapılan analizine ait kromatogramı.

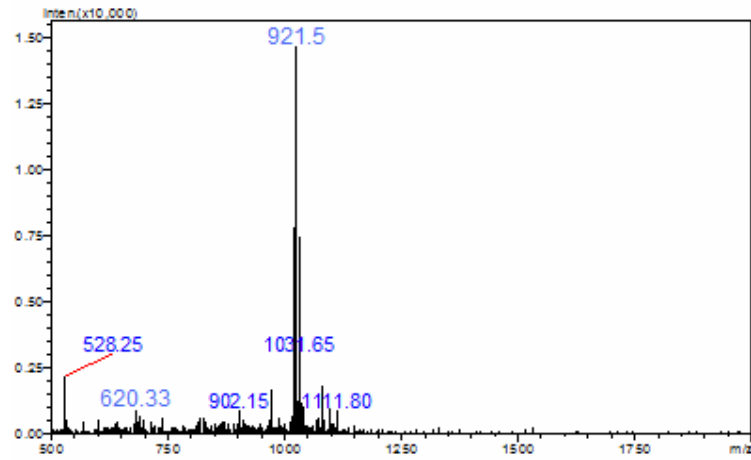
Sentezlenen peptid ile hazırlanan numune, oda sıcaklığında Mobil Faz A: Su, %0,1 TFA ve Mobil Faz B: Asetonitril, %0,1 TFA kullanılarak, 0,2 mL/dak ml/min. akış hızıyla cihaza verilir.



Şekil 6.3 Sentezlenen HBsAg peptid 95-109 dizisinin LC-MS cihazında alınan kütle spektrumu.



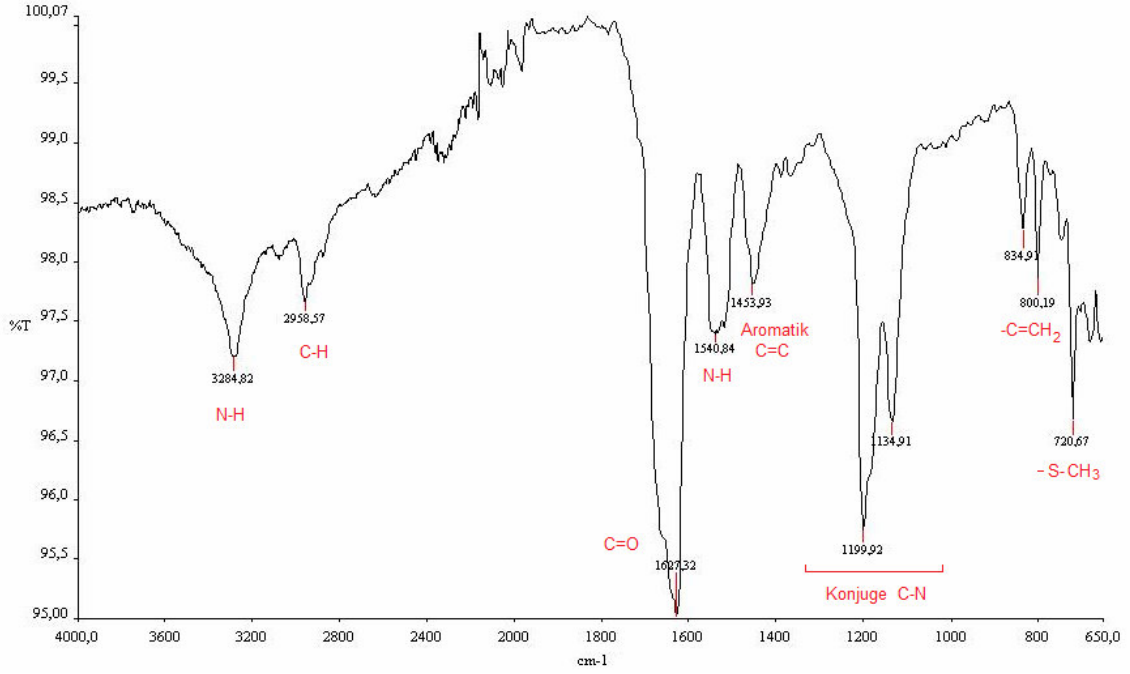
Şekil 6.4 Sentezlenen HBsAg peptid 95-109 dizisinin (1 numaralı Pik) LC-MS cihazında alınan kütle spektrumu. (Ret. Time : 13.467 -> 14.425 $(M+2H)^{2+}=930,5$ $(M+3H)^{3+}=620,33$)



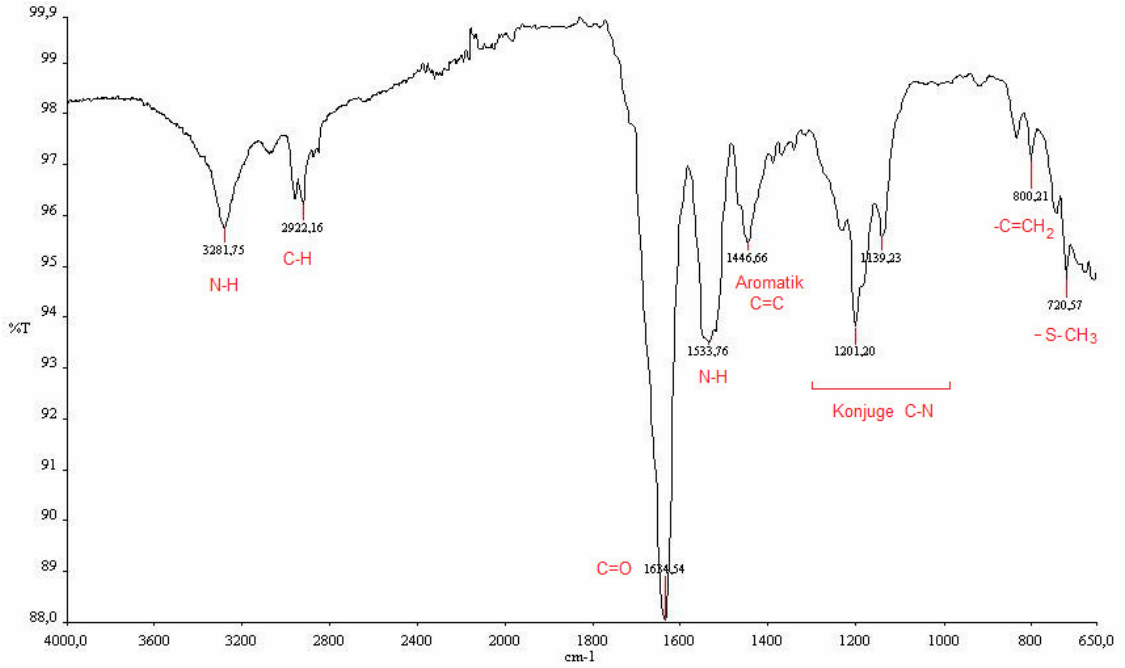
Şekil 6.5 Sentezlenen HBsAg peptid 95-109 dizisinin (2 numaralı Pik) LC-MS cihazında alınan kütle spektrumu. (Ret. Time : 14.542 -> 15.263 $(M+2H)^{2+}=921,5$ $(M+3H)^{3+}=620,33$)

6.1.2.2 FTIR Analizi

Örneklerin FTIR analizleri, Perkin Emler Spectrum One Universal ATR Sampling Accessory FTIR Spektrofotometre kullanılarak yapılmıştır.

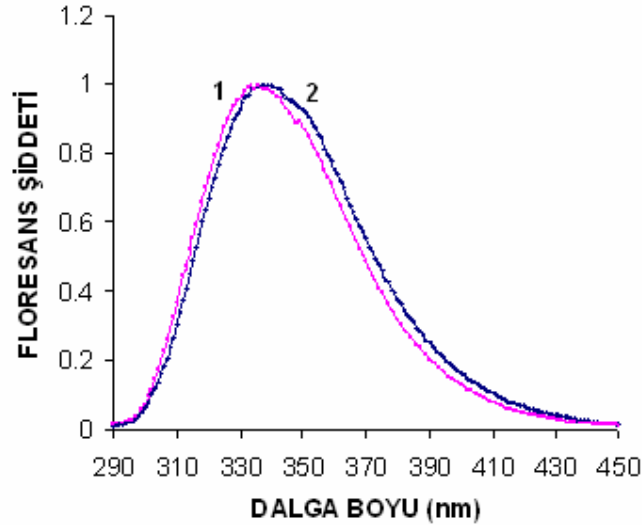


Şekil 6.6 Sentezlenen Hepatit B 95-109 peptid dizisine ait FTIR analizi



Şekil 6.7 Ticari olarak satın alınan Hepatit B 95-109 peptid dizisine ait FTIR analizi

6.1.2.3 Floresans Spektrofotometrik Analiz



Şekil 6.8 Ticari olarak satın alınan (1) ve sentezlenen (2) Hepatit B 95-109 peptid dizisinin floresans spektrumu

6.2 Peptid-polimer biyokonjugasyonları

HBsAg 95-109 peptid dizisiyle yapılan polimer-peptid biyokonjugatlarının sentezinde, 2 farklı yöntem kullanılmıştır:

1. Sulu ortamda, suda çözünen karbodiimid varlığında sentezlenen konjugatlar,
2. Susuz ortamda organik solventlerle, mikrodalga destekli sentezlenen konjugatlar.

Bu iki yöntemdeki bağlanma mekanizmaları karşılaştırılarak, en iyi verimin alındığı sonuçlar incelenmiştir.

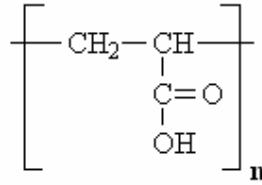
6.2.1 Sulu Ortamda Sentezlenen Biyokonjugatlar

Sulu ortamda sentezlenen peptid-polimer biyokonjugatlarının fizikokimyasının daha net anlaşılabilmesi için; farklı aktivasyon mekanizmaları, farklı polimerler ve farklı başlangıç molar oranları kullanılarak çok sayıda sentez yapıldı.

Genel olarak bütün konjugasyon reaksiyonlarında, konjugasyonun fizikokimyasının ve bağlanmanın ne derecede gerçekleştiğinin anlaşılabilmesi amacıyla polimer konsantrasyonunu

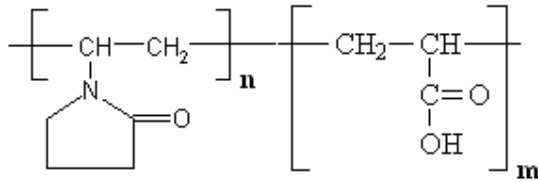
sabit tutularak (0.5 mg/mL), peptid konsantrasyonu değiştirildi.

Poliakrilik asid (PAA), yan zincirinde fonksiyonel grup olarak $-\text{COOH}$ grubu içeren, suda çözünebilen, lineer yapıda biyobozunur özellikte bir biyopolimerdir. Toksik değildir ve biyouyumlu bir yapıya sahiptir.



Şekil 6.9 Poliakrilik asidin molekül formülü

Konjugasyonda vinilpirolidonun akrilik asidin VP/AA (25:75) ve VP/AA (50:50) kopolimerleri de kullanıldı.



Şekil 6.10 Vinil prilidon-akrilik asid kopolimerinin molekül formülü

Polimer-peptid konjugatlarının sentezinde kullanılan polimerlerin özellikleri aşağıda verilmiştir:

- **Poliakrilik asid (PAA):** % 35'lik sulu çözeltisinde ve molekül ağırlığı 100.000 olan PAA, Aldrich firmasından alınmıştır.
- **Vinil prilidon-Poliakrilik asid (25:75) Kopolimeri:** Molekül ağırlığı 80.000 olan bu kopolimer, bölümümüzde Heinz Uelzmann'ın yöntemi (1958) ile sentezlenmiştir.
- **Vinil prilidon-Poliakrilik asid (50:50) Kopolimeri:** Molekül ağırlığı 80.000 olan bu kopolimer, Heinz Uelzmann'ın yöntemi (1958) ile sentezlenmiştir.

Konjugasyon reaksiyonlarında kullanılan diğer kimyasallar ve özellikleri genel olarak aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- **1-(3-Dimetilaminopropil)-3-etil karbodiimid (EDC):** Suda çözünebilir bir karbodiimid olan EDC, polimer molekülünün karboksil grubunu aktive etmek için kullanılmıştır. Sigma firmasından alınmıştır.
- **Dimetilsülfoksit (DMSO):** Sentezlenen peptid oldukça hidrofobik bir yapıya sahip olduğundan ve suda çözünmediğinden dolayı, bütün reaksiyonlarda DMSO'da çözülerek kullanılmıştır. DMSO Merck firmasından alınmıştır.
- **Sodyum Hidroksit (NaOH):** Çözeltilerin pH'larının ayarlanmasında kullanılmıştır ve Riedel-de Haën firmasından alınmıştır.
- **Hidroklorik asit (HCl):** Çözeltilerin pH'larının ayarlanmasında kullanılmıştır ve Riedel-de Haën firmasından alınmıştır.
- **Su:** Konjugat sentezinde ana çözücü olarak kullanılmıştır ve laboratuvarımızda bulunan Milipore-Q Gradient Ultra Saf Su Cihazı damıtılan ultra saf su kullanılmıştır.

Konjugatların sentezinde kullanılan cihazlar aşağıda verilmiştir:

- WTW pH level 1 pH metre
- Jasco V-530 UV-VIS Spektrofotometre
- Viscotek 4 Dedektörlü GPC (SEC) Sistemi (Viscotek TDA 302 üçlü dedektör dizisi, Viscotek Model 2501 UV dedektörü, Viscotek GPCmax VE2001 örnek modülü kısımlarından oluşur.)
- Precisa XB 220A Hassas Terazisi
- Heidolph MR 3001 Isıtıcıli Manyetik Karıştırıcı
- Binder Vakum Etüvi
- Finnpiette Micropipet (1-10 ml, 100-1000 µl, 5-50 µl)
- Hettich Eba20 Santrifüj Cihazı
- Shimadzu HPLC Sistemi
- IKAMAG Çoklu Karıştırıcı
- Milipore-Q Gradient Ultra Saf Su Cihazı
- PTI QM-4/2003 Steady State Floresans Spektrometre

6.2.1.1 Peptid-PAA Biyokonjugatlarının sentezi

Sentez öncesinde hazırlanan, PAA ara stok çözelti ve konjugasyon için yapılan hesaplamalar aşağıda anlatılmaktadır.

6.2.1.1.1 PAA Ara Stok Çözeltisinin Hazırlanması

Deneylerde % 35'lik $M_w=100000$ olan PAA çözeltisi kullanıldı. Bu ana stok çözeltiden her seferinde almak yerine, konsantrasyonu bilinen bir ara stok çözelti hazırlandı.

Öncelikle 1 mg PAA'nın ne kadar hacim içinde olduğu hesaplanır.

$$\begin{array}{cc} 100 \text{ mL'de} & 35 \text{ gr PAA varsa,} \\ \mathbf{X} & 1 \text{ mg PAA} \end{array}$$

$$\mathbf{X= 2.85 \times 10^{-3} \text{ mL'sinde yani } 2.85 \mu\text{L'sinde 1 mg PAA bulunur.}}$$

2 mL PAA ana stoktan alırsak;

$$\begin{array}{cc} 2.85 \mu\text{L'sinde} & 1 \text{ mg PAA varsa,} \\ 2000 \mu\text{L'sinde} & \mathbf{X} \end{array}$$

$$\mathbf{X= 701.75 \text{ mg PAA vardır.}}$$

Bu 2 mL (701.75 mg) PAA çözeltisini 2 mL ultra saf su ile dilue edersek ($V_T= 4 \text{ mL}$);

$$\begin{array}{cc} 701.75 \text{ mg PAA} & 4 \text{ mL'deyse} \\ 1 \text{ mg PAA} & \mathbf{X} \end{array}$$

$$\mathbf{X= 5.7 \mu\text{L'sinde 1 mg PAA bulunur.}}$$

Böylece, elimizde 5.7 µL'sinde 1 mg PAA olan 4 mL ara stok çözeltimiz olur. Deneylerimizde kullanılan bütün PAA'ler bu ara stok çözeltiden uygun miktarlar hesaplanarak kullanılmıştır.

6.2.1.1.2 Konjugasyon için Yapılan Hesaplamalar

Tüm reaksiyonlarda, polimer konsantrasyonları (0.5 mg/mL) sabit olduğundan, öncelikle aşağıdaki eşitlikten reaksiyon için gerekli peptid miktarı (mg/mL cinsinden) hesaplanır:

$$n_{\text{pep}}/n_{\text{pol}} = \frac{C_{\text{pep}} \times N_A}{M_w(\text{peptid})} \times \frac{M_w(\text{polimer})}{C_{\text{pol}} \times N_A}$$

N_A = Avagadro sayısı

C_{pep} = Peptid konsantrasyonu

C_{pol} = Polimer konsantrasyonu

M_w = Molekül ağırlığı

Daha sonra reaksiyon hacmine göre kullanılacak peptid, polimer ve aktivatör (EDC) miktarları belirlenir.

6.2.1.1.3 Konjugasyon Yöntemleri

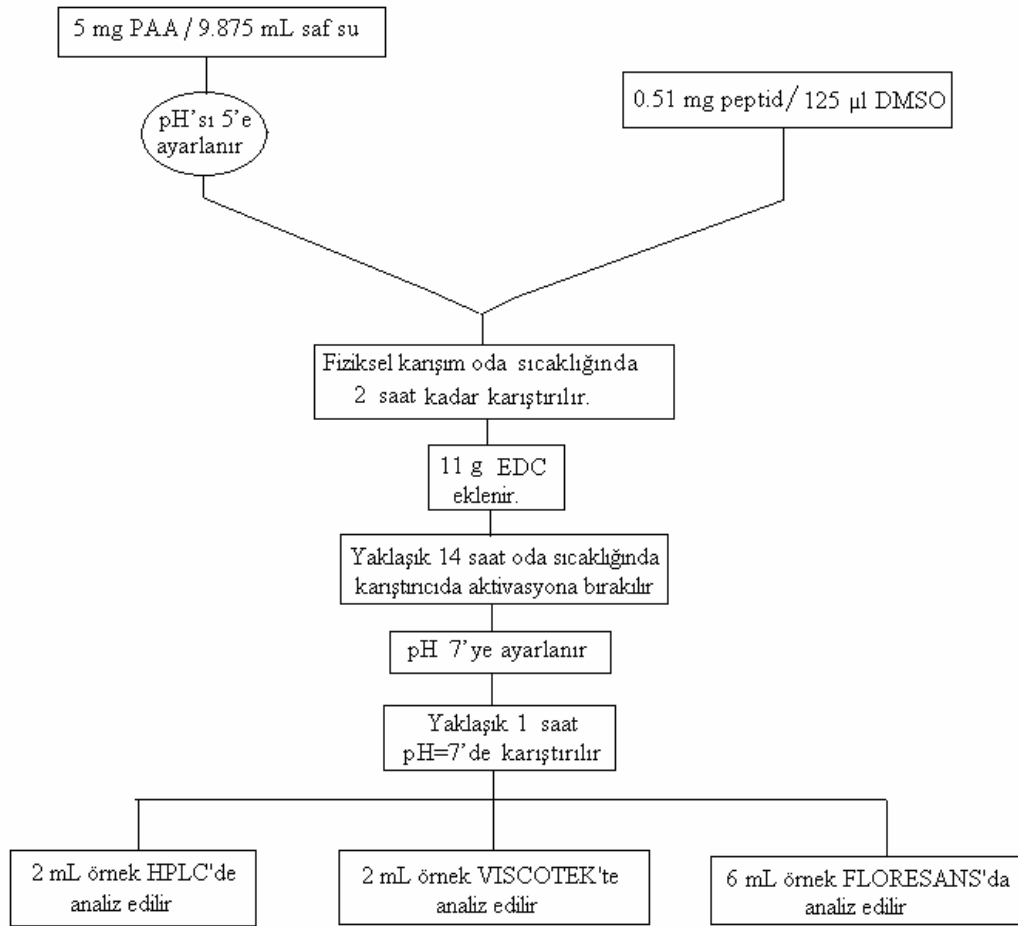
PAA-peptid biyokonjugatlarının hazırlanmasında, aktivasyon mekanizması farklı olan 3 ayrı yöntem kullanılmıştır. Her bir yöntemle sentezlenen biyokonjugatlar, çeşitli spektroskopik ve kromatografik yöntemlerle analiz edilerek, en iyi verime sahip konjugasyon yöntemi belirlenmiştir.

Yöntemler arasında bir kıyaslama yapabilmek amacıyla, bütün biyokonjugatlar $n_{\text{pep}}/n_{\text{pol}}=5$ oranında sentezlenmiştir.

6.2.1.1.3.1 Yöntem 0

5 mg poliakrilik asid (PAA $M_w=100000$) 9.875 mL saf suda çözülür ve sodyum hidroksid

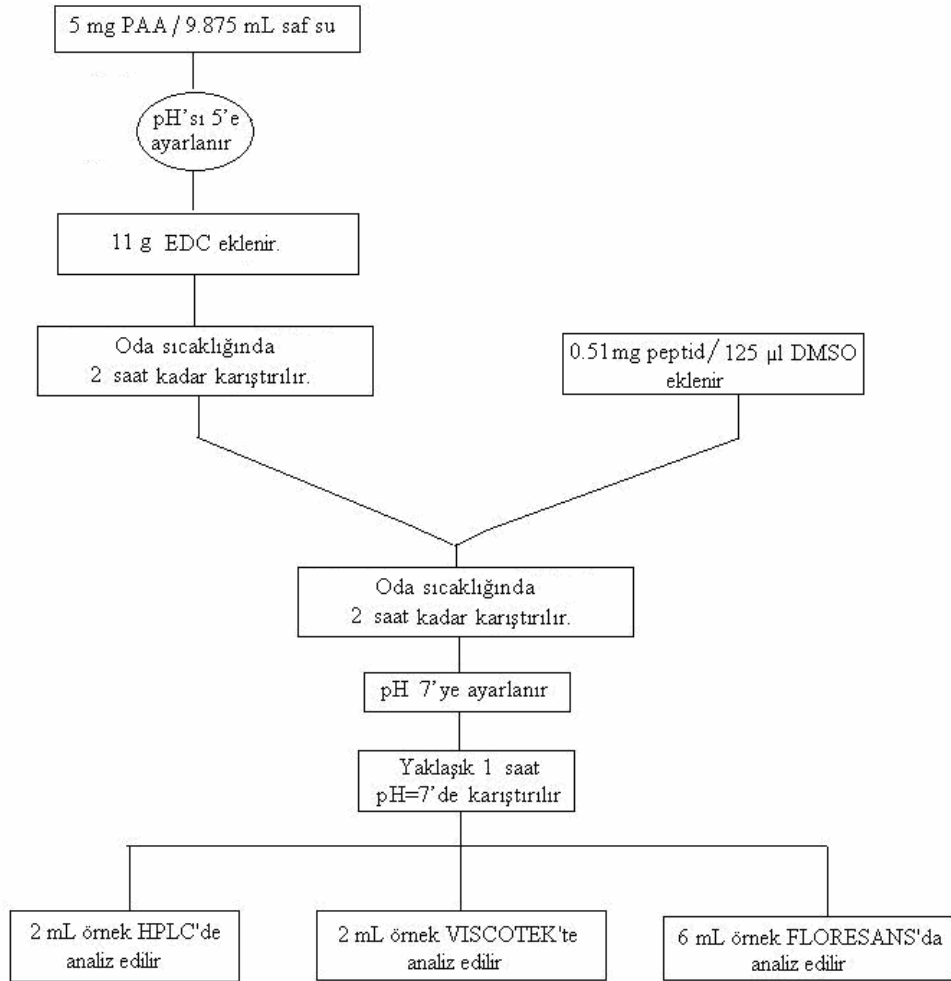
(NaOH) ile pH'sı 5'e ayarlandı. 51 mg peptid 125 µl dimetil sülfoksit (DMSO)'de çözüldü ve polimer çözeltisine eklenir. Bu fiziksel karışım, manyetik karıştırıcı yardımıyla oda sıcaklığında 2 saat kadar karıştırıldı. Daha sonra 11 g suda çözünen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid (EDC) çapraz bağlayıcısı fiziksel karışıma ilave edilerek yaklaşık 14-15 saat boyunca oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda aktivasyona bırakıldı. Daha sonra çözeltinin pH'sı kontrol edilerek, pH 7'ye ayarlandı ve yaklaşık 1 saat pH=7'de karıştırıldı. Elde edilen konjugatın yapı ve karakterizasyonu, kromatografik Viskotek [Dört Dedektörlü-UV, Refraktif İndeks, Viskozite ve ışık saçılması, kromatografik sistem]], spektroskopik, florimetrik yöntemlerle incelendi.



Şekil 6.11 Yöntem 0'a ait aktivasyon mekanizması kullanılarak sentezlenen konjugatın konjugasyon akış şeması

6.2.1.1.3.2 Yöntem 1

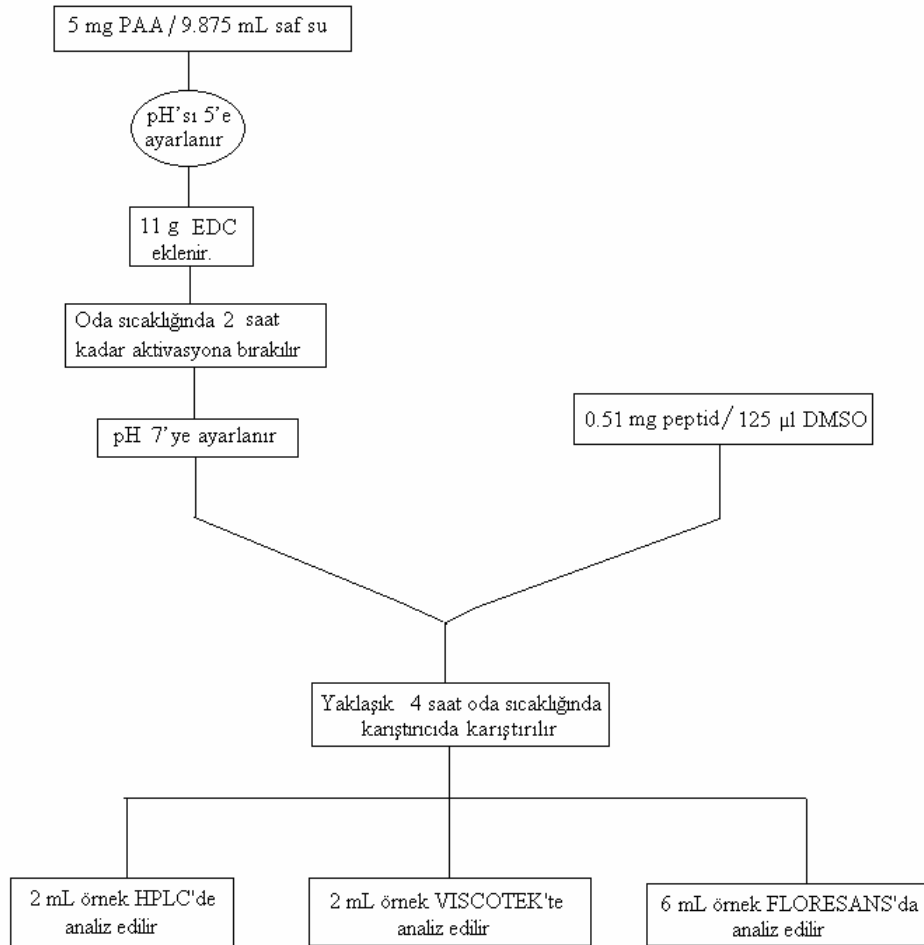
5 mg (PAA Mw=100000) 9.875 mL saf suda çözüldü ve sodyum hidroksid (NaOH) ile pH'sı 5'e ayarlandı. Daha sonra bu çözeltiye 11 g suda çözünen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid (EDC) çapraz bağlayıcısı ilave edilerek yaklaşık 2 saat kadar manyetik karıştırıcıda aktivasyona bırakıldı. 0.51 mg peptid 125 µl dimetil sülfoksit (DMSO)'de çözüldü ve 2 saat boyunca aktive edilen polimer çözeltisine eklendi. Bu karışım 2 saat kadar oda sıcaklığında karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra pH'sı ölçüldü ve pH 7'ye ayarlandı. 1-2 saat kadar daha karıştırıldıktan sonra, elde edilen konjugatın yapı ve karakterizasyonu, kromatografik Viskotek [Dört Dedektörlü-UV, Refraktif İndeks, Viskozite ve ışık saçılması, kromatografik sistem]), spektroskopik, florimetrik yöntemlerle incelendi.



Şekil 6.12 Yöntem 1'e ait aktivasyon mekanizması kullanılarak sentezlenen konjugatın konjugasyon akış şeması

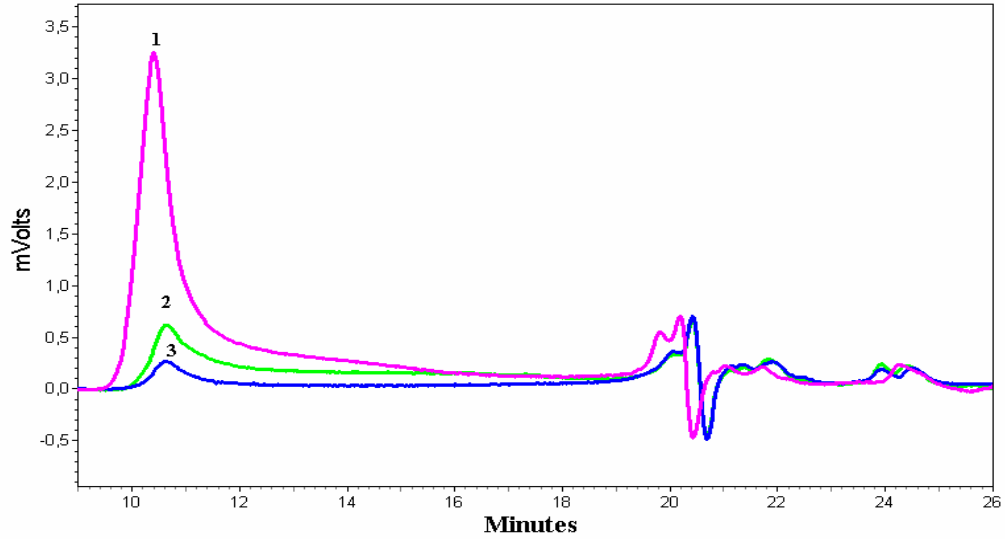
6.2.1.1.3.3 Yöntem 2

5 mg poliakrilik asid (PAA Mw=100000) 9.875 mL saf suda çözülür ve pH'sı sodyum hidroksid (NaOH) ile pH'sı 5'e ayarlandı. Daha sonra bu çözeltiye 11 g suda çözünen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid (EDC) çapraz bağlayıcısı ilave edilerek yaklaşık 2 saat kadar karıştırıcıda aktivasyona bırakıldı. Daha sonra pH 7'ye ayarlandı ve 0.51 mg peptid 125 µl dimetil sülfoksit (DMSO)'de çözülerek polimer çözeltisine eklendi. 4-5 saat oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra, elde edilen konjugatın yapı ve karakterizasyonu, kromatografik Viskotek [Dört Dedektörlü-UV, Refraktif İndeks, Viskozite ve ışık saçılması, kromatografik sistem]], spektroskopik, florimetrik yöntemlerle incelendi.

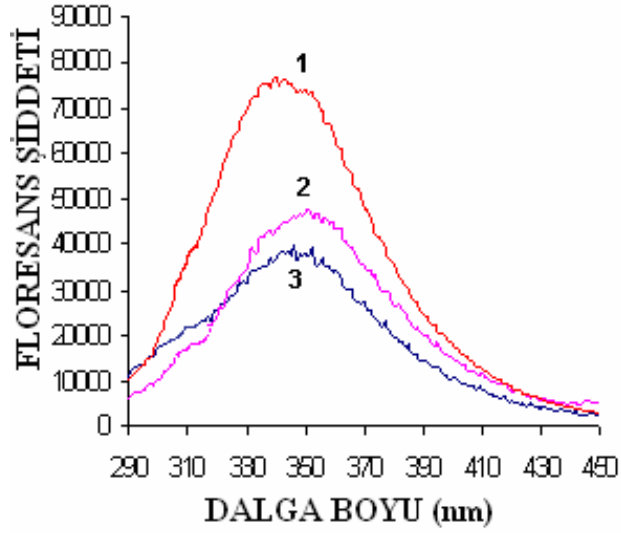


Şekil 6.13 Yöntem 2'ye ait aktivasyon mekanizması kullanılarak sentezlenen konjugatın, konjugasyon akış şeması

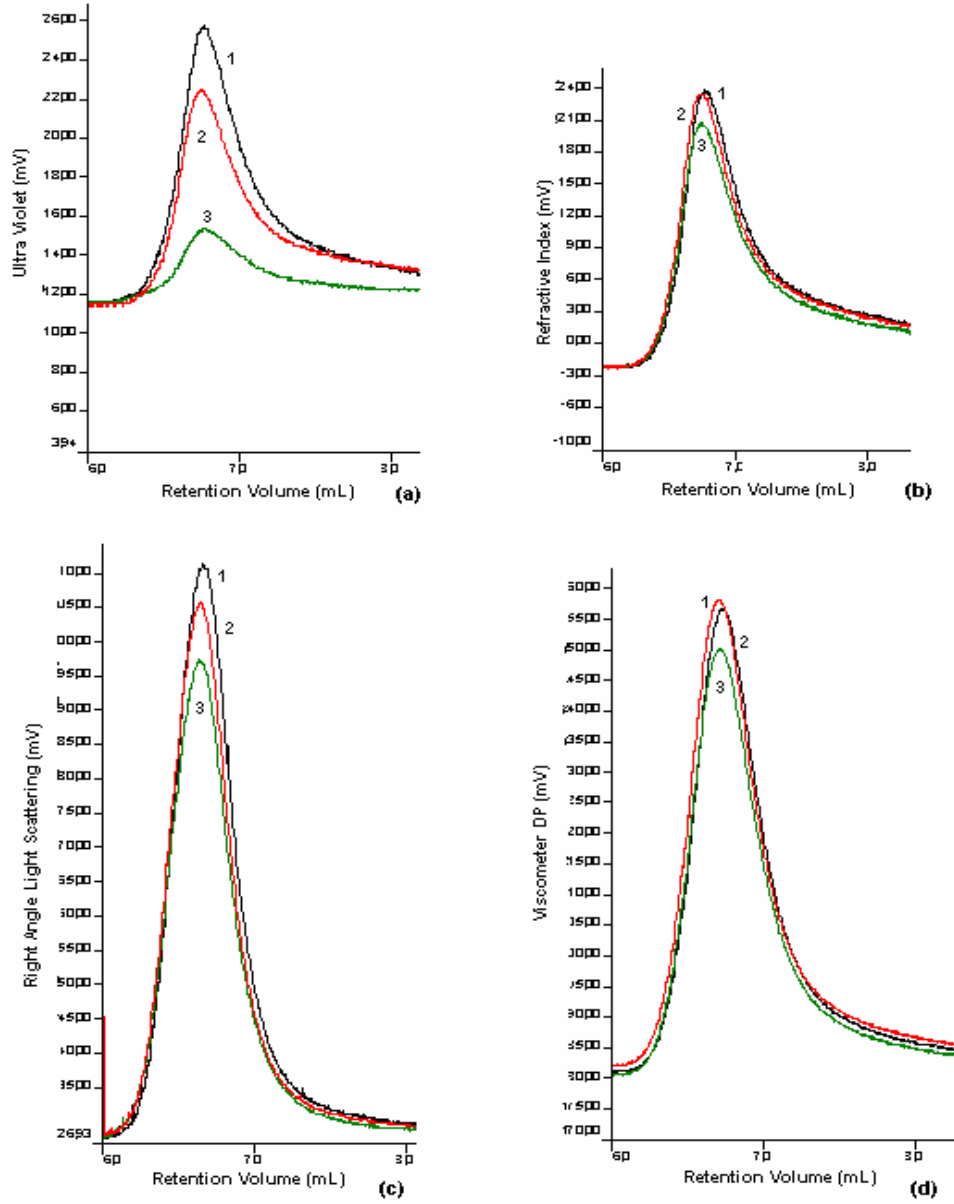
6.2.1.1.4 Farklı Aktivasyon Mekanizmalarına ait Analiz Sonuçları



Şekil 6.14 Hepatit B yüzey Antijen Peptidi 95-109 dizisi ile PAA'in, npeptide/nPAA =5 oranında, sulu ortamda, 3 farklı aktivasyon metodu kullanılarak sentezlenen farklı mol oranlarında sentezlenen konjugatlarının HPLC kromatogramları: (1) Yöntem 0, (2) Yöntem 1, (3) Yöntem 2.

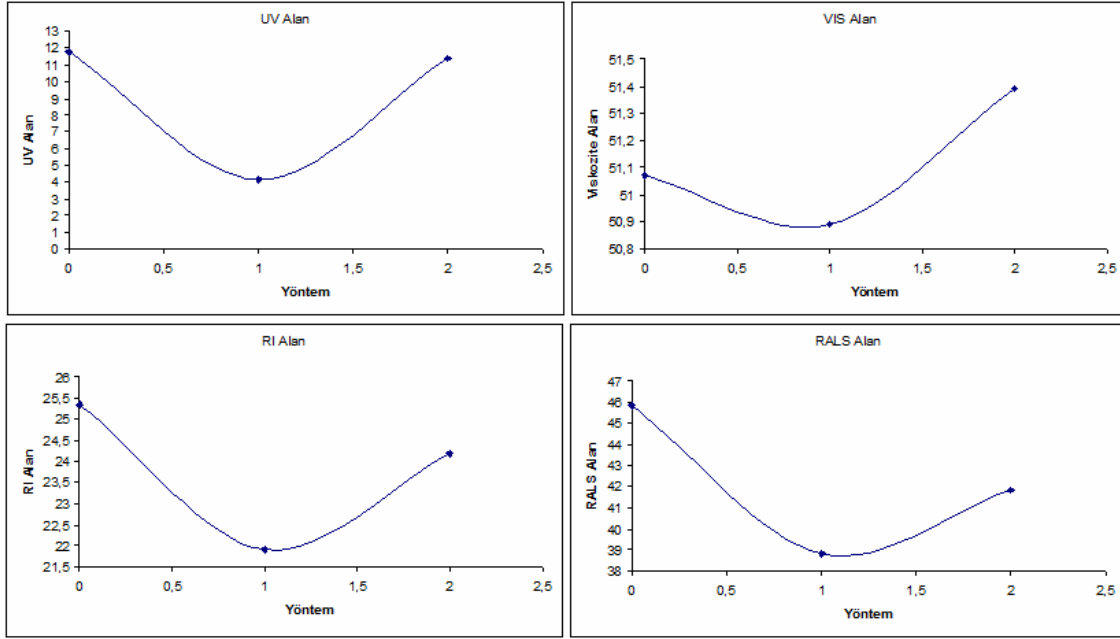


Şekil 6.15 PAA ile Hepatit B yüzey Antijen Peptidi 95-109 dizisinin 3 farklı aktivasyon metoduna göre, aynı molar oranda, $n_{\text{peptide/PAA}} = 5$ ve pH 7'de sentezlenen konjugatlarının floresans spektrumları: (1) Yöntem 0; $\lambda_{\text{max}}=340$ nm, (2) Yöntem 1; $\lambda_{\text{max}}=351$ nm, (3) Yöntem 2; $\lambda_{\text{max}}=346$ nm.



Şekil 6.16 PAA ile Hepatit B yüzey Antijen Peptidi 95-109 dizisinin 3 farklı aktivasyon metoduna göre, aynı molar oranda, $n_{\text{peptidePAA}} = 5$ ve pH 7’de sentezlenen konjugatlarının; Viscotek cihazı ile 4 ayrı detektör kullanılarak yapılan analiz sonuçları: (a) UV (Ultra Violet detector) detektörü ile, (b) Kırılma İndisi Detektörü (Refractive Index detector), (c) Işık Saçılması detektörü (Right Angle Light Scattering detector), (d) Vizkozite Detektörü (Viscometer detector).

Yöntem	RI Alan	UV Alan	RALS Alan	VIS Alan
0	25,35	11,79	45,84	51,07
1	21,92	4,13	38,83	50,89
2	24,18	11,42	41,83	51,39



Şekil 6.17 PAA ile Hepatit B yüzey Antijen Peptidi 95-109 dizisinin 3 farklı aktivasyon metoduna göre, aynı molar oranda, $n_{\text{peptidePAA}} = 5$ ve pH 7’de sentezlenen konjugatlarının; Viscotek cihazı ile 4 ayrı detektör kullanılarak yapılan analizleri sonucunda, elde edilen piklerin farklı detektörlerdeki alanlarının yöneme göre değişiminin gösterimi.

Yapılan analizler sonucunda, konjugasyonun en iyi Yöntem 0 ile gerçekleştiği görülmüştür. Ve bundan sonra sentezlenen bütün konjugatlar, yöntem 0 metoduna göre yapılmıştır.

6.2.1.1.5 Farklı Oranlarda Sentezlenen PAA-Peptid Konjugatları

PAA-peptid konjugatları Yöntem 0’daki mekanizmaya göre ve farklı $n_{\text{Peptid}}/n_{\text{PAA}}$ başlangıç molar oranlarında sentezlenmiştir. Bu konjugatların sentezi aşağıda anlatılmıştır.

6.2.1.1.5.1 nPeptid/nPAA =1 konjugatı

20 mg (ara stoktan 114 µl) poliakrilik asid (PAA, Mw=100000) 39.5 mL saf suda çözüldü. Çözeltinin pH'sı ölçülerek, 1 M sodyum hidroksid (NaOH) ile pH=5'e ayarlandı. Bu polimer çözeltisine 500 µl dimetil sülfoksit (DMSO)'de çözülen 0.38 mg peptid çözeltisi kısım kısım eklendi ve bu fiziksel karışım yaklaşık 2 saat manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Ara ara çözeltinin pH'sı kontrol edildi. 2 saat sonunda, fiziksel karışıma yaklaşık 40.83 mg suda çözünen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid (EDC) çapraz bağlayıcısı eklendi ve 1 gece oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Ertesi gün çözeltinin pH'sı tekrar ölçüldü, pH= 7'ye ayarlandı ve 1 saat kadar karıştırıldıktan sonra elde edilen konjugatın yapı ve karakterizasyonu, kromatografik Viskotek [Dört Dedektörlü-UV, Refraktif İndeks, Viskozite ve ışık saçılması, kromatografik sistem]), spektroskopik, florimetrik yöntemlerle incelendi.

6.2.1.1.5.2 nPeptid/nPAA =3 Konjugatı

20 mg (ara stoktan 114 µl) poliakrilik asid (PAA, Mw=100000) 39.5 mL saf suda çözüldü. Çözeltinin pH'sı ölçülerek, 1 M sodyum hidroksid (NaOH) ile pH=5'e ayarlandı. Bu polimer çözeltisine 500 µl dimetil sülfoksit (DMSO)'de çözülen 1.11 mg peptid çözeltisi kısım kısım eklendi ve bu fiziksel karışım yaklaşık 2 saat manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Ara ara çözeltinin pH'sı kontrol edildi. 2 saat sonunda, fiziksel karışıma yaklaşık 42.30 mg suda çözünen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid (EDC) çapraz bağlayıcısı eklendi ve 1 gece oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Ertesi gün çözeltinin pH'sı tekrar ölçüldü, pH= 7'ye ayarlandı ve 1 saat kadar karıştırıldıktan sonra elde edilen konjugatın yapı ve karakterizasyonu, kromatografik Viskotek [Dört Dedektörlü-UV, Refraktif İndeks, Viskozite ve ışık saçılması, kromatografik sistem]), spektroskopik, florimetrik yöntemlerle incelendi.

6.2.1.1.5.3 nPeptid/nPAA =5 Konjugatı

20 mg (ara stoktan 114 µl) poliakrilik asid (PAA, Mw=100000) 39.5 mL saf suda çözüldü. Çözeltinin pH'sı ölçülerek, 1 M sodyum hidroksid (NaOH) ile pH=5'e ayarlandı. Bu polimer çözeltisine 500 µl dimetil sülfoksit (DMSO)'de çözülen 2.02 mg peptid çözeltisi kısım kısım eklendi ve bu fiziksel karışım yaklaşık 2 saat manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Fiziksel karışımdan alınan 2.5 mL'lik örnek HPLC, Viscotek ve Floresans cihazlarında analiz edildi.

Kalan çözeltinin pH'sı ara ara kontrol edildi. 2 saat sonunda, fiziksel karışıma yaklaşık 44 mg suda çözünen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid (EDC) çapraz bağlayıcısı eklendi ve 1 gece oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Ertesi gün çözeltinin pH'sı tekrar ölçüldü, pH= 7'ye ayarlandı ve 1 saat kadar karıştırıldıktan sonra elde edilen konjugatın yapı ve karakterizasyonu, kromatografik Viskotek [Dört Dedektörlü-UV, Refraktif İndeks, Viskozite ve ışık saçılması, kromatografik sistem]), spektroskopik, florimetrik yöntemlerle incelendi.

6.2.1.1.5.4 nPeptid/nPAA =7 Konjugatı

5 mg (ara stoktan 28.5 µl) poliakrilik asid (PAA, Mw=100000) 9.875 mL saf suda çözüldü. Çözeltinin pH'sı ölçülerek, 1 M sodyum hidroksid (NaOH) ile pH=5'e ayarlandı. Bu polimer çözeltisine 125 µl dimetil sülfoksit (DMSO)'de çözülen 0.652 mg peptid çözeltisi kısım kısım eklendi ve bu fiziksel karışım yaklaşık 2 saat manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Ara ara çözeltinin pH'sı kontrol edildi. 2 saat sonunda, fiziksel karışıma yaklaşık 11.304 mg suda çözünen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid (EDC) çapraz bağlayıcısı eklendi ve 1 gece oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Ertesi gün çözeltinin pH'sı tekrar ölçüldü, pH= 7'ye ayarlandı ve 1 saat kadar karıştırıldıktan sonra elde edilen konjugatın yapı ve karakterizasyonu, kromatografik Viskotek [Dört Dedektörlü-UV, Refraktif İndeks, Viskozite ve ışık saçılması, kromatografik sistem]), spektroskopik, florimetrik yöntemlerle incelendi.

6.2.1.1.5.5 nPeptid/nPAA =9 Konjugatı

5 mg (ara stoktan 28.5 µl) poliakrilik asid (PAA, Mw=100000) 9.875 mL saf suda çözüldü. Çözeltinin pH'sı ölçülerek, 1 M sodyum hidroksid (NaOH) ile pH=5'e ayarlandı. Bu polimer çözeltisine 125 µl dimetil sülfoksit (DMSO)'de çözülen 0.837 mg peptid çözeltisi kısım kısım eklendi ve bu fiziksel karışım yaklaşık 2 saat manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Ara ara çözeltinin pH'sı kontrol edildi. 2 saat sonunda, fiziksel karışıma yaklaşık 11.68 mg suda çözünen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid (EDC) çapraz bağlayıcısı eklendi ve 1 gece oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Ertesi gün çözeltinin pH'sı tekrar ölçüldü, pH= 7'ye ayarlandı ve 1 saat kadar karıştırıldıktan sonra elde edilen konjugatın yapı ve karakterizasyonu, kromatografik Viskotek [Dört Dedektörlü-UV, Refraktif İndeks, Viskozite ve ışık saçılması, kromatografik sistem]), spektroskopik, florimetrik yöntemlerle incelendi.

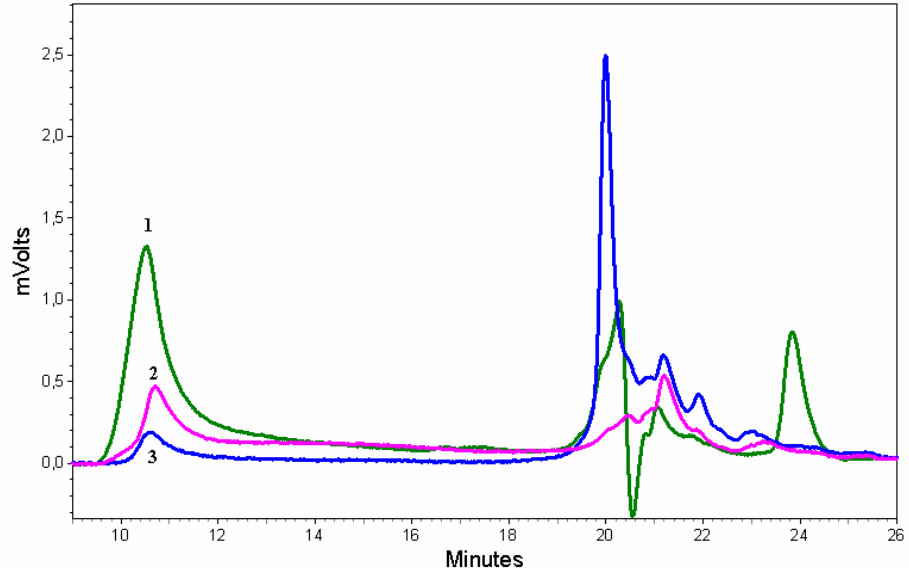
Tüm reaksiyonlarda kullanılan kimyasal miktarları Çizelge 5’de topluca verilmiştir:

Çizelge 5. Farklı nPeptid/nPAA oranlarında sentezlenen konjugatlarda kullanılan kimyasal miktarları

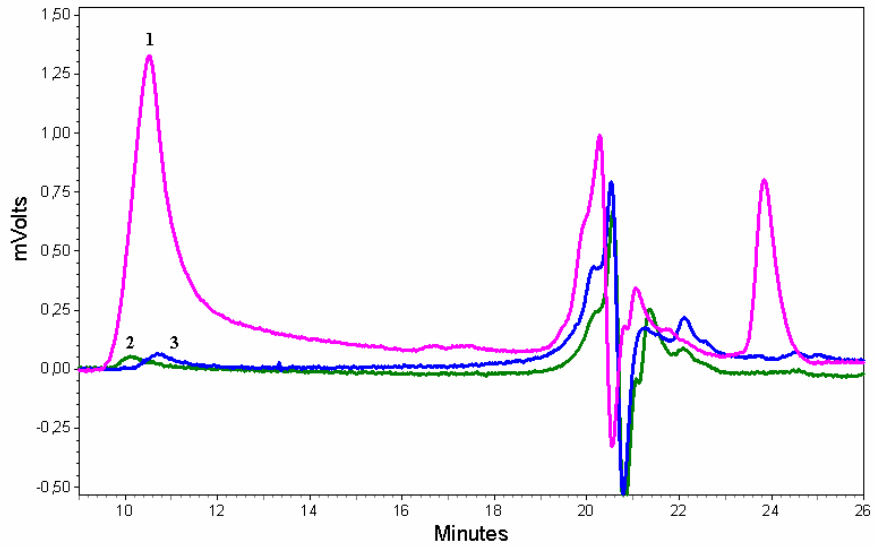
nPeptid/nPAA Oranı	Kullanılan Peptid Miktarı (mg)	Kullanılan DMSO Miktarı (µL)	Kullanılan Karbodiimid Miktarı (mg)	Toplam Reaksiyon Hacmi (mL)
1	0.38	500	40.83	40
3	1.11	500	42.3	40
5	2.02	500	44	40
7	0.652	125	11.304	10
9	0.837	125	11.68	10

6.2.1.2 PAA-Peptid Konjugatlarına Ait Analiz Sonuçları

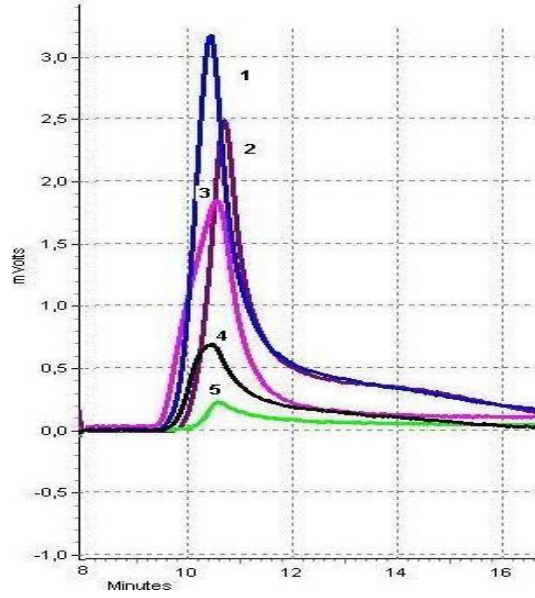
6.2.1.2.1 HPLC Sonuçları



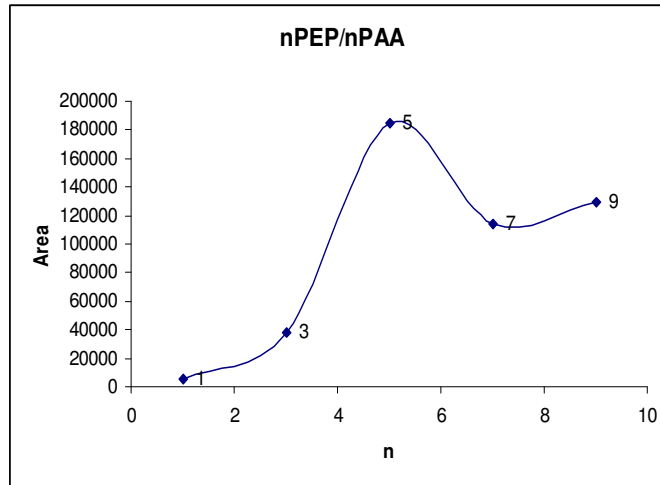
Şekil 6.18 PAA ile Hepatit B Yüzey Antijen Peptidi 95-109 dizisinin; (1) pH=7’de sentezlenen n= 5 konjugatına, (2) pH=5’de sentezlenen n= 5 konjugatı (3) pH 5’de yapılan fiziksel kompleksi gösteren HPLC kromatogramı.



Şekil 6.19 PAA ile Hepatit B Yüzey Antijen Peptidi 95-109 dizisinin; (1) pH=7’de sentezlenen n= 5 konjugatına, (2) pH=7’de 0.5 mg/mL konsantrasyondaki PAA çözeltisine, (3) pH 7’de HBsAg peptidine ait analiz sonuçlarını gösteren HPLC kromatogramı.



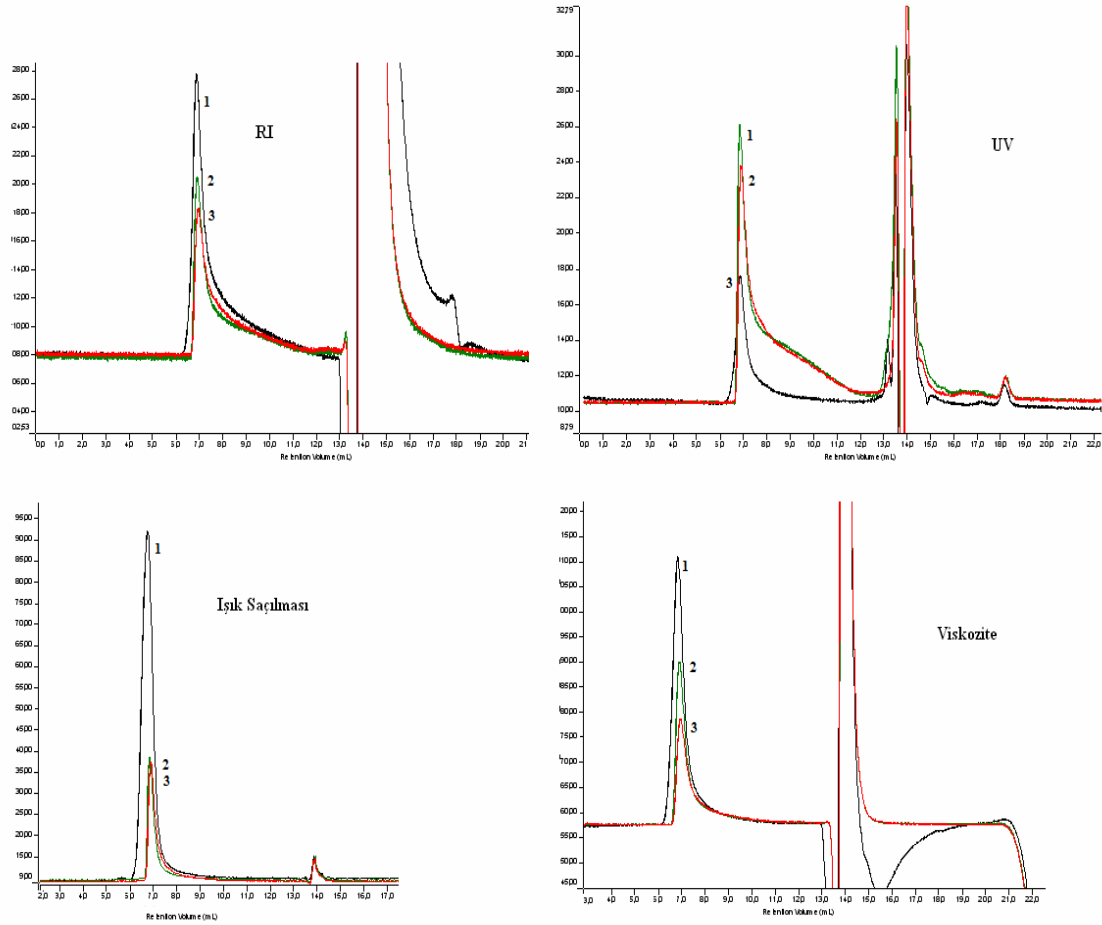
Şekil 6.20 Hepatit B yüzey Antijen Peptidi 95-109 dizisi ile PAA'nin pH 7'deki farklı mol oranlarında (npeptide/nPAA) sulu ortamda, sentezlenen konjugatlarının HPLC kromatogramları: 1(5), 3 (4), 5 (1), 7 (3), 9 (2).



$n_{\text{Peptide}}/n_{\text{PAA}}$	Alan
1	5231
3	37715
5	184992
7	113628
9	129320

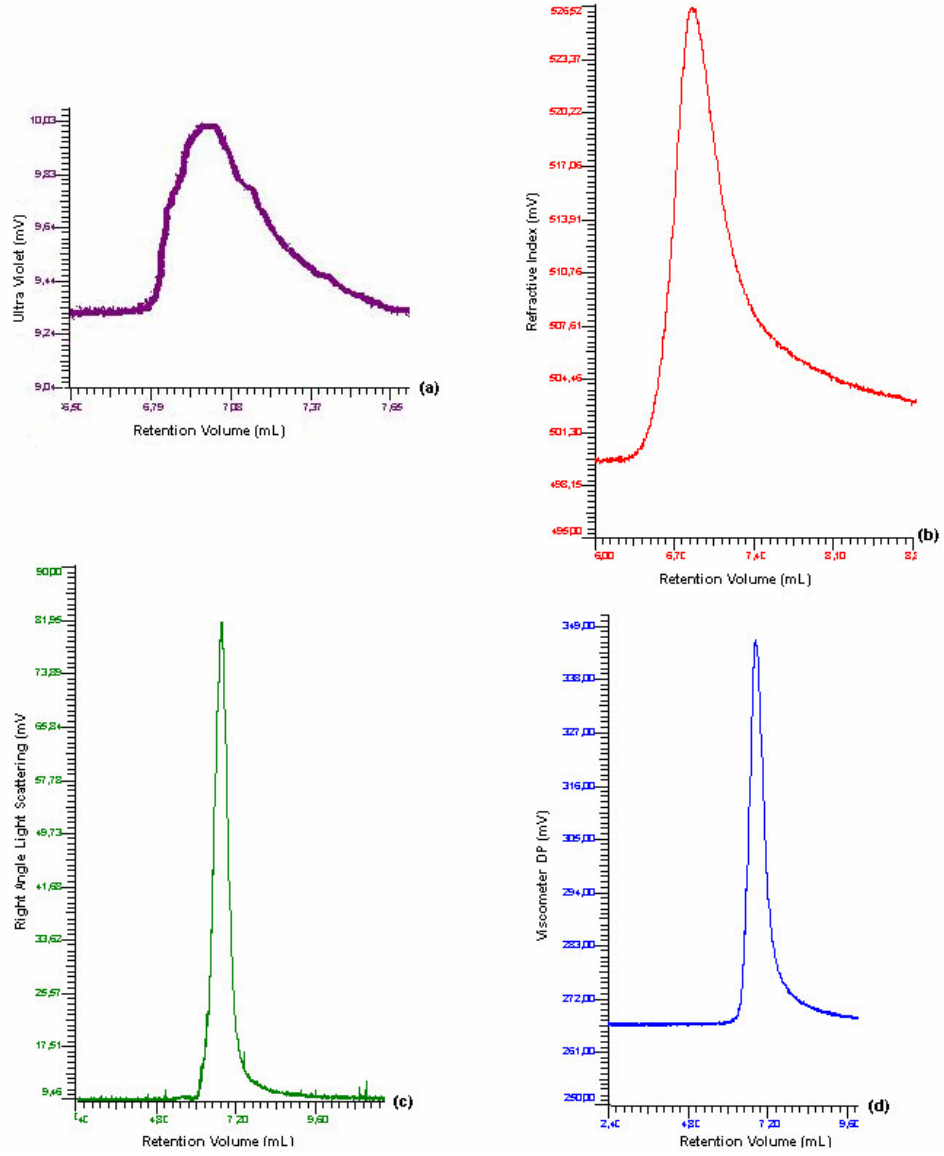
Şekil 6.21 Peptid/PAA konjugatlarının farklı molar oranlarında yapılan HPLC analizi sonucunda elde edilen piklerin alanlarının orana bağlı grafiği.

6.2.1.2.2 Viscotek Sonuçları

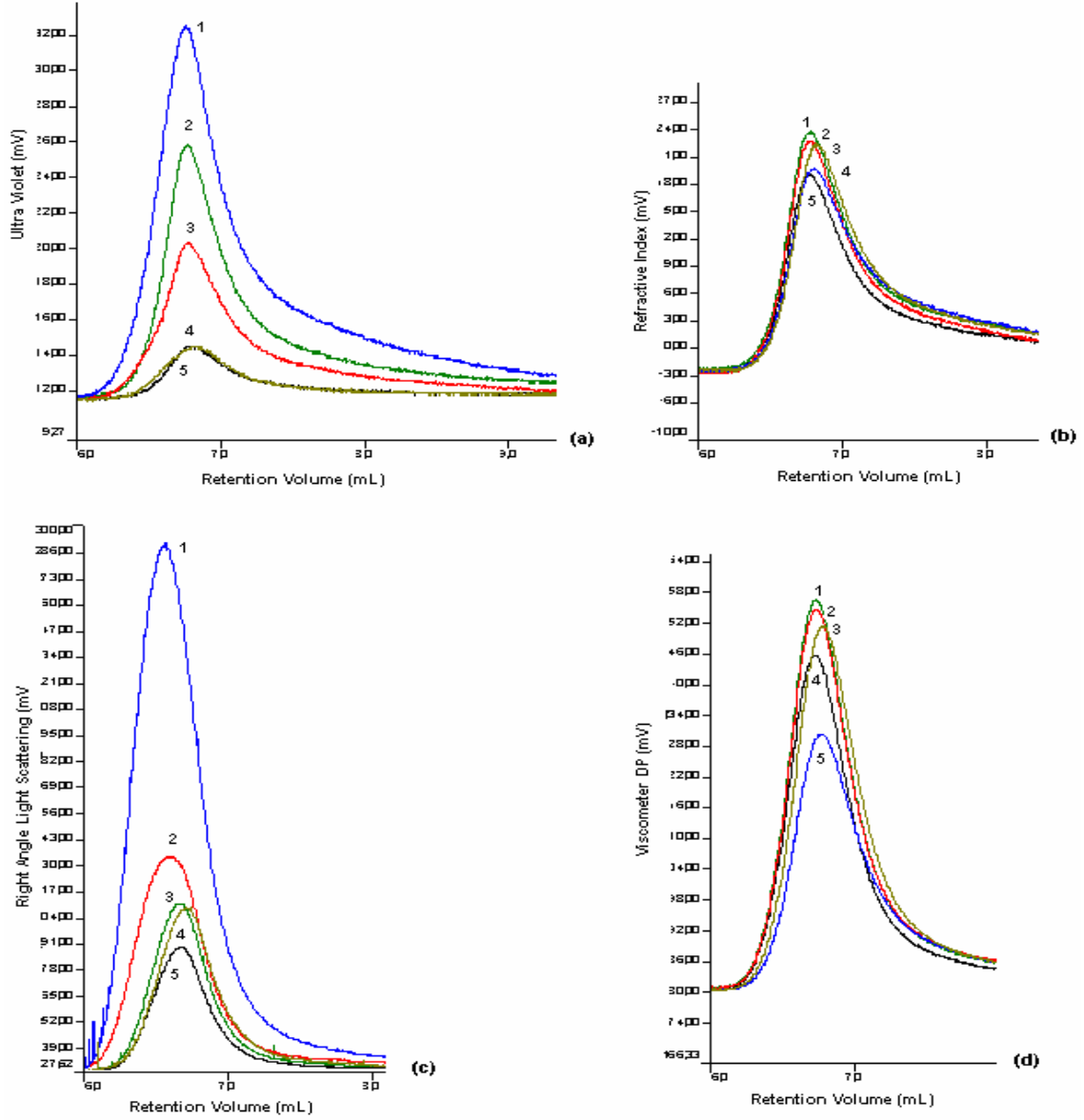


Şekil 6.22 PAA ile Hepatit B Yüzey Antijen Peptidi 95-109 dizisinin n= 5 oranına ait; pH=7’de sentezlenen konjugatı (Konj-pH 7), pH 5’de sentezlenen konjugatı (Konj-pH 5) ve pH 5’de yapılan fiziksel kompleksi (Fizika pH 7) gösteren ve 4 farklı detektörde analiz edilen Viscotek sonuçları.

- (a) Konj-pH 7 (1), Fizika pH 5 (2), Konj-pH 5 (3), Kırılma İndisi Detektörü (Refractive Index detector),
- (b) Konj-pH 7 (3), Fizika pH 5 (1), Konj-pH 5 (1), UV (Ultra Violet detector) detektörü,
- (c) Konj-pH 7 (1), Fizika pH 5 (2), Konj-pH 5 (3), Işık Saçılması detektörü (Right Angle Light Scattering detector),
- (d) Konj-pH 7 (1), Fizika pH 5 (2), Konj-pH 5 (3), Viskozite Detektörü (Viscometer detector) ile.



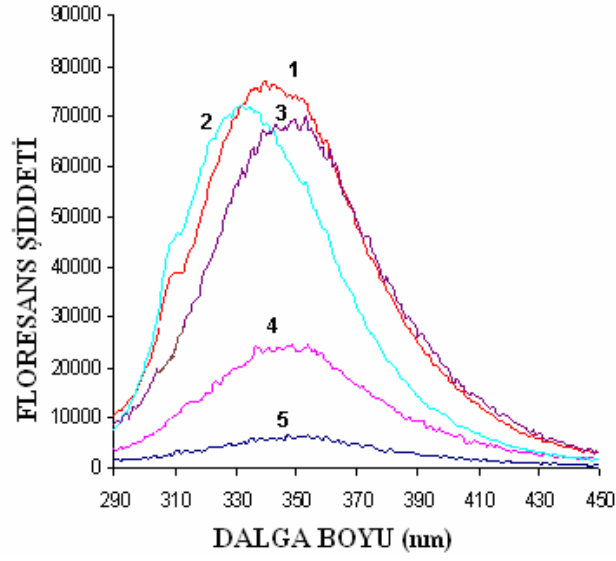
Şekil 6.23 0.5 mg/mL konsantrasyondaki PAA'nin, pH 7'deki 4 farklı detektörle Viscotek analiz sonuçları



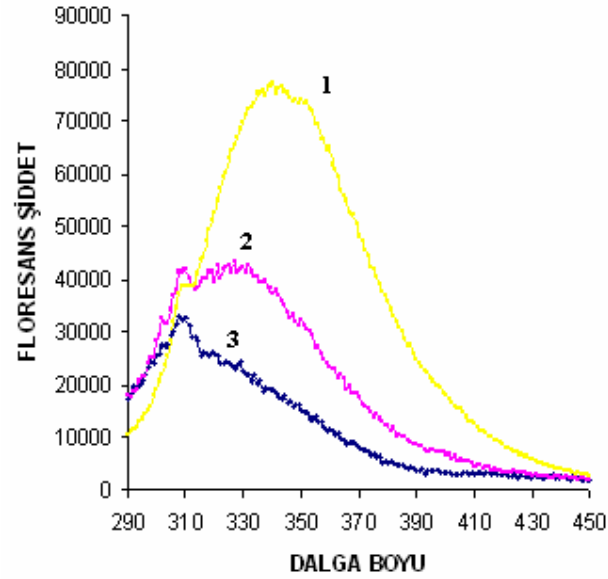
Şekil 6.24 Hepatit B yüzey Antijen Peptidi 95-109 dizisi ile PAA'nın pH 7'deki farklı mol oranlarında (npeptide/nPAA) sulu ortamda, sentezlenen konjugatlarının Viscotek cihazı ile 4 farklı detektör kullanılarak yapılan analiz sonuçları:

- (a)** 1(4), 3 (3), 5 (2), 7 (5), 9 (1), UV (Ultra Violet detector) detektörü,
- (b)** 1(5), 3 (2), 5 (1), 7 (3), 9 (4), Kırılma İndisi Detektörü (Refractive Index detector),
- (c)** 1(5), 3 (2), 5 (3), 7 (4), 9 (1), Işık Saçılması detektörü (Right Angle Light Scattering detector),
- (d)** 1(4), 3 (2), 5 (1), 7 (3), 9 (5), Vizkozite Detektörü (Viscometer detector) ile.

6.2.1.2.3 Floresans Sonuçları



Şekil 6.25 Hepatit B yüzey Antijen Peptidi 95-109 dizisi ile PAA polimerinin pH 7’deki farklı mol oranlarında (npeptide/nPAA) ve sulu ortamda sentezlenen konjugatlarının, floresans spektrumları: 1(5), 3 (4), 5 (1), 7 (2), 9 (3).



Şekil 6.26 Hepatit B yüzey Antijen Peptidi 95-109 dizisi ile PAA polimerinin npeptid/nPAA=5 oranındaki, (3) pH=5’teki fiziksel kompleksi, (2) pH=5’teki konjugatı (1) pH 7’deki konjugatına ait floresans spektrumları.

6.2.1.3 VP/AA (25:75) ve (50:50) Biyokonjugatlarının Sentezi

VP/AA ile biyokonjugasyonda iki farklı polimer kullanılmıştır. Ancak her iki polimerinde molekül ağırlığı 80.000 olduğundan dolayı, sentezler için yapılan hesaplamalar ve kullanılan kimyasal miktarları aynıdır.

VPAA-peptid konjugatları, Yöntem 0'daki mekanizmaya göre ve farklı nPeptid/nPAA başlangıç molar oranlarında sentezlenmiştir. Bu konjugatların sentezi aşağıda anlatılmıştır:

6.2.1.3.1 npeptid/nVPAA =1 konjugatı

2,5 mg polivinil pirolidon-co-akrilik asid (VPAA, Mw=80000) , 4.942 mL saf suda çözöldü. Çözeltinin pH'sı ölçölerek, 1 M sodyum hidroksid (NaOH) ile pH=5'e ayarlandı. Bu polimer çözeltisine 58 µl dimetil sülfoksid (DMSO)'de çözölen 0.058 mg peptid çözeltisi kısım kısım eklendi ve bu fiziksel karışım yaklaşık 2 saat manyetik karıştıricıda karıştırdı. Ara ara çözeltinin pH'sı kontrol edildi. 2 saat sonunda, fiziksel karışım a yaklaşık 5.12 mg suda çözölen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid (EDC) çapraz bağlayıcısı eklendi ve 1 gece oda sıcaklığında manyetik karıştıricıda karıştırdı. Ertesi gün çözeltinin pH'sı tekrar ölçöldü, pH= 7'ye ayarlandı ve 1 saat kadar karıştırdıktan sonra elde edilen konjugatın yapı ve karakterizasyonu, kromatografik Viskotek [Dört Dedektörlü-UV, Refraktif İndeks, Viskozite ve ışık saçılması, kromatografik sistem]), spektroskopik, florimetrik yöntemlerle incelendi.

6.2.1.3.2 npeptid/nVPAA =3 konjugatı

2,5 mg polivinil pirolidon-co-akrilik asid (VPAA, Mw=80000) , 4.825 mL saf suda çözöldü. Çözeltinin pH'sı ölçölerek, 1 M sodyum hidroksid (NaOH) ile pH=5'e ayarlandı. Bu polimer çözeltisine 175 µl dimetil sülfoksid (DMSO)'de çözölen 0.175 mg peptid çözeltisi kısım kısım eklendi ve bu fiziksel karışım yaklaşık 2 saat manyetik karıştıricıda karıştırdı. Ara ara çözeltinin pH'sı kontrol edildi. 2 saat sonunda, fiziksel karışım a yaklaşık 5.35 mg suda çözölen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid (EDC) çapraz bağlayıcısı eklendi ve 1 gece oda sıcaklığında manyetik karıştıricıda karıştırdı. Ertesi gün çözeltinin pH'sı tekrar ölçöldü, pH= 7'ye ayarlandı ve 1 saat kadar karıştırdıktan sonra elde edilen konjugatın yapı ve karakterizasyonu, kromatografik Viskotek [Dört Dedektörlü-UV, Refraktif İndeks, Viskozite ve ışık saçılması, kromatografik sistem]), spektroskopik, florimetrik

yöntemlerle incelendi.

6.2.1.3.3 npeptid/nVPAA =5 konjugatı

2,5 mg polivinil pirolidon tartılır, 4.709 mL saf suda çözülür. Çözeltinin pH'sı ölçülerek, 1 M NaOH ile pH=5'e ayarlanır. Bu polimer çözeltisine 291 µl DMSO'da çözülen 0.291 mg peptid çözeltisi kısım kısım eklenir ve bu fiziksel karışım yaklaşık 2 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılır. Ara ara çözeltinin pH'sı kontrol edilir. 2 saat sonunda, fiziksel karışıma yaklaşık 5.58 mg karbodiimid eklenir ve 1 gece karıştırıcıda karıştırılır. Ertesi gün çözeltinin pH'sı tekrar ölçülür, pH= 7'ye ayarlanır ve 1 saat kadar karıştırıldıktan sonra analiz için cihazlara verilir.

6.2.1.3.4 npeptid/nVPAA =7 konjugatı

2,5 mg polivinil pirolidon-co-akrilik asid (VPAA, Mw=80000) , 4.6 mL saf suda çözüldü. Çözeltinin pH'sı ölçülerek, 1 M sodyum hidroksid (NaOH) ile pH=5'e ayarlandı. Bu polimer çözeltisine 400 µl dimetil sülfoksit (DMSO)'de çözülen 0.4 mg peptid çözeltisi kısım kısım eklendi ve bu fiziksel karışım yaklaşık 2 saat manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Ara ara çözeltinin pH'sı kontrol edildi. 2 saat sonunda, fiziksel karışıma yaklaşık 5.8 mg suda çözünen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid (EDC) çapraz bağlayıcısı eklendi ve 1 gece oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Ertesi gün çözeltinin pH'sı tekrar ölçüldü, pH= 7'ye ayarlandı ve 1 saat kadar karıştırıldıktan sonra elde edilen konjugatın yapı ve karakterizasyonu, kromatografik Viskotek [Dört Dedektörlü-UV, Refraktif İndeks, Viskozite ve ışık saçılması, kromatografik sistem]), spektroskopik, florimetrik yöntemlerle incelendi.

6.2.1.3.5 npeptid/nVPAA =9 konjugatı

2,5 mg polivinil pirolidon-co-akrilik asid (VPAA, Mw=80000) , 4.475 mL saf suda çözüldü. Çözeltinin pH'sı ölçülerek, 1 M sodyum hidroksid (NaOH) ile pH=5'e ayarlandı. Bu polimer çözeltisine 525 µl dimetil sülfoksit (DMSO)'de çözülen 0.525 mg peptid çözeltisi kısım kısım eklendi ve bu fiziksel karışım yaklaşık 2 saat manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Ara ara çözeltinin pH'sı kontrol edildi. 2 saat sonunda, fiziksel karışıma yaklaşık 6.05 mg suda çözünen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid (EDC) çapraz bağlayıcısı eklendi ve 1 gece oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Ertesi gün çözeltinin

pH'sı tekrar ölçüldü, pH= 7'ye ayarlandı ve 1 saat kadar karıştırıldıktan sonra elde edilen konjugatın yapı ve karakterizasyonu, kromatografik Viskotek [Dört Dedektörlü-UV, Refraktif İndeks, Viskozite ve ışık saçılması, kromatografik sistem]), spektroskopik, florimetrik yöntemlerle incelendi.

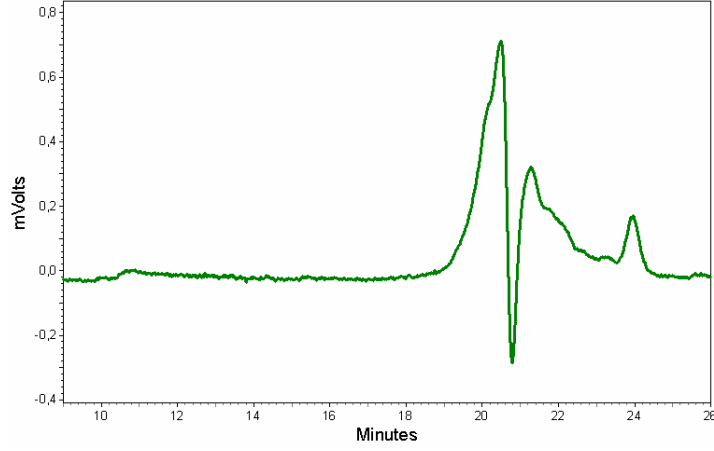
Tüm reaksiyonlarda kullanılan kimyasal miktarları Çizelge 6'da topluca verilmiştir:

Çizelge 6. Farklı nPeptid/nVPAA oranlarında sentezlenen konjugatlarda kullanılan kimyasal miktarları

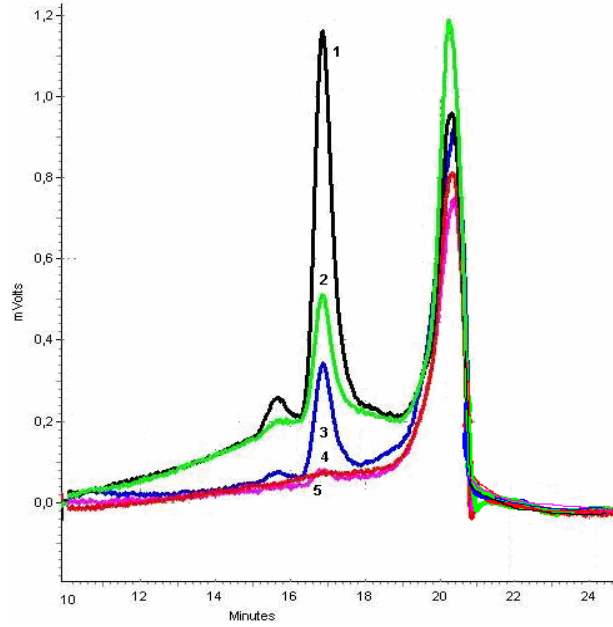
npeptid/nVPAA Oranı	Kullanılan Peptid Miktarı (mg)	Kullanılan DMSO Miktarı (µL)	Kullanılan Karbodiimid Miktarı (mg)	Toplam Reaksiyon Hacmi (mL)
1	0.058	58	5.12	5
3	0.175	175	5.35	5
5	0.291	291	5.58	5
7	0.4	400	5.8	5
9	0.525	252	6.05	5

6.2.1.4 Peptid- VP/AA (25:75) ve (50:50) Konjugatlarının Analizi

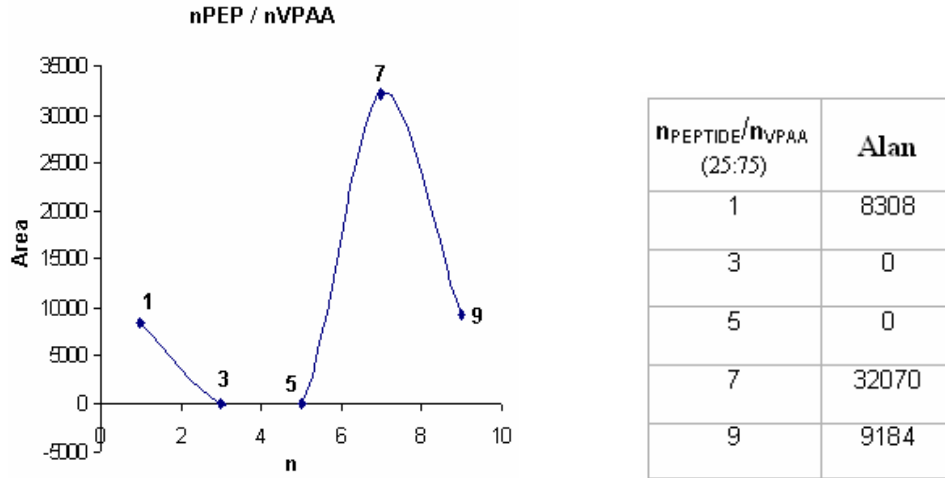
6.2.1.4.1 Peptid- VP/AA (25:75) ve (50:50) Konjugatlarının HPLC Sonuçları



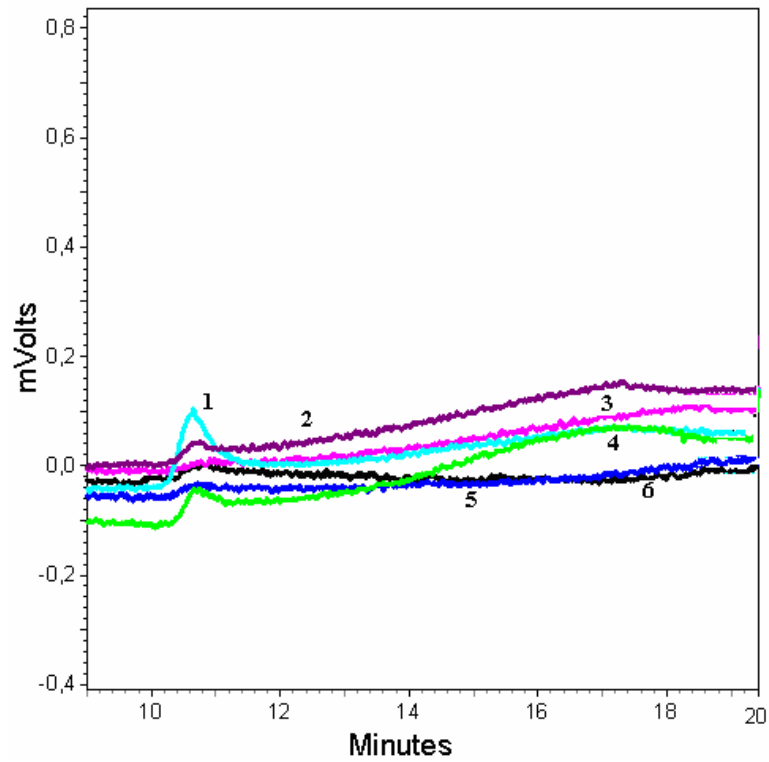
Şekil 6.27 0.5 mg/mL konsantrasyondaki VP/AA (25:75) kopolimerinin pH 7'deki HPLC kromatogramı.



Şekil 6.28 Hepatit B yüzey Antijen Peptidi 95-109 dizisi ile VP/AA (25:75)'in pH 7'deki farklı mol oranlarında (npeptide/nVPAA) sulu ortamda, sentezlenen konjugatlarının HPLC kromatogramları: 1(3), 3 (4), 5 (5), 7 (1), 9 (2).

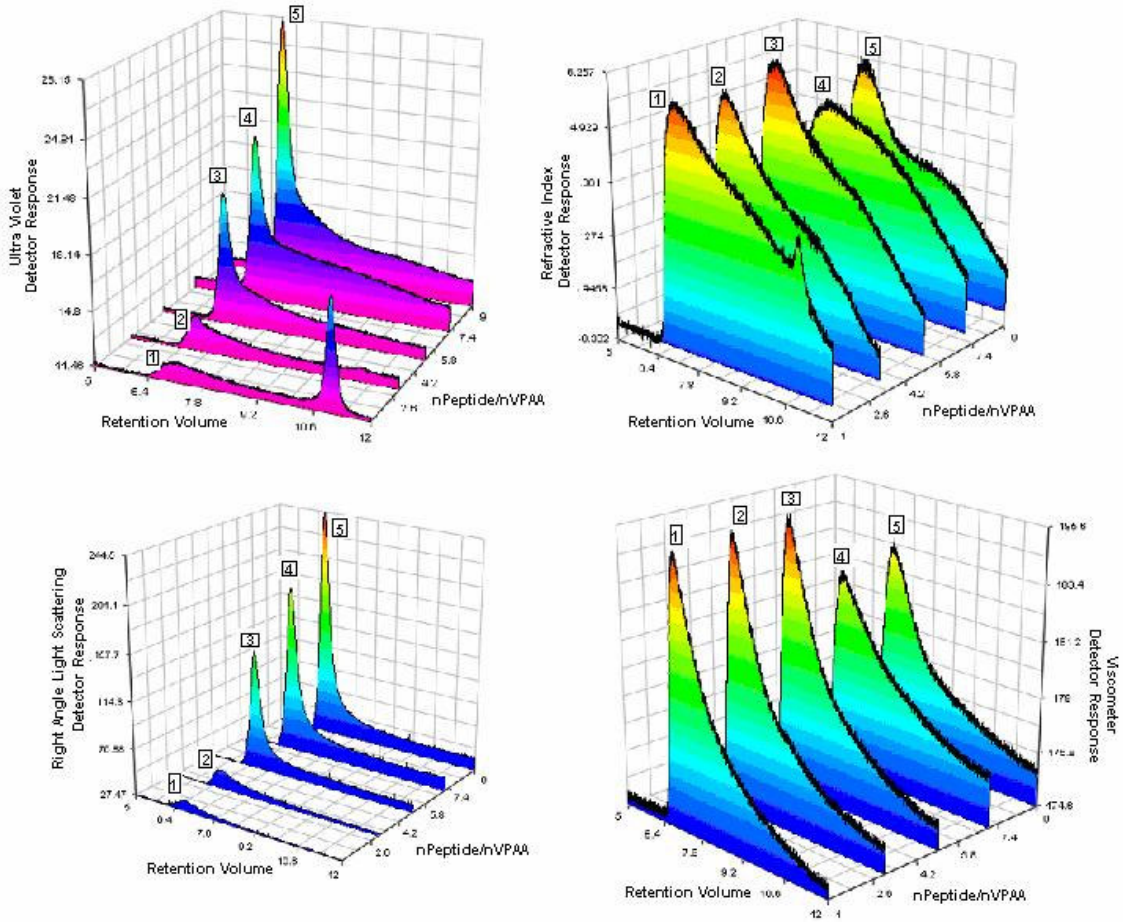


Şekil 6.29 Peptid/VPAA (25:75) konjugatlarının farklı molar oranlarında yapılan HPLC analizi sonucunda elde edilen piklerin alanlarının orana bağlı grafiği.



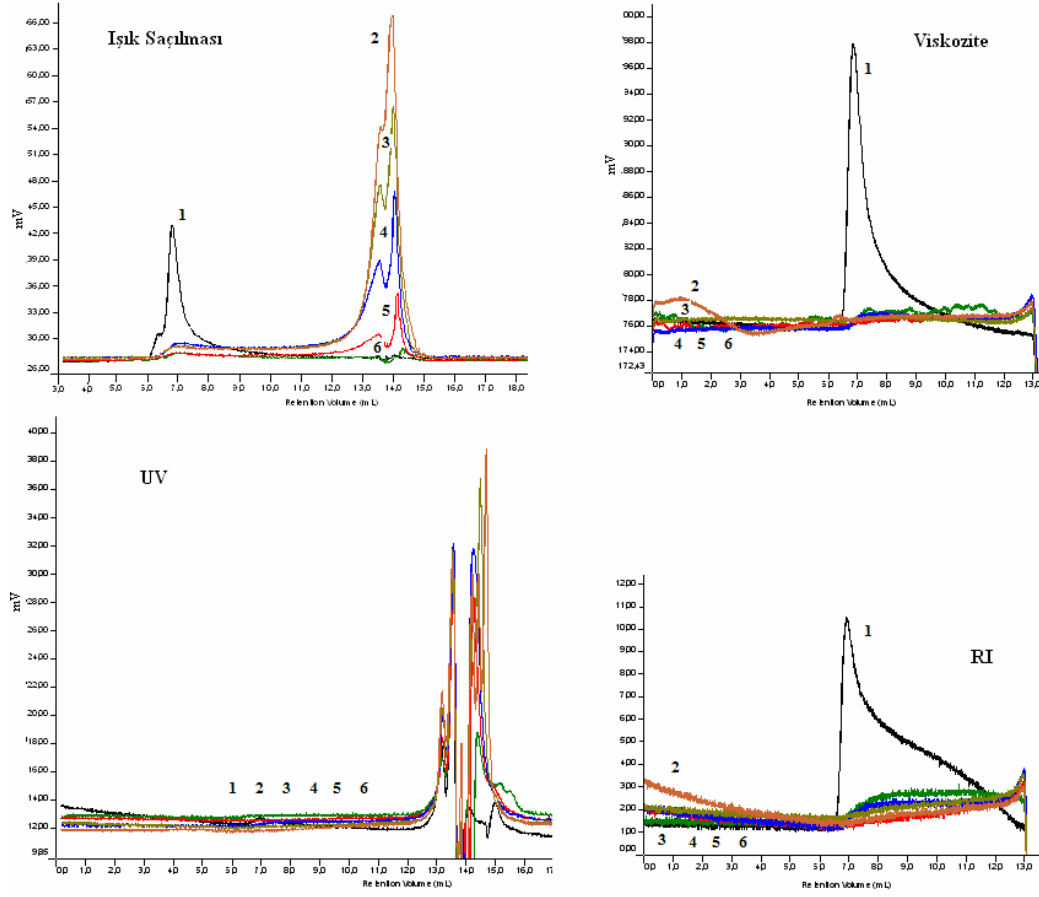
Şekil 6.30 Hepatit B yüzey Antijen Peptidi 95-109 dizisi ile VP/AA (50:50)'in pH 7'deki farklı mol oranlarında ($n_{\text{peptide}}/n_{\text{VPAA}}$) sulu ortamda, sentezlenen konjugatlarının HPLC kromatogramları. (1) $n=5$ (açık mavi), (2) $n=7$ (mor), (3) $n=3$ (pembe), (4) $n=9$ (fosforlu yeşil), (5) $n=1$ (mavi), (6) VPAA (50:50) kopolimeri (siyah).

6.2.1.4.2 Peptid- VP/AA (25:75) ve (50:50) Konjugatlarının Viscotek Sonuçları



Şekil 6.31 Hepatit B yüzey Antijen Peptidi 95-109 dizisi ile VP/AA (25:75) kopolimerinin pH 7'deki farklı mol oranlarında (npeptide/nVPAA) ve sulu ortamda sentezlenen konjugatlarının, Viscotek cihazı ile 4 farklı detektör kullanılarak yapılan analiz sonuçları:

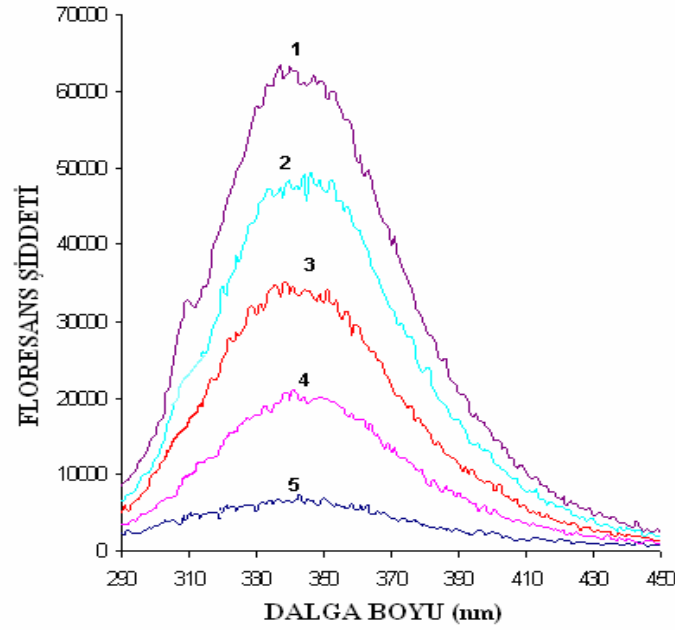
- (e) 1(5), 3 (4), 5 (3), 7 (2), 9 (1), UV (Ultra Violet detector) detektörü,
- (f) 1(5), 3 (4), 5 (3), 7 (2), 9 (1), Kırılma İndisi Detektörü (Refractive Index detector),
- (g) 1(2), 3 (3), 5 (1), 7 (5), 9 (4), Işık Saçılması detektörü (Right Angle Light Scattering detector),
- (h) 1(3), 3 (1), 5 (2), 7 (5), 9 (4), Vizkozite Detektörü (Viscometer detector) ile.



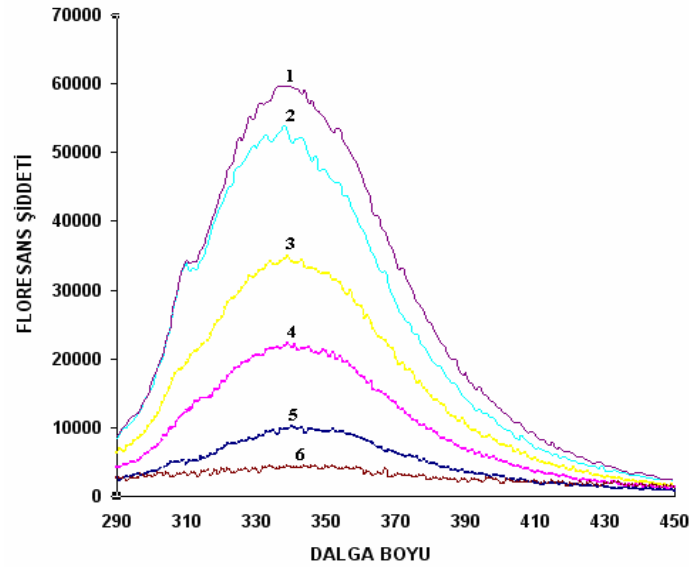
Şekil 6.32 VP/AA (50:50) kopolimerinin (1) ve Hepatit B yüzey Antijen Peptidi 95-109 dizisi ile konjugatlarının pH 7'deki farklı mol oranlarında (npeptide/nVPAA) ve sulu ortamda Viscotek cihazı ile 4 farklı detektör kullanılarak yapılan analiz sonuçları:

- (a) 1(6), 3 (5), 5 (4), 7 (3), 9 (2), kopolimer (1), Işık Saçılması detektörü (Right Angle Light Scattering detector),
- (b) 1(6), 3 (5), 5 (4), 7 (3), 9 (2), kopolimer (1), Viskozite Detektörü (Viscometer detector)
- (c) UV (Ultra Violet detector) detektörü,
- (d) Kırılma İndisi Detektörü (Refractive Index detector) ile.

6.2.1.4.3 Peptid- VP/AA (25:75) ve (50:50) Konjugatlarının Floresans Sonuçları



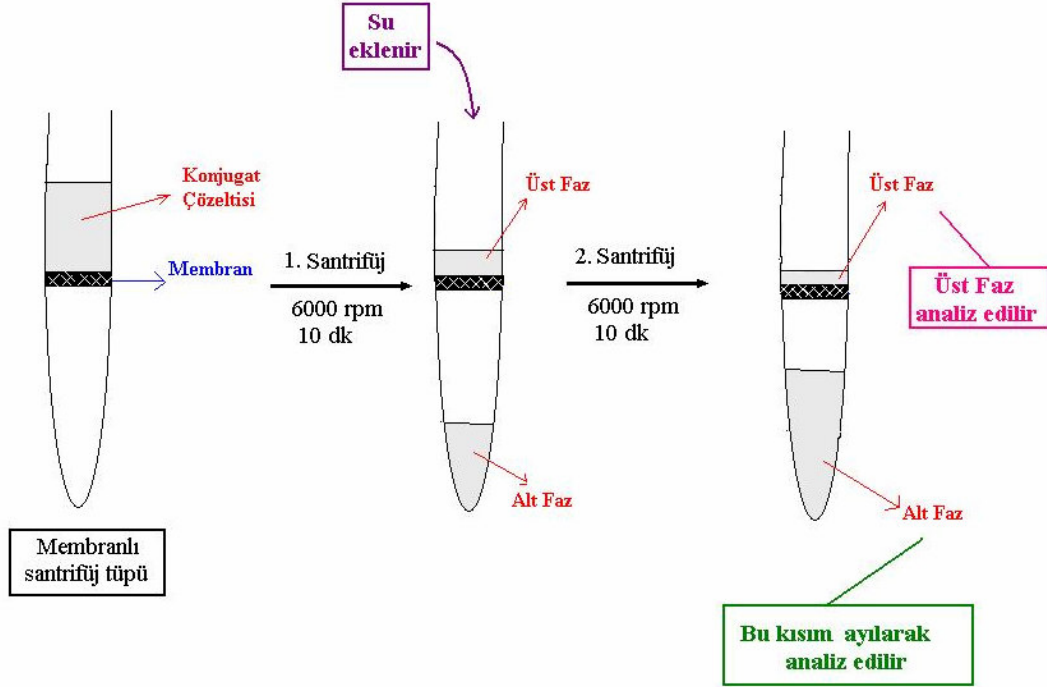
Şekil 6.33 Hepatit B yüzey Antijen Peptidi 95-109 dizisi ile VP/AA (25:75) kopolimerinin pH 7'deki farklı mol oranlarında (npeptide/nVPAA) ve sulu ortamda sentezlenen konjugatlarının, floresans spektrumları: 1(5), 3 (4), 5 (3), 7 (2), 9 (1).



Şekil 6.34 Hepatit B yüzey Antijen Peptidi 95-109 dizisi ile VP/AA (50:50) kopolimerinin pH 7'deki farklı mol oranlarında (npeptide/nVPAA) ve sulu ortamda sentezlenen konjugatlarının, floresans spektrumları: 1(5), 3 (4), 5 (3), 7 (2), 9 (1) ve VP/AA kopolimeri (6).

6.2.1.5 Konjugatların Saflaştırılması

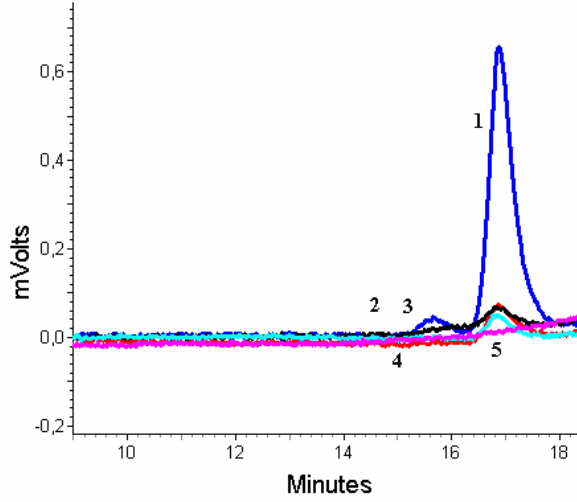
Sentezlenen konjugatlar, 10.000 M_w ayırma gücüne sahip polietersulfon (PES) membranlı tüpte (Sartorius VIVASPIN) +4 C°'de 6000 rpm devirde 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında elde edilen alt ve üst fazlar çeşitli spektroskopik metodlar yardımıyla analiz edilerek, reaksiyona girmemiş peptid ya da polimerin olup olmadığı araştırıldı.



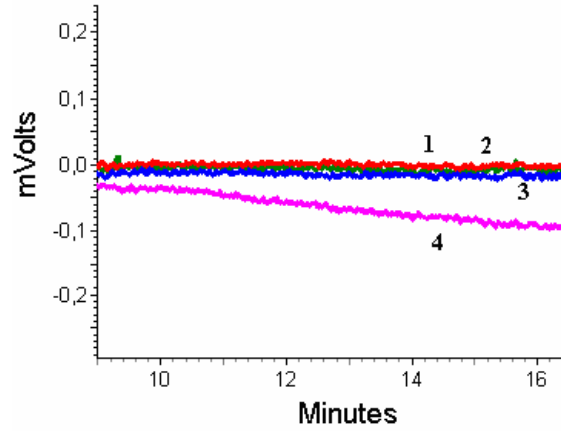
Şekil 6.35 Konjugatların PES membranlı tüpte saflaştırılmasının şematik gösterimi

6.2.1.5.1 Saflaştırma işlemine ait Analizler

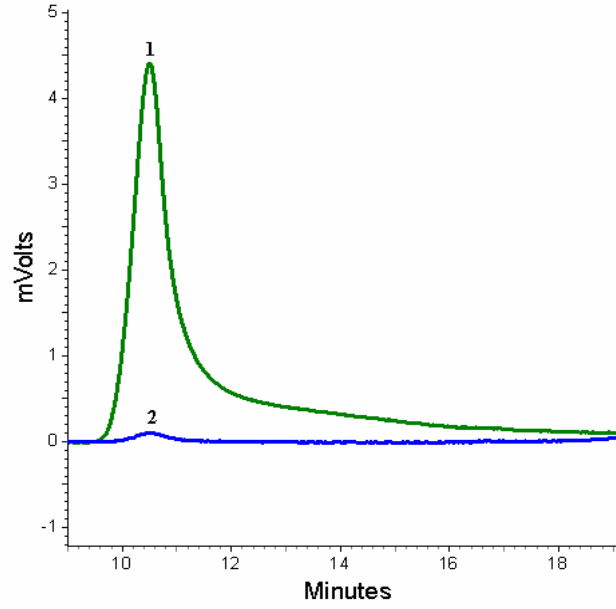
6.2.1.5.1.1 HPLC Analizleri



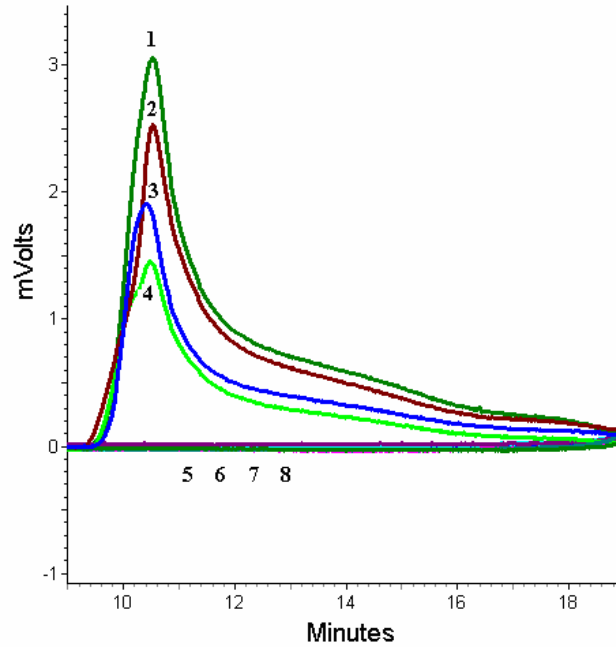
Şekil 6.36 Sulu ortamda sentezlenen VPAA 25:75 konjugatları 10000'lik membrandan santrifüj edildi. Üst fazların HPLC kromatogramları. (1) n=1 (k.mavi), (2) n=7 (açık mavi), (3) n=5 (siyah), (4) n=9 (pembe), (5) n=3 (kırmızı).



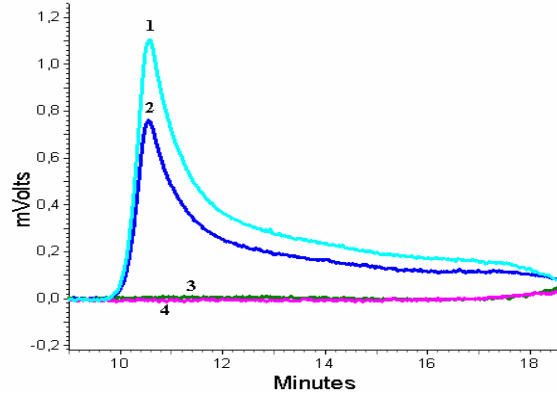
Şekil 6.37 Sulu ortamda sentezlenen VPAA 25:75 konjugatları 10000'lik membranda santrifüj edildi. Alt fazların HPLC kromatogramları. (1) n=7 (kırmızı), (2) n=1 (yeşil), (3) n=3 (mavi), (4) n=5 (pembe).



Şekil 6.38 PAA n=5 oranında sulu ortamda sentezlenen konjugatı 10000'lik membranda santrifüj edildi. (1) Üst faza ait (2) Alt fazın HPLC kromatogramları.

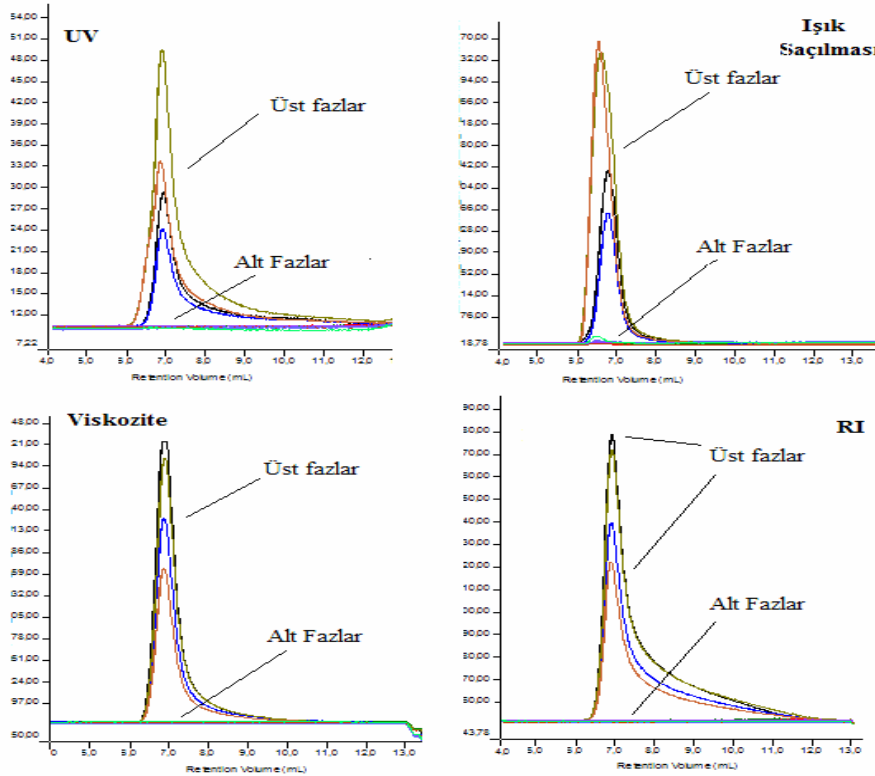


Şekil 6.39 Sulu ortamda sentezlenen PAA-Peptid n=3 oranındaki konjugat, 10000'lik membranda 4 kez santrifüj edildi. Her santrifüj sonrasında üst fazlar alınıp, çözücü ile yıkandı ve tekrar santrifüj edildi. Üst fazların (1, 2, 3, 4) ve alt fazların (5, 6, 7, 8) HPLC kromatogramları. (1) Sant. 4 üst faz, (2) Sant. 2 üst faz, (3) Sant. 1 üst faz, (4) Sant. 3 üst faz, (5, 6, 7, 8) Alt fazlar.



Şekil 6.40 Sulu ortamda PAA-Peptid ile sentezlenen $n=1$ oranındaki konjugat, 10000'lik membranda 2 kez santrifüj edildi. Her santrifüj sonrasında üst fazlar alınıp, çözücü ile yıkandı ve tekrar santrifüj edildi. Üst fazların (1, 2), ve alt fazların (3, 4) HPLC kromatogramları. (1) Sant. 2 üst faz, (2) Sant. 1 üst faz, (3) Sant. 1 alt faz, (4) Sant. 2 alt faz.

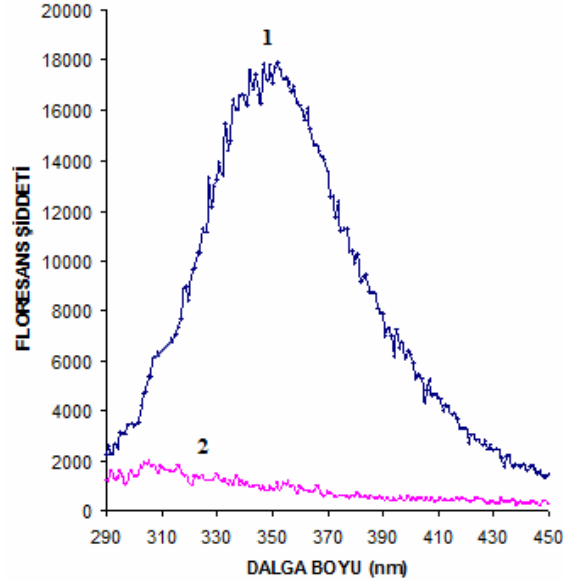
6.2.1.5.1.2 Viscotek Analizi



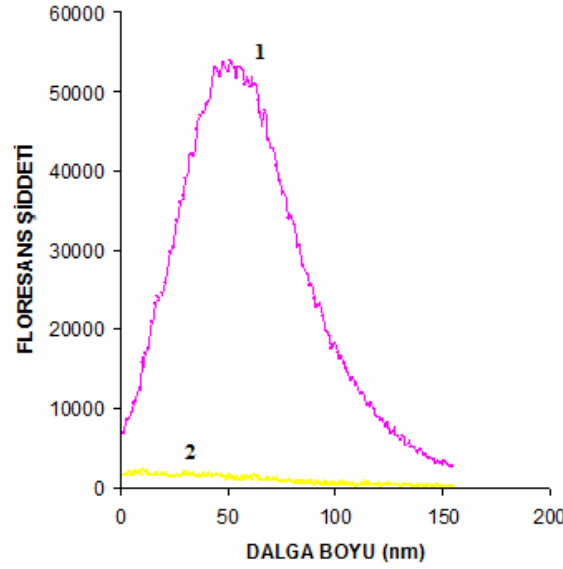
Şekil 6.41 Sulu ortamda sentezlenen PAA-Peptid konjugatlarından $n=1$ ve $n=3$ oranlarına ait konjugatların PES membranlı tüpte santrifüjü sonrasında konjugatların alt ve üst fazlarına ait

(a) RI detektör, (b) UV detektör (c) Işık Saçılması detektörü (d) Viskozite Detektörü ile yapılan Viscotek analizi

6.2.1.5.1.3 Floresans Analizi



Şekil 6.42 Sulu ortamda sentezlenen $n=1$ oranındaki PAA-Peptid konjugatı, 10.000'lik membranlı satrifüj tüpünde 6000 rpm'de 10 dk. Santrifüj edildi. Alt ve üst fazının floresans spektrumları alındı. (1) $n=1$ üst faz, (2) $n=1$ alt faz



Şekil 6.43 Sulu ortamda sentezlenen $n=3$ oranındaki PAA-Peptid konjugatı, 10.000'lik membranlı satrifüj tüpünde 6000 rpm'de 10 dk. Santrifüj edildi. Alt ve üst fazının floresans spektrumları alındı. (1) $n=3$ üst faz, (2) $n=3$ alt faz

6.2.2 Organik Ortamda Mikrodalga Yöntemiyle Yapılan Konjugat Sentezi

Sulu ortamda yapılan konjugatların verimlerinin düşük olması nedeniyle, susuz organik ortamda mikrodalga enerjisi yardımıyla, VPAA (25:75) kopolimeri ve HBsAg peptidi 95-109 dizisi kullanılarak, yeni bir konjugat sentezlendi. Konjugasyon, Liberty peptid sentez cihazının Discovery modülü içerisinde mikrodalga uygulanmasıyla gerçekleştirildi. Konjugatın sentezinde ana çözücü olarak DMF kullanılmıştır.

6.2.2.1 Hesaplamalar

6.2.2.1.1 Peptid Miktarı

Konjugasyon reaksiyonunda, VPAA (25:75) polimerinin içerdiği her 100 karboksil (-COOH) grubuna 8.67 tane amino grubu (-NH₂) bağlanacak şekilde hesaplama yapılır.

VPAA (25:75) için;

$$M_w(\text{PAA}) = 80.000 \text{ gr/mol}$$

$$M_w(\text{Akrilik asid}) = 72 \text{ gr/mol}$$

$$M_w(\text{Vinil prilidon}) = 107 \text{ gr/mol}$$

Öncelikle 1 mol VPAA'da bulunan monomer sayısı (MS) hesaplanır.

$$(72 \times 3MS) + (107 \times MS) = 80000 \longrightarrow MS = 247.6 \text{ bulunur.}$$

Buna göre, teorik olarak 1 mol VPAA (25:75) konjugatında,

247.6 tane VP monomeri, 743.3 tane de PAA monomeri bulunur. Her akrilik asid monomeri 1 tane karboksil (-COOH) grubu içerdiğinden, 1 mol PAA'de 743.3 tane -COOH grubu vardır.

Polimer konsantrasyonu 1mg/mL olarak alındığında, her karboksil grubuna 9 tane amino bağlanması için;

$$743.3 \times (9/100) = 66.87$$

$$66.87 = \frac{C_{\text{pep}}}{1861.6} \times \frac{80000}{1} \longrightarrow C_{\text{pep}} = 1.5 \text{ mg/mL}$$

olarak hesaplanır.

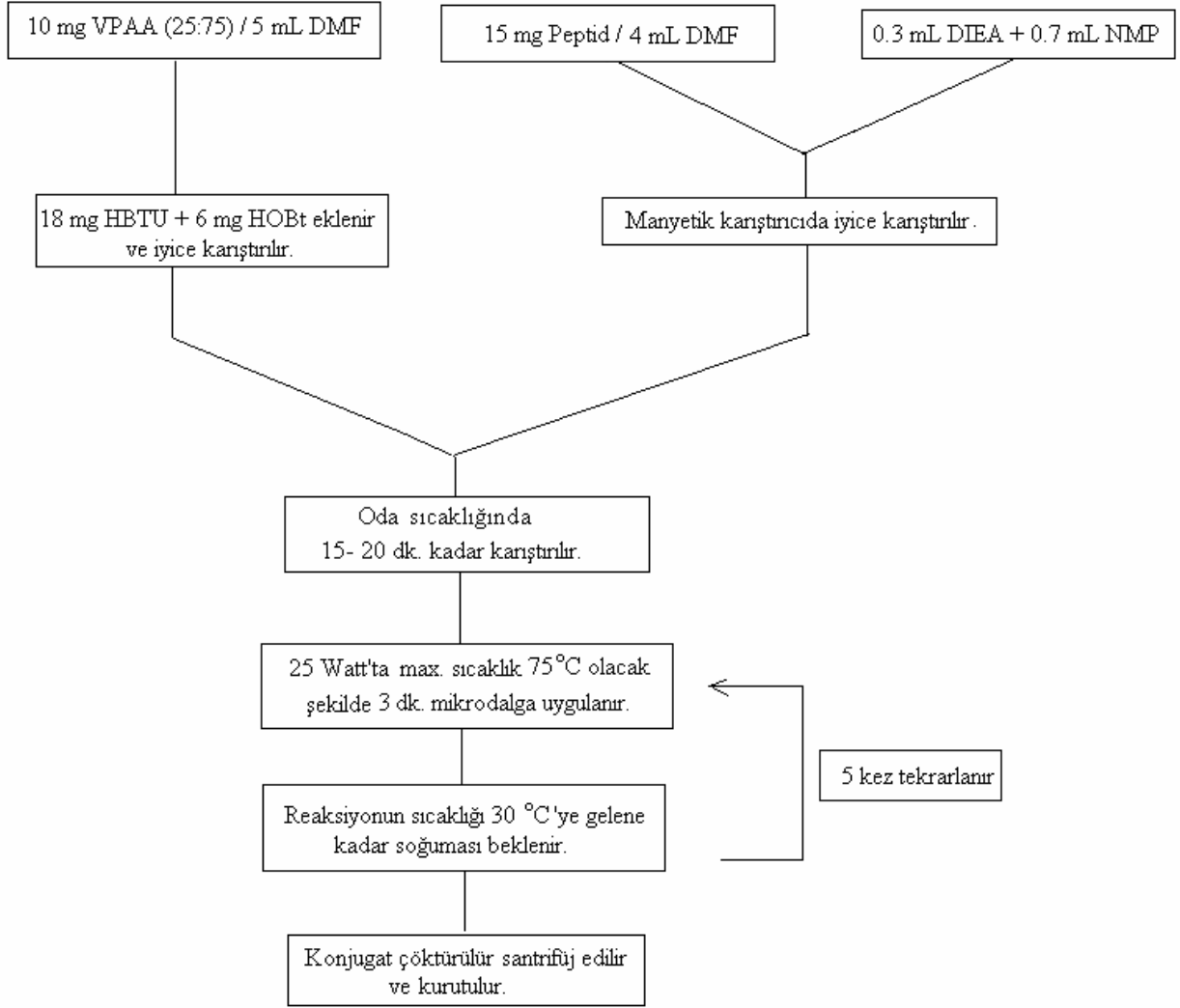
Toplam reaksiyon hacmi, 10 mL olduğundan, konjugasyon için 15 mg peptid 10 mg polimer kullanılır.

6.2.2.1.2 Aktivatör Miktarı ve Diğer Hesaplamalar

Reaksiyon için gerekli aktivatör (HBTU/HOBt) ve aktivatör baz (DIEA/NMP) miktarları Liberty peptid sentez cihazının bilgisayar programına reaksiyon koşullarına ait veriler girilerek hesaplatıldı.

6.2.2.2 Peptid-VPAA (25:75) Konjugatının Sentezlenmesi

10 mg VPAA (25/75; Mw=80.000) kopolimeri dibi yuvarlak bir balona konuldu ve üzerine 5 mL dimetilformamid (DMF) eklenerek manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Polimerin karboksil gruplarının aktivasyonu, 1 mL DMF içinde çözölen 18 mg *N,N,N',N'*-Tetrametil-*O*-(1*H*-benzotriazol-1-il)uranyum hekzaflorofosfat ($C_{11}H_{16}F_6N_5OP$) (Mw 379.24) (HBTU) ve 6 mg 1-Hydroxybenzotriazole hydrate ($C_6H_5N_3O \cdot xH_2O$) (135.12 anhydrous basis) (HOBt) bu polimer çözöltisine eklenerek yapıldı. HBsAg 95-109 peptid dizisinden 15 mg tartılarak 4 mL DMF'te çözöldü. 0.3 mL DIEA ve 0.7 mL NMP baz çözöltisi peptid üzerine eklendi. Peptid çözöltisi polimer çözöltisi üzerine eklendi ve manyetik karıştırıcı aracılığıyla karıştırıldı. 25 watt, 26-75 C° sıcaklık arasında 3 dakika süre aralıklarla Liberty peptid sentez cihazının Discovery modülü içerisinde, yaklaşık 5 kez mikrodalga işlemine maruz tutuldu. Örnek çözölti, 50 mL'lik falkon tüp içerisine alındı ve üzerine 35 mL soğuk (-20 C°) etil asetat eklenerek çöktüröldü. Çökeltili -6 C°'de 5000 rpm'de 5 dakika santrifuj edildi. Üst faz, bağlanmamış peptid olup olmadığını anlamak üzere floresans cihazı ile analiz edildi. Çöktürölen konjugat, kurutuldu ve tartımı alındı.



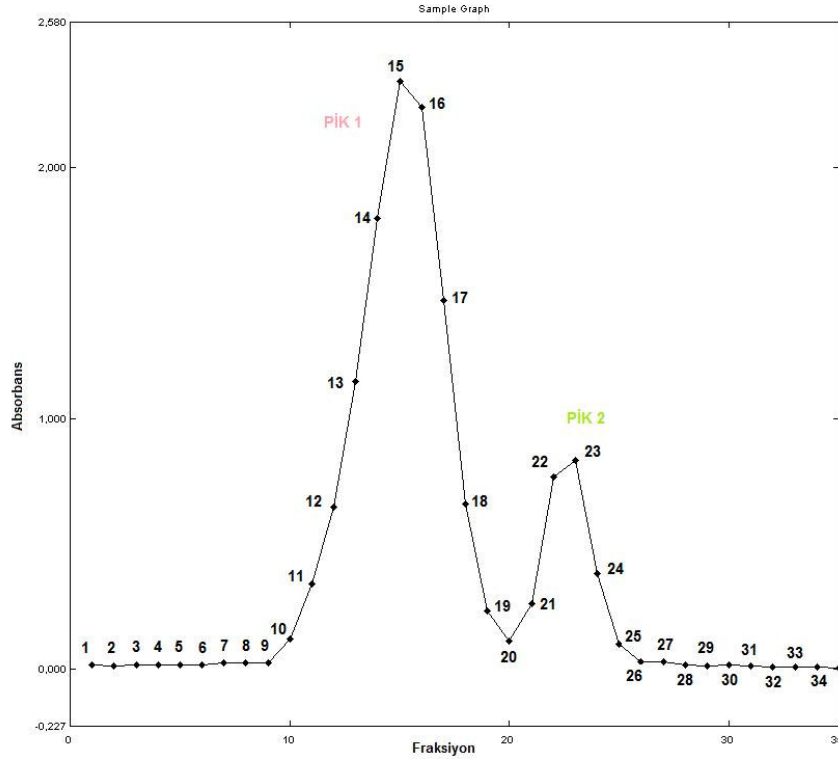
Şekil 6.44 Organik ortamda mikrodalga destekli olarak yapılan konjugat sentezinin akış şeması

6.2.2.3 Konjugatın Saflaştırılması

Konjugatlar sentezlendikten ve çöktürüldükten sonra, cihazlarda analiz edilmeden önce reaksiyona girmemiş maddelerden veya reaksiyonda oluşabilecek yan ürünlerden ayrılması yani saflaştırılması amacıyla, fosfat pH=7 (PBS) tamponunda çözülür ve Toyopearl kolon dolgu maddesi olan kolonda saflaştırıldı. Elde edilen fraksiyonların UV spektrofotometrede 280 nm’de spektrumu alındı. Spektrumdaki uygun fraksiyonlar (Pik 1 ve Pik 2) toplandı ve 10.000 M_w ayırma gücüne sahip polietersulfon (PES) membranlı tüpte (Sartorius VIVASPIN) +4 C°’de 6000 rpm devirde 10 dakika santrifüj edildi. Her iki pike ait üst fazlar, ayrı ayrı birleştirildikten sonra, tuzdan arındırma işlemi uygulandı ve liyafil kurutuldu. Bu

fraksiyonlar daha sonra, PBS pH=7 tamponunda çözülerek, kromatografik Viskotek [Dört Dedektörlü-UV, Refraktif İndeks, Viskozite ve ışık saçılması, kromatografik sistem]), spektroskopik, florimetrik yöntemlerle incelendi.

6.2.2.4 Konjugatın Karakterizasyonu

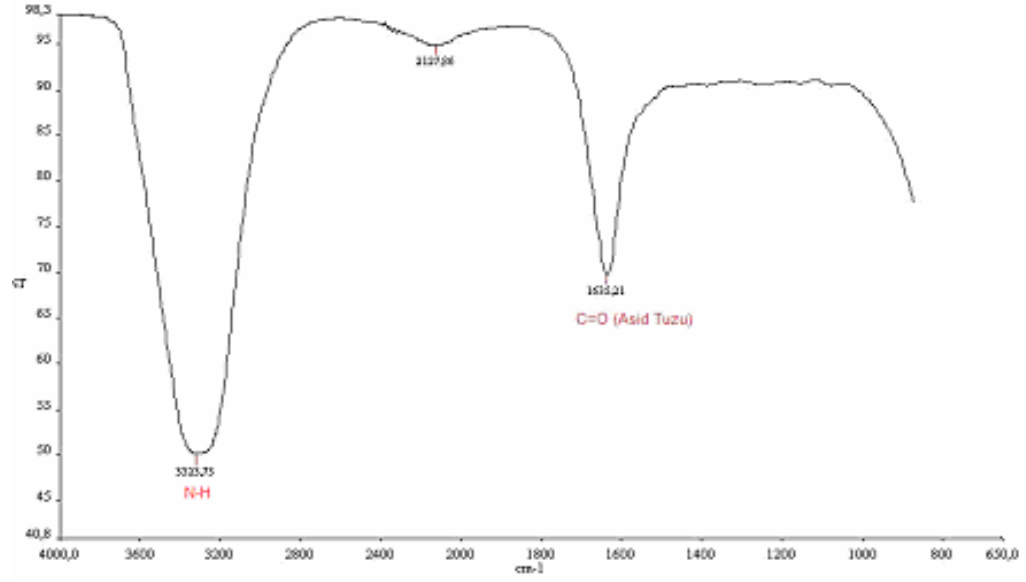


Şekil 6.45 14.7 mg/mL konsantrasyondaki konjugatın, Toyopearl dolgu maddesiyle doldurulmuş kolonda saflaştırıldıktan sonra UV spektrofotometrede 280 nm'de yapılan analizine ait spektrumu.

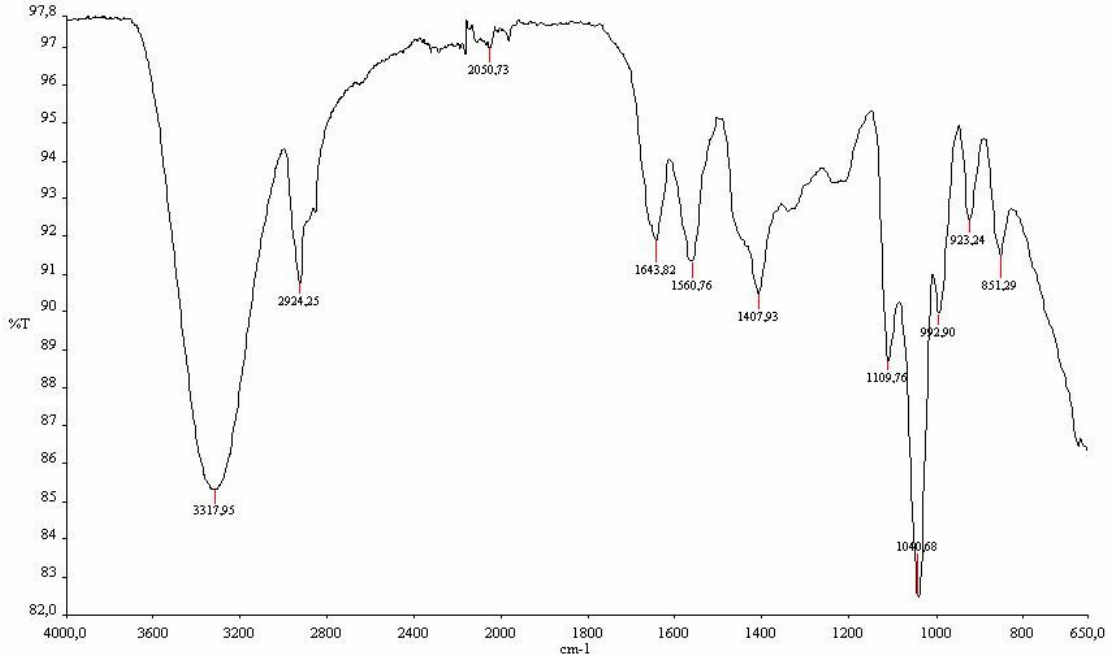
Spektrumda görülen iki pik, ayrı ayrı toplanarak birleştirildi. Daha konsantre edilmek üzere PES membranlı tüpte santrifüj edildi. Üst fazlar Pik 1 Üst ve Pik 2 Üst olarak birleştirildikten sonra, liyafil olarak kurutuldu. Toz halinde alınan bu iki örnek, daha sonra PBS pH=7 tamponunda çözülerek, HPLC, Viscotek ve Floresans spektrofotometre cihazlarında analiz edildi.

Santrifüj sonrasında elde edilen alt fazlar (PİK 1 /Alt faz ve Pik 2 Alt Faz) da aynı şekilde analiz edilmiştir.

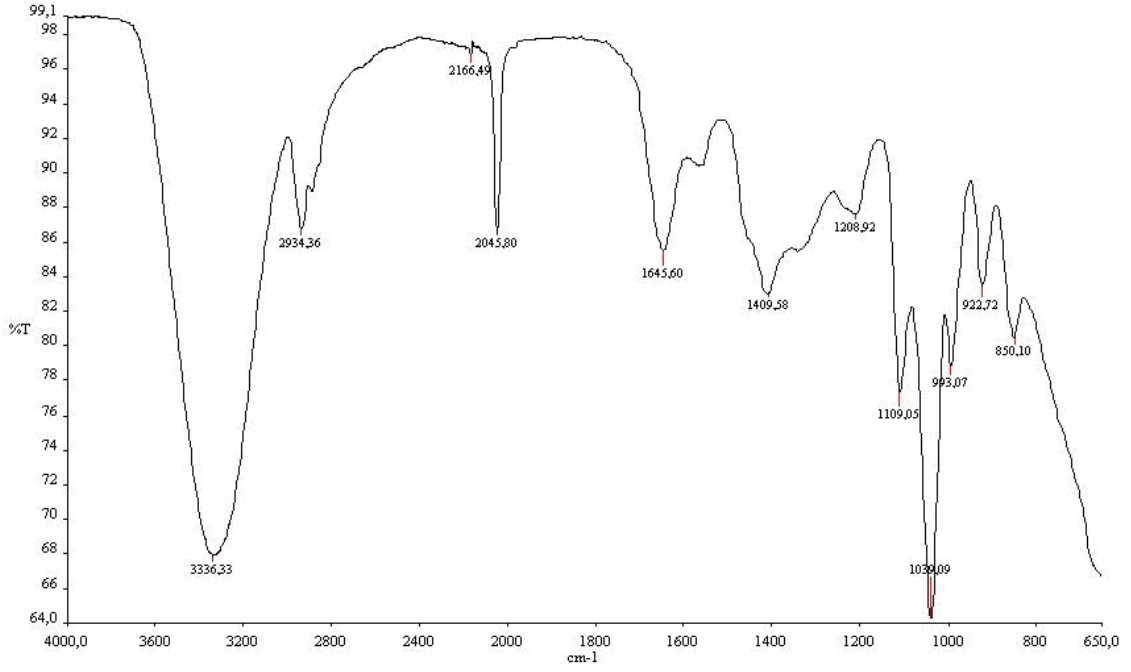
6.2.2.4.1 FTIR Analizi



Şekil 6.46 Organik ortamda mikrodalga yöntemi ile sentezlenen Peptid-VPAA (25:75) konjugatının (ZB 34) FTIR analizi

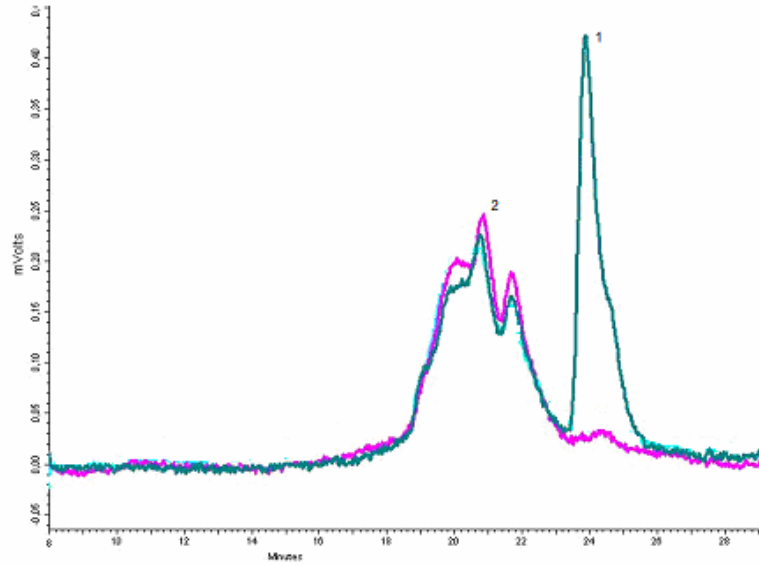


Şekil 6.47 ZB 34 konjugatı saflaştırıldıktan sonra elde edilen fraksiyonlardan PİK 1'in FTIR analizi



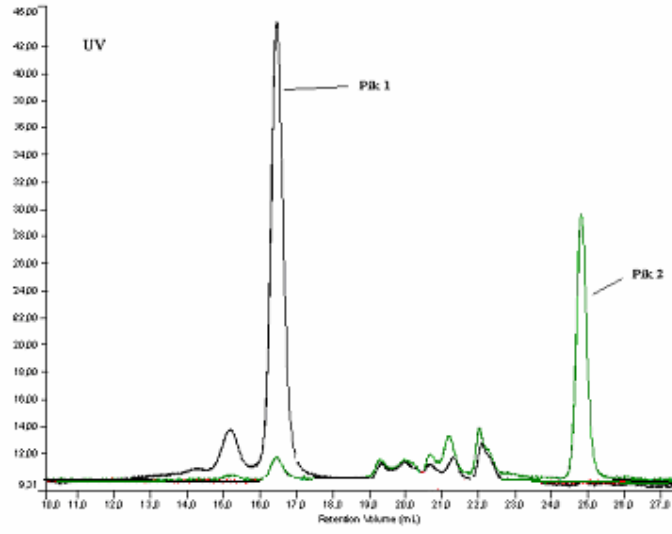
Şekil 6.48. ZB 34 konjugatına ait PİK 2 fraksiyonunun IR analizi

6.2.2.4.2 HPLC Analizi

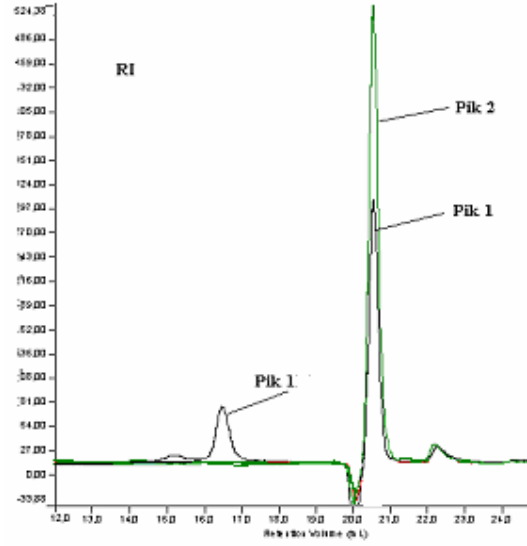


Şekil 6.49 Pik 1 (2) ve Pik 2 (1)' nin HPLC cihazı ile analizine ait kromatogram.

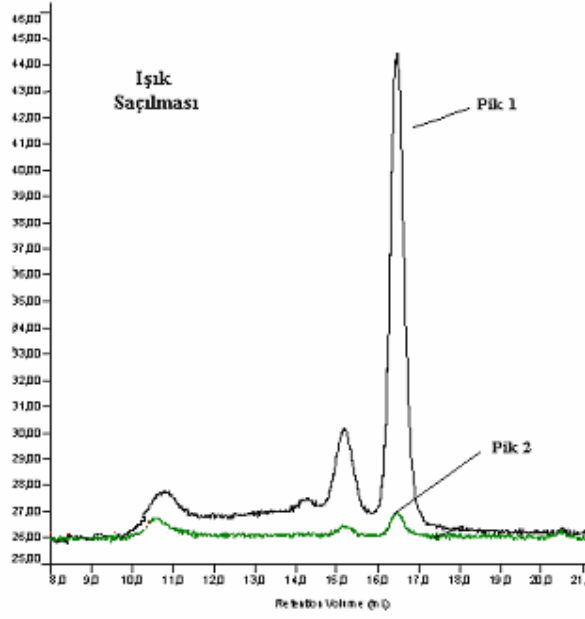
6.2.2.4.3 Viscotek Analizi



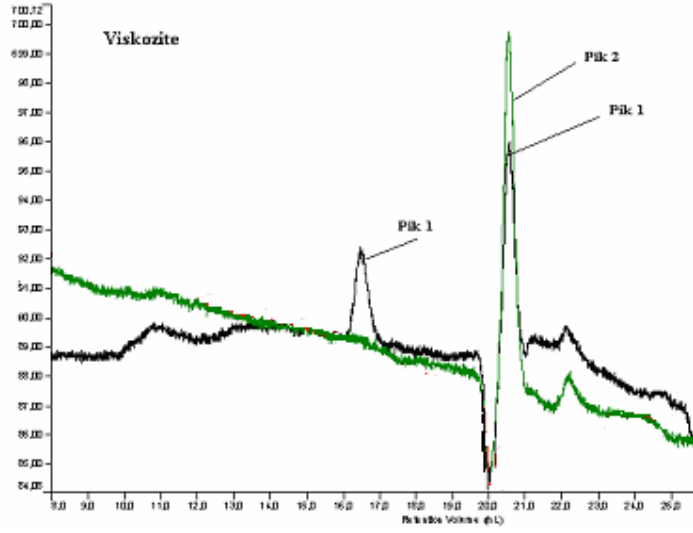
Şekil 6.50 PİK 1K (— siyah) ve PİK 2 (— yeşil)’ nin 4 detektörlü Viscotek cihazının UV detektörü ile analizine ait kromatogram.



Şekil 6.51 PİK 1 (— siyah) ve PİK 2 (— yeşil)’ nin 4 detektörlü Viscotek cihazının Kırılma İndisi (RI) detektörü ile analizine ait kromatogram.

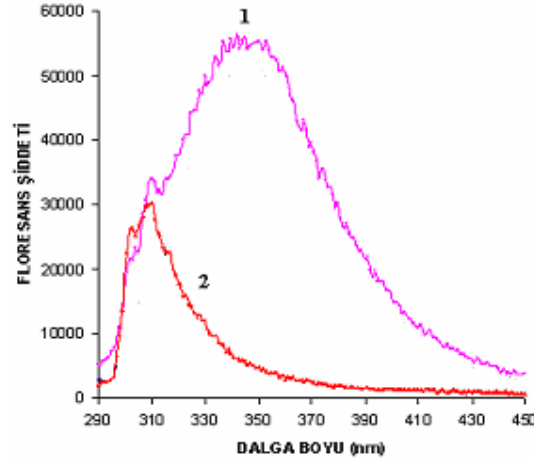


Şekil 6.52 PİK 1 (— siyah) ve PİK 2 (— yeşil)' nin 4 detektörlü Viscotek cihazının Işık Saçılması (RALS) detektörü ile analizine ait kromatogram.



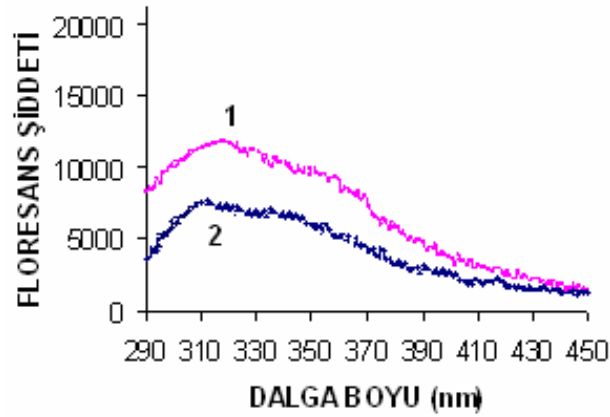
Şekil 6.53 PİK 1 (— siyah) ve PİK 2 (— yeşil)' nin 4 detektörlü Viscotek cihazının Viskozite detektörü ile analizine ait kromatogram.

6.2.2.4.4 Floresans Spektrofotometre analizi



Şekil 6.54 Saflaştırılan konjugata ait, Pik 1 ve Pik 2 fraksiyonlarının floresans spektrumları.
(1) Pik 1, (2) Pik 2.

Organik ortamda sentezlenen konjugat, kolonda fraksiyonlarına ayrılarak, PES membranlı santrifüj tüpünde santrifüjlendikten sonra, her iki pikten elde edilen alt fazlarda konjugat ya da peptid olup olmadığının anlaşılması amacıyla Floresans spektrofotometre cihazında analiz edilmiştir.



Şekil 6.55 Pik 1 ve Pik 2'nin santrifüjü sonrasında alt fazlara ait floresans spektrumu

7. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

7.1 Peptidin Sentezlenmesi ve Analizi

Hepatit B virüsü bizim ülkemizde ve bütün dünyadaki en önemli sorunlardan ve tehlikelerden biridir. Bu durum bizi, Hepatit B virüsüne karşı yeni bir savunma yöntemi geliştirme ihtiyacına yönlendirdi.

Tez çalışmamızda, yeni bir sentetik aşı geliştirmeye yönelik, Hepatit B virüsüne ait yüzey antijeni peptidi (HBsAg) epitoplarından 95-109 amino asid dizisinin sentezi yapılmıştır. Bu peptidin sentetik polianyonlar ile farklı yöntemler (Sulu ortamda ve organik ortamda mikrodalga destekli) kullanılarak sentezlenen biyokonjugatlarının fizikokimyasal özellikleri incelenmiştir.

Bu peptidin sentezi, Merrifield tarafından geliştirilen Katı Faz Peptid Sentezi (SPPS) yöntemi ile Liberty Mikrodalga Peptid Sentezi Cihazında (CEM), Fmoc kimyası kullanılarak yapılmıştır. Literatürde bulunmayan yeni bir yaklaşımla, ilk kez Hepatit B yüzey antijen epitoplarından 95-109 amino asid dizisinin amino ucuna Triptofan amino asidi eklenmiştir.

Peptid sentezi; Fmoc-Leu-Wang Rezin LL polimerik desteği üzerinde, fonksiyonel yan zincire sahip olan amino asidlerin yan zincirleri, uygun koruma grupları ile, α -amino grupları ise, Fmoc grubu ile korunmuş amino asidler kullanılarak yapılmıştır. Böylelikle meydana gelebilecek olası yan reaksiyonların engellenmesi sağlanmıştır.

Peptid sentezi tamamlandıktan sonra, peptidin rezinden ayrılmasını sağlamak üzere Kırılma (cleavage) işlemi uygulanmıştır. Kırılma işleminin ana reaktifi TFA'dır. TFA oldukça kuvvetli bir asidir ve bu nedenle kırılma sırasında oluşacak oldukça reaktif maddeler, özellikle yan zincirinde fonksiyonel grup taşıyan amino asidler için bir risk taşımaktadır. Oluşan bu reaktif maddelerin baskılanması ve amino asidlere olabilecek etkilerinin azaltılması amacıyla, kırılma kokteyline bir takım baskılayıcı kimyasallar (Scavengers) eklenmiştir. Bu işlem için detaylı bir literatür çalışması yapıldıktan sonra, kırılma kokteylinin kompozisyonu aşağıdaki şekilde belirlenmiştir:

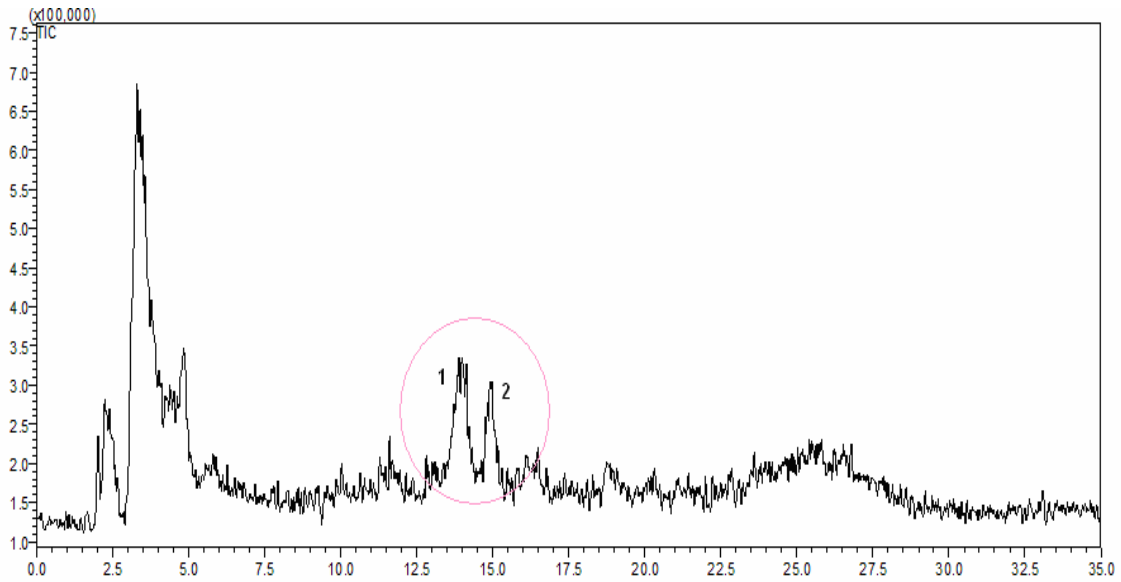
TFA: EDT: Su: Tiyoanisol (v:v), 94: 2.5: 2.5 :1

Kırılma işleminden sonra, sentezlenen peptid katı destekten ayrılarak çözelti fazına geçmektedir. Bu nedenle, bu çözelti süzülerek katı ve sıvı fazlar birbirinden ayrılmıştır. peptidin bulunduğu çözelti, özellikle TFA'nın uzaklaştırılması amacıyla Rotary Evaporatörde evapore edilmiş, kalan çözelti birkaç kısma ayrılarak soğuk eter (-20°C) ile çöktürülerek santrifüj edilmiştir. Çökeltide bulunan peptid kurutulduktan sonra tartımı alınmış ve verim hesaplaması yapılmıştır. Sentezlenen peptidin verimine ait bilgiler Çizelge 7'de verilmiştir:

Çizelge 7. Sentezlenen peptidin verimi

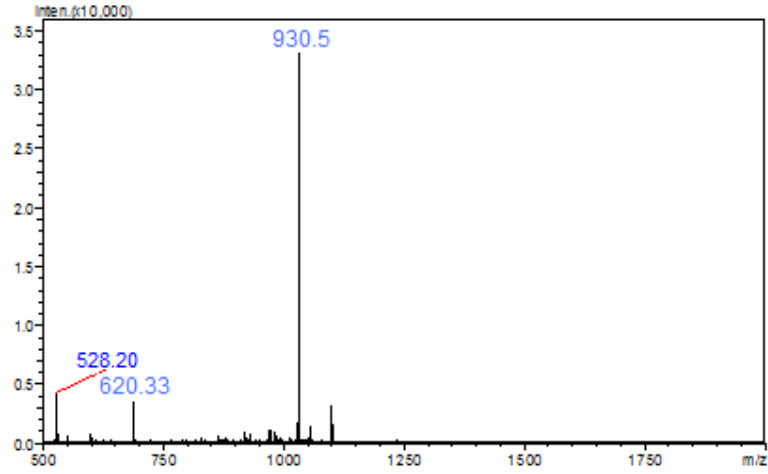
Teorik Verim	Pratik Verim
0.186 g	0.110 g

Sentez sonunda 110 mg peptid tartılmıştır. Sentezlenen peptidin karakterizasyonu, çeşitli kromatografik yöntemle (LC-MS, FTIR gibi) ve yapısındaki Trp amino asidi sayesinde floresans spektrofotometrede yapılmış, ticari olarak satın alınan aynı peptid (Trp içeren) ile kıyaslaması yapılmıştır. Bu analizlere ait deney sonuçları aşağıda verilmiştir:



Şekil 7.1 Sentezlenen HBsAg peptid 95-109 dizisinin LC-MS cihazında yapılan analizine ait spektrumu.

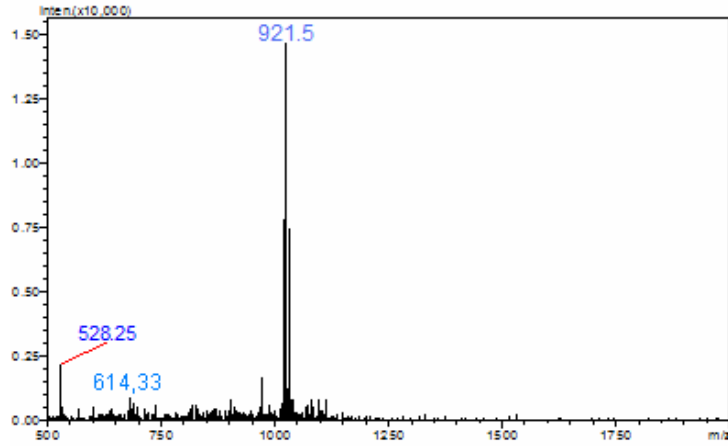
Peptidin LC-MS cihazında yapılan analizi sonucunda, spektrumda iki pik görülmüştür. Bu piklerin hangi moleküllere ait oldukları, aşağıdaki kütle spektrumlarında görülmektedir.



Şekil 7.2 Sentezlenen peptidin kütle spektrumundaki 1 numaralı Pike ait kütle analizi

(Ret. Time : 13.467 -> 14.425 $(M+2H)^{2+}=930,5$ $(M+3H)^{3+}=620,33$)

Birinci pike ait bu spektrumda, iki kez ve üç kez iyonlaşmış olan peptid molekülü açıkça görülmektedir. Spektrumdaki değerler iyonlaşma dereceleriyle çarpıldığında peptidin molekül kütesini vermektedir.



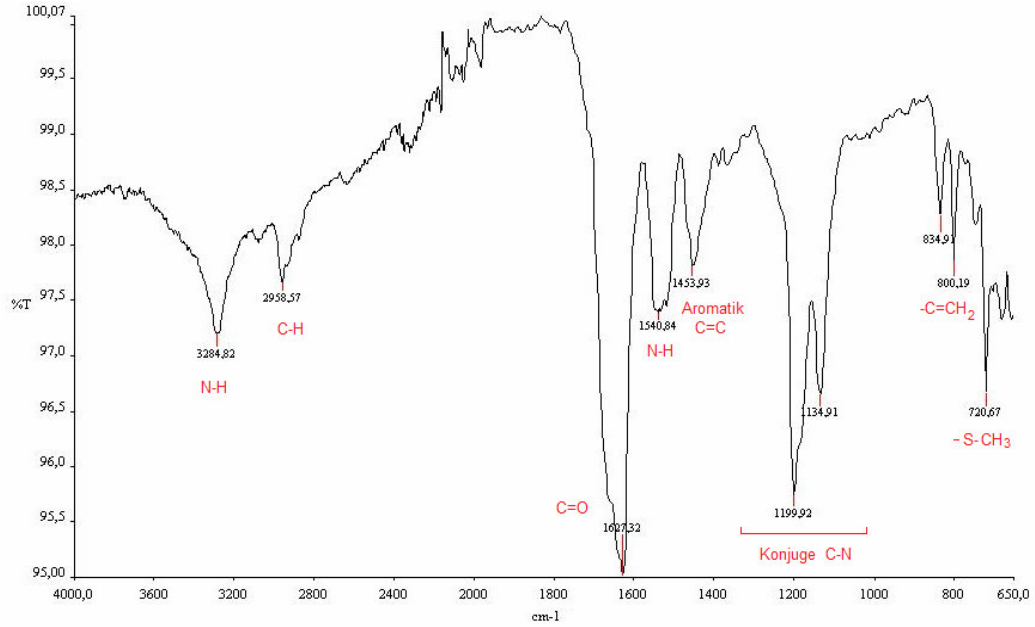
Şekil 7.3 Sentezlenen peptidin kütle spektrumundaki 2 numaralı Pike ait kütle analizi

(Ret. Time : 14.542 -> 15.263 $(M+2H)^{2+}=921,5$ $(M+3H)^{3+}=614,33$)

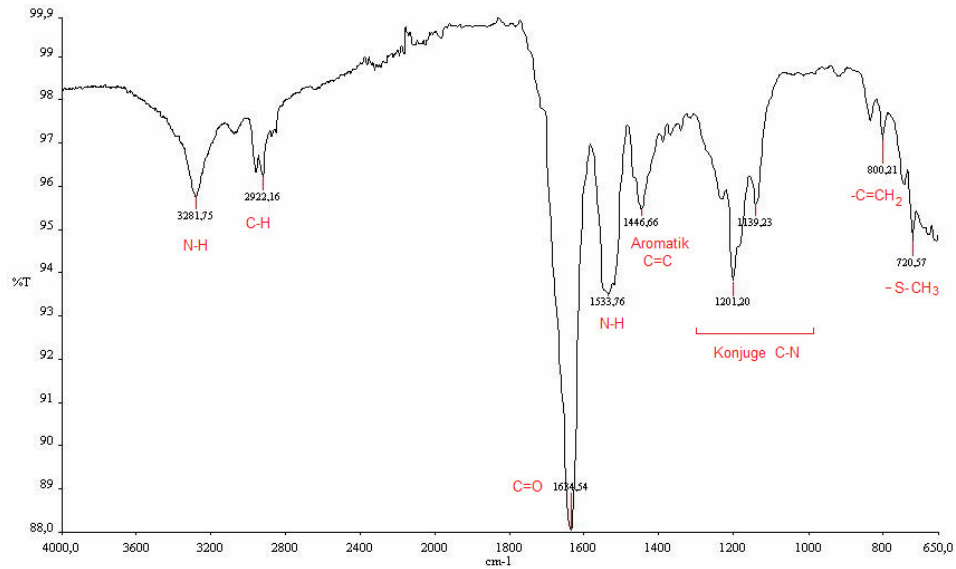
İkinci pike ait bu spektrumda da, iki kez ve üç kez iyonlaşmış olan peptid molekülü görülmektedir. Ancak bu spektrumlardaki değerler iyonlaşma dereceleriyle çarpıldığında, peptidin molekül ağırlığı değil, peptid molekülünden bir molekül suyun ayrıldığı değerleri

verdiği görülmektedir. Peptid molekülünden 1 molekül suyun ayrılmasının kırılma basamağında karşılaşılan durumlardan biri olduğu bilinmektedir.

Sentezlenen peptidin yapısı, ticari olarak satın aynı peptid ile karşılaştırılmıştır.



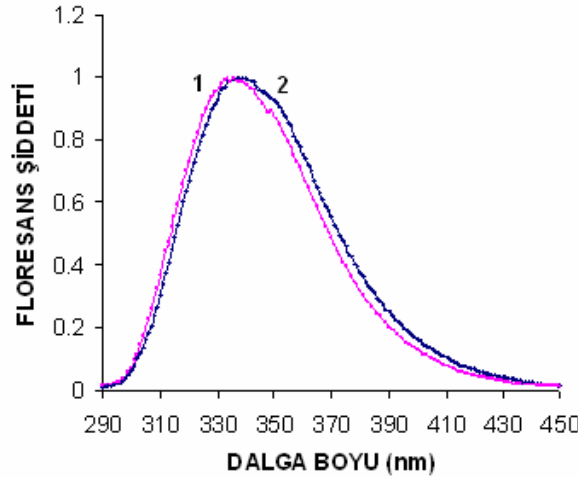
Şekil 7.4 Sentezlenen Hepatit B 95-109 peptid dizisine ait IR analizi



Şekil 7.5 Ticari olarak satın alınan Hepatit B yüzey antijeni 95-109 peptid dizisine ait FTIR spektrumu

Hem ticari olarak satın alınan peptid dizisi, hem de sentezlediğimiz peptid dizisinin FTIR analizi sonuçlarından da görüldüğü gibi, her iki peptidin FTIR spektrumları üst üste çakışmaktadır. Bu da bize peptidin doğru olarak sentezlenmiş olduğu ile ilgili önemli bilgiler vermektedir.

Bu iki peptidin florometrik yöntemle incelendiği sonuçlar da benzerlik göstermektedir:



Şekil 7.6 Ticari olarak satın alınan (1) ve sentezlenen (2) Hepatit B 95-109 peptid dizisinin floresans spektrumu

7.2 Polimer-Peptid Biyokonjugatları ve Yapı Analizi

Tez çalışmamızda, yüksek immünejenikliğe sahip peptid konjugatlarını elde etmek için yeni bir yaklaşım olarak; antijenik peptid molekülünün konjugasyonunda taşıyıcı olarak kendiliğinden adjuvant etkisine sahip olan sentetik polianyonlar kullanılmıştır.

Sentezlenen, hidrofobik özellikli ve tek bir amin grubu içeren HBsAg'nin 95-109 peptidinin karakterizasyonu ve yapısının aydınlatılmasından sonra, sentetik polianyonlar ile yapılan konjugasyon reaksiyonları fizikokimyasal olarak incelenmiştir.

Peptidin biyopolimerlerle oluşturdukları biyokonjugatlar, iki farklı yöntem (Sulu ortamda ve mikrodalga destekli organik ortamda) kullanılarak sentezlenmiştir.

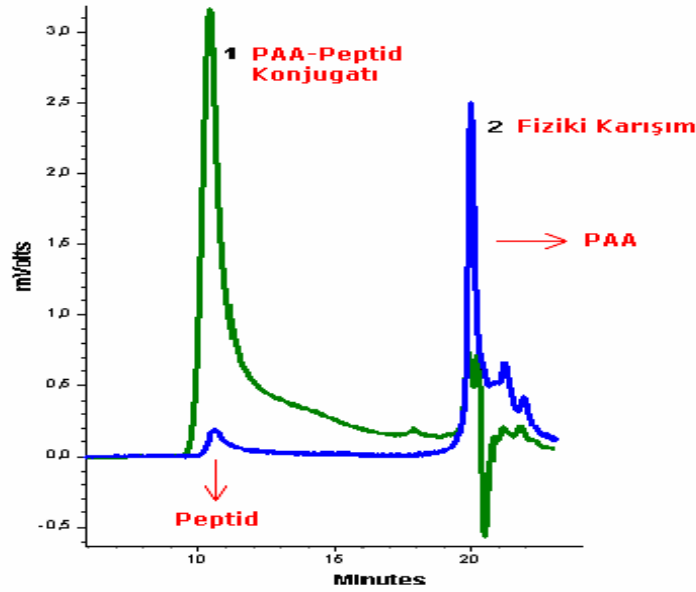
Sulu ortamda yapılan biyokonjugasyonlarda, farklı başlangıç mol oranları ($n_{\text{Peptid}}/n_{\text{Polimer}} = 1, 3, 5, 7, 9$) ve farklı aktivasyon mekanizmaları kullanılarak, biyokonjugatların fizikokimyasal davranışları incelenmiştir.

Bunlara ek olarak, susuz organik ortamda, mikrodalga destekli yöntemle sentezlenen polimer-

peptid konjugatı da, yeni bir yöntem olarak incelenmiştir. Sentezlenen biyokonjugatların yapı ve karakterizasyonunu HPLC, VISCOTEK [Dört Detektörlü-UV, Refraktif Indeks, Viskozite ve Isık Saçılması, kromatografik Sistem] ve FTIR gibi spektroskopik ve flourimetrik (Floresans Spektrofotometre cihazı ile) yöntemlerle incelenmiştir.

Genel olarak bütün konjugasyon reaksiyonlarında, konjugasyonun fizikokimyasının ve bağlanmanın ne derecede gerçekleştiğinin anlaşılabilmesi amacıyla polimer konsantrasyonunu sabit tutularak, peptid konsantrasyonu değiştirilmiştir.

Sulu ortamda sentezlenen biyokonjugatlarda, polimer molekülünü aktive etmek için karbodiimidlerden yararlanılmıştır. Sentezlenen konjugatın analizinde, reaksiyon mekanizması hakkında daha fazla bilgi edinmek amacı ile kabodimid olmaksızın oluşturulan fiziksel karışım ve karbodiimid varlığında gerçekleştirilen Polimer-Peptid konjugatı arasındaki farkı araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, karbodiimid olmaksızın oluşturulan fiziksel karışımın yapısında bulunan polimer ve peptid arasında interpolimer kompleks oluştuğu görülmektedir.

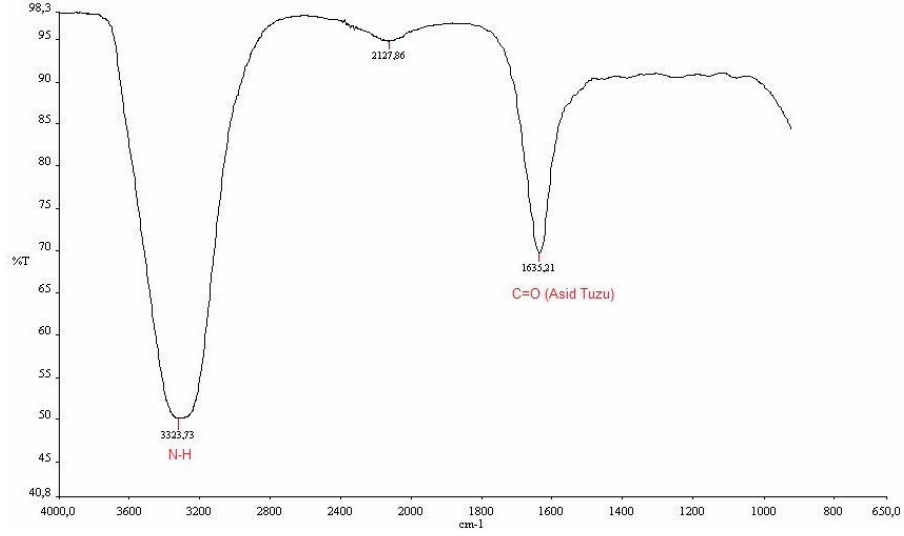


Şekil 7.7 Polimer ile peptid molekülü arasında meydana gelen fiziksel komplekse (Mavi pik) ve reaksiyon sonucunda oluşan konjugatın (yeşil) HPLC kromatogramı

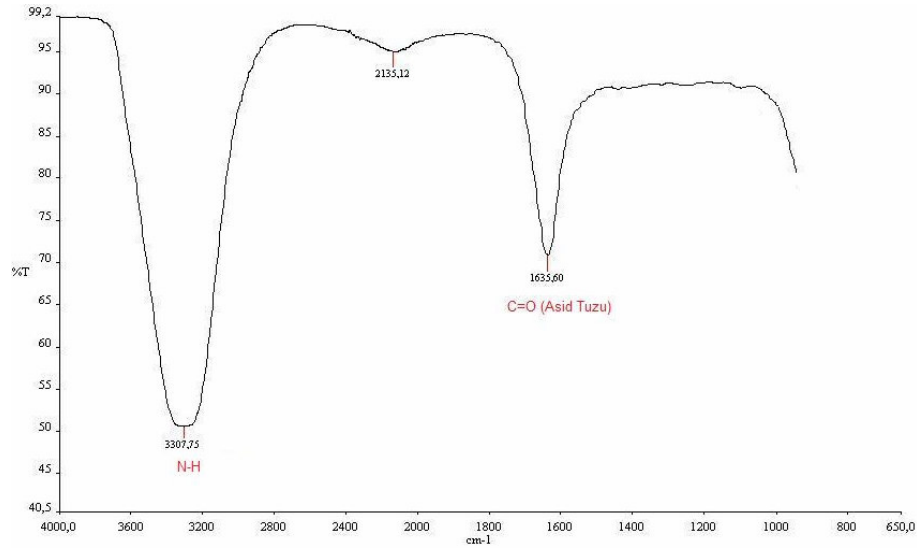
Grafikte, sulu ortamda $n_{\text{pep}}/n_{\text{PAA}}=5$ oranında sentezlenen biyokonjugat ve konjugasyon öncesinde polimer-peptid fiziki karışımının HPLC analiz sonuçları verilmiştir. Fiziki karışımında kovalent bağlanma gerçekleşmediğinden, hem serbest peptid hemde serbest

polimere ait pikler görülmektedir. Oysa konjugasyon tamamlandıktan sonra yapılan analizde, sadece konjugata ait bir pik gözlemlenmiştir.

Sulu ortamda ve organik ortamda sentezlenen biyokonjugatların kimyasal yapıları, FTIR analizi yapıldıktan sonra, spektrumdaki pikleri kıyaslanarak incelenmiştir.



Şekil 7.8 Organik ortamda mikrodalga yöntemi ile sentezlenen Peptid- VPAA (25:75) konjugatının analizi

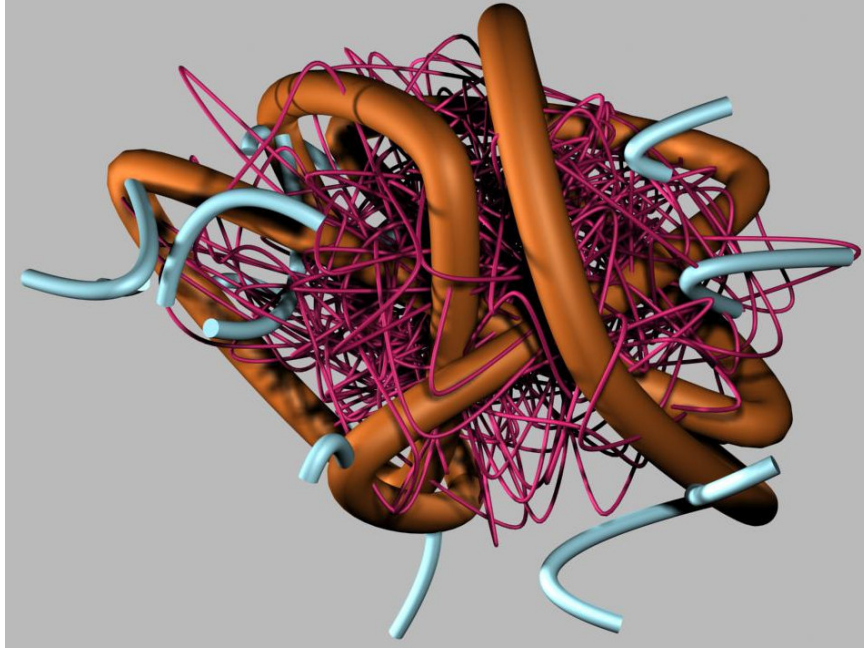


Şekil 7.9 Sulu ortamda mikrodalga yöntemi ile sentezlenen Peptid- VPAA (25:75) konjugatının analizi

Farklı reaksiyon mekanizmaları üzerinden sentez yapılmasına rağmen, hem organik ortamda hem de sulu ortamda sentezlenen konjugatların FTIR spektrumlarının çakışması, bize her iki mekanizmayla sentezlenen konjugatın kimyasal yapılarının da aynı olduğunu düşündürmektedir.

Bütün bu sonuçlar değerlendirildiğinde, peptidin yapısında reaksiyona girebilecek tek bir amino grubu taşıması ve diğer grupların hidrofob yapıda olması, aşağıda verilecek olan polimer-peptid biyokonjugatı modelini ileri sürme imkanı sağlamaktadır.

Her bir makromoleküle bağlanmış peptid moleküllerinin, hidrofobik etkileşime girerek kendiliğinden biraraya gelmesiyle (self-organization), polimerin iç kısmında toparlandığı ve bunun sonucunda kompakt bir yapı oluştuğu düşünülmektedir. Bu yapının modeli ise, şematik olarak aşağıda verilmiştir:



Şekil 7.10 Polimer-peptid biyokonjugatlarının düşünülen modeli

KAYNAKLAR

- Albericio, F., Kates, S. A. (2000), Solid-Phase Synthesis: A Practical Guide, CRC Pres, New York.
- Allen R. (1995), Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference Meyers Published Wiley-VCH Sciences.
- Atherton, E., Sheppard, R. C. (1989), Solid Phase Peptide Synthesis : A Practical Approach, Pres at Oxford University, Oxford.
- Barany, G., Kneib-Cordonier, N., Mullen, D. G. (2004), "Polypeptide Synthesis, Solid-Phase Method", Encyclopedia of Polymer Science and Technology.
- Benoiton N. L. (2005), Chemistry of Peptide Synthesis, CRC Press, New York.
- Bhagavan N. V. (2002), Medical Biochemistry, Jones and Bartlett Publishers.
- Campbell, K. M., Farrell S. O. (2006), Biocemistry, Thomson Brooks/Cole.
- Chan W. C., White P.D. (2000), Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, Oxford University Pres, Oxford.
- Chouwski, A., van Es, T., Palczul, N.C. and Davis, F.F. (1977), "Alteration of Immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol", J. Biol. Chem., 252:3578- 3581.
- Dilgmen A. (1998), Hepatit B Yüzey Antijenleri Poliipeptidlerin Kimyasal Yolla Sentezi ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul.
- Dilgimen A, Mustafaeva Z, Demchenko M., Kaneko T., Osada Y., Mustafaev M. (2001), "Water-soluble covalent conjugates of Bovine Serum Albumin with Anionic Poly-(N-isopropylacrylamide) and Their Immunogenicity", Biomaterials, 22:2383-2392.
- Donan S. (2002), Peptides and Proteins, Royal Society of Chemistry Published.
- Franks, H. S. and Evans, M. W. (1945), "Free Volume and Entropy in Condensed Systems III. Entropy in Binary Liquid Mixtures", J. Chem. Phys., 13:507-532.
- Franks, F. (2002), "Protein Stability: The Value of 'Old Literature' Biophysical Chemistry", 96:117-127.
- Giraldés B.S. (2003), "Design and Synthesis of Handles for Solid-Phase Peptide Synthesis and Convergent Peptide Synthesis", University of Puerto Rico.
- Hermanson T. (1996), Bioconjugate Techniques, Elsevier Press, California.
- Kauzmann, W. (1959), Some factors in the Interpretation of protein denaturation Advances in Protein Chem. (C. B. Anfinsen, M. L. Anson, Bailey K., and Edsall J. T.), Academic Press Inc. 14:1-63.
- Langer, R. (1990), "New methods of drug delivery Science", 249:1527-1533.
- Lee, W.Y., Schon, H. (1977), "Abrogation of reagenic antibodies with modified allergens", Nature, 267:618-619.
- McDonald, I. K. and Thornton, J. M. (1994), "Satisfying hydrogen bonding potential in proteins", Journal of Molecular Biology, 238:777-793.
- Merrifield R. B. (1963), "Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide". J.Amer. Chem. Soc., 85:2149-54.

- Merrifield B. (1984), "Solid phase Peptide Synthesis", Nobel Lecture, The Rockefeller University.
- Morris W., Steinhof, Russel K. (1994), "Potential of polymer microencapsulation technology for vaccine innovation", *Vaccine*, 12:5-11.
- Murray K. R., Mayes P. A., Granner D. K., Rodwell V. W. (1993), Harper'ın Biyokimyası (G. Menteş, B. Ersöz), Barış Kitabevi, İstanbul.
- Mustafaev M. I., Norimov A.Sh. (1990), "Polymer-metal complexes of protein antigens-a new highly effective Immunogens", *Biomed. Sci.* 1(3):274-278.
- Mustafaev M. I. (1996), *Biyopolimerler*" (Biopolymers), TÜBİTAK, Gebze/Kocaeli, Turkey.
- Mustafaev M. I., Saraç A.S., Erkol A.Y., Bayülken S., Dinçer B., Sezer E. (1996), "Effects of Cu^{+2} on Stability of Water Soluble Ternary Polyacrylic Acid-Cu+2-Protein Complexes against radiation damage", *Polymer Bull*, 36:623-627.
- Mustafaev M. I., Saraç A.S., Çirakoğlu B., Öztürk S., Yücel F., Bermek E. (1996), "Soluble and Insoluble Ternary Complexes of Serum Proteins with Polyanions in the Presence of Cu^{+2} in Water". *J.Appl. Polym. Sci.*, 62:99-109.
- Mustafaev, M., Mustafaeva Z. (2002), "Novel polypeptide-comprising biopolymer Systems", *Technology and Health Care*, 10:217-226.
- Mustafaev, M. (2004), "Functionally Biopolymer Systems", *Sigma Journal of Engineering and Natural Science*, 4:1-201.
- Nelson, L. N., Cox, M. M. (2005), *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri* (N. Kılıç), Palme Yayınları, Ankara.
- Nispen, J.w. van (1987), "Synthesis and analysis of (poly)peptides", *Pure &AppI. Chem.*, 59:331-344.
- Ogata N., Kim S.W., Feijen J., Okano T. (Eds.) (1996), "Advanced Biomaterials in Biomedical Engineering and Drug Delivery Systems", Springer-Verlag, Tokyo, 381.
- Pace, C. N., Shirley, B. A., McNutt, M. and Gajiwala, K. (1996), "Forces contributing to the conformational stability of proteins", *FASEB Journal*, 10:75-83.
- Patthy L. (1999), *Protein evolution*, Published Blackwell Publishing.
- Pennington, M. W., Dunn, B. M. (1994), *Peptide Synthesis Protocols*, Humana Pres, Nex Jersey.
- Petrov, R.V., Mustafaev, M.I., Norimov, A. Sh. (1992), "Physico-Chemical Criteria for the construction of artificial Immunomodulators and Immunogens on the bases of polyelectrolyte complexes" *Sov. Med. Rev. D. Immunol.* Harwood Acad. Publ. GmbH, UK, 1-113.
- Saraç, A.S., Özeroğlu, C., Mustafaev, M.I. (1995), "The Ternary Complexes of Bovine Serum Albumin and Polyacrylamide Derivatives in the Presence of Copper Ions in Neutral Water", *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 10:121-134.
- Sélégny E., Mandel M., Struss P. U. (1974), *Polyelectrolytes*, D. Reidel Publishing Company, Bostan-U.S.A.
- Siegbahn, R. H., Eisenstein, P. E. M., O., Rheingold, A. L., Koetzle T. F. (1996), "A New Intermolecular Interaction: Unconventional Hydrogen Bonds with Element-Hydride Bonds as Proton Acceptor Crabtree", *Acc. Chem. Res.*, 29 (7):348 - 354.
- Solomons G. T. W., Fryhle C. B. (2004), *Organic Chemistry*, John Wiley & Sons, United

States of America.

Uelzmann H. (1958), "Copolymers of Acrylic acid and N-Vinylpyrrolidone-2", J. of Polymer Science, 33:377-379.

U.S. Congress Office of Technology Assessment, Biopolymers: Making Materials Nature's Way, September 1993.

Veronese, F.M., Morpurgo, M., (1999), "Bioconjugation in pharmaceutical chemistry", IL Farmaco, 54:497-516.

World Health Organization, Department of Communicable Diseases Surveillance and Response, WHO/CDS/CSR/LYO/2002.2: Hepatitis B.

Zaragoza F. (2002), Organic Synthesis on Solid Phase: Supports, Linkers, Reactions By. Dörwald Published Wiley-VCH Science.

INTERNET KAYNAKLARI

- [1] <http://www.globalserve.net/%7Erobertg/HBV/hbvparts.htm>
- [2] <http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/255/255chem/gk2x24.gif>
- [3] http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/images/amino_acid.gif
- [4] http://fef.kafkas.edu.tr/bolum3proteinler1ders_dosyalar/frame.htm#slide0230.htm
- [5] http://www.fli-leibniz.de/~rake/Bioinformatics_WEB/basics_amino_acids.html
- [6] <http://courses.cm.utexas.edu/jrobertus/ch339k/overheads-1/ch5-amino-acids.jpg>
- [7] <http://web.indstate.edu/thcme/mwking/amino-acids.html>
- [8] http://www.fli-leibniz.de/~rake/Bioinformatics_WEB/basics_peptide_bond.html
- [9] <http://www.web.virginia.edu/heidi/chapter6/chp6.htm>
- [10] <http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/protein/sf3x11a.jpg>
- [11] http://www.steve.gb.com/images/science/van_der_waals_forces.png
- [12] http://phy.asu.edu/phy598-bio/Class/D1%20Notes_files/image010.jpg
- [13] <http://www.elmhurst.edu/~chm/vchembook/567tertprotein.html>
- [14] <http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/255/255chem/p2x7x5.jpg>
- [15] http://openlearn.open.ac.uk/file.php/1605/SK183_1_007i.jpg
- [16] http://www.brooklyn.cuny.edu/bc/ahp/LAD/C4b/C4b_proteinShape.html
- [17] <http://www.mie.utoronto.ca/labs/lcdlab/biopic/fig/3.3.jpg>
- [18] http://www.cem.com/biosciences/mwbasics_pep.asp
- [19] http://idv.sinica.edu.tw/pyc/2004TIGP_Peptide_Synthesis.pdf
- [20] http://www.sigmaaldrich.com/aldrich/brochure/al_chemfile_v3_no4
- [21] http://www.chemsoc.org/chembytes/ezine/1999/bhalay_box1.htm
- [22] <http://mason.gmu.edu/~bbishop1/chem468/Chem468peptsynth.pdf>
- [23] <http://instruct.uwo.ca/chemistry/223b-98/a.htm>
- [24] http://www.emdbiosciences.com/SharedImages/TechnicalLiterature/6_Fmoccleavage.pdf
- [25] <http://www.chemistry.helsinki.fi/polylab/research/content/polyelectrolytes?lang=fi>
- [26] <http://www.cem.com/biosciences/autopep.asp>
- [27] <http://web-books.com/MoBio/Free/Ch2B.htm>

ÖZGEÇMİŞ

Doğum tarihi	26.05.1981	
Doğum yeri	İstanbul	
Lise	1995-1998	Şehit Ersoy Yorulmaz Lisesi
Lisans	1999-2004	Yıldız Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fak. Kimya Bölümü
Yüksek Lisans	2004-...	Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Bölümü
Çalıştığı Kurum(lar)		
	2006-.....	Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya-Metalurji Fakültesi Biyomühendislik Bölümü