



TÜMÖR İLE İLİŞKİLİ PEPTİDLERİN SENTEZİ VE KARARLILIKLARININ
İNCELENMESİ

Şeyda KARA

Yüksek Lisans Tezi

Biyokimya Anabilim Dalı

Kasım - 2018

TÜMÖR İLE İLİŞKİLİ PEPTİDLERİN SENTEZİ VE KARARLILIKLARININ
İNCELENMESİ

Şeyda KARA

Kütahya Dumlupınar Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliği Uyarınca
Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Doç. Dr. Muharrem AKCAN

Kasım - 2018

KABUL VE ONAY SAYFASI

Şeyda KARA'nın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “Tümör ile İlişkili Peptidlerin Sentezi ve Kararlılıklarının İncelenmesi” başlıklı bu çalışma, jürimizce Kütahya Dumlupınar Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

16/11/2018

Prof. Dr. Önder UYSAL

Enstitü Müdürü, Fen Bilimleri Enstitüsü

Prof. Dr. Metin BÜLBÜL

Bölüm Başkanı, Biyokimya Bölümü

Doç. Dr. Muharrem AKCAN

Danışman, Biyokimya Bölümü

Sınav Komitesi Üyeleri

Prof. Dr. Tamer AKAR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Kimya Bölümü

Prof. Dr. Metin BÜLBÜL

Kütahya Dumlupınar Üniversitesi, Biyokimya Bölümü

Doç. Dr. Muharrem AKCAN

Kütahya Dumlupınar Üniversitesi, Biyokimya Bölümü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Bu tezin hazırlanmasında Akademik kurallara riayet ettiğimizi, özgün bir çalışma olduğunu ve yapılan tez çalışmasının bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olduğunu, çalışma kapsamında teze ait olmayan veriler için kaynak gösterildiğini ve kaynaklar dizininde belirtildiğini, Yüksek Öğretim Kurulu tarafından kullanılmak üzere önerilen ve Kütahya Dumlupınar Üniversitesi tarafından kullanılan İntihal Programı ile tarandığını ve benzerlik oranının % 3 çıktığını beyan ederiz. Aykırı bir durum ortaya çıktığı takdirde tüm hukuki sonuçlara razı olduğumuzu taahhüt ederiz.

Doç. Dr. Muharrem AKCAN

Şeyda KARA

TÜMÖR İLE İLİŞKİLİ PEPTİDLERİN SENTEZİ VE KARARLILIKLARININ İNCELENMESİ

Şeyda KARA

Biyokimya, Yüksek Lisans Tezi, 2018

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Muharrem AKCAN

ÖZET

Bu tezde, lenf tümörü ile ilişkili LyP-1 peptidinin serum içerisindeki kararlılığının peptid omurgası siklizasyonu ve aşılama yöntemleri ile artırılması çalışıldı. LyP-1 peptidinin halkalı homodimer ve SFTI-1 peptid iskelesinin iki ayrı hattına düz ve ters olarak aşılınmış versiyonları katı faz peptid sentez yöntemi (SPPS) ile sentezlendi. Sentezlenen peptidler ters faz yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) ile saflaştırıldı ve fraksiyonların molekül ağırlıkları sıvı kromatografisi/kuadropol-uçuş zamanlı kütle spektrometresi (LC-MS/QTOF) ile analiz edildi. Elde edilen peptidlerin saflığı analitik RP-HPLC ile kontrol edildikten sonra % 100 insan kan serumu içerisindeki kararlılıkları incelendi. Halkalı homodimer LyP-1 peptidi 24 saatin sonunda % 90 oranında serum içerisinde bozunmadan kalarak olağanüstü bir kararlılık gösterdi. Aşılama yöntemi ile de LyP-1 peptid epitopunun serum kararlılığı artırılabilirdi. Sentezlenen peptidlerin hemolitik aktiviteleri incelendiğinde, hemolitik aktivitelerin maksimum % 10 oranında olduğu görüldü. Bu bulgular ilaç araştırma ve tasarım çalışmalarında yeni peptid yapılı terapötiklerin geliştirilmesi açısından faydalı olabilecektir.

Anahtar Kelimeler: Aşılama, halkalaştırma, hemolitik aktivite, ilaç tasarımı, lenfatik tümör, LyP-1 peptidi, serum kararlılığı.

SYNTHESIS AND EXAMINATION OF STABILITIES OF TUMOR-RELATED PEPTIDES

Şeyda KARA

Biochemistry, M.S. Thesis, 2018

Thesis Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Muharrem AKCAN

SUMMARY

In this thesis, enhancement of the stability of lymph nodes related LyP-1 peptide in serum was studied by peptide backbone cyclization and grafting methods. Cyclic homodimer of LyP-1 peptide and its grafted versions as straight and retro sequences onto both SFTI-1 loops were synthesized using Fmoc solid phase peptide synthesis (SPPS). Synthesized peptides were purified by reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) and the molecular weights of the fractions were analyzed with liquid chromatography/quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (LC-MS/QTOF). After checking the purity, the stability of the peptides were determined in 100 % human blood serum. The cyclic homodimer LyP-1 peptide was showed an extraordinary stability as 90 % of the peptide remained intact in serum after 24 hour. In addition, the serum stability of LyP-1 peptide epitope can also be increased by grafting. While hemolytic activity of synthesized peptides were examined, the peptides have only maximum 10 % hemolytic activity. These findings may be useful in the development of new peptide based therapeutics in drug development and design studies.

Keyword: Cyclization, drug design, grafting, hemolytic activity, lymphatic tumor, LyP-1 peptide, serum stability.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca her daim değerli zamanından fedakârlık yapan, engin bilgi ve tecrübelerini paylaşan, duygu ve düşüncelerimi göz ardı etmeyen, gerçek bir bilim insanı olmam yolunda büyük katkıları olan, değerli danışman hocam Doç. Dr. Muharrem AKCAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Kütle spektrometresi ve UV plaka okuyucu ile yapılan analizler için Kütahya Dumlupınar Üniversitesi İleri Teknolojiler Tasarım, Araştırma-Geliştirme ve Uygulama Merkezi'ne teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasına 2017-59 nolu proje kapsamında destek veren Kütahya Dumlupınar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na teşekkürlerimi sunarım.

Tüm hayatım boyunca sonsuz sevgi ve destek ile yanımda olan annem, babam ve kardeşime sırası ile Nimet KARA, Sadettin KARA ve Ceyda KARA' ya çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	v
SUMMARY	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. PEPTİD YAPILI İLAÇLAR.....	2
3. DİSÜLFİDCE ZENGİN PEPTİDLER; SİKLOTİDLER	8
4. PEPTİD KARARLILIĞININ ARTTIRILMASI İÇİN KULLANILAN STRATEJİLER.....	12
4.1. Peptid Analogları	13
4.2. Peptid Omurgasının Siklizasyonu	16
4.3. Peptid Epitopların Aşılması	18
5. LyP-1 PEPTİDİ.....	22
6. MATERYAL VE METOD	25
6.1. Kullanılan Cihazlar	25
6.1.1. Ters faz yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (RP-HPLC).....	25
6.1.2. Kütle spektrometresi (MS).....	26
6.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	28
6.3. Katı Faz Peptid Sentezi.....	29
6.3.1. Fmoc katı faz peptid sentezi.....	30
6.3.2. Reçineden kırma	32
6.3.3. Siklizasyon ve koruyucu yan grupların uzaklaştırılması	32
6.3.4. Oksidasyon.....	33
6.4. Serum Kararlılığı	33
6.5. Hemolitik Aktivite	33

İÇİNDEKİLER(devam)

7. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	35
7.1. Peptidlerin Sentezlenmesi, Saflaştırılması, LC-MS analizleri.....	35
7.2. Peptidlerin Serum Kararlılıkları.....	49
7.3. Peptidlerin Hemolitik Aktiviteleri	53
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	55

ÖZGEÇMİŞ

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Molekül ağırlıklarına göre terapötiklerin gösterimi.	3
2.2. SFTI-1 peptidinin üç boyutlu yapısı ve sekansı (PDB kodu: 1JBL)..	7
3.1. Kalata B1 peptidinin sekansı ve üç boyutlu yapısı (PDB kodu: 1NB1)..	8
3.2. Siklik sistin düğüm (CCK) motifi.	9
3.3. Kalata B1 siklotidinin Helicoverpa larvalarının büyümelerini inhibe edici etkisi.	10
4.1. Peptid biyoaktivitesini etkilemeden proteazlara karşı dirençli olacak şekilde peptid kararlılığını arttırmak için uygulanabilecek stratejiler.	13
4.2. Siklizasyon.	16
4.3. Akrep zehri peptidi CTX'in siklizasyonu.	17
4.4. Tripsin inhibitör peptidleri üzerine trombospondin-1 (TSP-1) peptid epitopunun aşılması.	20
5.1. LyP-1 peptidinin kan damar belirteçleri ile lokalize değil iken lenf tümörleri ile lokalize olduğunun konfokal mikroskopu ile gösterilmesi.	22
5. 2. Sentezlenen peptidlerin amino asit sekansları.	24
6.1. HPLC de sıvı akışının şematik gösterimi.	25
6.2. Kütle spektrumu örneği.	27
6.3. Fmoc katı faz peptid sentez yönteminin şematik gösterimi.	31
6.4. Halkalı ve aşılınmış peptidlerin elde edilmesi.	32
7.1. LyP-1 peptidinin oksidasyon öncesine ait RP-HPLC kromatogramı ve LC-MS kütle spektrumu.	37
7.2. LyP-1 peptidinin oksidasyon sonrasına ait RP-HPLC kromatogramları ve LC-MS kütle spektrumu.	38
7.3. Halkalı homodimer LyP-1 peptidinin oksidasyon öncesine ait RP-HPLC kromatogramı ve LC-MS kütle spektrumu.	39
7.4. Halkalı homodimer LyP-1 peptidinin oksidasyon sonrasına ait RP-HPLC kromatogramları ve LC-MS kütle spektrumu.	40
7.5. LyP-1-hat1-SFTI-1 aşılınmış peptidinin oksidasyon öncesine ait RP-HPLC kromatogramı ve LC-MS kütle spektrumu.	41
7.6. LyP-1-hat1-SFTI-1 aşılınmış peptidinin oksidasyon sonrasına ait RP-HPLC kromatogramları ve LC-MS kütle spektrumu.	42
7.7. LyP-1-hat 2-SFTI-1 aşılınmış peptidinin oksidasyon öncesine ait RP-HPLC kromatogramı ve LC-MS kütle spektrumu.	43
7.8. LyP-1-hat 2-SFTI-1 aşılınmış peptidin oksidasyon sonrasına ait RP-HPLC kromatogramları ve LC-MS kütle spektrumu.	44

ŞEKİLLER DİZİNİ(devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
7.9. Retro LyP-1-hat1-SFTI-1 aşılانmış peptidinin oksidasyon öncesine ait RP-HPLC kromatogramı ve kütle LC-MS spektrumu.....	45
7.10. Retro LyP-1-hat1-SFTI-1 aşılانmış peptidinin oksidasyon sonrasına ait RP-HPLC kromatogramları ve LC-MS kütle spektrumları.	46
7.11. RetroLyP-1-hat2-SFTI-1 aşılانmış peptidinin oksidasyon öncesine ait RP-HPLC kromatogramı ve LC-MS kütle spektrumu.....	47
7.12. Retro LyP-1-hat2-SFTI-1 aşılانmış peptidinin oksidasyon sonrasına ait RP-HPLC kromatogramları ve LC-MS kütle spektrumu.....	48
7.13. Serum kararlılığı..	49
7.14. Sentezlenen peptidlerin ilk iki saat sonundaki % 100 serum içerisindeki kararlılıkları.....	50
7.15. Sentezlenen peptidlerin 24 saat sonundaki serum kararlılıkları.	51
7.16. Retro LyP-1-hat 2-SFTI-1 peptidine ait 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12 ve 24 saat aralıklarındaki kromatogramları.....	52
7.17. Hemolitik aktivite.	53
7.18. Sentezlenen peptidlerin hemolitik aktivitesi.	54

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Klinik ve klinik öncesi aşamalardaki bazı peptidlere örnekler.	4
4.1. Kararlı peptid iskeleleri üzerine yapılan diğer aşılama çalışmalarına örnekler.	19
6.1. Kullanılan Cihazlar ve Teçhizatlar.....	27
6.2. Kullanılan kimyasalların isimleri ve temin edildikleri firmalar.	28
7.1. Sentezlenen peptidler ve sekansları..	36
7.2. Sentezlenen peptidlere ait alıkonma süreleri, kütle ve % saflık değerleri.....	36



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
A, Ala	Alanin
Arg	Arjinin
Asn	Asparajin
Asp	Aspartat
RCF	Bağıl santrifüj kuvveti
rpm	Dakikada devir sayısı
G, Gly	Glisin
Glu	Glutamat
Ile	İzolösin
CTX	Klorotoksin
Lys	Lizin
L, Leu	Lösin
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
mg	Miligram
mg/mL	Miligram/mililitre
mL	Mililitre
mM	Milimolar
M	Molar
nAChR	Nikotinik asetilkolin reseptörleri
P	Prolin
PDB	Protein data bank
°C	Santigrat derece
Ser	Serin
CCK	Siklik sistin düğüm motifi
Cys	Sistein
Tyr	Tirozin
Thr	Treonin
Trp	Triptofan

1.GİRİŞ

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bölünmesi ve çoğalması ile sağlıklı dokulara da yayılabilen bir hastalıktır. Günümüzde ölüm sebeplerinin ikinci en büyük kısmını oluşturduğu için bu hastalığın tedavisinde kullanılabilecek yeni terapötiklere ihtiyaç duyulmaktadır. İlaç marketlerindeki mevcut kemoterapi ilaçları, hedef hücrelere spesifik olmamaları nedeni ile ciddi yan etkiler oluşturmaktadırlar.

Peptidler yüksek terapötik etkinlikleri ve spesifiklikleri ile dikkatleri üzerine toplamış ilaç aday moleküllerdir. Yüksek spesifikliklerinden dolayı diğer küçük molekül yapıları terapötiklere göre daha az yan etki ve toksisite oluşturlar. Ayrıca dokularda düşük oranlarda birikmeleri, kimyasal veya biyolojik olarak yüksek çeşitlilik ile elde edilebilmeleri ve antimikrobiyal (Tam vd., 1999), antikanser (Svangard vd., 2004), anti-HIV (Gustafson vd., 2004) ve antienflamatuvar (Yang vd., 2008, La Manna vd., 2018) gibi önemli birçok biyoaktiviteye sahip olmaları peptidlerin ilaç geliştirme çalışmalarında kullanılması için önemli avantajlarından (Cobos vd., 2018). Fakat metabolik olarak düşük kararlılık ve düşük oral biyoyararlanım peptidlerin terapötik etkinliklerini kısıtlayan en büyük faktörlerdir. Başlarda doğadan esinlenerek ortaya çıkmış ve daha sonraları da geliştirilmiş çeşitli stratejilerle bu dezavantajlar azaltılabilir. Örneğin peptidlerin halkalı hale getirilmesi veya kararlı bir iskele üzerine peptid epitopların yerleştirilmesi proteazlara karşı dirençli peptidlerin elde edilmesinde kullanılabilecek stratejilerden başlıcalarıdır.

Antikanser peptidler tümör hücrelerine karşı çeşitli biyoaktiviteler sergileyerek kanser tanı ve tedavisinde kullanım potansiyeline sahip biyomoleküllerdir. LyP-1 peptidi, dokuz amino asit kalıntısına ve lenf tümörlerine karşı apoptotik biyoaktiviteye sahip antikanser peptidlerden biri olarak rapor edilmiştir. En dikkat çekici özelliği ise sağlıklı hücrelerden çok lenf tümörleri ve mikro çevresi ile lokalize olabilmesidir. Ancak LyP-1 peptidinde serum içerisinde proteazlara karşı duyarlı ve kararsızdır.

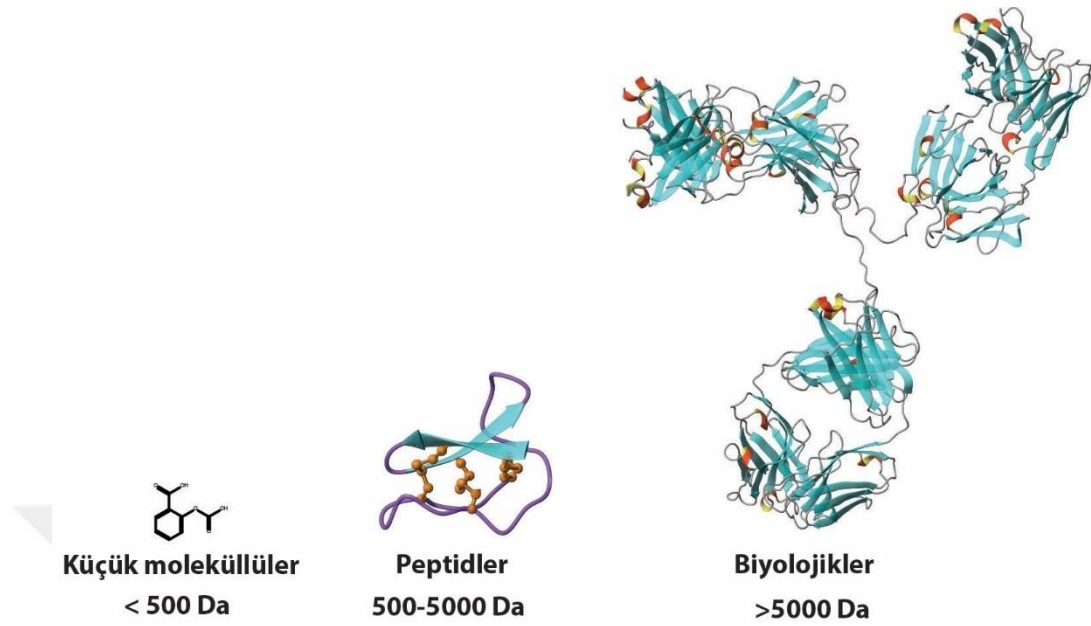
Bu tez çalışmasında, LyP-1'in halkalı homodimer versiyonunun sentezlenmesi ve kararlı SFTI-1 peptidinin her iki hattı üzerine aşılansak peptidin serum kararlılığının artırılması amaçlanmıştır. Son olarak da serum içerisinde daha kararlı hale getirilen peptidlerin kan hücrelerine karşı toksisiteleri analiz edilmiştir.

Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar ile lenf kanseri tanı ve tedavisinde LyP-1 peptidinin kullanılabilmesine ve yeni terapötik moleküllerin geliştirilmesine olanak sağlanabilir.

2. PEPTİD YAPILI İLAÇLAR

Terapötik moleküller, aspirin gibi 500 Da'dan küçük olan bileşikler ile antikorlar gibi 5000 Da'dan büyük olan protein yapılı biyolojikler olarak ikiye ayrılırlar. Küçük molekül yapılı terapötikler vücuda alındıklarında kimyasal yapıları bozunmadığı için kararlı moleküller olarak bilinseler de, etki ettikleri hedef molekülün aktif bölgesi dışında diğer bölgeleri ile de istenmeyen etkileşimler oluşturabildiklerinden düşük spesifikliğe ve yan etkilere sahiptirler. Biyolojikler ise büyük molekül yapılarından dolayı hedef moleküllerine yüksek spesifiklik ile bağlanırlar ve daha az yan etki oluştururlar. Bu sebeple ilaç otoriteleri tarafından onay alabilen ilaçlar arasında biyolojiklerin sayılarının son yıllarda giderek arttığı görülmektedir (Chames vd., 2009, Munoz-Durango vd., 2018, Pierpont vd., 2018). Fakat bu moleküller de protein yapısında olmalarından dolayı proteazlar tarafından kolayca parçalanabilirler ve bu durum düşük kararlılık ve daha kısıtlı etki ile sonuçlanır. Bu sebeple biyolojikler zayıf oral biyoyararlanımlarından dolayı vücuda parenteral enjeksiyon ile alınır. Günümüz ilaç araştırma ve geliştirme çalışmalarında küçük molekül yapılı terapötikler ile biyolojiklerin dezavantajlarının ortadan kaldırılmasına yönelik birçok çalışma yapılmaktadır. Son yıllarda peptidler bu tür çalışmalarda oldukça ilgi çeken moleküller haline gelmişlerdir. Küçük molekül yapılı terapötikler ile biyolojikler arasında kalan ve molekül ağırlığı 500 Da ile 5000 Da arasında olan peptidler, biyolojikler gibi yüksek hedef spesifikliğı, daha az toksisite ve dokularda daha az birikim gibi avantajlara sahiptirler (Şekil 2.1). Ancak proteazlar tarafından parçalanabilir olmalarından dolayı zayıf metabolik kararlılık, zayıf oral biyoyararlanım ve vücuttan hızlı atılma gibi dezavantajları vardır.

Peptidler, 40 ve/veya daha az amino asidin peptid bağları ile birbirine bağlanması ile oluşan biyomoleküllerdir. Peptidlerin terapötik etkinlikleri geniş bir alanda incelenmiş olup, kanser ve metabolik hastalıkların tanı ve tedavisinde oldukça fazla kullanılmaktadırlar (Lau ve Dunn 2017).



Şekil 2.1. Molekül ağırlıklarına göre terapötiklerin gösterimi. Peptidler moleküler ağırlıklarından dolayı küçük moleküller ve biyolojikler arasında yer alan terapötik biyomoleküllerdir ve günümüz ilaç araştırma ve geliştirme çalışmalarında kullanılmaktadırlar. Küçük moleküller, peptidler ve biyolojikler için sırası ile aspirin, kalata B1 peptidi ve IgG2a monoklonal antikorü örnek verilmiştir. Kalata B1 peptidi ve IgG2a molekül yapıları MOLMOL (Koradi vd., 1996) programı ile hazırlanmıştır.

Bugüne kadar hayvan ve bitkiler başta olmak üzere birçok organizmadan peptidler izole edilmiş ve terapötik etkinlikleri incelenmiştir (L. Thorstholm 2012). Peptid yapılı ilaçlar, küçük moleküllülerin ya da biyolojiklerin yetersiz olduğu durumlarda çeşitli biyoaktiviteleri ile ilaç araştırma ve geliştirme çalışmaları için alternatif olabilmektedirler. Örneğin; mikroorganizmalardan elde edilen siklosporin A ve bakteriyosin AS-48, yılan, deniz koni salyangozu, akrep ve örümcek gibi canlıların zehirlerinden elde edilen venom peptidleri ve bitkilerden elde edilen peptidler günümüz ilaç tarama, tasarım ve geliştirme çalışmalarında kullanılmaktadırlar ve bazıları da ilaç olarak kullanılmak üzere onay almıştır. Örneğin, siklosporin A, yılan zehrinden izole edilen Eptifibatide, koni salyangozundan izole edilen ω -konotoksin MVIIA (Prialt) ve kertenkele zehrinden izole edilen Exenatide Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış peptid ilaçlardır. Diğer birçok peptid ise halen geliştirilme aşamasındadır (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Klinik ve klinik öncesi aşamalarda bazı peptidlere örnekler.

Organizma	Peptid	Farmakoloji	Endikasyon	Aşama
Yılan	Captopril (Teprotide)	Anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörü	Hipertansiyon	FDA onayladı (1981)
Yılan	Eptifibatide (Integrilin™)	Fibrinojenin trombosit glikoprotein IIb/IIIa reseptörüne bağlanmasını inhibe eder	Karasız angina	FDA onayladı (1998)
Koni salyangozu	ω -Conotoxin MVIIA (Ziconotide, Prialt®)	Ca _v 2.2 voltaj bağımlı kalsiyum kanalını bloke eder	Kronik ağrı	FDA onayladı (2004)
Kertenkele	Exenatide (Byetta®)	İnsülin salgılatıcısı	Tip2 şeker hastalığı	FDA onayladı (2005)
Yılan	Ancrod	Antikoagülan	İskemik felç	Faz3
Koni salyangozu	γ -Conotoxin MrIA (Xen2174)	Nöradrenalin taşıyıcısını inhibe eder	Kronik ağrı	Faz2
Akrep	Clorotoxin (TM-601)	Glioma hücrelerinin yüzeyine MMPS2 bağlar, invazyon kabiliyetini zayıflatır	Glioma	Faz2
Örümcek	Psalmotoxin-1	Asit algılayıcı iyon kanalı 1a'yı (ASIC1a) bloke eder	Enflamatuvar ağrı	Klinik öncesi
Deniz şakayığı	ShK	K _v 1.3 voltaj bağımlı potasyum kanalını bloke eder	MS de içeren otoimmün hastalıklar	Klinik öncesi

Tolypocladium inflatum mantarından izole edilen siklosporin A, 11 amino asit kalıntısına ve oral biyoyararlanıma sahip bir peptiddir (Borel vd., 1976, Spitzfaden vd., 1992, Yang vd., 2018). İlk başlarda antifungal etkinliği bilinse de, günümüzde organ nakillerinde bağışıklık sistemi baskılayıcı olarak kullanılmaktadır (Klages vd., 2005). Bakteriyosin AS-48 ise *Enterococcus faecalis* bakterisinden izole edilen 70 aminoasit kalıntısına sahip halka yapılı antibakteriyel aktiviteye sahip bir peptiddir. Doğal formdaki peptidlerden farklı olarak peptid kararlılığı için önemli olan disülfid bağlarını içermez (Grande Burgos vd., 2014).

Hayvan zehirlerinden elde edilen peptidler ise yüksek terapötik potansiyele sahip olmaları ve sinir sistemiyle ilişkili olmalarından dolayı peptid yapılı ilaçların geliştirilmesinde önemli bir yere sahiptirler. Bu peptidler hedeflerine karşı oldukça spesifiktirler. Örneğin, Eptifibatide (Integrilin) yılan zehrinden elde edilen altı amino asitli peptid yapılı bir ilaçtır. Kalp

ve damar rahatsızlıklarında istenmeyen kan pıhtılaşmalarını önlemek için kullanılmaktadır. (O'Shea ve Tchong 2002).

Tropik okyanuslarda yaşayan *Conus* cinsi deniz salyangozlarından elde edilen disülfidce-zengin peptidler ise "konotoksinler" olarak adlandırılmaktadır. Deniz koni salyangozunun avını yakalamak veya kendini savunma amacıyla kullandığı zehir peptidleri yaklaşık 12-40 aminoasit uzunluğunda, disülfidce-zengin lineer biyomoleküllerdir (Gray vd., 1981, Terlau ve Olivera 2004). Konotoksinler potasyum, sodyum, kalsiyum ve klorür iyon kanalları ile reseptörler üzerinde seçici etki göstermeleri ve sahip oldukları güçlü potansiyelleri ile önemli terapötiklerdir. Konotoksinlerin moleküler yapılarının küçük olması ve zor kristallenmelerinden dolayı üç boyutlu yapıları genellikle Nükleer Manyetik Rezonans spektroskopisi (NMR) ile incelenir (Craik ve Adams 2007). Deniz koni salyangozu *Conus magus* zehrinden elde edilen 25 amino asit uzunluğundaki MVIIA peptidinin sentetik versiyonu, Ziconotide jenerik adı altında (Prialt™) kronik ağrı tedavisi için kullanılan ilk konotoksin türü peptid yapılı ilaçtır (Jain 2000, Miljanich 2004). Son zamanlarda yine nöropatik ağrı tedavisi için üzerinde çalışılan Xen2174 peptidi de Faz II aşamasındadır (Brust vd., 2009).

Akrep zehri peptidi klorotoksin ise ilk kez *Leiurus quinquestriatus* zehrinden izole edilmiş 36 amino asit kalıntısına ve dört disülfid bağına sahip bir peptiddir. Peptidin üç boyutlu yapısı NMR spektroskopisi ile aydınlatılmıştır (DeBin vd., 1993). Yapısındaki bir α -heliks ve üç β -tabakasının dört disülfid bağıyla desteklendiği bu peptid yüksek bir kararlılığa sahiptir. Klorotoksinin kanser hücrelerinin hücre dışı matriks proteini olan Annexin 2'ye bağlanabilmesi sayesinde, peptid floresan boya Cy5.5 ile birleştirilmiş ve "tümör boyası" adı verilen konjuge bir molekül elde edilmiştir. Bu molekül cerrahi rezeksiyon esnasında floresan ışık altında beyin tümör hücrelerini belirgin hale getirerek kanserli ve normal hücrelerin birbirinden ayırt edilmesini sağlamıştır (Veisoh vd., 2007). Ayrıca hücre penetrasyonu özelliğine sahip olan klorotoksin, ilaçların tümör hücrelerine hedeflenmesini sağlayarak daha etkili kullanılabilmelerini sağlayabilmektedir (Wiranowska vd., 2011).

Akrep zehirleri gibi örümcek zehirlerinden de 25-40 aminoasit kalıntısına sahip disülfidce-zengin peptid yapıları izole edilmiştir. Bu peptidler, hücre sinyalleşmesi için önemli olan sodyum, potasyum, kalsiyum ve asit algılayıcı iyon kanallarını (ASICs) düzenler. Bu sayede, özellikle kalp hastalıkları ve ağrı tedavisi için yüksek potansiyele sahiptirler. Psalmotoxin-1, tarantula *Psalmopoeus cambridgei* zehrinden elde edilmiştir ve 40 aminoasit kalıntısı içerir. Asit algılayıcı iyon kanalı 1a'nın (ASIC1a) seçici ve yüksek afiniteli bir inhibitörüdür (Escoubas ve Bosmans 2007).

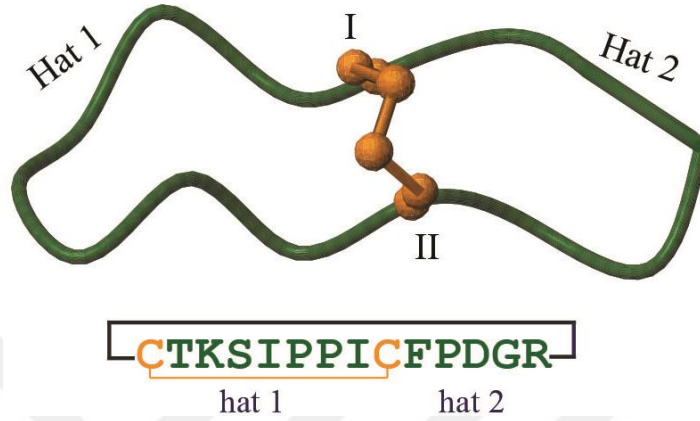
Hayvan zehir peptidleri sahip oldukları biyoaktivitelerinden dolayı ilaç araştırma ve geliştirme çalışmalarının birçok alanında kullanılmaktadırlar. Bu peptidlere ek olarak doğal olarak oluşan antimikrobiyal peptidler de (AMP) diğer önemli terapötik peptid ajanlarıdır. AMP'ler, barındırdıkları pozitif yüklerden dolayı hücre membranlarına zarar vererek patojenlere karşı antimikrobiyal özellik oluşturulabilirler. Ayrıca, kanser hücrelerinin diğer sağlıklı hücrelerden farklı olarak membranlarında daha fazla negatif yük içermelerinden dolayı, AMP'ler kanser hücrelerine spesifik olarak bağlanabilmektedirler (Kang vd., 2017). N-ucunda piroglutamik asit bulunan gomesin, 18 kalıntılı örümcek hemositlerinden izole edilmiş ve β -tabaka yapısının iki disülfid bağı ile desteklendiği peptiddir. Brezilya'da yaşayan *Acanthoscurria gomesiana* örümceği tarafından üretilen disülfidce-zengin antimikrobiyal peptid Gomesin'in, gram negatif bakterilere karşı etkili olduğu ve melanoma hücrelerine karşı seçici antikanser özelliğe sahip olduğu rapor edilmiştir (Troeira Henriques vd., 2017). Bir diğer örnek ise Avusturalya'da yaşayan *Litoria aurea* kurbağasından izole edilen antimikrobiyal ve antikanser aktiviteye sahip 13 amino asit kalıntılı biyoaktif aurein 1.2, peptididir (Felicio vd., 2017).

Memeli antimikrobiyal savunma peptidi defensinler ise makak ve babun lökositlerinden izole edilirler. Defensinler α , β ve θ olmak üzere üçe ayrılırlar. Rhesus theta defensin-1 (RTD-1), altı tanesi sistein kalıntısı olmak üzere toplam 18 aminoasit kalıntısı içermektedir. Sistein kalıntılarının oluşturduğu üç disülfid bağı paralel olarak düzenlenip merdiven motifi oluşturur. Peptidin antibakteriyel ve anti-HIV aktivitesine sahip olduğu rapor edilmiştir (Conibear vd., 2012).

Bitkilerden elde edilen peptidler ise, antimikrobiyal etkililiklerinin yanı sıra yüksek kararlılıkları ve hücre penetrasyonu gibi özellikleri ile ilaç araştırma ve geliştirme çalışmalarında sıklıkla kullanılan diğer önemli peptidlerdir (Henriques ve Craik 2010). Örneğin, siklotidler ve ayçiçeğinden izole edilen tripsin inhibitörü SFTI-1 peptidi en önemli bitki kaynaklı peptidlerdir. Siklotidler, bitkinin çeşitli patojenlere karşı savunmasında önemli rol oynayan doğal peptidlerdir. Yapıları hidrofobik ve pozitif yüklüdür. Bu sayede insektisit, nematisit ve mollusisit etkilere sahiptirler (Weidmann ve Craik 2016).

SFTI-1 peptidi ise iki sistein ve biyoaktif etkiyi sağlayan lizin kalıntısı ile toplam 14 aminoasit kalıntısına ve iki antiparalel β tabakaya sahip tek disülfid köprülü halka yapılı bir peptiddir (Şekil 2.2). Siklik omurga ve disülfid köprüsüne ek olarak peptid yapısında bulunan hidrojen bağlarının da SFTI-1'in kararlılığı üzerindeki etkisi büyüktür (Franke vd., 2018). Tripsin/kimotripsin enzimlerini inhibe eden Bowman-Birk inhibitörleri ile homolog sekansa

sahip olan SFTI-1, olağanüstü tripsin inhibitör etkinliğine sahiptir. Ayrıca kanser hücresi metastazını indükleyen matriptaz enzimini de inhibe ettiği rapor edilmiştir (Long vd., 2001, Colgrave vd., 2010).

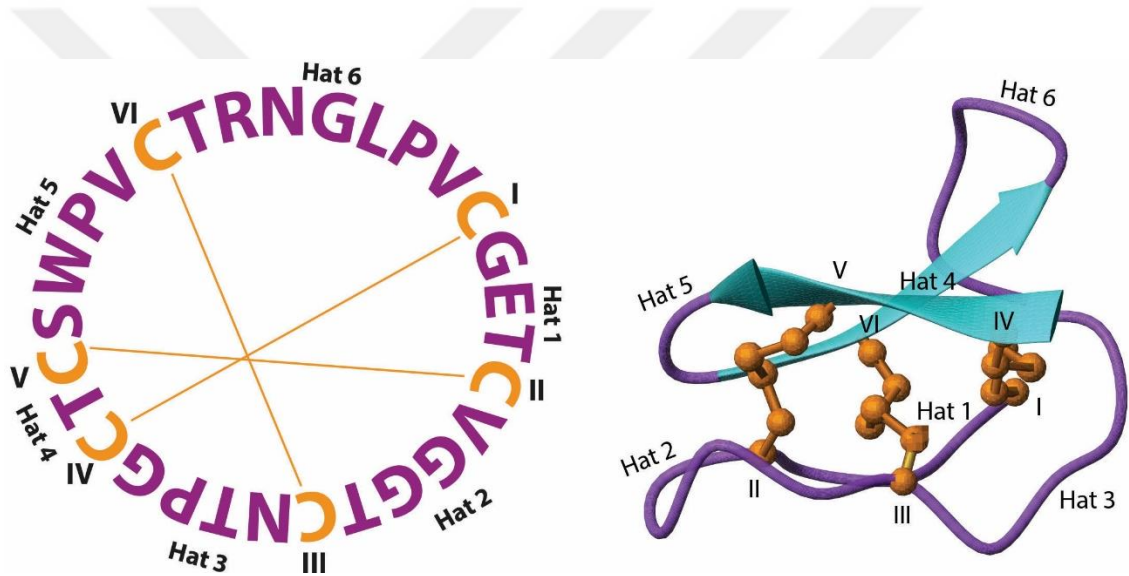


Şekil 2.2. SFTI-1 peptidinin üç boyutlu yapısı ve sekansı (PDB kodu: 1JBL). Peptid 14 amino asit kalıntısına ve disülfid köprülü siklik omurga yapısına sahiptir. Peptid omurgası yeşil renk ile, Cys amino asitleri ve oluşturdıkları disülfid köprüsü turuncu renk ile gösterilmiştir. Molekül yapısı MOLMOL (Koradi vd., 1996) programı ile hazırlanmıştır.

Peptidler sahip oldukları bu çeşitli ve çok değerli biyoaktiviteleri sayesinde ilaç araştırma ve geliştirme çalışmalarında önemli bir yere sahiptirler. Ancak, peptid yapılı ilaçların geliştirilmesindeki en önemli zorluklar bu biyomoleküllerin zayıf kararlılığa sahip olmaları ve bunun sonucu olarak da zayıf oral biyoyararlanımlarıdır. Bu problemin aşılabilmesi için yapılan ilaç geliştirme çalışmalarında öncelikle peptid veya peptid epitopu keşfedilir ve çeşitli stratejiler ile bu epitopun kararlılığının ve biyoyararlanımının artırılması hedeflenir. Peptid kararlılığını arttırmak için uygulanan stratejiler ilk başlarda doğadaki disülfidce-zengin siklotidlerin yapı ve biyoaktivitelerinden ilham alınarak ortaya çıkmıştır. Ayrıca disülfidce-zengin peptidlerin tripsin enzimini inhibe edici veya kanser hücrelerine karşı sitotoksiteleri gibi biyoaktif etkinlikleri aşılama uygulamaları ile peptid molekülüne kazandırılabilir. Bu hedefler doğrultusunda disülfidce-zengin bitkisel kaynaklı peptidler ilaç araştırmalarında kullanılmaktadır.

3. DİSÜLFİDCE ZENGİN PEPTİDLER; SİKLOTİDLER

Norveçli Doktor Lorents Gran, 1960'lı yıllarda Afrika Demokratik Kongo Cumhuriyeti'nde yaşayan kadınların doğumu kolaylaştırmak için *Oldenlandia affinis* bitkisini kaynatıp içtiklerini gözlemlemiştir. Bu uterotonik bitki ekstratındaki ana aktif bileşenin, bitkinin kaynatılmasına rağmen denatüre olmayan ve oral olarak vücuda alındığında proteolitik enzimlere karşı dirençli olan *kalata-kalata* peptidi olduğu rapor edilmiştir (Gran 1973). Aradan geçen yaklaşık 25 yıl sonra NMR analizleri ile kalata B1 olarak yeniden adlandırılan peptidin siklik peptid omurgasına ve üç disülfid bağı ile düzenlenmiş sistin düğüm motifine sahip olduğu rapor edilmiştir (Şekil 3.1)(Pallaghy vd., 1994, Saether vd., 1995).

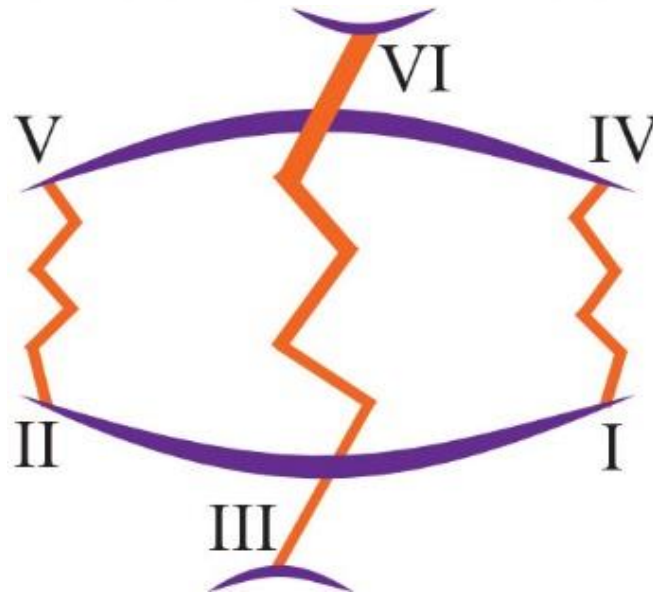


Şekil 3.1. Kalata B1 peptidinin sekansı ve üç boyutlu yapısı (PDB kodu: 1NB1). Peptid, siklik omurga yapısına ve üç disülfid köprüsünü oluşturan altı Cys amino asit kalıntısına sahiptir. Peptidin yapısı mor renk ile, Cys amino asitleri ve oluşturdukları disülfid bağları turuncu renk ile gösterilmiştir. Sağdaki üç boyutlu molekül yapısı MOLMOL (Koradi vd., 1996) programı ile hazırlanmıştır.

Siklotidler; *Rubiaceae*, *Violaceae*, *Cucurbitacea*, *Solanaceae* ve *Fabaceae* bitki familyalarında bulunmaktadır (Weidmann ve Craik 2016). İlerleyen yıllarda tek çekirdekli *Poaceae* bitki familyasının bir üyesi olan *Panicum laxum*'dan da yeni siklotidler izole edilmiştir (Giang vd., 2013, Park vd., 2017).

Siklotidler altı tanesi Cys kalıntısı olmak üzere toplam 28–37 amino asit kalıntısına sahip siklik peptidlerdir. Her iki Cys aminoasidi arasındaki peptid sekansına hat denilmektedir. Siklotidler, birinci hatlarında genellikle Glu kalıntısı ile birlikte toplam 3–4 aminoasit, ikinci hatta 4–8 aminoasit, üçüncü hatta 3–7 aminoasit, dördüncü hatta Ser, Thr ya da Ile olmak üzere tek bir aminoasit, beşinci hatta 4–5 aminoasit ve altıncı hatta ise yapının siklizasyonu için önemli Asn/Asp–Gly ile birlikte 5–8 aminoasit içerirler (Weidmann ve Craik 2016).

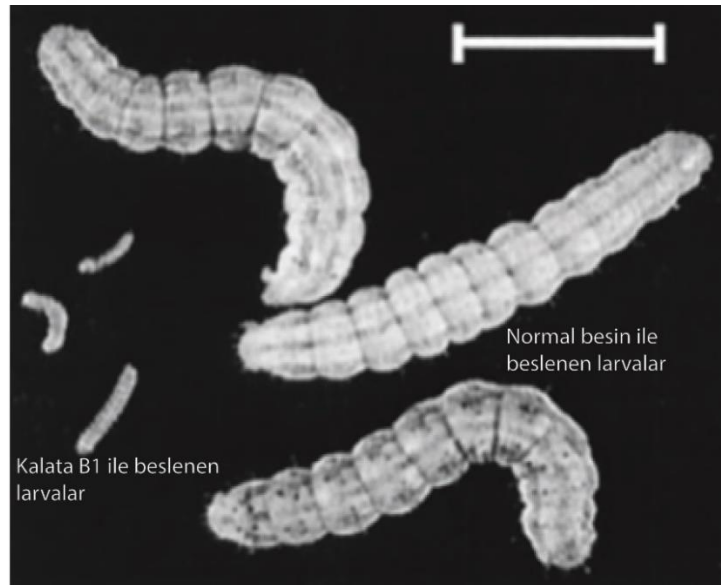
Siklotidlerin sahip oldukları üç disülfid bağı kendi içerisinde düzenlenerek siklik sistin düğüm (CCK) yapısal motifini oluştururlar. Siklotidlerin en karakteristik özelliği olan bu CCK motifi, baş-kuyruk siklik peptid yapısı ile beraber Cys1– Cys4 ve Cys2– Cys5 disülfid köprülerinin oluşturdukları halka yapısı ve Cys3– Cys6 ile oluşan üçüncü bir disülfid köprüsünün bu halkanın merkezinden geçmesiyle oluşan bir düğüm motifidir (Şekil 3.2). Bu motif peptid yapısına kimyasal, termal ve enzimatik direnç kazandırdığı için son derece önemlidir (Colgrave ve Craik 2004). Siklotidler, bu motifin peptide sağladığı olağanüstü kararlılık, peptid sekansının modifikasyonlara karşı toleranslı olması ve bazı siklotidlerin de hücre membranını geçebilme özellikleri sebebiyle ilaç araştırma ve geliştirme çalışmalarında önemli bir yere sahiptirler.



Şekil 3.2. Siklik sistin düğüm (CCK) motifi. Siklotidler sahip oldukları altı Cys aminoasitinin oluşturduğu disülfid bağları ile kendi içerisinde düzenlenerek düğüm motifi oluştururlar. CCK motifi kimyasal, termal ve enzimatik etkilere karşı peptidlere olağanüstü direnç sağlar. Peptid omurgası mor renk, disülfid köprüleri ise turuncu renk ile gösterilmiştir.

Siklotidler; Möbius, Braselet ve Tripsin inhibitörü olmak üzere üç alt sınıfa ayrılırlar. Möbius ve Braselet birbirine benzemekle beraber beşinci hattaki *cis*-Pro kalıntısının sırasıyla varlığı ve yokluğuna göre birbirinden ayrılırlar. İlaç tasarımı en fazla kullanılan siklotidlere, Möbius ve Tripsin inhibitörleri olarak sırasıyla kalata B1 ve *Momordica cochinchinensis* meyvesi tohumlarından izole edilen MCoTI-II peptidleri örnek olarak verilebilir. Braselet alt familyası peptidleri sentetik olarak elde edilmeye çalışıldıklarında peptidin doğal formundaki konformasyonun elde edilememesi nedeni ile çalışmalarda çok fazla tercih edilmemektedirler (Gunasekera vd., 2009, Aboye vd., 2011).

Siklotidlerin yüksek kararlılıklarına ek olarak birçok önemli biyoaktiviteye de sahip oldukları yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. Bu peptidlerin en önemli görevi bitkiyi haşerelere karşı koruma olduğu *Helicoverpa* larvalarının büyümesini engellediklerinin gözlemlenmesiyle anlaşılmıştır (insektisit) (Jennings vd., 2005)(Şekil 3.3). Ayrıca, nematisit, mollusisit, anti-HIV ve antimikrobiyal aktiviteye de sahip oldukları birçok çalışmada rapor edilmiştir (Jennings vd., 2001, Plan vd., 2008, Daly vd., 2009, Craik 2012). Dikkat çekici bu farmakolojik özelliklerinden dolayı birçok araştırma grubu bitki peptidleri üzerine araştırmalar yapmaktadırlar.

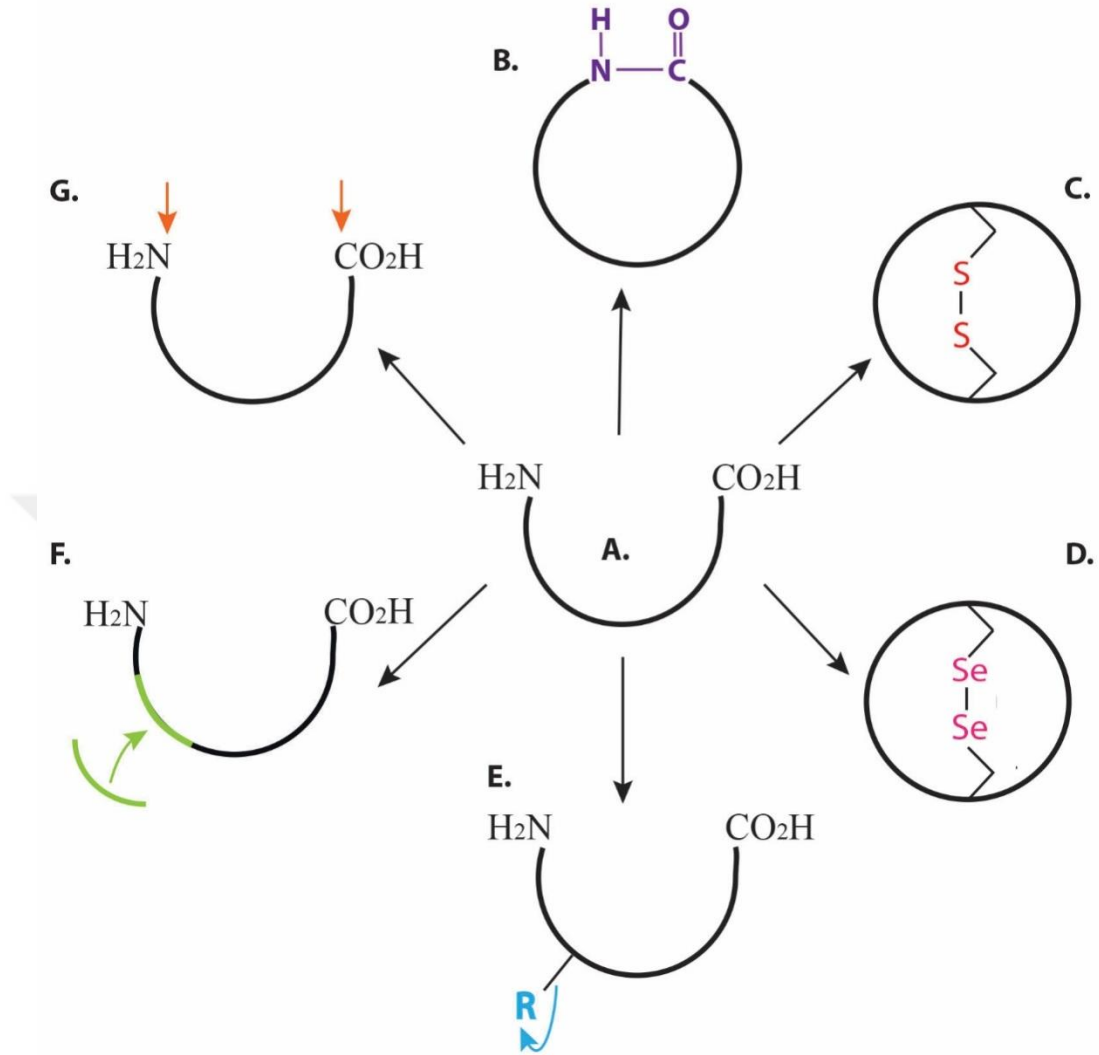


Şekil 3.3. Kalata B1 siklotidinin *Helicoverpa* larvalarının büyümelerini inhibe edici etkisi. Bu şekil Jennings ve arkadaşlarının çalışmasından alınmıştır (Jennings vd., 2001). Kalata B1 ile beslenen larvaların normal besin ile beslenen larvalardan kat kat küçük olduklarının görülmesi ile bu tür zararlı larvalar ile mücadelede doğal peptidlerin zararlı tarım ilaçlarına karşı alternatif olabilecekleri görülmüştür.

Siklotidlere antimikrobiyal etki kazandıran pozitif yük, membran aktivitelerinde son derece önemlidir. Pozitif yüklü siklotidler, tümör hücresi, bakteri ve patojen hücrelerinin membranlarındaki negatif yük ile elektrostatik olarak etkileşerek hücrelerin membranlarını parçalar ve hücre içine girebilirler. Möbius ve braselet siklotidlerinin membrandaki zar lipidlerinden olan fosfotiletanolaminin (PE) varlığıyla veya yokluğuyla ilişkili olarak biyoaktivitelerinin değiştiği ve bu siklotidlerin PE'ye karşı yüksek affiniteleri çalışmalarda rapor edilmiştir (Henriques vd., 2012, Henriques vd., 2015). Bununla birlikte PE'ye afinitesi olmayan MCoTI-II, membrandaki fosfatidilinositol (PI) ve fosfat asitleri (PA) ile etkileşimi sonucunda hücre içine girebilmektedir (Cascales vd., 2011, de Veer vd., 2017). Ayrıca siklotidlerin özellikle Glu kalıntısının bulunduğu birinci hat membran parçalayıcı aktivite için son derece önemlidir. Birinci hat üzerinde yapılan aşılama çalışması sonucunda siklotidlerin bu aktivitesinin büyük ölçüde azaldığı görülmüştür (Burman vd., 2014). Möbius alt familyasına ait olan varv A, varv F ve braselet alt familyasına ait cycloviolacin O2 peptidlerinin sitotoksik etkilerinin araştırılması için yapılan bir çalışmada, lösemi hücrelerinin normal hücrelere oranla membranlarında daha fazla negatif yüklü fosfatidilserin içermesi sebebi ile bu peptidlerin normal hücrelere oranla kanserli hücreler ile daha fazla etkileşerek seçici sitotoksik etki gösterdikleri de rapor edilmiştir (Burman vd., 2014).

4. PEPTİD KARARLILIĞININ ARTTIRILMASI İÇİN KULLANILAN STRATEJİLER

Peptidler önemli biyoaktivitelere sahip olmalarına rağmen mide içeriğinin düşük pH'sı ve tripsin, kimotripsin, pepsin, karboksi peptidazlar gibi proteazlara karşı duyarlılıkları nedeniyle oral olarak alındıklarında tıpkı proteinler gibi parçalanırlar ve böylelikle biyoaktiviteleri azalır. Tedavi için sıklıkla alınması gereken ilaçlar enjeksiyon ile alınacak ise bu yol hastalar tarafından pek tercih edilmez. Örneğin, peptid yapılı insülin hormonu vücut içerisindeki çeşitli proteazlara karşı duyarlı olduğundan diyabet tedavisinde insülin enjeksiyon ile uygulanır. Peptid yapılı ilaçlar zayıf oral biyoyararlanımlarından dolayı parenteral enjeksiyon ile verilir. Bu nedenle peptid yapılı öncü ilaç molekülünün biyoaktivitesini etkilemeden proteazlara karşı dirençli olacak şekilde kararlılığını çeşitli stratejilerle artırılması gerekmektedir. Bu stratejilerin en önemlileri peptid sekansına doğal olmayan aminoasitlerin eklenmesi, peptid omurgasının siklizasyonu ve aşılama yöntemleri olarak sıralanabilir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Peptid biyoaktivitesini etkilemeden proteazlara karşı dirençli olacak şekilde peptid kararlılığını arttırmak için uygulanabilecek stratejiler. **A.** peptid yapısı. **B.** siklizasyon. **C.** disülfid köprüsü eklenmesi. **D.** diselenoid köprüsünün eklenmesi. **E.** amino asitlerin streokimyasal olarak ters çevrilmesi (D-amino asitlerin kullanılması). **F.** aşılama. **G.** terminal kısımların kapatılması.

4.1. Peptid Analogları

Sekansta doğal olmayan aminoasitleri barındıran peptid analogları, proteazlara karşı peptid stabilitesini arttırmak için kullanılabilecek stratejilerden biridir. 2011 yılında yapılan bir çalışmada prostat karsinoma hücrelerine spesifik olarak bağlanan DUP-1 peptidi serum içerisinde 10 dakika gibi kısa bir sürede bozunurken, peptid sekansının doğal olmayan D-aminoasitlerle değiştirilmesiyle peptidin kararlılığı artırılmıştır (Askoxylakis vd., 2011).

Polybia paulista böceği zehrinden izole edilen Polybia-CP, 12 amino asit kalıntılı antimikrobiyal peptiddir. 2017 yılında Jia ve arkadaşları bu peptidin kararlılığını optimize etmek amacı ile doğal olmayan D-aminoasitler ile analogunu sentezlemişler ve sonucunda peptidin kararlılığının arttığı rapor edilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada antimikrobiyal etkinin az miktarda azalmasına rağmen peptidin hemolitik etkisinin doğal Polybia-CP'ye göre belirgin bir şekilde azaldığı da görülmüştür (Jia vd., 2017).

Bitki kaynaklı kalata B1 peptidi birçok önemli biyoaktivitesini hücre membranı ile elektrostatik etkileşimi ile gerçekleştirir. 2011 yılında Sando ve arkadaşları D-aminoasitler ile kalata B1 analogu sentezlemişler ve doğal formdaki kalata B1'e göre hücre membranı üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda D-kalata B1'in daha düşük hemolitik aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca D-kalata B1'in membran affinitesi daha az olmakla birlikte etkisi devam etmiştir (Sando vd., 2011).

Matriptaz-2 inhibitörleri, kanser hücrelerinin metastazının baskılanmasında ve fizyolojik demir konsantrasyonunun düzenlenmesinde önemli enzimlerdir. SFTI-1 peptidinin güçlü matriptaz-2 inhibitörü olduğu rapor edilmiştir (Long vd., 2001). Gitlin-Domagalska ve arkadaşları matriptaz-2 enzimini inhibe edecek SFTI-1 analogları sentezlemiş ve test etmişlerdir. SFTI peptidinin 5. aminoasidi Lys yerine Arg amino asidi kullanıldığında peptidin inhibitör aktivitesi 10 kat arttırılabilmektedir. İkinci aminoasit Arg'i D-enantiyomeri ile değiştirdiklerinde ise peptid analoglarının en seçici matriptaz inhibitörleri oldukları ve insan serumu içinde 24 saatin sonunda oldukça yüksek oranda bozunmadan kalabildikleri rapor edilmiştir. Ayrıca, siklik ve disülfid köprüsüne sahip olan analogların sadece disülfid köprüsüne sahip olan lineer analoglara göre daha güçlü inhibitör özelliğine sahip oldukları da aynı çalışmada rapor edilmiştir (Gitlin-Domagalska vd., 2017).

Tümör ile ilişkili U87MG ve HUVEC hücrelerinin reseptörlerini tanıyan GICP ve A7R iki farklı heptapeptiddir. Zhang ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada GICP ve A7R'nin D-enantiyomerleri ^DA7R ve ^DA7R-GICP olarak üç farklı peptid sentezlemiş ve bu peptidlerin çeşitli testlerle biyoaktiviteleri incelenmiştir. GICP peptidi serum içerisinde dört saatten daha az sürede tamamen bozunurken, ^DA7R peptidi 12 saatten daha uzun süre bozunmadan kalabilmiştir. Gly ve Cys aminoasitleri ile birleştirilmiş ^DA7R-GICP peptidinin kararlılığı da GICP'e göre belirgin bir şekilde artmıştır ve peptidin tümör ve tümörle ilişkili damarlardaki birikiminde artış görüldüğü rapor edilmiştir (Zhang ve Lu 2018).

Sığır antimikrobiyal peptidi BMAP28, konağın immün sistemine önemli katkı sağlar. 2011 yılında Kindrachuk ve arkadaşları bu peptidin proteazlara karşı düşük kararlılığını iyileştirmek amacı ile D-amino asitli analogu ve hem D-amino asitli hem de stereokimyasal olarak ters çevrilmiş analogu üzerinde denemeler yapmışlardır. Çalışmanın sonunda peptid kararlılığı artırılırken, peptidin sitotoksik etkisinin de azaldığını rapor edilmiştir (Kindrachuk vd., 2011).

Tek aminoasit değişikliğiyle elde edilen aşılınmış peptid, nokta mutasyonlu peptid olarak bilinir. Örneğin kalata B1 peptid sekansındaki belirli aminoasitlerin, Lys amino asidi ile değiştirilmesiyle siklotidler'in nematisit etkinlikleri artırılmıştır (Huang vd., 2010).

Akrep zehrindeki 48 amino asitli mauriporin peptidinden elde edilen ZXR-1, 16 amino asit uzunluğunda antikanser peptiddir. 2016 yılında Zhou ve arkadaşları ZXR-1 peptid sekansındaki 14. amino asit Lys ile Leu amino asitlerini yer değiştirerek nokta mutasyonlu ZXR-2 peptidini tasarlamış ve sentezlemişler. Bu çalışma sonucunda ZXR-2 peptidi, ZXR-1'e göre daha gelişmiş antikanser aktiviteye sahip iken yarılanma ömrü azalmıştır (Zhou vd., 2016).

Akrep zehrinden elde edilen diğer bir peptid, CTX 36 amino asit kalıntısına sahiptir. 2016 yılında Ojeda ve arkadaşları peptidinin iki ayrı lizin kalıntısını arjinin ile değiştirmiş ve buna ek olarak Tyr aminoasidini de Trp aminoasidi ile değiştirerek iki farklı peptid analogu tasarlamışlardır. Sentezlenen peptidlerin, serum kararlılığı ve hücresel alım özellikleri CTX'e göre artmıştır (Ojeda vd., 2017).

İndirgeyici koşullarda kararlı olmayan α -konotoksin ImI peptidinin farklı disülfid izomerlerindeki disülfid bağlarının düşük redoks potansiyelli diselenoid bağları ile değiştirilmesiyle (sistein amino asitlerinin selenosistein amino asidi ile değiştirilmesi) peptid kararlılığının arttığı görülmüştür. Ayrıca diselenoid bağları içeren bu peptidlerin $\alpha 7$ nikotinik asetilkolin reseptörleri (nAChR) üzerindeki aktivitelerini de korudukları rapor edilmiştir (Armishaw vd., 2006).

Bir diğer çalışmada da Muttenthaler ve arkadaşlarının dokuz amino asit kalıntılı oksitosin nöropeptidinin sahip olduğu disülfid bağını diselenoid bağı ile değiştirilmeleri sonucunda peptidin insan serumundaki kararlılığının yaklaşık % 28 oranında artırılabilirdiği rapor edilmiştir (Muttenthaler vd., 2017).

Diselenoid bağı analogları için bir diğer çalışma da nematod *Caenorhabditis elegans* intestinalinden izole edilen caenopore-5 proteinidir. Üç disülfid bağına sahip olan bu proteinin bir disülfid bağına diselenoid bağı ile değiştirilmesi ile proteinin penetrasyon özellikleri korunurken, kararlılığı ve aktivitesinde artma görülmüştür (Medini vd., 2016).

Bahsedilen stratejilere ek olarak peptid sekansının stereokimyasal olarak ters çevrilmesi, FDA onaylı bir polimer olan polietilenglikol (PEG) ile peptidin kovalent bağlanması, peptidin N- ve C-uçlarının kesilmesi veya kapatılması ile de peptid kararlılığının artırılacağı birçok çalışmada rapor edilmiştir (Craik ve Adams 2007, Yin 2014).

4.2. Peptid Omurgasının Siklizasyonu

Peptid kararlılığını iyileştirmek amacıyla geliştirilen stratejilerden belki de en önemlisi olan siklizasyon, siklotidler gibi peptidlerin halkalı yapılarından dolayı yüksek kararlılığa sahip olmalarının ortaya çıkmasıyla lineer peptid yapılı ilaç adaylarının daha kararlı hale getirilmesinde kullanılmaya başlanmıştır (Clark vd., 2012). Lineer peptidlerin üç boyutlu yapılarını bozmayacak fakat kararlılıklarını arttıracak biçimde peptidin N- ve C-uçları arasındaki mesafeye uygun uzunlukta amino asitlerden oluşan bağlaç zincirler veya köprüler kullanarak peptid uçlarının birleştirilmesiyle proteolitik enzimlere karşı daha dirençli peptid yapılarının elde edilmesi sağlanabilmektedir (Şekil 4.2).



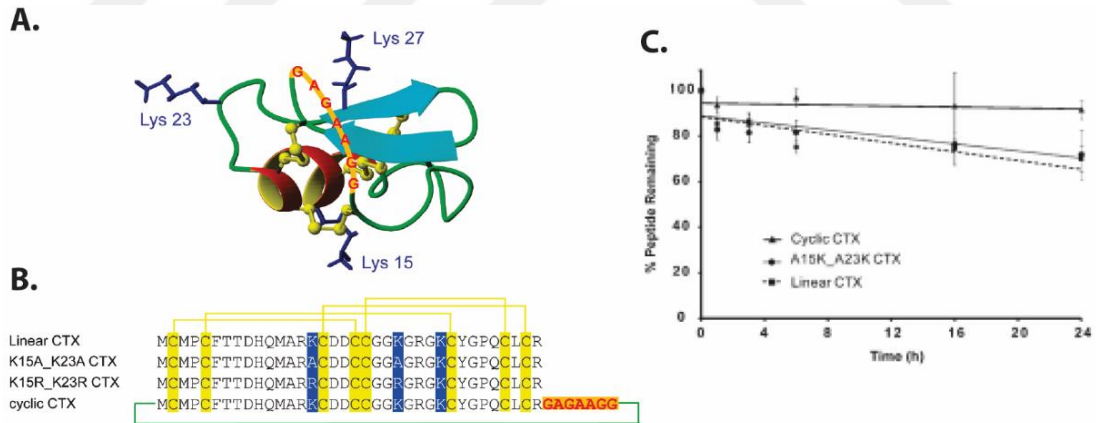
Şekil 4.2. Siklizasyon. Peptidin N- ve C-uçları arasına uygun uzunluktaki bağlaç amino asit zinciri eklenerek iki ucun peptid bağı ile birleştirilmesi sonucunda daha kararlı peptidler oluşabilmektedir. Lineer peptid omurgası kırmızı, bağlaç amino asit zinciri ise yeşil renk ile gösterilmiştir.

Konotoksinler lineer yapılarından dolayı proteolitik enzimlere karşı sınırlı kararlılığa sahiptirler. Bu peptidlerin kararlılıklarının artırılması için siklizasyon yöntemi en çok tercih edilen yöntemlerden biri olmuştur. Örneğin, lineer MII konotoksini nAChR inhibitörü bir peptiddir. 2005 yılında Clark ve arkadaşları tarafından rapor edilen çalışmada, bu peptidin N- ve C-uçları arasına moleküler etkileşimin en az düzeyde olması için Ala ve Gly

aminoasitlerinden oluşan üç farklı sayıda bağlaç amino asit zinciri tasarlanmış ve peptidin cMII-5, cMII-6 ve cMII-7 (sırasıyla beş, altı ve yedi amino asit uzunluğunda bağlaç zincir kullanılmış) olmak üzere üç adet siklik versiyonu sentezlenmiştir. Peptidin katlanması NMR analizleri ile kontrol edildiğinde cMII-5 peptidinin yapısının doğal MII peptidinin yapısından farklı olduğu, cMII-6 ve cMII-7 peptidlerinde ise hem üç boyutlu doğal yapının korunduğu hem de peptid kararlılığının arttığı rapor edilmiştir (Clark vd., 2005).

Bir diğer önemli çalışma ise 2010 yılında yine Clark ve arkadaşlarının yapmış olduğu α -konotoksin Vc1.1 peptidinin siklizasyon çalışmasıdır. Bu çalışmada da peptidin üç boyutlu yapısı dikkate alınarak N- ve C-uçları arasındaki mesafeye uygun olarak altı amino asitli bağlaç zincir (GGAAGG) ile peptid siklize edilmiştir (Clark vd., 2010). Siklizasyon sonrası peptidin üç boyutlu yapısı korunmuş ve kararlılığı lineer Vc1.1'e göre % 46 oranında artmıştır.

Tümör hücrelerine spesifik bağlanan akrep zehri peptidi klorotoksin'in serum kararlılığı 2011 yılında Akcan ve arkadaşlarının siklizasyon çalışması ile artırılabilmiştir. Bu çalışmada yedi aminoasitli bağlaç zincir (GGAAGAG) kullanılmış ve 24 saatin sonunda peptid serum kararlılığı % 20 oranında artmıştır (Şekil 4.3)(Akcan vd., 2011).



Şekil 4.3. Akrep zehri peptidi CTX'in siklizasyonu. **A.** Lineer CTX'in yapısı. **B.** Peptid sekansındaki Lys'lerin Ala veya Arg aminoasitleri ile modifikasyonu ve peptid omurgasının yedi amino asitli bağlaç zincir kullanılarak siklizasyonu. **C.** Siklizasyon çalışması sonrasında CTX'nin kararlılığı % 20 oranında artmıştır. Bu şekil Akcan ve arkadaşlarının çalışmasından alınmıştır (Akcan vd., 2011).

Chan ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada antimikrobiyal peptid olan gomesinin siklize edilmesi ile doğal gomesin yapısına göre peptid kararlılığının ve HeLa hücrelerine karşı sitotoksitesinin arttığı görülmüştür (Chan vd., 2013).

Konotoksin gm9a ve bru9a peptidleri, farklı *Conus* cinslerinden izole edilen inhibitör sistin düğüm (ICK) motifine sahip lineer peptidlerdir. 2015 yılında Akcan ve arkadaşları gm9a ve bru9a peptidlerini üç amino asitli bağlaç zincir (GLP) kullanarak siklize etmişlerdir. Peptidlerin insan serumu içindeki kararlılığı az miktarda da olsa artmıştır (Akcan vd., 2015).

Eşek arısı zehir peptidi mastoparan (MP-C) 14 aminoasit kalıntılı, antimikrobiyal ve antikanser aktiviteye sahip bir peptiddir. Chen ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada bu peptidin her iki ucuna sistein amino asidi eklenmesi ile peptid omurgası siklik hale getirilerek MP-C'nin serum içerisindeki kararlılığı artırılmış fakat antimikrobiyal aktivitesi azalmıştır (Chen vd., 2018).

KLA peptidi, apoptoz indüklemeye özelliğine ve 14 amino asit kalıntısına sahiptir. Hyun ve arkadaşları değiştirdikleri amino asitlere göre üç farklı KLA peptid dimeri tasarlamış ve sentezlemişlerdir. Ala amino asitlerinin, Cys amino asitleri ile değiştirilmesi sonucunda oluşturulan dimer peptidinin, diğer analoglara göre daha heliks bir yapıya ve hücre penetrasyon yeteneğine sahip olduğu rapor edilmiştir (Hyun vd., 2014).

Son gerçekleştirilen bir diğer örnek çalışmada ise Lawrence ve arkadaşları sıtmaya karşı kullanım potansiyeli olan ilaç adayı PF4 proteininin belirli bir sekans bölgesinin oluşturduğu peptidi, esnek bağlaç amino asit kullanılarak lineer dimer formunu ve bu lineer peptid yapısına bir disülfid bağı ekleyerek disülfid köprülü dimer analogunu sentezlemişler ve sonrasında kararlılık ve biyoaktivite analizlerini yapmışlardır. Çalışma sonunda, dimer peptidin *P. Falciparum* protozoinun büyümesini inhibe edici özelliğini koruduğu, serum içerisindeki kararlılığının önemli oranda arttığı ve peptidin herhangi bir hemolitik aktiviteye sahip olmadığı rapor edilmiştir (Lawrence vd., 2018).

4.3. Peptid Epitopların Aşılması

Biyoaktif lineer peptid epitoplarının kararlılığını arttırmak amacıyla kararlılığı kanıtlanmış peptid iskeleleri üzerine yerleştirilmesi **aşılama** olarak bilinmektedir. Aşılama ile lineer epitopun vücutta kalma süresinin arttığı aşağıda da verilen literatür çalışmalarında rapor edilmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Kararlı peptid iskeleleri üzerine yapılan diğer aşılama çalışmalarına örnekler.

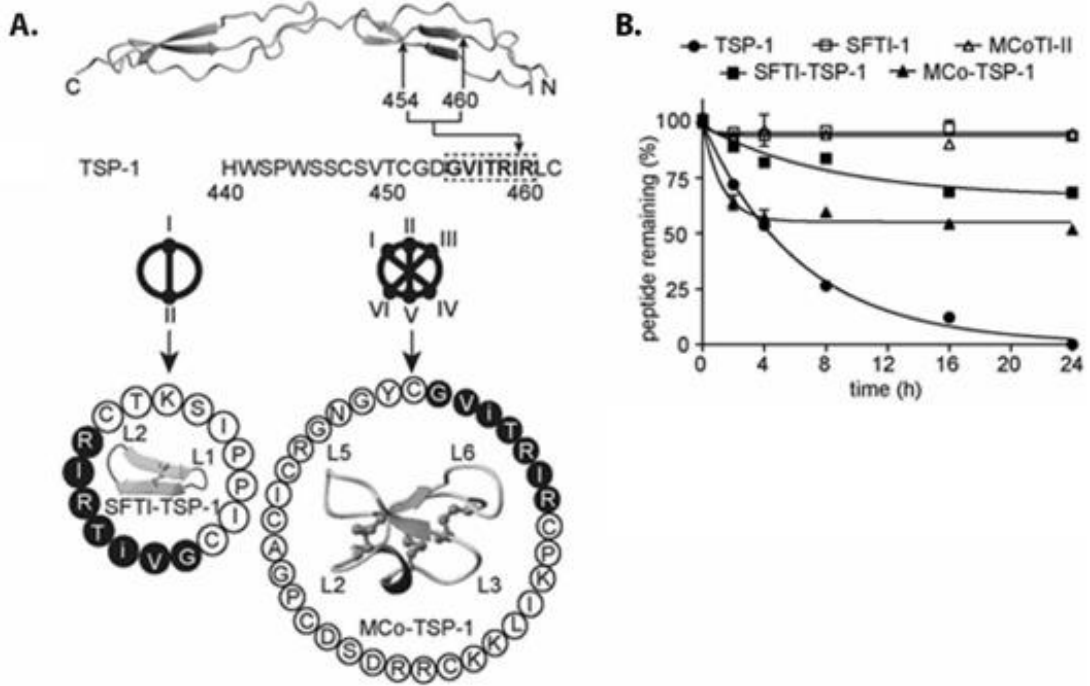
İskele	Aktivite	Endikasyon	Kaynakça
SFTI-1	Matriptaz İnhibitörü	Kanser	(Quimbar vd., 2013)
SFTI-1	Tau aggregation inhibitörü	Alzheimer hastalığı	(Wang vd., 2016)
SFTI-1	Kallikrein ile ilişkili peptidaz inhibitörü	Kanser	(Jendrny ve Beck-Sickinger 2016)
Kalata B1	Melanokortin reseptör 4 agonisti	Obezite	(Eliassen vd., 2012)
Kalata B1	Dengue NS2B–NS3 proteaz inhibitörü	Dang humması	(Gao vd., 2010)
MCoTI-II	SET antagonisti	Kanser	(D'Souza vd., 2016)

Kalata B1, MCoTI-II ve SFTI-1 peptidleri kimyasallara, ısıya ve enzimlere karşı kararlı olan ilk karakterize edilmiş bitki türevli peptidler olduklarından bugüne kadar birçok peptid yapılı ilaç geliştirme çalışmasında diğer peptidlere oranla daha fazla kullanılmışlardır. Bu peptidler katı faz peptid sentez (SPPS) yöntemleri ile sentezlenebildikleri ve doğal yapılarındaki konformasyona benzer şekilde kolayca katlanabildikleri için literatürdeki aşılama çalışmaları genellikle bu peptidler üzerinde uygulanmıştır.

Literatürdeki aşılama çalışmaları daha çok siklotidlerin sekans değişikliklerine karşı toleranslı olduğu görülen altıncı hattı üzerinde gerçekleştirilir. Çünkü, CCK motifinin birinci ve dördüncü hatları ana merkezi oluştur ve sınırlı sayıda aminoasit barındırırlar (1. hat 3-4, 4. hat ise yalnızca bir amino asit). İkinci hat ise tuz köprüleri oluşturabildiğinden peptid katlanması için önemlidir. Peptid iskelesinin ve aşılamanın yapılacağı hat kadar peptid epitopunun yapı ve özellikleri de önemlidir. Abdul Ghani ve arkadaşları kalata B1 ve MCoTI-II'nin karşılıklı bazı hatlarını değiştirerek yapının ve biyoaktivitenin etkisini incelemişler ve CCK motifinin kovalent bağ etkileşimleri gerçekleşmediği takdirde bozulmayacak kadar dayanıklı olduğunu fakat nokta mutasyonu dâhil küçük değişikliklerle bile biyoaktivitenin büyük oranda değişebildiğini rapor etmişlerdir (Abdul Ghani vd., 2017). Bu nedenle aşılama çalışmaları yapılmadan önce literatür bulguları dikkatle incelenmelidir (Craik ve Du 2017, Wang ve Craik 2018).

Trombospondin-1 (TSP-1), anti-antiyogenez etkisine sahip yedi amino asitli peptid parçasıdır. Bu peptidin kararlılığını arttırmak için 2015 yılında Chan ve arkadaşları MCoTI-II

ve SFTI-1 kararlı iskelelerine TSP-1 epitopunu aşlamışlardır. Sentezlenen her iki aşlanmış peptid için de, doğal TSP-1'nin sahip olduğu biyoaktivite korunurken, peptid epitopunun kararlılığı da artmıştır (Chan vd., 2015)(Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Tripsin inhibitör peptidleri üzerine trombospondin-1 (TSP-1) peptid epitopunun aşılması. **A.** TSP-1 peptid epitopu ve SFTI-1 iskelesinin ikinci hattı ile MCoTI-II iskelesinin altıncı hattına aşılması. **B.** TSP-1 peptid epitopu aşlanmış peptidlerin (SFTI-TSP-1 ve MCo-TSP-1) kararlılığı belirgin olarak artmıştır. Bu şekil Chan ve arkadaşlarının çalışmasından alınmıştır (Chan vd., 2015).

SFTI-1 peptid iskelesi üzerine yapılan diğer bir çalışmada da, ağrı ve vazodilatör ile ilişkili dokuz amino asit kalıntısına sahip kararsız bradikinin peptidi SFTI-1 peptidinin her iki hattı üzerine ayrı ayrı aşlanmış ve peptid lineer ve siklik olarak iki şekilde sentezlenmiştir (Qiu vd., 2017). Mevcut çalışmada sentezlenen her bir peptidin kararlılığı belirgin olarak artmıştır. Aynı çalışmada, lineer peptidlerin bradikinin peptid epitopuna ve siklik aşlanmış peptidlere oranla daha az tripsin aktivitesi sergilediği de rapor edilmiştir.

Aynı yıl Caceres ve arkadaşları inflamatuvar barsak hastalıklarına karşı kullanım da umut veren MC-12 peptidini SFTI-1 peptid iskelesinin çeşitli yerlerinde halkalı ve disülfid köprülü ve sadece disülfid köprülü yapılar olacak şekilde aşlamışlardır. Bu çalışmanın sonucunda halkalı ve disülfid köprüsüne sahip olan aşlanmış peptid analiz boyunca serum

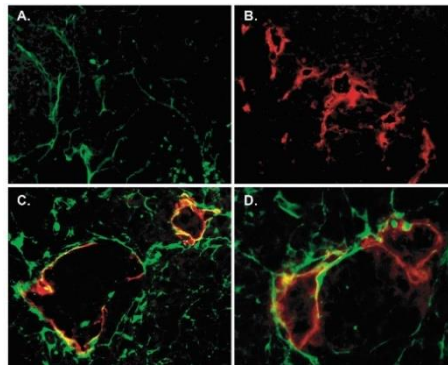
içerisinde oldukça kararlı iken diğer sentezlenen peptidlerin kararlılıklarının iyileştirilmesinde sadece disülfid köprüsünün yeterli olmadığı görülmüştür (Cobos Caceres vd., 2017).

Aşılama çalışmaları genellikle lineer peptid epitopunun biyoaktif özelliğinin geliştirilmesi için altıncı hat üzerinde uygulanırken, peptid epitopunun büyük olduğu veya peptide çift özellik kazandırılması istenildiği durumlarda aynı anda iki farklı hat üzerinde aşılama yapılabilir. Örneğin, bir merkezi sinir sistemi hastalığı olan multiple skleroz (MS) için 21 amino asitli ilaç öncülü MOG peptidinin kısmi sekansları kalata B1 iskelesinin 5. ve/veya 6. hatlarına aşılannmıştır. Kararlılık denemeleri yapıldığında; lineer peptid epitoplarının hızlıca bozunduğu fakat aşılannmış peptidlerin kararlı oldukları görülmüştür. Ayrıca kalata B1 peptidi az miktarda hemolitik aktivite gösterirken, aşılannmış peptidlerde hemolitik aktivite gözlenmemiştir (Wang vd., 2014).

5. LyP-1 PEPTİDİ

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde bölünmesi ve diğer sağlıklı dokulara yayılabilmesi ile sonuçlanan bir hastalıktır. Günümüzde ölüm sebeplerinin ikinci büyük kısmını oluşturduğundan toplum için önemli bir tehdit unsurudur. Mevcut kemoterapi ilaçları hedefe spesifik olmamaları nedeniyle sağlıklı dokuları da etkileyerek organ yetmezliği gibi ciddi yan etkiler oluştururlar. Antikanser peptidler ise hedef hücreye karşı spesifik olmalarının yanı sıra yüksek terapötik potansiyelleri ve hücre penetrasyon özellikleri ile dikkatleri üzerine toplamış ilaç aday molekülleridir. Bu peptidler oluşturdukları inhibitör, nekroz ve apoptotik biyoaktivitelerine göre sınıflandırılabilir (Hu vd., 2016).

Apoptotik biyoaktiviteye sahip LyP-1 peptidi, N- ve C-uçlarında sistein aminoasidine sahip dokuz amino asit kalıntılı (CGNKRTRGC) bir peptiddir (Laakkonen vd., 2002). Faj görüntüleme teknolojisi ile elde edilen LyP-1 peptidinin meme kanseri hücrelerine rekombinant olmayan fajdan çok daha fazla bağlandığı rapor edilmiştir. Peptid floresan boya ile birleştirildiğinde peptidin lenf tümör hücrelerinde lokalize olduğu ve hücre çekirdeğinde biriktiği görülürken, kan damar hücreleri ile lokalize olmadığı görülmüştür (Laakkonen vd., 2004)(Şekil 5.1). LyP-1 peptidi ayrıca MDA-MB-435 kanser hücrelerine bağlanabilirken, lösemi HL-60 ve melanoma C8161 hücrelerine bağlanamamaktadır (Laakkonen vd., 2002). Peptidin sağlıklı hücrelerden daha çok hipoksik ortam oluşturan tümör hücrelerinde ifade edilen p32 proteinine de bağlanabildiği rapor edilmiştir (Fogal vd., 2008).



Şekil 5.1. LyP-1 peptidinin kan damar belirteçleri ile lokalize değil iken lenf tümörleri ile lokalize olduğunun konfokal mikroskopu ile gösterilmesi. **A.** ve **B.** LyP-1 peptidi ile kan damarlarının ayrı yerlerde olduklarını göstermektedir. **C.** ve **D.** ksenografları ise peptidin, lenf damar belirteçleri ile lokalize olduğunu göstermektedir. Yeşil renk peptidi, kırmızı renk ise

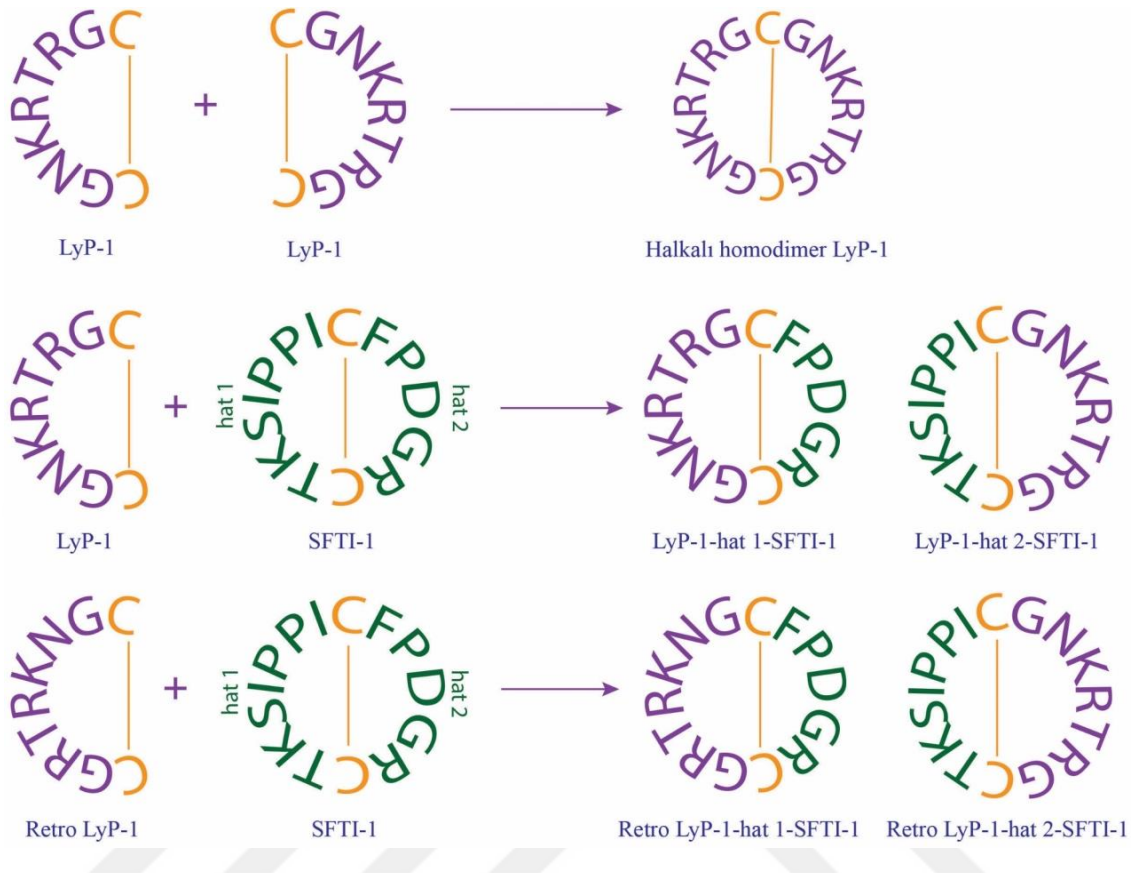
damar belirteçlerini belirtir. Bu mikroskop görüntüleri Laakkonen ve arkadaşlarının çalışmasından alınmıştır (Laakkonen vd., 2002).

LyP-1 peptidi terapötik önemine rağmen peptidlerin sahip olduğu düşük kararlılık dezavantajına sahiptir. LyP-1 peptidinin kararlılığını arttırmak için Conibear ve arkadaşları siklotid MCoTI-II ve θ -defensin BTD-2 iskelelerinin çeşitli hatlarına aşılama çalışmaları yapmışlar ve kararlılıklarına ek olarak sitotoksik aktivitelerini de analiz etmişler. Sentezledikleri her bir analog LyP-1 peptidinden belirgin bir şekilde kanda daha fazla kalabilmiştir (Conibear vd., 2016).

Aynı amaçla yapılan diğer bir çalışma da LyP-1 peptidinin terminal kısımlarındaki Cysamino asitlerinin selenosistein amino asitleri ile değiştirilmesi ile diselenoid bağlarının oluşturulmasıdır. Li ve arkadaşlarının 2013 yılında yapmış oldukları bu çalışmada, LyP-1 peptidinin p32 proteinine bağlanabilirliği korunurken, kararlılığının da iyileştirildiği rapor edilmiştir (Li vd., 2013).

Son yapılan bir çalışmada da Zhang ve arkadaşları LyP-1 peptidinin son Cys amino asitini Ala ile değiştirdikten sonra (CGNKRTRGA) peptidin siklik ve stereokimyasal olarak ters analogunu sentezlenmişler ve uygulanan bu strateji ile LyP-1 peptidi % 25 serum içerisinde neredeyse hiç bozunmadan kalmıştır. Ancak peptid analogunun p32 proteinine bağlanması ve tümör hücrelerine alınımlı azalmıştır (Zhang vd., 2018).

Bu tez çalışmasında, LyP-1 peptidinin kararlılığının siklizasyon ve aşılama yöntemleri ile artırılması amaçlanmıştır. Daha kararlı peptid elde etmek için ilk olarak LyP-1 peptidinin peptid bağı ile siklize edilmiş halkalı homodimer versiyonu sentezlenmiştir. Aşılama çalışmaları için ise kararlı SFTI-1 peptid iskelesi kullanılmıştır. SFTI-1'in 1. ve 2. hatları üzerine ayrı ayrı LyP-1 peptidi sekansı aşılanmıştır. Son olarak da endo- ve ekzo-peroteazlara karşı seçiciliğinin azaltılması ve sonucunda kararlılığın artırılması amacı ile LyP-1 peptid sekansı ters-sekans (retro veya invers sekans) şeklinde SFTI-1'in her iki hattına aşılanmıştır (Şekil 5.2) ve sentezlenen peptidlerin kararlılıkları 24 saat boyunca insan kan serumunda inkübe edilerek analiz edilmiştir. Ayrıca her bir peptidin kırmızı kan hücrelerine karşı toksik etkisini saptamak amacı ile hemolitik aktiviteleri de incelenmiştir.



Şekil 5. 2. Sentezlenen peptidlerin amino asit sekansları. Cys amino asitleri ve oluşturdukları disülfid bağları turuncu renk ile gösterilmiştir. LyP-1 peptid sekansı mor renk, SFTI-1 peptid sekansı ise yeşil renk ile gösterilmiştir.

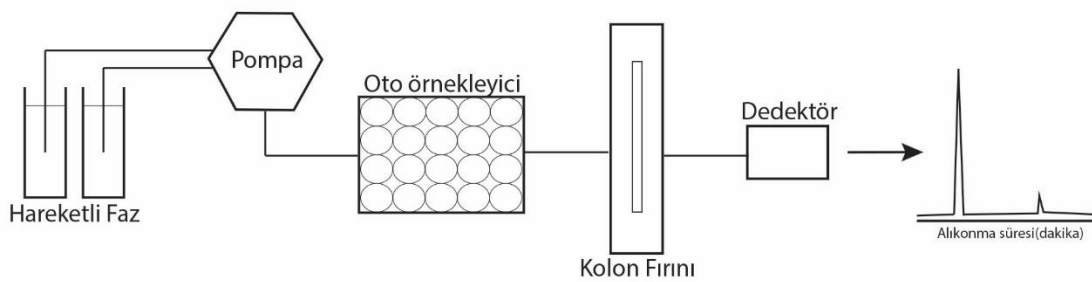
6. MATERİYAL VE METOD

6.1. Kullanılan Cihazlar

Bu tez çalışmasında ters faz yüksek basınçlı sıvı kromatografisi sentezlenen peptidlerin saflaştırılması ve fraksiyonların saflıklarının belirlenmesinde, kütle spektrometresi peptid kütlelerinin kontrol edilmesinde ve UV plaka okuyucu ise peptidlerin hemolitik aktivitelerinin tespit edilmesi için kullanılmıştır.

6.1.1. Ters faz yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (RP-HPLC)

Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC), sıvı fazdaki numunenin kolona tutunması ve yüksek basınç ile eluentler tarafından polaritesine göre ayrılmasını sağlayan bir analitik ayırma yöntemidir. Yüksek ayırma gücü ve hızlı analiz imkânı önemli avantajlarındandır. Numune içerisindeki bileşenleri alıkonma sürelerine göre fraksiyonlarına ayırmada ve fraksiyonların saflığının belirlenmesinde kullanılır. HPLC cihazı hareketli faz, yüksek basınçla akışı kontrol eden pompa, oto örnekleyici, kolon fırını ve dedektör olmak üzere beş kısımdan oluşur (Şekil 6.1). Kolon fırını, analiz boyunca kolunun sıcaklığını sabit tutmak için kullanılır. Ters faz yüksek basınçlı sıvı kromatografisi'nde (RP-HPLC) hareketli faz asetronitril gibi polar çözücülerden oluşurken, sabit faz apolar 18 karbonlu bir hidrokarbon ile modifiye edilmiş silika jel'den (C18 kromatografi kolonu) oluşur.



Şekil 6.1. HPLC de sıvı akışının şematik gösterimi. Cihaz, hareketli faz, pompa, oto örnekleyici, kolon fırını ve dedektör olmak üzere beş kısımdan oluşur.

Bu tez çalışmasında LyP-1 ve diğer sentezlenen peptidlerin saflaştırılmasında, saflık yüzdelere belirlenmesinde ve serum kararlılıklarının tespit edilmesinde Shimadzu L20 marka RP-HPLC cihazı kullanılmıştır. Cihaza ait bilgiler Çizelge 6.1'de verilmiştir. Hareketli faz olarak Tampon A ($H_2O/\%0,05$ TFA (v/v)) ve Tampon B ($\%90$ $CH_3CN/\%10$ $H_2O/\%0,045$ TFA

(v/v/v)) kullanılmıştır. Dedektör olarak UV dedektör kullanıldı ve 215 nm ile 280 nm dalga boyundaki absorbans değerleri kullanılarak analizler gerçekleştirildi.

Bu tez çalışmasında preparatif, yarı preparatif ve analitik kolon kullanıldı. Preparatif kolon ile 80 mg'a kadar peptid saflaştırılabilir ve 8 mL/dakika akış hızına sahiptir. Diğer yandan yarı preparatif kolonla 10 mg'a kadar peptid saflaştırılabilirken 3 mL/dakika akış hızına sahiptir ve bu kolon preparatif kolona göre daha iyi ayırma kapasitesine sahiptir. Analitik kolon ise 0,3 mL/dakika akış hızına sahiptir ve peptidlerin saflıklarının belirlenmesinde kullanılmıştır. En iyi ayırma kapasitesine sahip kolondur (Çizelge 6.1).

Sentezlenen her bir peptidin saflaştırılmasında 8 mL/dakika ve 3 mL/dakika akış hızına sahip gradyent metodlar (% 1, % 0,5 ve % 0,25 gradyent) kullanıldı. Sentezlenen ve daha sonrasında üzerine farklı modifikasyonlar yapılarak son ürün haline getirilen peptidlerin saflığı ve serum kararlılıkları ise 0,3 mL/dakika gradyent metodlar(sırasıyla % 2 ve % 1 gradyent) ile tespit edildi.

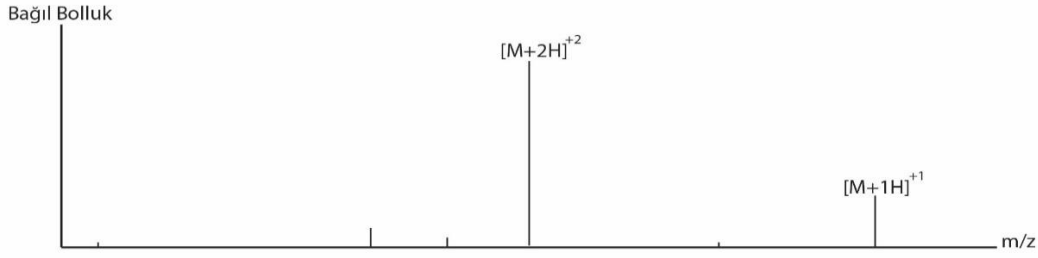
6.1.2. Kütle spektrometresi (MS)

Kütle Spektrometresi, moleküllerin iyon haline getirildikten sonra manyetik alanda kütle/yük (m/z) oranlarına göre ayrılmasını sağlayan cihazdır. Sırasıyla örnek verme sistemi, iyon kaynağı, kütle analizörü ve dedektör olmak üzere dört kısımdan oluşur. Çeşitli iyon kaynakları ve kütle analizörlerine göre ayrılmakta ve isimlendirilmektedir. Kütle spektrometreleri biyokimyasal analizlerde ve özellikle proteomiks çalışmaları için önem arz etmektedir. Protein/peptid kütle ve primer yapısının belirlenmesinde veya sentezlenen peptid sekansının doğruluğunu kontrol etmek amacıyla kullanılmaktadır.

Kütle spektrumunda, x eksenini bileşenlerin m/z oranlarını gösterirken y eksenini her birinin bağıl bolluğunu verir (Şekil6.2).

Bu tez çalışmasında da Sıvı Kromatografisi/Kuadrupol-Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi (Agilent Q-TOF LC-MS) ile kütle analizleri gerçekleştirildi.

Analizlerin yapıldığı cihazda iyon kaynağı olarak elektrosprey iyonizasyon (ESI) ve kütle analizörü olarak da kuadrupol-uçuş zamanı (Q-TOF) kullanıldı.



Şekil 6.2. Kütle spektrumu örneği. Biyomoleküller iyon haline getirildikten sonra manyetik alanda m/z oranlarına göre ayrılmaktadır. Yukarıdaki spektrumda bir peptide ait $[M+2H]^{+2}$ ve $[M+1H]^{+1}$ m/z oranları gösterilmiştir.

Çizelge 6.1. Kullanılan Cihazlar ve Teçhizatlar.

Kullanılan Cihazlar	Markası
Inertsil kolon 2.1x150mm, WP300, 5µm	Japonya
Inertsil kolon 10x250mm, WP300, 5µm	Japonya
Inertsil kolon 20x250mm, WP300, 5µm	Japonya
Inertsil koruyucu kolon 1,5x10mm, WP300, 5µm	Japonya
Kütle Spektrometresi (MS)	Agilent 6530 Accurate Q-TOF LC-MS, USA
Liyofilizatör	Telstar, LYOQUEST, İspanya
Manyetik karıştırıcı	Jeio tech, MS-17BB, Kore
pH metre	Ohaus, Starter3000, Çin
Rotary evaporatör	Heidolph, G5, Almanya
RP-HPLC	Shimadzu, L20, Japonya
RP-HPLC degazer	Shimadzu, DGU-20AT, Japonya
RP-HPLC kolon fırını	Shimadzu, CTO-10ASVP, Japonya
RP-HPLC otoörnekleyici	Shimadzu, SIL-20AHT, Japonya
RP-HPLC pompa	Shimadzu, LC-20AT, Japonya
RP-HPLC UV dedektör	Shimadzu, SPD-20A, Japonya
Santrifüj	Sigma, 2-16KL, Almanya
Su banyosu	Wisd, WB11, Kore
Terazi	Ohaus, PA214C, USA
Ultra saf su cihazı	Merck Millipore
UV plaka okuyucu	BMG LABTECH, SPECTROstar, Almanya
Vortex	Jeio tech, VM-96B, Kore

6.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kullanılan kimyasal maddeler Çizelge 6.2 de verilmiştir.

Çizelge 6.2. Kullanılan kimyasalların isimleri ve temin edildikleri firmalar.

Kimyasal Madde	Firma Adı
1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate, <i>N</i> -[(Dimethylamino)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo-[4,5-b]pyridin-1-ylmethylene]- <i>N</i> -methylmethanaminium hexafluorophosphate <i>N</i> -oxide (HATU)	Chem-Impex Int'I Inc.
2-klorotritil klorür reçine (2-CTC)	Merck
Amonyum Hidrojen Karbonat (NH ₄ HCO ₃)	Alfa Aesar
Asetonitril	Merck
Dietileter	Merck
Diklorometan	Merck
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	Merck
Fmoc-Asn(Trt)-OH	Merck
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	Merck
Fmoc-Cys(Trt)-OH	Merck
Fmoc-Gly-OH	Merck
Fmoc-Ile-OH	Merck
Fmoc-Lys-(Boc)-OH	Merck
Fmoc-Phe-OH	Merck
Fmoc-Pro-OH	Merck
Fmoc-Ser(Trt)-OH	Merck
Fmoc-Thr(tBu)-OH	Merck
Formik Asit	Fisher Scientific
Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS)	Gibco
İnsan kan serumu	Sigma-Aldrich
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl- <i>O</i> -(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate, <i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU)	Chem-Impex Int'I Inc.
<i>N,N</i> -Diisopropiletilamin	Merck

Çizelge 6.2. Kullanılan kimyasalların isimleri ve temin edildikleri firmalar(devam).

Kimyasal Madde	Firma Adı
<i>N-N</i> -Dimetilformamid	Merck
Piperidine	Acros Organics
Trifloroasetik asit	Fisher Scientific
Triisopropylsilane	Sigma-Aldrich
Trikloroasetik asit	Acros Organics
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Üre	Merck

6.3. Katı Faz Peptid Sentezi

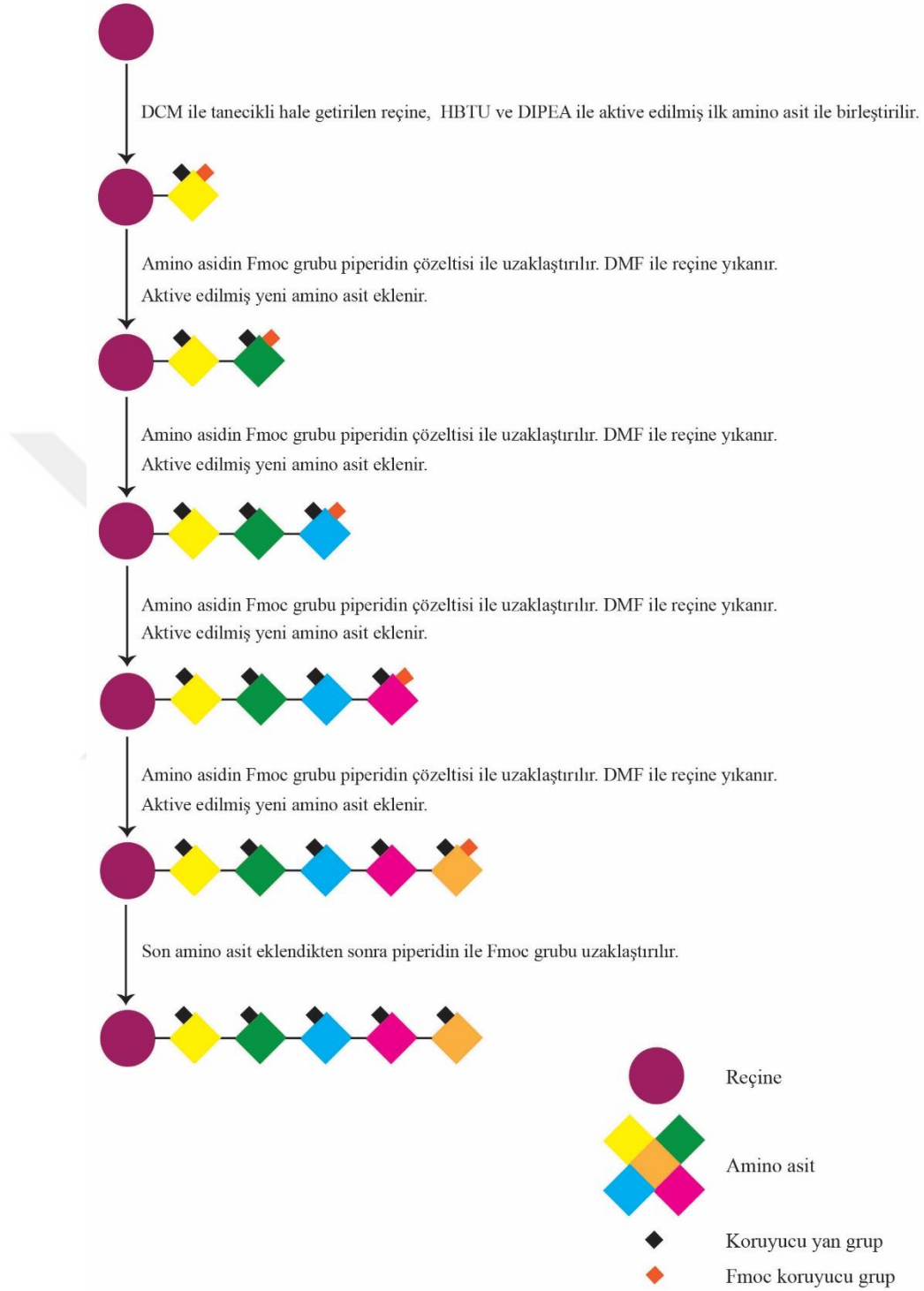
Katı faz peptid sentezi (SPPS) 1963 yılında Robert Bruce Merrifield tarafından geliştirmiştir. Bu metod çözücü içerisinde çözünmeyen ve fonksiyonel grup taşıyan polimer reçine üzerine amino asitlerin teker teker eklenmesini ve oluşan peptid zincirinin yan ürünler ve reaksiyona girmeyen reaktiflerden kolayca arınabilmesini sağlar. Ayrıca bu metod, sentez sürecinin daha kolay ve hızlı gerçekleşmesini de sağlamaktadır (Merrifield 1963).

Peptidler, katı faz peptid sentez yöntemi ile sentezlenebilir. SPPS, amino grubundaki koruyucu gruba göre 9-florometiloksikarbonil (Fmoc) veya ter-butoksikarbonil (Boc) olarak ikiye ayrılır. Fmoc veya Boc grubu, peptid sekansı oluşturulurken amino asit yan gruplarının reaksiyona girmemesi için kullanılmaktadır. Boc koruyucu grubu bir sonraki aminoasit eklenmeden önce TFA ile uzaklaştırılırken, Fmoc koruyucu grubu piperidin/DMF çözeltisi ile uzaklaştırılır. Boc koruyucu grubuna sahip amino asitlerle gerçekleştirilen sentez sonrası, oluşturulan peptid zincirinin reçineden kırılması ve daha sonra koruyucu yan grupların uzaklaştırılması aşamasında toksik hidrojen florür (HF) kullanılır. HF yerine TFA kullanılması sebebiyle Fmoc katı faz peptid sentez yöntemi daha yaygın olarak kullanılmaktadır (Behrendt vd., 2016). Bu tez çalışmasında halkalı peptidler Fmoc katı faz peptid sentez yöntemi ile sentezlendi.

6.3.1. Fmoc katı faz peptid sentezi

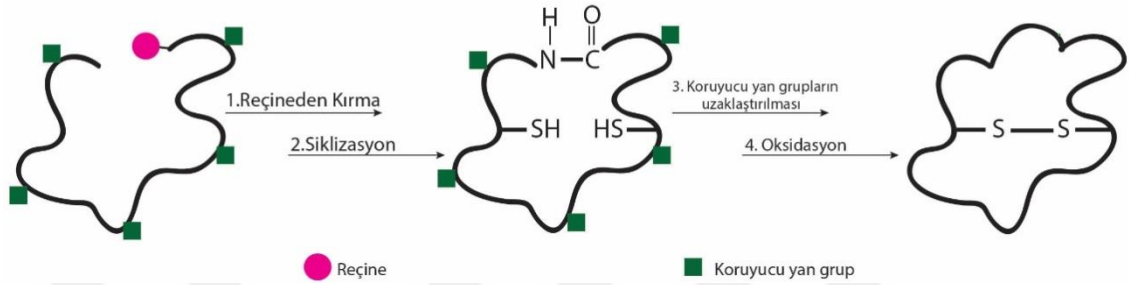
Fmoc katı faz peptid sentez yönteminde reçine üzerine istenilen amino asitlerin eklenmesi ile lineer peptidler sentezlenebilir. Elde edilen peptidler siklizasyon yöntemi ile siklik hale getirilir, koruyucu yan grupların kırılması ve sonrasında oksidasyon reaksiyonu ile de peptidin disülfid köprüleri oluşturulur (Malesevic vd., 2004, Akcan ve Craik 2013, Cheneval vd., 2014).

Tasarlanan peptid iskelesinin C-ucundan N-ucuna doğru Fmoc koruyucu grubu içeren amino asitlerin 2-klorotritil klorür reçinesine (2-CTC) teker teker bağlanmasıyla istenilen peptid zincirleri elde edilmiş oldu. Peptid sentezinde 0,25 mmol ölçek kullanıldı. Bu amaçla bir gün önceden tanecikli hale gelmesi için diklorometan (DCM) içerisinde bekletilen 2-CTC reçinesi (0,19 g) ile C-terminaldeki ilk amino asit, *N,N*-Dimetilformamid (DMF) içerisinde hazırlanmış 0,5 M 4 mL *N,N,N',N'*-tetramethyl-*O*-(1*H*-benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate, *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU) ve 460 µL *N,N*-diizopropiletilamin (DIPEA) ile aktive edilerek birleştirildi. 30 dakika bekledikten sonra bağlanan aminoasidin Fmoc koruyucu grubu % 30 piperidin çözeltisi ile uzaklaştırıldı. Reçine üç defa DMF ile yıkandı ve sekansın ikinci amino asidi HBTU ve DIPEA ile aktive edildikten sonra 1. amino aside bağlandı. Bu şekilde sekanstaki tüm aminoasitler sırasıyla birbirine bağlanarak peptid sentezlendi (Şekil 6.3).



Şekil 6.3. Fmoc katı faz peptid sentez yönteminin şematik gösterimi. İlk amino asit aktive edilerek reçineye bağlanır. Peptidin Fmoc koruyucu grubu piperidin ile uzaklaştırılır ve sıradaki diğer amino asitler bu şekilde teker teker eklenir. Bu şekilde beş amino asitli bir peptidin sentezi örnek olarak verilmiştir.

Peptidler Fmoc SPPS ile reçineye bağlı olarak sentezlendikten sonra peptid reçineden kırıldı ve elde edilen linear peptidler siklizasyon yöntemi ile halkalı hale dönüştürüldü. Amino asitlerin koruyucu yan grupları uzaklaştırıldıktan sonra oksidasyon reaksiyonu ile de disülfid köprüleri oluşturuldu (Şekil 6.4).



Şekil 6.4. Halkalı ve aşılınmış peptidlerin elde edilmesi. Sırasıyla reçineye bağlı olarak linear peptidin sentezlenmesi, siklizasyonu ve oksidasyonu.

6.3.2. Reçineden kırma

Reçineye bağlı olarak sentezlenen peptidleri reçineden ayırırken, siklizasyon reaksiyonunun gerçekleştirilmesinde yan ürünlerin oluşmasını önlemek amacıyla bazı amino asit yan grupları üzerindeki koruyucu grupların peptid zinciri üzerinde kalması gerekir. Bu amaçla peptid bağlı reçineye DCM içinde hazırlanmış % 1'lik TFA çözeltisinden 10 mL eklenip 10 dakika bekletildi ve bu işlem 10 defa tekrarlanarak sentezlenen linear peptidler reçineden ayrılmış oldu. DCM, evaporatör ile uzaklaştırılıp peptid liyofilize edildi vesiklizasyon reaksiyonuna geçildi.

6.3.3. Siklizasyon ve koruyucu yan grupların uzaklaştırılması

Liyofilize edilen peptidin intramoleküler siklize olabilmesi için 2,0 mM'lık seyreltik peptid derişimi olacak şekilde DMF içerisinde çözüldü. Daha sonra 5,0 mM 1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate, *N*-[(Dimethylamino)-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridin-1-ylmethylene]-*N*-methylmethanaminium hexafluorophosphate *N*-oxide (HATU) ve 10 mM DIPEA eklenip üç saat manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak *N*- ve C-uç arasında peptid bağı oluşturuldu. Elde edilen siklik peptid liyofize edildi.

Siklizasyon sonrası peptid zinciri üzerindeki koruyucu grupların uzaklaştırılması için liyofilize edilen peptid 50 mL TFA:triizopropilsilan(TIPS):H₂O karışımı (95:2,5:2,5,v/v/v) içerisinde çözülüp 3,5 saat oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Süzme işleminden sonra TFA evaporatör ile uzaklaştırıldı ve kalan kısım ayırma hunisine aktarıldı. Soğuk dietil eter ve tampon çözeltilerle (Tampon A-Tampon B, % 50/50 (v/v)) birkaç kez ekstrakte edildi. Sulu fazda olan peptid liyofilize edildi ve sonra RP-HPLC ile saflaştırıldı. RP-HPLC ile ayrılan fraksiyonların kütleleri kütle spektrometresi ile belirlendikten sonra istenilen kütlelere sahip olan fraksiyonlar birleştirildi ve liyofilize edildi.

6.3.4. Oksidasyon

Oluşan halkalı peptidin disülfid köprülerinin oluşturulması için konsantrasyonu 0,3 mg/mL olacak şekilde liyofilize edilmiş peptid 0,1 M NH₄HCO₃ (pH 8,3) çözeltisi içerisinde 24 saat boyunca manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. RP-HPLC ile ayrılan fraksiyonların doğruluğu için kütle spektrometresi kullanıldı. İstenilen kütlelere sahip olan fraksiyonlar analitik RP-HPLC ile alıkonma sürelerine göre karşılaştırıldı ve saflıkları belirlendi.

6.4. Serum Kararlılığı

Sentezlenen peptidlerinin serum kararlılığı, peptidlerin kan serumu içerisindeki proteazlara karşı kararlılıklarını belirlemek amacı ile gerçekleştirildi. İnsan kan serumu (Sigma Aldrich) 15000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek içerisindeki lipidlerden ayrıldı. Serum ve peptid çözeltisi üç farklı ependorf tüp içerisinde karıştırıldı ve 37 °C de sıcak su banyosunda 24 saat bekletildi. Sıcak su banyosunda bekleyen örneklerden 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12 ve 24 saat aralıklarında 40 µL alındı ve reaksiyonun durdurulması amacıyla üzerine 6 M 40 µL üre eklendi. 4 °C de 10 dakika bekletildi ve üzerine 40 µL %20 trikloroasetikasit (TCA) eklendi ve tekrar 4 °C de 10 dakika bekletildi. 15000 rpm' de 10 dakika santrifüj edilerek serum içindeki TCA ile çöken kısımlar ayrıldı. Süpernatant kısmı alınıp (90 µL) analitik RP-HPLC ile analiz edildi. Piklerin altında kalan alan pik integrasyonu ile hesaplanıp, kalan peptid miktarına karşı zaman grafiği çizildi.

6.5. Hemolitik Aktivite

Sentezlenen peptidlerinin hemolitik aktiviteleri farklı konsantrasyonlardaki peptidlerin kırmızı kan hücrelerine karşı toksik etkilerinin olup olmadığını tespit etmek amacı ile gerçekleştirildi. İlk önce yaklaşık beş damla insan kanı, fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) içerisine eklenerek 4000 rpm'de bir dakika santrifüj edildi. Bu işlem süpernatant kısmı

berraklaşana kadar tekrarlandı. Son santrifüjden sonra süpernatant kısmı uzaklaştırıldı ve kırmızı kan hücrelerinin (KKH) konsantrasyonu % 0,25 olacak şekilde tüp içerisine PBS eklendi. Test edilecek peptidlerin çözeltileri ise 2 mg/mL, 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,125 mg/mL, 0,0625 mg/mL, 0,0313 mg/mL, 0,016 mg/mL konsantrasyonlarında ve herbirinden 3'er tane olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan peptid çözeltilerinden 20 µL alınıp üzerine 100 µL KKH çözeltisi eklendi ve 37 °C de sıcak su banyosunda 1 saat bekletildi. Pozitif kontrol için %100 lizise sebep olan Triton X-100 ve negatif kontrol için % 0 lizis oluşturan PBS kullanıldı. Örnek çözeltiler gibi kontrollerden de 20 µL alınıp üzerine 100 µL KKH çözeltisi eklendi ve inkübe edildi. 150 RCF de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmından 100 µL alınıp 96 kuyucuklu plakaya aktarıldı. Absorbans 415 nm'de BMG-LABTECH marka UV plaka okuyucu ile ölçüldü ve her bir örnek için % hemoliz aşağıdaki formül ile hesaplandı.

$$\% \text{ Hemoliz} = \frac{(\text{Örneğin absorbansı} - \text{PBS absorbansı})}{(\text{Triton absorbansı} - \text{PBS absorbansı})} \times 100$$

7. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

7.1. Peptidlerin Sentezlenmesi, Saflaştırılması, LC-MS analizleri

Laakkonen ve arkadaşları 2002 yılında faj görüntüleme kütüphanesinden elde edilen LyP-1 peptidinin lenf tümörleri ile ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir. Kanser hücrelerine karşı spesifik ve apoptotik aktiviteye sahip olması, bu peptidin iyi bir antikanser ilaç aday molekülü olmasını sağlamıştır. Ancak zayıf kararlılık gibi önemli dezavantaja sahip olması da onun terapötik olarak kullanımını kısıtlamaktadır. Deniz toksin peptidlerinin kararlılığı siklizasyon çalışmaları ile arttığı ve de bitki türevli peptidler üzerinde yapılan aşılama çalışmalarının peptid serum kararlılığını iyileştirdiği literatürde fazlaca yer almaktadır. Bu tez çalışmasında da LyP-1 peptidinin kararlılığını arttırmak için halkalaştırma ve aşılama yöntemleri kullanıldı. Lineer LyP-1 peptidinin halkalaştırma reaksiyonu ile halkalı homodimer versiyonu ve kararlı doğal bir peptid olan SFTI-1 iskelesinin her iki hattına aşılantı versiyonları sentezlendi.

Çizelge 7.1’de verilen LyP-1 ve diğer tasarlanmış peptidler Fmoc SPPS metodu ile sentezlendi. Sentezlenen her bir peptid RP-HPLC ile saflaştırıldı. Peptidin sentezi ve katlanması Q-TOF LC-MS ile kontrol edildi.

Çizelge 7.1. Sentezlenen peptidler ve sekansları. Kalın çizgiler halkalı yapıları, ince çizgiler ise disülfid köprülerini göstermektedir.

Peptidler	Amino Asit Sekansları
LyP-1	CGNKRTRGC
Halkalı homodimer LyP-1	CGNKRTRGCNKRTRG
SFTI-1	CTKSIPPICFPDGR hat 1 hat 2
LyP-1-hat 1-SFTI-1	CGNKRTRGCFPDGR
LyP-1-hat 2-SFTI-1	CTKSIPPICGNKRTRG
Retro LyP-1-hat 1-SFTI-1	CGRTRKNGCFPDGR
Retro LyP-1-hat 2-SFTI-1	CTKSIPPICGRTRKNG

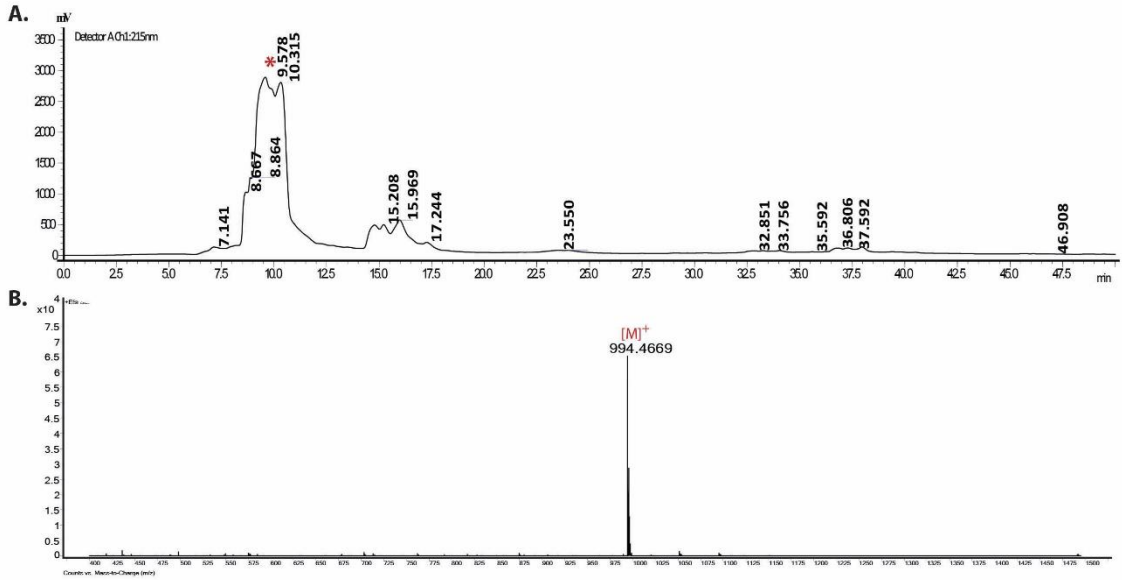
Sentezlenen her bir peptid yüksek saflıkta elde edildi. Aşağıdaki çizelgede peptidlere ait alıkonma süreleri, kütle ve % saflık değerleri verilmiştir (Çizelge 7.2).

Çizelge 7.2. Sentezlenen peptidlere ait alıkonma süreleri, kütle ve % saflık değerleri.

Peptidler	Alıkonma Süresi (dakika)	Teorik Kütle (Da)	Deneysel Kütle (Da)	% Saflık
LyP-1	2.9	992.14	991.46	> 98
Halkalı homodimer LyP-1	5.7	1744.00	1744.87	> 98
LyP-1-hat 1-SFTI-1	11.1	1546.76	1545.71	> 98
LyP-1-hat 2-SFTI-1	13.0	1711.05	1710.88	> 98
Retro LyP-1-hat 1-SFTI-1	10.4	1546.76	1546.94	> 98
Retro LyP-1-hat 2-SFTI-1	13.1	1711.05	1711.79	> 98

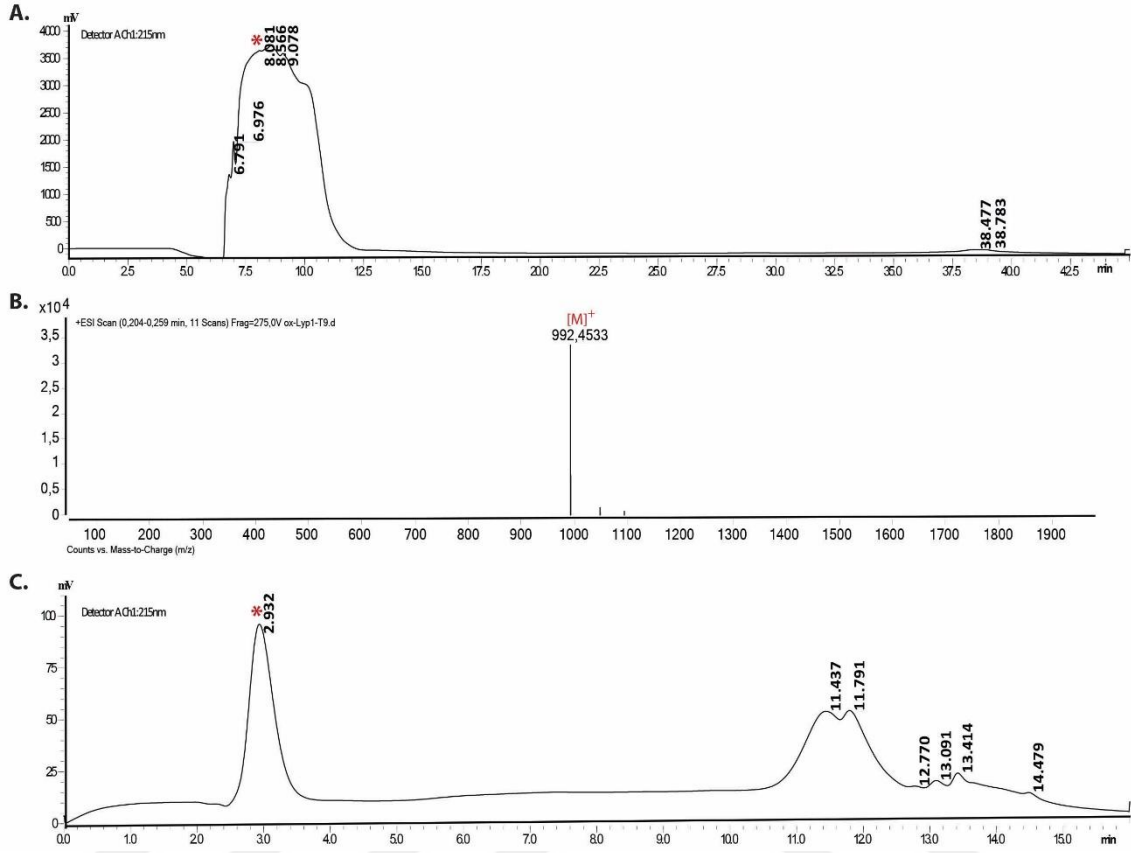
LyP-1 peptidi dokuz aminoasit kalıntısına ve 994,14 Da molekül ağırlığına sahiptir. 360 mg reçine kırıldıktan sonra 200 mg ham peptid elde edildi. Ham peptid karışımı 8 mL/dakika gradyent metodu ile saflaştırıldı ve kütle spektrometre analizinden sonra uygun fraksiyonlar liyofilize edildi. Aşağıda ham LyP-1 peptidine ait RP-HPLC kromatogramı ve LC-MS

spektrumu verilmiştir (Şekil 7.1). Yaklaşık 8-12 dakikaları arasında toplanan fraksiyonlarda 994,14 Da molekül ağırlığına sahip LyP-1 peptidinin olduğu görülmüştür.



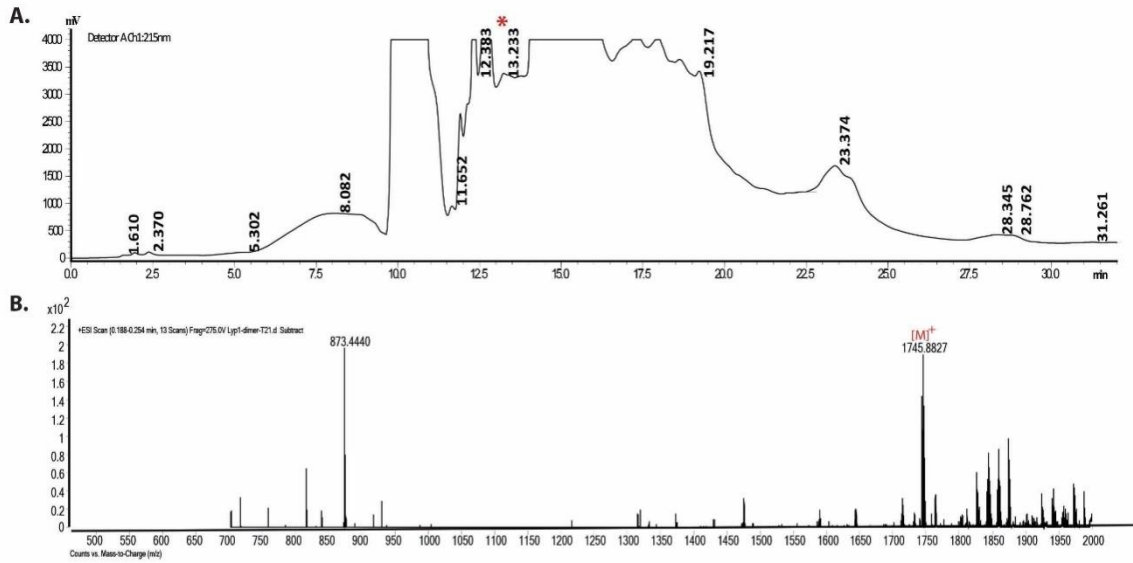
Şekil 7.1. LyP-1 peptidinin oksidasyon öncesine ait RP-HPLC kromatogramı ve LC-MS kütle spektrumu. **A.** Peptide ait RP-HPLC kromatogramı. Peptidin alıkonma süresi 8-12 dakikaları arasındadır. **B.** Peptidin $[M]^+$: 994,46 kütle/yük oranına sahip olması doğru sentezlendiğini kanıtlamaktadır.

Oksidasyon reaksiyonu ile LyP-1 peptidinin disülfid köprüsü oluşturuldu. Yaklaşık 90 mg peptid 0,1 M NH_4HCO_3 tampon çözeltisi (pH 8,3) içerisinde bir gün boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. Karışım doğrudan RP-HPLC'ye yüklenerek 8 mL/dakika gradyent metod ile saflaştırıldı. Okside olmuş LyP-1'e ait $[M]^+$: 992,45 kütle/yük oranına sahip fraksiyonlar birleştirilerek liyofilize edildi. Kütle datası peptidin disülfid köprüsünün oluştuğunu gösterirken, analitik RP-HPLC ile yapılan analizde peptidin >98 % saflıkta olduğu görüldü. Sentezlenen ve daha sonrasında oksidasyon reaksiyonu gerçekleştirerek son ürün haline getirilen LyP-1 peptidinden yaklaşık 52 mg elde edilmiştir. Peptid serum kararlılığı ve hemolitik aktivite denemelerine kadar buzdolabında -20 °C'de muhafaza edildi. Aşağıda oksidasyon sonrası LyP-1 peptidine ait RP-HPLC kromatogramları ve LC-MS spektrumu verilmiştir (Şekil 7.2).



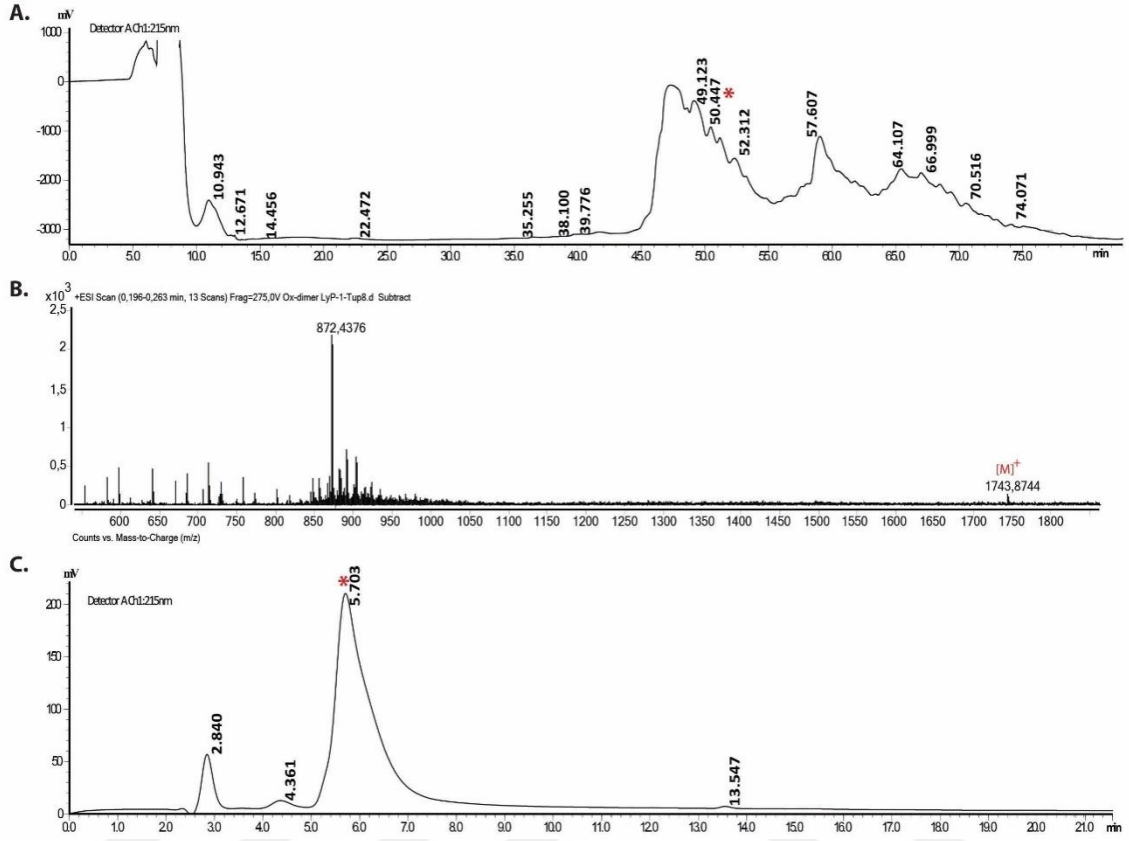
Şekil 7.2. LyP-1 peptidinin oksidasyon sonrasına ait RP-HPLC kromatogramları ve LC-MS kütle spektrumu. **A.** Oksidasyon sonrası peptidin RP-HPLC kromatogramı. **B.** Peptidin kütle spektrumu. **C.** Elde edilen LyP-1 peptidin yüksek saflıkta olduğu (>98%) ve alıkonma süresinin de 2,9 dakika olduğu görülmüştür.

İki LyP-1 peptidinin halkalaştırılması ve disülfid bağının oluşturulması şeklinde tasarlanan ve sentezlenen halkalı homodimer LyP-1 peptidi 16 aminoasit kalıntısına sahiptir. 426 mg reçine kırıldıktan sonra 300 mg ham peptid elde edildi. Halkalı hale getirilmiş peptid karışımı 8 mL/dakika gradyent metodu ile saflaştırıldı ve kütle spektrometre analizinden sonra uygun fraksiyonlar liyofilize edildi. Aşağıda halkalı homodimer LyP-1 peptidine ait RP-HPLC kromatogramı ve LC-MS spektrumu verilmiştir (Şekil 7.3). Yaklaşık 12-14 dakikaları arasında toplanan fraksiyonların [M]⁺: 1745,88 kütle/yük oranına sahip olması halkalı homodimer peptidinin doğru sentezlendiğini göstermektedir.



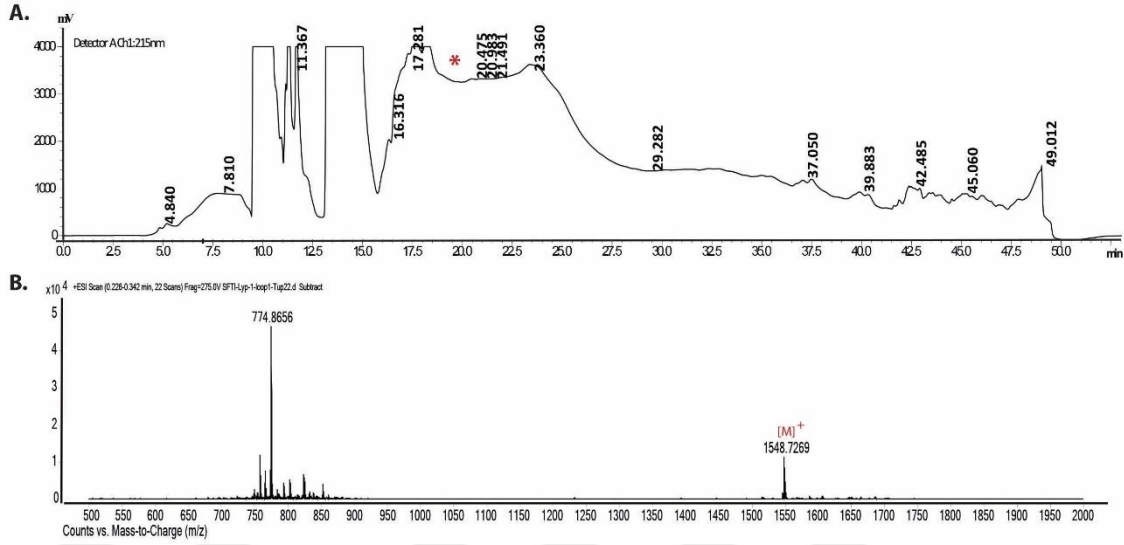
Şekil 7.3. Halkalı homodimer LyP-1 peptidinin oksidasyon öncesine ait RP-HPLC kromatogramı ve LC-MS kütle spektrumu. **A.** Halkalaştırma ve koruyucu yan grupların uzaklaştırılması sonrasında RP-HPLC kromatogramı. **B.** Kütle spektrometresi ile yapılan analizde 12-14 dakikaları arasında toplanan fraksiyonların $[M]^+$:1745,88 kütle/yük oranına sahip olmaları peptidin doğru sentezlendiğini göstermektedir.

Saflaştırma işleminden sonra halkalı homodimer LyP-1 peptidinin disülfid köprüsü oksidasyon reaksiyonu ile oluşturuldu. Yaklaşık 170 mg peptid 0,1 M NH_4HCO_3 tampon çözeltisi (pH 8,3) içerisinde bir gün boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. Karışım doğrudan RP-HPLC'ye yüklenerek 8 mL/dakika akış hızına sahip gradyent metod ile saflaştırıldı. Peptid oksidasyon sonrası 49-51 dakikaları arasında gelmektedir ve $[M]^+$: 1743,87 kütle/yük oranına sahiptir. Sentezlenen ve daha sonrasında siklizasyon ve oksidasyon yapılarak son ürün haline getirilen halkalı homodimer peptidinin toplam miktarı yaklaşık 2 mg elde edildi. Fakat diğer sentezlenen peptidlere kıyasla daha düşük verim ile elde edildi. Liyofilize edilen peptid serum kararlılığı ve hemolitik aktivite denemelerine kadar buzdolabında $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edildi. Aşağıda oksidasyon sonrası halkalı homodimer LyP-1 peptidine ait RP-HPLC kromatogramları ve LC-MS spektrumu verilmiştir (Şekil 7.4).



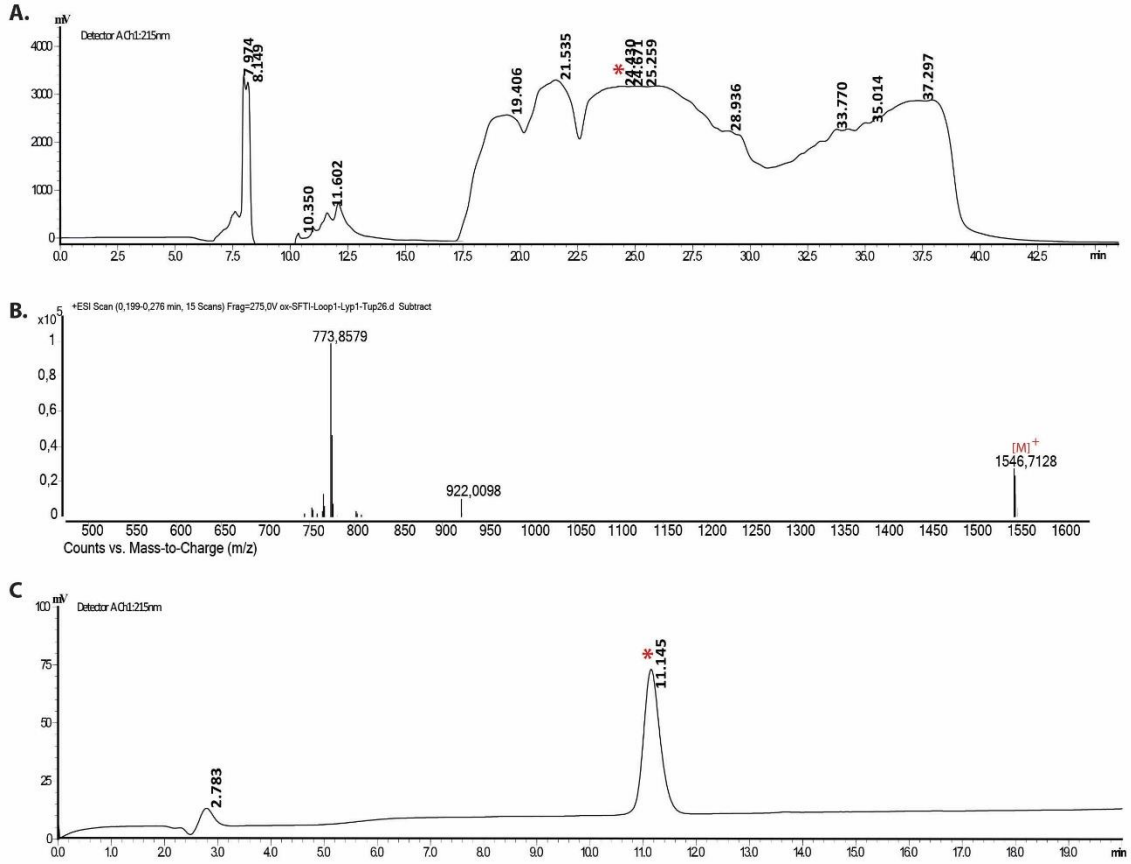
Şekil 7.4. Halkalı homodimer LyP-1 peptidinin oksidasyon sonrasında ait RP-HPLC kromatogramları ve LC-MS kütle spektrumu. **A.** Oksidasyon sonrası peptid fraksiyonlarının ayrılması için kullanılan metod ile peptid 49-51 dakikalar arasında gelmektedir. **B.** Kütle spektrometresi ile yapılan analizde okside olmuş peptide ait $[M]^+$:1743,87 kütle/yük oranının görülmesi disülfid köprüsünün oluştuğunu doğrulamıştır. **C.** Analitik RP-HPLC analizinde peptidin yüksek saflıkta olduğu ($> 98\%$) ve alıkonma süresinin de 5,7 dakika olduğu görülmüştür.

Doğal SFTI-1 14 aminoasit kalıntısına sahip kararlı bir peptiddir. LyP-1 peptidinin kararlılığını arttırmak amacıyla SFTI-1 peptid omurgasının birinci hattına LyP-1 peptidi aşılannmıştır. 433 mg reçine kırıldıktan sonra 312 mg ham peptid elde edildi. Halkalı hale getirilen peptid karışımı 8 mL/dakika gradyent metodu ile saflaştırıldı ve kütle spektrometre analizinden sonra uygun fraksiyonlar liyofilize edildi. Oksidasyon öncesi RP-HPLC ile saflaştırılan peptidin alıkonma süresi 15-22 dakikaları arasındır. Lineer aşılannmış peptid 1566,76 Da moleküler ağırlığa sahip iken peptid halkalaştırma reaksiyonu sonrasında su çıkışı (-18 Da) sebebi ile 1548,76 Da moleküler ağırlığına sahiptir. Aşağıda aşılannmış LyP-1-hat 1-SFTI-1 peptidine ait RP-HPLC kromatogramı ve LC-MS spektrumu verilmiştir (Şekil 7.5).



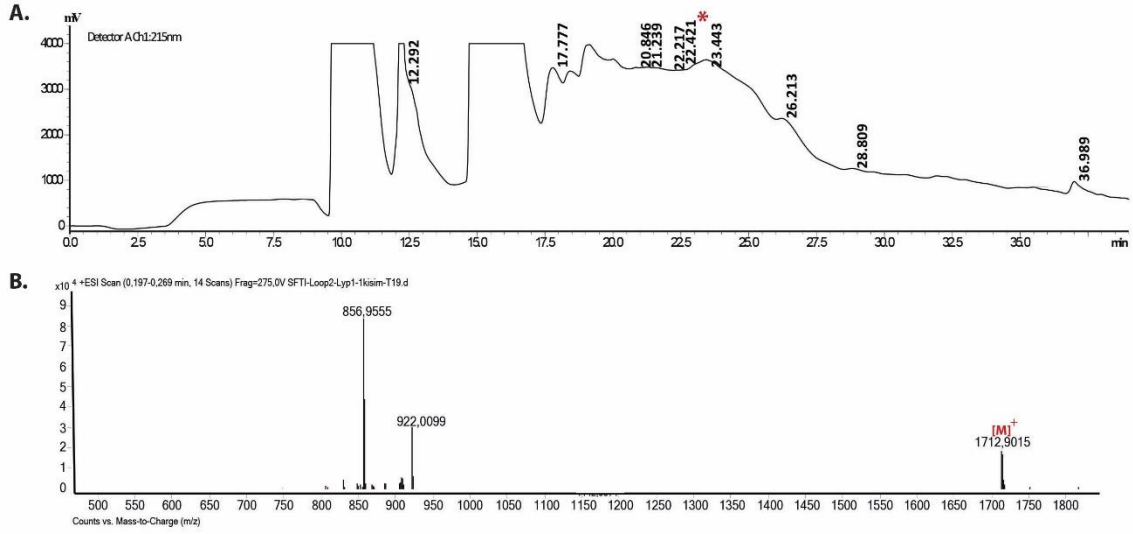
Şekil 7.5. LyP-1-hat1-SFTI-1 aşılınmış peptidinin oksidasyon öncesine ait RP-HPLC kromatogramı ve LC-MS kütle spektrumu. **A.** Oksidasyon öncesi RP-HPLC ile saflaştırılan aşılınmış peptid 15-22 dakikalari arası alıkonma süresine sahiptir. **B.** Halkalı aşılınmış peptide ait [M]⁺:1548,72 kütle/yük oranı peptidin doğru sentezlendiğini göstermektedir.

Aşağıdaki Şekil7.6' da LyP-1-hat1-SFTI-1 aşılınmış peptidinin oksidasyon sonrasına ait RP-HPLC kromatogramları ve LC-MS spektrumu verilmiştir. Yaklaşık 72 mg peptid 0,1 M NH₄HCO₃ tampon çözeltisi (pH 8,3) içerisinde bir gün boyunca oda sıcaklığında karıştırılarak peptidin disülfid köprüsü oluşturuldu. Karışım doğrudan RP-HPLC'ye yüklenerek 8 mL/dakika gradyent metod ile saflaştırıldı. Oksidasyon sonrası LyP-1-hat1-SFTI-1 aşılınmış peptidin alıkonma süresi 22-28 dakikalari ve moleküler ağırlığı 1546,71 Da'dur. Kütle spektrometre analizinden sonra uygun fraksiyonlar yeteri kadar saf olmadığı için peptid 3 mL/dakika gradyent metodu ile tekrar saflaştırıldı. Tekrar saflaştırma sonrasında analitik RP-HPLC ile yapılan analizde aşılınmış peptidin yüksek saflığa (>98 %) sahip olduğu görülmüştür. Sentezlenen ve daha sonrasında siklizasyon ve oksidasyon yapılarak son ürün haline getirilen LyP-1-hat 1-SFTI-1 peptidinden yaklaşık 20,3 mg elde edildi. Liyofilize edilen peptid serum kararlılığı ve hemolitik aktivite denemelerine kadar buzdolabında -20 °C'de muhafaza edildi.



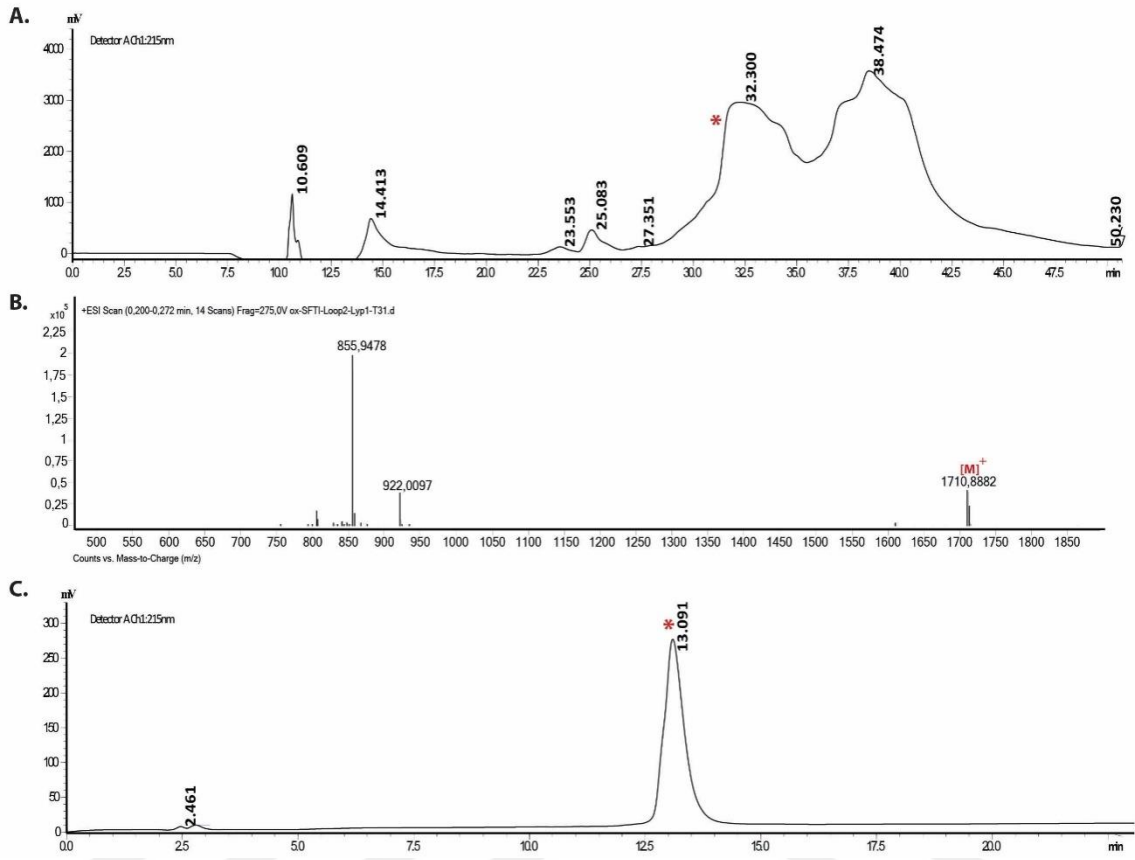
Şekil 7.6. LyP-1-hat1-SFTI-1 aşılınmış peptidinin oksidasyon sonrasına ait RP-HPLC kromatogramları ve LC-MS kütle spektrumu. **A.** Oksidasyon sonrası aşılınmış peptidin RP-HPLC kromatogramı. **B.** Halkalı ve tek disülfid bağına sahip aşılınmış peptidin monoisotopik moleküler ağırlığı 1546,71 Da dur. **C.** Son olarak analitik RP-HPLC analizinde peptidin yüksek saflıkta olduğu (> 98%) ve alıkonma süresinin de 11,1 dakika olduğu görülmüştür.

Ayrıca SFTI-1 peptid omurgasının ikinci hattına da LyP-1 peptid epitopu aşılandı. 500 mg reçine kırıldıktan sonra 380 mg ham peptid elde edildi. Halkalı hale getirilen peptid karışımı 8 mL/dakika gradyent metodu ile saflaştırıldı ve kütle spektrometre analizinden sonra uygun fraksiyonlar liyofilize edildi. Aşılınmış peptidin oksidasyon öncesi alıkonma süresi 20-25 dakikaları arasındadır. Sentezlenen aşılınmış peptidin lineer yapısı 1731,05 Da moleküler ağırlığa sahip iken siklizasyon sonrasında su çıkışı sebebiyle peptid 1713,05 Da moleküler ağırlığa sahiptir. Aşılınmış LyP-1-hat 2-SFTI-1 peptidine ait $[M]^+$: 1712,90 kütle/yük oranının görülmesi peptidin doğru sentezlendiğini göstermektedir. Aşağıda aşılınmış LyP-1-hat 2-SFTI-1 peptidine ait RP-HPLC kromatogramı ve LC-MS spektrumu verilmiştir (Şekil 7.7).



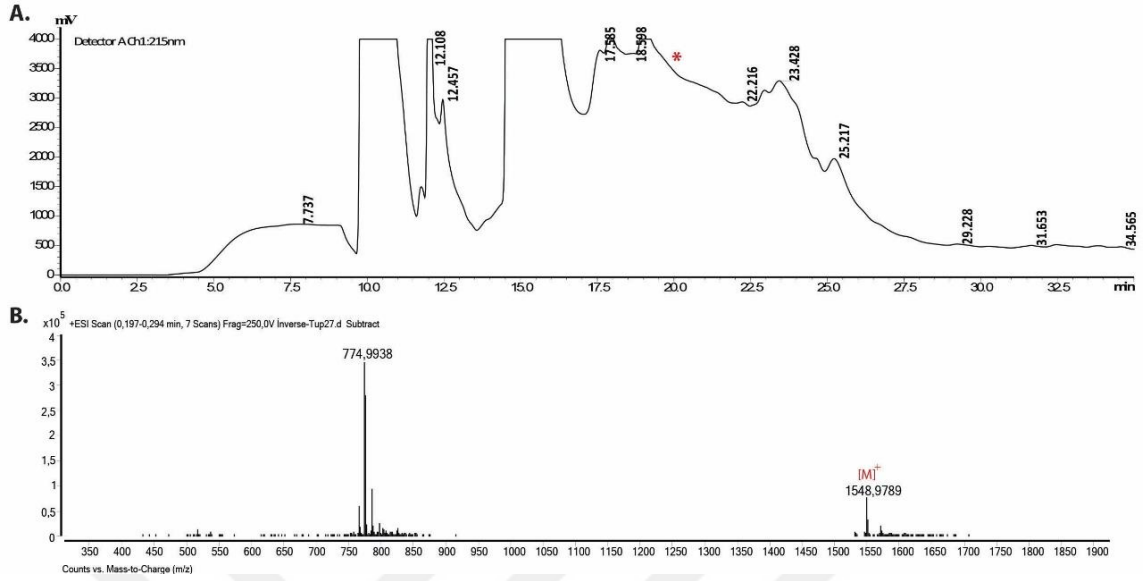
Şekil 7.7. LyP-1-hat 2-SFTI-1 aşılınmış peptidinin oksidasyon öncesine ait RP-HPLC kromatogramı ve LC-MS kütle spektrumu. **A.** Oksidasyon öncesi peptidin alıkonma süresi 20-25 dakika arasındadır. **B.** Spektrumda $[M]^+$: 1712,90 kütle/yük oranının görülmesi peptidin doğru sentezlendiğini gösterir.

Şekil 7.8 de LyP-1-hat 2-SFTI-1 aşılınmış peptidinin oksidasyon sonrasına ait RP-HPLC kromatogramları ve LC-MS spektrumu verilmiştir. Oksidasyon reaksiyonu ile LyP-1-hat 2-SFTI-1 aşılınmış peptidinin disülfid köprüsü oluşturuldu. Yaklaşık 160 mg peptid 0,1 M NH_4HCO_3 tampon çözeltisi (pH 8,3) içerisinde bir gün boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. Karışım doğrudan RP-HPLC'ye yüklenerek 8 mL/dakika gradyent metod ile saflaştırıldı. Peptidin alıkonma süresi 30-33 dakikaları arasındır. Halkalı peptidin moleküler ağırlığı 1712,90 Da iken oksidasyon sonrasında peptid 1710,88 Da moleküler ağırlığa sahiptir. Oksidasyon öncesi ve sonrasındaki 2,0 Da kütle farkı disülfid köprüsünün oluştuğunu doğrulamaktadır. Analitik RP-HPLC dataları peptidin yüksek saflıkta (>98%) olduğunu göstermektedir. Sentezlenen ve daha sonrasında siklizasyon ve oksidasyon yapılarak son ürün haline getirilen LyP-1-hat 2-SFTI-1 peptidinden yaklaşık 16 mg elde edilmiştir. Liyofilize edilen peptid serum kararlılığı ve hemolitik aktivite denemelerine kadar buzdolabında -20 °C'de muhafaza edildi.



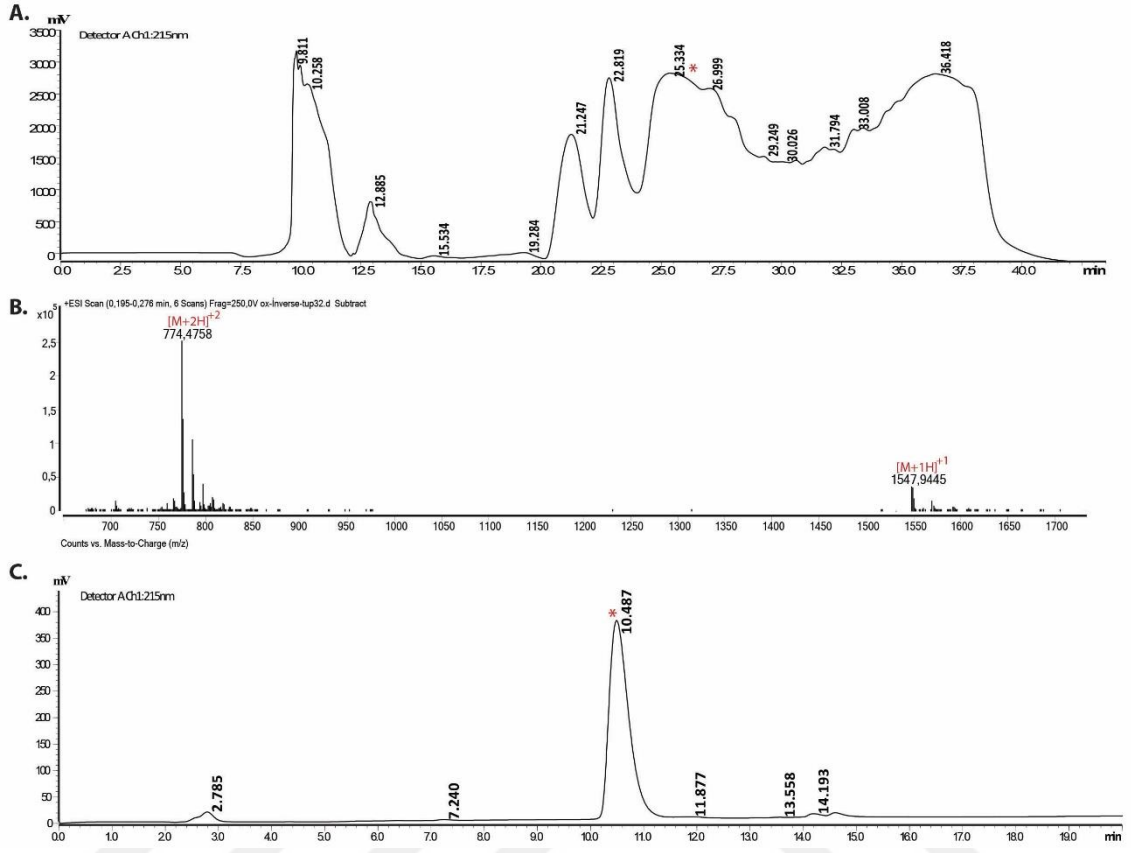
Şekil 7.8. LyP-1-hat 2-SFTI-1 aşılınmış peptidin oksidasyon sonrasında ait RP-HPLC kromatogramları ve LC-MS kütle spektrumu. **A.** Oksidasyon sonrasında peptidin RP-HPLC kromatogramı. **B.** Kütle spektrumunda [M]⁺: 1710,88 kütle/yük oranının görülmesi bir disülfid köprüsünün oluştuğunu gösterir. **C.** Oluşan aşılınmış peptid 13. dakikada ve yüksek saflıkta (>98%) gelmektedir.

Sekansın streokimyasal olarak ters çevrilmesi ile oluşan retro peptidler protezlara karşı seçiciliği azaltır ve sonuçta daha dirençli yapılar oluşturulabilmektedir (Wei vd., 2015, Neubauer vd., 2017, Wang vd., 2018). Retro LyP-1 peptid epitopu, SFTI-1 peptid omurgasının birinci hattına aşılandı. 400 mg reçine kırıldıktan sonra 290 mg ham peptid elde edildi. Halkalı peptid karışımı 8 mL/dakika gradyent metodu ile saflaştırıldı ve kütle spektrometre analizinden sonra uygun fraksiyonlar liyofilize edildi. Oksidasyon öncesinde halkalı ve aşılınmış peptidin alıkonma süresi 17-22 dakikaları arasındır. Sentezlenen aşılınmış peptidin lineer yapısı 1566,76 Da moleküler ağırlığa sahip iken siklizasyon sonrasında peptid 1548,76 Da moleküler ağırlığa sahiptir. Aşağıda aşılınmış retro LyP-1-hat 1-SFTI-1 peptidine ait RP-HPLC kromatogramı ve LC-MS spektrumu verilmiştir (Şekil 7.9).



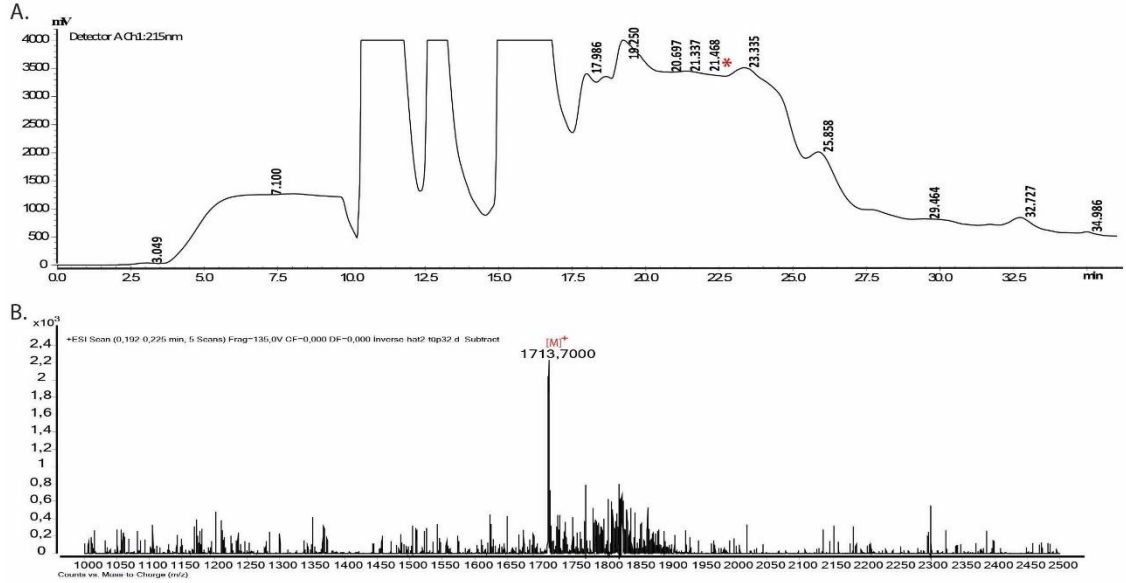
Şekil 7.9. Retro LyP-1-hat1-SFTI-1 aşılanmış peptidinin oksidasyon öncesine ait RP-HPLC kromatogramı ve kütle LC-MS spektrumu. **A.** Oksidasyon öncesi peptidin alıkonma süresi 17-22 arasındadır. **B.** Spektrumda $[M]^+$:1548,97 kütle/yük oranının görülmesi peptidin doğru sentezlendiğini gösterir.

Retro LyP-1-hat1-SFTI-1 aşılanmış peptidinin disülfid köprüsü oksidasyon reaksiyonu ile oluşturuldu. Yaklaşık 104 mg peptid 0,1 M NH_4HCO_3 (pH 8,3) tampon çözeltisi içerisinde bir gün boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. Karışım doğrudan RP-HPLC'ye yüklenerek 8 mL/dakika gradyent metod ile saflaştırıldı. Peptidin oksidasyon sonrası alıkonma süresi 25-26 dakikaları arasındır. Oksidasyon sonrası $[M+1H]^+$:1547,94 ve $[M+2H]^{+2}$:774,47 kütle/yük oranlarının görülmesi peptidin doğru sentezlendiğini ve disülfid köprüsünün oluştuğunu göstermektedir. Liyofilize edilen peptid serum kararlılığı ve hemolitik aktivite denemelerine kadar buzdolabında $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edildi. Sentezlenen ve daha sonrasında siklizasyon ve oksidasyon yapılarak son ürün haline getirilen retro LyP-1-hat 1-SFTI-1 peptidinden yaklaşık 13 mg elde edilmiştir. Aşağıda oksidasyon sonrası retro LyP-1-hat 1-SFTI-1 peptidine ait RP-HPLC kromatogramları ve LC-MS spektrumu verilmiştir (Şekil 7.10).



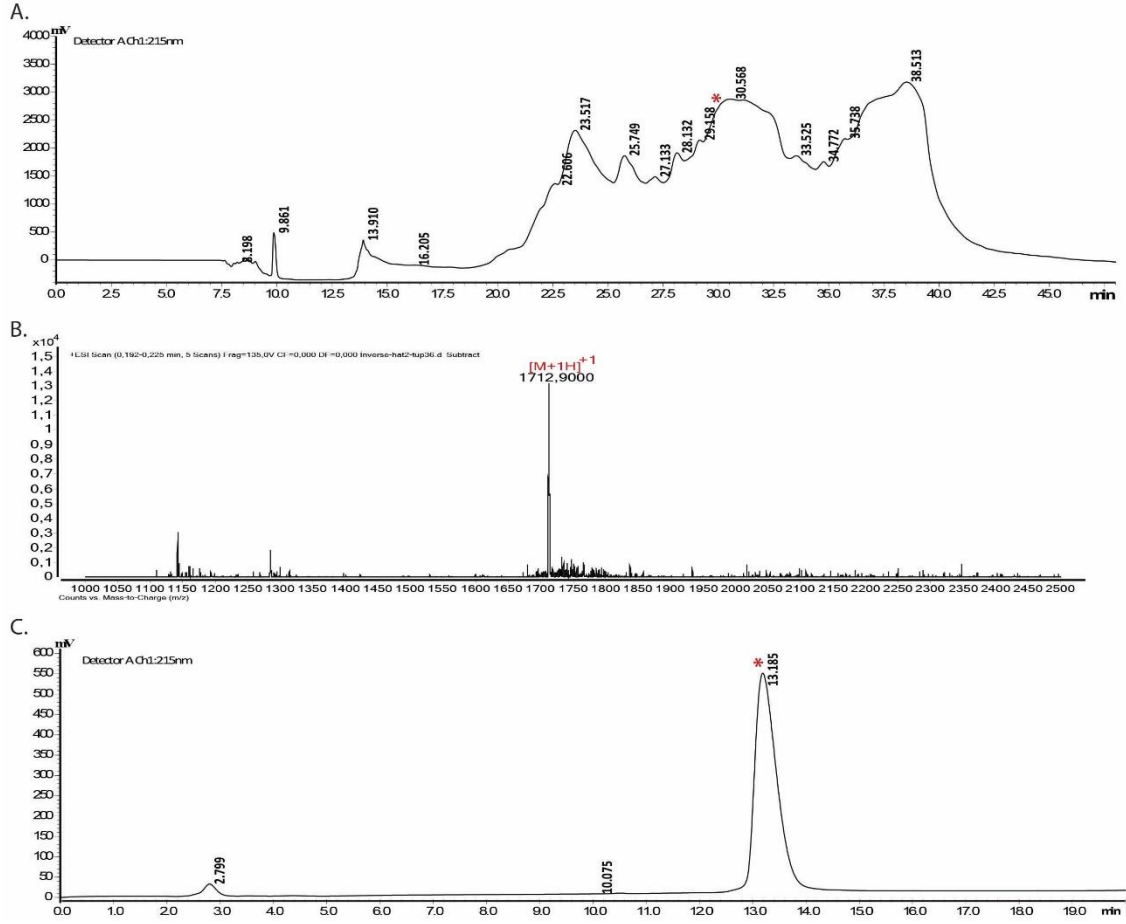
Şekil 7.10. Retro LyP-1-hat1-SFTI-1 aşılınmış peptidinin oksidasyon sonrasında ait RP-HPLC kromatogramları ve LC-MS kütle spektrumları. **A.** Oksidasyon sonrasında peptidin RP-HPLC kromatogramı. **B.** Kütle spektrumunda $[M+1H]^+$:1547,94 ve $[M+2H]^{2+}$:774,47 kütle/yük oranlarının görülmesi bir disülfid köprüsünün oluştuğunu gösterir. **C.** Oluşan aşılınmış peptid 10,4 dakikada ve yüksek saflıkta (>98%) gelmektedir.

Ayrıca SFTI-1 omurgasının ikinci hattına da LyP-1 peptidi retro olarak aşılandı. 440 mg reçine kırıldıktan sonra 290 mg ham peptid elde edildi. Halkalı ve aşılınmış peptid 8 mL/dakika gradyent metodu ile saflaştırıldı ve kütle spektrometre analizinden sonra uygun fraksiyonlar liyofilize edildi. Aşağıda retro LyP-1-hat 2-SFTI-1 aşılınmış peptidine ait RP-HPLC kromatogramı ve LC-MS spektrumu mevcuttur (Şekil 7.11). Yaklaşık 20-24 dakikaları arasında toplanan fraksiyonlarda 1713,70 Da molekül ağırlığına sahip retro LyP-1-hat 2-SFTI-1 peptidinin olduğu görülmüştür.



Şekil 7.11. Retro LyP-1-hat 2-SFTI-1 aşılınmış peptidinin oksidasyon öncesine ait RP-HPLC kromatogramı ve LC-MS kütle spektrumu. **A.** Oksidasyon öncesi peptidin alıkonma süresi 20-24 arasındadır. **B.** Spektrumda $[M]^+$:1713,70 kütle/yük oranlarının görülmesi peptidin doğru sentezlendiğini gösterir.

Aşağıda Şekil 7.12 de Retro LyP-1-hat 2-SFTI-1 aşılınmış peptidinin oksidasyon sonrasına ait RP-HPLC kromatogramları ve LC-MS spektrumu verilmiştir. Liyofilize edildikten sonra tartılamayan peptid 350 mL 0,1 M NH_4HCO_3 tampon çözeltisi (pH 8,3) içerisinde bir gün boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. Karışım doğrudan RP-HPLC'ye yüklenerek 8 mL/dakika gradyent metod ile saflaştırıldı. Oksidasyon sonrası retro LyP-1-hat 2-SFTI-1 aşılınmış peptidin moleküler ağırlığı 1712,90 Da'dur. Analitik RP-HPLC ile yapılan analizde aşılınmış peptidin yüksek saflığa (>98%) sahip olduğu görülmüştür. Sentezlenen ve daha sonrasında siklizasyon ve oksidasyon yapılarak son ürün haline getirilen retro LyP-1-hat 2-SFTI-1 peptidinden yaklaşık 10 mg elde edilmiştir. Liyofilize edilen peptid serum kararlılığı ve hemolitik aktivite denemelerine kadar buzdolabında -20 °C'de muhafaza edildi.



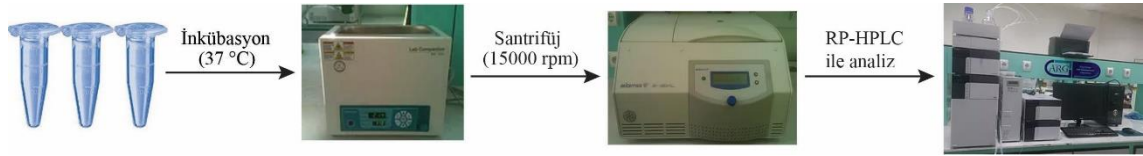
Şekil 7.12. Retro LyP-1-hat 2-SFTI-1 aşılantısı peptidinin oksidasyon sonrasına ait RP-HPLC kromatogramları ve LC-MS kütle spektrumu. **A.** Oksidasyon sonrasında peptidin RP-HPLC kromatogramı. **B.** Kütle spektrumunda $[M+1H]^+$: 1712,90 kütle/yük oranının görülmesi bir disülfid köprüsünün oluştuğunu gösterir. **C.** Analitik RP-HPLC analizinde peptidin yüksek saflıkta olduğu (> 98%) ve alıkonma süresinin de 13,1 dakika olduğu görülmüştür.

HPLC, karışımın bileşenlerini genellikle sahip oldukları polariteye göre ayırmaktadır. Ayırmada etkili diğer bir faktör ise molekül ağırlıklarıdır. Bu nedenle aynı hat üzerine aşılantısı aynı kütleye sahip peptidlerin kromatogramları ve alıkonma süreleri benzerdir.

Yukarıda sentezlenen peptidlere ait RP-HPLC kromatogramları ve LC-MS kütle spektrumları verilmiştir. Kütle dataları peptidlerin doğru sentezlendiklerini ve disülfid köprülerinin oluştuğunu desteklemektedir. Peptidlerin saflığı kontrol edildikten sonra insan kan serumundaki kararlılıkları incelendi.

7.2. Peptidlerin Serum Kararlılıkları

Peptidlerin serum kararlılıkları % 100 insan kan serumunda (Sigma Aldrich) 37 °C de inkübe edilerek analiz edildi (Şekil 7.13).



Şekil 7.13. Serum kararlılığı. Her bir peptid çözeltisi serum içerisinde 37 °C sıcak su banyosunda inkübe edildi. Belirli zaman aralıklarında numuneler alınıp üzerlerine üre ve TCA eklendikten sonra santrifüj ile serum proteinleri çöktürüldü. Süpernatant kısmı alınıp RP-HPLC ile analiz edildi.

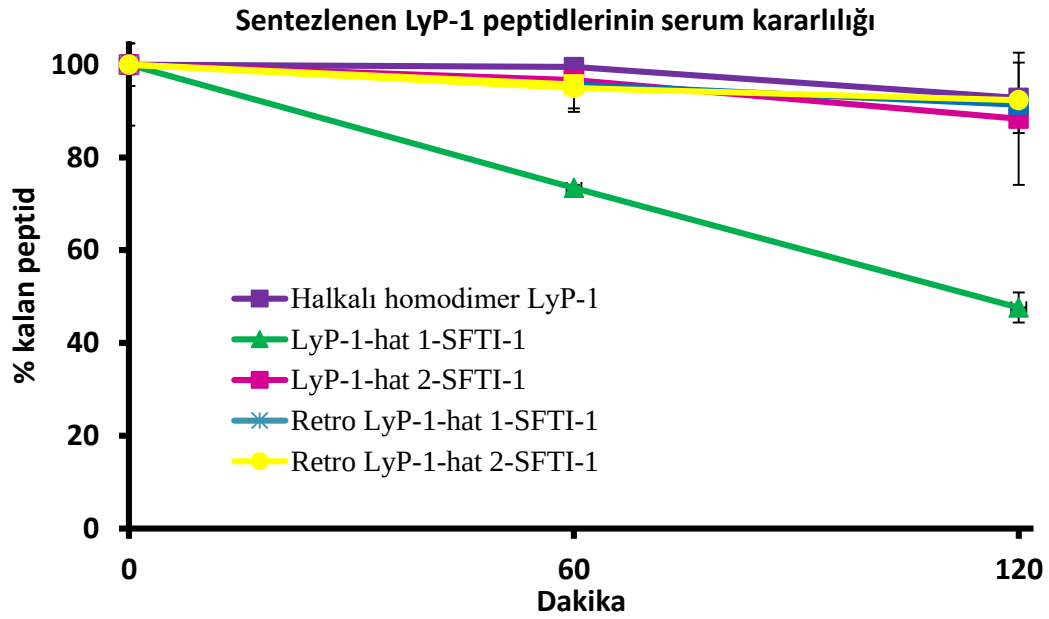
LyP-1 peptidinin kararlılığı ile ilgili ilk çalışmada, Li ve arkadaşları LyP-1 peptidi ve onun selenosistein ile modifiye edilmiş analogunu sentezlemişler ve daha sonra peptidlerin kararlılıklarını ve biyoaktivitelerini analiz etmişlerdir. Bu çalışmada % 25 serum ile yapılan kararlılık çalışmalarında LyP-1 peptidi 12. saatin sonunda % 90 oranında bozunduğu rapor edilmiştir (Li vd., 2013).

İlerleyen yıllarda Conibear ve arkadaşları LyP-1 peptidini MCoTI-II iskelesinin birinci, ikinci ve altıncı hatları üzerine aşılayarak peptidin kararlılığını arttırmışlardır. Bu çalışmadaki kontrol amacıyla LyP-1'in serum kararlılığı incelendiğinde peptidin 24. saatin sonunda yalnızca %13 oranında bozunmadan kaldığı rapor edilmiştir (Conibear vd., 2016).

Son olarak Zhang ve arkadaşları LyP-1 peptidini siklik ve hem siklik hem de retro versiyonu ile çeşitli çalışmalar gerçekleştirmişlerdir. Kontrol amaçlı yapılan LyP-1 kararlılık analizlerine göre ise peptid % 25 serum içerisinde 12. saat sonunda % 92 oranında bozunduğu rapor edilmiştir (Zhang vd., 2018).

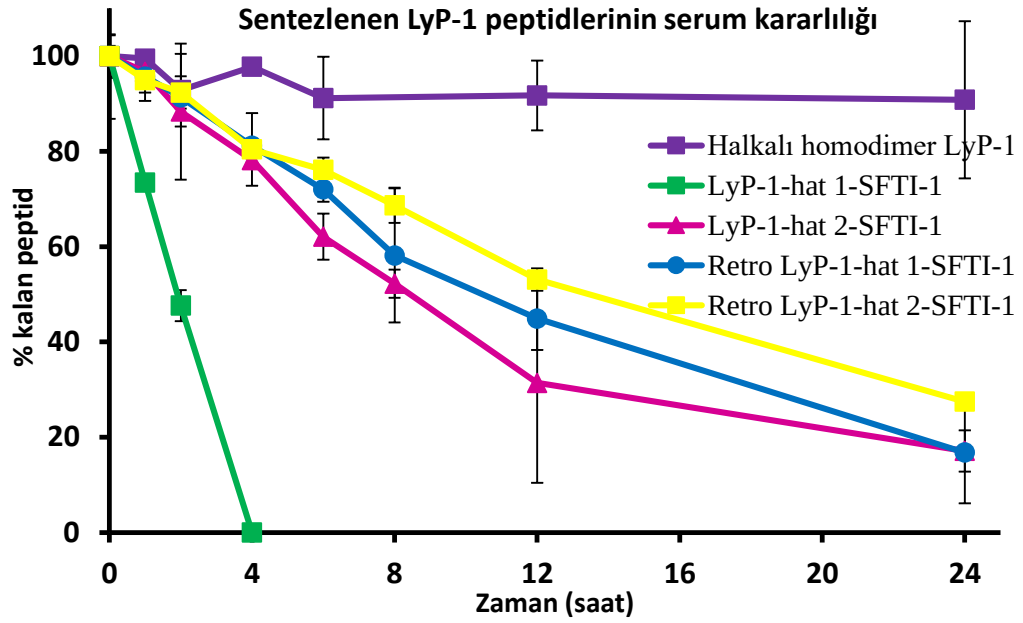
Bu üç literatür çalışması da LyP-1 peptidinin serum içerisindeki kararsızlığını göstermektedir.

Bu tez çalışmasında sentezlenen peptidlerin % 100 serum kararlılıkları ile ilgili analiz ilk iki saat süresince gerçekleştirildiğinde SFTI-1 iskelesinin 1. hattına aşıl原因 LyP-1-hat 1-SFTI-1 peptidi iki saatin sonunda % 47 oranında bozunmadan kalabilirken diğer sentezlenmiş peptidlerin ise daha yüksek kararlılığa (yaklaşık % 90) sahip oldukları görüldü. (Şekil 7.14).



Şekil 7.14. Sentezlenen peptidlerin ilk iki saat sonundaki % 100 serum içerisindeki kararlılıkları. LyP-1-hat 1-SFTI-1 peptidi iki saatin sonunda % 47 oranında serum içerisinde bozunmadan kalmıştır. Diğer sentezlenmiş peptidlerin ise daha yüksek kararlılığa (yaklaşık % 90) sahip oldukları görüldü.

Peptidlerin serum kararlılık denemelerine 24 saat boyunca devam edildiğinde aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 7.15).



Şekil 7.15. Sentezlenen peptidlerin 24 saat sonundaki serum kararlılıkları.

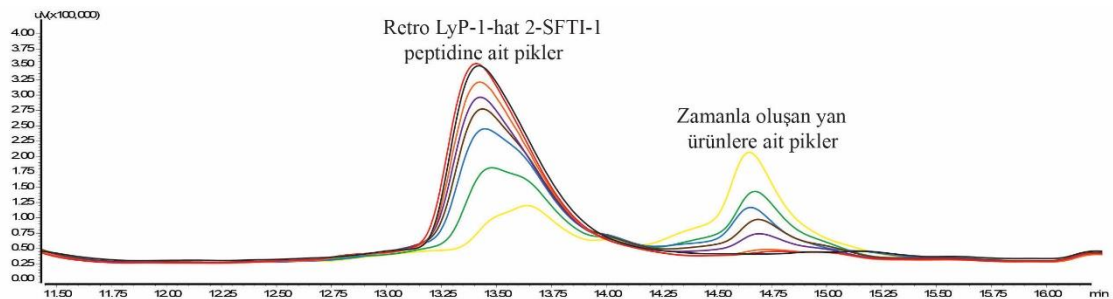
Sentez sonrası siklizasyon ile düzenlenmiş halkalı homodimer LyP-1 peptidi 24 saat sonunda % 90 oranında bozunmadan kalarak olağanüstü bir kararlılık gösterdi. Literatürdeki diğer çalışmalarda 24 saat sonunda LyP-1 türevleri serum içerisinde oldukça az miktarda bulunurken halkalaştırma stratejisi uygulanan halkalı homodimer peptidi sadece % 10 oranında bozundu ve halkalaştırma yöntemi ile peptid kararlılığının önemli oranda artırılabilceğini gösterdi.

Halkalaştırma stratejisine ek olarak çeşitli aşılama çalışmaları ile de peptid kararlılığının geliştirilmesi amaçlandı. SFTI-1 peptidi diğer disülfidce zengin iskelelerin en küçüğüdür. Yapıdaki modifikasyonlara karşı toleranslı ve yüksek kararlılığa sahip olması ile aşılama çalışmalarında önemli bir yere sahiptir. Halkalı peptid omurgası ve disülfid köprüsünün peptid kararlılığına etkisi büyüktür. Ayrıca hidrojen bağları ve birinci hattaki ardışık iki prolin kalıntıları peptidin kararlılığını desteklemektedir (Franke vd., 2018). LyP-1 peptidi SFTI-1 iskelesinin birinci hattına aşılandığında peptidin doğal yapısını koruyamamış olması ihtimalinden dolayı dört saatin sonunda tamamen bozunduğu görülmüştür. Fakat LyP-1 peptidi SFTI-1 iskelesinin ikinci hattına aşılandığında peptid dört saat sonunda % 78 oranında bozunmadan kalmıştır. Ardışık prolin kalıntıları ve/veya üç boyutlu doğal yapının birinci hat üzerindeki aşılama yapıya göre daha korunmuş olması proteazlara karşı peptide daha fazla

kararlılık kazandırmış olabileceği muhtemeldir. Ayrıca iki ayrı hat üzerine yapılan aşılama çalışmaları sonrasında kararlılığın bu kadar farklı olması hat seçiminin önemini göstermektedir.

Peptid kararlılığını arttırmak için halkalaştırma ve aşılama yöntemi dışında peptid sekansını retro şekilde yani D-peptid olarak sekansı tersten sentezlemek diğer önemli bir yöntemdir. Literatürde antimikrobiyal peptidler üzerinde uygulanmış retro-analog çalışmaları mevcuttur. Bu tez çalışmasında da aşılamanın peptidlere ek olarak aşılama ve retro-analog yöntemlerini kombine ederek retro LyP-1 peptidi SFTI-1 iskelesinin her iki hattına ayrı ayrı aşılandı. Öncelikle retro LyP-1 peptidi SFTI-1 iskelesinin birinci hattına aşılandı. Yukarıda bahsedildiği gibi LyP-1 peptidi birinci hatta düz olarak aşılandığında peptid kan serumunda ikinci saat sonunda % 47 oranında bozunmadan kalmıştır ve dördüncü saat sonunda tamamen bozunmuştur. Buna karşılık retro peptid epitopunun, SFTI-1 iskelesinin birinci hattına aşılması ile serum içerisinde ikinci saatte % 95 ve dördüncü saat sonunda ise % 81 oranında bozunmadan kalabilmiştir. Aşılanmış peptidin dört saat sonunda serum kararlılığındaki % 81 oranındaki gelişme peptidin sekansının ters yönde aşılmasının önemini göstermektedir.

Daha sonra retro LyP-1 peptidi SFTI-1 iskelesinin ikinci hattına da aşılandı. LyP-1 peptidi düz şekilde ikinci hatta aşılandığında peptid kan serumunda ikinci saatte % 88 ve 24. saat sonunda % 17 oranında bozunmadan kalmıştır. Bununla birlikte retro peptid epitopunun aşılması ile serum içerisinde ikinci saatte % 92 ve 24. saat sonunda %27 oranında bozunmadan kalmıştır ve retro konsepti bu peptid için 24. saat sonunda % 10 oranında kararlılığını arttırmıştır. Ayrıca retro LyP-1-hat 2-SFTI-1 peptidi tüm aşılanmış peptidler içerisinde en kararlı ve halkalı homodimer LyP-1 peptidinden sonra ise en kararlı ikinci peptiddir. Peptidin serum kararlılığı analizinin yapıldığı saat aralıklarındaki RP-HPLC kromatogramları aşağıda verilmiştir (Şekil 7.16).



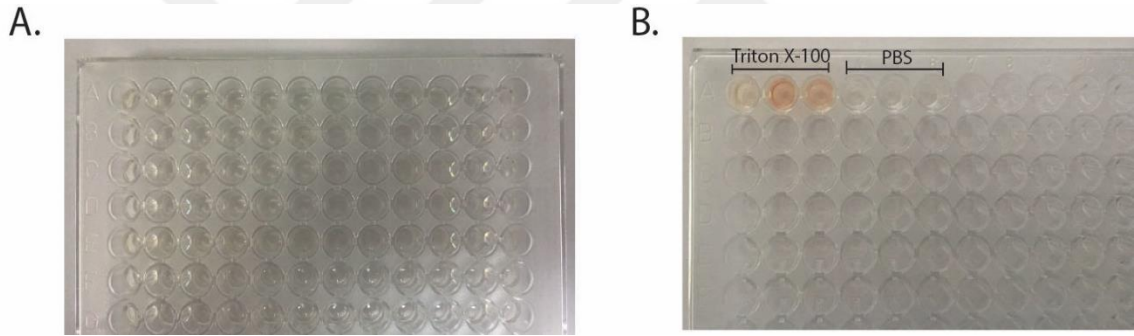
Şekil 7.16. Retro LyP-1-hat 2-SFTI-1 peptidine ait 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12 ve 24 saat aralıklarındaki kromatogramları. Peptidin kan serumu içerisinde zamanla bozunması sonucunda yan ürün oluşmuştur. Peptid piki 13,4. dakikada alıkonmuştur ve zaman içerisinde absorbansın azalması

ile peptid miktarının azaldığı ve daha sonrasında 14,7. dakikada zamanla yan ürün olduğu görülmüştür. Kırmızı renkli kromatogram 0. saate, sarı renkli kromatogram ise 24. saate aittir.

Tezin son bölümünde ise halkalaştırma ve aşılama çalışmaları ile serum içerisinde daha kararlı olan LyP-1 peptid türevlerinin hemolitik aktiviteleri incelendi.

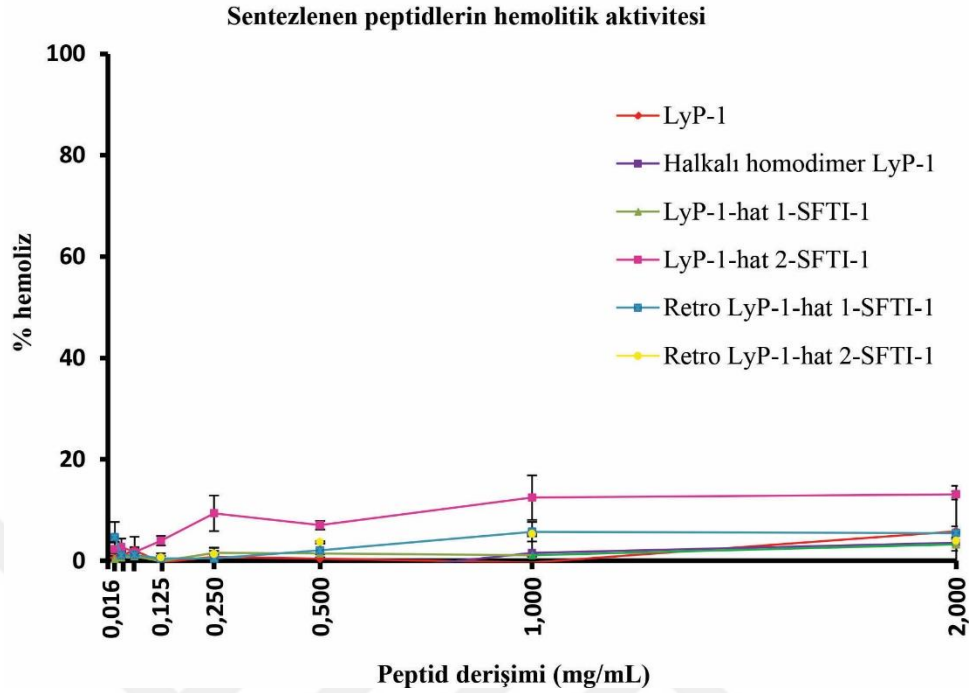
7.3. Peptidlerin Hemolitik Aktiviteleri

Kırmızı kan hücrelerinin (KKH) parçalanmasına hemoliz denir. İlaç adayı olabilecek molekül vücut içerisine alındığında kan hücrelerine zarar vermemelidir. Bu çalışmada da peptidler ve kontrol kimyasal maddeler, PBS içerisinde hazırlanan KKH ile 37 °C de bir saat inkübe edildi ve 415 nm’de absorbans değerleri ölçülerek % hemoliz miktarları hesaplandı(Şekil 7.17).



Şekil 7.17. Hemolitik aktivite. Pozitif kontrol Triton X-100, negatif kontrol PBS ve sentezlenen peptidler KKH çözeltisi içerisinde inkübe edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant kısımları alınıp plaka okuyucu ile absorbansları ölçüldü. **A.** Farklı konsantrasyonlara sahip peptidler minimum hemolitik aktivite gösterdi. **B.** Plakanın ilk üç kuyusu Triton X-100’e aittir ve kırmızı kan hücrelerine karşı hemoliz oluşturduğu görülmüştür. Diğer üç kuyu ise hemoliz oluşturmayan PBS’e aittir.

Sentezlenen farklı konsantrasyonlardaki her bir peptidin KKH için hemolitik aktivitesi aşağıdaki grafikte verilmiştir (Şekil 7.18).



Şekil 7.18. Sentezlenen peptidlerin hemolitik aktivitesi. Peptidler farklı konsantrasyonlarda hemolitik aktivite göstermediler.

SFTI-1 peptid iskelesi üzerine yapılan aşılama çalışmasında peptid kararlılığına ek olarak yapılan hemolitik aktivite analizinde SFTI-1 peptidinin hemolitik aktivitesinin bulunmadığı rapor edilmiştir (Chan vd., 2015). Aynı çalışmada % 100 lizisi oluşturan diğer bir pozitif kontrol melittin peptidinin yüksek aktivitesi görülmüştür. Bu tez çalışmasında da sentezlenen peptidler en yüksek derişimde bile hemolitik aktivite göstermediler (maksimum % 10).

Peptidler, yüksek hedef spesifikliğı ve terapötik potansiyellerine ek olarak diğer terapötik moleküllere göre nispeten daha az toksisiteleri ile ilaç geliştirme çalışmalarında aday biyomoleküllerdir. Lenf tümörleri ile ilişkili LyP-1 peptidi apoptotik bir biyoaktiviteye sahiptir. Tıpkı diğer peptidler gibi LyP-1 peptidi de serum içerisindeki proteazlara karşı duyarlı ve kararsızdır. Bu çalışmada LyP-1 peptidini siklizasyon ve aşılama yöntemleri ile modifiye edip kararlılığını geliştirmeyi hedefledik. Çalışmanın sonucunda sentezlenen peptidler, LyP-1 epitopunun kararlılığını çeşitli oranlarda arttırdığı görülmüştür. Ayrıca daha kararlı peptidlerin hemolitik aktivitesi analiz edildiğinde kırmızı kan hücreleri için toksik olmadığı görülmüştür. Bu çalışma, kanser tanı ve tedavisinde kullanılabilecek terapötik peptidlerin çeşitli yöntemlerle modifiye edilerek daha kararlı ve daha az toksik hale getirilebileceklerini göstermiştir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abdul Ghani, H., Henriques, S. T., Huang, Y. H., Swedberg, J. E., Schroeder, C. I. ve Craik, D. J. (2017). Structural and functional characterization of chimeric cyclotides from the Mobius and trypsin inhibitor subfamilies. *Biopolymers*, 108(1), e22927.
- Aboye, T. L., Clark, R. J., Burman, R., Roig, M. B., Craik, D. J. ve Goransson, U. (2011). Interlocking Disulfides in Circular Proteins: Toward Efficient Oxidative Folding of Cyclotides. *Antioxidants & Redox Signaling*, 14(1), 77-86.
- Akcan, M., Clark, R. J., Daly, N. L., Conibear, A. C., de Faoite, A., Heghinian, M. D., Sahil, T., Adams, D. J., Mari, F. ve Craik, D. J. (2015). Transforming conotoxins into cyclotides: Backbone cyclization of P-superfamily conotoxins. *Biopolymers*, 104(6), 682-692.
- Akcan, M. ve Craik, D. (2013). Synthesis of Cyclic Disulfide-Rich Peptides. *Peptide Synthesis and Applications*. K. J. Jensen, P. Tofteng Shelton ve S. L. Pedersen, *Humana Press*. 1047: 89-101.
- Akcan, M., Stroud, M. R., Hansen, S. J., Clark, R. J., Daly, N. L., Craik, D. J. ve Olson, J. M. (2011). Chemical Re-engineering of Chlorotoxin Improves Bioconjugation Properties for Tumor Imaging and Targeted Therapy. *J Med Chem*, 54(3), 782-787.
- Armishaw, C. J., Daly, N. L., Nevin, S. T., Adams, D. J., Craik, D. J. ve Alewood, P. F. (2006). alpha-selenoconotoxins, a new class of potent alpha(7) neuronal nicotinic receptor antagonists. *Journal of Biological Chemistry*, 281(20), 14136-14143.
- Askoxylakis, V., Zitzmann-Kolbe, S., Zoller, F., Altmann, A., Markert, A., Rana, S., Marr, A., Mier, W., Debus, J. ve Haberkorn, U. (2011). Challenges in optimizing a prostate carcinoma binding peptide, identified through the phage display technology. *Molecules*, 16(2), 1559-1578.
- Behrendt, R., White, P. ve Offer, J. (2016). Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis. *J Pept Sci*, 22(1), 4-27.
- Borel, J. F., Feurer, C., Gubler, H. U. ve Stahelin, H. (1976). Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions*, 6(4), 468-475.
- Brust, A., Palant, E., Croker, D. E., Colless, B., Drinkwater, R., Patterson, B., Schroeder, C. I., Wilson, D., Nielsen, C. K., Smith, M. T., Alewood, D., Alewood, P. F. ve Lewis, R. J. (2009). chi-Conopeptide pharmacophore development: toward a novel class of norepinephrine transporter inhibitor (Xen2174) for pain. *J Med Chem*, 52(22), 6991-7002.
- Burman, R., Gunasekera, S., Stromstedt, A. A. ve Goransson, U. (2014). Chemistry and biology of cyclotides: circular plant peptides outside the box. *J Nat Prod*, 77(3), 724-736.
- Cascales, L., Henriques, S. T., Kerr, M. C., Huang, Y. H., Sweet, M. J., Daly, N. L. ve Craik, D. J. (2011). Identification and characterization of a new family of cell-penetrating peptides: cyclic cell-penetrating peptides. *J Biol Chem*, 286(42), 36932-36943.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

Chames, P., Van Regenmortel, M., Weiss, E. ve Baty, D. (2009). Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *Br J Pharmacol*, 157(2), 220-233.

Chan, L. Y., Craik, D. J. ve Daly, N. L. (2015). Cyclic thrombospondin-1 mimetics: grafting of a thrombospondin sequence into circular disulfide-rich frameworks to inhibit endothelial cell migration. *Biosci Rep*, 35(6), e00270.

Chan, L. Y., Zhang, V. M., Huang, Y. H., Waters, N. C., Bansal, P. S., Craik, D. J. ve Daly, N. L. (2013). Cyclization of the antimicrobial peptide gomesin with native chemical ligation: influences on stability and bioactivity. *Chembiochem*, 14(5), 617-624.

Chen, X., Zhang, L., Wu, Y., Wang, L., Ma, C., Xi, X., Bininda-Emonds, O. R. P., Shaw, C., Chen, T. ve Zhou, M. (2018). Evaluation of the bioactivity of a mastoparan peptide from wasp venom and of its analogues designed through targeted engineering. *Int J Biol Sci*, 14(6), 599-607.

Cheneval, O., Schroeder, C. I., Durek, T., Walsh, P., Huang, Y. H., Liras, S., Price, D. A. ve Craik, D. J. (2014). Fmoc-based synthesis of disulfide-rich cyclic peptides. *J Org Chem*, 79(12), 5538-5544.

Clark, R. J., Akcan, M., Kaas, Q., Daly, N. L. ve Craik, D. J. (2012). Cyclization of conotoxins to improve their biopharmaceutical properties. *Toxicon*, 59(4), 446-455.

Clark, R. J., Fischer, H., Dempster, L., Daly, N. L., Rosengren, K. J., Nevin, S. T., Meunier, F. A., Adams, D. J. ve Craik, D. J. (2005). Engineering stable peptide toxins by means of backbone cyclization: stabilization of the alpha-conotoxin MII. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(39), 13767-13772.

Clark, R. J., Jensen, J., Nevin, S. T., Callaghan, B. P., Adams, D. J. ve Craik, D. J. (2010). The engineering of an orally active conotoxin for the treatment of neuropathic pain. *Angewandte Chemie International Edition*, 49(37), 6545-6548.

Cobos, C., Bansal, P. S., Jones, L., Wangchuk, P., Wilson, D., Loukas, A. ve Daly, N. L. (2018). Engineering of an Anti-Inflammatory Peptide Based on the Disulfide-Rich Linaclotide Scaffold. *Biomedicines*, 6(4), 97.

Cobos Caceres, C., Bansal, P. S., Navarro, S., Wilson, D., Don, L., Giacomini, P., Loukas, A. ve Daly, N. L. (2017). An engineered cyclic peptide alleviates symptoms of inflammation in a murine model of inflammatory bowel disease. *J Biol Chem*, 292(24), 10288-10294.

Colgrave, M. L. ve Craik, D. J. (2004). Thermal, chemical, and enzymatic stability of the cyclotide kalata B1: The importance of the cyclic cystine knot. *Biochemistry*, 43(20), 5965-5975.

Colgrave, M. L., Korsinczky, M. J., Clark, R. J., Foley, F. ve Craik, D. J. (2010). Sunflower trypsin inhibitor-1, proteolytic studies on a trypsin inhibitor peptide and its analogs. *Biopolymers*, 94(5), 665-672.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

- Conibear, A. C., Chaousis, S., Durek, T., Rosengren, K. J., Craik, D. J. ve Schroeder, C. I. (2016). Approaches to the stabilization of bioactive epitopes by grafting and peptide cyclization. *Biopolymers*, 106(1), 89-100.
- Conibear, A. C., Rosengren, K. J., Harvey, P. J. ve Craik, D. J. (2012). Structural Characterization of the Cyclic Cystine Ladder Motif of theta-Defensins. *Biochemistry*, 51(48), 9718-9726.
- Craik, D. J. (2012). Host-defense activities of cyclotides. *Toxins (Basel)*, 4(2), 139-156.
- Craik, D. J. ve Adams, D. J. (2007). Chemical modification of conotoxins to improve stability and activity. *Acs Chemical Biology*, 2(7), 457-468.
- Craik, D. J. ve Du, J. (2017). Cyclotides as drug design scaffolds. *Curr Opin Chem Biol*, 38,8-16.
- D'Souza, C., Henriques, S. T., Wang, C. K., Cheneval, O., Chan, L. Y., Bokil, N. J., Sweet, M. J. ve Craik, D. J. (2016). Using the MCoTI-II Cyclotide Scaffold To Design a Stable Cyclic Peptide Antagonist of SET, a Protein Overexpressed in Human Cancer. *Biochemistry*, 55(2), 396-405.
- Daly, N. L., Rosengren, K. J. ve Craik, D. J. (2009). Discovery, structure and biological activities of cyclotides. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(11), 918-930.
- De Veer, S. J., Weidmann, J. ve Craik, D. J. (2017). Cyclotides as Tools in Chemical Biology. *Acc Chem Res*, 50(7), 1557-1565.
- DeBin, J. A., Maggio, J. E. ve Strichartz, G. R. (1993). Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 264(2), C361-369.
- Eliassen, R., Daly, N. L., Wulff, B. S., Andresen, T. L., Conde-Frieboes, K. W. ve Craik, D. J. (2012). Design, synthesis, structural and functional characterization of novel melanocortin agonists based on the cyclotide kalata B1. *J Biol Chem*, 287(48), 40493-40501.
- Escoubas, P. ve Bosmans, F. (2007). Spider peptide toxins as leads for drug development. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2(6), 823-835.
- Felicio, M. R., Silva, O. N., Goncalves, S., Santos, N. C. ve Franco, O. L. (2017). Peptides with Dual Antimicrobial and Anticancer Activities. *Front Chem*, 5(5).
- Fogal, V., Zhang, L., Krajewski, S. ve Ruoslahti, E. (2008). Mitochondrial/cell-surface protein p32/gC1qR as a molecular target in tumor cells and tumor stroma. *Cancer Res*, 68(17), 7210-7218.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

Franke, B., Mylne, J. S. ve Rosengren, K. J. (2018). Buried treasure: biosynthesis, structures and applications of cyclic peptides hidden in seed storage albumins. *Nat Prod Rep*, 35(2), 137-146.

Gao, Y., Cui, T. ve Lam, Y. (2010). Synthesis and disulfide bond connectivity-activity studies of a kalata B1-inspired cyclopeptide against dengue NS2B-NS3 protease. *Bioorg Med Chem*, 18(3), 1331-1336.

Giang, K. T. N., Lian, Y. L., Pang, E. W. H., Phuong, Q. T. N., Tran, T. D. ve Tam, J. P. (2013). Discovery of Linear Cyclotides in Monocot Plant *Panicum laxum* of Poaceae Family Provides New Insights into Evolution and Distribution of Cyclotides in Plants. *Journal of Biological Chemistry*, 288(5), 3370-3380.

Gitlin-Domagalska, A., Debowski, D., Legowska, A., Stirnberg, M., Okonska, J., Gutschow, M. ve Rolka, K. (2017). Design and chemical syntheses of potent matriptase-2 inhibitors based on trypsin inhibitor SFTI-1 isolated from sunflower seeds. *Biopolymers*, 108(6), e23031.

Gran, L. (1973). On the effect of a polypeptide isolated from "Kalata-Kalata" (*Oldenlandia affinis* DC) on the oestrogen dominated uterus. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 33(400-408).

Grande Burgos, M. J., Pulido, R. P., Del Carmen Lopez Aguayo, M., Galvez, A. ve Lucas, R. (2014). The Cyclic Antibacterial Peptide Enterocin AS-48: Isolation, Mode of Action, and Possible Food Applications. *Int J Mol Sci*, 15(12), 22706-22727.

Gray, W. R., Luque, A., Olivera, B. M., Barrett, J. ve Cruz, L. J. (1981). Peptide toxins from *Conus geographus* venom. *Journal of Biological Chemistry*, 256(10), 4734-4740.

Gunasekera, S., Daly, N. L., Clark, R. J. ve Craik, D. J. (2009). Dissecting the Oxidative Folding of Circular Cystine Knot Miniproteins. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(5), 971-980.

Gustafson, K. R., McKee, T. C. ve Bokesch, H. R. (2004). Anti-HIV cyclotides. *Current Protein and Peptide Science*, 5(5), 331-340.

Henriques, S. T. ve Craik, D. J. (2010). Cyclotides as templates in drug design. *Drug Discovery Today*, 15(1-2), 57-64.

Henriques, S. T., Huang, Y. H., Castanho, M., Bagatolli, L. A., Sonza, S., Tachedjian, G., Daly, N. L. ve Craik, D. J. (2012). Phosphatidylethanolamine Binding Is a Conserved Feature of Cyclotide-Membrane Interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 287(40), 33629-33643.

Henriques, S. T., Huang, Y. H., Chaousis, S., Sani, M. A., Poth, A. G., Separovic, F. ve Craik, D. J. (2015). The Prototypic Cyclotide Kalata B1 Has a Unique Mechanism of Entering Cells. *Chem Biol*, 22(8), 1087-1097.

Hu, C., Chen, X. ve Zhao, W. (2016). Design and Modification of Anticancer Peptides. *Drug Designing: Open Access*, 05(03),

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

Huang, Y. H., Colgrave, M. L., Clark, R. J., Kotze, A. C. ve Craik, D. J. (2010). Lysine-scanning Mutagenesis Reveals an Amendable Face of the Cyclotide Kalata B1 for the Optimization of Nematocidal Activity. *Journal of Biological Chemistry*, 285(14), 10797-10805.

Hyun, S., Lee, S., Kim, S., Jang, S., Yu, J. ve Lee, Y. (2014). Apoptosis inducing, conformationally constrained, dimeric peptide analogs of KLA with submicromolar cell penetrating abilities. *Biomacromolecules*, 15(10), 3746-3752.

Jain, K. K. (2000). An evaluation of intrathecal ziconotide for the treatment of chronic pain. *Expert Opin Investig Drugs*, 9(10), 2403-2410.

Jendryny, C. ve Beck-Sickinger, A. G. (2016). Inhibition of Kallikrein-Related Peptidases 7 and 5 by Grafting Serpin Reactive-Center Loop Sequences onto Sunflower Trypsin Inhibitor-1 (SFTI-1). *Chembiochem*, 17(8), 719-726.

Jennings, C., West, J., Waine, C., Craik, D. ve Anderson, M. (2001). Biosynthesis and insecticidal properties of plant cyclotides: the cyclic knotted proteins from *Oldenlandia affinis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(19), 10614-10619.

Jennings, C. V., Rosengren, K. J., Daly, N. L., Plan, M., Stevens, J., Scanlon, M. J., Waine, C., Norman, D. G., Anderson, M. A. ve Craik, D. J. (2005). Isolation, solution structure, and insecticidal activity of kalata B2, a circular protein with a twist: do Mobius strips exist in nature? *Biochemistry*, 44(3), 851-860.

Jia, F., Wang, J., Peng, J., Zhao, P., Kong, Z., Wang, K., Yan, W. ve Wang, R. (2017). D-amino acid substitution enhances the stability of antimicrobial peptide polybia-CP. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 49(10), 916-925.

Kang, H. K., Kim, C., Seo, C. H. ve Park, Y. (2017). The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): a patent review. *J Microbiol*, 55(1), 1-12.

Kindrachuk, J., Scruten, E., Attah-Poku, S., Bell, K., Potter, A., Babiuk, L. A., Griebel, P. J. ve Napper, S. (2011). Stability, toxicity, and biological activity of host defense peptide BMAP28 and its inversed and retro-inversed isomers. *Biopolymers*, 96(1), 14-24.

Klages, J., Neubauer, C., Coles, M., Kessler, H. ve Luy, B. (2005). Structure refinement of cyclosporin a in chloroform by using RDCs measured in a stretched PDMS-gel. *Chembiochem*, 6(9), 1672-1678.

Koradi, R., Billeter, M. ve Wuthrich, K. (1996). MOLMOL: A program for display and analysis of macromolecular structures. *Journal of Molecular Graphics*, 14(1), 51-&.

L. Thorstholm, D. J. C. (2012). Discovery and applications of naturally occurring cyclic peptides. *Drug Discov Today Technol*, 9(1), e1-e70.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

La Manna, S., Di Natale, C., Florio, D. ve Marasco, D. (2018). Peptides as Therapeutic Agents for Inflammatory-Related Diseases. *Int J Mol Sci*, 19(9), 2714.

Laakkonen, P., Akerman, M. E., Biliran, H., Yang, M., Ferrer, F., Karpanen, T., Hoffman, R. M. ve Ruoslahti, E. (2004). Antitumor activity of a homing peptide that targets tumor lymphatics and tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(25), 9381-9386.

Laakkonen, P., Porkka, K., Hoffman, J. A. ve Ruoslahti, E. (2002). A tumor-homing peptide with a targeting specificity related to lymphatic vessels. *Nature Medicine*, 8(7), 751-755.

Lau, J. L. ve Dunn, M. K. (2017). Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. *Bioorg Med Chem*, 2700-2707.

Lawrence, N., Dennis, A. S. M., Lehane, A. M., Ehmann, A., Harvey, P. J., Benfield, A. H., Cheneval, O., Henriques, S. T., Craik, D. J. ve McMorran, B. J. (2018). Defense Peptides Engineered from Human Platelet Factor 4 Kill Plasmodium by Selective Membrane Disruption. *Cell Chem Biol*, 25(9), 1140-1150.

Li, C., Wang, Y., Zhang, X., Deng, L., Zhang, Y. ve Chen, Z. (2013). Tumor-targeted liposomal drug delivery mediated by a diseleno bond-stabilized cyclic peptide. *Int J Nanomedicine*, 81051-1062.

Long, Y. Q., Lee, S. L., Lin, C. Y., Enyedy, I. J., Wang, S., Li, P., Dickson, R. B. ve Roller, P. P. (2001). Synthesis and evaluation of the sunflower derived trypsin inhibitor as a potent inhibitor of the type II transmembrane serine protease, matriptase. *Bioorg Med Chem Lett*, 11(18), 2515-2519.

Malesevic, M., Strijowski, U., Bachle, D. ve Sewald, N. (2004). An improved method for the solution cyclization of peptides under pseudo-high dilution conditions. *Journal of Biotechnology*, 112(1-2), 73-77.

Medini, K., Harris, P. W. R., Menorca, A., Hards, K., Cook, G. M. ve Brimble, M. A. (2016). Synthesis and activity of a diselenide bond mimetic of the antimicrobial protein caenopore-5. *Chemical Science*, 7(3), 2005-2010.

Merrifield, R. B. (1963). Solid Phase Peptide Synthesis .1. Synthesis of a Tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society*. 85, 2149-2154.

Miljanich, G. P. (2004). Ziconotide: Neuronal calcium channel blocker for treating severe chronic pain. *Curr Med Chem*, 11(23), 3029-3040.

Munoz-Durango, N., Pizarro-Ortega, M. S., Rey-Jurado, E., Diaz, F. E., Bueno, S. M. ve Kalergis, A. M. (2018). Patterns of antibody response during natural hRSV infection: insights for the development of new antibody-based therapies. *Expert Opin Investig Drugs*, 27(9), 721-731.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

Muttenthaler, M., Andersson, A., Vetter, I., Menon, R., Busnelli, M., Ragnarsson, L., Bergmayr, C., Arrowsmith, S., Deuis, J. R., Chiu, H. S., Palpant, N. J., O'Brien, M., Smith, T. J., Wray, S., Neumann, I. D., Gruber, C. W., Lewis, R. J. ve Alewood, P. F. (2017). Subtle modifications to oxytocin produce ligands that retain potency and improved selectivity across species. *Science Signaling*, 10(508), 12.

Neubauer, D., Jaskiewicz, M., Migon, D., Bauer, M., Sikora, K., Sikorska, E., Kamysz, E. ve Kamysz, W. (2017). Retro analog concept: comparative study on physico-chemical and biological properties of selected antimicrobial peptides. *Amino Acids*, 49(10), 1755-1771.

O'Shea, J. C. ve Tchong, J. E. (2002). Eptifibatide: a potent inhibitor of the platelet receptor integrin glycoprotein IIb/IIIa. *Expert Opin Pharmacother*, 3(8), 1199-1210.

Ojeda, P. G., Henriques, S. T., Pan, Y., Nicolazzo, J. A., Craik, D. J. ve Wang, C. K. (2017). Lysine to arginine mutagenesis of chlorotoxin enhances its cellular uptake. *Biopolymers*, 108(5), e23025.

Pallaghy, P. K., Nielsen, K. J., Craik, D. J. ve Norton, R. S. (1994). A common structural motif incorporating a cystine knot and a triple stranded beta sheet in toxic and inhibitory polypeptides. *Protein Science*, 3(10), 1833-1839.

Park, S., Yoo, K. O., Marcussen, T., Backlund, A., Jacobsson, E., Rosengren, K. J., Doo, I. ve Goransson, U. (2017). Cyclotide Evolution: Insights from the Analyses of Their Precursor Sequences, Structures and Distribution in Violets (*Viola*). *Front Plant Sci*, 8(2058).

Pierpont, T. M., Limper, C. B. ve Richards, K. L. (2018). Past, Present, and Future of Rituximab-The World's First Oncology Monoclonal Antibody Therapy. *Front Oncol*, 8(163).

Plan, M. R. R., Saska, I., Cagauan, A. G. ve Craik, D. J. (2008). Backbone Cyclised Peptides from Plants Show Molluscicidal Activity against the Rice Pest *Pomacea canaliculata* (Golden Apple Snail).

Qiu, Y., Taichi, M., Wei, N., Yang, H., Luo, K. Q. ve Tam, J. P. (2017). An Orally Active Bradykinin B1 Receptor Antagonist Engineered as a Bifunctional Chimera of Sunflower Trypsin Inhibitor. *J Med Chem*, 60(1), 504-510.

Quimbar, P., Malik, U., Sommerhoff, C. P., Kaas, Q., Chan, L. Y., Huang, Y. H., Grundhuber, M., Dunse, K., Craik, D. J., Anderson, M. A. ve Daly, N. L. (2013). High-affinity cyclic peptide matriptase inhibitors. *J Biol Chem*, 288(19), 13885-13896.

Saether, O., Craik, D. J., Campbell, I. D., Sletten, K., Juul, J. ve Norman, D. G. (1995). Elucidation of the primary and three-dimensional structure of the uterotonic polypeptide kalata B1. *Biochemistry*, 34(13), 4147-4158.

Sando, L., Henriques, S. T., Foley, F., Simonsen, S. M., Daly, N. L., Hall, K. N., Gustafson, K. R., Aguilar, M. I. ve Craik, D. J. (2011). A Synthetic mirror image of kalata B1 reveals that cyclotide activity is independent of a protein receptor. *ChemBiochem*, 12(16), 2456-2462.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

Spitzfaden, C., Weber, H. P., Braun, W., Kallen, J., Wider, G., Widmer, H., Walkinshaw, M. D. ve Wuthrich, K. (1992). Cyclosporin A-cyclophilin complex formation. A model based on X-ray and NMR data. *FEBS Lett*, 300(3), 291-300.

Svangard, E., Goransson, U., Hocaoglu, Z., Gullbo, J., Larsson, R., Claeson, P. ve Bohlin, L. (2004). Cytotoxic cyclotides from *Viola tricolor*. *J Nat Prod*, 67(2), 144-147.

Tam, J. P., Lu, Y. A., Yang, J. L. ve Chiu, K. W. (1999). An unusual structural motif of antimicrobial peptides containing end-to-end macrocycle and cystine-knot disulfides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(16), 8913-8918.

Terlau, H. ve Olivera, B. M. (2004). Conus venoms: a rich source of novel ion channel-targeted peptides. *Physiological Reviews*, 84(1), 41-68.

Troeira Henriques, S., Lawrence, N., Chaousis, S., Ravipati, A. S., Cheneval, O., Benfield, A. H., Elliott, A. G., Kavanagh, A. M., Cooper, M. A., Chan, L. Y., Huang, Y. H. ve Craik, D. J. (2017). Redesigned Spider Peptide with Improved Antimicrobial and Anticancer Properties. *ACS Chem Biol*, 12(9), 2324-2334.

Veiseh, M., Gabikian, P., Bahrami, S. B., Veiseh, O., Zhang, M., Hackman, R. C., Ravanpay, A. C., Stroud, M. R., Kusuma, Y., Hansen, S. J., Kwok, D., Munoz, N. M., Sze, R. W., Grady, W. M., Greenberg, N. M., Ellenbogen, R. G. ve Olson, J. M. (2007). Tumor paint: A Chlorotoxin : Cy5.5 bioconjugate for intraoperative visualization of cancer foci. *Cancer Res*, 67(14), 6882-6888.

Wang, C. K. ve Craik, D. J. (2018). Designing macrocyclic disulfide-rich peptides for biotechnological applications. *Nat Chem Biol*, 14(5), 417-427.

Wang, C. K., Gruber, C. W., Cemazar, M., Siatskas, C., Tagore, P., Payne, N., Sun, G., Wang, S., Bernard, C. C. ve Craik, D. J. (2014). Molecular grafting onto a stable framework yields novel cyclic peptides for the treatment of multiple sclerosis. *ACS Chem Biol*, 9(1), 156-163.

Wang, C. K., Northfield, S. E., Huang, Y. H., Ramos, M. C. ve Craik, D. J. (2016). Inhibition of tau aggregation using a naturally-occurring cyclic peptide scaffold. *Eur J Med Chem*, 109, 342-349.

Wang, R., Shen, Q., Li, X., Xie, C., Lu, W., Wang, S., Wang, J., Wang, D. ve Liu, M. (2018). Efficacy of inversed isomer of CendR peptide on tumor tissue penetration. *Acta Pharm Sin B*, 8(5), 825-832.

Wei, X., Zhan, C., Shen, Q., Fu, W., Xie, C., Gao, J., Peng, C., Zheng, P. ve Lu, W. (2015). A D-peptide ligand of nicotine acetylcholine receptors for brain-targeted drug delivery. *Angew Chem Int Ed Engl*, 54(10), 3023-3027.

Weidmann, J. ve Craik, D. J. (2016). Discovery, structure, function, and applications of cyclotides: circular proteins from plants. *J Exp Bot*, 67(16), 4801-4812.

KAYNAKLAR DİZİNİ(devam)

Wiranowska, M., Colina, L. O. ve Johnson, J. O. (2011). Clathrin-mediated entry and cellular localization of chlorotoxin in human glioma. *Cancer Cell Int*, 11(27).

Yang, X., Feng, P., Yin, Y., Bushley, K., Spatafora, J. W. ve Wang, C. (2018). Cyclosporine Biosynthesis in *Tolypocladium inflatum* Benefits Fungal Adaptation to the Environment. *mBio*, 9(5), e01211-01218.

Yang, Y. L., Hua, K. F., Chuang, P. H., Wu, S. H., Wu, K. Y., Chang, F. R. ve Wu, Y. C. (2008). New cyclic peptides from the seeds of *Annona squamosa* L. and their anti-inflammatory activities. *J Agric Food Chem*, 56(2), 386-392.

Yin, N. (2014). Enhancing the Oral Bioavailability of Peptide Drugs by using Chemical Modification and Other Approaches. *Medicinal Chemistry*, 4(12), 763-769.

Zhang, M. ve Lu, W. (2018). Enhanced glioma-targeting and stability of (L)GICP peptide coupled with stabilized peptide (D)A7R. *Acta Pharm Sin B*, 8(1), 106-115.

Zhang, X., Wang, F., Shen, Q., Xie, C., Liu, Y., Pan, J. ve Lu, W. (2018). Structure Reconstruction of LyP-1: (L)c(LyP-1) Coupling by Amide Bond Inspires the Brain Metastatic Tumor Targeted Drug Delivery. *Mol Pharm*, 15(2), 430-436.

Zhou, X. R., Zhang, Q., Tian, X. B., Cao, Y. M., Liu, Z. Q., Fan, R., Ding, X. F., Zhu, Z., Chen, L. ve Luo, S. Z. (2016). From a pro-apoptotic peptide to a lytic peptide: One single residue mutation. *Biochim Biophys Acta*, 1858(8), 1914-1925.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : KARA Şeyda
Doğum tarihi ve yeri : 01.02.1994 Bolu
e-mail : seyraka@gmail.com

Eğitim:

Derece	Eğitim birimi	Mezuniyet tarihi
Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyokimya Bölümü	14.06.2016
Lise	Emine ve Mehmet Baysal Lisesi	08.06.2012

Bildiriler

Şeyda Kara, Muharrem Akcan, Sefa Demir, Grafting of a Cancer Targeting Peptide Epitope onto Cyclotides, 5th International BAU Drug Design Congress, PP-73, 19-21 Ekim 2017, İstanbul, Türkiye

Şeyda Kara, Muharrem Akcan, Lenf Tümörleri ile İlişkili LyP-1 Peptidinin Modifikasyonu, Uluslararası Katılımlı 6. İlaç Kimyası: İlaç Etkin Maddesi Tasarımı, Sentezi, Üretimi ve Standardizasyonu Kongresi, KS-160, 22-25 Mart 2018, Belek/Antalya, Türkiye.

Projeler

M. Akcan (Yönetici), Ş. Karaoğlu (Bursiyer), S. Demir (Bursiyer), **Ş. Kara** (Bursiyer), “Tümör ilişkili karbonik anhidraz IX proteinini hedefleyen CaIX-P1 peptidinin kararlılığının ve oral biyoyararlanımının artırılması” Tübitak tarafından desteklenen 114Z193 nolu proje.

M. Akcan (Yönetici), **Ş. Kara** (Araştırmacı) “Lenf tümörleri ile ilişkili LyP-1 peptidinin kararlılığının artırılması” Dumlupınar Üniversitesi BAP birimi tarafından desteklenen 2017-69 nolu proje.