

**T.C.  
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**CANİNE PARVOVİRUS'E AİT ANTİJENİK ÖZELLİKLİ SENTETİK PEPTİDLERİN  
SENTEZİ VE BİYOKONJUGATLARININ GELİŞTİRİLMESİ**

**SERAP ACAR DERMAN**

**DOKTORA TEZİ  
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI  
BİYOMÜHENDİSLİK PROGRAMI**

**DANIŞMAN  
YRD. DOÇ. DR. ZEYNEP MUSTAFAEVA AKDESTE**

**İSTANBUL, 2012**

T.C.  
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**CANİNE PARVOVİRUS'E AİT ANTİJENİK ÖZELLİKLİ SENTETİK PEPTİDLERİN  
SENTEZİ VE BİYOKONJUGATLARININ GELİŞTİRİLMESİ**

Serap DERMAN tarafından hazırlanan tez çalışması tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Tez Danışmanı**

Yrd. Doç. Dr. Zeynep Mustafaeva AKDESTE  
Yıldız Teknik Üniversitesi

**Jüri Üyeleri**

Prof. Dr. Nesrin EMEKLİ  
Marmara Üniversitesi

\_\_\_\_\_

Prof. Dr. İNCİ ARISAN  
Yıldız Teknik Üniversitesi

\_\_\_\_\_

Prof. Dr. İbrahim İŞILDAK  
Yıldız Teknik Üniversitesi

\_\_\_\_\_

Prof. Dr. İsmail AYDIN  
İstanbul Üniversitesi

\_\_\_\_\_

Bu alışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün 2011-07-04-DOP01 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Bu alışma, Tübitak BİDEB 2211 Yurtiçi Doktora Burs Programı tarafından desteklenmiştir.

Bu tez alışması DERMAN, ÖZBEK ve ACAR aileleri tarafından maddi olarak desteklenmiştir.

## ÖNSÖZ

---

Tez konumu belirleyen, çalışmalarımın şekillenmesinde büyük emeği bulunan, benden hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen, değerli tez hocam Yrd.Doç.Dr. Zeynep Mustafaeva AKDESTE'ye,

Tez çalışmam boyunca yapmış oldukları değerlendirmeler ile doktora çalışmama verdikleri destekten ötürü doktora tez izleme jüri üyeleri Prof. Dr. Nesrin EMEKLİ'ye ve Prof. Dr. İnci ATAÇ'a,

Çalışmalarımın yerine getirilmesine imkân sağlayan Kimya-Metalurji Fakültesi Dekanlığına, Biyomühendislik Bölümüne, Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. İbrahim İŞILDAK'a ve Biyomühendislik Bölümündeki değerli hocalarıma,

2004-2007 yılları arasında hem yüksek lisans hem de doktora tez çalışmam süresinde engin bilgisi ile çalışmalarımızın ilerlemesinde yardımcı olan, bizlerin her yönde önünü açan ve bu gelişmiş teknoloji ile çalışmamıza olanak sağlayan Biyomühendislik Kurucu Bölüm Başkanı, merhum Prof. Dr. Mehmet Mustafaev AKDESTE'ye,

Doktora tezime mali destekte bulunan YTÜ-BAP Koordinatörlüğüne ve Tübitak BİDEB 2211 Yurtiçi Doktora Burs Programına,

Sitotoksisite deneylerimin gerçekleştirilmesini sağlayan Prof. Dr. Adil Allahverdiyev ve Dr. Sezen CANIM ATEŞ'e, Boyut ve Zeta potansiyel ölçümlerimi gerçekleştiren Arş.Gör. Eray DALGAKIRAN'a, LC-MS, GPC-Viscotek analizlerimi gerçekleştiren Arş.Gör. Murat TOPUZOĞULLARI'na, HPLC analizlerimi gerçekleştiren Arş.Gör.Dr. Banu MANSUROĞLU ve Dr. Kadriye KIZILBEY'e, Flouresans ölçümlerimi gerçekleştiren Arş.Gör. Yasemin Budama KILINÇ'a, AFM görüntülerimi alan Arş.Gör. Yeliz Başaran ELALMIŞ'a, SEM görüntülerimin alınmasını sağlayan Arş.Gör.Dr. Mehmet Burçin PİŞKİN ve Arş. Gör. Seyhun KIPÇAK'a

Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Laboratuvarları'ndaki çalışmalarım sırasında arkadaşlık ve destekleri ile bana yardımcı olan tüm çalışma arkadaşlarıma,

Doktora eğitimim boyunca manevi destekleri, emekleri ve dostlukları ile hep yanımda olan değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Banu MANSUROĞLU, Dr. Kadriye ATICI KIZILBEY, Dr. Sezen CANIM ATEŞ ve Uzm. Ayşegül ERDEMİR'e

Sevgisiyle hayatıma kattığı değerler ve bu çalışma sürecindeki sabrı için sevgili Eşim'e,

Hayatımın her döneminde varlıkları ile bana güç veren, desteklerini her daim hissettiğim ve sayelerinde bugünlere gelebildiğim sevgili Anneciğim ve Babacığım Gülinaz ve Avni ACAR'a, canım kardeşlerim Volkan ve Salih ACAR'a, Bana ikinci anne ve baba olan sevgili ailem Nihal ve Kayhan DERMAN'a,

Hayatımın en güzel hediyesi, biriciğim, canım kızım Sena DERMAN'a,

Bana ve bu teze emeği geçmiş herkese sonsuz teşekkürler.

Eylül, 2012

Serap ACAR DERMAN

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ .....	xi
KISALTMA LİSTESİ .....	xii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xiii
ÖZET .....	xxv
ABSTRACT .....	xxvii
BÖLÜM 1.....	29
GİRİŞ.....	29
1.1 Literatür Özeti.....	29
1.2 Tezin Amacı.....	31
1.3 Hipotez.....	32
BÖLÜM 2.....	33
GENEL BİLGİLER.....	33
2.1 Köpeklerde Kanlı İshal .....	33
2.1.1 Canine Parvovirüsün Özellikleri .....	34
2.1.1.1 Köpeklerde Parvovirus Enfeksiyonlarında Risk Faktörleri .....	36
2.2 Aşı Çalışmaları.....	36
2.2.1 Cansız (ölü) Mikrop Aşıları .....	37
2.2.2 Canlı (Atenüe) Mikrop Aşıları.....	37
2.2.3 Mikrop Ürünlerinden Hazırlanan Aşılar .....	38
2.2.3.1 Toksoid (Anatoksin) Aşılar.....	38
2.2.3.2 Mikropların Belirli Bir Kısımından Hazırlanan Aşılar .....	38
2.2.4 Biyoteknolojik Aşılar .....	38
2.2.4.1 Rekombinant DNA Aşıları.....	38
2.2.4.2 Reasortan Aşılar .....	38
2.2.4.3 Mutant Aşılar .....	39
2.2.4.4 Anti İdiotip Aşılar.....	39
2.2.4.5 Konjuge Polisakkarid Aşıları .....	39

2.2.4.6	Sentetik Peptid Aşıları .....	39
2.3	Lineer Polimer Özellikteki Peptid Taşıyıcılar.....	40
2.3.1	Poliakrilikasit (PAA) .....	44
2.3.2	Karboksimetilselülaz (CMC) .....	44
2.3.3	Poli(N-Vinil-2-Pirolidon-ko-Akrilikasid) [P(VP-co-AA)] .....	44
2.4	Küresel Özellikteki Taşıyıcılar.....	44
2.4.1	Mikropartiküller .....	45
2.4.2	Nanopartiküller .....	45
2.4.2.1	Nanopartiküllerin Sağladığı Avantajlar .....	47
2.4.2.2	Nanopartiküllerin Uygulama Alanları.....	49
2.4.2.3	Nanopartiküllerin Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler.....	49
Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) .....	50	
2.4.2.4	Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri .....	52
İkili Emülsiyon (w/o/w) Çözücü Buharlaştırma Yöntemi .....	53	
2.5	Çapraz Bağlama Reaktifleri.....	54
2.5.1	Homobifonksiyonel Çapraz Bağlayıcılar.....	54
2.5.2	Seçici Oldukları Gruplara Göre Homobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri .....	56
2.5.3	Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlayıcılar .....	57
2.5.4	Seçici Oldukları Gruplara Göre Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri .....	59
2.5.5	Direkt (Zero-Length) Çapraz Bağlayıcılar .....	59
2.5.6	Karbodiimidler .....	60
2.5.6.1	EDC .....	61
2.5.6.2	EDC Plus Sülfon-NHS .....	64
2.5.6.3	CMC.....	65
2.5.6.4	DCC.....	65
2.5.6.5	DIC.....	65
2.5.6.6	N,N-Karbonildiimidazol .....	65
2.6	Radikal Zincir Polimerizasyonu .....	65
2.7	Mikrodalga Destekli Katı Faz Peptid Sentezi (SPPS) .....	68
BÖLÜM 3.....		73
DENEYSEL ÇALIŞMALARDA KULLANILAN ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ.....		73
3.1	Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar .....	73
3.2	Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	74
3.3	Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler.....	76
3.3.1	Asetat Tamponu.....	76
3.3.2	0,01 M 'lik PBS Tamponu (pH=7) .....	76
3.3.3	% 2,5'lik PVA Çözeltisi .....	77
3.3.4	% 0,5'lik PVA Çözeltisi .....	77
3.4	Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Ölçüm Yöntemleri.....	77
3.4.1	GPC (Jel Geçirgenlik-Moleküler Eleme Kromatografisi) .....	77
3.4.2	Fluoresans Spektroskopisi .....	78
3.4.3	Boyut ve Zeta Potansiyel Ölçümleri.....	79
3.4.4	LC-MS (Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi) .....	80

3.4.5	UV-VIS Spektroskopisi (Ultraviyole-Görünür Bölge Spektroskopisi) ..	81
3.4.6	FT-IR Spektroskopisi (Furier Transform Infrared Spektroskopisi).....	81
3.4.7	AFM (Atomik Kuvvet Mikroskopisi) .....	82
3.4.8	SEM (Taramalı Elektron Mikroskopisi).....	83
BÖLÜM 4.....		84
DENEYSEL KISIM.....		84
4.1	Poli(N-Vinil-2-pirolidon-ko-Akrilik asit) Polimerinin Sentezi .....	84
4.2	Canine Parvovirüs W-7L20 Sentetik Peptidinin Özellikleri ve Sentezi.....	85
4.3	Canine Parvovirüs W-1L19 Sentetik Peptidinin Özellikleri ve Sentezi.....	88
4.4	Canine Parvovirus W-7L20 Peptidinin Poliakrilikasit (PAA) Polimeri ile Biyokonjugatlarının Sentezi .....	89
4.4.1	PAA-Peptid Biyokonjugatlarına Ait Hesaplamalar .....	89
4.4.1.1	PAA Polimerinin Artan Oranlarında Konjugasyon.....	89
4.5	Canine Parvovirus W-1L19 Peptidinin Poliakrilikasit (PAA) Polimeri ile Fiziksel Komplekslerinin Hazırlanması.....	91
4.5.1	PAA-Peptid Fiziksel Komplekslerine Ait Hesaplamalar .....	91
4.6	Canine Parvovirus W-1L19 Peptidinin Poliakrilikasit (PAA) Polimeri ile Biyokonjugatlarının Sentezi .....	92
4.6.1	Peptid-PAA Biyokonjugatlarına Ait Hesaplamalar .....	92
4.6.1.1	Peptidin Artan Oranlarında Konjugasyon .....	92
4.6.1.2	Polimerin Artan Oranlarında Konjugasyon .....	94
4.7	Canine Parvovirus W-1L19 Peptidinin Karboksimetilselülaz (CMC) Polimeri ile Biyokonjugatlarının Sentezi .....	95
4.7.1	CMC-Peptid Biyokonjugatlarına Ait Hesaplamalar .....	95
4.7.1.1	CMC Polimerinin Artan Oranlarında Konjugasyon.....	95
4.8	Canine Parvovirus W-1L19 Peptidinin Poli(N-Vinil-2-Pirolidon-ko- Akrilikasid) [P(VP-co-AA)] Polimeri ile Biyokonjugatlarının Sentezi .....	97
4.8.1	[P(VP-ko-AA)]-Peptid Biyokonjugatlarına Ait Hesaplamalar.....	97
4.8.1.1	[P(VP-ko-AA)] (2:1, 120.000 Da) Polimerinin Artan Oranlarında Konjugasyon.....	97
4.8.1.2	[P(VP-ko-AA)] (1:3, 80.000 Da) Polimerinin Artan Oranlarında Konjugasyon.....	99
4.9	Poli(D,L-laktik-ko-glikolik) Asid (PLGA) Nanopartiküllerinin Oluşturulması 100	
4.9.1	Yükleme Veriminin Hesaplanması .....	100
4.9.2	MTT Analizi.....	101
4.9.3	Nanopartiküllerin Salımlarının İncelenmesi.....	102
BÖLÜM 5.....		103
DENEY SONUÇLARI.....		103
5.1	Poli(N-Vinil-2-pirolidon-ko-Akrilik asit) (2:1) Polimerinin Analizi .....	103
5.2	Canine Parvovirus W-7L20 Dizili Sentetik Peptidinin Analizi.....	107
5.2.1	Canine Parvovirus W-7L20 Dizili Sentetik Peptidin LC-MS Analizi....	107



5.2.2	Canine Parvovirus W-7L20 Dizili Sentetik Peptidin Jel Geçirgenlik Kromatografisi Analizi.....	115
5.2.3	Canine Parvovirus W-7L20 Dizili Sentetik Peptidin Floresans Spektroskopisi Analizi.....	118
5.2.4	Canine Parvovirus W-7L20 Dizili Sentetik Peptidin Toyopearl Dolgulu Kolonda Saflaştırılması .....	119
5.3	Canine Parvovirus W-1L19 Dizili Sentetik Peptidin Analizi.....	123
5.3.1	Canine Parvovirus W-1L19 Dizili Sentetik Peptidin HPLC Analizi.....	123
5.3.2	Canine Parvovirus W-1L19 Dizili Sentetik Peptidin MS Analizi.....	124
5.4	Canine Parvovirus W-7L20 Peptidinin PAA Polimeri ile Biyokonjugatlarının Analizi .....	125
5.4.1	GPC Analizi .....	125
5.4.2	Floresans Analizi .....	127
5.4.3	Zetasizer Analizi .....	128
5.5	Canine Parvovirus W-1L19 Peptidinin PAA Polimeri ile Fiziksel Komplekslerinin Analizi .....	129
5.5.1	HPLC Analizi .....	129
5.6	Canine Parvovirus W-1L19 Peptidinin PAA Polimeri ile Biyokonjugatlarının Analizi .....	130
5.6.1	Peptidin Artan Oranlarında Konjugasyon .....	130
5.6.1.1	HPLC Analizi.....	130
5.6.1.2	GPC Analizi .....	136
5.6.1.3	Floresans Analizi.....	139
5.6.1.4	Zetasizer Analizi.....	140
5.6.2	Polimerin Artan Oranlarında Konjugasyon .....	141
5.6.2.1	HPLC Analizi.....	141
5.6.2.2	GPC Analizi .....	146
5.6.2.3	Floresans Analizi.....	149
5.6.2.4	Zetasizer Analizi.....	150
5.7	Canine Parvovirus W-1L19 Peptidinin Karboksimetilselülaz (CMC) Polimeri ile Biyokonjugatlarının Analizi .....	151
5.7.1	GPC Analizi .....	151
5.7.2	Floresans Analizi .....	154
5.7.3	Zetasizer Analizi .....	155
5.8	Canine Parvovirus W-1L19 Peptidinin Poli(N-Vinil-2-Pirolidon-ko-Akrilikasid) [P(VP-co-AA)] Polimeri ile Biyokonjugatlarının Analizi .....	156
5.8.1	[P(VP-ko-AA)] (2:1, 120.000 Da) Polimerinin Artan Oranlarında Konjugasyon .....	156
5.8.1.1	GPC Analizi .....	156
5.8.1.2	Floresans Analizi.....	159
5.8.1.3	Zetasizer Analizi.....	160
5.8.2	[P(VP-ko-AA)] (1:3, 80.000 Da) Polimerinin Artan Oranlarında Konjugasyon .....	161
5.8.2.1	GPC Analizi .....	161
5.8.2.2	Floresans Analizi.....	164
5.8.2.3	Zetasizer Analizi.....	165

5.9	Poli(Laktik-ko-glikolik) Asid (PLGA) Nanopartiküllerinin Analizi.....	165
5.9.1	Zetasizer Analizi .....	165
5.9.2	FT-IR Analizi.....	167
5.9.3	AFM Analizi .....	173
5.9.4	SEM Analizi.....	177
5.9.5	Işık Mikroskop Analizi .....	181
5.9.6	Fluoresans Mikroskop Analizi .....	183
5.9.7	MTT Analizi.....	185
5.9.8	Yükleme veriminin hesaplanması .....	195
5.9.9	Nanopartiküllerin Salımlarının İncelenmesi.....	196
BÖLÜM 6	.....	200
SONUÇ VE ÖNERİLER	.....	200
6.1	Canine Parvovirus W-7L20 Peptidinin Poliakrilikasit (PAA) Polimeri ile Biyokonjugatlarına Ait Tartışma .....	202
6.2	Canine Parvovirus W-1L19 Peptidinin Poliakrilikasit (PAA) Polimeri ile Biyokonjugatlarına Ait Tartışma .....	206
6.2.1	Peptidin Artan Oranlarında Konjugasyon .....	206
6.2.2	Polimerin Artan Oranlarında Konjugasyon .....	210
6.3	Canine Parvovirus W-1L19 Peptidinin Karboksimetilselülaz (CMC) Polimeri ile Biyokonjugatlarına Ait Tartışma .....	215
6.4	Canine Parvovirus W-1L19 Peptidinin Poli(N-Vinil-2-Pirolidon-ko- Akrilikasid)[P(VP-co-AA)] Polimeri ile Biyokonjugatlarına Ait Tartışma ..	219
6.4.1	[P(VP-ko-AA)] (2:1, 120.000 Da) Polimerinin Konjugatları .....	219
6.4.2	[P(VP-ko-AA)] (1:3, 80.000 Da) Polimerinin Konjugatları .....	223
6.5	Poli(Laktik-ko-glikolik) Asid (PLGA) Nanopartiküllerine Ait Tartışma .....	227
KAYNAKLAR	.....	234
ÖZGEÇMİŞ	.....	245

## SİMGE LİSTESİ

---

L	Litre
ml	Mililitre
$\mu$ l	Mikrolitre
mg	Miligram
$\mu$ m	Mikrometre
nm	Nanometre
Da	Dalton
kDa	Kilodalton
M	Molar
n	Mol
$^{\circ}$ C	Derece santigrat

## KISALTMA LİSTESİ

---

SEC	Moleküler eleme kromatografisi (Size Exclusion Chromatography)
GPC	Moleküler eleme kromatografisi (Gel Permeation Chromatography)
UV	Ultra Violet
RI	Kırılma İndisi
RALS	Işık Saçılması
HPLC	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography)
FT-IR	Furier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (Furier Transform Infrared Spectroscopy)
LC-MS	Sıvı Kromatografi-Kütle Spektroskopisi (Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy)
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopisi (Scanning Electron Microscopy)
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskopisi (Atomik Force Microscopy)
PLGA	Poli(laktik-ko-glikolik)asit
PLA	Poli(laktik asit)
PGA	Poli(Glikolik asit)
PAA	Poliakrilikasit
CMC	Karboksimetilselülaz
(VP-ko-AA)	Poli(N-Vinil-2-Pirolidon-ko-Akrilikasid)
PVA	Polivinilalkol
NP	Nanopartikül
MBS	m-Maleimidobenzoil-N-hidroksisüksinimid ester
NHS	N-Hidroksisüksinimid ester
EDC	Karbodiimid
FITC	Floresin İzotiyosiyanat
MTT	3-(4,5-dimetil triazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliumbromid
HCl	Hidroklorik Asit
PBS	Fosfat Tamponu
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Disodyum hidrojen fosfat heptahidrate
NaCl	Sodyum klorür
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	Sodyum dihidrojen fosfat dihidrate
NaN <sub>3</sub>	Sodyum azid
pl	İzoelektrik nokta

## ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2. 1	Canine Parvovirusün etkilediği organların [kalp ve gastrointestinal (mide-bağırsak sistemi) sistemlerin (fakat bu organlarla sınırlı değildir)] gösterimi [13] ..... 33
Şekil 2. 2	CPV'nin X-Işın Kristalografisi ile çözümlenen moleküler yüzey yapısı [37] ..... 35
Şekil 2. 3	Canine parvovirüsün (PDB entry 4dpv) protein ve DNAsını içeren tüm yapısı. Beyaz eksen etrafında 5 farklı protein bölgesi 5 farklı renkte işaretlenmiştir [38]. ..... 36
Şekil 2. 4	Taşıyıcı polimer olarak yaygın kullanılan katyonik polielektrolitler ..... 42
Şekil 2. 5	Taşıyıcı polimer olarak yaygın kullanılan anyonik polielektrolitler ..... 42
Şekil 2. 6	Kısa zincirli peptid moleküllerinin lineer ve uzun zincirli polimerler ile oluşturdukları konjugatların şematik gösterimi [52, 53]..... 43
Şekil 2. 7	Nanoküre ve Nanokapsül yapısının şematik gösterimi [84]..... 46
Şekil 2. 8	Biyoparçalanabilir nanopartiküllerin çeşitleri [79, 97]..... 47
Şekil 2. 9	Poli(Laktik asit) (PLA), Poli(GLikolik asit) (PGA) ve Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) polimerlerinin kimyasal yapıları ..... 51
Şekil 2. 10	PLGA polimerinin hidrolizi ..... 52
Şekil 2. 11	PLGA nanopartikülünün hidrolizi ve etkin madde salımının aşamaları [111]..... 52
Şekil 2. 12	Peptid yüklü nanopartiküllerin ikili emülsiyon w/o/w çözücü buharlaştırma yöntemi ile üretimi [91]..... 53
Şekil 2. 13	Homobifonksiyonel çapraz bağlayıcıların şematik gösterimi [50] ..... 55
Şekil 2. 14	Konjugasyon reaksiyonlarında kullanılan karboksil grubuna yönelen çapraz bağlayıcılar [50]..... 57
Şekil 2. 15	Heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcıların şematik gösterimi [50]..... 57
Şekil 2. 16	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür molekülünün kimyasal yapısı [50] ..... 61
Şekil 2. 17	EDC kullanılarak sentezlenen Polimer-Peptid konjugatı reaksiyon mekanizması [50] ..... 64
Şekil 2. 18	Benzoilperoksit başlatıcısının ısı ile parçalanma reaksiyonu [122] ..... 66
Şekil 2. 19	Radikal molekülünün monomere bağlanması [122] ..... 66
Şekil 2. 20	Radikal zincire monomerlerin katılması [122] ..... 67
Şekil 2. 21	Aktif radikal zincirlerinin birbirine katılarak orantılı sonlanması [122]... 67

Şekil 2. 22	Aktif radikal zincirlerinin orantısız sonlanmaları [122] .....	68
Şekil 2. 23	Geleneksel ısıtma (a) ve mikrodalga enerjisi (b) ile peptid sentezinde moleküllerin yönlendirilmesi [123] .....	69
Şekil 2. 24	Geleneksel ısıtma yöntemi ile mikrodalga ısıtma yönteminin karşılaştırılması [125] .....	69
Şekil 2. 25	Peptid sentez döngüsünün basamakları [131].....	70
Şekil 2. 26	Katı faz peptid sentezinin genel gösterimi .....	71
Şekil 2. 27	Katı faz peptid sentezinin şematik gösterimi [133].....	72
Şekil 3. 1	Negatif yüklü parçacığın Zeta Potansiyeli [135].....	80
Şekil 3. 2	AFM cihazının temel bileşenleri (a)[140], AFM cihazında direk temas (b1), temassız (b2) ve titreşimli (b3) modda yapılan ölçüm teknikleri [141] .....	83
Şekil 4. 1	Klasik (termal) yöntemle sentezlenen [P(VP-ko-AA)] kopolimerinin sentez aşamasının şematik gösterimi [71] .....	84
Şekil 4. 2	Klasik (termal) yöntemle sentezlenen [P(VP-ko-AA)] polimerinin reaksiyon mekanizması [71].....	85
Şekil 4. 3	Canine Parvovirus W-7L20 sentetik peptid (W-QPDGGQPAVRNERA) dizisinin aminoasitlerinin hidrofobik ve hidrofobik özellikleri .....	86
Şekil 4. 4	Canine Parvovirus W-7L20 sentetik peptid dizisinin pH'a bağlı titrasyon grafiği ve her pH değerindeki net yükü .....	86
Şekil 4. 5	Canine Parvovirus W-1L19 sentetik peptid (W-MSDGA VQPDGGQPAVRNER) dizisinin aminoasitlerinin hidrofobik ve hidrofobik özellikleri.....	88
Şekil 4. 6	Canine Parvovirus W-1L19 sentetik peptid dizisinin pH'a bağlı titrasyon grafiği ve her pH değerindeki net yükü .....	89
Şekil 5. 1	Klasik (Termal) yöntemle sentezlenen P(VP-ko-AA) (2:1) kopolimerlerine ait GPC-Refraktif İndeks (a), UV (b), Işık Saçılması (c) ve Viskozimetre (d) kromatogramı.....	104
Şekil 5. 2	Termal yöntemle sentezlenen P(VP-ko-AA) (2:1) kopolimerine ait FT-IR spektrumu .....	105
Şekil 5. 3	Poli(N-vinil-2-pirolidon-ko-akrilik asit) polimerine ait zetasizer boyut analizi .....	107
Şekil 5. 4	Sentezlenen Canine Parvovirus W-7L20 ham peptidin preparatif LC-MS cihazı UV kromatogramı.....	108
Şekil 5. 5	Sentezlenen Canine Parvovirus W-7L20 ham peptidi LC-MS cihazı Toplam İyon Kromatogramı .....	109
Şekil 5. 6	Sentezlenen Canine Parvovirus W-7L20 ham peptidine ait <b>19.154 → 21.700</b> dakikalar arasındaki kütle spektrumu .....	109
Şekil 5. 7	Sentezlenen Canine Parvovirus W-7L20 ham peptidine ait preparatif HPLC kromatogramı .....	111
Şekil 5. 8	Canine Parvovirus W-7L20 ham peptid dizisinin saflaştırılmasından elde edilen Pik1'in Preparatif LC-MS cihazı UV kromatogramı.....	112
Şekil 5. 9	Canine Parvovirus W-7L20 ham peptid dizisinin saflaştırılmasından elde edilen Pik1'in Preparatif LC-MS cihazı Toplam İyon kromatogramı.....	112
Şekil 5. 10	Canine Parvovirus W-7L20 ham peptidine ait Pik 1 fraksiyonunun <b>7.692 → 8.308</b> dakikalar arasındaki kütle spektrumu .....	113

Şekil 5. 11	Canine Parvovirus W-7L20 ham peptid dizisinin saflaştırılmasından elde edilen Pik2'in Preparatif LC-MS cihazı UV kromatogramı.....	114
Şekil 5. 12	Canine Parvovirus W-7L20 ham peptid dizisinin saflaştırılmasından elde edilen Pik2'in Preparatif LC-MS cihazı Toplam İyon kromatogramı.....	114
Şekil 5. 13	Canine Parvovirus W-7L20 ham peptidine ait Pik 2 fraksiyonunun <b>7.767</b> → <b>8.438</b> dakikalar arasındaki kütle spektrumu.....	115
Şekil 5. 14	pH 7'de hazırlanmış Canine Parvovirus W-7L20 ham peptidi (◆), Pik 1 (◆) ve Pik 2 (◆)'ye ait GPC Kırılma İndisi detektörü kromatogramları.	116
Şekil 5. 15	pH 7'de hazırlanmış Canine Parvovirus W-7L20 ham peptidi (◆), Pik 1 (◆) ve Pik 2 (◆)'ye ait GPC UV detektörü kromatogramları.....	117
Şekil 5. 16	pH 7'de hazırlanmış Canine Parvovirus W-7L20 ham peptidi (◆), Pik 1 (◆) ve Pik 2 (◆)'ye ait GPC Işık Saçılması detektörü kromatogramları.	117
Şekil 5. 17	pH 7'de hazırlanmış Canine Parvovirus W-7L20 ham peptidi (◆), Pik 1 (◆) ve Pik 2 (◆)'ye ait GPC Vizkozite detektörü kromatogramları .....	118
Şekil 5. 18	pH 7'de hazırlanmış Canine Parvovirus W-7L20 ham peptidi (◆), Pik 1 (◆) ve Pik 2 (◆)'ye ait karşılaştırmalı Floresans Spektrumu .....	119
Şekil 5. 19	Canine Parvovirus W-7L20 ham peptidinin toyopearl kolon uygulaması sonucu saflaştırılması .....	120
Şekil 5. 20	pH 7'de hazırlanmış Canine Parvovirus W-7L20 ham peptidi, Fraksiyon 1 ve Fraksiyon 2'ye ait GPC Kırılma İndisi (◆) ve UV (◆) detektörü kromatogramı.....	121
Şekil 5. 21	pH 7'de hazırlanmış Canine Parvovirus W-7L20 ham peptidi, Fraksiyon 1 ve Fraksiyon 2'ye ait GPC Işık Saçılması (◆) ve Vizkozite (◆) detektörü kromatogramı.....	122
Şekil 5. 22	Canine Parvovirus W-1L19 peptidine ait HPLC UV kromatogramı.....	123
Şekil 5. 23	Canine Parvovirus W-1L19 peptidine ait MS spektrumu .....	124
Şekil 5. 24	PAA polimeri (◆) ve pH 7'de hazırlanmış $n_{PAA}/n_{pep}=0,025$ (◆), $0,075$ (◆), $0,15$ (◆), $0,25$ (◆), $0,375$ (◆), konjugatlarına ait GPC Kırılma İndisi kromatogramı.....	125
Şekil 5. 25	PAA polimeri (◆) ve pH 7'de hazırlanmış $n_{PAA}/n_{pep}=0,025$ (◆), $0,075$ (◆), $0,15$ (◆), $0,25$ (◆), $0,375$ (◆), konjugatlarına ait GPC Kırılma Işık Saçılması kromatogramı.....	126
Şekil 5. 26	PAA polimeri (◆) ve pH 7'de hazırlanmış $n_{PAA}/n_{pep}=0,025$ (◆), $0,075$ (◆), $0,15$ (◆), $0,25$ (◆), $0,375$ (◆), konjugatlarına ait GPC Kırılma UV kromatogramı.....	126
Şekil 5. 27	Peptid (◆), PAA polimeri (◆) ve pH 7'de hazırlanmış $n_{PAA}/n_{pep}=0,025$ (◆), $0,075$ (◆), $0,15$ (◆), $0,25$ (◆), $0,375$ (◆) konjugatlarına ait Floresans spektrumları .....	127
Şekil 5. 28	Peptid (◆), PAA polimeri (◆) ve pH 7'de hazırlanmış $n_{PAA}/n_{pep}=0,025$ (◆), $0,075$ (◆), $0,15$ (◆), $0,25$ (◆), $0,375$ (◆), konjugatlarına ait boyut analizi sonuçları .....	128
Şekil 5. 29	Peptid, PAA polimeri ve pH 7'de hazırlanmış $n_{PAA}/n_{pep}=0,025$ , $0,075$ , $0,15$ , $0,25$ , $0,375$ konjugatlarına ait Z-Average, Pdl ve Zetapotansiyel değerleri .....	128

Şekil 5. 30	Peptid (♦), PAA polimeri (♦) ve pH 4'de hazırlanmış $n_{PAA}/n_{pep}=0,8$ (♦), $n_{PAA}/n_{pep}=1$ (♦) fiziksel komplekslerine ait HPLC kromatogramı .....	129
Şekil 5. 31	Peptid (♦), PAA polimeri (♦) ve pH 7'de hazırlanmış $n_{pep}/n_{PAA}=1$ (♦) konjugatına ait HPLC kromatogramı .....	130
Şekil 5. 32	Peptid (♦), PAA polimeri (♦) ve pH 7'de hazırlanmış $n_{pep}/n_{PAA}=3$ (♦) konjugatına ait HPLC kromatogramı .....	131
Şekil 5. 33	Peptid (♦), PAA polimeri (♦) ve pH 7'de hazırlanmış $n_{pep}/n_{PAA}=5$ (♦) konjugatına ait HPLC kromatogramı .....	131
Şekil 5. 34	Peptid (♦), PAA polimeri (♦) ve pH 7'de hazırlanmış $n_{pep}/n_{PAA}=7$ (♦) konjugatına ait HPLC kromatogramı .....	132
Şekil 5. 35	Peptid (♦), PAA polimeri (♦) ve pH 7'de hazırlanmış $n_{pep}/n_{PAA}=10$ (♦) konjugatına ait HPLC kromatogramı .....	132
Şekil 5. 36	Peptid (♦), PAA polimeri (♦) ve pH 7'de hazırlanmış $n_{pep}/n_{PAA}=15$ (♦) konjugatına ait HPLC kromatogramı .....	133
Şekil 5. 37	Peptid (♦), PAA polimeri (♦) ve pH 7'de hazırlanmış $n_{pep}/n_{PAA}=20$ (♦) konjugatına ait HPLC kromatogramı .....	133
Şekil 5. 38	Peptid (♦), PAA polimeri (♦) ve pH 7'de hazırlanmış $n_{pep}/n_{PAA}=30$ (♦) konjugatına ait HPLC kromatogramı .....	134
Şekil 5. 39	Peptid (♦), PAA polimeri (♦) ve pH 7'de hazırlanmış $n_{pep}/n_{PAA}=1$ (♦), 3(♦), 5(♦), 7(♦), 10(♦), 15(♦), 20(♦), 30 (♦) konjugatlarına ait HPLC kromatogramı.....	135
Şekil 5. 40	Peptid (♦), PAA polimeri (♦) ve pH 7'de hazırlanmış $n_{pep}/n_{PAA}=1$ (♦), 3(♦), 5(♦), 7(♦), 10(♦), 15(♦), 20(♦), 30 (♦) konjugatlarına ait GPC Kırılma İndisi kromatogramı.....	136
Şekil 5. 41	Peptid (♦), PAA polimeri (♦) ve pH 7'de hazırlanmış $n_{pep}/n_{PAA}=1$ (♦), 3 (♦), 5 (♦), 7 (♦), 10 (♦), 15 (♦), 20 (♦), 30 (♦) konjugatlarına ait GPC Işık Saçılması kromatogramı.....	137
Şekil 5. 42	Peptid (♦), PAA polimeri (♦) ve pH 7'de hazırlanmış $n_{pep}/n_{PAA}=1$ (♦), 3 (♦), 5 (♦), 7 (♦), 10 (♦), 15 (♦), 20 (♦), 30 (♦) konjugatlarına ait GPC UV kromatogramı.....	138
Şekil 5. 43	Peptid (♦), PAA polimeri (♦) ve pH 7'de hazırlanmış $n_{pep}/n_{PAA}=1$ (♦), 3 (♦), 5(♦), 7(♦), 10(♦), 15(♦), 20(♦), 30 (♦) konjugatlarına ait Floresans spektrumları.....	139
Şekil 5. 44	Peptid (♦), PAA polimeri (♦) ve pH 7'de hazırlanmış $n_{pep}/n_{PAA}=1$ (♦), 3 (♦), 5 (♦), 7 (♦), konjugatlarına ait boyut analizi sonuçları .....	140
Şekil 5. 45	Peptid (♦), PAA polimeri (♦) ve pH 7'de hazırlanmış $n_{pep}/n_{PAA}=10$ (♦), 15 (♦), 20 (♦), 30 (♦) konjugatlarına ait boyut analizi sonuçları.....	140
Şekil 5. 46	Peptid, PAA polimeri ve pH 7'de hazırlanmış $n_{pep}/n_{PAA}=1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30$ konjugatlarına ait Z-Average, Pdl ve Zetapotansiyel değerleri ..	141
Şekil 5. 47	Peptid (♦), PAA polimeri (♦) ve pH 7'de hazırlanmış $n_{PAA}/n_{pep}=0,016$ (♦) konjugatına ait HPLC kromatogramı .....	142
Şekil 5. 48	Peptid (♦), PAA polimeri (♦) ve pH 7'de hazırlanmış $n_{PAA}/n_{pep}=0,048$ (♦) konjugatına ait HPLC kromatogramı .....	142
Şekil 5. 49	Peptid (♦), PAA polimeri (♦) ve pH 7'de hazırlanmış $n_{PAA}/n_{pep}=0,096$ (♦) konjugatına ait HPLC kromatogramı .....	143



Şekil 5. 50	Peptid (◆), PAA polimeri (◆) ve pH 7'de hazırlanmış $n_{PAA}/n_{pep}=0,16$ (◆) konjugatına ait HPLC kromatogramı .....	143
Şekil 5. 51	Peptid (◆), PAA polimeri (◆) ve pH 7'de hazırlanmış $n_{PAA}/n_{pep}=0,24$ (◆) konjugatına ait HPLC kromatogramı .....	144
Şekil 5. 52	Peptid (◆), PAA polimeri (◆) ve pH 7'de hazırlanmış $n_{PAA}/n_{pep}=0,016$ (◆), 0,048 (◆), 0,096 (◆), 0,16 (◆), 0,24 (◆) konjugatlarına ait HPLC kromatogramı.....	145
Şekil 5. 53	Peptid (◆), PAA polimeri (◆) ve pH 7'de hazırlanmış $n_{PAA}/n_{pep}=0,016$ (◆), 0,048 (◆), 0,096 (◆), 0,16 (◆), 0,24 (◆), 0,48 (◆), 0,65 (◆) konjugatlarına ait GPC Kırılma İndisi kromatogramı .....	146
Şekil 5. 54	Peptid (◆), PAA polimeri (◆) ve pH 7'de hazırlanmış $n_{PAA}/n_{pep}=0,016$ (◆), 0,048 (◆), 0,096 (◆), 0,16 (◆), 0,24 (◆), 0,48 (◆), 0,65 (◆) konjugatlarına ait GPC Işık Saçılması kromatogramı .....	147
Şekil 5. 55	Peptid (◆), PAA polimeri (◆) ve pH 7'de hazırlanmış $n_{PAA}/n_{pep}=0,016$ (◆), 0,048 (◆), 0,096 (◆), 0,16 (◆), 0,24 (◆), 0,48 (◆), 0,65 (◆) konjugatlarına ait GPC UV kromatogramı .....	148
Şekil 5. 56	Peptid (◆), PAA polimeri (◆) ve pH 7'de hazırlanmış $n_{PAA}/n_{pep}=0,016$ (◆), 0,048 (◆), 0,096 (◆), 0,16 (◆), 0,24 (◆), 0,48 (◆), 0,65 (◆) konjugatlarına ait Floresans spektrumları .....	149
Şekil 5. 57	Peptid (◆), PAA polimeri (◆) ve pH 7'de hazırlanmış $n_{PAA}/n_{pep}=0,016$ (◆), 0,048 (◆), 0,096 (◆), 0,16 (◆), 0,24 (◆), 0,48 (◆), 0,65 (◆) konjugatlarına ait boyut analizi sonuçları .....	150
Şekil 5. 58	Peptid, PAA polimeri ve pH 7'de hazırlanmış $n_{PAA}/n_{pep}=0,016$ , 0,048, 0,096, 0,16, 0,24, 0,48, 0,65 konjugatlarına ait Z-Average, Pdl ve Zetapotansiyel değerleri .....	150
Şekil 5. 59	Peptid (◆), CMC polimeri (◆) ve pH 7'de hazırlanmış $n_{CMC}/n_{pep}=0,018$ (◆), 0,055 (◆), 0,11 (◆), 0,185 (◆), 0,287 (◆), 0,55 (◆), 0,74 (◆) konjugatlarına ait GPC Kırılma İndisi kromatogramı .....	151
Şekil 5. 60	Peptid (◆), CMC polimeri (◆) ve pH 7'de hazırlanmış $n_{CMC}/n_{pep}=0,018$ (◆), 0,055 (◆), 0,11 (◆), 0,185 (◆), 0,287 (◆), 0,55 (◆), 0,74 (◆) konjugatlarına ait GPC Işık Saçılması kromatogramı.....	152
Şekil 5. 61	Peptid (◆), CMC polimeri (◆) ve pH 7'de hazırlanmış $n_{CMC}/n_{pep}=0,018$ (◆), 0,055 (◆), 0,11 (◆), 0,185 (◆), 0,287 (◆), 0,55 (◆), 0,74 (◆) konjugatlarına ait GPC UV kromatogramı .....	153
Şekil 5. 62	Peptid (◆), CMC polimeri (◆) ve pH 7'de hazırlanmış $n_{CMC}/n_{pep}=0,018$ (◆), 0,055 (◆), 0,11 (◆), 0,185 (◆), 0,287 (◆), 0,55 (◆), 0,74 (◆) konjugatlarına ait Floresans spektrumları .....	154
Şekil 5. 63	Peptid (◆), CMC polimeri (◆) ve pH 7'de hazırlanmış $n_{CMC}/n_{pep}=0,018$ (◆), 0,055 (◆), 0,11 (◆), 0,185 (◆), 0,287 (◆), 0,55 (◆), 0,74 (◆) konjugatlarına ait boyut analizi sonuçları .....	155
Şekil 5. 64	Peptid, CMC polimeri ve pH 7'de hazırlanmış $n_{CMC}/n_{pep}=0,018$ , 0,055, 0,11, 0,185, 0,287, 0,55, 0,74 konjugatlarına ait Z-Average, Pdl ve Zetapotansiyel değerleri .....	155

Şekil 5. 65	Peptid (◆), P(VP-ko-AA) <sub>120kDa</sub> polimeri (◆) ve pH 7'de hazırlanmış $n_{P(VP-ko-AA)120kDa}/n_{pep}=0,014$ (◆), 0,041 (◆), 0,083 (◆), 0,14 (◆), 0,208 (◆), 0,417 (◆) konjugatlarına ait GPC Kırılma İndisi kromatogramı ..... 156
Şekil 5. 66	Peptid (◆), P(VP-ko-AA) <sub>120kDa</sub> polimeri (◆) ve pH 7'de hazırlanmış $n_{P(VP-ko-AA)120kDa}/n_{pep}=0,014$ (◆), 0,041 (◆), 0,083 (◆), 0,14 (◆), 0,208 (◆), 0,417 (◆) konjugatlarına ait GPC Işık Saçılması kromatogramı ..... 157
Şekil 5. 67	Peptid (◆), P(VP-ko-AA) <sub>120kDa</sub> polimeri (◆) ve pH 7'de hazırlanmış $n_{P(VP-ko-AA)120kDa}/n_{pep}=0,014$ (◆), 0,041 (◆), 0,083 (◆), 0,14 (◆), 0,208 (◆), 0,417 (◆) konjugatlarına ait GPC UV kromatogramı ..... 158
Şekil 5. 68	Peptid (◆), P(VP-ko-AA) <sub>120kDa</sub> (◆) ve pH 7'de hazırlanmış $n_{P(VP-ko-AA)120kDa}/n_{pep}=0,014$ (◆), 0,041 (◆), 0,083 (◆), 0,14 (◆), 0,208 (◆), 0,417 (◆) konjugatlarına ait Floresans spektrumları ..... 159
Şekil 5. 69	Peptid (◆), P(VP-ko-AA) <sub>120kDa</sub> polimeri (◆) ve pH 7'de hazırlanmış $n_{P(VP-ko-AA)120kDa}/n_{pep}=0,014$ (◆), 0,041 (◆), 0,083 (◆), 0,14 (◆), 0,208 (◆), 0,417 (◆) konjugatlarına ait boyut analizi sonuçları..... 160
Şekil 5. 70	Peptid, P(VP-ko-AA) <sub>120kDa</sub> polimerive pH 7'de hazırlanmış $n_{P(VP-ko-AA)120kDa}/n_{pep}=0,014$ , 0,041, 0,083, 0,14, 0,208, 0,417 konjugatlarına ait Z-Average, Pdl ve Zetapotansiyel değerleri ..... 160
Şekil 5. 71	Peptid (◆), P(VP-ko-AA) <sub>80kDa</sub> polimeri (◆) ve pH 7'de hazırlanmış $n_{P(VP-ko-AA)80kDa}/n_{pep}=0,02$ (◆), 0,06 (◆), 0,125 (◆), 0,2 (◆), 0,31 (◆) konjugatlarına ait GPC Kırılma İndisi kromatogramı ..... 161
Şekil 5. 72	Peptid (◆), P(VP-ko-AA) <sub>80kDa</sub> polimeri (◆) ve pH 7'de hazırlanmış $n_{P(VP-ko-AA)80kDa}/n_{pep}=0,02$ (◆), 0,06 (◆), 0,125 (◆), 0,2 (◆), 0,31 (◆) konjugatlarına ait GPC Işık Saçılması kromatogramı..... 162
Şekil 5. 73	Peptid (◆), P(VP-ko-AA) <sub>80kDa</sub> polimeri (◆) ve pH 7'de hazırlanmış $n_{P(VP-ko-AA)80kDa}/n_{pep}=0,02$ (◆), 0,06 (◆), 0,125 (◆), 0,2 (◆), 0,31 (◆) konjugatlarına ait GPC UV kromatogramı ..... 163
Şekil 5. 74	Peptid (◆), P(VP-ko-AA) <sub>80kDa</sub> (◆) ve pH 7'de hazırlanmış $n_{P(VP-ko-AA)80kDa}/n_{pep}=0,02$ (◆), 0,06 (◆), 0,125 (◆), 0,2 (◆), 0,31 (◆) konjugatlarına ait Floresans spektrumları ..... 164
Şekil 5. 75	Peptid (◆), P(VP-ko-AA) <sub>80kDa</sub> polimeri (◆) ve pH 7'de hazırlanmış $n_{P(VP-ko-AA)80kDa}/n_{pep}=0,02$ (◆), 0,06 (◆), 0,125 (◆), 0,2 (◆) konjugatlarına ait boyut analizi sonuçları ..... 165
Şekil 5. 76	Peptid, P(VP-ko-AA) <sub>80kDa</sub> polimerive pH 7'de hazırlanmış $n_{P(VP-ko-AA)80kDa}/n_{pep}=0,02$ , 0,06, 0,125, 0,2 konjugatlarına ait Z-Average, Pdl ve Zetapotansiyel değerleri..... 165
Şekil 5. 77	Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan (NP1→Boş, NP2→FITC yüklü, NP3→Peptid yüklü, NP4→FITC+Peptid yüklü) nanopartiküllere ait boyut, Z-Average, Pdl ve Zetapotansiyel değerleri..... 166
Şekil 5. 78	PLGA polimerine ait FT-IR spektrumu ..... 167
Şekil 5. 79	Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan boş nanopartiküllere ait FT-IR spektrumu (NP1) ..... 168
Şekil 5. 80	Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan Florescein isotiyosiyanat (FITC) yüklü nanopartiküllere ait FT-IR spektrumu (NP2) ..... 169

Şekil 5. 81	Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan peptid yüklü nanopartiküllere ait FT-IR spektrumu (NP3) .....	170
Şekil 5. 82	Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan FITC+peptid yüklü nanopartiküllere ait FT-IR spektrumu (NP4) .....	171
Şekil 5. 83	PLGA polimeri (◆), Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan boş (◆), FITC yüklü (◆), peptid yüklü (◆), FITC+peptid (◆) yüklü nanopartiküllerin karşılaştırmalı FT-IR spektrumu.....	172
Şekil 5. 84	Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan boş nanopartiküllere (NP1) ait sırasıyla 2D ve 3D AFM görüntüsü (1x1 $\mu\text{m}^2$ 'lik alan).....	173
Şekil 5. 85	Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan boş nanopartiküllere (NP1) ait sırasıyla 2D ve 3D AFM görüntüsü (2x2 $\mu\text{m}^2$ 'lik alan).....	173
Şekil 5. 86	Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan FITC yüklü nanopartiküllere (NP2) ait sırasıyla 2D ve 3D AFM görüntüsü (1x1 $\mu\text{m}^2$ 'lik alan).....	174
Şekil 5. 87	Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan FITC yüklü nanopartiküllere (NP2) ait sırasıyla 2D ve 3D AFM görüntüsü (2x2 $\mu\text{m}^2$ 'lik alan).....	174
Şekil 5. 88	Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan peptid yüklü nanopartiküllere (NP3) ait sırasıyla 2D ve 3D AFM görüntüsü (1x1 $\mu\text{m}^2$ 'lik alan).....	175
Şekil 5. 89	Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan peptid yüklü nanopartiküllere (NP3) ait sırasıyla 2D ve 3D AFM görüntüsü (2x2 $\mu\text{m}^2$ 'lik alan).....	175
Şekil 5. 90	Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan FITC+peptid yüklü nanopartiküllere (NP4) ait sırasıyla 2D ve 3D AFM görüntüsü (1x1 $\mu\text{m}^2$ 'lik alan).....	176
Şekil 5. 91	Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan FITC+peptid yüklü nanopartiküllere (NP4) ait sırasıyla 2D ve 3D AFM görüntüsü (2x2 $\mu\text{m}^2$ 'lik alan).....	176
Şekil 5. 92	Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan boş nanopartiküllere (NP1) ait sırasıyla 5000x ve 20000x SEM görüntüleri .....	177
Şekil 5. 93	Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan FITC yüklü nanopartiküllere (NP2) ait sırasıyla 5000x ve 20000x SEM görüntüleri .....	178
Şekil 5. 94	Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan peptid yüklü nanopartiküllere (NP3) ait sırasıyla 5000x ve 20000x SEM görüntüleri	179
Şekil 5. 95	Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan FITC+peptid yüklü nanopartiküllere (NP4) ait sırasıyla 5000x ve 20000x SEM görüntüleri	180
Şekil 5. 96	Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan boş nanopartiküllere (NP1) ait 20x Işık Mikroskobu görüntüsü .....	181
Şekil 5. 97	Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan FITC yüklü nanopartiküllere (NP2) ait 20x Işık Mikroskobu görüntüsü .....	181
Şekil 5. 98	Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan peptid yüklü nanopartiküllere (NP3) ait 20x Işık Mikroskobu görüntüsü .....	182
Şekil 5. 99	Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan FITC+peptid yüklü nanopartiküllere (NP4) ait 20x Işık Mikroskobu görüntüsü .....	182
Şekil 5. 100	Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan boş nanopartiküllere (NP1) ait 20x Işık Mikroskobu görüntüsü .....	183

Şekil 5. 101	Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan FITC yüklü nanopartiküllere (NP2) ait 20x Işık Mikroskobu görüntüsü .....	183
Şekil 5. 102	Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan peptid yüklü nanopartiküllere (NP3) ait 20x Işık Mikroskobu görüntüsü .....	184
Şekil 5. 103	Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan FITC+peptid yüklü nanopartiküllere (NP4) ait 20x Işık Mikroskobu görüntüsü .....	184
Şekil 5. 104	FITC'nin farklı konsantrasyonlarının 48 saatlik inkübasyon sonucu L-929 fare fibroblast hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskopik incelenmesi (20x); (a) Kontrol, (b) 0,025 mg/ml, (c) 0,05 mg/ml .....	185
Şekil 5. 105	Canine Parvovirus W-1L19 sentetik peptidinin farklı konsantrasyonlarının 48 saatlik inkübasyon sonucu L-929 fare fibroblast hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskopik incelenmesi (20x); (a) Kontrol, (b) 0,05 mg/ml, (c) 0,1 mg/ml, (4) 0,2mg/ml, (e) 0,4 mg/ml, (f) 0,5 mg/ml .....	186
Şekil 5. 106	Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan boş nanopartiküllerin (NP1) farklı konsantrasyonlarının 48 saatlik inkübasyon sonucu L-929 fare fibroblast hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskopik incelenmesi (20x); (a) Kontrol, (b) 0,05 mg/ml, (c) 0,1 mg/ml, (4) 0,2mg/ml, (e) 0,4 mg/ml, (f) 0,5 mg/ml .....	187
Şekil 5. 107	Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan peptid yüklü nanopartiküllerin (NP3) farklı konsantrasyonlarının 48 saatlik inkübasyon sonucu L-929 fare fibroblast hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskopik incelenmesi (20x); (a) Kontrol, (b) 0,05 mg/ml, (c) 0,1 mg/ml, (4) 0,2mg/ml, (e) 0,4 mg/ml, (f) 0,5 mg/ml .....	188
Şekil 5. 108	Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan FITC+peptid yüklü nanopartiküllerin (NP4) farklı konsantrasyonlarının 48 saatlik inkübasyon sonucu L-929 fare fibroblast hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskopik incelenmesi (20x); (a) Kontrol, (b) 0,05 mg/ml, (c) 0,1 mg/ml, (4) 0,2mg/ml, (e) 0,4 mg/ml, (f) 0,5 mg/ml .....	189
Şekil 5. 109	Aynı konsantrasyondaki (0,5 mg/ml) Peptid, boş nanopartikül (NP1), peptid yüklü nanopartikül (NP3) ve peptid+FITC yüklü nanopartikül (NP4) örneklerinin L-929 fare fibroblast hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi (n=3) .....	190
Şekil 5. 110	Aynı konsantrasyondaki (0,4 mg/ml) Peptid, boş nanopartikül (NP1), peptid yüklü nanopartikül (NP3) ve peptid+FITC yüklü nanopartikül (NP4) örneklerinin L-929 fibroblast hücreleri üzerinde gözlenen % hücre canlılığı (n=3) .....	191
Şekil 5. 111	Aynı konsantrasyondaki (0,2 mg/ml) Peptid, boş nanopartikül (NP1), peptid yüklü nanopartikül (NP3) ve peptid+FITC yüklü nanopartikül (NP4) örneklerinin L-929 fibroblast hücreleri üzerinde gözlenen % hücre canlılığı (n=3) .....	191
Şekil 5. 112	Aynı konsantrasyondaki (0,1 mg/ml) Peptid, boş nanopartikül (NP1), peptid yüklü nanopartikül (NP3) ve peptid+FITC yüklü nanopartikül (NP4) örneklerinin L-929 fibroblast hücreleri üzerinde gözlenen % hücre canlılığı (n=3) .....	192

Şekil 5. 113	Aynı konsantrasyondaki (0,05 mg/ml) Peptid, boş nanopartikül (NP1), peptid yüklü nanopartikül (NP3), peptid+FITC yüklü nanopartikül (NP4) ve FITC örneklerinin L-929 fibroblast hücreleri üzerinde gözlenen % hücre canlılığı (n=3) .....	192
Şekil 5. 114	FITC'nin farklı konsantrasyonlarının (0,05 mg/ml, 0,025 mg/ml) fare fibroblast hücreleri (L-929) üzerine etkisi sonucu konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği.....	193
Şekil 5. 115	W-1L19 sentetik peptidinin farklı konsantrasyonlarının (0,5 mg/ml; 0,4 mg/ml; 0,2 mg/ml; 0,1 mg/ml; 0,05 mg/ml) fare fibroblast hücreleri (L-929) üzerine etkisi sonucu konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği .....	193
Şekil 5. 116	Boş nanopartiküllerin (NP1) farklı konsantrasyonlarının (0,5 mg/ml; 0,4 mg/ml; 0,2 mg/ml; 0,1 mg/ml; 0,05 mg/ml) fare fibroblast hücreleri (L-929) üzerine etkisi sonucu konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği .....	194
Şekil 5. 117	Peptid yüklü nanopartiküllerin (NP3) farklı konsantrasyonlarının (0,5 mg/ml; 0,4 mg/ml; 0,2 mg/ml; 0,1 mg/ml; 0,05 mg/ml) fare fibroblast hücreleri (L-929) üzerine etkisi sonucu konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği.....	194
Şekil 5. 118	Peptid+FITC yüklü nanopartiküllerin (NP4) farklı konsantrasyonlarının (0,5 mg/ml; 0,4 mg/ml; 0,2 mg/ml; 0,1 mg/ml; 0,05 mg/ml) fare fibroblast hücreleri (L-929) üzerine etkisi sonucu konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği.....	195
Şekil 5. 119	Canine Parvovirus W-1L19 sentetik peptidi UV standart eğrisi .....	196
Şekil 5. 120	Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan FITC+peptid yüklü nanopartiküllerin (NP4) 30 gün PBS tamponunda bekletilmesinin ardından elde edilen sırasıyla 2D, 3D ve deflection AFM görüntüsü (1x1 $\mu\text{m}^2$ lik alan) .....	197
Şekil 5. 121	Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan FITC+peptid yüklü nanopartiküllerin (NP4) 60 gün PBS tamponunda bekletilmesinin ardından elde edilen sırasıyla 2D ve 3D AFM görüntüsü (1x1 $\mu\text{m}^2$ lik alan) .....	198
Şekil 5. 122	Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan FITC+peptid yüklü nanopartiküllerin (NP4) 60 gün PBS tamponunda bekletilmesinin ardından elde edilen sırasıyla 2D ve 3D AFM görüntüsü (2x2 $\mu\text{m}^2$ lik alan) .....	198
Şekil 5. 123	Peptid içeren PLGA nanopartikülden (NP3) peptid salım profili.....	199
Şekil 6. 1	$n_{PAA}/n_{pep}=0,025, 0,075, 0,15, 0,25, 0,375$ biyokonjugatlarına ve serbest peptide ait Floresans spektrumlarındaki $\lambda_{maksimum}$ değerlerinin karşılaştırılması.....	203
Şekil 6. 2	$n_{PAA}/n_{pep}=0,025, 0,075, 0,15, 0,25, 0,375$ biyokonjugatlarına, serbest peptide ve polimere ait Boyut ve Zeta Potansiyel değerlerinin karşılaştırılması.....	205
Şekil 6. 3	$n_{pep}/n_{PAA} = 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20$ ve 30 biyokonjugatlarına ve serbest peptide ait Floresans spektrumlarındaki $\lambda_{maksimum}$ değerlerinin karşılaştırılması.....	207

Şekil 6. 4	$n_{\text{pep}}/n_{\text{PAA}} = 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20$ ve 30 biyokonjugatlarına ve serbest peptid ve polimere ait Boyut ve Zeta Potansiyel değerlerinin karşılaştırılması.....	209
Şekil 6. 5	$n_{\text{PAA}}/n_{\text{pep}}=0,016, 0,048, 0,096, 0,16, 0,24, 0,48, 0,65$ biyokonjugatlarına ve serbest peptide ait HPLC kromatogramı pik alanlarının (a) ve pik yüzdelerinin (b) karşılaştırılması .....	210
Şekil 6. 6	$n_{\text{PAA}}/n_{\text{pep}}=0,016, 0,048, 0,096, 0,16, 0,24, 0,48, 0,65$ biyokonjugatlarına ve serbest peptide ait HPLC kromatogramı pik alanlarının (a) ve pik yüzdelerinin (b) karşılaştırılması .....	211
Şekil 6. 7	$n_{\text{PAA}}/n_{\text{pep}}=0,016, 0,048, 0,096, 0,16, 0,24, 0,48, 0,65$ biyokonjugatlarına ve serbest peptide ait Floresans spektrumlarındaki $\lambda_{\text{maksimum}}$ değerlerinin karşılaştırılması .....	212
Şekil 6. 8	$n_{\text{PAA}}/n_{\text{pep}}=0,016, 0,048, 0,096, 0,16, 0,24, 0,48, 0,65$ biyokonjugatlarına, serbest peptide ve polimere ait Boyut ve Zeta Potansiyel değerlerinin karşılaştırılması.....	214
Şekil 6. 9	$n_{\text{CMC}}/n_{\text{pep}}=0,018, 0,055, 0,11, 0,185, 0,287, 0,55, 0,74$ biyokonjugatlarına ve serbest peptide ait GPC kromatogramı pik alanlarının (a) ve pik yüzdelerinin (b) karşılaştırılması .....	215
Şekil 6. 10	$n_{\text{CMC}}/n_{\text{pep}}=0,018, 0,055, 0,11, 0,185, 0,287, 0,55, 0,74$ biyokonjugatlarına ve serbest peptide ait Floresans spektrumlarındaki $\lambda_{\text{maksimum}}$ değerlerinin karşılaştırılması .....	216
Şekil 6. 11	$n_{\text{CMC}}/n_{\text{pep}}=0,018, 0,055, 0,11, 0,185, 0,287, 0,55, 0,74$ biyokonjugatlarına, serbest peptide ve polimere ait Boyut ve Zeta Potansiyel değerlerinin karşılaştırılması.....	218
Şekil 6. 12	$n_{\text{P(VP-ko-AA)120kDa}}/n_{\text{pep}}=0,014, 0,041, 0,083, 0,14, 0,208, 0,417$ biyokonjugatlarına ve serbest peptide ait HPLC kromatogramı pik alanlarının (a) ve pik yüzdelerinin (b) karşılaştırılması.....	219
Şekil 6. 13	$n_{\text{P(VP-ko-AA)120kDa}}/n_{\text{pep}}=0,014, 0,041, 0,083, 0,14, 0,208, 0,417$ biyokonjugatlarına ve serbest peptide ait Floresans spektrumlarındaki $\lambda_{\text{maksimum}}$ değerlerinin karşılaştırılması .....	220
Şekil 6. 14	$n_{\text{P(VP-ko-AA)120kDa}}/n_{\text{pep}}=0,014, 0,041, 0,083, 0,14, 0,208, 0,417$ biyokonjugatlarına, serbest peptide ve polimere ait Boyut ve Zeta Potansiyel değerlerinin karşılaştırılması .....	222
Şekil 6. 15	$n_{\text{P(VP-ko-AA)80kDa}}/n_{\text{pep}}=0,02, 0,06, 0,125, 0,2, 0,31$ biyokonjugatlarına ve serbest peptide ait HPLC kromatogramı pik alanlarının (a) ve pik yüzdelerinin (b) karşılaştırılması .....	223
Şekil 6. 16	$n_{\text{P(VP-ko-AA)80kDa}}/n_{\text{pep}}=0,02, 0,06, 0,125, 0,2, 0,31$ biyokonjugatlarına ve serbest peptide ait Floresans spektrumlarındaki $\lambda_{\text{maksimum}}$ değerlerinin karşılaştırılması.....	224
Şekil 6. 17	$n_{\text{P(VP-ko-AA)80kDa}}/n_{\text{pep}}=0,02, 0,06, 0,125, 0,2$ biyokonjugatlarına, serbest peptide ve polimere ait Boyut ve Zeta Potansiyel değerlerinin karşılaştırılması.....	226
Şekil 6. 18	Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan (NP1→Boş, NP2→FITC yüklü, NP3→Peptid yüklü, NP4→FITC+Peptid yüklü) nanopartiküllere ait Z-Average değerlerinin karşılaştırılması.....	227

Şekil 6. 19	Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan (NP1→Boş, NP2→FITC yüklü, NP3→Peptid yüklü, NP4→FITC+Peptid yüklü) nanopartiküllere ait Zeta potansiyel değerlerinin karşılaştırılması ..... 228
Şekil 6. 20	Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan sırasıyla NP1→Boş, NP2→FITC yüklü, NP3→Peptid yüklü, NP4→FITC+Peptid yüklü nanopartiküllere ait 2D AFM görüntüsü (2x2 µm <sup>2</sup> 'lik alan) ..... 229
Şekil 6. 21	FITC, peptid, boş nanopartikül (NP1), peptid yüklü nanopartikül (NP3) ve peptid+FITC yüklü nanopartikül (NP4) örneklerinin farklı konsantrasyonlarının (0,5 mg/ml; 0,4 mg/ml; 0,2 mg/ml; 0,1 mg/ml; 0,05 mg/ml) fare fibroblast hücreleri (L-929) üzerine etkisi sonucu konsantrasyona bağlı karşılaştırmalı % canlılık grafiği ..... 230
Şekil 6. 22	Farklı polimerlerin aynı miktarlarının sabit miktarda peptid ile reaksiyonu sonucu sentezlenen biyokonjugatların alan değerlerinin karşılaştırılması..... 231
Şekil 6. 23	Farklı polimerlerin aynı miktarlarının sabit miktarda peptid ile reaksiyonunda reaksiyona giren peptid miktarlarının karşılaştırılması 232
Şekil 6. 24	Farklı polimerlerin aynı miktarlarının sabit miktarda peptid ile reaksiyonunda reaksiyon verimi yüzdelерinin karşılaştırılması ..... 233

## ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2.1	Nanopartikül hazırlamada kullanılan polimerler [86, 106] ..... 50
Çizelge 3.1	Deneysel çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin özellikleri..... 74
Çizelge 4.1	Sentezlenen Canine Parvovirus W-7L20 sentetik peptid (W-QPDGGQPAVRN ERA) dizisine ait belirleyici özellikler ..... 86
Çizelge 4.2	W-7L20 Sentetik peptidinin sentezinde kullanılan kimyasal maddeler ve miktarları ..... 87
Çizelge 4.3	Canine Parvovirus W-1L19 sentetik peptid (W-MSDGAVQPDGGQPAVRNER) dizisine ait belirleyici özellikler ..... 88
Çizelge 5.1	Polivinilpirolidon (PVP) FT-IR analiz sonuçları..... 105
Çizelge 5.2	Poliakrilik asit (PAA) FT-IR analiz sonuçları ..... 105
Çizelge 5.3	Poli(N-vinil-2-pirolidon-ko-akrilik asit) [P(VP-ko-AA)] FT-IR analizi sonuçları ..... 106
Çizelge 5.4	Nanopartiküllere ait UV <sub>280nm</sub> değerleri ve % yükleme miktarları..... 196



---

## CANİNE PARVOVİRUS'E AİT ANTİJENİK ÖZELLİKLİ SENTETİK PEPTİDLERİN SENTEZİ VE BİYOKONJUGATLARININ GELİŞTİRİLMESİ

Serap ACAR DERMAN

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Zeynep MUSTAFAEVA AKDESTE

Yeni ve etkili polimerik sistemlerin geliştirilmesi ve spesifik kontrollü dağılım formülasyonlarının hazırlanıp uygulanması, uzun etkili peptid taşıyıcılar biyoteknolojide ileri ilaç ve aşı uygulamaları amacı ile yoğun biçimde araştırılan bir konudur. Polimerlerin peptid, protein vb. biyomoleküllerle etkileşiminin incelenmesi canlı organizmadaki davranışlarının anlaşılması ve biyokonjugasyon teknolojisinin geliştirilmesi için büyük önem taşımaktadır. Peptidlerin taşıyıcı moleküllere bağlanması, zayıf immunojenik özellikteki peptidlere karşı antikor oluşturmak için gerekmektedir. Suda çözünebilen biyopolimerlerin karboksil gruplarının aktivasyonu ve bunlara amino grupları içeren peptidlerin kovalent bağlanması bu tez çalışmamızın konusu olan Canine Parvovirus'e ait antijenik özellikli sentetik peptidlerin biyokonjugatlarının sentezlenmesi reaksiyonunun temelini oluşturmaktadır.

Bu tez çalışmasının birinci aşamasında Canine Parvovirus'e ait W-7L20 sentetik peptidi katı faz peptid sentez metodu ile sentezlendi ve PAA polimeri ile biyokonjuge edildi. Buna ek olarak ticari olarak satın alınan W-1L19 sentetik peptidinin Polialkrilikasid, Poli(N-vinil-2-pirolidon-ko-akrilikasid), Karboksimetilselülaz polimerileri ile Canine Parvoviruse ait antijenik peptid bölgelerinin "1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid (EDC)" çapraz bağlayıcısı varlığında suda çözünebilen polimer-peptid biyokonjugatları sentezlendi. Biyokonjugatlar bir polimer molekülü için peptidin

farklı molar oranlarında ( $n_{\text{pep}}/n_{\text{pol}}$ ) ve bir peptid molekülü için polimerlerin farklı molar oranlarında ( $n_{\text{pol}}/n_{\text{pep}}$ ) sentezlendi. Sentez basamağının ardından; Peptid-Polimer biyokonjugatları oluşum mekanizması, elektrik yükü ve üç boyutlu yapısının incelenmesi amacı ile peptid ve reaksiyonda kullanılan polimer ile karşılaştırmalı olarak HPLC, GPC, Zetasizer ve Floresans Spektrofotometre cihazları ile analiz edildi.

Çalışmanın ikinci aşamasında ise Canine Parvoviruse ait antijenik peptid molekülünün hem tek başına hem de Floresein izotiyosiyanat (FITC) boyası ile beraber yüklendiği Poli(laktik-ko-glikolik)asid (PL-GA) esaslı nanopartiküller üretildi. Üretilen nanopartiküllerin boyut ve zeta potansiyel analizleri Zetasizer cihazı ile gerçekleştirildikten sonra GPC cihazında PL-GA polimeri ile karşılaştırmalı olarak kromatogramları alındı. FT-IR analizleri de gerçekleştirilen nanopartiküllerin daha sonra AFM ve SEM görüntüleri alındı. Nanopartiküllerin peptid yükleme kapasiteleri ve salım özellikleri AFM ve UV spektrofotometre ile incelendi. Üretilen nanopartiküllerin sitotoksik özellikleri, peptid ile karşılaştırmalı olarak Fare fibroblast hücreleri (L-929) ile değerlendirildi.

Bu tez kapsamında elde edilecek bilgiler Canine Parvovirüsün oluşturduğu kanlı ishal hastalığına karşı spesifik antikörlerin elde edilmesi, tanı kitlerinin ve biyosensörlerin oluşturulması ve sentetik aşılarda geliştirilmesi yönünde yapılacak çalışmalara ışık tutacak bir ön çalışma olacaktır.

Ayrıca tez kapsamında üretilen nanopartiküller; ileriki çalışmalarda antijenik peptidlerin kontrollü salımı ve buna dayalı biyoteknolojik aşılarda geliştirilmesi için ümit vadeden taşıyıcılardır.

**Anahtar Kelimeler:** Canine Parvovirus, sentetik peptid sentezi, polimerlerin biyokonjugasyonu, Poli(D,L-laktik-ko-glikolik asit), nanopartikül

**SYNTHESIS OF ANTIGENIC SYNTHETIC PEPTIDE OF CANINE PARVOVIRUS  
AND DEVELOPMENT OF BIOCONJUGATES**

Serap ACAR DERMAN

Department of Bioengineering

PhD. Thesis

Advisor: Assist. Prof. Dr. Zeynep MUSTAFAEVA AKDESTE

The development of new and effective polymeric systems and the preparation-application of specific controlled delivery formulations, long-action peptide carrier extensively studied subject in biotechnology with the aim of further applications of drug and vaccine. Interaction of polymers with peptide, protein ect. biomolecules is great importance for understanding the action mechanism of biopolymers in organism and development of bioconjugation technology. Coupling of peptides to carrier molecules is required to antibody production against weak immunogenic peptides. Activation of carboxyl groups of water soluble biopolymers and covalent binding of peptides amino groups is basis of bioconjugation reaction of antigenic synthetic peptide of Canine Parvovirus which subject of this thesis.

In the first part of this PhD. thesis W-7L20 synthetic peptide of Canine Parvovirus is synthesized by Solid Phase Peptide Synthesis Method and bioconjugated to PAA polymer. Furthermore commercially purchased W-1L19 synthetic peptide-Polymer bioconjugates with polyacrylic acid, poly(N-vinyl-2-pyrrolidone-co-acrylic acid), carboxymethylcellulose synthesized in the presence of "1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide" cross-linker. Bioconjugates were synthesized different ratio of peptides for one polymer molecule ( $n_{pep}/n_{pol}$ ) and different ratio of polymer for one peptide molecule ( $n_{pol}/n_{pep}$ ). After the synthesis step, peptide-polymer bioconjugates

comperatively analyzed with peptide and polymers, for investigation of formation mechanism, electrical charge and three dimensional structure by using HPLC, GPC, Zetasizer and Fluorescence Spectrophotometer.

In the second part of this PhD. thesis only Canine parvovirus synthetic peptide and peptide+fluorescein isothiocyanate (FITC) loaded Poly(lactide-co-glicolide)acid (PL-GA) nanoparticles produced. After the analyses of produced nanoparticle's size and zeta potential analyses by Zetasizer, the chromatograms receipt by GPC comperatively by PL-GA polymer. After performed FT-IR analyses of nanoparticles, AFM and SEM analysed were done. Peptide loading capacity and release properties of nanoparticles analyzed by AFM and UV Spectrophotometer. Cytotoxic properties of produced nanoparticles was evaluated against mouse fibroblast cells (L-929) in comparison with peptide.

Information to be obtained within the scope of this thesis is to shed light on the direction of, to obtain specific antibodies against bloody diarrhea which caused by Canine parvovirus, generation of diagnostic kits and biosensors and development of synthetic vaccines will be a pre-study.

In addition, nanoparticles produced in this thesis are promising carriers for controlled release of antigenic peptides and for the development of biotechnological vaccines based on this.

**Key words:** Canine Parvovirus, synthetic peptide synthesis, bioconjugation of polymers, poly(D,L-lactide-co-glycolide), nanoparticle

#### 1.1 Literatür Özeti

Köpeklerde 1970'lerde görülmeye başlanan ve günümüzde hala birçok yavru hayvanın ölümü ile sonuçlanan Kanlı İshal hastalığı Canine Parvovirus olarak adlandırılan ve köpekten köpeğe kolaylıkla geçebilen bulaşıcı bir hastalıktır. Kanlı ishal hastalığına yol açan Canine Parvovirus'e ait antijenik bölgelerin bağışıklık sistemi tarafından tanınması bu hastalığa karşı biyolojik sistemde antikor üretilmesini sağlamaktadır. Canine Parvovirus viral yüzey proteinine ait VP2 bölgesindeki tanımlanan [1-4] antijenik epitoplara (sentetik peptid dizileri) aşı oluşturulması amacı ile kullanılmaktadırlar. Küçük sentetik peptidler uzun süreden beri gelecekte kullanılabilecek aşılarda aday olarak görülmektedir. Sentetik peptidler, zayıf immunojenik özellik gösterdiklerinden ve biyolojik sistemde kalma süreleri kısa olduğundan; antijenik özelliklerini ve dayanım sürelerini arttırmak ve peptidlere karşı yüksek antikor cevabı oluşturmak için; peptidlerin taşıyıcı moleküllere bağlanması ve yeni nesil aşı oluşturulması yapılan güncel çalışmalar arasında yer almaktadır. Yeni nesil aşı oluşturulmasının temelindeki nokta ise hastalığı oluşturan virüslerin yüzey proteinlerindeki antijenik bölgelerin tespit edilmesi ve bunların sentetik yollarla üretilmesidir. Gelişen teknoloji değişik peptid sentez yöntemleri ile immunojenik özellikteki bu dizilerin sentetik olarak sentezlenmesine imkan sunmaktadır.

Peptidlere karşı antikor üretiminde immunojenliği arttırmak için peptidler lineer özellikteki polimerlere bağlanmaktadır. Poliakrilik asit (PAA), PoliN-isopropilakrilamid (NIPAA), Poli(N-2-vinilprolidon), Polikarboksümetilselülaz (CMC), Polivinilpiridin-Polisetilpiridin kopolimeri ve Poli(N-vinil-2-pirolidon-akrilik asit)

kopolimerleri genel olarak kullanılan lineer taşıyıcılardır ve bu tarz polielektrolitler peptid molekülü için eş zamanlı hem taşıyıcı hem de adjuvant özelliği göstermektedir. Sentetik peptidlerin doğal ya da sentetik makromoleküllere bağlanması (konjugasyonu) tıp ve biyoteknolojide; ilaç salımından immobilize enzimlere, afinite bazlı immunoassay çalışmalarından, sentetik aşı üretimine kadar oldukça geniş bir alanda büyük önem taşımaktadır [5, 6].

Peptid-polimer kompleksleri negatif yüklenebilen yan grupları olan polimerlerin peptidler üzerindeki zıt yüklü grupları ile etkileşimi sonucunda oluşturulabilir. Etkileşim pH ve iyonik güce duyarlıdır ve peptidlerin izoelektrik noktalarına (pI) bağlı olarak değişmektedir. Peptid-polimer kompleksleri moleküllerin üzerindeki aktif fonksiyonel grupların kovalen bağlarla bağlanması sonucunda biyokonjugat oluşumu ile daha kararlı hale gelirler [7]. Sentezlenen biyokonjugatların suda çözünübilirliği ve üç boyutlu yapıları ise hücre membranı ile etkileşim açısından oldukça önemli özelliklerdir. Fizyolojik şartlarda (pH, iyonik kuvvet vs.); biyokonjugat partiküllerindeki serbest bölgeler negatif yüklü hücre membranı ile pozitif yükler, hidrofobik gruplar, geçiş metal iyonları, hidrojen bağı yapabilen fonksiyonel gruplar vb. kuvvetlerin etkisi ile çeşitli etkileşimler oluştururlar [7].

Sentetik peptidlerin ya da haptenlerin; düşük çözünürlüğü, kararsızlığı, küçük molekül boyutlarından dolayı antijenik özelliklerinin düşük olması, biyouyumlu ve spesifik olmayışı ya da sitematik toksisitesi gibi istenmeyen özellikleri mevcuttur. Ancak antijenik peptidlerin yada etken maddelerinin suda çözünebilir polimerler ile konjugatlarının oluşturulması, tedavi edici ajanların özelliklerini ve immunojenliğini önemli ölçüde değiştirmektedir. Bu amaçla bu tez çalışmasında Poliakrilik asid, Poli(N-vinil-2-pirolidon-ko-akrilik asid), Karboksimetilselülaz polimerleri ile Canine Parvoviruse ait antijenik peptid bölgelerinin "1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid (EDC)" çapraz bağlayıcısı varlığında ve bileşenlerinin farklı molar oranlarında suda çözünebilir polimer-peptid biyokonjugatları sentezlendi. Elde edilen peptid-polimer biyokonjugatlarının peptid ve kullanılan polimer ile karşılaştırmalı olarak HPLC, GPC, Zetasizer ve Floresans Spektrofotometre cihazları ile analizleri yapıldı ve oluşum mekanizmaları, yükleri ve üç boyutlu yapıları incelendi.

Sentezlenen biyokonjugatlara ek olarak Canine Parvoviruse ait antijenik peptid molekülünün hem tek başına hem de floresein izotiyosiyanat (FITC) boyası ile beraber yüklendiği Poli(laktik-ko-glikolik)asid (PL-GA) esaslı nanopartiküller üretildi. Elde edilen nanopartiküllerin boyut ve zeta potansiyel analizleri Zetasizer cihazı ile gerçekleştirildikten sonra GPC cihazında PL-GA polimeri ile karşılaştırmalı olarak kromatogramları alındı. FT-IR analizleri de gerçekleştirilen nanopartiküllerin daha sonra AFM ve SEM görüntüleri alındı. Nanopartiküllerdeki peptid miktarı ve salınan peptid miktarı AFM ve UV spektrofotometre yardımı ile belirlendi. Ayrıca nanopartiküllerin peptid ile karşılaştırmalı olarak sitotoksik özellikleri fare fibroblast hücreleri (L-929) üzerinde incelendi. Peptidin nanopartikül içerisine hapsedilmesi ile biyouyumluluğunun arttığı saptandı.

## **1.2 Tezin Amacı**

Bu çalışmada sentetik polimerlerin fonksiyonel sentetik peptidlerle (Canine Parvovirus yüzey antijenleri) kovalent bağlanma yöntemleri ile konjugasyonu sonucu sentezlenen suda çözünebilen biyohidrid ve biyobozunur yapıları polimer peptid biyokonjugatlarının sentezi, fiziko-kimyasının geliştirilmesi, incelenmesi ve peptid antijenlerinin immünojenliğinin yükseltilmesi amacıyla polimer-peptid konjugatlarının gerekli üç boyutlu yapılarının incelenmesi amaçlanmaktadır.

Aynı zamanda sentetik peptidlerin nanopartiküllere hapsedilmesi yöntemi ile salımlarının kontrollü olarak gerçekleştirilebilmesi hedeflenmektedir. Yapılan doktora çalışması sonucunda aşı uygulama amaçlı sentezlenen polimer-peptid biyokonjugatlarının fonksiyonel özelliklerinin incelenmesi, yapı-işlev analizlerinin gerçekleştirilmesi ve fizikokimyasal karakterizasyonlarının yapılması hedeflenmektedir.

Ayrıca bu çalışmamızda, yeni nesil peptid aşısı çalışmalarında kullanılmak üzere seçici olarak da hedeflendirme yapılabilen, hümorale ve hücresele immün cevap oluşturabilen antijenik peptid yüklü nanopartiküller üretilmesi amaçlanmakta, üretilen nanopartiküller ile peptidin biyouyumluluğunu arttırmak ve biyolojik sistemdeki salımının düzenlenmesi hedeflenmektedir.

### **1.3 Hipotez**

Bu doktora tez çalışmasında antijenik özellikteki sentetik peptidlerinin polimerler ile sentezlenen biyokonjugatları ve nanopartiküllere yüklenmesi sonucu oluşturulan sistemlerin, peptidlerin biyouyumluluğunu arttırarak, kontrollü salımı sonucunda immunojenik özelliklerini çarpıcı bir şekilde arttırmasının daha sonra gerçekleştirilecek olan hayvan deneylerinde yüksek immun cevaplar oluşmasını sağlaması beklenmektedir.

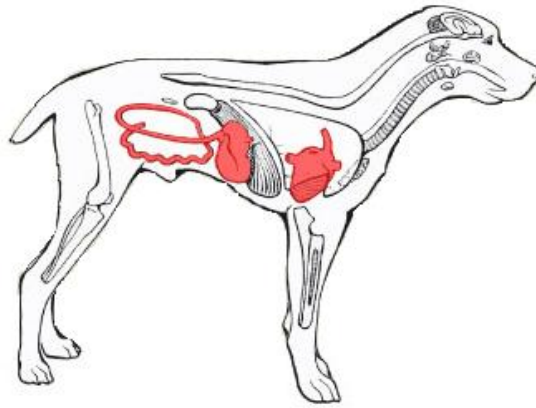
Sentezlenen peptid-polimer biyokonjugatları daha sonraki çalışmalarda kullanılacak ve diğer ilgili laboratuvarların yapacakları fazladan sentez ve analizleri önleyecektir. Daha sonra bu uygulamalar için bir protokol geliştirilecektir. Bu da köpeklerde görülen kanlı ishal hastalığının tanısı ve teşhisi için bir sonraki basamağa ilerlenmesine imkan sağlayacaktır.

Bu çalışma nitelik olarak ülkemizin hedeflediği ileri teknolojiye uyum sağlayacak polimer ve protein teknolojisi birlikteliğinde, biyoteknolojik aşuların üretilmesine zemin hazırlayacaktır. Bu nedenle sunulan tez çalışması, hem teorik hem de pratik olarak temel bilimler uygulamalı araştırma alanlarını kapsayan disiplinler arası nitelikte geniş spektrumlu bir çalışmadır.



#### 2.1 Köpeklerde Kanlı İshal

Günümüzde özellikle köpeklerde parvovirüslere bağlı enfeksiyonlara dünyanın her yerinde sıkça rastlanmaktadır. Birçok yavru hayvanın ölümü ile sonuçlanan **“Kanlı İshal”** hastalığı Canine Parvovirus (CPV) olarak adlandırılan virus tarafından meydana gelmektedir[1, 2, 8]. Hastalığa neden olan otonom CPV, 1967 yılında solunum ve gastrointestinal sistem organlarında hastalık belirlenen köpeklerden izole edilmiş ve virüs ilk olarak Kanin Minute Virüs olarak adlandırılmış, daha sonrada Canin Parvovirüs-1 (CPV-1) ismi verilmiştir [9-11]. Köpekler için patojenitesi düşük olan CPV-1, özellikle 1-3 haftalık köpek yavrularında gastroenteritis (mide-bağırsak iltihabı), pnömonitis (akciğer iltihabı) veya myokarditis’e (kalp kası iltihabı) neden olmaktadır (Şekil 2.1) [9, 10, 12].



Şekil 2. 1 Canine Parvovirusün etkilediği organların [kalp ve gastrointestinal (mide-bağırsak sistemi) sistemlerin (fakat bu organlarla sınırlı değildir)] gösterimi [13]

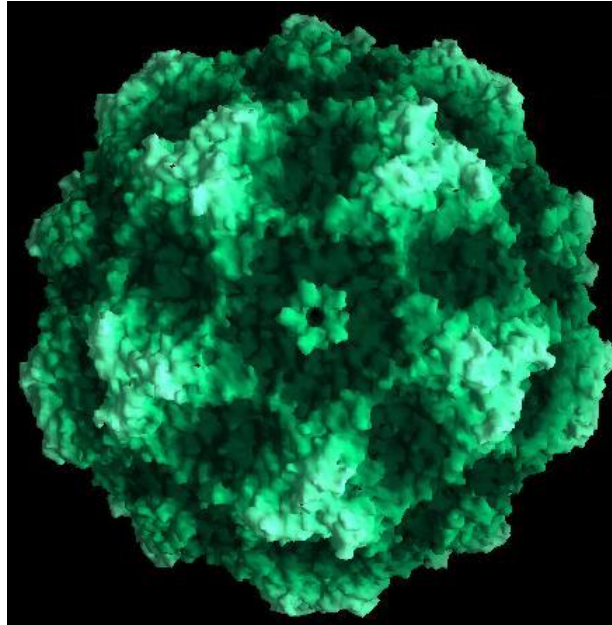
Köpeklerden toplanan serum örneklerinde CPV'ya ait virüs 1972'de Belçika'da, 1977'de Hollanda'da, 1978'de Danimarka, Avusturalya ve Amerika Birleşik Devletlerinde ve 1979'da Japonya'da tespit edilmiştir [10, 14]. CPV-2'nin oluşturduğu enfeksiyon ise ilk olarak 1978 yılında Amerika Birleşik Devletlerinde "**Bulaşıcı Enterik Hastalık**" olarak rapor edilmiştir. Sonraki yıllarda tüm dünyada bağışıklık sistemi zayıf köpeklerde bu virusa bağlı yaygın epidemiler sonucu çok sayıda yavru köpek ölmüş, daha sonra hastalığa karşı aşıların geliştirilmesi ile salgınlar kontrol altına alınarak ölümler sınırlandırılmıştır [10-12, 15, 16]. İlerleyen yıllarda CPV-2'nin yeni bir suşu olduğu belirlenmiş ve bu suş CPV-2a olarak isimlendirilmiştir. Parrish ve ark (1988), virusun hızlı mutasyona uğradığını belirlemiş ve mutasyonlar sonrası ortaya çıkan yeni suşu CPV-2b olarak sınıflandırmışlardır [12, 14].

Günümüzde köpeklerde hastalığa yol açan en yaygın parvovirus suşları CPV2a ve CPV-2b'dir. Son 10 yıllık süreç içinde CPV-2c olarak adlandırılan yeni bir suş izole edilmiştir. Bu suşun virulensinin morbidite ve mortalitesinin oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir [10, 12, 17].

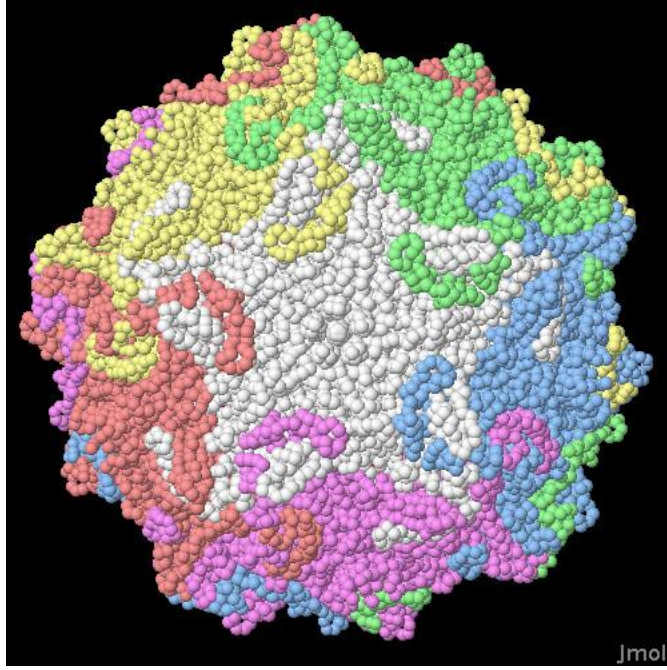
### **2.1.1 Canine Parvovirüsün Özellikleri**

Canine Parvovirüs (CPV) Parvoviridae ailesinde yer alan otonom olarak replike olabilen, zarfsız ve yaklaşık 26 cm çapında tek zincirli DNA virüs olup çevrede uzun süre canlılığını koruyabilen (5-7 ay kadar) dayanıklı bir organizmadır [1, 18-20]. CPV'ün önemli bir kısmı türe spesifiktir. Fakat birçok memeli türünde (kedi, vizon ve rakun gibi) DNA yapısı yüksek derecede benzeşlik (<%98 benzeşlik) göstermektedir [1, 21-25]. Virüsün viral kapsid yapısı 60 protein altünitesinden oluşan VP1, VP2 ve VP3 olarak adlandırılan 3 farklı polipeptid zincirinden oluşmaktadır [1, 3, 26, 27]. VP1 (748 aminoasit kalıntısı) ile VP2 (584 aminoasit kalıntısı) protein yapıları aynıdır, fakat VP1'de VP2'ye ilave olarak proteinin N-amino ucunda 154. aminoasit kalıntısı bulunmaktadır [26-33]. VP2 proteinin büyük bir kısmı virüsün yüzeyini oluştururken VP1 proteini ise sadece kapsid bileşiminin küçük bir kısmını oluşturmaktadır [28, 34]. VP3 proteini ise VP2'nin N-terminal ucundan yaklaşık 20 amino asitin preteolitik olarak uzaklaştırılması ile oluşmaktadır. Bu yüzden, VP2 ve VP3'ün aminosid dizileri VP1'in C terminal ucunda kapsamaktadır [1, 26]. VP2 domainin uzaysal yapısının büyük

çoğunluğu X-ray diffraction analizleri ile aydınlatılırken amino terminal 37 dizilik aminoasid kalıntısının uzaysal yapısının stabil olmamasından dolayı tam olarak bilinmemektedir. CPV'nin hastalık yaptığı çeşitli konak türlerinden (kedi, vizon ve rakun gibi) izole edilen VP2'nin bu bölgesinin aminoasid dizileri tümünde tamamıyla aynıdır [1, 22-25]. Bu dizi ayrıca minute of mice (MVM) da ve H1 parvovirüs (hamster) çok iyi korunmuştur. Bununla birlikte, diğer parvirüslerde bu benzeşlik daha zayıftır [3, 35]. Bu bölge birçok yönden önemlidir: (1) bu bölge MVM'nin hücreye girişinde ilişkilidir. (2) Virüs neutralizasyonu sağlayan yani monoklonal antikor 3C9 tarafından tanınan epitop bölgeyi içerir [3, 20, 36]. (3) Bu birçok hayvan türünde immünolojiktir (Şekil 2.3). Peptid aşılıları direk bu bölgedeki dizleri içerecek şekilde dizayn edilmektedir [1, 3]. Viral yapı X-ray kristalografisi ve elektron mikroskobu ile karakterize edilmiştir (Şekil 2.2).



Şekil 2. 2 CPV'nin X-Işın Kristalografisi ile çözümlenen moleküler yüzey yapısı [37]



Şekil 2. 3 Canine parvovirüsün (PDB entry 4dpv) protein ve DNAsını içeren tüm yapısı. Beyaz eksen etrafında 5 farklı protein bölgesi 5 farklı renkte işaretlenmiştir [38].

#### 2.1.1.1 Köpeklerde Parvovirus Enfeksiyonlarında Risk Faktörleri

Canin parvovirus-2'ye karşı aşılanan veya hastalığı geçiren köpekler uzun süreli bağışıklık kazanır. CPV-2'ye karşı aşılanmış annelerden doğan yavrular yaşamlarının ilk birkaç haftasında enfeksiyona karşı anneden gelen antikor tarafından korunur. Hastalık bu nedenle neonatallerde (yeni doğan) erken dönemde ender olarak görülür [12, 39]. CPV-2 enfeksiyonu her yaş, cinsiyet ve ırktaki köpeklerde görülmekle birlikte hastalığa özellikle 6 hafta-6 ay arası yaşlardaki yavru köpekler daha duyarlıdır [12, 40, 41]. Virüs salya ve dışkı ile bulaşmış eşyalar ve dikkatsiz insanlar ile çevreye dağılır. Virüs doğada oldukça dayanıklı olduğundan bulaşmalar oldukça yaygındır [17, 39, 42].

Hastalık ülkemizde oldukça yaygın olmakla birlikte son bir kaç yıldır kanlı ishale yakalanan köpek sayısını azaltmak amacı ile aşılama çalışmaları başlatılmıştır [43].

## 2.2 Aşı Çalışmaları

İnsanlarda ve hayvanlarda aktif bağışıklığı uyararak enfeksiyonlara karşı koruma sağlayan biyolojik maddeler olan aşılarda vücudun mikroorganizmalara karşı korunmasında aktif rol oynayan aktif bağışıklığın yapay olarak kazanılmasını

sağlamaktadır. Aktif bağışıklığın kazanılmasında kullanılan aşilar temel olarak dört gruba ayrılmaktadır.

- Cansız (ölü) mikrop aşiları
- Canlı (atenüe) mikrop aşiları
- Mikrop ürünlerinden hazırlanan aşilar
- Biyoteknolojik aşilar

### **2.2.1 Cansız (ölü) Mikrop Aşiları**

Bakterilerin farklı yöntemlerle öldürülmesi sonucunda yada virüslerin inaktive edilmesi ile hazırlanan aşilarıdır. Laboratuvarda üretilen bakteri veya virüsler 1 cm<sup>3</sup> sıvıda belirli sayıda mikrop olacak şekilde seyerlendirilir ve ısı, formaldehit, fenol, aseton, ultraviyole gibi etki veya maddelerle öldürülürler. Mikrop bütünlüğü ve antijenik yapının bozulmadığı bu yöntemle elde edilen cansız mikrop aşilarının koruyuculuk süresi diğer aşilardan daha kısadır [44].

Ölü bakteri aşiları: Tifo, paratifo, kolera, boğmaca, veba, salgın tifüs aşiları,

İnaktive virüs aşiları: Çocuk felci (Salk tipi) , kuduz, influenza (Grip) aşilarıdır.

### **2.2.2 Canlı (Atenüe) Mikrop Aşiları**

Mikropların antijenik özellikleri bozulmadan, hastalandırma özelliği (virülans) yavaşlatılarak ya da tamamen ortadan kaldırılarak hazırlanan aşilarıdır. Organizmada, sessiz veya çok hafif seyirli bir infeksiyon oluşturarak doğal infeksiyona benzer nitelikte bir bağışıklık oluşturarak bağışıklık kazandıran canlı mikrop aşiları daha çok hücresel bağışık yanıt oluştururlar ve koruyuculuk süreleri de daha uzundur. Özellikle bazı atenüe virüs aşiları (örn. kızamık, kızamıkçık, kabakulak gibi) tek bir doz ile ömür boyu bağışıklık sağlayabilirler [44].

Canlı (atenüe) bakteri aşiları: BCG Verem Aşısı, Canlı (atenüe) virüs aşiları: Sabin tipi (ağızdan verilen) çocuk felci aşısı, Sarı ateş, kızamık, kızamıkçık, kabakulak.

### **2.2.3 Mikrop Ürünlerinden Hazırlanan Aşılar**

#### **2.2.3.1 Toksoid (Anatoksin) Aşılar**

Bakteri toksinleriyle meydana gelen hastalıklardan korunmada kullanılan bu aşılar bakteri toksininin saf olarak elde edilmesi ve sonrasında ısı veya formol ile muamele edilerek zehir etkisinin giderilmesi ile elde edilir. Antijen yapısı bozulmamış toksoid (anatoksin) lerin aşı olarak kullanıldığı bu yöntemde daha çok hümmoral bağışık yanıt oluşarak antikorlarla koruma sağlanmaktadır [44].

#### **2.2.3.2 Mikropların Belirli Bir Kısımından Hazırlanan Aşılar**

Bazı infeksiyon hastalıklarında, etken mikrobun belirli bir parçasından (örneğin HBs Ag partikülleri veya N. meningitidis'in hücre duvar polisakkariti gibi) hazırlanan aşılar ve daha iyi koruyucu etki yaptığı yapılan bazı araştırmalarla gösterilmektedir [44].

### **2.2.4 Biyoteknolojik Aşılar**

Aşılama sürecinde karşılaşılan yan etkiler ve diğer sorunlardan dolayı; infeksiyon hastalıklarında daha etkili ve yan etkileri daha az olan aşıların elde edilmesi için yeni biyoteknolojik yöntemler kullanılmaktadır ve bu yöntemlerle hazırlanan aşıların avantajları oldukça fazladır. Aşı içinde mikroorganizmanın genomunun sadece küçük bir kısmı bulunduğundan infeksiyon oluşturmaz bu aşılar çeşitli alt gruplara ayrılmaktadır. Bunlar aşağıda kısaca özetlenmiştir.

#### **2.2.4.1 Rekombinant DNA Aşıları**

Mikropların bağışıklıkta etkili olan proteinlerini kodlayan genlerin izole edilerek başka bir taşıyıcı hücreye aktarılması (bir mayaya aktarılması ya da taşıyıcı bir virüse rekombine edilmesi) ile ve orada sentezlenmesi sonucunda hazırlanırlar.

#### **2.2.4.2 Reasortan Aşılar**

Bazı virüslerin genetik materyallerini komşu virüslerle değiştirerek soğukta üreyip vücut ısısında çoğalamama yeteneği kazandırma esasına dayanır (Ör: İnfluenza A, Rota

virüs). Bu tar aşılarında, hazırlanan suşun tekrar vücut ısısında üreme yeteneği kazanabilme olasılığı en büyük dezavantajdır.

#### **2.2.4.3 Mutant Aşılar**

Mutant aşılar biyoteknolojik yöntemler ile patojen mikroplardaki virulans genlerinin yok edilmesi sonucu "avirulan mutant" suşların oluşturulması ile hazırlanırlar. V.cholerae bakterisinde toksini kodlayan genin yok edilmesi sonucu hazırlanan aşı buna örnek verilebilmektedir.

#### **2.2.4.4 Anti İdiotip Aşılar**

Enfeksiyon etkenleri veya antijenlerin immünojenik komponentlerinde bulunan, epitoplara gibi aktiviteye sahip monoklonal anti-idiotip antikorlardan ibarettir. Antikorlar aracılığı ile gerçekleştirilen yeni bir aşı tekniğidir.

#### **2.2.4.5 Konjuge Polisakkarid Aşıları**

Bazı patojenik bakterilerin virülansı hidrofilik polisakkarid kapsüllerinin antifagositik özelliklerine dayanır. Kapsülün antikor ile kaplanması makrofajların ve nötrofillerin o patojeni fagosite etmelerini kolaylaştırır. Polisakkarid aşıların dezavantajı T hücrelerini uyaramamalarıdır. B hücrelerini T-bağımsız olarak uyarırlar ve IgM yapımı gerçekleştirir. Hafıza hücresi oluşmaz. Polisakkarid antijenler zayıf immünojenik özellik gösteren haptentlerdir. Bir protein taşıyıcısı ile bağlanarak haptentin immünojenitesi artırılır. Polisakkarid-protein konjugatının T hücreleri aktive etmesi sonucunda immünoglobulin dönüşümü meydana gelir. Bu aşılarla karşı IgG sınıfı antikorlar oluşur. İmmün hafıza oluşur ve hayatın ilk anlarından itibaren korunma sağlanır [44-46].

#### **2.2.4.6 Sentetik Peptid Aşıları**

Bu teknikle, bağışıklıkta etkili olan proteinlerin, aminoasit sıralaması belirlenir ve bu proteinler laboratuvarında sentetik olarak sentezlenir. Peptid antijenleri sentetik olarak elde edildikleri için canlı mikroorganizmaların üretilmesine ihtiyaç yoktur. Peptidlerin saflaştırılması daha kolaydır. Küçük molekül ağırlı olduklarından immünojen özellikleri azdır. Bu yüzden taşıyıcı protein yada adjuvant kullanımına gerek duyulabilir [7, 44].

Canine Parvovirus tarafından enfekte edilen hayvanlarda görülen Kanlı ishal hastalığına karşı yapılan çalışmalarda vürüsün VP2 viral proteinin amino terminal bölgesine karşı gelen ve antijenik bölgeleri haritalanmış ve bu bölgelere karşı gelen peptid dizileri sentezlenmiştir. Bu amino asid dizilerini içeren sentetik peptid aşıları geliştirilmeye başlanmış ve ayrıca bu aşuların immünolojik özellikleri üzerine deneysel çalışmalara başlanmıştır. Kanlı ishale karşı sentetik peptid aşısı geliştirme çalışmalarına Langeveld ve arkadaşlarının çalışmaları öncülük etmiştir. Langeveld ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada CPV'nin 1L15 (MSDGAVQPDGGOPAV) ve 7L15 (OPDGPAVRNERAT) olmak üzere iki farklı peptid dizisini sentezlemişlerdir. Bu peptidlerin KLH proteini ile biyokonjugatlarının da sentezleyen araştırmacılar, bu KLH-peptid biyokonjugatlarının, CPV'e karşı koruyucu etkisini genç köpeklerde üzerinde test etmişlerdir. Geliştirdikleri sentetik peptid aşısı, klasik yöntemlerle hazırlanan aşularla aynı etkiyi sahip olmasının yanında virüs içermemesinden ve daha kararlı yapıda olmasından dolayı potansiyel olarak üstünlük göstermektedir [1, 47]. Casal ve arkadaşları ise, CVP'nin VP2 proteinin N terminal ucuna karşı gelen bölgenin farklı kısımlarının farklı sayıda peptid içeren dizileri ile çalışmışlardır. Bu farklı dizileri kullanarak sentezledikleri KLH-peptid biyokonjugatları ile Yeni Zelanda beyaz tavşanlar üzerinde ve Balb/c fare türleri üzerinde yaptıkları deneylerde peptid dizilerinin birbirlerine kıyasla immünolojik özelliklerin etkisini incelemişlerdir. Tek bir peptid dizisinde VP2'nin farklı bölgeleri karşı gelen birden fazla peptid dizisinin proteine bağlandığı durumda etkinin çok daha yüksek olduğunu göstermişlerdir [3]. Başka bir çalışmada da, CPV'ün VP2 proteinini kodlayan gen rekombinant baculovirüse yüklenmiş ve bakteri tarafından sentezlenen virüs benzeri partiküller, adjuvantlarla birlikte farklı kombinasyonlarda ve farklı dozlarda köpeklere immünüze edilmiştir. Elde edilen sonuçlar geliştirilen rekombinat aşının köpeklerde CVP'e karşı kullanılabileceğini göstermiştir [48].

### **2.3 Lineer Polimer Özellikteki Peptid Taşıyıcılar**

Sentetik peptidlerin immunojenik özelliklerinin zayıf olması ve moleküler boyutlarının antikor oluşturmak için yeterli olmamasından dolayı, peptidlere karşı antikor üretiminde immunojenliği arttırmak için peptidler çeşitli taşıyıcı moleküllere bağlanırlar. Poliakrilik asid (PAA), PoliN-isopropilakrilamid (NIPAA), PoliN-vinil-2-prolidon (PVP), Polivinilpiridin-Polisetilpiridin kopolimeri ve Polivinilpirolidon-



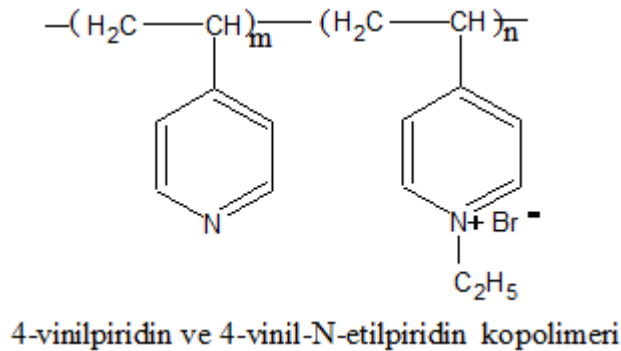
Poliakrilik asit kopolimerlerinde peptidler için kullanılan lineer özellikteki taşıyıcılardır ve peptidler bu tür taşıyıcılara kararlı kovalent bağlarla biyokonjugasyon yöntemi ile bağlanırlar [49].

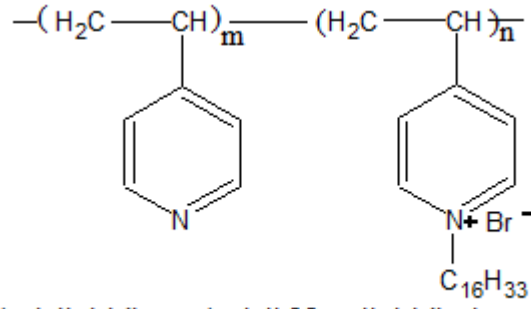
Biyokonjugasyon bölgesi peptid dizilimine bağlı olarak; dizinin N- ucu, C- ucu ya da peptidin içerisindeki fonksiyonel bir nokta [karboksil (-COOH), amino (-NH<sub>2</sub>) ya da sülfidril (-SH) uçları] olabilir. Aşı olarak kullanıldığında önemli bir etki oluşturan sentetik peptidler, haptenler vb. spesifik antikor oluşturmak için günümüzde oldukça yaygın kullanılmaktadır [50]. Ancak peptidlerin, antijenlerin ya da ilaç etken maddelerinin suda çözünabilir polimerler ile konjugatlarının oluşturulması, tedavi edici ajanların özelliklerini ve immunojenliğini önemli ölçüde değiştirmektedir. Peptid-polimer biyokonjugatlarının oluşturulması çok yönlü etkilere sahiptir. Bunlardan bazıları;

- Peptidlerin modifikasyonu sağlamak,
- Hidrofobik özellikte peptidlerin suda çözünübilirliğini arttırmak,
- Peptidlerin bölgesel etkilerini yükseltmek,
- Peptidlerin immunojenik etkilerini ve immunoreaktivliklerini arttırmak,
- Peptidlerin canlı organizmada daha uzun süre etkili olmasını sağlamaktır [51].

Polimerik biyokonjugatların bu eşsiz özellikleri tedavi edici etkilerini de arttırmaktadır. Böylece immunolojik olmayan pozitif ya da negatif yüklü sentetik polielektrolitlerin, klasik adjuvantlara karşı en iyi alternatiflerden biri olmasını sağlamaktadır [52]. Polimerik taşıyıcı olarak kullanılan bazı polielektrolitlerin genel gösterimi Şekil 2.4 ve Şekil 2.5'te verilmiştir [51].

→ Katyonik Polielektrolitler

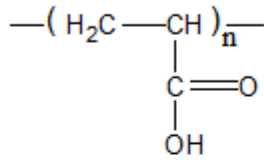




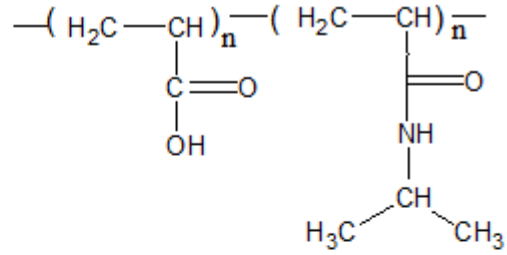
**4-vinilpiridin ve 4-vinil-N-setilpiridin kopolimerleri**

Şekil 2. 4 Taşıyıcı polimer olarak yaygın kullanılan katyonik polielektrolitler

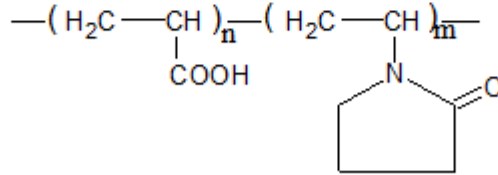
➔ Anyonik Polielektrolitler



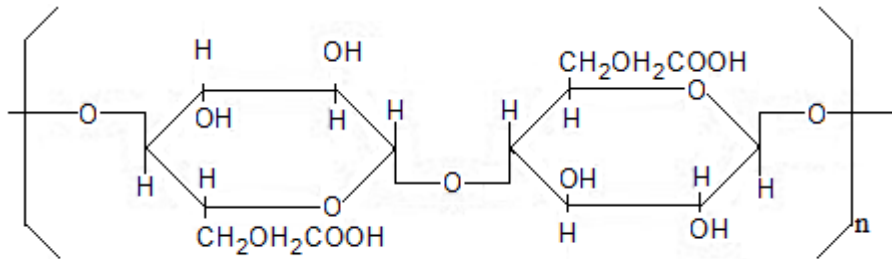
**Poliakrilik asid**



**Poliakrilik asid -N-isopropilakrilamid kopolimeri**



**N-Vinil-2-Pirolidon-Akrilik asid kopolimeri**

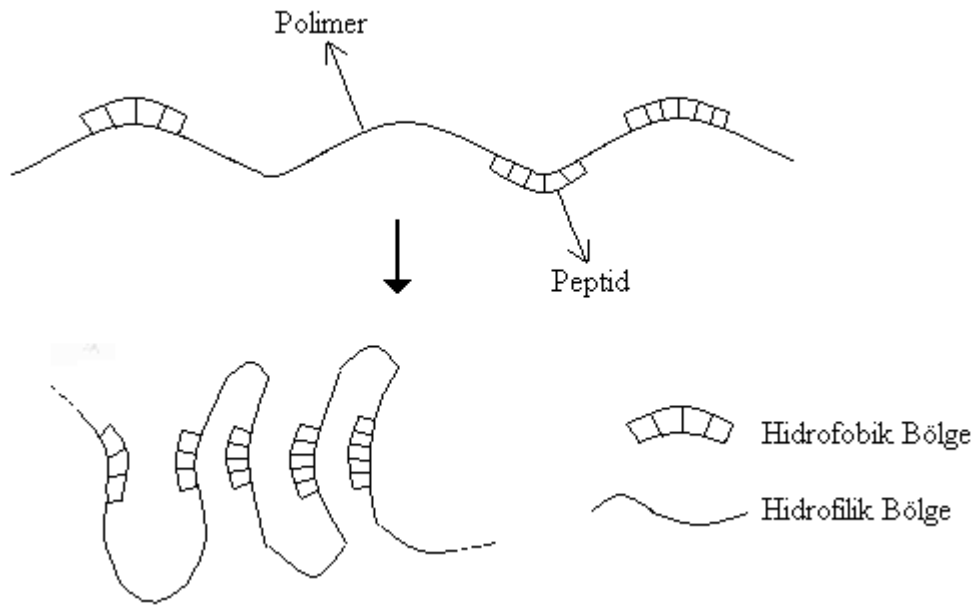


**Karboksimetilselüloz**

Şekil 2. 5 Taşıyıcı polimer olarak yaygın kullanılan anyonik polielektrolitler

Senetik peptidlerin polielektrolitler kullanılarak oluşturulan biyokonjugatları güçlü koruma özelliklerinden dolayı yeni nesil aşı bileşenleri olarak düşünölmektedir[51].

Mustafaev ve arkadaşları tarafından geleneksel yöntemle, protein-lineer polielektrolit, peptid-lineer polielektrolit kovalent biyokonjugatları moleküllerin sulu çözeltilerdeki aktive edilmiş fonksiyonel grupları arasında gerçekleşen reaksiyonlar ile sentezlenmiştir. Karbodiimid aktivasyonu ile gerçekleştirilen iki basamaklı kovalent konjugasyon reaksiyonu; polimerin karboksil gruplarının karbodiimid ile aktive edilmesi ve sonrasında karboksil grupları ile proteinin ya da peptidin amino grupları arasında kondenzasyon reaksiyonunun oluşumu ile gerçekleşir. Birinci basamak süresince karboksil grubunun karbodiimide saldırması ile O-açılısoüre ara ürünü oluşmaktadır. Daha sonrasında kararsız olan bu ara ürün peptid ya da proteindeki amino gruplarına saldırmakta böylece polimer ile peptid veya protein arasında çapraz bağlanma gerçekleşmektedir.



Şekil 2. 6 Kısa zincirli peptid moleküllerinin lineer ve uzun zincirli polimerlerle oluşturdukları konjugatların şematik gösterimi [52, 53]

Karbodiimid kullanılarak senetik peptidlerin taşıyıcı polimerlerle kovalent konjugasyonu sonucu sentezlenen biyokonjugatların (Şekil 2.6) yüksek immunolojik özelliğe sahip olduğu Mustafaev ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Konjugatların sahip olduğu yüksek immunolojik özelliğin polimerin adjuvant etkisine bağlı olduğu düşünölmektedir [53].

### **2.3.1 Poliakrilikasit (PAA)**

Poliakrilik asit (PAA) birincil ve ikincil immun cevap için kuvvetli adjuvant özelliktedir ve birçok çalışmada sentetik polielektrolitlerin immun sistemi tetikleyici (immunostimulant) mekanizmalarının daha iyi anlaşılması ve araştırılması için model polimer olarak geniş ve yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [53-55].

### **2.3.2 Karboksimetilselülaz (CMC)**

Eczacılık, kozmetik ve gıda alanında yaygın olarak kullanılan Karboksimetilselülaz (CMC); suda yüksek çözünürlüğe sahip, selülaz türevi anyonik bir polisakkarittir [56]. Sahip olduğu biyouyumluluk özelliği [57] ile ilaç dağılım çalışmalarında [58-61] ve cerrahi operasyon sonrası yapışmaların önlenmesi için terapi uygulamalarında [62-66] kullanılmıştır [67]. Toksik olmayan, yenilenebilir, biyobozunur yapıda ve modifiye edilebilir özellikteki doğal polimer olan karboksimetilselülazın sahip olduğu bu avantajlarından dolayı birçok çalışmada da polimerik taşıyıcı olarak kullanılmıştır [68, 69].

### **2.3.3 Poli(N-Vinil-2-Pirolidon-ko-Akrilikasid) [P(VP-co-AA)]**

Petrov ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda poliakrilikasidin (PAA) immun sistem üzerinde yüksek uyarıcı etkisinin olduğu gösterilmiştir, ancak yüksek toksisitesinden dolayı hazırlanan preparatlar immunolojide geniş kullanım alanı bulamamıştır. Bu nedenle Rafikov ve arkadaşları PAA'in toksisitesini düşürmek için PAA'in N-Vinil-2-pirolidon ile çeşitli oranlarda ve farklı molekül ağırlıklarında kopolimerlerini sentezleyerek bu kopolimerlerin de en az PAA kadar immun sistemde uyarıcı etkisi olduğunu göstermişlerdir [70]. Bu nedenle tıp ve biyoloji alanında yapılan birçok çalışmada [51, 55, 71-75] P(VP-co-AA) polimeri birçok biyolojik molekül için taşıyıcı olarak kullanılmaktadır.

## **2.4 Küresel Özellikteki Taşıyıcılar**

Etkin ilaç taşıyıcı sistem olarak biyoparçalanabilir nanopartiküllerin geliştirilmesi geçtiğimiz birkaç on yıldan fazla bir süredir büyük ilgi odağı oluşturmuştur [76-79]. Mikropartiküller büyüklükleri 1-1000 µm arasında değişen [80], nanopartiküller ise

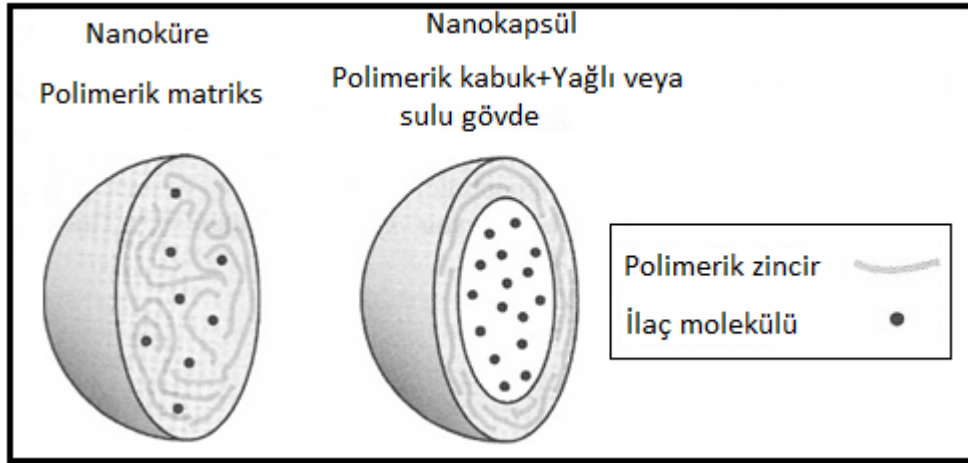
boyutları 10 nm – 1000 nm arasında değişen [81], makromoleküler maddeleri içeren kolloidal, katı partiküllerdir. Etkin madde, mikropartikül yada nanopartikül matriksi içinde çözümlenebilir, hapsedilebilir, adsorbe ettirilebilir, bağlanabilir veya enkapsüle edilebilir [76, 79]. Biyoparçalanır ve biyouyumlu polimerlerden hazırlanan nanopartiküller ve mikropartiküller, hümoral ve hücresele immun cevapları indükleyerek aşı formülasyonlarının oluşturulmasında da kullanılmaktadır. Örneğin Hepatit B hastalığına ait antijenik peptidin salımı için PLGA nanopartiküller kullanılmıştır [81].

#### **2.4.1 Mikropartiküller**

Mikropartiküller büyüklükleri 1-1000 µm arasında değişen katı partiküllerdir [80]. Günümüzde genel olarak etkin maddelerin salım özelliklerinin kontrolü, stabilitelelerinin sağlanması, hedefe yönelik uygulamalar ve hasta uyumu gibi avantajlarından dolayı kontrollü salım preparatları geliştirilmiştir. Bu sistemlerin esasını biyoparçalanabilen polimerler veya membranlar oluşturmaktadır. Mikrokürelerde bunlardan birisidir ve yaklaşık 25 yıldan beri gerek organik kimya sentez ürünü terapötik moleküller için gerekse peptid ya da protein özellikteki biyomoleküller için kullanılmaktadır [82, 83].

#### **2.4.2 Nanopartiküller**

Nanopartiküller; doğal ya da sentetik yapıdaki polimerlerle hazırlanan, boyutları 10-1000 nm arasında değişen, hazırlama yöntemine göre nanoküre veya nanokapsül (Şekil 2.7) olarak adlandırılan ve etken maddenin partikül içinde çözümlendiği, hapsedildiği ve/veya yüzeye adsorbe edildiği yada bağlandığı matriks sistemlerdir [79, 84-86].

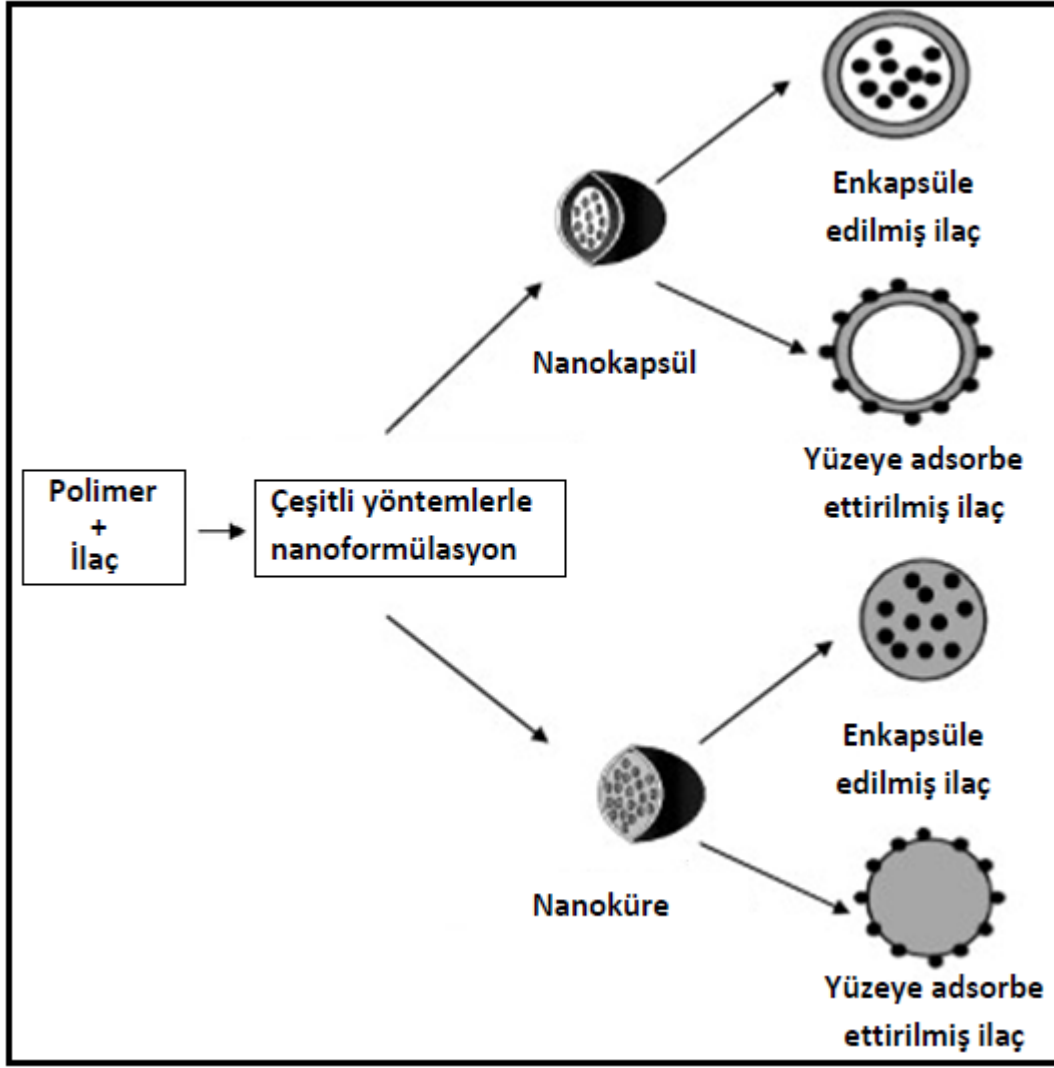


Şekil 2.7 Nanoküre ve Nanokapsül yapısının şematik gösterimi [84]

Son yıllarda, nanoteknoloji tıp ve biyoteknoloji alanında nanopartikül sistemlerle ilgili araştırmalara ve uygulamalara ilişkin çalışmaların sayısında önemli ölçüde artış olmuştur [86]. Tıptaki uygulamalar özellikle; ilaç, gen ve antijenler için taşıyıcı olarak kullanılması, *in vitro/in vivo* diagnostiklerin uygulanması, diyet destekleyiciler, geliştirilmiş biyouyumlu materyallerin üretimi gibi konuları kapsamaktadır [86-91].

Hazırlama yöntemine bağlı olarak, enkapsüle edilmiş terapötik ajanın farklı özellikler ve farklı salım karakteristikleri sergilediği nanoküreler veya nanokapsüller elde edilir. Nanokapsüller veziküler sistemlerdir, ilaç bir kaviteye hapsedilir ve bir polimer membran ile çevrelenir, nanoküreler ise matris sistemlerdir burada ilaç fiziksel olarak ve uniform olarak disperse edilmiştir (Şekil 2.8). Nanopartiküller ilk defa yaklaşık olarak 40 yıl önce [92] aşılarda ve kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanların taşınması için geliştirilmiştir [79, 93-95].

Nanopartiküller, nanoboyutlu yapılarından dolayı mikropartiküler sistemlere kıyasla hücre içine daha fazla alınmaktadırlar. Desai ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada 100 nm boyutundaki nanopartiküllerin Caco-2 hücrelerinden; 1 µm boyutundaki mikropartiküllere oranla ikibuçuk kat daha fazla, 10 µm boyutundaki mikropartiküllere oranla ise altı kat daha fazla hücre içerisine alındığını göstermişlerdir [96].



Şekil 2. 8 Biyoparçalanabilir nanopartiküllerin çeşitleri [79, 97]

#### 2.4.2.1 Nanopartiküllerin Sağladığı Avantajlar

Doğal yada sentetik polimerlerin kullanılması ile elde edilen; ilaçların yanı sıra, proteinler, peptitler ve genlerin de ilgili dokuya hedeflendirilmeleri için kullanılan nanopartiküllerin sağladığı avantajlar iki temel özelliklerinden ileri gelmektedir. Bu özelliklerinden birincisi, nanopartiküllerin küçük partikül boyutlarına sahip olmasıdır. Böylece küçük kapillerlerden geçerek hücrelere alınır ve hedef bölgede etkili etkin madde akümülyasyonunu sağlarlar [79, 96, 98-100]. İkincisi ise, nanopartiküllerin hazırlanmasında biyobozunur materyallerin kullanılmasıdır. Biyobozunur malzemeler günler hatta haftalar süren periyotlarda hedef dokuda kontrollü etkin madde salımını sağlamaktadırlar. Tüm bunlara ek olarak nanopartiküller; ilaçların/proteinlerin yada peptidlerin stabilitesinin artmasını sağlarlar [101].

### **Nanopartiküllerin diğer avantajları ise;**

- Kolaylıkla sterilize edilebilirler,
- Fizyolojik ortamda parçalanabilirler ve parçalanma ürünleri toksik değildir,
- Etkin madde yükleme kapasiteleri yüksektir ve bu şekilde, etkin maddenin intrasellüler dağılımı artar,
  - Oral yolla ilaç uygulamada, nanopartikül şeklinde verilen ilacın salım ve biyoyararlanımı artar,
  - Nanopartiküllerin polimerik yapıları, etkin maddenin hedeflendirilmesini, salımının kontrolünü ve sürdürülmesini sağlar. Hedeflenen bölgede enjeksiyonlarını takiben, günler hatta haftalar süren etkin madde salımına olanak verirler. Ayrıca, nanopartiküllerin yüzeyine hedefleme bölgesindeki özel moleküler yapıları tanıyan spesifik ligandların tutturulması ile etkin maddenin lokalizasyonu mümkün olmaktadır,
  - Diğer koloidal taşıyıcı sistemlerle kıyaslandıklarında polimerik nanopartiküller biyolojik sıvılarda çok daha yüksek stabiliteye sahiptirler. Polimerik partiküler yapı, katı matriks içine hapsedilmiş aktif maddeyi parçalanmaktan korur. Böylece etkin maddenin istenen bölgeye ulaşma olasılığı artar,
  - Küçük partikül boyutları, nanopartiküllerin küçük kapillere penetrasyonuna imkan verir ve hücreler tarafından tutulmalarını sağlar. Böylece, vücutta hedeflenen bölgede istenen etkin madde salımı sağlanır. Mikropartiküllere kıyasla hücre içine alımları yüksektir,
  - Etkin maddenin hedef bölgede salımını sağladıkları için, diğer organ ve dokular üzerindeki sistemik toksisitelerini azaltırlar,
  - Nanopartikül dispersiyonları; ilacın, taşıyıcı veya ilave zararlı çözücüler içinde çözünmesine gerek kalmadan, parenteral yolla kolaylıkla uygulanabilmesini sağlar,
  - Üretim teknikleri genel olarak basit ve kolaydır,
  - Nanopartiküller, ilacın katı dozaj şekillerinde, uzun süre ve ilave saklama şartlarına gerek kalmaksızın saklanmasına imkan vermeleridir [84, 86].



#### **2.4.2.2 Nanopartiküllerin Uygulama Alanları**

Son yıllarda, nanopartiküller sahip oldukları avantajlardan dolayı nanoteknoloji, tıp, biyoteknoloji ve diğer alanlarda yoğun olarak araştırılmaktadırlar. Tıp alanında özellikle antikanser ilaçlar, antienflamatuvar ilaçlar, antiparaziter ilaçlar, peptit ve proteinler için taşıyıcı sistem olarak, ayrıca, aşılar ve tanı maddeleri olarak kullanılırken; veteriner hekimlikte de yaygın uygulama alanı bulmaktadır [86, 102, 103]. Antijenik özellikteki molekülleri taşıyan nanopartiküllerin ise, immünolojide ümit verici sonuçlar oluşturduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [104]. Veterinerlikte özellikle, hayvanları parazitlere karşı korumak için içme suyu içinde verilen ve bağırsakta parçalanarak ilacı serbestleştiren nanopartiküller kullanılmaktadır [86, 105].

#### **2.4.2.3 Nanopartiküllerin Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler**

Nanopartiküllerin üretiminde doğal (proteinler, polisakkaritler) ve sentetik polimerler (üretim sırasında sentezlenenler, önceden sentezlenenler) kullanılmaktadır. İlk üretilen nanopartiküller, albumin gibi doğal proteinlerden yada poli (akrilamid), poli (metil metakrilat) gibi biyobozunur olmayan sentetik polimerlerden üretilmiştir. Nanopartikül üretiminde proteinlerin kullanımında antijenik reaksiyonların oluşması gibi olumsuz sonuçlar meydana gelirken, biyobozunur olmayan sentetik polimerlerin kullanımında ise bu polimerlerin toksisiteleri büyük risk oluşturmaktadır. Nanopartikül üretimi sırasında sentezlenen polimerlerin kullanımında ise monomerlerin tamamı ile polimerize olmayıp nanopartikül yapısında artık olarak kalabilme sakıncası bulunmaktadır [86]. Nanopartiküllerin hazırlanmasında yaygın olarak kullanılan polimerler Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2. 1 Nanopartikül hazırlamada kullanılan polimerler [86, 106]

Polimer Tipleri	Polimer İsimleri
Sentetik polimerler	Poli(laktid) Poli(laktid-ko-glikolid) Poli( $\epsilon$ -kaprolakton) Poli(izobütülsiyanoakrilat) Poli(izoheksilsiyanoakrilat) Poli(n-bütülsiyanoakrilat) Poli(akrilat) Poli(metakrilat)
Doğal polimerler	Kitosan Aljinat Jelatin Albümin
Blok kopolimerler	Poli(laktid)-poli(etilen glikol) (PLA-PEG) Poli(epsilon-kaprolakton)- poli(etilen glikol) (PCL- PEG) Poli(heksadesilsiyanoakrilat)-ko-poli(etilen glikol) (PHDCA-PEG)
Kolloidal stabilizanlar	Dekstran Poli(vinil alkol) Tween <sup>®</sup> 20 veya Tween <sup>®</sup> 80

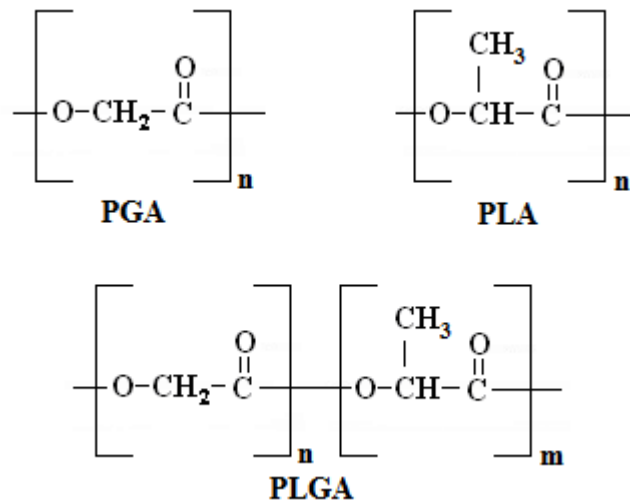
Son zamanlarda peptit, protein ve nükleik asitlerin nanopartiküller ile taşınmasında polisakkaritlerden de yararlanılmaktadır [86, 107]. Bu tez çalışmasındaki nanopartiküller Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) kullanılarak üretildiğinden PLGA polimerine ait genel bilgiler aşağıda detaylı olarak verilmiştir.

### **Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)**

Toksik olmayan metabolitlere dönüşen polimerler, uzun etkili ve kontrollü salım sistemlerinin hazırlanmasında sıklıkla tercih edilmektedir [86]. Sahip olduğu avantajlarından dolayı etkin maddelerin enkapsülasyonu sonucu kontrollü salımı için nanopartikül üretiminde en yaygın olarak kullanılan biyobozunur polimerler alifatik poliesterler olan Polilaktik asit (PLA), Poliglikolik asit (PGA) ve bunların kopolimeri olan Poli(laktik-ko-glikolik asit)'dir [91, 97, 108-110].

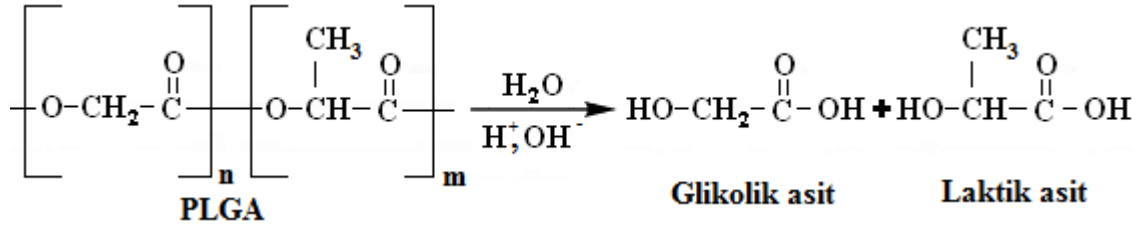
Poli(laktik-ko-glikolik asit), laktik asit ve glikolik asit monomerlerinin uygun karışımlarının polimerizasyonu sonucu elde edilmektedir. Kopolimeri oluşturan

monomerlerin oranları değiştirilerek, farklı molekül ağırlığında, farklı fiziksel, kimyasal ve fizikokimyasal özelliklerde PLGA polimerleri elde edilebilmektedir. Polimerik matriks olarak ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanılan PLGA'ların özelliklerine bağlı olarak, ilaç salımının uzatılması ve kontrolü gerçekleştirilebilmektedir [86]. PLGA'nın kristal yapısı kopolimer zincirindeki iki monomer bileşeninin molar oranına bağlıdır. PLGA'da, % 70'den az PGA içeren kopolimerler amorfudur ve diklorometan, etil asetat gibi organik çözücülerde kolaylıkla çözünürler. PGA hidrofilik özellikte olduğundan hücre içi koşullarda kolaylıkla çözünmektedir. PLA ise yan zincirinde PGA'ye göre fazladan bir metil grubu taşıdığından (Şekil 2.9) daha hidrofobik özelliktedir ve bozunması PGA'den çok daha uzun sürede gerçekleşmektedir [85]. Bu nedenle PLGA'nın sudaki bozunma özelliği kopolimerin molekül ağırlığına ve laktik:glisolik oranına bağlıdır. Yüksek glisolik asit içeriği ve düşük molekül ağırlığı, parçalanma oranını artırmaktadır [86].



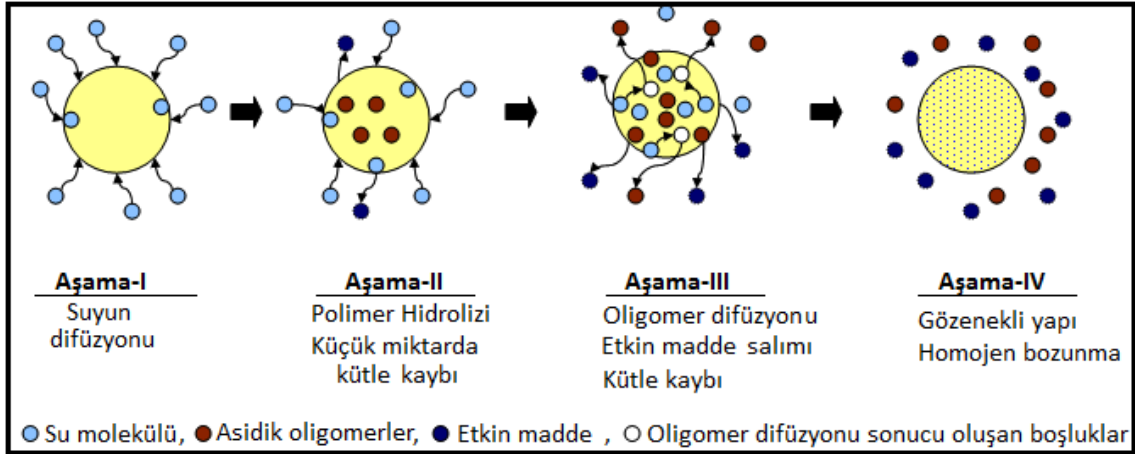
Şekil 2. 9 Poli(Laktik asit) (PLA), Poli(GLisolik asit) (PGA) ve Poli(laktik-ko-glisolik asit) (PLGA) polimerlerinin kimyasal yapıları

PLGA; fizyolojik ortamda inert olması, biyolojik olarak parçalanabilmesi, biyouyumlu olması ve toksik olmayan ürünlere parçalanabilmesi nedeniyle, yeni ilaç taşıyıcı sistemlerde yaygın olarak kullanılan ve FDA tarafından da onaylanmış bir biyopolimerdir. PLGA kopolimerleri gerek yağda, gerekse suda çözünen etkin maddeler ile nanopartiküler sistemlerin hazırlanmasında uygun taşıyıcılardır [86]. PLGA vücutta laktik asit ve glisolik asit monomerlerine parçalanmakta (Şekil 2.10), bunlar da sitrik asit döngüsüne girerek metabolize olarak karbondioksit (CO<sub>2</sub>) ve suya (H<sub>2</sub>O) parçalanmaktadır [86].



Şekil 2. 10 PLGA polimerinin hidrolizi

PLGA nanopartiküllerden etkin madde salımı polimerin hidrolizi sonucu bozunmasına bağlı olarak dört aşamadan meydana gelmektedir (Şekil 2.11). Birinci aşamada suyun difüzyonu gerçekleşmekte bunu takip eden ikinci aşamada ise asidik uç gruplara sahip oligomerlerin hidroliz reaksiyonunu otokatalizlemesi sonucu hidroliz hızlanmaktadır. Üçüncü aşamanın başında kritik molekül ağırlığına ulaşılmakta ve oligomerler partikülden dışarıya difüze olmaktadır. Su molekülleri oluşan boşluklardan difüze olmakta bu da oligomerlerin daha fazla difüzyonunu teşvik etmektedir. Polimerin belirgin kütle kaybı ve etkin madde salımındaki keskin artış üçüncü aşamada meydana gelmektedir. Dördüncü aşamada ise polimerik matris yüksek oranda gözenekli bir yapıya dönüşmekte, bozunma daha yavaş ve homojen bir şekilde ilerlemektedir [111].



Şekil 2. 11 PLGA nanopartikülünün hidrolizi ve etkin madde salımının aşamaları [111]

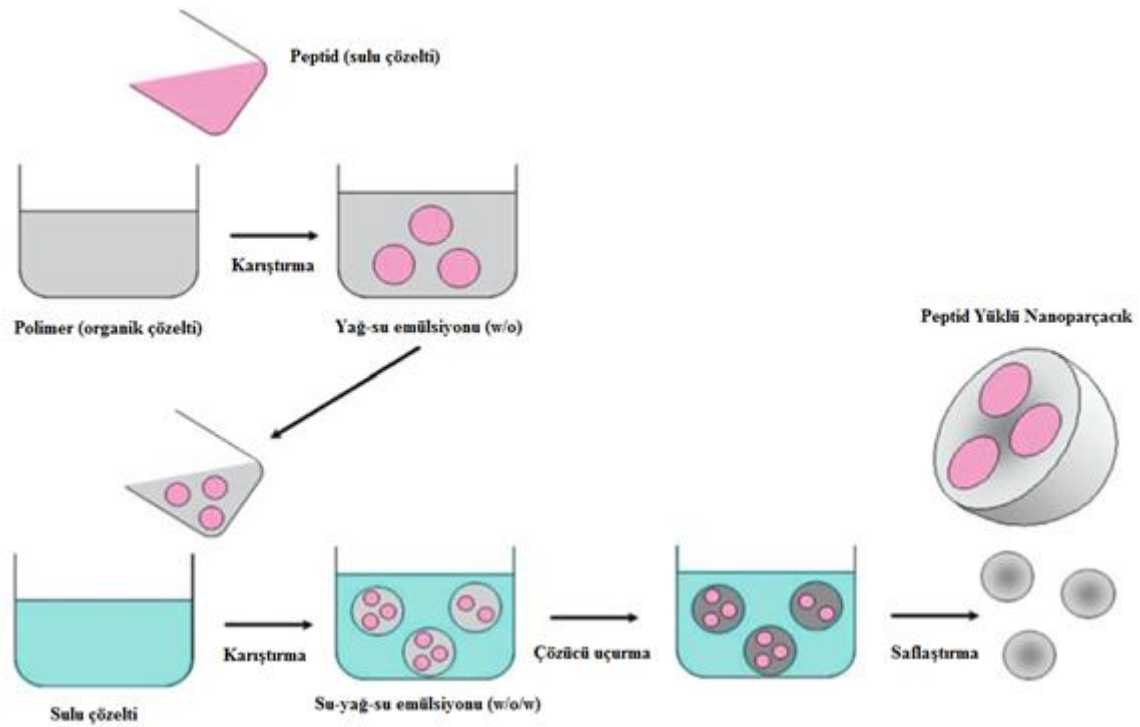
#### 2.4.2.4 Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri

Hazırlama yönteminin seçimi, kullanılan polimerin yapısına ve etkin maddenin çözünürlük özelliğine göre belirlenmektedir. Nanopartikül hazırlama yöntemleri olarak önceleri monomerlerin çeşitli ortamlarda in situ polimerizasyonuna dayanan yöntemler kullanılmıştır [84]. Günümüzde ise, tam olarak karakterize edilmiş, önceden

sentezlenmiş polimer veya doğal makromoleküllerin dispersiyonuna dayalı yöntemler daha fazla kullanılmaktadır. Bu tez çalışması için peptid yüklü nanopartikül üretimi amacı ile yapılan literatür taramasında peptid yada protein yüklü nanopartiküllerin üretiminde en yaygın olarak ikili emülsiyon (w/o/w=su/yağ/su) çözücü buharlaştırma yönteminin (homojenizasyon yada ultrasonikasyon destekli) kullanıldığı görülmüştür ve bu yöntem detaylı olarak anlatılmıştır.

### İkili Emülsiyon (w/o/w) Çözücü Buharlaştırma Yöntemi

Etkin maddenin peptid, protein gibi hidrofilik özellikteki moleküller olduğu durumda, nanopartiküller; ikili emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile üretilirler (Şekil 2.12).



Şekil 2. 12 Peptid yüklü nanopartiküllerin ikili emülsiyon w/o/w çözücü buharlaştırma yöntemi ile üretimi [91]

Bu yöntemde ilk olarak etkin maddenin sulu çözeltisi polimer içeren organik faz içerisinde dağıtılır. Elde edilen w/o emülsiyonu dış sulu faz içerisinde emülsifiye edilerek w/o/w ikili emülsiyonu elde edilir. Elde edilen w/o/w emülsiyonu, etkin madde çözeltisini içeren polimer çözeltisi damlacıklarını oluşturur ve çözücü buharlaştırıldıktan sonra, etkin maddenin sulu çözeltisini içeren nanopartikül süspansiyonu elde edilir. Bu süspansiyon santrifüjlenerek nanopartiküller elde edilir,

su ile yıkama yapıldıktan sonra kurutlan nanopartiküller liyofilize olarak kurutulur ve kullanılmak üzere dondurulur.

## 2.5 Çapraz Bağlama Reaktifleri

Çapraz bağlama reaktifleri (çapraz bağlayıcılar) biyokonjugasyon reaksiyonlarında moleküllerin kovalent olarak bağlanmasını sağlayan ve uygulama amacına göre çok farklı çeşitleri bulunan kimyasal ajanlardır. Çapraz bağlama reaktifleri biyolojik moleküllerin işaretlenmesinde, çapraz bağlanmasında ya da küçük moleküllerin daha büyük moleküllere bağlanarak hedeflenmesi ve dağıtımında kullanılmaktadır. İki farklı molekül intermoleküler (moleküller arası) ya da tek bir molekül intramoleküler (molekül içi) olarak çapraz bağlayıcılar kullanılarak bağlanabilmektedir. Çapraz bağlayıcılar aktif bağın sağındaki ve solundaki R gruplarının eş olup olmamasına göre Homobifonksiyonel (iki eş fonksiyonel R grubu taşıyanlar) veya Heterobifonksiyonel (farklı fonksiyonel R grubu taşıyanlar) olarak sınıflandırılırlar [112].

Kullanılan bağlayıcının cinsine göre bağlanan iki molekül arasında yaklaşık 0-20 Å (1 Å=1x10<sup>-10</sup> m) uzunluğunda bir arabulucu (spacer) bulunmaktadır (arabulucu uzunluğu 0 Å olan bağlayıcılar özel bir alt bölüm olan Direkt Çapraz Bağlayıcılardır).

Arabulucu içeren bağlayıcıların bazı avantajları;

Değişen uzunluktaki arabulucu mesafesi peptide, taşıyıcı molekül yüzeyinden çıkabilme özelliği sağlamak ve böylece peptid daha ulaşılabilir olduğundan daha fazla antijenik özellik göstermektedir.

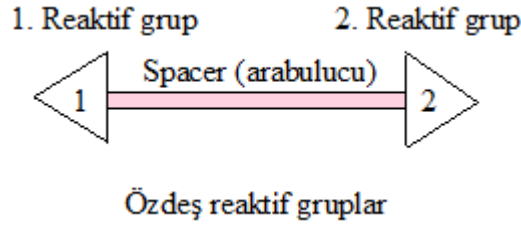
Arabulucu en fazla 6 metilen zincirinden oluşmaktadır ve başka bir fonksiyonel grup içermemektedir. Bu da istenmeyen immunolojik cevapların oluşumunu önleyecektir.

Çapraz bağlama reaktifleri kullanılarak kovalent bağlama ile elde edilen konjugatlar her iki molekülün biyolojik aktivitesini birlikte taşımaktadır [50].

### 2.5.1 Homobifonksiyonel Çapraz Bağlayıcılar

Homobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar; karbon zincirinden oluşan bir arabulucunun simetrik olarak iki özdeş reaktif gruba bağlanması ile oluşturulmuştur (Şekil 2.13) [112].

Arabulucu moleküler bir ip gibi bir protein molekülünü diğer bir moleküle ortak reaktif gruplarına saldırarak kovalent olarak bağlamaktadır. Örneğin bir proteindeki lizine ait  $\epsilon$  amino ya da N- ucundaki amino grubu diğer bir moleküldeki amino grubuna homobifonksiyonel bağlayıcı aracılığı ile çapraz bağlanmaktadır.



Şekil 2. 13 Homobifonksiyonel çapraz bağlayıcıların şematik gösterimi [50]

Bu şekilde iki proteini ya da diğer molekülleri birbirine bağlayabilme yetenekleri homobifonksiyonel çapraz bağlayıcıların farklı assay (deneme) ya da target (hedefleme) çalışmalarında kullanılmasına olanak sağlamıştır. Bunun yanında homobifonksiyonel çapraz bağlayıcıların bazı dezavantajları da mevcuttur. Bunların başında;

Genel olarak basit homobifonksiyonel bağlayıcıların kullanılması ile oluşturulan konjugatların yeteri kadar tanımlanamaması,

Konjugasyon esnasında çapraz bağlayıcı tarafından aktive edilen polimer tarafından oluşturulan aktif ara ürünün yine aynı polimer ile çapraz bağlanabilmesi,

Aktif ara ürünün kendi içerisinde aynı polipeptid zincirinde diğer bir fonksiyonel gruba çapraz bağlanarak intramoleküler konjugat oluşturabilmesi,

Diğer bir çapraz bağlayıcının yine bu aktif ara ürüne bağlanması bunun sonucunda aynı molekülün ikili (dimer), üçlü (trimer) vb, oligomerlerinin oluşabilmesi ve bu şekilde polimerize olabilmesi gelmektedir.

Bu şekilde homobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar kullanılarak gerçekleştirilen tek basamaklı konjugasyon reaksiyonlarında tam olarak tanımlanamayan konjugatların oluşumu önemli bir problemdir. Çünkü bu tip reaksiyonlarda tüm reaktiflerin aynı anda reaksiyon karışımına koyulması gerekmektedir. Tüm bu olumsuz nedenlerden dolayı homobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar için iki basamaklı reaksiyon prosedürü geliştirilmiştir [112].

Öncelikle taşıyıcı molekülü (polimer) homobifonksiyonel çapraz bağlayıcı ile aktive edilir ve sonrasında çapraz bağlayıcının fazlası ile yan ürünler uzaklaştırılarak aktive edilmiş polimer saflaştırılır. Sonrasında bağlanacak olan ikinci molekül ile konjugat oluşumu için karıştırılır [112].

### **2.5.2 Seçici Oldukları Gruplara Göre Homobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri**

Homobifonksiyonel çapraz bağlama reaktiflerinin konjugasyon çalışmalarında en yaygın olarak kullanılanları yöneldikleri reaktif gruplara göre sınıflandırılarak aşağıda verilmiştir [113].

#### **a) Amino Grubuna Yönelen Homobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri**

Amino grubuna yönelen çapraz bağlama reaktifleri amino grubu içeren protein, peptid gibi makromoleküllerin kovalent olarak bağlanmasında kullanılan homobifonksiyonel çapraz bağlayıcılardır.

- NHS Esterleri
- Bis-imidoesterler
- Bis-aldehidler
- Bis-izosiyonatlar ve İzotiyosiyonatlar
- Diflorobenzen Türevleri
- Amino Gruplarının Yönlendirdiği Diğer Çapraz Bağlayıcılar

#### **b) Sülfidril Grubuna Yönelen Homobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri**

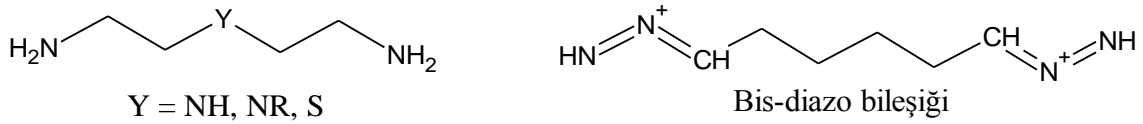
Sülfidril grubuna yönelen çapraz bağlama reaktifleri sülfidril grubu içeren protein, peptid gibi makromoleküllerin tiyol bağı oluşturarak kovalent olarak bağlanmasında kullanılan homobifonksiyonel çapraz bağlayıcılardır [112].

- Bis-maleimidler
- Disülfid Oluşturan Reaktifler
- Bis-alkil halojenürler



### c) Karboksil Grubuna Yönelen Homobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri

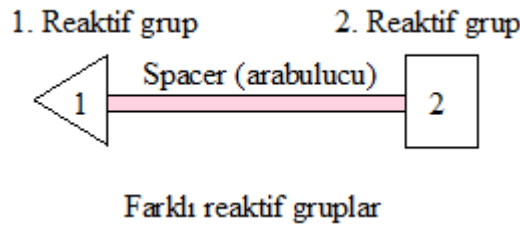
Karboksil anyonu nükleofilik yapıdadır ancak nötr ve oldukça bazik pH değerleri arasında elektrofiller için reaktivliği amino ya da tiyol grubunun yanında oldukça zayıf kalmaktadır. İlimli asidik koşullarda (karboksil grubunun pKa değerleri arasında; yaklaşık pH=3-5) amino ve tiyol grupların protonlanmış formları ( $\text{NH}_3^+$ , SH) baskın olduğundan reaktivlikleri azalmakta ve karboksil grupları reaksiyon için tercih edilmektedir.  $\beta$ -karbonildiazo bileşikler bu koşullar altında konjugasyon reaktifleri olarak kullanılmaktadır. Bu bileşikler fotoaktive edilebilir formda olup sonrasında karanlık koşullarda nükleofilleri hedefleyerek reaksiyona girmektedir. Genel olarak kullanılan karboksil grubuna yönelen homobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar diazo bileşikleridir (Şekil 2.14) [113].



Şekil 2. 14 Konjugasyon reaksiyonlarında kullanılan karboksil grubuna yönelen çapraz bağlayıcılar [50]

### 2.5.3 Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlayıcılar

Heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar; karbon zincirinden oluşan bir arabulucunun iki ucuna farklı reaktif grupların bağlanması ile oluşturulmuştur (Şekil 2.15).



Şekil 2. 15 Heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcıların şematik gösterimi [50]

İki farklı reaktif grup, kovalent olarak bağlanacak farklı moleküllerdeki iki farklı fonksiyonel gruba saldırarak bu moleküllerin çapraz bağlanmalarını sağlarlar. Örneğin çapraz bağlayıcının bir ucu amino grubuna yönelen reaktif grup içerirken, diğer ucu

sülfidril ya da karboksil grubuna yönelen reaktif grup içermektedir. Bunun sonucunda hedeflenen molekülün istenilen bölgesinde çapraz bağlanma reaksiyonu gerçekleştirilebilmekte ve böylece konjugasyon prosesinde daha iyi bir kontrol sağlanmaktadır [112].

Heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar kullanılarak gerçekleştirilen konjugasyon reaksiyonu birkaç basamaktan oluşmaktadır. Tipik bir konjugasyon reaksiyonunda ilk protein (ya da peptid, makromelekül vb.) heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcının daha reaktif ve reaksiyona meyilli olan ucu tarafından modifiye edilir. Sonrasında modifiye protein, reaktiflerin fazlasının jel filtrasyon ya da diyaliz yoluyla uzaklaştırılması sonucu saflaştırılır. Konjugasyon için ikinci molekül ilave edilmeden aktive edilmiş ara ürünün saflaştırılması sırasında ara ürünün kararlılığını koruyabilmesi için birçok heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar, en az bir tane sulu ortamda uzun süre kararlı kalabilecek reaktif grup içerirler. Örneğin NHS-ester maleimid heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcıları, aminlere karşı oldukça reaktif olan NHS ucu ile proteine bağlanıp molekülün modifikasyonunu gerçekleştirirken, maleimid fonksiyonel grubunun kararlılığından dolayı ara ürünün aktivitesi korunmaktadır. Çünkü maleimid grubu sulu çözeltilerde NHS esterlere göre daha kararlıdır. Hızlı bir saflaştırma işleminden sonra ikinci molekül (sülfidril grubu içeren) ortama eklenerek maleimid ucu ile ilk moleküle çapraz bağlanması sağlanır. Bu şekilde çoklu basamaklı konjugasyon reaksiyonlarında konjugat ürününün molekül boyutu ve çapraz bağlı üründeki bileşen oranları üzerinde daha iyi bir kontrol sağlanmaktadır. Konjugatın konfigürasyonu ve ya da yapısı ilk proteinin başlangıç modifikasyon derecesine bağlı olarak ikinci proteinin konjugasyon reaksiyonuna eklenecek miktarı ayarlanarak düzenlenebilmektedir [112]. Bu şekilde kullanım amacına göre; düşük ya da yüksek molekül ağırlıklı konjugatlar elde edilebilir.

Heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar konjugasyon reaksiyonlarında hedef molekülün özel bir bölgesine karşı spesifik yönlendirici olarak kullanılabilirler. Bunun yanı sıra heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar seçici olmayan bağlanma gerçekleştiren ve UV ışınlama ile aktive edilen bir adet fotoreaktif gruba sahip olabilirler.

Heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar iki farklı fonksiyonel grubun yanı sıra bunları birbirine bağlayan bir adet de arabulucu (spacer) içerirler. Çapraz bağlayıcılar her

zaman yalnızca reaktivitelerine göre değil bazen de sahip oldukları arabulucunun boyutuna ve özelliğine göre seçilip kullanılabilirler.

#### **2.5.4 Seçici Oldukları Gruplara Göre Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri**

Heterobifonksiyonel çapraz bağlama reaktiflerinin konjugasyon çalışmalarında en yaygın olarak kullanılanları yöneldikleri reaktif gruplara göre sınıflandırılarak aşağıda verilmiştir [113].

- Amino ve Süldifril Grubuna Yönelen Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri
- Karbonil ve Sülfidril Grubuna Yönelen Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri
- Amino Grubuna Yönelen ve Fotoreaktif Grup İçeren Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri
- Sülfidril Grubuna Yönelen ve Fotoreaktif Grup İçeren Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri
- Karbonil Grubuna Yönelen ve Fotoreaktif Grup İçeren Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri
- Karboksil Grubuna Yönelen ve Fotoreaktif Grup İçeren Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri
- Arjinin Grubuna Yönelen ve Fotoreaktif Grup İçeren Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri
- Amino ve Karboksil Grubuna Yönelen Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri

#### **2.5.5 Direkt (Zero-Length) Çapraz Bağlayıcılar**

Çapraz bağlayıcıların diğer bir grubu ise zero-length olarak da bilinen direkt çapraz bağlama reaktifleridir. Bu alt gruptaki bağlayıcılar iki molekül arada herhangi bir grup ya da atom olmaksızın birbirine bağlamakta yani ilk moleküldeki bir atom diğer

moleküle kovalent olarak bağlanırken arada hiçbir arabulucu ya da bağlayıcı bulunmamaktadır. Ancak birçok konjugasyon reaksiyonu elde edilen konjugattaki moleküller birbirlerine bağlanırken yapıya yabancı bir madde girmiştir ve bu madde konjugatın kullanılmak istendiği yere göre zararlı olabilmektedir. Örneğin peptid-protein konjugatları, taşıyıcı proteine bağlanmış olan peptide karşı immun cevap oluşumu amacı ile sentezlenmiştir. Bazı durumlarda oluşturulan antikorların bir kısmı, konjugasyon reaksiyonunda kullanılan çapraz bağlayıcı ajanlara spesifiktir. Direkt çapraz bağlama reaktifleri iki molekülü birbirlerine arada bir arabulucu ya da bağlayıcı bulunmadan direkt bağladığı için bu tür istenmeyen antikor oluşumlarını engellemektedirler [112].

Bu tür çapraz bağlayıcılar;

- Primer amino grubu ile karboksilik asid grubunu, kondenzasyon reaksiyonu sonucu amid bağı oluşturarak,
- Organik fosfat grubu ile primer aminleri fosfoamid bağı üzerinden ya da,
- Aldehidler ile primer veya sekonder amino gruplarını Schiff bazı oluşturarak ve bu bileşiğin indirgenmesi sonucu sekonder ya da tersiyer amin bağları ile bağlamaktadır.

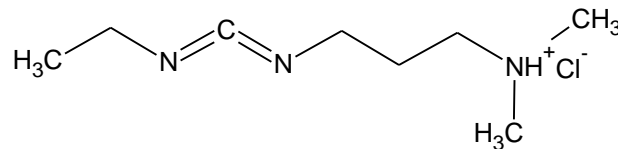
### **2.5.6 Karbodiimidler**

Peptid-protein, protein-protein ve peptid-polimer konjugatlarının oluşturulmasında kullanılan direkt çapraz bağlama reaktifleri arasında en çok tercih edilen karbodiimidlerdir. Suda çözünebilir ve çözünemeyen formlarının bulunduğu karbodiimidler; karboksilat ve primer aminlerin amid bağı ile, fosfat ve amino gruplarının ise fosfoamid bağı ile bağlanmasına arabuluculuk ederler. Suda çözünebilir özellikteki karbodiimidler daha çok biyokimyasal konjugasyonlarda tercih edilmektedir çünkü biyolojik kökenli birçok makromolekül sulu tampon çözeltilerde çözünmektedir. Sadece karbodiimidler değil aynı zamanda yan ürünler olan üre türevleri de suda çözünen özellikte olduğundan konjugatın saflaştırılmasında kolaylık sağlamaktadır. Bunun yanı sıra suda çözünemeyen özellikteki karbodiimidler genel olarak peptid sentezinde ve moleküllerin sadece organik çözücülerde çözünmesi gereken

biyokonjugasyon reaksiyonlarında kullanılmaktadır. Bu reaksiyonlarda meydana gelen ürünler ve yan ürünler de sadece organik çözücülerde çözünebilmekte suda çözünmemektedir [112].

### 2.5.6.1 EDC

EDC ya da EDAC adı ile bilinen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür biyolojik moleküllerin konjugasyonunda en sık kullanılan karbodiimid türevidir. Suda çözünebilir özelliği çapraz bağlayıcıyı reaksiyon ortamında daha önce bir organik çözücüde çözme zorunluluğu olmadan direkt olarak ekleme imkanı sunmaktadır. Karbodiimidin fazlası ve çapraz bağlama reaksiyonunun yan ürünü olan üre türevleri suda çözünebilir olduğundan diyaliz ya da jel filtrasyon ile kolayca ortamdaki uzaklaştırılabilir ve elde edilen konjugatlar saflaştırılabilir [114, 115]. Ancak EDC suyun varlığında kararlı olmadığından  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmalı, kullanılacağı zaman oda sıcaklığına getirilmeli ve öyle açılmalıdır. EDC'nin küçük miktarlarını reaksiyon ortamına eklemek için suda stok çözeltisi hazırlanabilmektedir ancak bu çözeltinin kimyasal aktivitesini kaybetmemesi için oldukça çabuk hazırlanması ve kısa sürede kullanılması gerekmektedir. Şekil 2.16'da EDC molekülünün kimyasal yapısı gösterilmektedir.



Şekil 2. 16 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür molekülünün kimyasal yapısı [50]

Primer amin ve karboksil grupları içeren birçok molekülün EDC kullanılarak konjugasyonu gerçekleştirilebilmektedir [116-119]. Konjugat oluşum prosesinde öncelikle N-substitue karbodiimidler (karbon atomuna komşu iki azot atomu karbona göre daha elektronegatif olduğundan karbon atomu  $\delta^+$  yüklenir ve karboksilat anyonunun saldırması için oldukça uygun bir yapı oluşur) karboksilik asitler ile reaksiyona girerek oldukça reaktif olan O-açilisoüre ara ürününü oluştururlar. Sonrasında bu aktif ara ürün primer amin gibi nükleofil özellikteki gruplar ile reaksiyona girerek amid bağı üzerinden konjugat oluşumunu gerçekleştirir [120]. Reaksiyon esnasında herhangi başka bir nükleofil de reaktif olabilmektedir. Örneğin sülfidril

grupları ara ürüne saldırabilmektedir ancak oluşan tiyoester bağı amid bağı kadar kararlı değildir.

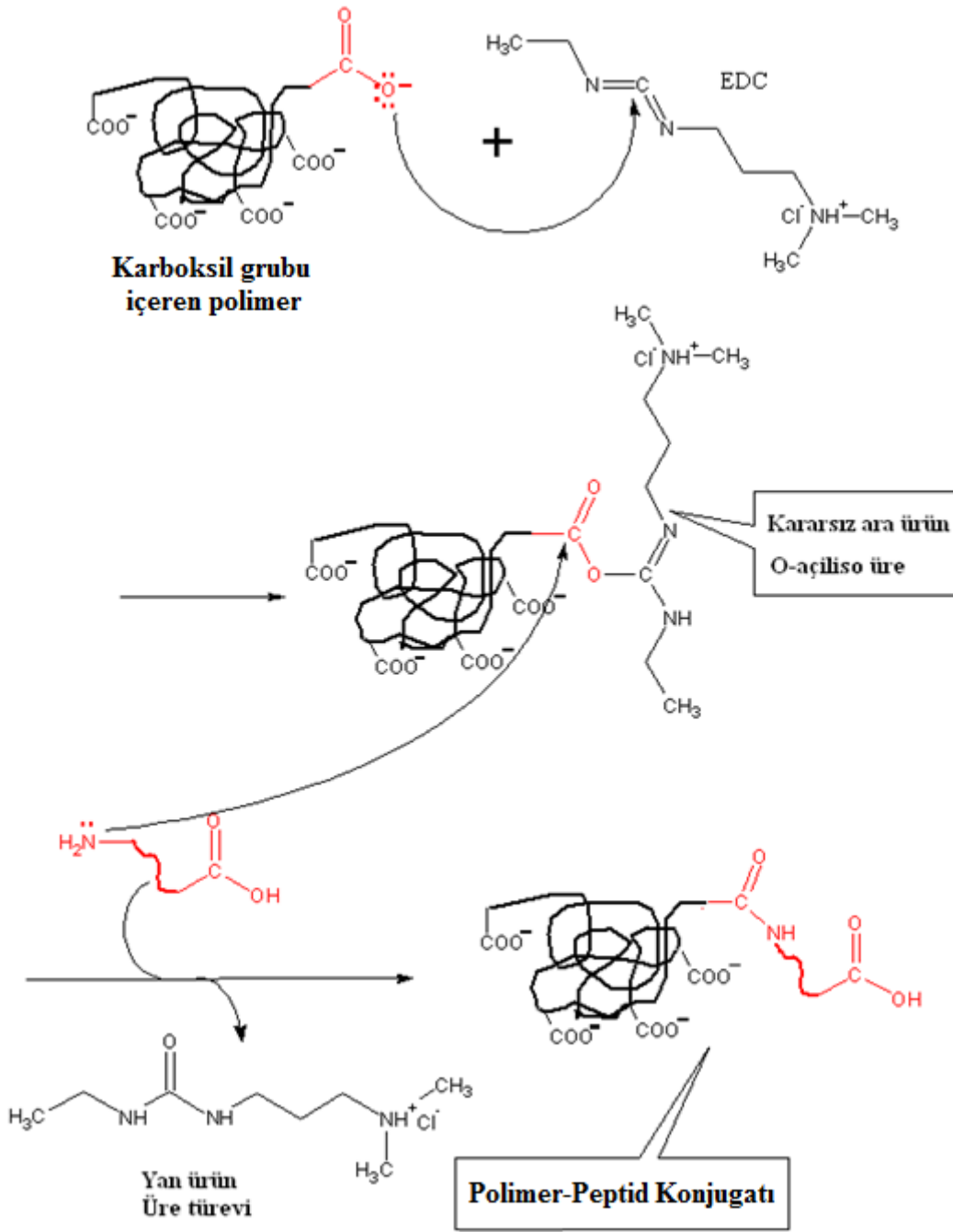
Ancak EDC peptidlerin polimerlerle konjugasyonu sırasında moleküllerin kendi içerisinde polimerizasyonu da söz konusudur. Örneğin peptid molekülü hem karboksil grubu hem de amino grubu içerdiğinden karbodiimid tarafından aktive edilen karboksil grubunun oluşturduğu kararsız ara ürüne yine peptid molekülünün amino grubu saldırabilmekte ve peptid-polimer konjugatının yanı sıra peptidin oligomerlerinin oluşumu da söz konusu olabilmektedir. Birçok çalışmada karbodiimidler için referans edilen optimum pH aralığı 4,7 ile 6'dır.

Genel olarak EDC kullanılarak amino ve karboksil grupları içeren küçük peptid vb. moleküllerin polimer veya proteinler ile konjugasyonu aşağıda verilen protokole göre yapılmaktadır. Protokol pH, kullanılan tampon, reaksiyona giren peptid ya da proteinin oranı, EDC'nin oranı değiştirilerek modifiye edilebilir. Bazı durumlarda ise protokol elde edilen konjugatın çözünürlüğünü ya da aktivitesini kaybetmemesi için modifiye edilmektedir. Örneğin hidrofobik bir peptidin protein yüzeyine kovalent konjugasyonu sırasında kısmi ya da tümüyle çökme problemi oluşabilmektedir. Bu problem EDC miktarının ya da ortama ilave edilen hidrofobik peptid miktarının düşürülmesi ile azaltılabilmektedir [112].

- Modifiye edilecek polimer suda ya da fosfat tamponunda çözünür.
- Konjugasyon yapılacak olan peptid de aynı çözücüde çözünür. Eğer belirli oranlar ile çalışılmıyor ise küçük molekül, reaksiyon ortamına polimerin en az 10 katı molar konsantrasyonda olacak şekilde eklenir. Eğer mümkün ise peptidin gereken miktarı direkt olarak polimer çözeltisine ilave edilir. Az miktarlar ile çalışılacak ise peptidin stok çözeltisi hazırlanarak bundan reaksiyon için gereken miktar kullanılabilir.
- Eğer peptid çözeltisi ayrı olarak hazırlandı ise polimer çözeltisine eklenir.
- Çözeltideki polimerin molar konsantrasyonunun 10 katı olacak şekilde ortama EDC ilave edilir. Eğer düşük miktarda EDC kullanılacak ise hemen tüketilmek kaydı ile karbodiimidin stok çözeltisi hazırlanır ve gereken miktar bu çözeltiden eklenir.

- 2 saat oda sıcaklığında reaksiyon için bırakılır.
- Elde edilen konjugat jel filtrasyon ile ya da uygun bir tampon kullanılarak [birçok konjugat için 0.1 M sodyumfosfat tamponu (0.15 M NaCl, pH = 7.4) tercih edilir] diyaliz ile saflaştırılır. Eğer konjugasyon sırasında herhangi bir bulanıklık gözlenirse bu reaksiyon bitiminde santrifüj ile uzaklaştırılabilir. Ancak EDC ile immunojen konjugatların oluşturulması sırasında oluşan bu bulanıklık genel olarak sorun yaratmamaktadır. Çünkü çökelti halindeki bu immunojenik konjugatlar suda çözünebilir olanlarına göre daha yüksek immunojenlik göstermektedir [112].

EDC çapraz bağlayıcısı kullanılarak peptid molekülünün karboksilik asit grubu içeren polimerlere kovalent olarak bağlanması sonucu biyokonjugatların sentezlenmesine ait reaksiyon mekanizması Şekil 2.17'de gösterilmiştir.



Şekil 2. 17 EDC kullanılarak sentezlenen Polimer-Peptid konjugatı reaksiyon mekanizması [50]

### 2.5.6.2 EDC Plus Sülfö-NHS

Suda çözünabilir özellikteki karbodiimidler; karboksil grubu ile aktif ester ara ürünü oluşturmak için suda çözünebilir sülfö-NHS ile birlikte kullanılırlar. Önce karbodiimid ile karboksil grubunun reaksiyonu sonucu O-açilisoüre kararsız ara ürünü oluşur sonrasında sülfö-NHS ile bu ara ürünün reaksiyonundan sülfö-NHS ester ara ürünü



oluşur ve bu ara ürünün primer amino grubu ile reaksiyona girmesi sonucu amid bağı üzerinden ile konjugat elde edilir.

### 2.5.6.3 CMC

Suda çözünebilir özellikteki 1-Siklohegzil-3-(2-morfolinetil) karbodiimid, karboksil ve amino grubu içeren moleküllerin konjugasyonunda kullanılmaktadır. Moleküle suda çözünebilme özelliğini sağlayan yapısındaki pozitif yüklü morfolin grubudur.

### 2.5.6.4 DCC

Disiklohegzilkarbodiimid özellikle organik sentez uygulamalarında oldukça sık kullanılan bir çapraz bağlayıcıdır. 1955 yılından beri peptid sentezinde kullanılmakta ve halen de kullanımında devam edilmektedir. DCC organik çözücülerde çözünebilir özelliktedir ve 80 °C'a kadar olan sıcaklıklarda kullanılabilir.

### 2.5.6.5 DIC

Diizopropilkarbodiimid suda çözünmeyen özellikteki ve oda sıcaklığında sıvı olarak bulunan diğer bir karbodiimid çeşididir.

### 2.5.6.6 N,N-Karbonildiimidazol

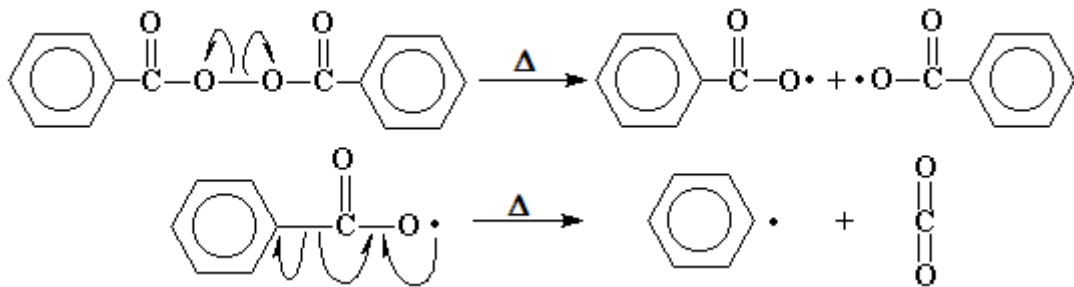
N,N-karbonildiimidazol yapısında konjugasyon sırasında ayrılan iki adet açilimidazol grubu taşıyan diğer bir direkt çapraz bağlama reaktifidir [112].

## 2.6 Radikal Zincir Polimerizasyonu

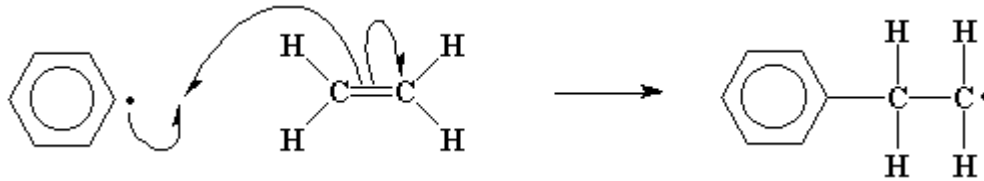
Katılma polimerizasyonun en önemli tiplerinden biri çiftleşmemiş elektron içeren elektriksel olarak nötral serbest radikallerle başlatılan **Radikalik Zincir Polimerizasyonu**'dur. Çiftleşmemiş elektronu bulunan bileşiklerden faydalanılarak yapılan bu polimerizasyon türünde monomerler doğrudan büyümekte olan aktif zincire katılarak polimer yapısını oluştururlar. Bu yöntemde radikaller genel olarak katalizör yada başlatıcılar ile bazende ısı, ışın gibi fiziksel etkenlerle karasız maddelerin parçalanması sonucu oluşmaktadır. Karbon-karbon çifte bağı görece olarak düşük kararlılığa sahip olması nedeniyle, özellikle serbest radikallerle kolayca tepkime

verebilmektedir [121]. Serbest radikaller üzerinden yürüyen polimerizasyon; Başlama, Büyüme (Çoğalma) ve Sonlanma olmak üzere başlıca üç basamaktan oluşmaktadır. Reaksiyon basamakları etilen monomerinin polimerleşmesi üzerinden anlatılacaktır.

**Başlama Basamağı:** Bu basamakta monomer molekülleri kimyasal veya fiziksel yolla aktifleştirilerek radikal haline dönüştürülür. Bu basamak başlangıç aktivitesinin oluşturulduğu bir basamak gibi düşünülebilir. Bu basamağın gerçekleştirilmesi için izlenen en yaygın yöntem sisteme dışarıdan başlatıcıların ilave edilmesidir. En yaygın kullanılan başlatıcılardan biri olan benzoilperoksit 60 °C - 90 °C sıcaklık aralığında Şekil 2.18'deki reaksiyona göre parçalanmakta ve oluşan radikal monomere saldırarak radikalik reaksiyonu başlatmaktadır (Şekil 2.19).

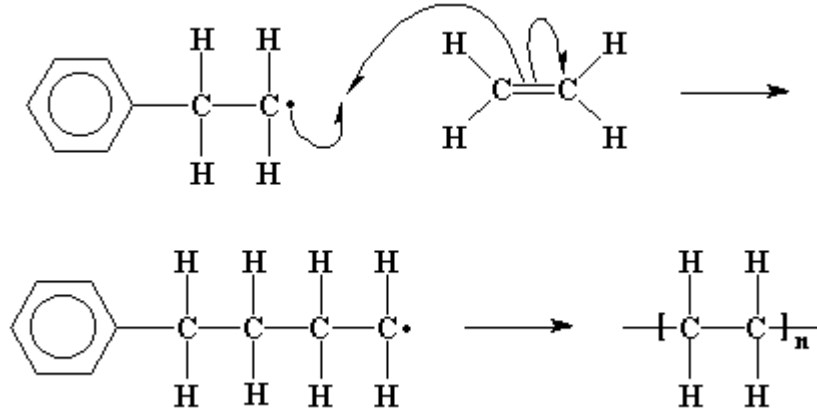


Şekil 2. 18 Benzoilperoksit başlatıcısının ısı ile parçalanma reaksiyonu [122]



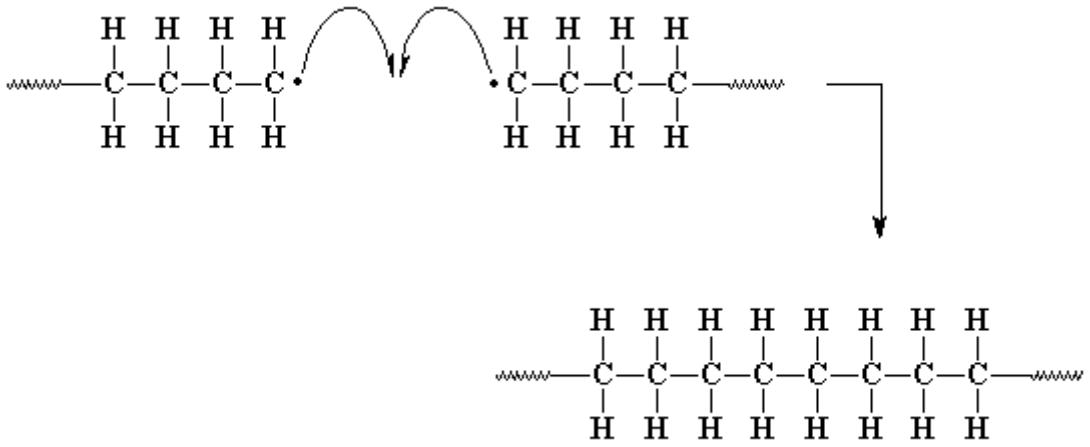
Şekil 2. 19 Radikal molekülünün monomere bağlanması [122]

**Büyüme (Çoğalma) Basamağı:** Başlama basamağında oluşan monomer radikaline diğer monomerlerin katılması ile radikal zincirinin büyümesi aşamasıdır (Şekil 2.20). Reaksiyonun ilerlemesi; monomerin aktif zincirle birleşmesiyle gerçekleşmektedir.

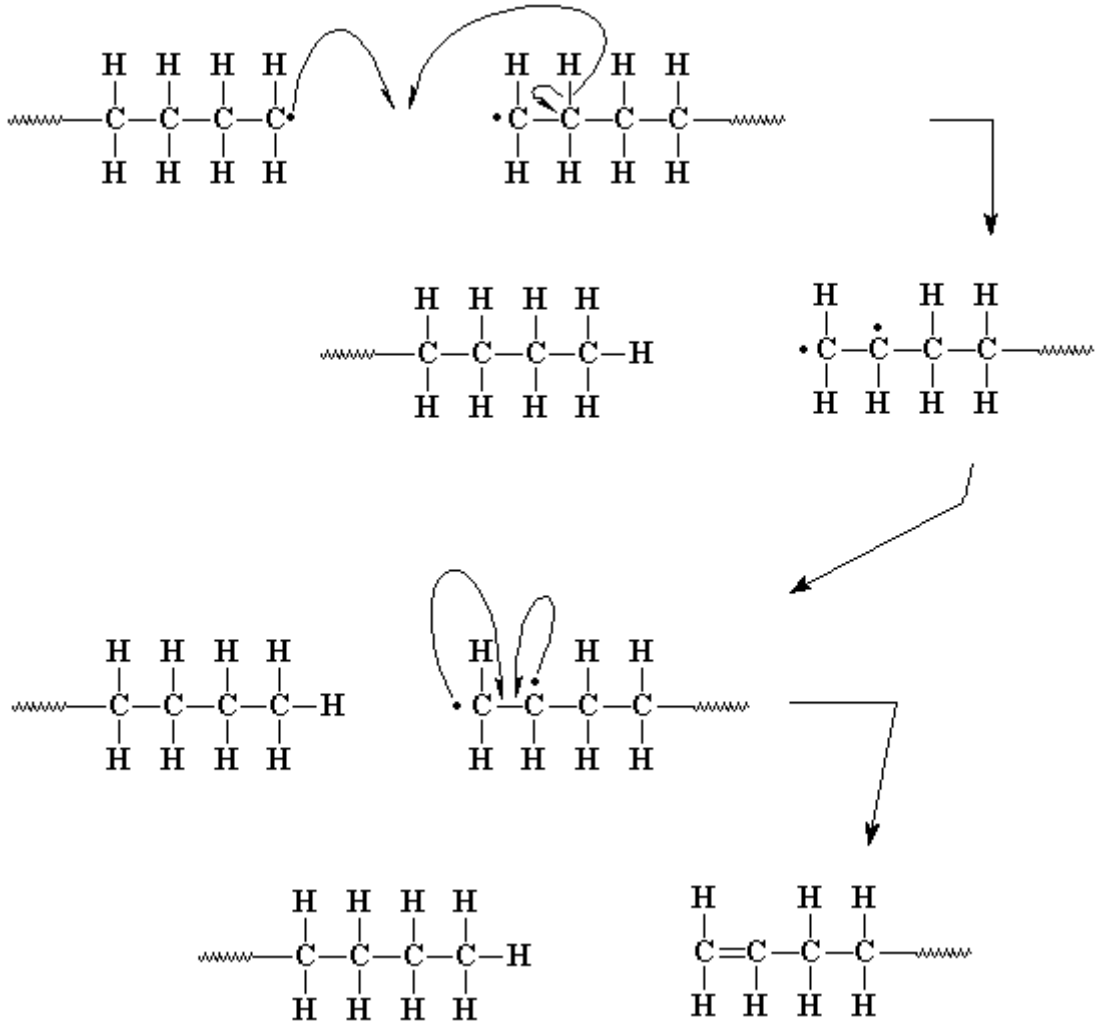


Şekil 2. 20 Radikal zincire monomerlerin katılması [122]

**Sonlanma Basamağı:** Büyümekte olan polimer zincirlerinin çoğalmasının durduğu yani aktif radikallerin söndüğü sonlanma basamağında radikal zincirleri birbirleri ile birleşerek orantılı olarak (Şekil 2.21) ya da kendi içerisinde yeniden düzenlenme ile orantısız olarak (Şekil 2.22) reaksiyonu sonlandırmaktadır.



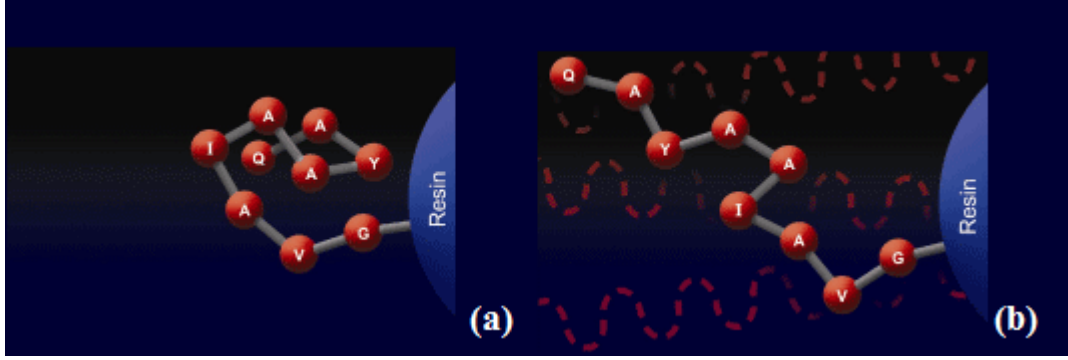
Şekil 2. 21 Aktif radikal zincirlerinin birbirine katılarak orantılı sonlanması [122]



Şekil 2. 22 Aktif radikal zincirlerinin orantısız sonlanmaları [122]

## 2.7 Mikrodalga Destekli Katı Faz Peptid Sentezi (SPPS)

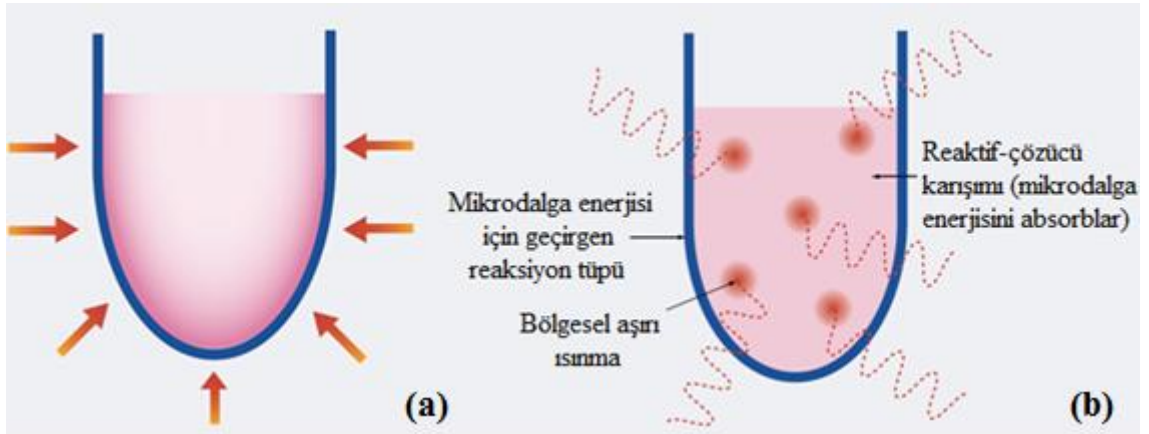
R. Gedye ve R. J. Majetich tarafından 1986 yılında organik kimyada ilk kez kullanılan mikrodalga teknolojisi ile reaksiyonların geleneksel ısıtma yöntemine göre çok daha hızlı ilerlediği gösterilmiştir. Mikrodalga elektromanyetik spektrumunda X-ışınları, UV-görünür bölge ve IR' den daha az enerjili bölgede yer almaktadır ve 300-300.000 MHz frekans aralığındadır. Mikrodalğanın frekansı, yani enerjisi, çok düşük olduğu için bağları kırmadan sadece dönmelerine sebep olmaktadır. Böylece moleküllerin daha lineer olarak yönlenmesi gerçekleşmekte (Şekil 2.23) ve agregasyon minimize edilirken yeni bağlanacak aminoasidin büyüyen zincirin ucuna bağlanması kolaylaşacaktır.



Şekil 2. 23 Geleneksel ısıtma (a) ve mikrodalga enerjisi (b) ile peptid sentezinde moleküllerin yönlendirilmesi [123]

Normal ısıtma sistemlerinde, önce ısıtıcı ısınmakta, bu enerji reaksiyon kabına aktarılmakta, reaksiyon kabı da tüm sistemin sıcaklıkları eşit olana kadar ısı enerjisini reaksiyon çözeltisine aktarmaktadır. Mikrodalga yönteminde ise örnek reaksiyon kabı tarafından değil doğrudan mikrodalga ışınları tarafından ısıtılmaktadır (Şekil 2.24). Bunun ise iki faydası bulunmaktadır:

- Reaksiyon karışımına daha etkin bir enerji aktarımı olmaktadır.
- Reaksiyon kabının ortasındaki ve kenarındaki bileşenler eşit miktarda enerjiye maruz kalmaktadır [124].



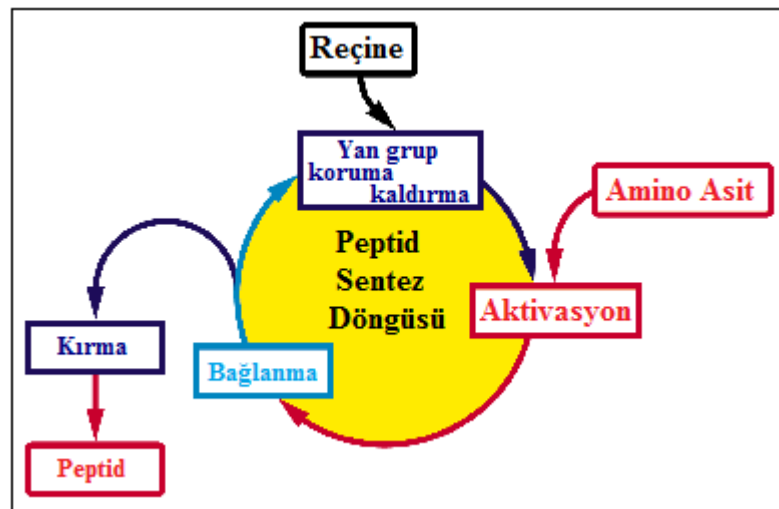
Şekil 2. 24 Geleneksel ısıtma yöntemi ile mikrodalga ısıtma yönteminin karşılaştırılması [125]

Mikrodalgayla enerji transferi çok hızlı gerçekleştiğinden enerjiye maruz kalan moleküllerin durulması için gerekli süre dolmadan moleküller tekrardan enerjiye maruz kalırlar. Böylece moleküller reaksiyonun gerçekleşmesi için gerekli aktivasyon enerjisini kazanırlar ve reaksiyon çok daha kısa sürede tamamlanır [126]. Mikrodalga enerjisinin

hem reaksiyon ortamını homojen olarak ısıtılması, hem de reaksiyon süresini kısaltması gibi avantajlarından dolayı yapılan çalışmalarda bu yöntem peptid sentezi üzerine de uygulanmıştır. J. K. Murray ve S. H. Gellman'ın yaptıkları bir çalışmada mikrodalga yönteminin peptid sentezi üzerine etkileri araştırılmış ve mikrodalga enerjisinin daha fazla miktarda ve daha yüksek saflıkta peptid sentezine olanak sağladığı gösterilmiştir [127].

Temel olarak proteinlerin küçük versiyonları olan peptidler birbirlerine amid bağları ile bağlı aminoasit zincirleri olarak tanımlanmaktadır [128]. 1962'de peptidlerin çözünmeyen katı bir destek materyali (Reçine) üzerinde sentezini araştıran Merrifield çalışmaları bugünkü katı faz peptid sentezi yönteminin temelini oluşturmaktadır [129]. Biyokimya, tıp kimyası ve fizyoloji gibi temel bilimlerde her geçen gün daha önemli hale gelen biyomoleküller olan peptidlerle ilgili araştırmalarda son 10 yılda büyük artış olmuştur [130]. Bir polimer destek maddesi (Reçine) üzerinde yürüyen katı faz peptid sentezinde kullanılan polimerik destek maddeleri aslında bir katıdan çok, jeldir [127].

Katı faz peptid sentezi için temel olarak iki yöntem kullanılmaktadır. Bunlar t-Boc ve Fmoc yöntemleridir. t-Boc yönteminde Hidrojen florür (HF) kullanılması uygulama alanını daraltmaktadır. Bu sebeple birçok laboratuvarında Fmoc yöntemiyle katı faz peptid sentezi gerçekleştirilmektedir.

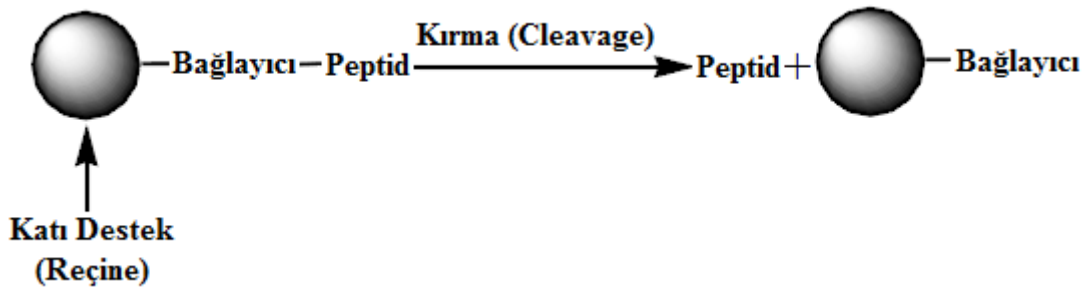


Şekil 2. 25 Peptid sentez döngüsünün basamakları [131]

Fmoc yönteminde, ilk olarak Fmoc korumalı amino asit reçine üzerine bağlanır. Ardından Fmoc koruma grubu piperidin ile amino asitten koparılır ve yıkama yapılır.

Diziye uygun bir şekilde bir sonraki Fmoc korumalı amino asit, aktivatörler ve aktivatör bazlarla beraber ortama eklenir. Aktivatörler amino asidin karboksil ucunu aktive ederek yeni amino asidin reçine üzerindeki amino asidin amino grubuna bağlanmasını sağlar. Tekrardan yıkama yapılır ve ortama piperidin eklenerek Fmoc koruma grubu uzaklaştırılır [127, 132]. Sonraki amino asitler de aynı işlem akışına göre birbirlerine bağlanırlar. Peptid sentez döngüsü Şekil 2.25’de basit olarak Şekil 2.27’de ise detaylı olarak gösterilmiştir.

Sentez bitiminde reçine üzerinde sentezlenen peptid cleavage çözeltisi ile muamele edilip reçineden ayrılır ve analiz edilmek üzere kurutulur (Şekil 2.26).



Şekil 2. 26 Kırtı faz peptid sentezinin genel gösterimi

P Kalıcı yan zincir koruma grubu

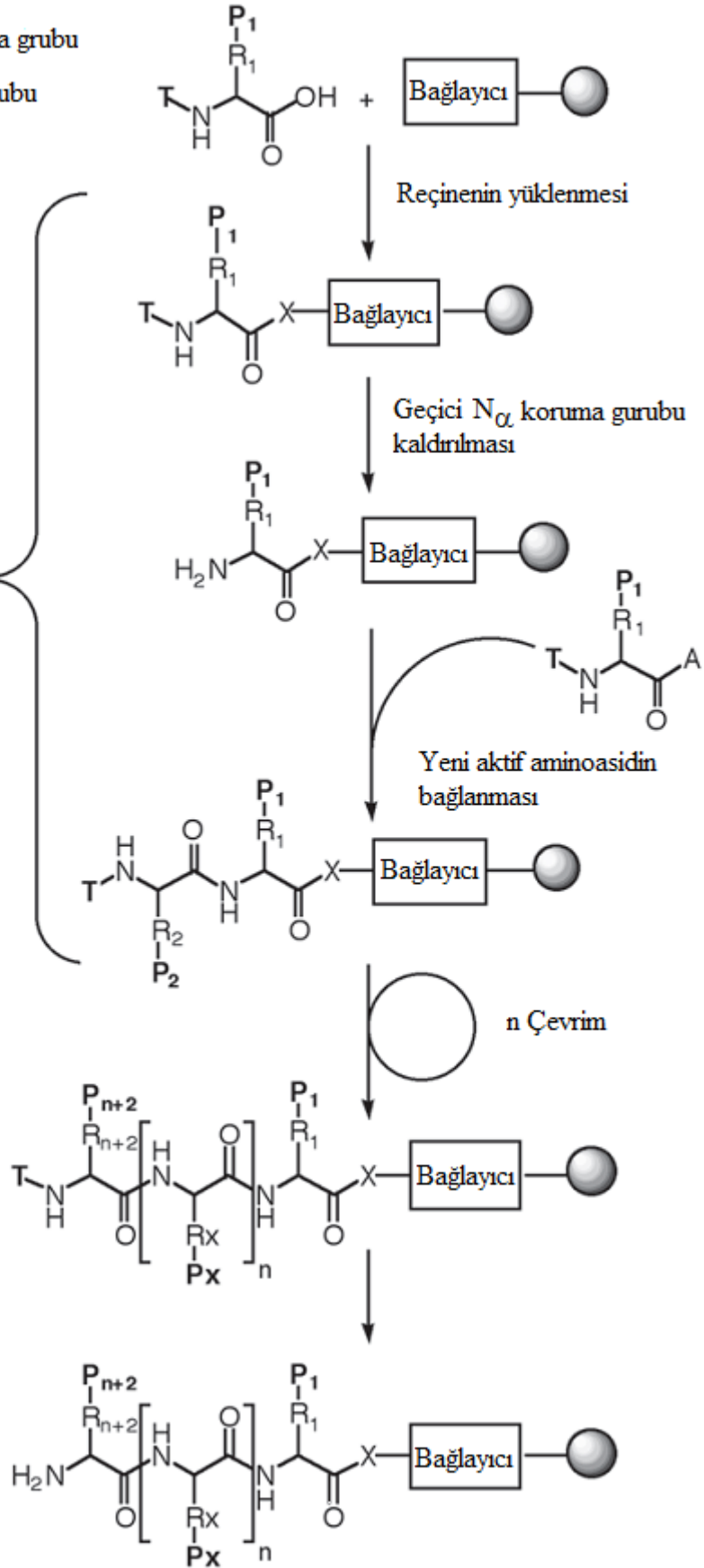
T Geçici  $N_{\alpha}$  koruma grubu

● Katı destek

A Aktivasyon grubu

X NH yada O

Katı Faz Peptid Sentezi  
(SPPS) Çevrimi



Şekil 2. 27 Katı faz peptid sentezinin şematik gösterimi [133]



### DENEYSEL ÇALIŞMALARDA KULLANILAN ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ

#### 3.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar

- Finnpiquette Micropipet (1-10 mL, 100-1000 µL, 5-50 µL)
- WTW pH level 1 pH metre
- Hanna Instruments pH 211
- Precisa XB 220A Terazi
- Sartorius CP 225D Hassas Terazi
- Hettich Eba20 Santrifüj Cihazı
- Heraeus Biofuge Stratos Santrifüj Cihazı
- Heildolph MR 3000 Manyetik Karıştırıcı
- Heildolph MR 3001 Isıtıcı Manyetik Karıştırıcı
- IKAMAG Çoklu Karıştırıcı
- Milipore-Q Gradient Ultra Saf Su Cihazı
- Liberty Mikro Dalga destekli Katı Faz Peptid Sentez Cihazı
- Milestone Microsynth Mikro Dalga Sentez Cihazı
- Jasco V-530 UV-VIS Spektrofotometre
- Shimadzu LC-MS 2010 EV

- Shimadzu Preparatif HPLC Sistemi (UV Detektörlü)
- Shimadzu HPLC Sistemi (UV Detektörlü)
- Viscotek 4 Detektörlü GPC (SEC) Sistemi (Viscotek TDA 302 üçlü detektör dizisi, Viscotek Model 2501 UV detektörü, Viscotek GPCmax VE2001 örnek modülü kısımlarından oluşur.)
- Malvern ZEN 3600 Zetasizer Nano ZS Zetapotansiyel ve Parçacık boyut ölçüm cihazı
- PTI QM-4/2003 Steady State Floresans Spektrofluorometre
- Shimadzu SPM 9600 Atomic Force Mikroskop
- Shimadzu IR-Prestige Fourier Transform Infrared Spektrofotometre
- JSM-5410 LV SEM Taramalı Elektron Mikroskop
- Olympus CKX41 Invert Mikroskop
- Multiskan Ascent 354 Mikroplaka Okuyucu

### 3.2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasalların isimleri, alındıkları firmalar ve katalog numaraları Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3. 1 Deneysel çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin özellikleri

Kimyasalın Adı	Alındığı Firma	Katalog No
Canine Parvovirus Sentetik peptid (W-1L19)	Caslo Lab.	
Bovin serum albumin, (BSA)	Sigma	A-4503
1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid (EDC)	Sigma	E-7750
Sodyum dihidrojen fosfat, (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Riedel-de Haën	04361
Sodyum hidrojen fosfat, (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	Fluka	71647
Sodyum klorür, (NaCl)	Fluka	71376

Çizelge 3. 1 (devam) Deneysel çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin özellikleri

<b>Kimyasalın Adı</b>	<b>Alındığı Firma</b>	<b>Katalog No</b>
Sodyum hidroksit, (NaOH)	Fluka	06203
Hidroklorik asit, (HCl)	Riedel-de Haën	07102
Sodyum azid, (NaN <sub>3</sub> )	Applichem	A1430
Alanin (Ala), Arginin (Arg), Asparagin (Asn), Aspartik Asit (Asp), Glutamin (Gln), Glutamik Asit (Glu), Glisin (Gly), Prolin (Pro), Triptofan (Trp), Valin (Val) Amino asitleri	Fluka	
Piperidin	Merck	8.22299.2500
N-Hidroksibenzotriazol (HOBt)	Fluka	54804
N,N-Diisopropiletilamine (DIEA)	Sigma-Aldrich	D125806
N-Metil-2-pirrolidon (NMP)	Sigma	M6762
Diklorometan (DCM)	Riedel-de Haen	24233
Dimetilformamid (DMF)	Fluka	40255
Thioanisol	Fluka	88470
Trifluoroasetikasit (TFA)	Fluka	91700
O-Benzotriazole-N,N,N',N'-tetrametil-uronyum-hekzafluoro-fosfat (HBTU)	Fluka	12804
1,2-Etan ditiol (EDT)	Aldrich	398020
Fmoc-Ala-Wang resin LL (Recine)	Novabiochem	04-12-2074
Fmoc-Ala-OH	Aldrich	531480
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	Fluka	47616
Fmoc-Asn(Trt)-OH	Fluka	47672
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	Fluka	47618

Çizelge 3. 1 (devam) Deneysel çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin özellikleri

Kimyasalın Adı	Alındığı Firma	Katalog No
Fmoc-Gln(Trt)-OH	Fluka	47674
Fmoc-Glu(OtBu)-OH	Fluka	47625
Fmoc-Gly-OH	Fluka	47627
Fmoc-Pro-OH	Fluka	47636
Fmoc-Trp(Boc)-OH	Fluka	47561
Fmoc-Val-OH	Fluka	47638
Dietileter	Riedel-de Haen	24005
Polivinilalkol (PVA)	Aldrich	363073
Poli-Laktik-ko-Glikolik Asit (PLGA)	Aldrich	719900 Mw=38000-54000
Poliakrilikasit (PAA)	Aldrich	52392-5
Karboksümetilselülaz (CMC) Sodyum Tuzu	Aldrich	419273
3-(4,5-dimetil triazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma	M 5655
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich	41640

### 3.3 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler

#### 3.3.1 Asetat Tamponu

5,72 ml asetik asit, ultra saf su ile 2 lt'ye tamamlandı. Bir süre manyetik karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra 17,53 g NaCl eklendi ve karıştırmaya devam edildi. 1M NaOH ile pH 4'e ayarlandı.

#### 3.3.2 0,01 M 'lik PBS Tamponu (pH=7)

2,6807g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (Mw=268,07 g/mol) tartılarak 500ml ultra saf suda çözüldü. Ayrı bir erlende 1,56g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (Mw=156,01 g/mol) tartılarak 400 ml ultra saf

suda çözüldü. Hazırlanan 400 ml'lik  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  çözeltisi 1 L'lik balon joje içerisindeki  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  çözeltisinin üzerine eklendi ve karıştırıldı. Bu karışıma son olarak 8,766 g NaCl eklenir ve karıştırmaya devam edildi. Çözeltinin pH'ı ölçüldü ve pH=7'ye ayarlandı. Ultra saf su kullanılarak çözeltinin son hacmi 1 L'ye tamamlandı.

### **3.3.3 % 2,5'lik PVA Çözeltisi**

2,5 g polivinil alkol tartıldı ve üzerine 100 ml ultra saf eklenip homejen çözelti elde edilene kadar karıştırıldı.

### **3.3.4 % 0,5'lik PVA Çözeltisi**

0,5 g. polivinil alkol tartıldı ve üzerine 100 ml ultra saf eklenip homejen çözelti elde edilene kadar karıştırıldı.

## **3.4 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Ölçüm Yöntemleri**

### **3.4.1 GPC (Jel Geçirgenlik-Moleküler Eleme Kromatografisi)**

Kromatografi çeşitli biyolojik ve kimyasal moleküllerin incelenmesi için kullanılan fizikokimyasal bir yöntemdir. Kromatografi metodu, bileşenlerin kalibre edilmiş ve silikajel, çapraz bağlı polimer gibi özel dolgu maddeleri ile doldurulmuş kromatografik kolon içerisinde geçerken ayrılması temeline dayanmaktadır [134].

Moleküler Eleme Kromatografisi peptid, polimer yada protein gibi bileşenlerin fiziksel etkileşimler doğrultusunda; molekül ağırlığı, boyutu ve şekli temel alınarak sıvı kromatografi ile ayrılmasında kullanılmaktadır.

Çalışmamızda kullanılan peptid, protein, polimer gibi moleküllerin molekül ağırlıkları ve boyutları birbirlerinden farklıdır. Çalıştığımız sentetik peptid dizileri, protein ve polimerlerden çok daha küçük bir molekül boyutuna sahiptir. Bu şekilde farklı boyutlardaki moleküllerin karışımından oluşan çözeltide her bir molekülün hidrodinamik çapı ve hidrodinamik hacmi birbirlerinden farklı olacaktır. Konjugat karışımımızda bulunan serbest peptid, ya da üre türevi gibi küçük moleküller gözeneklerde daha uzun kalacakları için kolondan daha geç çıkacaklardır. Oysa molekül çapı çok daha büyük olan polimer gibi moleküllerin gözenekler ile etkileşimi çok daha

az olacağından kolonda daha kısa süre kalacak ve sistemden daha çabuk çıkacaktır. Bu şekilde molekül çapı büyüdükçe kolonda kalma süresi buna ters orantılı olarak azalacaktır. Sistemi terk eden moleküller ise UV, Vizkozite, ışık saçılması ya da RI detektörlerinde saptanacak ve sinyale dönüştürülerek kromatogram elde edilecektir.

### 3.4.2 Floresans Spektroskopisi

Spektroskopi, elektromagnetik dalga ile moleküllerin etkileşmesini inceleyen deneysel tekniklerin başında gelmektedir. Floresans spektroskopisi ise absorpsiyon spektroskopisine benzemektedir ve maddenin floresans özelliği üzerine kurulmuştur. Floresans spektroskopisi ile birçok madde milyonda birin altındaki hassaslıkla tayin edilebilir. Floresans spektroskopi yöntemi yüksek seçicilikte çalışmaktadır ancak, floresan özellik gösteren madde sayısının az olması yöntem için bir dezavantaj oluşturmaktadır. Proteinlerin ve peptidlerin yapısında bulunan amino asitlerden floresans özellik gösteren Triptofan, Tirozin ve Fenilalaninden Triptofan en yüksek floresansa sahiptir.

Çalışmamızda kullanılan sentetik peptidlerinin dizilimlerinde Triptofan bulunmamaktadır. Ancak konjugasyon mekanizmasının ve oluşumunun floresans spektroskopisi ile saptanabilmesi için sentezlenen peptid dizilerinin N- ucuna Trp aminoasidi eklenmiştir.

Serbest haldeki peptid dizisinde daha açıkta olan Trp sulu ortamla etkileşim içerisindedir ve daha düşük enerjili ışığa ile uyarılabilmektedir. Konjugasyon gerçekleşip Trp sulu ortamdan uzaklaşıp daha içeriye hidrofobik bölgeye girdikten sonra uyarma için gereken enerji artacaktır.

$$E = \frac{hc}{\lambda} \quad (3.1)$$

Eşitlikte de görüldüğü üzere uyarma için gereken enerjinin artması dalga boyunun küçülmesine yani  $\lambda_{\max}$  değerinde daha küçük dalga boyuna doğru kaymasına (blue shift) neden olacaktır. Uyarıldığı dalga boyu kayan molekülün yaptığı floresans ışığının  $\lambda_{\max}$  değeri de buna bağlı olarak küçülecek ve blue shift verecektir.

Çalışmamızda öncelikle serbest peptidin  $\lambda_{\max}$  değerleri floresans spektrumları alınarak saptanmıştır sonrasında elde edilen konjugatlarımızdaki Trp'in konformasyon değişikliğine bağlı olarak değişen  $\lambda_{\max}$  değerleri saptanış ve gözlenen kaymalar yardımı ile konjugasyon oluşumu incelenmiştir.

### 3.4.3 Boyut ve Zeta Potansiyel Ölçümleri

En az bir boyutu 1nm–1 $\mu$ m arasında olan peptid, polimer, protein gibi katı bir maddenin sıvı bir çözücü içinde çözünmesiyle oluşan koloidal sisteme koloidal süspansiyon denir. Koloidal sistemlerin doğalarını gösteren en önemli özelliklerden ikisi, partikül boyutu ve yüzey özellikleridir.

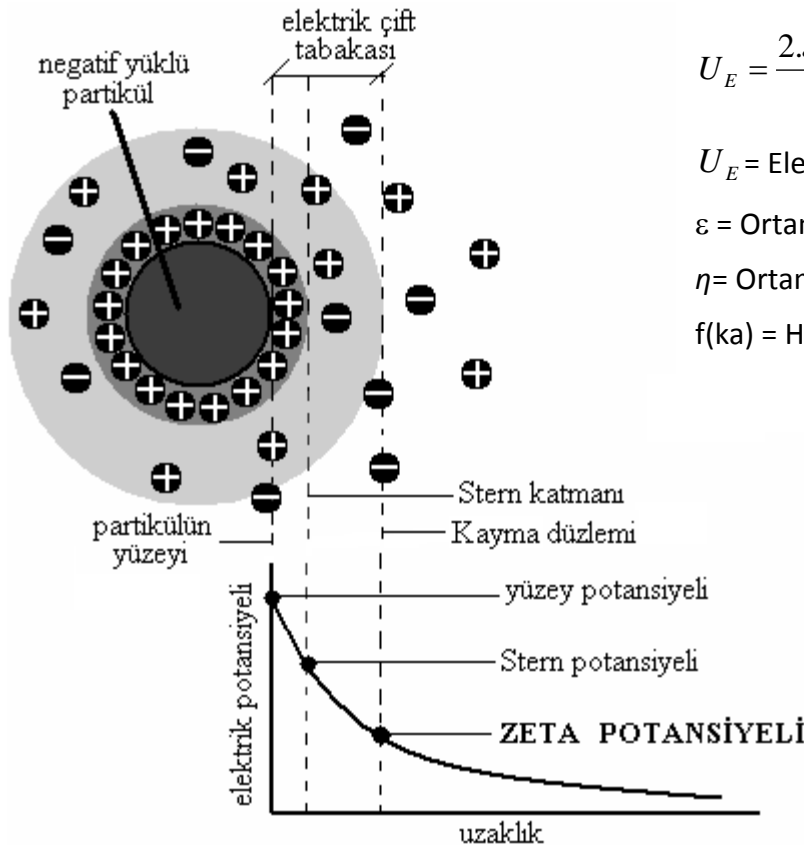
Peptid, protein, polimer çözeltilerinin ya da bunların karışımlarının ortalama boyut analizlerinde Zetasizer Nano ZS cihazında; 633 nm dalga boyunda 4,0 mV He-Ne lazer kullanılarak 25 °C'de Foton Kolerasyon Spektroskopisi Yöntemi uygulanarak ölçüm yapılmaktadır. Vizkozitenin 0,8872 cP ve kırılma indisinin 1.33 olarak alındığı ölçümlerde tüm çözeltiler 0,22  $\mu$ m'lik membranlardan filtre edilerek analiz edildi. Bir korelatör tarafından kaydedilen zaman ölçümlerinden  $G_2(\tau)$  saçılma şiddetine ait otokorelasyon fonksiyonu bulunur, bu fonksiyona en iyi uyan 3. dereceden polinom saptanır, polinomun katsayılarından translasyonel difüzyon katsayısı D ve polidisperseite sabiti hesaplanır. Boyut değeri, Stokes-Einstein denkleminde bulunur.

$$D = \frac{k.T}{3.\pi.\eta.R} \quad k = \text{Boltzman Sabiti, } T = \text{Mutlak sıcaklık, } \eta = \text{Çözücü vizkozitesi} \quad (3.2)$$

Peptid, protein, polimer çözeltilerinin ya da bunların karışımlarının Zeta Potansiyel analizlerinde ise Zetasizer Nano ZS cihazında bir kapiler hücre içerisinde Lazer Doppler Elektroforez (LDE) tekniği uygulanarak ölçüm yapılmaktadır. Vizkozitenin 0,8872 cP, dielektrik sabitinin 79;  $f(ka)$ 'nın 1.50 (Smoluchowski) olarak alındığı 25°C'de ki ölçümlerde tüm çözeltiler 0,22  $\mu$ m lik membranlardan filtre edilerek analiz edilmiştir.

Çalışmamızda zeta potansiyel ölçümü için pH=7'de negatif yüklü olan PAA polimeri ve peptid molekülü temel alınmıştır. PAA-peptid biyokonjugat partikülleri ortamda bulunan iyonlarla girdiği elektrostatik etkileşim sonucu pozitif iyonları çekerken negatif

iyonları da iterek partikül yüzeyinin hemen dışında, pozitif iyonların yüzeye sıkı bağlı olduğu ve Stern katmanı denilen bir tabaka oluşturmaktadır. Stern katmanından sonra iyonların hareket edebildiği bir difüz bölgesi mevcuttur. Difüz bölgesinde; hayali olarak var olduğu düşünülen bir **Kayma düzlemi** vardır ve bu düzlemin içinde kalan pozitif iyonlar, partikülle birlikte hareket etmeye zorlanırken, dışında kalanlar ise bağımsız olarak hareket edebilmektedirler. Molekülün Stern katmanındaki elektrik potansiyeline **Stern potansiyeli**, kayma düzlemindeki elektrik potansiyeline ise **Zeta Potansiyeli** denmektedir ve Zeta Potansiyeli Henry denkleminde hesaplanmaktadır (Şekil 3.1).



$$U_E = \frac{2 \cdot \epsilon \cdot z \cdot f(ka)}{3 \cdot \eta} \quad (3.3)$$

$U_E$  = Elektroforetik hareketlilik,  
 $\epsilon$  = Ortamın dielektrik sabiti,  
 $\eta$  = Ortamın viskozitesi ve  
 $f(ka)$  = Henry Fonksiyonu

Şekil 3. 1 Negatif yüklü parçacığın Zeta Potansiyeli [135]

#### 3.4.4 LC-MS (Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi)

HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) ve MS (Kütle Spektrometresi) ünitelerinin birlikte çalıştırılarak yapı aydınlatması ve miktar tayininde kullanılan yeni ve gelişmekte olan bir analiz yöntemidir. Başta bileşik tanımlaması olmak üzere bilimsel araştırmalar, çevre analizleri, gıda analizleri ve toksik analizler gibi alanlarda kullanılmaktadır.



Düşük konsantrasyonlarda analize imkan vermesi, yapısal analizi olanaklı kılması, otomatik olarak kullanılabilmesi gibi avantajlarından dolayı günümüzde biyolojik maddelerin analizinde en çok başvurulan yöntemlerden biri Kütle Spektroskopisidir. Ayırma teknikleri (HPLC, GC, kapiler elektroforez) ile birlikte kullanılarak; fizyolojik sıvıların, ilaç etkileşimlerinin incelenmesi, proteinlerin ve peptidlerin yapı analizleri yapılabilmektedir. HPLC, kütle spektrometresine bağlandığında, kolondan birçok bileşen çıkarken her birinin kütle spektrumu aynı anda alınabilir.

Kütle spektrometresinde molekülün kütle/yük ( $m/z$ ) oranı tayin edilmektedir. Kütle spektrumu ise iyon miktarıyla  $m/z$  arasında çizilen bir grafikdir. Molekülün yüke sahip olması için iyonlaştırılması gerekmektedir ve bu işlem gaz fazında gerçekleştirilir. HPLC-MS cihazı 4 temel kısımdan oluşmaktadır. Bu kısımlar sırasıyla HPLC, iyonlaştırıcı, kütle analizörü ve dedektördür.

#### **3.4.5 UV-VIS Spektroskopisi (Ultraviyole-Görünür Bölge Spektroskopisi)**

Önemli birçok biyolojik molekül ultraviyole ışığı absorplamaktadır. Proteinlerin UV absorplama özellikleri; çözeltilerindeki konsantrasyonun ve saflığının tayininde kullanılmaktadır. Proteinler UV bölgede iki absorbans pikine sahiptirler. Bunlardan bir tanesi 215-230 nm'de (peptid bağının absorpsiyonundan kaynaklanan), diğeri de 280 nm [yapıdaki aromatik aminoasitlerin (triptofan, tirozin ve fenilalanin) absorpsiyonundan kaynaklanan] gözlenmektedir. Proteinlerin ultraviyole ışığı absorplaması özelliğinden yola çıkılarak protein çözeltilerinin konsantrasyonlarının saptanmasında, UV-VIS Spektroskopisi oldukça yaygın kullanılmaktadır [136].

Protein çözeltileri için 280 nm'deki absorbans ile derişim arasında doğru orantılı bir ilişki vardır ve bundan yararlanarak protein çözeltilerinde konsantrasyon tayini yapılmaktadır.

#### **3.4.6 FT-IR Spektroskopisi (Furier Transform Infrared Spektroskopisi)**

Elektromanyetik spektrumda dalga boyu 0,75  $\mu\text{m}$  ile 1000  $\mu\text{m}$  arasında kalan bölge Kızıl Ötesi (Infrared) bölgesini oluşturmaktadır.

FTIR matematiksel Fourier dönüşümü yöntemi ile ışığın infrared yoğunluğuna karşı dalga sayısını ölçen bir yöntemdir. Elektromanyetik ışık dizisinin kızıl ötesi bölgesi

14000 cm<sup>-1</sup> ile 10 cm<sup>-1</sup> arasındadır ve yakın dalga boylu kızıl ötesi (NIR; 4000~14000 cm<sup>-1</sup>), orta dalga boylu kızıl ötesi (MIR; 400~4000 cm<sup>-1</sup>) ve uzak dalga boylu kızıl ötesi (FIR; 4~400 cm<sup>-1</sup>) olmak üzere üç ana bölgeden oluşmaktadır [137, 138].

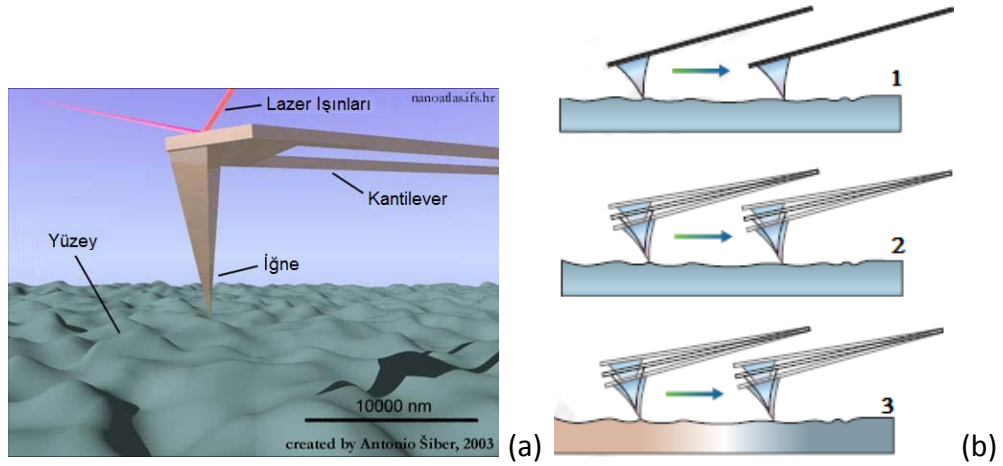
Fourier Transform Infrared (FTIR) spektroskopisi katı, sıvı, gaz ve çözelti halindeki organik bileşiklerin analizinde kullanılan fizikokimyasal bir yöntemdir ve kızıl ötesi (IR) radyasyonun absorpsiyonu ile kimyasal bağların titreşiminin ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Kızıl ötesi bölgesinde kimyasal bağların titreşimlerdeki değişim ve absorpsiyon özellikleri spektral piklerin oluşmasını sağlar [137].

Çalışmada kullanılan ve tarafımızdan sentezlenen ve katı örnek olan Poli(N-Vinil-2-pirolidon-ko-Akrilik asit) polimerleri ATR-FT-IR spektrofotometre de hiçbir ön işlem uygulanmadan analiz edildi. w/o/w ikili emülsiyon yöntemi ile oluşturulan nanopartiküller de aynı şekilde katı olarak ve hiçbir ön işlem uygulanmadan analiz edildi.

#### **3.4.7 AFM (Atomik Kuvvet Mikroskopisi)**

Atomik kuvvet mikroskobu, (AFM) ince bir kolda (kantilever) takılı olan çok ince bir iğne (tip) yardımı ile sıvı ya da katı örneklerin yüzey bölgesini nanometre (nm) seviyesinde görüntüleyebilen ve moleküller arası kuvvetleri (nN, pN) ölçebilen bir sistemdir. İğne ve üst yüzey arasındaki güçlerin değerlendirilmesi ile üst yüzey yapısından oldukça net görünüm elde edilebilmektedir. Yüzey topografisine göre kantileverin uç kısmında bulunan nanoboyuttaki iğnenin, konumu değişmektedir. Kantileverde meydana gelen bu değişim, fotodedektöre yansıtılan lazer ışınları tarafından belirlenmekte ve yüzey topografisi çıkartılmaktadır. AFM, iletken olan veya olmayan tüm yüzeylerin topografisinin çıkartılmasında kullanılabilir [139].

AFM'de temel olarak 3 farklı şekilde ölçüm yapılabilmektedir (Şekil 3.2). Bunlar, direk temas (CONTACT MODE) modu, temassız mod (NON CONTACT MODE) ve titreşimli (TAPPING) mod olarak adlandırılmaktadır [140].



Şekil 3. 2 AFM cihazının temel bileşenleri (a)[141], AFM cihazında direk temas (b1), temassız (b2) ve titreşimli (b3) modda yapılan ölçüm teknikleri [142]

w/o/w ikili emülsiyon yöntemi ile oluşturulan nanopartiküller Shimadzu Scanning Probe Microscope-SPM 9600 ile analiz edilmiştir. Dinamik modda yapılan görüntüleme için kullanılan iğne aşağıdaki özelliklere sahiptir.

- Thickness: 4  $\mu\text{m}$
- Length: 125  $\mu\text{m}$
- Width: 30  $\mu\text{m}$
- Resonance Frequency: 320 kHz
- Force Constant: 42 N/m

Mika yüzeyine önce 20  $\mu\text{l}$  saf su damlatıldı ve 10 sn sonrasında su uzaklaştırıldı ve 5  $\mu\text{l}$  örnek mika yüzeyine yüklendi. 5 dakika bekletildikten sonra örnek sıvısı tekrardan uzaklaştırıldı. 10  $\mu\text{l}$  su ile mika yüzeyi tekrar yıkandı ve 30 dakika kuruması beklendikten sonra örnekler AFM cihazında analiz edildi.

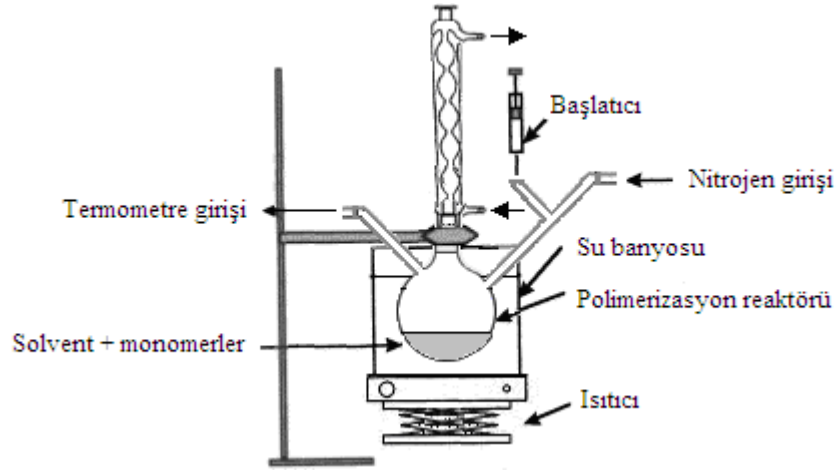
### 3.4.8 SEM (Taramalı Elektron Mikroskopisi)

Taramalı elektron mikroskopunda (SEM) görüntü elde etmek için yüksek voltaj ile hızlandırılmış elektronların numune yüzeyine odaklanması sağlanır ve bu elektron demeti numune yüzeyinde taratılır. Bu tarama sırasında elektron ve numune atomları arasında oluşan çeşitli girişimler sonucunda meydana gelen etkiler uygun algılayıcılarda toplanır ve sinyal güçlendiricilerinden geçirildikten sonra bir katot ışınları tüpünün ekranına aktararak görüntü elde edilir. Modern sistemlerde bu algılayıcılardan gelen sinyaller dijital sinyallere çevrilip bilgisayar monitörüne verilmektedir [139].

### DENEYSEL KISIM

#### 4.1 Poli(N-Vinil-2-pirolidon-ko-Akrilik asit) Polimerinin Sentezi

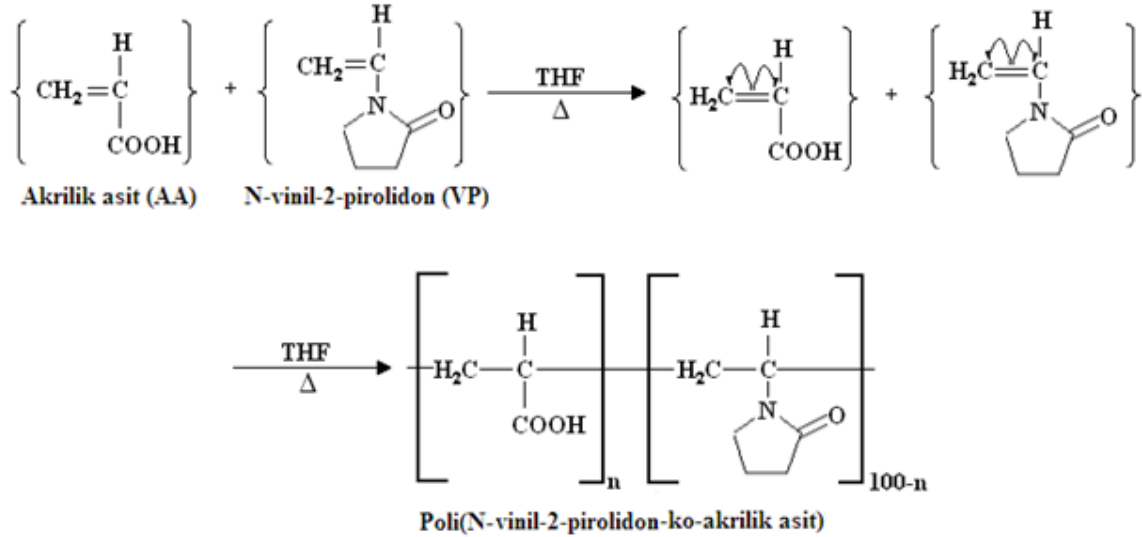
N-Vinil-2-pirolidon-ko-akrilik asit polimeri benzoilperoksit başlatıcı kullanılarak radikalik polimerizasyon yöntemi ile N(Vinil-2-Pirolidon) (VP) : Akrilik asit (AA)= 2:1 oranında sentezlenmiştir. Termal yöntemle literatürde [121] tanımlandığı şekilde sentezlenen kopolimere ait sentez aşamasının şematik gösterimi Şekil 4.1'de ve reaksiyon mekanizması Şekil 4.2'de gösterilmektedir.



Şekil 4. 1 Klasik (termal) yöntemle sentezlenen [P(VP-ko-AA)] kopolimerinin sentez aşamasının şematik gösterimi [71]

48 g glacial akrilik asit ve 111 g N-Vinil-2-pirolidon, 350 g Tetrahidrofuran (THF) içerisinde karıştırıldı. 318 mg benzoil peroksit ve 21 mg kobalt naftanat 65-70 °C'de (N<sub>2</sub> gazı varlığında, akrilik asit ve N-Vinil-2-pirolidon karıştırılırken) ortama eklendi. 3 saat

süren polimerizasyon sonucunda kopolimer çökelti olarak elde edildi, filtre edilen kopolimer 40°C'de vakum etüvde kurutuldu. Sentezlenen polimerin karakterizasyonu bölümümüzde bulunan; 4 detektörlü Jel geçirgenlik kromatografisi (GPC), FT-IR Spektroskopisi ve Zetasizer cihazları ile gerçekleştirildi. GPC analizleri sonucu elde edilen verilerden polimerin molekül ağırlığı ( $M_w$ ) hesaplandı.

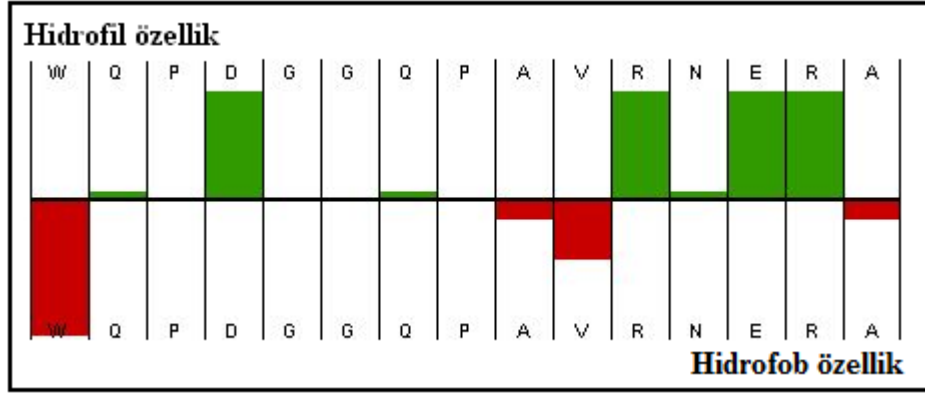


Şekil 4. 2 Klasik (termal) yöntemle sentezlenen [P(VP-ko-AA)] polimerinin reaksiyon mekanizması [71]

#### 4.2 Canine Parvovirüs W-7L20 Sentetik Peptidinin Özellikleri ve Sentezi

Kanlı ishal Canine parvovirus tip 2 (CPV-2) virüsü tarafından enfekte edilen hayvanlarda gözlenmektedir [1-3]. Yapılan çalışmalarda Canine Parvovirüs'e ait VP2 proteininin immunojenik olarak koruma sağladığı gösterilmiş ve etkili olan epitoplara literatürde belirtilmiştir [1, 3].

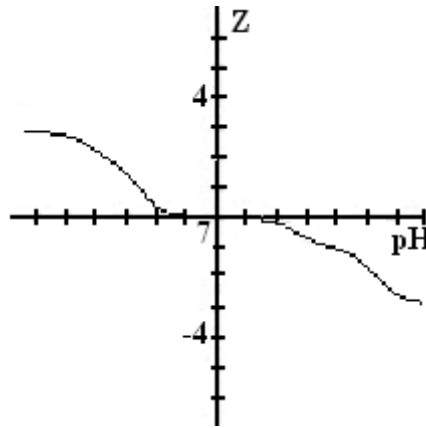
Bu tez çalışmasında kullanılan Canine parvovirus W-7L20 sentetik peptidi (W-QPDGGQPAVRNERA) bölümümüzde bulunan CEM Microdalga Peptid sentezi cihazında Solid Phase (Katı Faz) Peptid Sentez Yöntemi ile sentezlendi. Peptid dizisindeki aminoasitlerin hidrofilik ve hidrofobik özellikleri Şekil 4.3'de, pH'a bağlı titrasyon grafiği ise Şekil 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4. 3 Canine Parvovirus W-7L20 sentetik peptid (W-QPDGGQPAVRNERA) dizisinin aminoasitlerinin hidrofilik ve hidrofobik özellikleri

Çizelge 4.1 Sentezlenen Canine Parvovirus W-7L20 sentetik peptid (W-QPDGGQPAVRNERA) dizisine ait belirleyici özellikler

WQPDGGQPAVRNERA (Trp-Gln-Pro-Asp-Gly-Gly-Gln-Pro-Ala-Val-Arg-Asn-Glu-Arg-Ala)	
Amino asit sayısı	15
Molekül ağırlığı (MW)	1680.8 Da
pH 7'de net yükü	0
İzoelektrik noktası (pI)	7



Şekil 4. 4 Canine Parvovirus W-7L20 sentetik peptid dizisinin pH'a bağlı titrasyon grafiği ve her pH değerindeki net yükü

W-7L20 (W-Q-P-D-G-G-Q-P-A-V-R-N-E-R-A) dizili sentetik peptidin N- terminal ucuna Triptofan (Trp-W) aminoasidi eklenerek peptide fluoresans özellik kazandırılmıştır.

Sentez için Fmoc-Ala-Wang-LL reçine kullanılmıştır böylece C- ucunda bulunan Alanin (Ala-A) aminoasidi Wang reçine üzerinde yüklü olarak senteze başlanmıştır.

Çizelge 4. 2 W-7L20 Sentetik peptidinin sentezinde kullanılan kimyasal maddeler ve miktarları

Kimyasal Fonksiyonu	Kimyasal Adı	Kimyasal Miktarı (mg)	Kimyasal Miktarı (ml)
Resin (Reçine)	Fmoc-Ala-Wang-LL	401 mg	
Amino Asid	Ala (A)	310 mg	6,5 ml
	Arg (R)	1430 mg	12,5 ml
	Asn (N)	600 mg	6,5 ml
	Asp (D)	410 mg	6,5 ml
	Gln (Q)	730 mg	7,5 ml
	Glu (E)	430 mg	6,5 ml
	Gly (G)	360 mg	7,5 ml
	Pro (P)	400 mg	7,5 ml
	Trp (W)	530 mg	6,5 ml
	Val (V)	340 mg	6,5 ml
Deprotector (Yan Grup Koruma Kırma)			
	Piperidin		100 ml
	DMF		400 ml
Activator (Aktifleştirici)			
	HOBt	2678 mg	
Activator Base (Aktifleştirici Baz)			
	DIEA		8,7 ml
	NMP		16,3 ml
Cleavage Kokteyl (Kırma Kokteyli)			
	Su		5 ml
	EDT		5 ml
	Thioanisol		5 ml
	TFA		85 ml

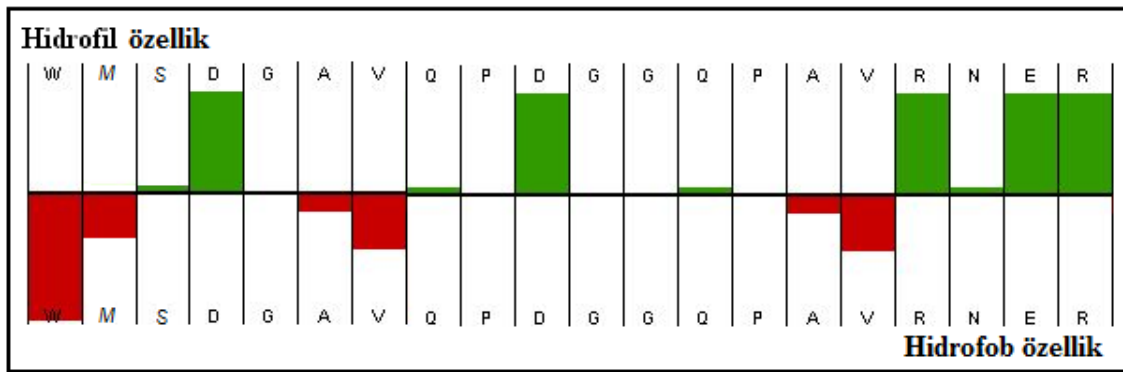
Senteze başlamadan 1 gece önce reçine 401 mg olarak tartıldı ve üzerine 5-6 ml DMF eklenerek yaklaşık 12 saat oda sıcaklığında şişmek üzere karışmaya bırakıldı. Ertesi gün sentezlenecek peptid dizisinde kullanılacak olan amino asitler tartıldı ve tabloda belirtilen miktardaki DMF içerisinde çözüldüler. Aktivatör baz ve deprotektör çözeltileri gerekli kimyasalların belirtilen hacimleri karıştırılarak hazırlandı.

Peptid sentezinin başlatılması için hazırlanan tüm çözeltiler sentez cihazında uygun bölgelere bağlandı, peptid sentez programı açılarak tüm kontroller yapıldı ve program

üzerinden peptid sentezi başlatıldı. Sentez bitiminde peptid zinciri reçine üzerinde bağlı olarak elde edildi. Cleavage çözültisi ile muamele edilip reçineden ayrılan peptid zinciri daha sonrasında analiz edilmek üzere kurutuldu.

#### 4.3 Canine Parvovirüs W-1L19 Sentetik Peptidinin Özellikleri ve Sentezi

Canine Parvoviruse ait W-1L19 sentetik peptidi ise (W-MSDGAVQPDGGQPAVRNER) (Şekil 4.5) Caslo Laboratuvarı tarafından sentezlendi ve bu tez çalışmasında kullanılmak üzere satın alındı. Peptid dizisindeki aminoasitlerin hidrofilik ve hidrofobik özellikleri Şekil 4.5'te, pH'a bağlı titrasyon grafiği ise Şekil 4.6'da verilmiştir.

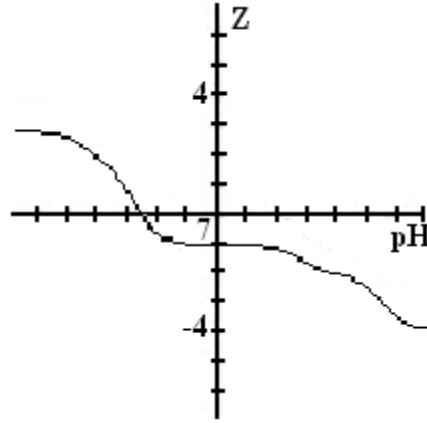


Şekil 4. 5 Canine Parvovirus W-1L19 sentetik peptid (W-MSDGAVQPDGGQPAVRNER) dizisinin aminoasitlerinin hidrofilik ve hidrofobik özellikleri

Çizelge 4.3 Canine Parvovirus W-1L19 sentetik peptid (W-MSDGAVQPDGGQPAVRNER) dizisine ait belirleyici özellikler

WMSDGAVQPDGGQPAVRNER (Trp-Met-Ser-Asp-Gly-Ala-Val-Gln-Pro-Asp-Gly-Gly-Gln-Pro-Ala-Val-Arg-Asn-Glu-Arg)	
Amino asit sayısı	19
Molekül ağırlığı (MW)	2170 Da
pH 7'de net yükü	-1
İzoelektrik noktası (pI)	4,31





Şekil 4. 6 Canine Parvovirus W-1L19 sentetik peptid dizisinin pH'a bağlı titrasyon grafiği ve her pH değerindeki net yükü

#### 4.4 Canine Parvovirus W-7L20 Peptidinin Poliakrilikasit (PAA) Polimeri ile Biyokonjugatlarının Sentezi

Bu tez çalışmasında Canine Parvoviruse ait W-7L20 sentetik peptidi ile Poliakrilikasit (PAA) kullanılarak EDC çapraz bağlayıcısı varlığında farklı molar oranlarda konjugatlar sentezlendi.

##### 4.4.1 PAA-Peptid Biyokonjugatlarına Ait Hesaplamalar

PAA'nın artan oranlarında ( $n_{PAA}/n_{pep}=0,025; 0,075; 0,15; 0,25; 0,375$ ) konjugatlar sentezlendi.

##### 4.4.1.1 PAA Polimerinin Artan Oranlarında Konjugasyon

Klasik Konjugasyon Yöntemi ile EDC varlığında  $n_{PAA}/n_{pep}= 0,025; 0,075; 0,15; 0,25; ve 0,375$  olmak üzere 5 farklı oranda konjugat sentezlendi.

Peptidin çözelti içerisindeki konsantrasyonu 0,11 mg/ml olarak çalışıldı.

( $M_{PAA}= 100\ 000\ Da; M_{peptid} = 1662\ Da$ )

**1.**  $n_{PAA}/n_{pep} = 0,025$  olan 6 ml PAA-Peptid Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{PAA}}{n_{pep}} = \frac{c_{PAA} \cdot M_{pep}}{c_{pep} \cdot M_{PAA}} \Rightarrow 0,025 = \frac{\frac{x\ mg}{6\ ml} \cdot 1662}{100000 \cdot \frac{0,66\ mg}{6\ ml}} \Rightarrow x = 1\ mg\ polimer / 6\ ml$$

2.  $n_{PAA}/n_{pep} = 0,075$  olan 6 ml PAA-Peptid Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{PAA}}{n_{pep}} = \frac{c_{PAA} \cdot M_{pep}}{c_{pep} \cdot M_{PAA}} \Rightarrow 0,075 = \frac{\frac{x \text{ mg}}{6 \text{ ml}} \cdot 1622}{100000 \cdot \frac{0,66 \text{ mg}}{6 \text{ ml}}} \Rightarrow x = 3 \text{ mg polimer/ 6 ml}$$

3.  $n_{PAA}/n_{pep} = 0,15$  olan 6 ml PAA-Peptid Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{PAA}}{n_{pep}} = \frac{c_{PAA} \cdot M_{pep}}{c_{pep} \cdot M_{PAA}} \Rightarrow 0,15 = \frac{\frac{x \text{ mg}}{6 \text{ ml}} \cdot 1622}{100000 \cdot \frac{0,66 \text{ mg}}{6 \text{ ml}}} \Rightarrow x = 6 \text{ mg polimer/ 6 ml}$$

4.  $n_{PAA}/n_{pep} = 0,25$  olan 6 ml PAA-Peptid Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{PAA}}{n_{pep}} = \frac{c_{PAA} \cdot M_{pep}}{c_{pep} \cdot M_{PAA}} \Rightarrow 0,25 = \frac{\frac{x \text{ mg}}{6 \text{ ml}} \cdot 1622}{100000 \cdot \frac{0,66 \text{ mg}}{6 \text{ ml}}} \Rightarrow x = 10 \text{ mg polimer/ 6 ml}$$

5.  $n_{PAA}/n_{pep} = 0,375$  olan 6 ml PAA-Peptid Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{PAA}}{n_{pep}} = \frac{c_{PAA} \cdot M_{pep}}{c_{pep} \cdot M_{PAA}} \Rightarrow 0,375 = \frac{\frac{x \text{ mg}}{6 \text{ ml}} \cdot 1622}{100000 \cdot \frac{0,66 \text{ mg}}{6 \text{ ml}}} \Rightarrow x = 15 \text{ mg polimer/ 6 ml}$$

Polimer olacağı hesaplandı ve polimer stok çözeltisi hazırlandı. Herbir konjugat için sabit konsantrasyondaki peptid çözeltisi üzerine değişen konsantrasyondaki polimer çözeltisinden eklendi ve karışımların pH değerleri 5'e ayarlandı, çözeltiler 4 °C'de karıştırıldı aktivasyon için her bir çözeltiye EDC eklendi gece boyu soğuk odada 4 °C'de karıştırıldı. Ertesi gün çözeltilerin pH değerleri 7'ye ayarlandı. Örnekler 2 saat karıştırıldı ve sentezlenen konjugatların oluşum mekanizması, fizikokimyasal özellikleri ve elektriksel yükleri Viscotek, Floresans Spektrofotometre ve Zetasizer cihazları ile incelendi.

#### 4.5 Canine Parvovirus W-1L19 Peptidinin Poliakrilikası (PAA) Polimeri ile Fiziksel Komplekslerinin Hazırlanması

Canine Parvovirus W-1L19 sentetik peptidi ile poliakrilikası (PAA) kullanılarak polimerin artan oranlarında ( $n_{PAA}/n_{pep}=0,8$  ve 1) ve pH=4 değerinde 2 farklı molar oranda fiziksel karışım hazırlandı.

##### 4.5.1 PAA-Peptid Fiziksel Komplekslerine Ait Hesaplamalar

PAA'nın çözelti içerisindeki konsantrasyonu sırası ile 6,13 mg/ml; 7,6 mg/ml ve W-1L19 peptidinin konsantrasyonu da 1mg/ml olacak  $n_{PAA}/n_{peptid} = 0,8$  ve 1 oranları için fiziksel karışımlar hazırlandı. ( $M_{PAA} = 100\ 000$  Da;  $M_{peptid} = 2170$  Da)

1.  $n_{PAA}/n_{peptid}=0,1$  olan 6 ml PAA-Peptid Fiziksel Karışımı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{PAA}}{n_{pep}} = \frac{c_{PAA} \cdot M_{pep}}{c_{pep} \cdot M_{PAA}} \Rightarrow 0,8 = \frac{\frac{36,8\ mg}{6\ ml} \cdot 2170}{100000 \cdot \frac{x\ mg}{6\ ml}} \Rightarrow x = 1\ mg / 6\ ml$$

2.  $n_{PAA}/n_{peptid}=0,1$  olan 6 ml PAA-Peptid Fiziksel Karışımı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{PAA}}{n_{pep}} = \frac{c_{PAA} \cdot M_{pep}}{c_{pep} \cdot M_{PAA}} \Rightarrow 1 = \frac{\frac{46\ mg}{6\ ml} \cdot 2170}{100000 \cdot \frac{x\ mg}{6\ ml}} \Rightarrow x = 1\ mg / 6\ ml$$

peptid olacağı hesaplandı ve peptid stok çözeltisi hazırlandı. Değişen konsantrasyonlardaki PAA ve sabit konsantrasyondaki peptid çözeltilerinin pH değerleri ayarlandı, çözeltiler karıştırıldı, son pH değeri 4'e ayarlandı. Örnekler 3 saat karıştırıldı ve HPLC cihazında analiz edildi.

## 4.6 Canine Parvovirus W-1L19 Peptidinin Poliakrilikası (PAA) Polimeri ile Biyokonjugatlarının Sentezi

Bu tez çalışmasında Canine Parvoviruse ait W-1L19 sentetik peptidi ile Poliakrilikası (PAA) kullanılarak EDC çapraz bağlayıcısı varlığında farklı molar oranlarda konjugatlar sentezlendi.

### 4.6.1 Peptid-PAA Biyokonjugatlarına Ait Hesaplamalar

PAA polimeri ile konjugasyonda iki farklı konjugat serisi sentezlendi. Birinci seride peptidin artan oranı ile çalışılırken ikinci seride peptid konsantrasyonu sabit tutulup polimerin artan oranları ile çalışıldı.

#### 4.6.1.1 Peptidin Artan Oranlarında Konjugasyon

Klasik Konjugasyon Yöntemi ile EDC varlığında  $n_{\text{pep}}/n_{\text{PAA}} = 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20$  ve 30 olmak üzere 8 farklı oranda konjugat sentezlendi.

PAA'nın çözelti içerisindeki konsantrasyonu 1 mg/ml olarak çalışıldı.

( $M_{\text{PAA}} = 100\ 000$  Da;  $M_{\text{peptid}} = 2170$  Da)

1.  $n_{\text{pep}}/n_{\text{PAA}} = 1$  olan 6 ml Peptid-PAA Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{\text{pep}}}{n_{\text{PAA}}} = \frac{c_{\text{pep}} \cdot M_{\text{PAA}}}{c_{\text{PAA}} \cdot M_{\text{pep}}} \Rightarrow 1 = \frac{\frac{x \text{ mg}}{6 \text{ ml}} \cdot 100000}{2170 \cdot \frac{1 \text{ mg}}{6 \text{ ml}}} \Rightarrow x = 0,1302 \text{ mg peptid/ 6 ml}$$

2.  $n_{\text{pep}}/n_{\text{PAA}} = 3$  olan 6 ml Peptid-PAA Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{\text{pep}}}{n_{\text{PAA}}} = \frac{c_{\text{pep}} \cdot M_{\text{PAA}}}{c_{\text{PAA}} \cdot M_{\text{pep}}} \Rightarrow 3 = \frac{\frac{x \text{ mg}}{6 \text{ ml}} \cdot 100000}{2170 \cdot \frac{1 \text{ mg}}{6 \text{ ml}}} \Rightarrow x = 0,3906 \text{ mg peptid/ 6 ml}$$

3.  $n_{\text{pep}}/n_{\text{PAA}} = 5$  olan 6 ml Peptid-PAA Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{\text{pep}}}{n_{\text{PAA}}} = \frac{c_{\text{pep}} \cdot M_{\text{PAA}}}{c_{\text{PAA}} \cdot M_{\text{pep}}} \Rightarrow 5 = \frac{\frac{x \text{ mg}}{6 \text{ ml}} \cdot 100000}{2170 \cdot \frac{1 \text{ mg}}{6 \text{ ml}}} \Rightarrow x = 0,651 \text{ mg peptid/ 6 ml}$$

4.  $n_{pep}/n_{PAA} = 7$  olan 6 ml Peptid-PAA Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{pep}}{n_{PAA}} = \frac{c_{pep} \cdot M_{PAA}}{c_{PAA} \cdot M_{pep}} \Rightarrow 7 = \frac{\frac{x \text{ mg}}{6 \text{ ml}} \cdot 100000}{2170 \cdot \frac{1 \text{ mg}}{6 \text{ ml}}} \Rightarrow x = 0,9114 \text{ mg peptid/ 6 ml}$$

5.  $n_{pep}/n_{PAA} = 10$  olan 6 ml Peptid-PAA Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{pep}}{n_{PAA}} = \frac{c_{pep} \cdot M_{PAA}}{c_{PAA} \cdot M_{pep}} \Rightarrow 10 = \frac{\frac{x \text{ mg}}{6 \text{ ml}} \cdot 100000}{2170 \cdot \frac{1 \text{ mg}}{6 \text{ ml}}} \Rightarrow x = 1,302 \text{ mg peptid/ 6 ml}$$

6.  $n_{pep}/n_{PAA} = 15$  olan 6 ml Peptid-PAA Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{pep}}{n_{PAA}} = \frac{c_{pep} \cdot M_{PAA}}{c_{PAA} \cdot M_{pep}} \Rightarrow 15 = \frac{\frac{x \text{ mg}}{6 \text{ ml}} \cdot 100000}{2170 \cdot \frac{1 \text{ mg}}{6 \text{ ml}}} \Rightarrow x = 1,953 \text{ mg peptid/ 6 ml}$$

7.  $n_{pep}/n_{PAA} = 20$  olan 6 ml Peptid-PAA Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{pep}}{n_{PAA}} = \frac{c_{pep} \cdot M_{PAA}}{c_{PAA} \cdot M_{pep}} \Rightarrow 20 = \frac{\frac{x \text{ mg}}{6 \text{ ml}} \cdot 100000}{2170 \cdot \frac{1 \text{ mg}}{6 \text{ ml}}} \Rightarrow x = 2,604 \text{ mg peptid/ 6 ml}$$

8.  $n_{pep}/n_{PAA} = 30$  olan 6 ml Peptid-PAA Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{pep}}{n_{PAA}} = \frac{c_{pep} \cdot M_{PAA}}{c_{PAA} \cdot M_{pep}} \Rightarrow 30 = \frac{\frac{x \text{ mg}}{6 \text{ ml}} \cdot 100000}{2170 \cdot \frac{1 \text{ mg}}{6 \text{ ml}}} \Rightarrow x = 3,906 \text{ mg peptid/ 6 ml}$$

peptid olacağı hesaplandı ve peptid stok çözeltisi hazırlandı. Herbir konjugat için sabit konsantrasyondaki PAA çözeltisi üzerine değişen konsantrasyondaki peptid çözeltisinden eklendi ve karışımların pH değerleri 5'e ayarlandı, çözeltiler 4 °C'de karıştırıldı aktivasyon için her bir çözeltiliye EDC eklendi gece boyu soğuk odada 4 °C'de karıştırıldı. Ertesi gün çözeltilerin pH değerleri 7'ye ayarlandı. Örnekler 2 saat karıştırıldı ve sentezlenen konjugatların oluşum mekanizması, fizikokimyasal özellikleri ve elektriksel yükleri HPLC, Viscotek, Floresans Spektrofotometre ve Zetasizer cihazları ile incelendi.

#### 4.6.1.2 Polimerin Artan Oranlarında Konjugasyon

Klasik Konjugasyon Yöntemi ile EDC varlığında  $n_{PAA}/n_{pep} = 0,016; 0,048; 0,096; 0,16; 0,24; 0,48;$  ve  $0,65$  olmak üzere 7 farklı oranda konjugat sentezlendi.

Peptidin çözelti içerisindeki konsantrasyonu  $0,217$  mg/ml olarak çalışıldı.

( $M_{PAA} = 100\ 000$  Da;  $M_{peptid} = 2170$  Da)

1.  $n_{PAA}/n_{pep} = 0,016$  olan 6 ml PAA-Peptid Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{PAA}}{n_{pep}} = \frac{c_{PAA} \cdot M_{pep}}{c_{pep} \cdot M_{PAA}} \Rightarrow 0,016 = \frac{\frac{x \text{ mg}}{6 \text{ ml}} \cdot 2170}{100000 \cdot \frac{1,3 \text{ mg}}{6 \text{ ml}}} \Rightarrow x = 1 \text{ mg polimer/ 6 ml}$$

2.  $n_{PAA}/n_{pep} = 0,048$  olan 6 ml PAA-Peptid Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{PAA}}{n_{pep}} = \frac{c_{PAA} \cdot M_{pep}}{c_{pep} \cdot M_{PAA}} \Rightarrow 0,048 = \frac{\frac{x \text{ mg}}{6 \text{ ml}} \cdot 2170}{100000 \cdot \frac{1,3 \text{ mg}}{6 \text{ ml}}} \Rightarrow x = 3 \text{ mg polimer/ 6 ml}$$

3.  $n_{PAA}/n_{pep} = 0,096$  olan 6 ml PAA-Peptid Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{PAA}}{n_{pep}} = \frac{c_{PAA} \cdot M_{pep}}{c_{pep} \cdot M_{PAA}} \Rightarrow 0,096 = \frac{\frac{x \text{ mg}}{6 \text{ ml}} \cdot 2170}{100000 \cdot \frac{1,3 \text{ mg}}{6 \text{ ml}}} \Rightarrow x = 6 \text{ mg polimer/ 6 ml}$$

4.  $n_{PAA}/n_{pep} = 0,16$  olan 6 ml PAA-Peptid Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{PAA}}{n_{pep}} = \frac{c_{PAA} \cdot M_{pep}}{c_{pep} \cdot M_{PAA}} \Rightarrow 0,16 = \frac{\frac{x \text{ mg}}{6 \text{ ml}} \cdot 2170}{100000 \cdot \frac{1,3 \text{ mg}}{6 \text{ ml}}} \Rightarrow x = 10 \text{ mg polimer/ 6 ml}$$

5.  $n_{PAA}/n_{pep} = 0,24$  olan 6 ml PAA-Peptid Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{PAA}}{n_{pep}} = \frac{c_{PAA} \cdot M_{pep}}{c_{pep} \cdot M_{PAA}} \Rightarrow 0,24 = \frac{\frac{x \text{ mg}}{6 \text{ ml}} \cdot 2170}{100000 \cdot \frac{1,3 \text{ mg}}{6 \text{ ml}}} \Rightarrow x = 15 \text{ mg polimer/ 6 ml}$$

6.  $n_{PAA}/n_{pep} = 0,48$  olan 6 ml PAA-Peptid Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{PAA}}{n_{pep}} = \frac{c_{PAA} \cdot M_{pep}}{c_{pep} \cdot M_{PAA}} \Rightarrow 0,48 = \frac{\frac{x \text{ mg}}{6 \text{ ml}} \cdot 2170}{100000 \cdot \frac{1,3 \text{ mg}}{6 \text{ ml}}} \Rightarrow x = 30 \text{ mg polimer/ 6 ml}$$

7.  $n_{PAA}/n_{pep} = 0,65$  olan 6 ml PAA-Peptid Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{PAA}}{n_{pep}} = \frac{c_{PAA} \cdot M_{pep}}{c_{pep} \cdot M_{PAA}} \Rightarrow 0,65 = \frac{\frac{x \text{ mg}}{6 \text{ ml}} \cdot 2170}{100000 \cdot \frac{1,3 \text{ mg}}{6 \text{ ml}}} \Rightarrow x = 40 \text{ mg polimer/ 6 ml}$$

Polimer olacağı hesaplandı ve polimer stok çözeltisi hazırlandı. Herbir konjugat için sabit konsantrasyondaki peptid çözeltisi üzerine değişen konsantrasyondaki polimer çözeltisinden eklendi ve karışımların pH değerleri 5'e ayarlandı, çözeltiler 4 °C'de karıştırıldı aktivasyon için her bir çözeltiliye EDC eklendi gece boyu soğuk odada 4 °C'de karıştırıldı. Ertesi gün çözeltilerin pH değerleri 7'ye ayarlandı. Örnekler 2 saat karıştırıldı ve sentezlenen konjugatların oluşum mekanizması, fizikokimyasal özellikleri ve elektriksel yükleri HPLC, Viscotek, Floresans Spektrofotometre ve Zetasizer cihazları ile incelendi.

#### 4.7 Canine Parvovirus W-1L19 Peptidinin Karboksimetilselülaz (CMC) Polimeri ile Biyokonjugatlarının Sentezi

Bu tez çalışmasında Canine Parvoviruse ait W-1L19 sentetik peptidi ile Karboksimetilselülaz (CMC) polimeri kullanılarak EDC çapraz bağlayıcısı varlığında farklı molar oranlarda konjugatlar sentezlendi.

##### 4.7.1 CMC-Peptid Biyokonjugatlarına Ait Hesaplamalar

CMC'in artan oranlarında ( $n_{CMC}/n_{pep}=0,018; 0,055; 0,11; 0,185; 0,278; 0,55; 0,74$ ) konjugatlar sentezlendi.

##### 4.7.1.1 CMC Polimerinin Artan Oranlarında Konjugasyon

Klasik Konjugasyon Yöntemi ile EDC varlığında  $n_{CMC}/n_{pep} = 0,018; 0,055; 0,11; 0,185; 0,278; 0,55;$  ve 0,74 olmak üzere 7 farklı oranda konjugat sentezlendi.

Peptidin çözelti içerisindeki konsantrasyonu 0,217 mg/ml olarak çalışıldı.

( $M_{\text{CMC}} = 90\,000$  Da;  $M_{\text{peptid}} = 2170$  Da)

1.  $n_{\text{CMC}}/n_{\text{pep}} = \mathbf{0,018}$  olan 6 ml CMC-Peptid Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{\text{CMC}}}{n_{\text{pep}}} = \frac{c_{\text{CMC}} \cdot M_{\text{pep}}}{c_{\text{pep}} \cdot M_{\text{CMC}}} \Rightarrow 0,018 = \frac{\frac{x \text{ mg}}{6 \text{ ml}} \cdot 2170}{90000 \cdot \frac{1,3 \text{ mg}}{6 \text{ ml}}} \Rightarrow x = 1 \text{ mg polimer/ 6 ml}$$

2.  $n_{\text{CMC}}/n_{\text{pep}} = \mathbf{0,055}$  olan 6 ml CMC-Peptid Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{\text{CMC}}}{n_{\text{pep}}} = \frac{c_{\text{CMC}} \cdot M_{\text{pep}}}{c_{\text{pep}} \cdot M_{\text{CMC}}} \Rightarrow 0,055 = \frac{\frac{x \text{ mg}}{6 \text{ ml}} \cdot 2170}{90000 \cdot \frac{1,3 \text{ mg}}{6 \text{ ml}}} \Rightarrow x = 3 \text{ mg polimer/ 6 ml}$$

3.  $n_{\text{CMC}}/n_{\text{pep}} = \mathbf{0,11}$  olan 6 ml CMC-Peptid Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{\text{CMC}}}{n_{\text{pep}}} = \frac{c_{\text{CMC}} \cdot M_{\text{pep}}}{c_{\text{pep}} \cdot M_{\text{CMC}}} \Rightarrow 0,11 = \frac{\frac{x \text{ mg}}{6 \text{ ml}} \cdot 2170}{90000 \cdot \frac{1,3 \text{ mg}}{6 \text{ ml}}} \Rightarrow x = 6 \text{ mg polimer/ 6 ml}$$

4.  $n_{\text{CMC}}/n_{\text{pep}} = \mathbf{0,185}$  olan 6 ml CMC-Peptid Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{\text{CMC}}}{n_{\text{pep}}} = \frac{c_{\text{CMC}} \cdot M_{\text{pep}}}{c_{\text{pep}} \cdot M_{\text{CMC}}} \Rightarrow 0,185 = \frac{\frac{x \text{ mg}}{6 \text{ ml}} \cdot 2170}{90000 \cdot \frac{1,3 \text{ mg}}{6 \text{ ml}}} \Rightarrow x = 10 \text{ mg polimer/ 6 ml}$$

5.  $n_{\text{CMC}}/n_{\text{pep}} = \mathbf{0,278}$  olan 6 ml CMC-Peptid Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{\text{CMC}}}{n_{\text{pep}}} = \frac{c_{\text{CMC}} \cdot M_{\text{pep}}}{c_{\text{pep}} \cdot M_{\text{CMC}}} \Rightarrow 0,278 = \frac{\frac{x \text{ mg}}{6 \text{ ml}} \cdot 2170}{90000 \cdot \frac{1,3 \text{ mg}}{6 \text{ ml}}} \Rightarrow x = 15 \text{ mg polimer/ 6 ml}$$

6.  $n_{\text{CMC}}/n_{\text{pep}} = \mathbf{0,55}$  olan 6 ml CMC-Peptid Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{\text{CMC}}}{n_{\text{pep}}} = \frac{c_{\text{CMC}} \cdot M_{\text{pep}}}{c_{\text{pep}} \cdot M_{\text{CMC}}} \Rightarrow 0,55 = \frac{\frac{x \text{ mg}}{6 \text{ ml}} \cdot 2170}{90000 \cdot \frac{1,3 \text{ mg}}{6 \text{ ml}}} \Rightarrow x = 30 \text{ mg polimer/ 6 ml}$$



$7 \cdot n_{\text{CMC}}/n_{\text{pep}} = 0,74$  olan 6 ml CMC-Peptid Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{\text{CMC}}}{n_{\text{pep}}} = \frac{c_{\text{CMC}} \cdot M_{\text{pep}}}{c_{\text{pep}} \cdot M_{\text{CMC}}} \Rightarrow 0,74 = \frac{\frac{x \text{ mg}}{6 \text{ ml}} \cdot 2170}{90000 \cdot \frac{1,3 \text{ mg}}{6 \text{ ml}}} \Rightarrow x = 40 \text{ mg polimer/ 6 ml}$$

Polimer olacağı hesaplandı ve polimer stok çözeltisi hazırlandı. Herbir konjugat için sabit konsantrasyondaki peptid çözeltisi üzerine değişen konsantrasyondaki polimer çözeltisinden eklendi ve karışımların pH değerleri 5'e ayarlandı, çözeltiler 4 °C'de karıştırıldı aktivasyon için her bir çözeltiliye EDC eklendi gece boyu soğuk odada 4 °C'de karıştırıldı. Ertesi gün çözeltilerin pH değerleri 7'ye ayarlandı. Örnekler 2 saat karıştırıldı ve sentezlenen konjugatların oluşum mekanizması, fizikokimyasal özellikleri ve elektriksel yükleri Viscotek, Floresans Spektrofotometre ve Zetasizer cihazları ile incelendi.

#### **4.8 Canine Parvovirus W-1L19 Peptidinin Poli(N-Vinil-2-Pirolidon-ko-Akrilikasid) [P(VP-co-AA)] Polimeri ile Biyokonjugatlarının Sentezi**

Bu tez çalışmasında Canine Parvoviruse ait W-1L19 sentetik peptidi ile Poli(N-Vinil-2-Pirolidon-ko-Akrilikasid) [P(VP-co-AA)] kullanılarak EDC çapraz bağlayıcısı varlığında farklı molar oranlarda konjugatlar sentezlendi.

##### **4.8.1 [P(VP-ko-AA)]-Peptid Biyokonjugatlarına Ait Hesaplamalar**

İki farklı molekül ağırlığında ve bileşen kompozisyonundaki [P(VP-ko-AA)] polimeri kullanılarak iki farklı konjugat serisi sentezlendi. Birinci seride [P(VP-ko-AA)] (1:3) Mw:80.000 Da ile çalışılırken ikinci seride [P(VP-ko-AA)] (2:1) Mw:120.000 Da olan polimer ile çalışıldı.

##### **4.8.1.1 [P(VP-ko-AA)] (2:1, 120.000 Da) Polimerinin Artan Oranlarında Konjugasyon**

Klasik Konjugasyon Yöntemi ile EDC varlığında  $n_{\text{P(VP-ko-AA)}}/n_{\text{pep}} = 0,014; 0,041; 0,083; 0,14; 0,208$  ve  $0,417$  olmak üzere 6 farklı oranda konjugat sentezlendi.

Peptidin çözelti içerisindeki konsantrasyonu  $0,217 \text{ mg/ml}$  olarak çalışıldı.

$$(M_{\text{P(VP-ko-AA)}} = 120\,000 \text{ Da}; M_{\text{peptid}} = 2170 \text{ Da})$$

1.  $n_{P(VP-ko-AA)}/n_{pep} = 0,014$  olan 6 ml P(VP-ko-AA)-Peptid Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{P(VP-ko-AA)}}{n_{pep}} = \frac{c_{P(VP-ko-AA)} \cdot M_{pep}}{c_{pep} \cdot M_{P(VP-ko-AA)}} \Rightarrow 0,014 = \frac{\frac{x \text{ mg}}{6 \text{ ml}} \cdot 2170}{120000 \cdot \frac{1,3 \text{ mg}}{6 \text{ ml}}} \Rightarrow x = 1 \text{ mg polimer/ 6 ml}$$

2.  $n_{P(VP-ko-AA)}/n_{pep} = 0,041$  olan 6 ml P(VP-ko-AA)-Peptid Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{P(VP-ko-AA)}}{n_{pep}} = \frac{c_{P(VP-ko-AA)} \cdot M_{pep}}{c_{pep} \cdot M_{P(VP-ko-AA)}} \Rightarrow 0,041 = \frac{\frac{x \text{ mg}}{6 \text{ ml}} \cdot 2170}{120000 \cdot \frac{1,3 \text{ mg}}{6 \text{ ml}}} \Rightarrow x = 3 \text{ mg polimer/ 6 ml}$$

3.  $n_{P(VP-ko-AA)}/n_{pep} = 0,083$  olan 6 ml P(VP-ko-AA)-Peptid Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{P(VP-ko-AA)}}{n_{pep}} = \frac{c_{P(VP-ko-AA)} \cdot M_{pep}}{c_{pep} \cdot M_{P(VP-ko-AA)}} \Rightarrow 0,083 = \frac{\frac{x \text{ mg}}{6 \text{ ml}} \cdot 2170}{120000 \cdot \frac{1,3 \text{ mg}}{6 \text{ ml}}} \Rightarrow x = 6 \text{ mg polimer/ 6 ml}$$

4.  $n_{P(VP-ko-AA)}/n_{pep} = 0,14$  olan 6 ml P(VP-ko-AA)-Peptid Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{P(VP-ko-AA)}}{n_{pep}} = \frac{c_{P(VP-ko-AA)} \cdot M_{pep}}{c_{pep} \cdot M_{P(VP-ko-AA)}} \Rightarrow 0,14 = \frac{\frac{x \text{ mg}}{6 \text{ ml}} \cdot 2170}{120000 \cdot \frac{1,3 \text{ mg}}{6 \text{ ml}}} \Rightarrow x = 10 \text{ mg polimer/ 6 ml}$$

5.  $n_{P(VP-ko-AA)}/n_{pep} = 0,208$  olan 6 ml P(VP-ko-AA)-Peptid Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{P(VP-ko-AA)}}{n_{pep}} = \frac{c_{P(VP-ko-AA)} \cdot M_{pep}}{c_{pep} \cdot M_{P(VP-ko-AA)}} \Rightarrow 0,208 = \frac{\frac{x \text{ mg}}{6 \text{ ml}} \cdot 2170}{120000 \cdot \frac{1,3 \text{ mg}}{6 \text{ ml}}} \Rightarrow x = 15 \text{ mg polimer/ 6 ml}$$

6.  $n_{P(VP-ko-AA)}/n_{pep} = 0,417$  olan 6 ml P(VP-ko-AA)-Peptid Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{P(VP-ko-AA)}}{n_{pep}} = \frac{c_{P(VP-ko-AA)} \cdot M_{pep}}{c_{pep} \cdot M_{P(VP-ko-AA)}} \Rightarrow 0,417 = \frac{\frac{x \text{ mg}}{6 \text{ ml}} \cdot 2170}{120000 \cdot \frac{1,3 \text{ mg}}{6 \text{ ml}}} \Rightarrow x = 30 \text{ mg polimer/ 6 ml}$$

Polimer olacağı hesaplandı ve polimer stok çözeltisi hazırlandı. Herbir konjugat için sabit konsantrasyondaki peptid çözeltisi üzerine değişen konsantrasyondaki polimer çözeltisinden eklendi ve karışımların pH değerleri 5'e ayarlandı, çözeltiler 4 °C'de karıştırıldı aktivasyon için her bir çözeltiliye EDC eklendi gece boyu soğuk odada 4 °C'de karıştırıldı. Ertesi gün çözeltilerin pH değerleri 7'ye ayarlandı. Örnekler 2 saat karıştırıldı ve sentezlenen konjugatların oluşum mekanizması, fizikokimyasal özellikleri ve elektriksel yükleri Viscotek, Floresans Spektrofotometre ve Zetasizer cihazları ile incelendi.

#### 4.8.1.2 [P(VP-ko-AA)] (1:3, 80.000 Da) Polimerinin Artan Oranlarında Konjugasyon

Klasik Konjugasyon Yöntemi ile EDC varlığında  $n_{PAA}/n_{pep} = 0,02; 0,06; 0,125; 0,2$  ve  $0,3$  olmak üzere 5 farklı oranda konjugat sentezlendi.

Peptidin çözelti içerisindeki konsantrasyonu  $0,217$  mg/ml olarak çalışıldı.

$$(M_{P(VP-ko-AA)} = 80\ 000\ Da; M_{peptid} = 2170\ Da)$$

1.  $n_{P(VP-ko-AA)}/n_{pep} = 0,02$  olan 6 ml P(VP-ko-AA)-Peptid Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{P(VP-ko-AA)}}{n_{pep}} = \frac{c_{P(VP-ko-AA)} \cdot M_{pep}}{c_{pep} \cdot M_{P(VP-ko-AA)}} \Rightarrow 0,02 = \frac{\frac{x\ mg}{6\ ml} \cdot 2170}{80000 \cdot \frac{1,3\ mg}{6\ ml}} \Rightarrow x = 1\ mg\ polimer / 6\ ml$$

2.  $n_{P(VP-ko-AA)}/n_{pep} = 0,06$  olan 6 ml P(VP-ko-AA)-Peptid Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{P(VP-ko-AA)}}{n_{pep}} = \frac{c_{P(VP-ko-AA)} \cdot M_{pep}}{c_{pep} \cdot M_{P(VP-ko-AA)}} \Rightarrow 0,06 = \frac{\frac{x\ mg}{6\ ml} \cdot 2170}{80000 \cdot \frac{1,3\ mg}{6\ ml}} \Rightarrow x = 3\ mg\ polimer / 6\ ml$$

3.  $n_{P(VP-ko-AA)}/n_{pep} = 0,125$  olan 6 ml P(VP-ko-AA)-Peptid Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{P(VP-ko-AA)}}{n_{pep}} = \frac{c_{P(VP-ko-AA)} \cdot M_{pep}}{c_{pep} \cdot M_{P(VP-ko-AA)}} \Rightarrow 0,125 = \frac{\frac{x\ mg}{6\ ml} \cdot 2170}{80000 \cdot \frac{1,3\ mg}{6\ ml}} \Rightarrow x = 6\ mg\ polimer / 6\ ml$$

4.  $n_{P(VP-ko-AA)}/n_{pep} = 0,2$  olan 6 ml P(VP-ko-AA)-Peptid Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{P(VP-ko-AA)}}{n_{pep}} = \frac{c_{P(VP-ko-AA)} \cdot M_{pep}}{c_{pep} \cdot M_{P(VP-ko-AA)}} \Rightarrow 0,2 = \frac{\frac{x \text{ mg}}{6 \text{ ml}} \cdot 2170}{80000 \cdot \frac{1,3 \text{ mg}}{6 \text{ ml}}} \Rightarrow x = 10 \text{ mg polimer} / 6 \text{ ml}$$

5.  $n_{P(VP-ko-AA)}/n_{pep} = 0,3$  olan 6 ml P(VP-ko-AA)-Peptid Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{P(VP-ko-AA)}}{n_{pep}} = \frac{c_{P(VP-ko-AA)} \cdot M_{pep}}{c_{pep} \cdot M_{P(VP-ko-AA)}} \Rightarrow 0,3 = \frac{\frac{x \text{ mg}}{6 \text{ ml}} \cdot 2170}{80000 \cdot \frac{1,3 \text{ mg}}{6 \text{ ml}}} \Rightarrow x = 15 \text{ mg polimer} / 6 \text{ ml}$$

#### 4.9 Poli(D,L-laktik-ko-glikolik) Asid (PLGA) Nanopartiküllerinin Oluşturulması

PLGA nanopartiküller literatürde [143, 144] tanımlanan ikili emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi modifiye edilerek üretilmiştir. 150 mg PLGA 2 ml diklorometan içerisinde çözüldü ve 200 µl su fazını oluşturan çözelti ile karıştırılarak 3 dakika 50 W enerji altında sonikasyona tabi tutuldu. Daha sonra oluşan W/O emülsiyonu 4 ml %2,5'lük polivinilalkol (PVA) çözeltisi ile karıştırıldı ve W/O/W emülsiyonunu elde etmek için 3 dakika 50 W enerji altında tekrar sonikasyon yapıldı. Elde edilen örnekler çözücünün uzaklaşması için 12 saat manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. 12 saat sonrasında örnekler 10000 g'de 20 dakika santrifüj edildi, ultra saf su ile yıkandı ve santrifüj işlemi tekrar yapıldı. Üst fazın uzaklaştırılması ile elde edilen katı nanopartiküller kurutularak analiz edilmek üzere donduruldu.

##### 4.9.1 Yükleme Veriminin Hesaplanması

Hazırlanan nanopartiküller için yükleme verimi santrifüj aşamasında ayrılan üst fazlardaki serbest peptid miktarının UV spektrofotometre ile 280 nm dalga boyunda yapılan ölçümler ile hesaplanması sonucu gerçekleştirildi (NP1-Boş nanopartikül blank olarak kabul edildi). Üst faz çözeltisinden 1 ml alınarak UV okundu ve daha önceden konsantrasyonu bilinen peptid çözeltileri ile hazırlanan kalibrasyon eğrisi yardımı ile nanopartikülün içerisine girmeyen serbest haldeki peptid miktarı tayin edildi. Serbest

haldeki peptid miktarının hesaplanmasının ardından % yükleme miktarı aşağıda verilen formül ile hesaplandı.

$$\% \text{ Yükleme} = \frac{[\text{Eklenen peptid (mg)} - \text{Uzaklaştırılan peptid (mg)}]}{[\text{Eklenen peptid (mg)}]} \times 100 \quad (4.1)$$

#### 4.9.2 MTT Analizi

İlk defa Mossmann tarafından tanımlanan ve daha sonra Alley ve arkadaşları tarafından geliştirilen 3-(4,5-dimetil triazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliumbromid (MTT) yöntemi hücre canlılığının belirlenmesi için yaygın olarak kullanılan pratik bir yöntemdir [145, 146]. MTT hücrelere aktif olarak absorbe olan ve mitokondriye bağlı bir reaksiyon ile renkli, suda çözünmeyen formazana indirgenen bir maddedir [146]. Hücrelerin MTT indirgeme özelliği hücre canlılığının ölçütü olarak alınır ve MTT analizi sonucunda elde edilen boya yoğunluğu canlı hücre sayısı ile doğru orantı gösterir [147].

W-1L19 sentetik peptidi, NP1, NP3, NP4 ve FITC'nin L-929 fare fibroblast hücrelerine karşı sitotoksiteleri MTT (metil-tiyazoltetrazolyum) yöntemi ile incelendi. MTT analizi için 96 kuyucuklu platlere herbir kuyucuğa  $1 \times 10^4$  hücre (L-929) düşecek şekilde ekim yapıldı ve 24 saat inkübasyonun ardından her bir kuyucuğa farklı konsantrasyonlardaki değişik örnekler (ilaç) eklendi. Serbest peptid için 0,50; 0,4; 0,2; 0,1; 0,05 mg/ml, boş nanopartikül (NP1) 0,50; 0,4; 0,2; 0,1; 0,05 mg/ml, peptid yüklü nanopartikül (NP3) için 0,50; 0,4; 0,2; 0,1; 0,05 mg/ml, peptid+FITC yüklü nanopartikül (NP4) için 0,50; 0,4; 0,2; 0,1; 0,05 mg/ml ve FITC için 0,05; 0,025 mg/ml konsantrasyonlarında çalışıldı. 48 saat ilaç ile inkübasyonun ardından herbir kuyucuğun optik yoğunluk değeri 540 nm'de UV absorpsiyonu okunarak elde edildi. Herbir örnek için % hücre canlılığı aşağıda verilen formül ile hesaplandı (Kontrol ve her bir örneğin farklı konsantrasyonları için 3 tekrar çalışıldı ve ortalama alınarak % canlılık hesaplandı).

$$\% \text{ Canlılık} = \frac{\text{İlaç yüklü orneklerle ait } OD_{540 \text{ nm}}}{\text{Kontrol grubuna ait } OD_{540 \text{ nm}}} \times 100 \quad (4.2)$$

#### **4.9.3 Nanopartiküllerin Salımlarının İncelenmesi**

5 mg peptid yüklü PLGA nanopartikül 1,5 ml PBS tamponunda süspanse edildi, (pH=7,4) 37 °C'de yatay çalkalayıcıda çalkalandı. Belirli sürelerde örnek santrifüj edildi, üst faz UV okunmak üzere alındı, katı pellet taze salım ortamı ilave edilerek tekrar süspanse edildi. Alınan örnekler UV spektrofotometre'de 280 nm'de okunarak analiz edildi.

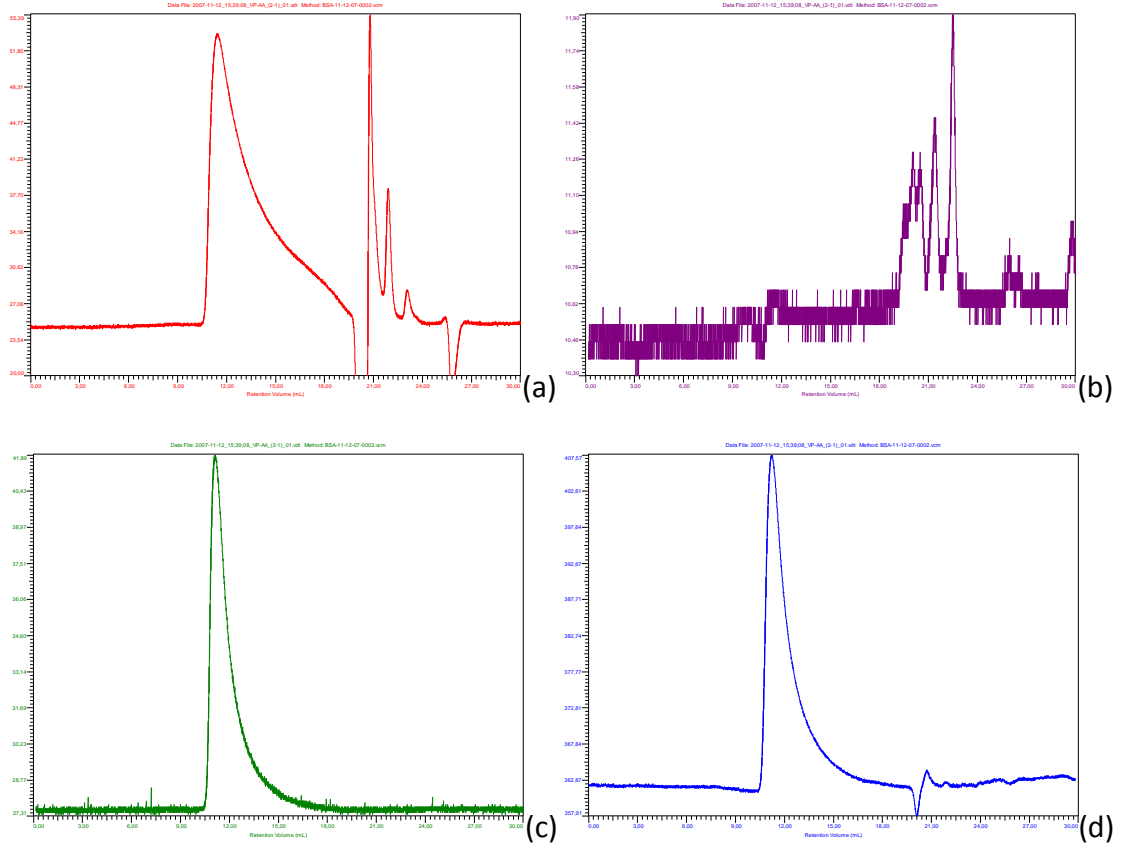
### DENEY SONUÇLARI

#### 5.1 Poli(N-Vinil-2-pirolidon-ko-Akrilik asit) (2:1) Polimerinin Analizi

Bu tez çalışmasında kullanılan polimerik taşıyıcılardan biri olan N-vinil-2-pirolidon-ko-akrilik asit [P(VP-ko-AA)] polimeri benzoilperoksit başlatıcısı varlığında tarafımızdan sentezlendi. Bölümümüzde bulunan dört detektörlü jel geçirgenlik kromatografisi (GPC), Fourier Transform Infrared (FT-IR) spektroskopisi, Zetasizer cihazları kullanılarak analiz edilen kopolimere ait analiz sonuçları Şekil 5.1 – Şekil 5.3'te verilmiştir. Şekil 5.1'de [P(VP-ko-AA)] polimerinin refraktif indeks, UV, ışık saçılması ve viskozimetre dedektörlerinden elde edilen GPC kromatogramları verilmektedir.

Kopolimerin ağırlık ortalama molekül ağırlığı (Mw) jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) prensibine göre çalışan dört detektörlü Viskotek cihazında yapılan analiz sonrası cihaz tarafından hesaplandı. Molekül ağırlığı tayini için GPC cihazında kopolimere uygun olan kolon takıldı ve kopolimerin molekül ağırlığı Mw=120.000 Da olarak bulundu.

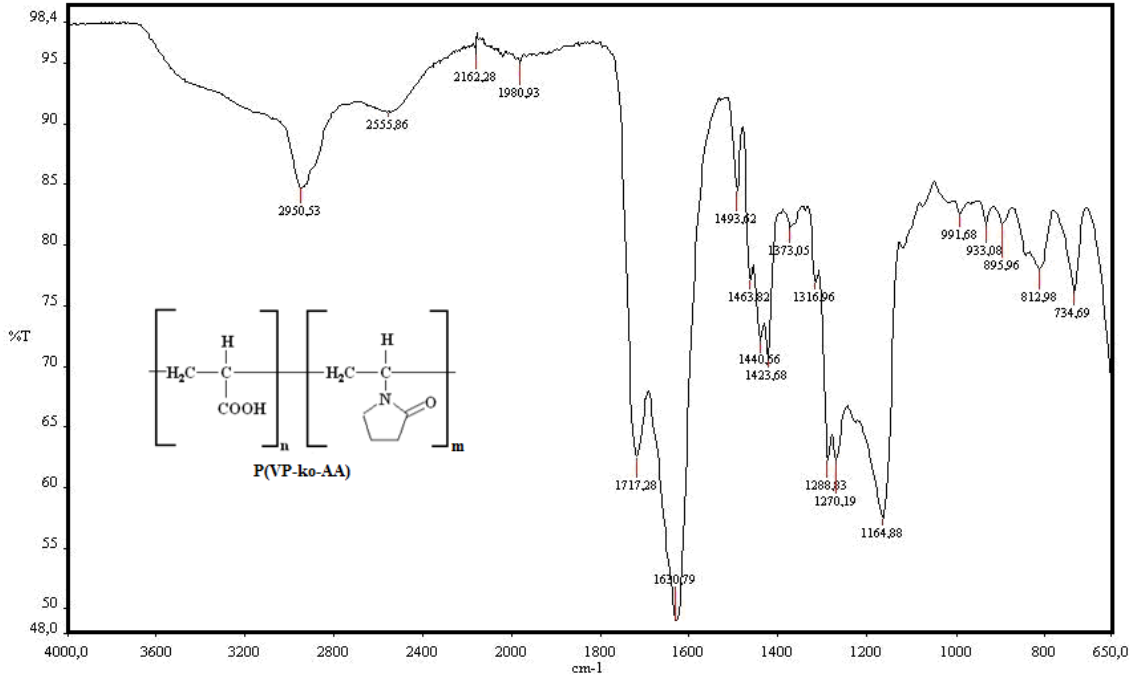
P(VP-ko-AA) kopolimerinin bileşenlerinin molar oranı VP:AA = 2:1 olacak şekilde sentezlendi. P(VP-ko-AA) (2:1) kopolimeri içerisindeki N-vinil-2-pirolidon grubunun oranının artırılması ve akrilikasid grubunun molar oranının düşürülmesi ile polimerin biyoyumluluğunun artması sağlanmıştır. Sentezlenen P(VP-ko-AA) kopolimerinin, canlı sistemde kalma süresi (prolongation) ise daha düşük molekül ağırlıklı P(VP-ko-AA) kopolimerlere kıyasla daha uzundur.



Şekil 5. 1 Klasik (Termal) yöntemle sentezlenen P(VP-ko-AA) (2:1) kopolimerlerine ait GPC-Refraktif İndeks (a), UV (b), Işık Saçılması (c) ve Viskozimetre (d) kromatogramı

Sentezlenen kopolimere ait FT-IR spektrumu Şekil 5.2'de görülmektedir. FT-IR spektrumunun analizi, P(VP-ko-AA) kopolimerinin yapısında bulunan akrilik asit ve N-vinil-2-pirolidon monomerlerinden sentezlenen poli(N-vinil-2-pirolidon) (PVP) ve poliakrilik asit (PAA) homopolimerlerine ait FT-IR spektrumlarının Çizelge 5. 1 ve Çizelge 5. 2'de verilen bant aralıkları ile kıyaslamalı olarak gerçekleştirildi.





Şekil 5. 2 Termal yöntemle sentezlenen P(VP-ko-AA) (2:1) kopolimerine ait FT-IR spektrumu

Çizelge 5. 1 Polivinilpirolidon (PVP) FT-IR analiz sonuçları

Bant aralığı (cm <sup>-1</sup> )	Bileşenler
100–1200 cm <sup>-1</sup>	C–N absorpsiyon bandı
2900 cm <sup>-1</sup>	C–H gerilme titreşimleri
1703 cm <sup>-1</sup>	C=O gerilme bandı piki
1436 cm <sup>-1</sup>	Pirolidon halkasında bulunan C–C' a ait gerilme bandı (Şolpan, 2005; Chadra, 2006)

Çizelge 5. 2 Poliakrilik asit (PAA) FT-IR analiz sonuçları

Bant aralığı	Bileşenler
3000–3500 cm <sup>-1</sup> 2500-2700 cm <sup>-1</sup>	O–H bandı
2900 cm <sup>-1</sup>	C–H gerilme titreşimleri
1485 cm <sup>-1</sup> , 1396 cm <sup>-1</sup> ve 1700 cm <sup>-1</sup>	COOH (Şolpan, 2005)

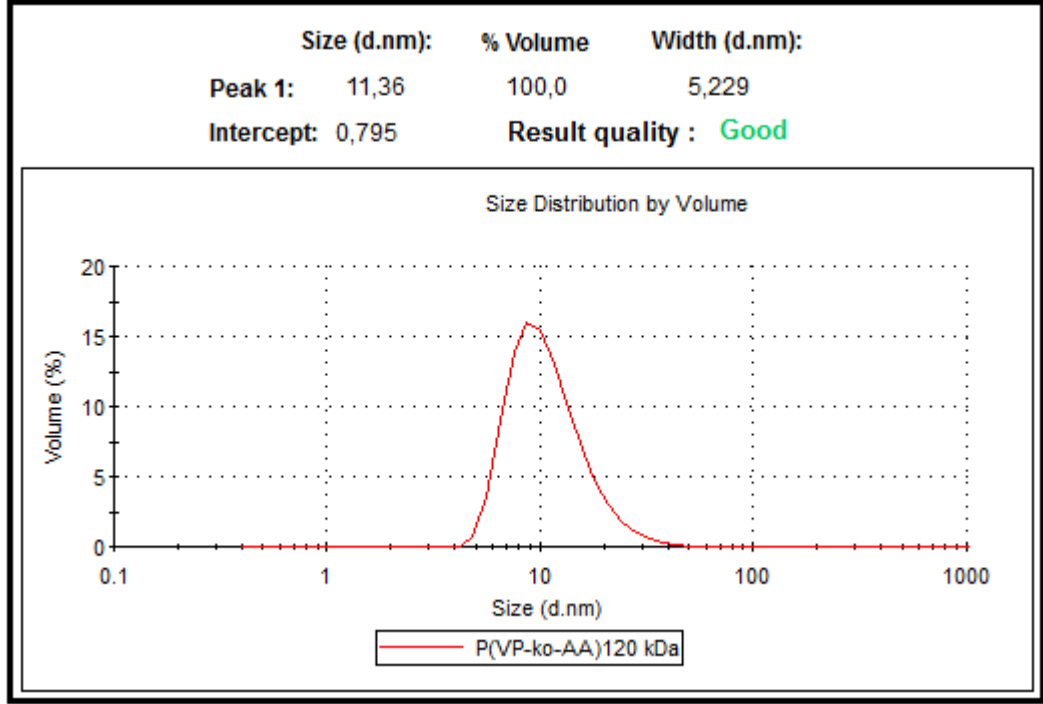
Laboratuvarımızda sentezlenen kopolimere ait FT-IR spektrumundaki bantların analizi ise Çizelge 5. 3'te verildi.

Çizelge 5. 3 Poli(N-vinil-2-pirolidon-ko-akrilik asit) [P(VP-ko-AA)] FT-IR analizi sonuçları

Bant aralığı	Bileşenler
1160 cm <sup>-1</sup>	Akrilik asit karboksil grubu C-O gerilme bandına ait pik
1180-1360 cm <sup>-1</sup>	Pirolidonda yer alan C-N gerilme bandı piki
1340-1470 cm <sup>-1</sup>	Zincirdeki -CH <sub>2</sub> - grupları
1422 - 1442 cm <sup>-1</sup>	Pirolidon halkasındaki (C-C) gerilme bandı
1629 cm <sup>-1</sup>	Pirolidon grubundaki amide (CONR <sub>2</sub> ) ait karbonil gerilme band piki
1717 cm <sup>-1</sup>	Akrilik asitdeki C=O gerilme bandı piki
2931 cm <sup>-1</sup>	Alkan C-H gerilme bandı piki
3450	Karboksilikasid O-H gerilme bandı

Poli(N-vinil-2-pirolidon-ko-akrilik asit) polimerizasyonunun oluşumunu tespit etmek için yapılan FT-IR analizinde elde edilen spektrumda her iki homopolimerde mevcut olan bantlar görüldü. 1690-1760 cm<sup>-1</sup>, 1180-1360 cm<sup>-1</sup>, 1422 ve 1442 cm<sup>-1</sup>'de oluşan pikler kopolimerizasyonun gerçekleştiğini kanıtlayan en önemli piklerdir. Karboksilik gruplarında yer alan C=O' a ait pik 1717 cm<sup>-1</sup>' de görülürken, pirolidon halkasında yer alan C-C' a ait pikler 1423 cm<sup>-1</sup>'de görülmektedir. Analiz sonuçları AA monomerinin VP monomeri ile kopolimerleşmesinin gerçekleştiğini göstermektedir.

Poli(N-vinil-2-pirolidon-ko-akrilik asit) polimerinin Zetasizer cihazında yapılan boyut analizinde polimerin boyutu 11,36 nm olarak bulunmuştur (Şekil 5.3).



Şekil 5. 3 Poli(N-vinil-2-pirolidon-ko-akrilik asit) polimerine ait zetasizer boyut analizi

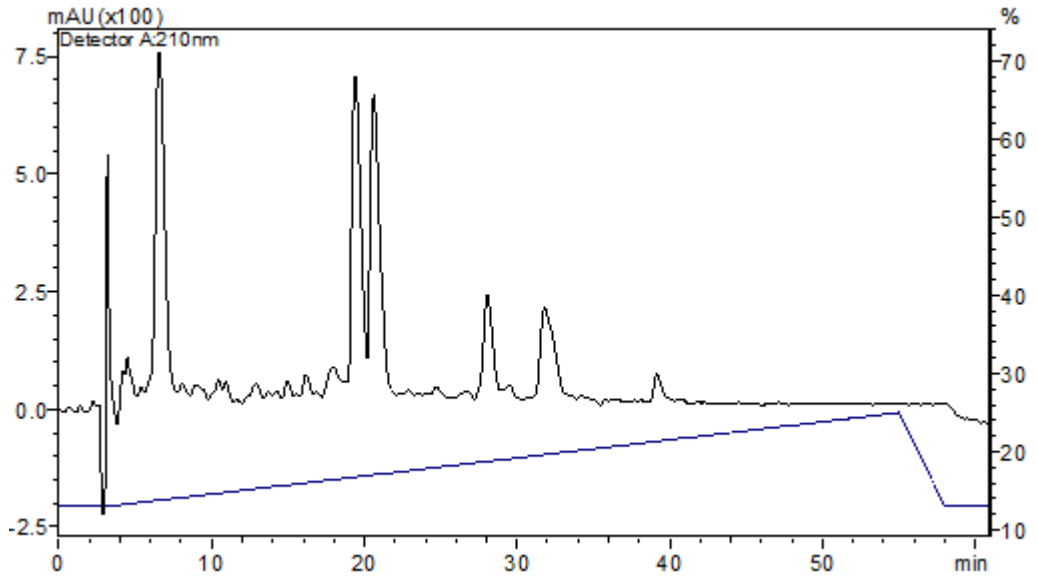
## 5.2 Canine Parvovirus W-7L20 Dizili Sentetik Peptidinin Analizi

Bölümümüz laboratuvarında sentezlenen W-7L20 (W-Q-P-D-G-G-Q-P-A-V-R-N-E-R-A) sentetik peptidi LC-MS cihazı ile analiz edildi ve elde edilen kromatogramda görülen piklerin molekül ağırlıkları hesaplandı. LC-MS cihazı ile analiz edilen peptid dizisi ters faz sıvı kromatografi sistemi kullanılarak saflaştırıldı. UV kromatogramında görülen her iki pik ayrı ayrı fraksiyonlandı. Her iki fraksiyon LC-MS cihazı ile analiz edildi ve iki pikin de molekül ağırlığı hesaplandı. Her iki pikin molekül ağırlığının da aynı olduğu saptandı. Sterio izomer yapıları bulunan peptidin molekül ağırlığı tayini Jel geçirgenlik kromatografisi prensibi ile çalışan GPC-Viskotek cihazı (Vizkozite, Kırılma indisi, UV ve Işık saçılması detektörleri kullanılarak) tekrardan hesaplandı ve elde edilen değerler karşılaştırıldı.

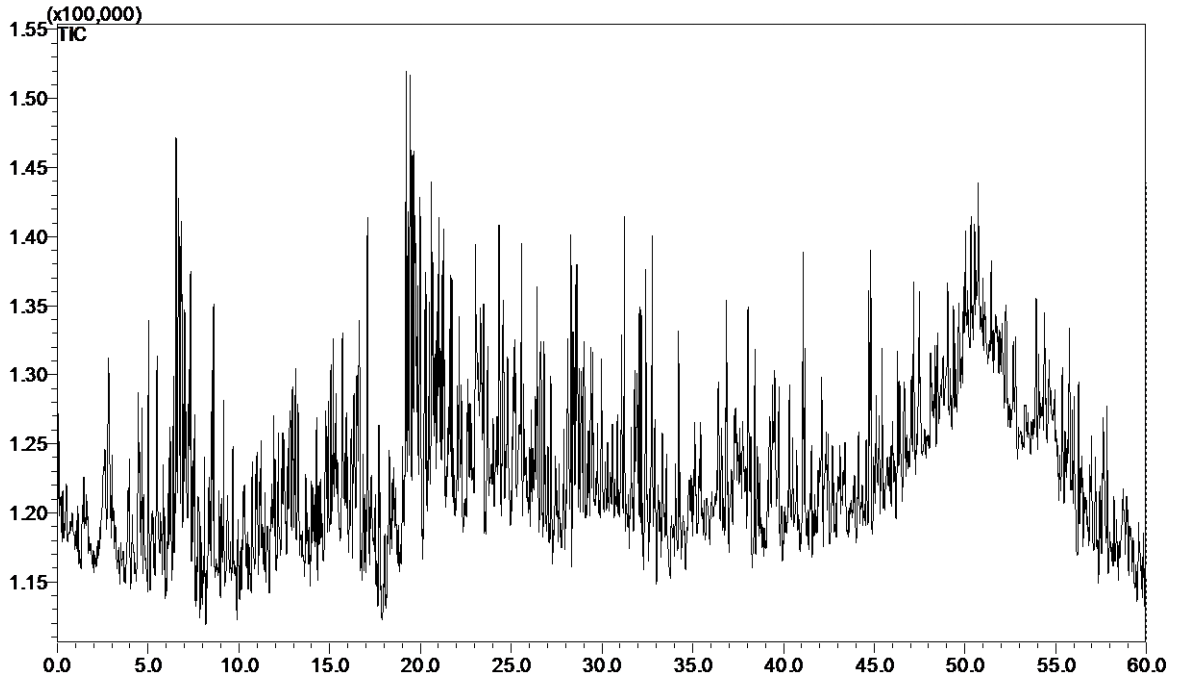
### 5.2.1 Canine Parvovirus W-7L20 Dizili Sentetik Peptidin LC-MS Analizi

CEM marka katı faz peptid sentez cihazında ham olarak sentezlenen VP2 W-7L20 sentetik peptid dizisi LC-MS cihazında aşağıdaki şartarda ve oda sıcaklığında analiz edildi (Şekil 5.4).

- Akış hızı: 0,2 mL/dak
- Mobil Faz A: Su (%0,1 TFA)
- Mobil Faz B:Asetonitril (%0,085 TFA)
- Kolon: Teknokroma Tracer Excel 120 ODS-A 0,5um 20x0,21
- UV Dedektör: 210 nm
- Gradient: %13 B 0-4 dak, %13-24 B 4-54 dak
- İyonlaştırma yöntemi ESI (+)

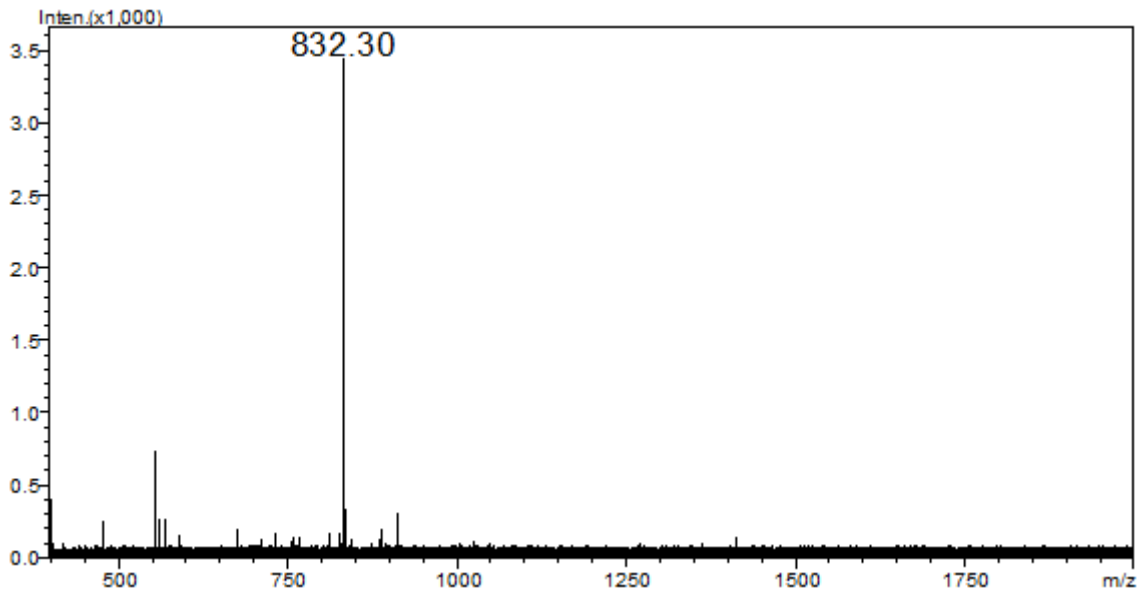


Şekil 5. 4 Sentezlenen Canine Parvovirus W-7L20 ham peptidin preparatif LC-MS cihazı UV kromatogramı



Şekil 5. 5 Sentezlenen Canine Parvovirus W-7L20 ham peptidi LC-MS cihazı Toplam İyon Kromatogramı

ESI (+) yöntemi ile iyonlaştırılan ham W-7L20 peptidinden elde edilen toplam iyon kromatogramı (Şekil 5.5) ve bu kromatogramdaki piklere ait kütle spektrumları (Şekil 5.6) kullanılarak sentezlenen ham peptidin her iki pikinin de molekül ağırlığı hesabı yapıldı.



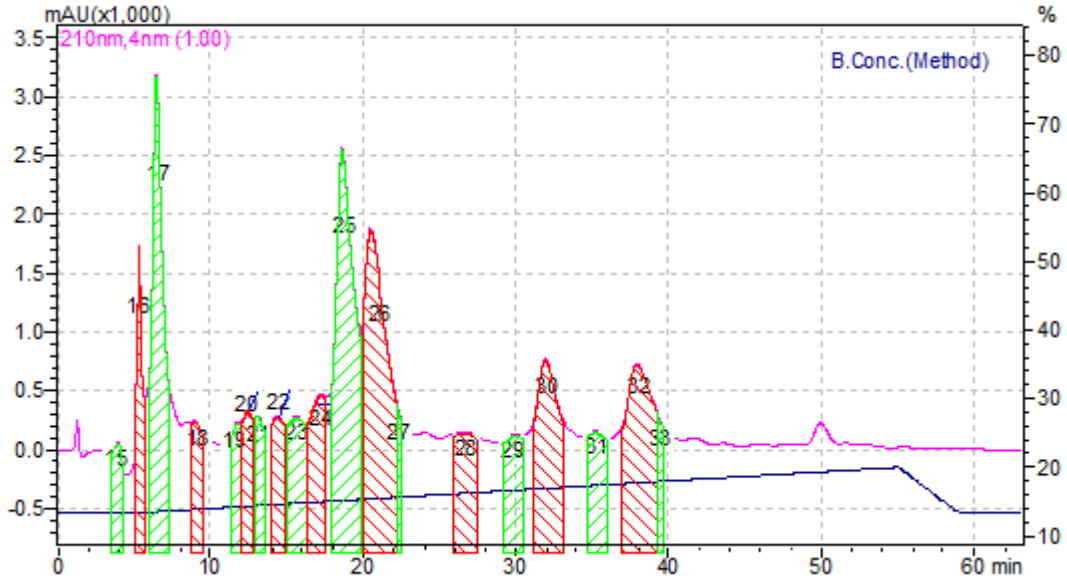
Şekil 5. 6 Sentezlenen Canine Parvovirus W-7L20 ham peptidine ait **19.154 → 21.700** dakikalar arasındaki kütle spektrumu

Toplam iyon kromatogramında 19.154 ile 21.700 dakikalar arasında gözlenen pike ait kütle spektrumundan 555,55; 832,30 ve 832,50 iyonları kullanılarak molekül ağırlığı aşağıdaki şekilde hesaplandı.

$[M+3H^+]^{3+}=555,55 \rightarrow M = 1663,63 \text{ Da}$	$[M+2H^+]^{2+}=832,60 \rightarrow M = 1663,19 \text{ Da}$
$[M+2H^+]^{2+}=832,30 \rightarrow M = 1662,59 \text{ Da}$	$M_{\text{hesaplanan}} = 1662,91 \text{ Da}$ $M_{\text{teorik}}=1680,8 \text{ Da}$

Teorik molekül ağırlığı 1680,8 Da olarak hesaplanan Canine Parvovirus W-7L20 peptidine ait LC-MS analizi sonucu deneysel olarak hesaplanan molekül ağırlığı 1662,91 Da olarak bulundu. Teorik ve deneysel molekül ağırlıkları arasında 18 Da fark bulunmaktadır. Bu da peptid dizisinin yapısından bir mol suyun kaybolduğunu yani peptid dizisinin dehidrasyona uğradığını göstermektedir. Bu durum literatürde Asparagin ve Glutamin aminoasidlerini yapısında yan yana bulunduran peptidlerde koruma grupları kaldırılırken (deprotection) yada reçinden peptid dizisinin ayrılması sırasında (cleavage) sıcaklığın yükselmesi ile birlikte yapıdan su molekülünün uzaklaştığı şeklinde açıklanmaktadır [145] . LC-MS cihazında analizi yapılan ve deneysel olarak molekül ağırlığı hesaplanan peptid dizisinin preparatif HPLC ile aşağıda verilen analiz koşullarında UV detektör yardımı ile analizi yapıldı ve analiz sonrasında her iki pik ayrı ayrı fraksiyonlanarak toplandı.

- Akış hızı: 14 mL/dak
- Mobil Faz A: Su (%0,1 TFA)
- Mobil Faz B:Asetonitril (%0,085 TFA)
- Kolon: Shimadzu PRC-ODS 30x2,1
- UV Dedektör: 210 nm
- Gradient: %13 B 0-5 dak, %13-24 B 5-55 dak

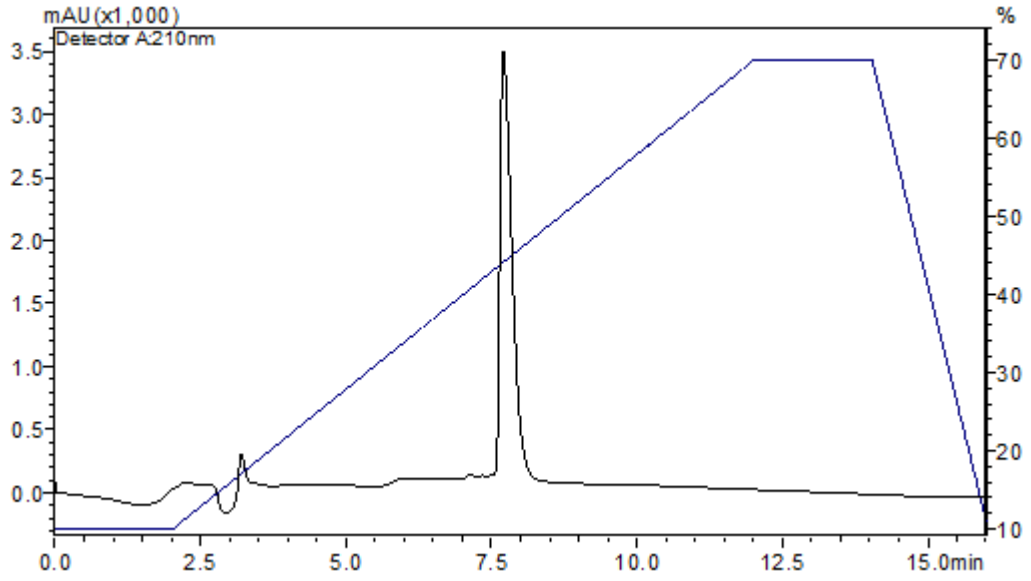


Şekil 5. 7 Sentezlenen Canine Parvovirus W-7L20 ham peptidine ait preparatif HPLC kromatogramı

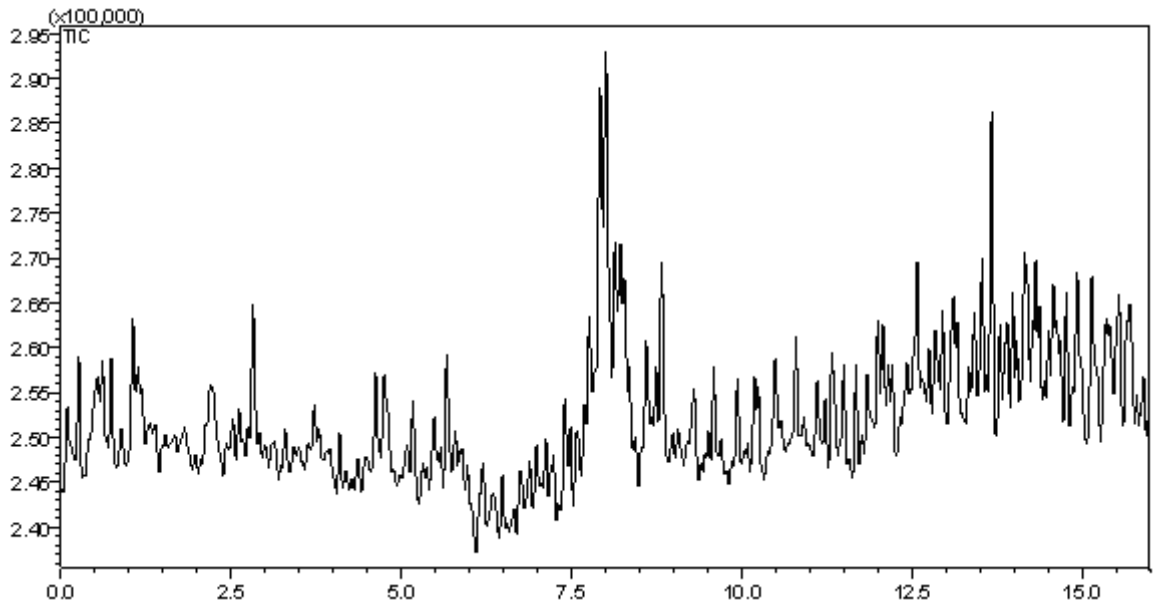
Şekil 5.7'de ki UV kromatogramında 25 ve 26 olarak numaralanmış olan pikler Pik 1 ve Pik 2 olarak ayrı ayrı toplandı ve bu fraksiyonlar LC-MS cihazında aşağıda verilen şartlarda molekül ağırlıklarının hesaplanması için tekrardan analiz edildi.

- Akış hızı: 0,2 mL/dak
- Mobil Faz A: Su (%0,1 TFA)
- Mobil Faz B:Asetonitril (%0,085 TFA)
- Kolon: Teknokroma Tracer Excel 120 ODS-A 0,5um 20x0,21
- UV Dedektör: 210 nm
- Gradient: %13 B 0-4 dak, %13-24 B 4-54 dak
- İyonlaştırma yöntemi ESI (+)

Her iki fraksiyon için LC-MS analizi sonrasında UV kromatogramları, toplam iyon kromatogramları ve toplam iyon kromatogramlarındaki piklere ait kütle spektrumları elde edildi ve bu sonuçlar Şekil 5.8 - Şekil 5.13'te sırası ile verildi.

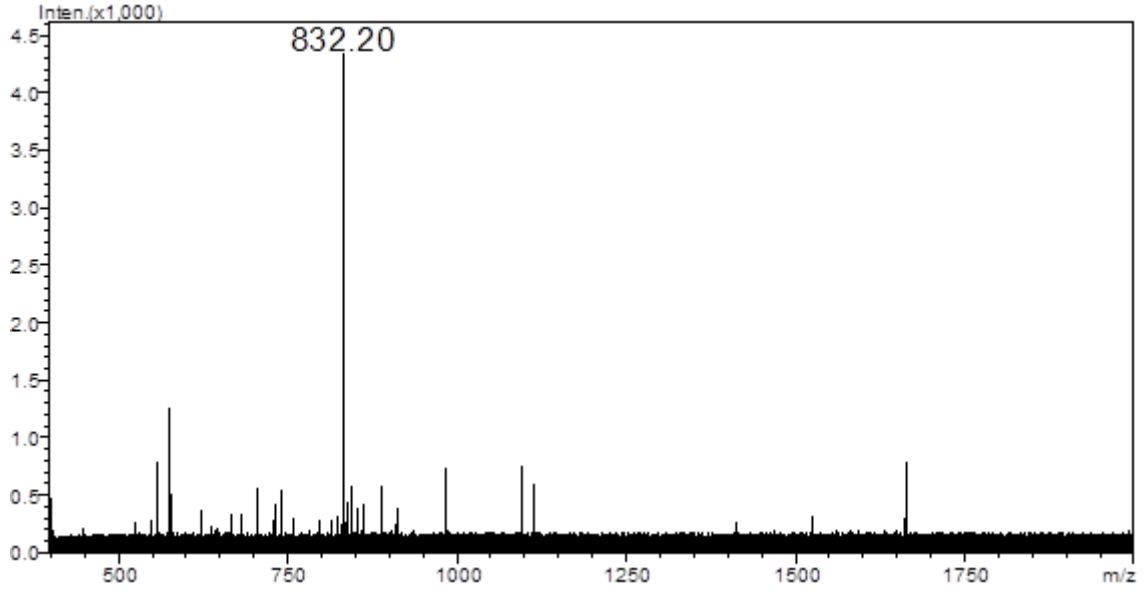


Şekil 5. 8 Canine Parvovirus W-7L20 ham peptid dizisinin saflaştırılmasından elde edilen Pik1'in Preparatif LC-MS cihazı UV kromatogramı



Şekil 5. 9 Canine Parvovirus W-7L20 ham peptid dizisinin saflaştırılmasından elde edilen Pik1'in Preparatif LC-MS cihazı Toplam İyon kromatogramı

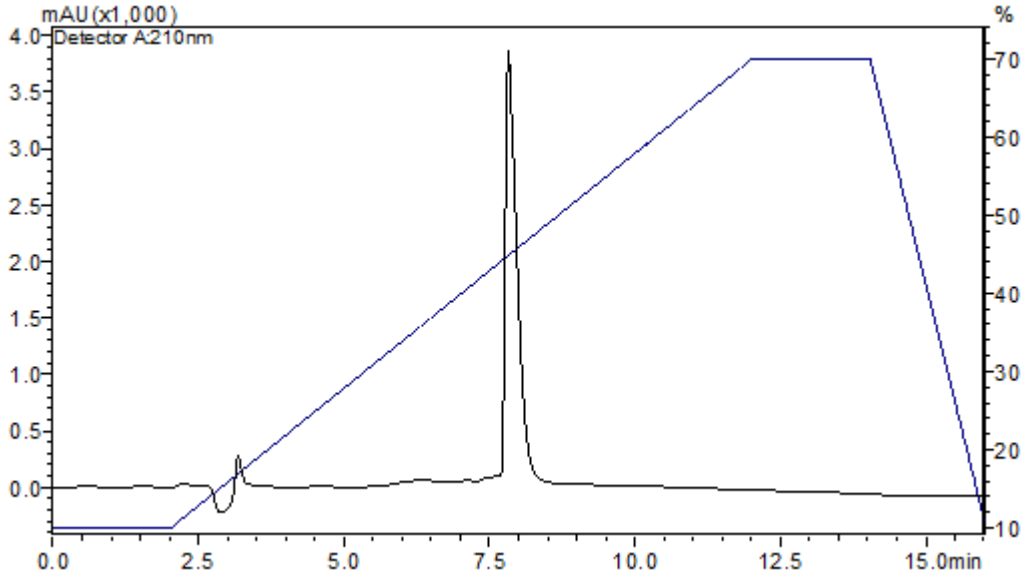




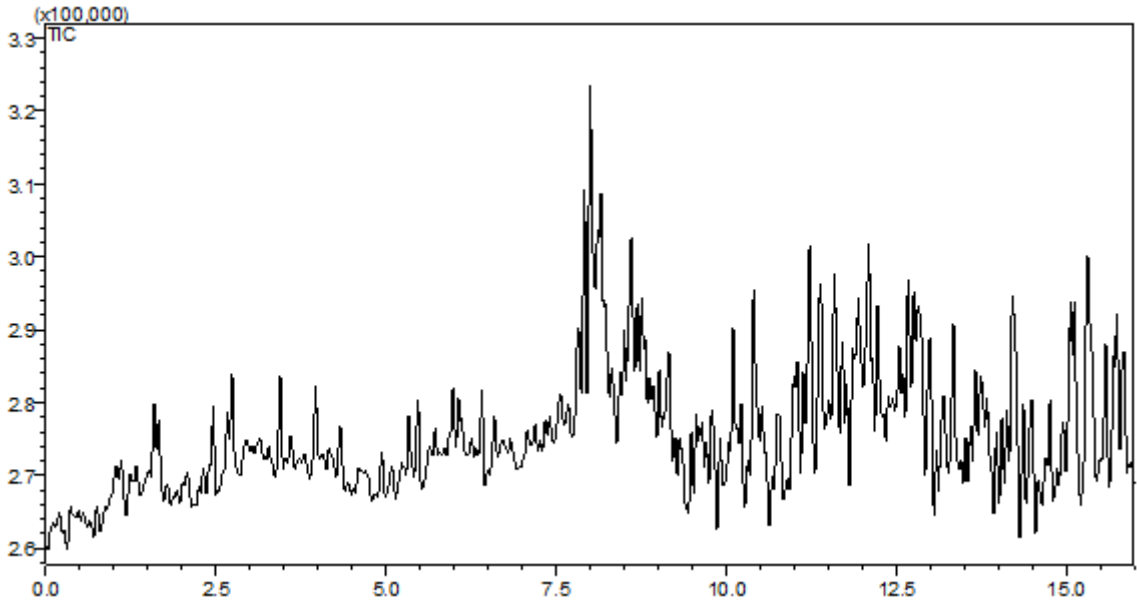
Şekil 5. 10 Canine Parvovirus W-7L20 ham peptidine ait Pik 1 fraksiyonunun **7.692 → 8.308** dakikalar arasındaki kütle spektrumu

Toplam iyon kromatogramında **7.692 → 8.308** dakikalar arasında gözlenen pike ait kütle spektrumundan 555,55; 832,20; 832,40 ve 1663,9 iyonları kullanılarak molekül ağırlığı aşağıdaki şekilde hesaplandı.

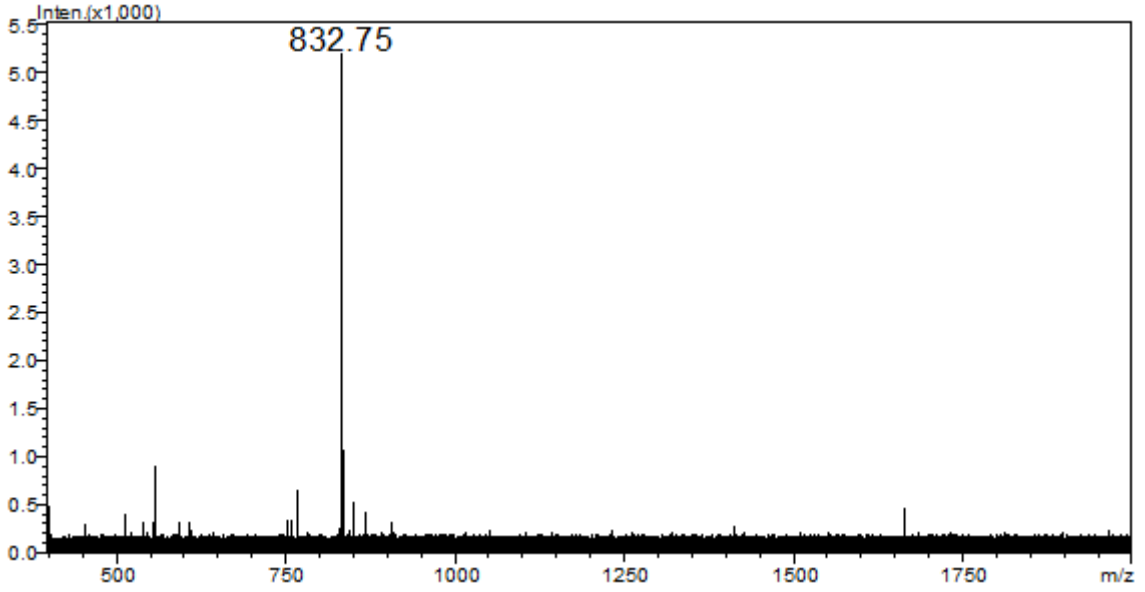
$[M+3H^+]^{3+}=555,55 \rightarrow M = 1663,63 \text{ Da}$	$[M+2H^+]^{2+}=832,20 \rightarrow M = 1662,39 \text{ Da}$
$[M+2H^+]^{2+}=832,40 \rightarrow M = 1664,79 \text{ Da}$	$[M+H^+]^+=1663,90 \rightarrow M = 1662,89 \text{ Da}$
$M_{\text{hesaplanan}} = 1663,48 \text{ Da}$	$M_{\text{teorik}}=1680,8 \text{ Da}$



Şekil 5. 31 Canine Parvovirus W-7L20 ham peptid dizisinin saflaştırılmasından elde edilen Pik2'in Preparatif LC-MS cihazı UV kromatogramı



Şekil 5. 42 Canine Parvovirus W-7L20 ham peptid dizisinin saflaştırılmasından elde edilen Pik2'in Preparatif LC-MS cihazı Toplam İyon kromatogramı



Şekil 5. 53 Canine Parvovirus W-7L20 ham peptidine ait Pik 2 fraksiyonunun **7.767** → **8.438** dakikalar arasındaki kütle spektrumu

Toplam iyon kromatogramında **7.767** → **8.438** dakikalar arasında gözlenen pike ait kütle spektrumundan 555,80; 832,20; 832,75 ve 1664,55 iyonları kullanılarak molekül ağırlığı aşağıdaki şekilde hesaplandı.

$[M+3H^+]^{3+}=555,80 \rightarrow M = 1664,38 \text{ Da}$	$[M+2H^+]^{2+}=832,20 \rightarrow M = 1662,39 \text{ Da}$
$[M+2H^+]^{2+}=832,75 \rightarrow M = 1663,48 \text{ Da}$	$[M+H^+]^+=1664,55 \rightarrow M = 1663,54 \text{ Da}$
$M_{\text{hesaplanan}} = 1663,12 \text{ Da}$	$M_{\text{teorik}}=1680,8 \text{ Da}$

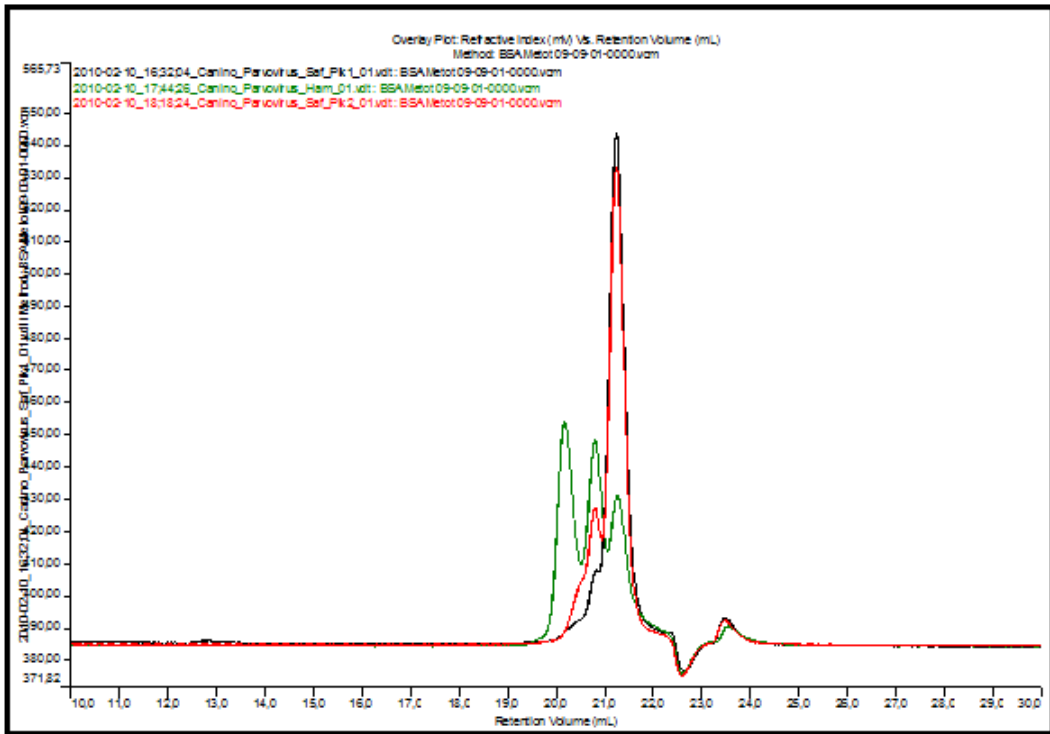
Fraksiyonlama sonucu elde edilen Pik 1 ve Pik 2'ye ait UV kromatogramları incelendiğinde iki pikinde oldukça saf olarak elde edildiği görülmektedir. İki pikin molekül ağırlıkları sırası ile 1663,48 Da ve 1663,12 Da olarak bulundu. Bu da ham peptid UV kromatogramında görülen iki pikin sterio izomer pikler olduğunu göstermektedir.

### 5.2.2 Canine Parvovirus W-7L20 Dizili Sentetik Peptidin Jel Geçirgenlik Kromatografisi Analizi

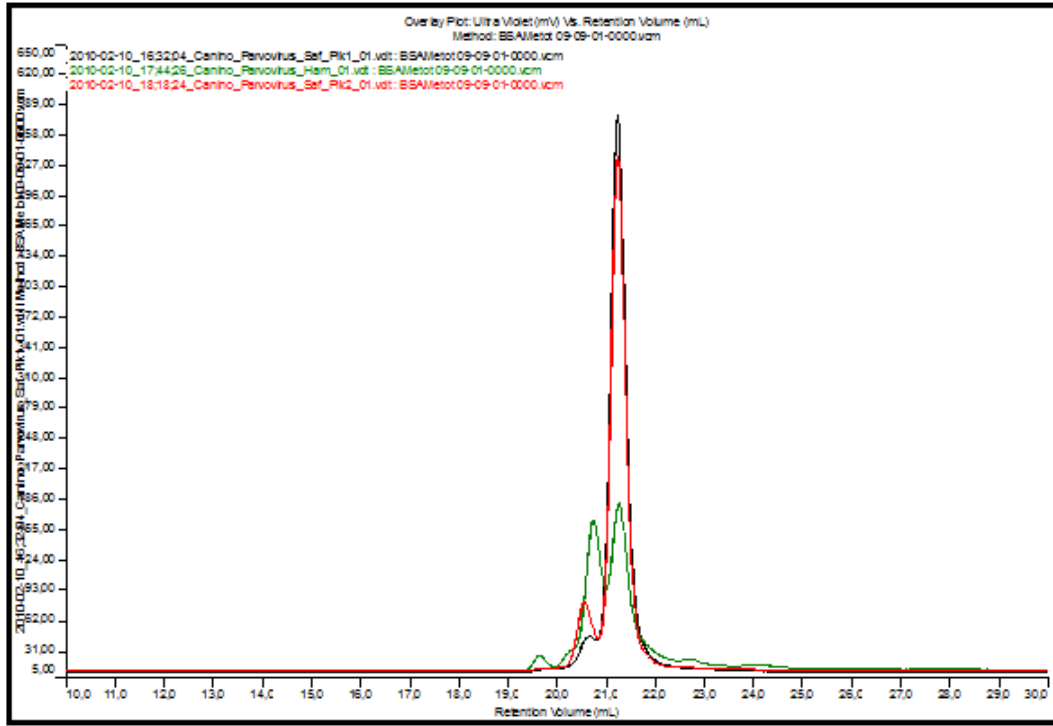
Bölümümüzde bulunan ve jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) temeline dayalı olarak çalışan GPC-Viscotek cihazı (Vizkozite, Kırılma indisi, UV ve Işık saçılması detektörleri)

ile ham peptid (1mg/ml) ve karşılaştırmalı olarak Pik 1 (1 mg/ml) ve Pik 2 (1 mg/ml) numuneleri aşağıda verilen analiz koşullarında incelendi. Elde edilen sonuçlar Şekil 5.14 ile Şekil 5.17 arasında verildi.

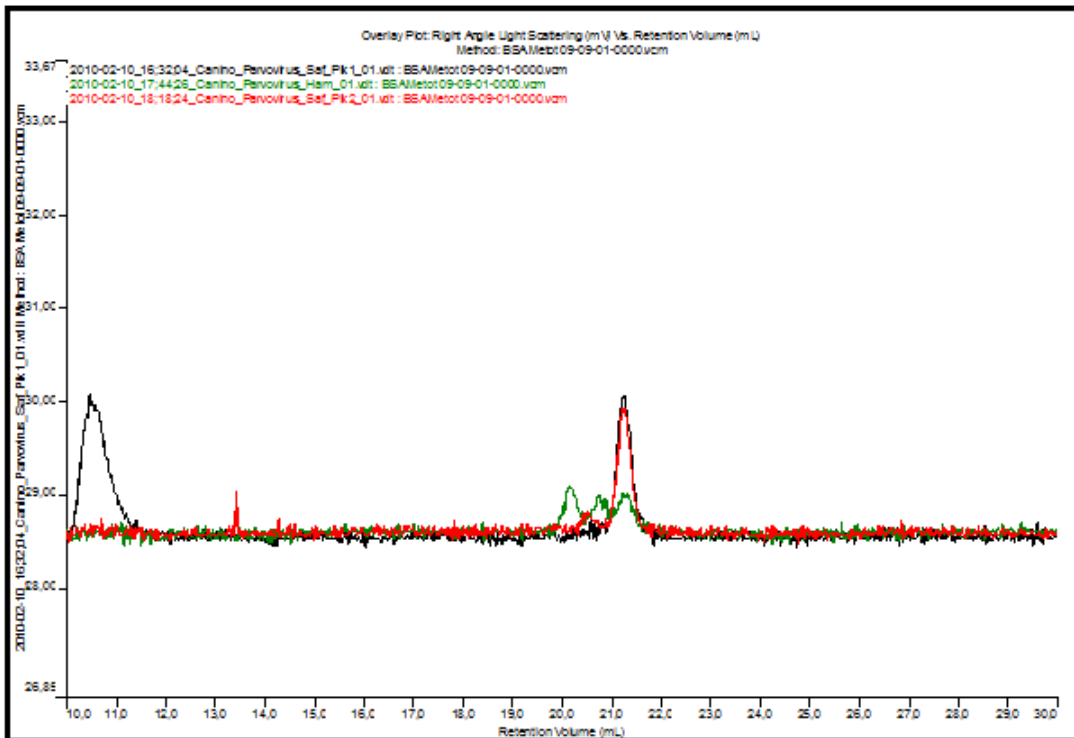
- Akış hızı: 1 mL/dak
- Hareketli Faz: PBS tamponu (pH=7)
- Kolon: Shim-Pack Diol 300 (50 cm)
- UV Dedektör: 280 nm



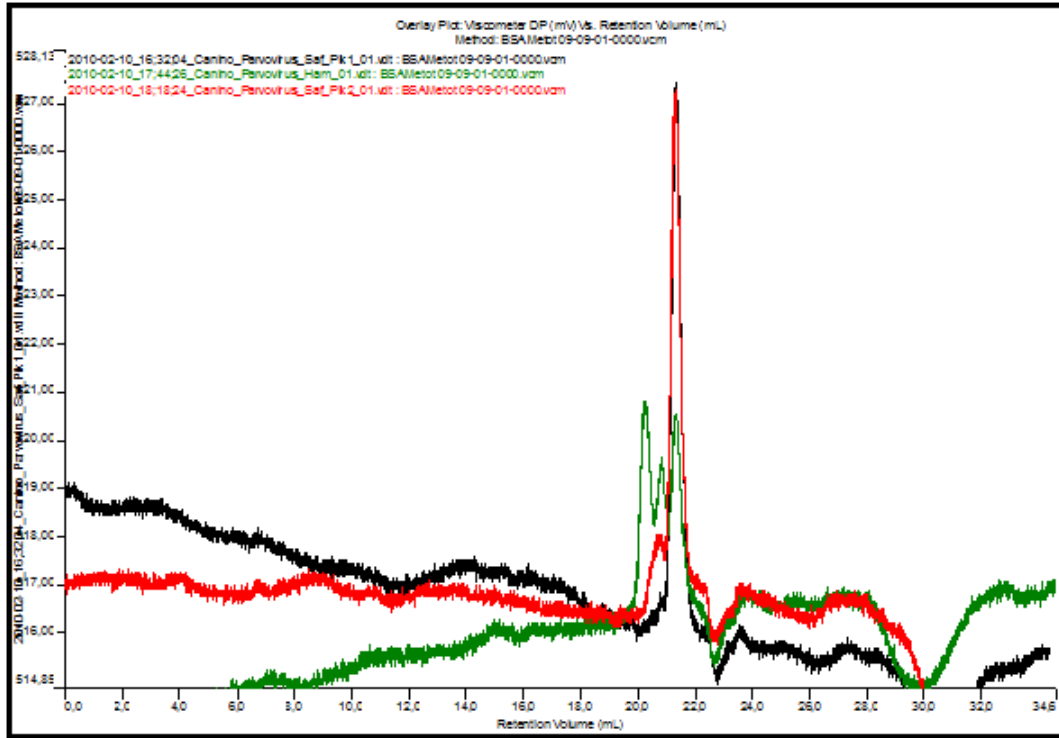
Şekil 5. 14 pH 7'de hazırlanmış Canine Parvovirus W-7L20 ham peptidi (◆), Pik 1 (◆) ve Pik 2 (◆)'ye ait GPC Kırılma İndisi detektörü kromatogramları



Şekil 5. 15 pH 7'de hazırlanmış Canine Parvovirus W-7L20 ham peptidi (◆), Pik 1 (◆) ve Pik 2 (◆)'ye ait GPC UV detektörü kromatogramları



Şekil 5. 16 pH 7'de hazırlanmış Canine Parvovirus W-7L20 ham peptidi (◆), Pik 1 (◆) ve Pik 2 (◆)'ye ait GPC Işık Saçılması detektörü kromatogramları



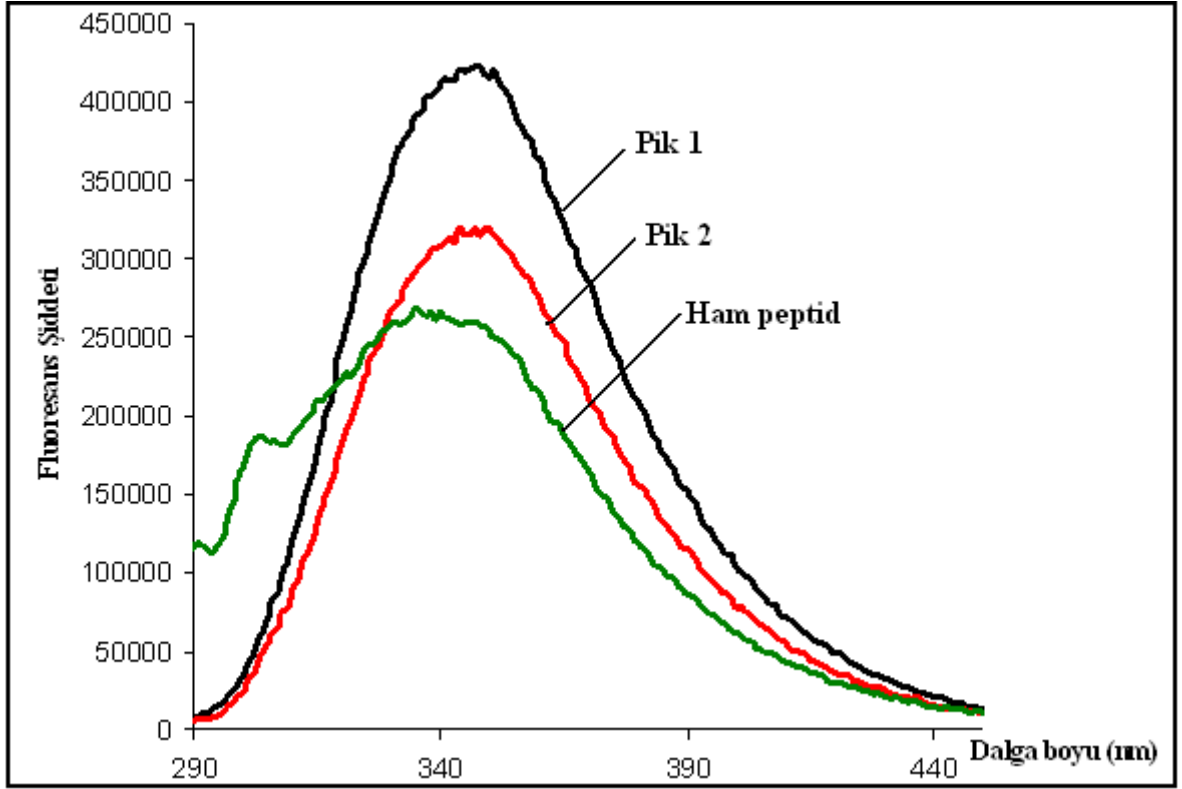
Şekil 5. 17 pH 7’de hazırlanmış Canine Parvovirus W-7L20 ham peptidi (◆), Pik 1 (◆) ve Pik 2 (◆)’ye ait GPC Vizkozite detektörü kromatogramları

Elde edilen GPC kromatogramlarından Pik 1 ve Pik 2’nin çıktığı zaman aralığının aynı olduğu ve iki pikin birbiri ile çakıştığı ve iki pikin Stereoizomer olduğu görüldü. Ayrıca ham peptide tüm kromatogramlarda üç adet pik görülürken Pik 1 ve Pik 2’ye ait kromatogramlarda saf ve tek pik gözlemlendi.

### 5.2.3 Canine Parvovirus W-7L20 Dizili Sentetik Peptidin Floresans Spektroskopisi Analizi

Proteinler ve peptidlerdeki floresans özellik; triptofan, tirozin ve fenilalanin aminoasitlerinin yapıda bulunması ile sağlanmakta en yüksek kuantum verimi ile floresans özellik ise triptofanda görülmektedir. Bu tez çalışmasında peptid ve sonrasında sentezlenecek biyokonjugat moleküllerinde bağlanmanın gerçekleşip gerçekleşmediği ya da bağlanma sonrasında ne tür fizikokimyasal değişikliklerin meydana geldiğini analiz edebilmek için sentezlenen peptid molekülüne ait diziyeye triptofan aminoasidini eklendi. Triptofan amino asidi ile kazandırılan floresans özelliği ile ham peptid (1 mg/ml) ve karşılaştırmalı olarak Pik 1 (1 mg/ml) ve Pik 2 (1 mg/ml) olarak adlandırdığımız fraksiyonların floresans ölçümleri yapıldı ve elde edilen

sepktrum Şekil 5.18’de verildi.

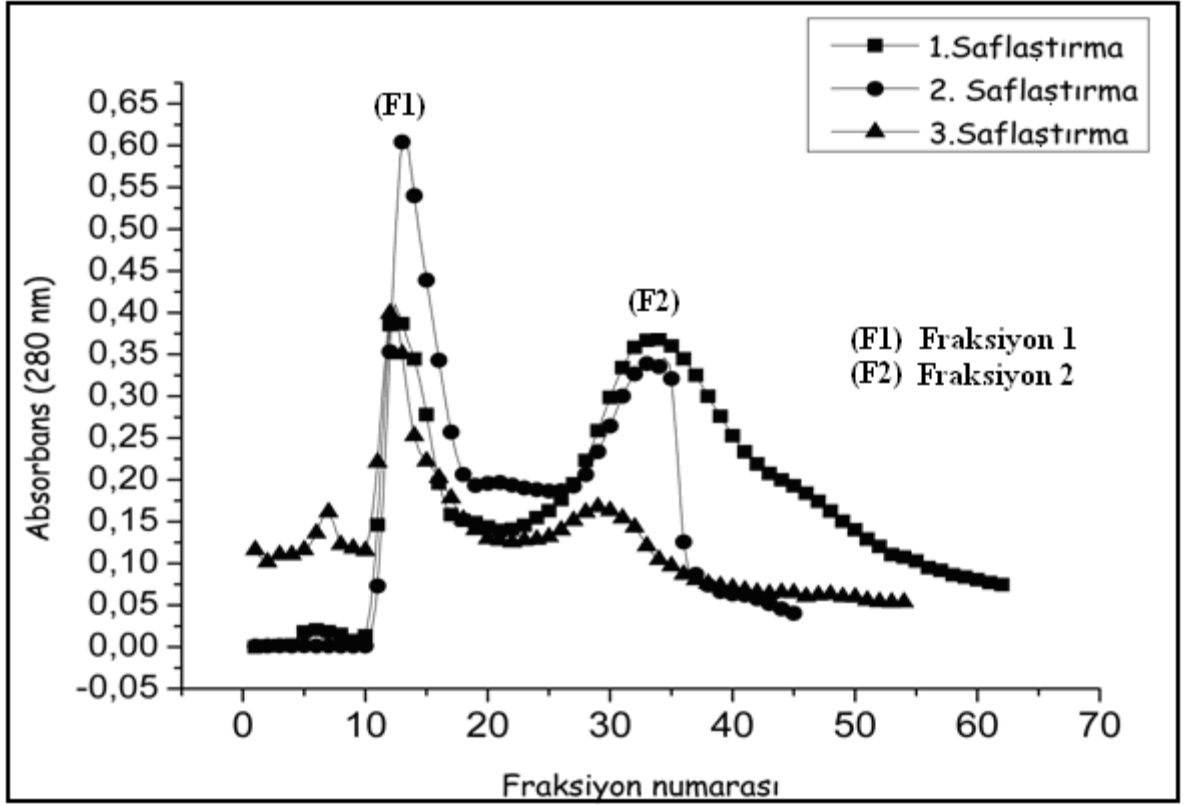


Şekil 5. 18 pH 7’de hazırlanmış Canine Parvovirus W-7L20 ham peptidi (◆), Pik 1 (◆) ve Pik 2 (◆)’ye ait karşılaştırmalı Fluoresans Spektrumu

Ham peptid ile karşılaştırmalı olarak Fluoresans Spektrumu alınan Pik 1 ve Pik 2’nin miktarlarının aynı olmasına karşın her iki fraksiyonun fluoresans şiddetinin de ham peptide göre daha fazla olduğu görüldü.

#### 5.2.4 Canine Parvovirus W-7L20 Dizili Sentetik Peptidin Toyopearl Dolgulu Kolonda Saflaştırılması

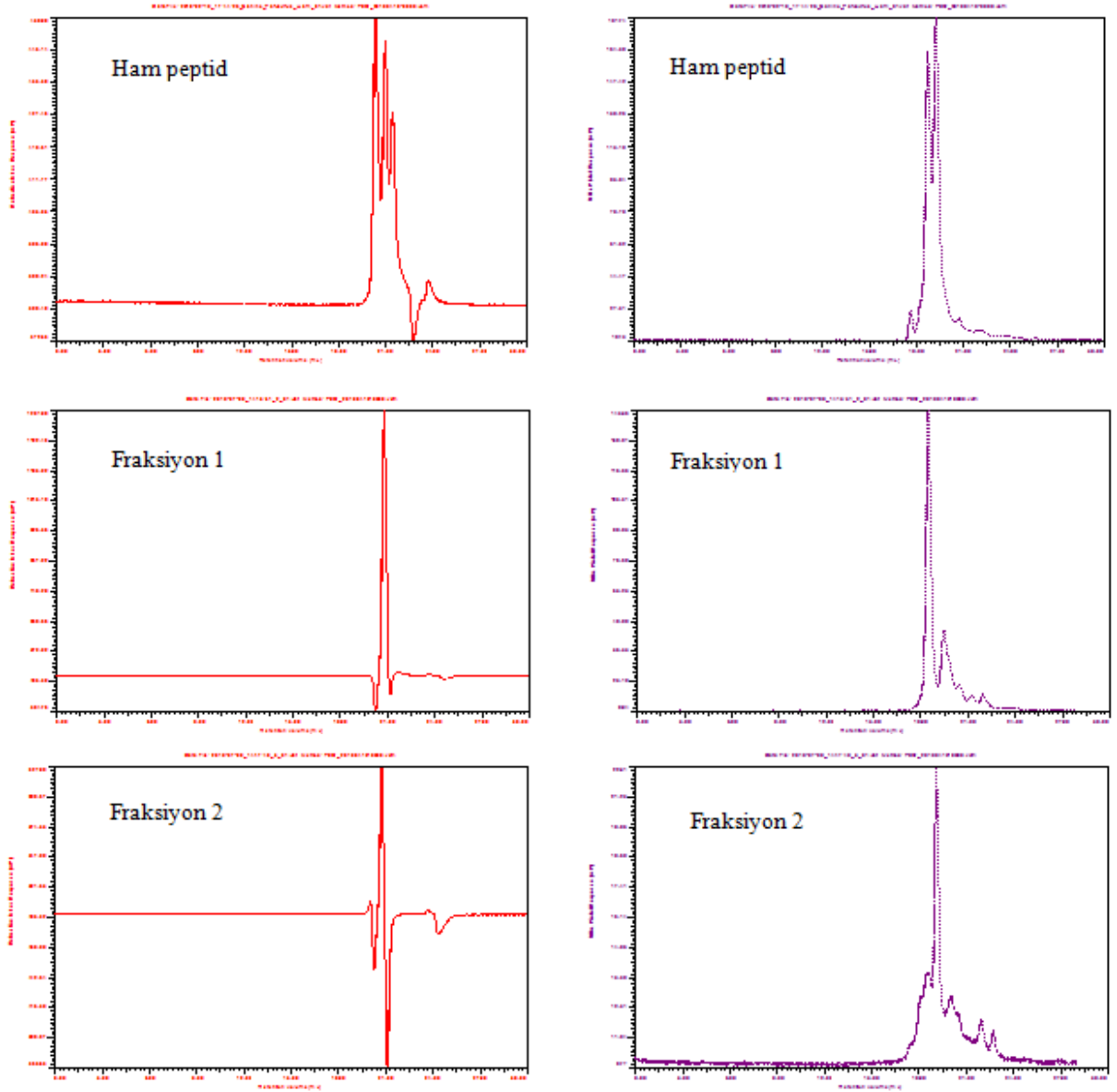
Sentezlenen ham peptid çözeltisi (10mg/ml), 0.01 M pH 7,0 fosfat tamponu ile dengelenmiş Toyopearl SP-550 C dolgu mataryeli ile doldurulmuş kolona (2.5 x 30 cm) verildi. Bu işlem 3 kere tekrarlandı ve kolondan çıkan fraksiyonlar 2’şer ml olacak şekilde toplandı. Toyopearl kolondan elde edilen fraksiyonlara ait UV<sub>280nm</sub> değerleri okundu ve fraksiyon numaralarına karşı çizilen grafik Şekil 5.19’da verildi.



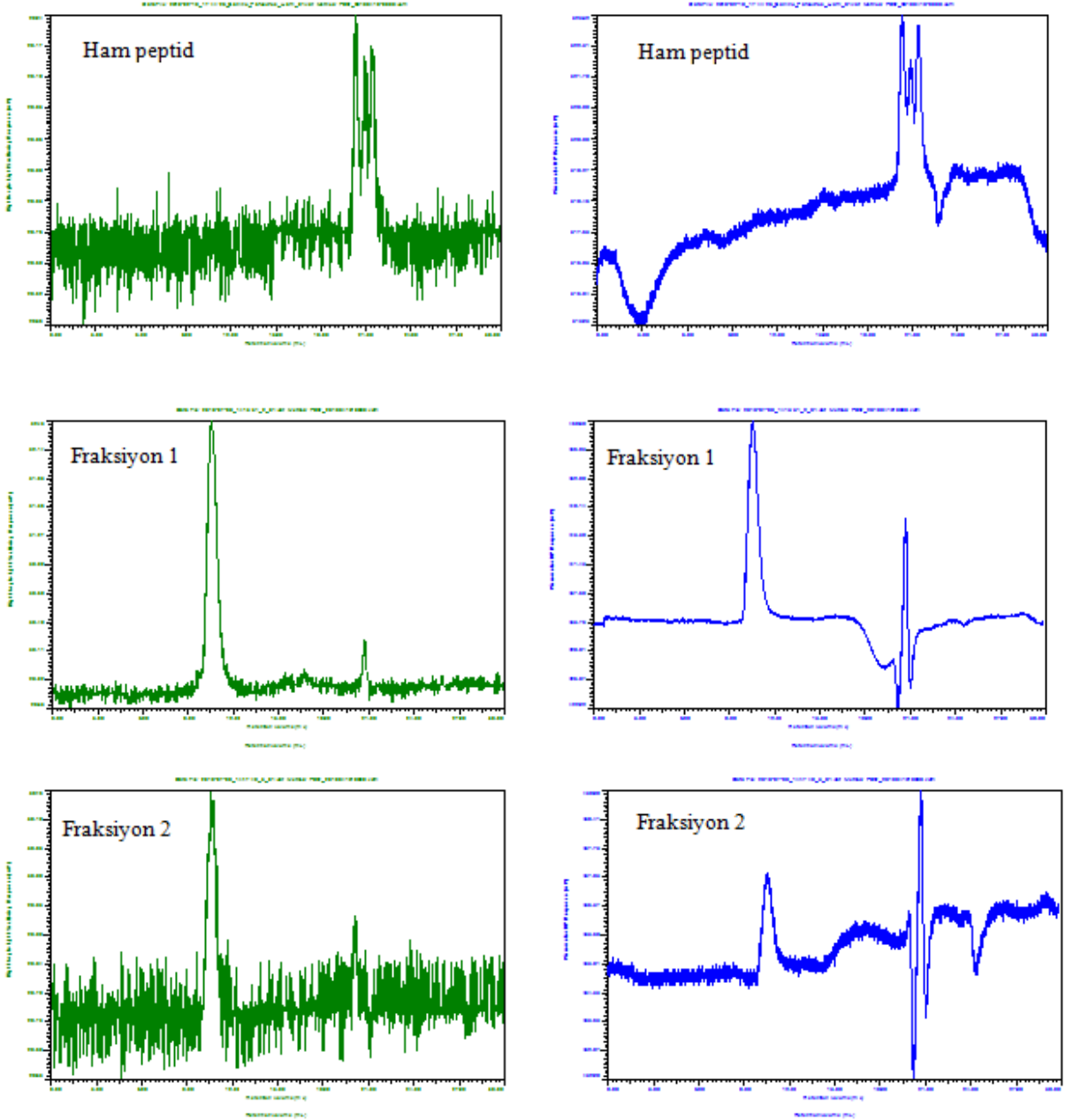
Şekil 5. 19 Canine Parvovirus W-7L20 ham peptidinin toyopearl kolon uygulaması sonucu saflaştırılması

Peptid çözeltisinin kolona verilmesi ile elde edilen F1 ve F2 fraksiyonları kendi aralarında birleştirildi. Toplamda elde edilen 2 fraksiyon tekrardan Jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) temeline dayalı olarak çalışan Viscotek marka kromatografi cihazı ile analiz edildi ve elde edilen kromatogramlar Şekil 5.20 ve Şekil 5.21'de karşılaştırmalı olarak gösterildi.





Şekil 5. 20 pH 7'de hazırlanmış Canine Parvovirus W-7L20 ham peptidi, Fraksiyon 1 ve Fraksiyon 2'ye ait GPC Kırılma İndisi (♦) ve UV (♦) detektörü kromatogramı



Şekil 5. 21 pH 7’de hazırlanmış Canine Parvovirus W-7L20 ham peptidi, Fraksiyon 1 ve Fraksiyon 2’ye ait GPC Işık Saçılması (◆) ve Vizkozite (◆) detektörü kromatogramı

2.5 x 30 cm boyutlarında ve toyopearl SP-550 C dolgu mataryeli ile doldurulmuş kolonda fraksiyonlarına ayrılan ham peptidin 1. Ve 2. Fraksiyonlarının (Fraksiyon 1 ve Fraksiyon2) ham peptid ile karşılaştırmalı olarak yapılan analizinden elde edilen kromatogramlarda peptidin toyopearl dolgulu kolonda saflaştırıldığı görüldü. Her iki fraksiyona ait kromatogramın da ham peptide göre çok daha saf olduğu saptandı.

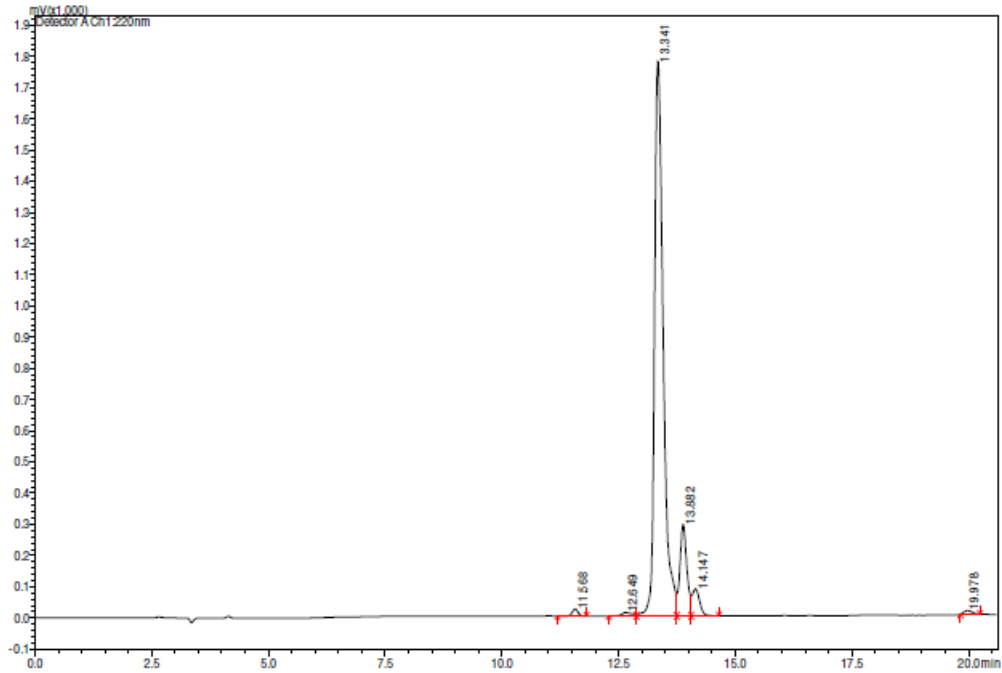
### 5.3 Canine Parvovirus W-1L19 Dizili Sentetik Peptidinin Analizi

Caslo laboratuvarında sentezlenen Canine Parvovirus W-1L19 (W-MSDGA VQPDGGQPA VRNERA) sentetik peptidi, aynı firma tarafından saflık kontrolü için preparatif HPLC cihazı ile analiz edildi. Canine Parvovirus W-1L19 peptidinin molekül ağırlığı tayini de Caslo Firması tarafından MS cihazında yapıldı ve elde edilen kütle spektrumundan molekül ağırlığı hesaplandı.

#### 5.3.1 Canine Parvovirus W-1L19 Dizili Sentetik Peptidin HPLC Analizi

Canine Parvovirus W-1L19 peptidinin preparatif HPLC analizi aşağıda verilen şartlarda yapıldı. Elde edilen kromatogram Şekil 5.22’de verildi.

- Mobil Faz A: 0.05%TFA +2%CH<sub>3</sub>CN
- Mobil Faz B: 0.05%TFA +90%CH<sub>3</sub>CN
- Kolon: Merck (250×4.6mm I.D.) C18
- UV Dedektör: 220 nm
- Gradient: 0-30%B in 30min



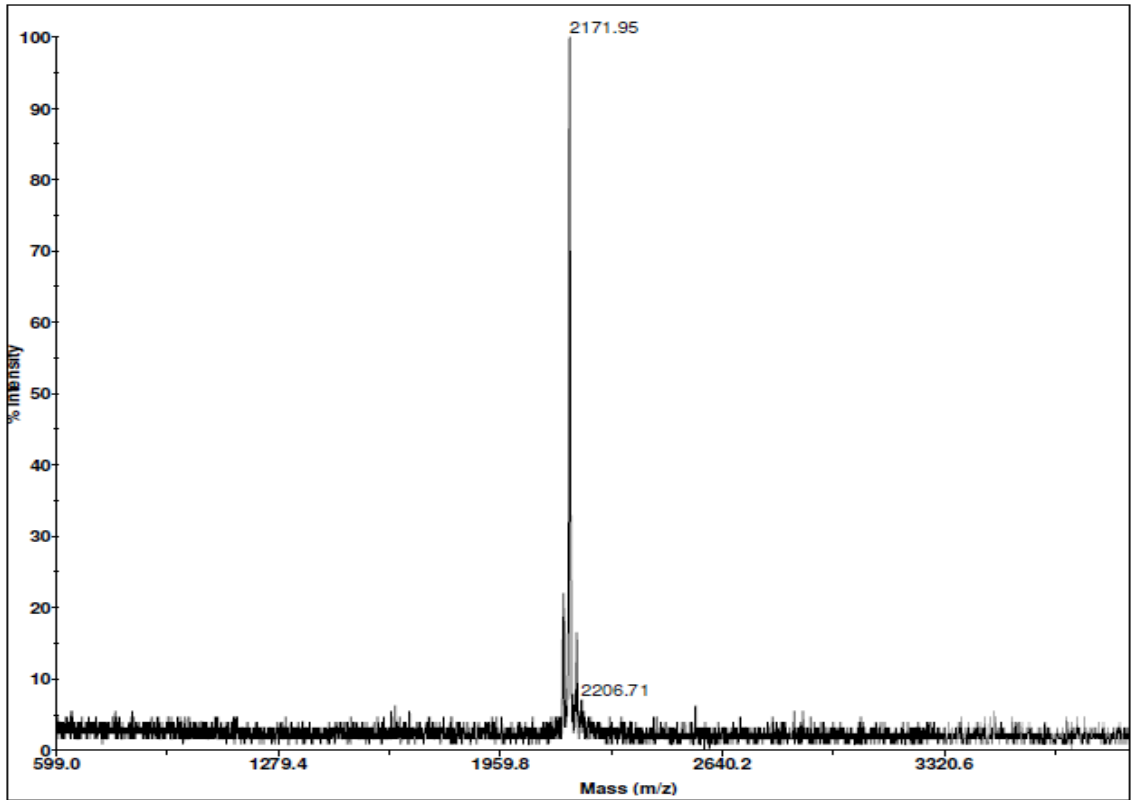
Şekil 5. 22 Canine Parvovirus W-1L19 peptidine ait HPLC UV kromatogramı

Caslo firmasına ait laboratuvarında sentezlenen peptide ait HPLC kromatogramında peptidin saf olarak sentezlendiği görülmektedir.

### 5.3.2 Canine Parvovirus W-1L19 Dizili Sentetik Peptidin MS Analizi

Canine Parvovirus W-1L19 peptidinin MALDI-TOF cihazında yapılan kütle analizi sonuçları Şekil 5.23’de verildi.

- Ana pik: 2171,95
- $M_w [M+ H^+]$ : 2171,95
- $M_w$ : 2170,95
- Teorik  $M_w$ : 2170,37



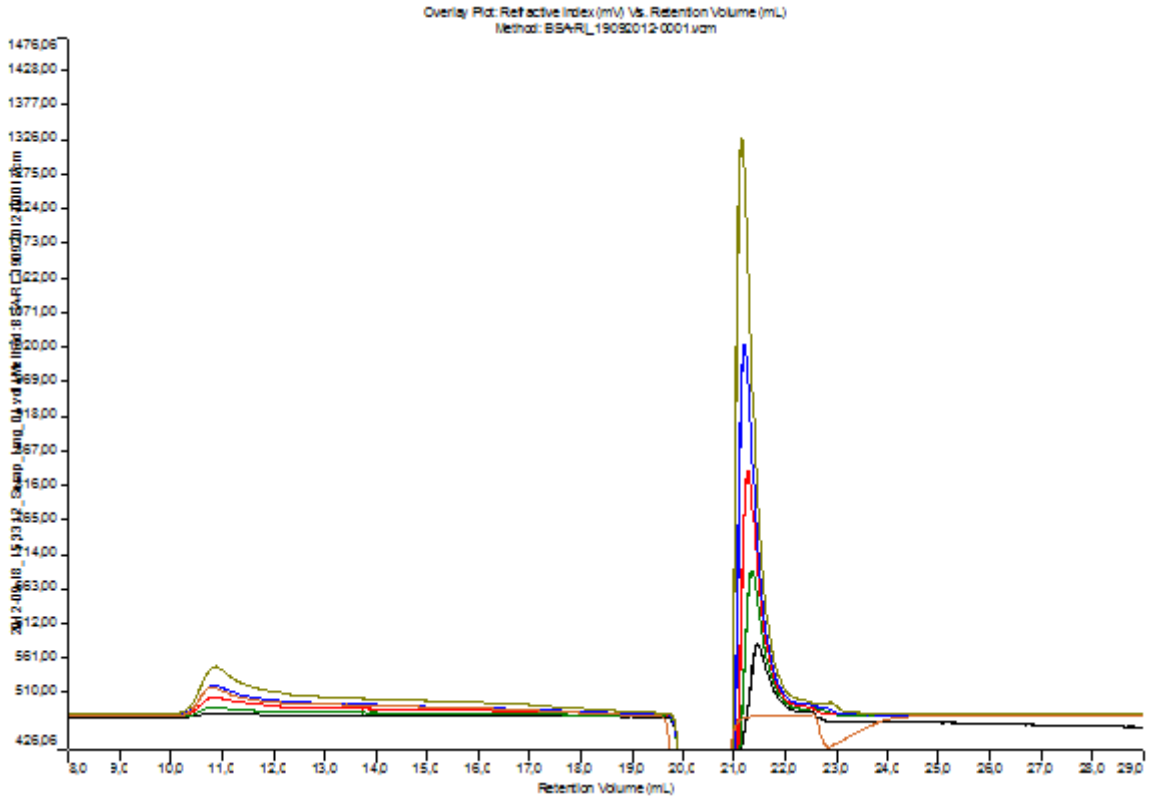
Şekil 5. 23 Canine Parvovirus W-1L19 peptidine ait MS spektrumu

Peptide ait MS spektrumunda sentezlenen peptidin molekül ağırlığının teorik molekül ağırlığı olan 2171 Da’a eşit olduğu görülmektedir.

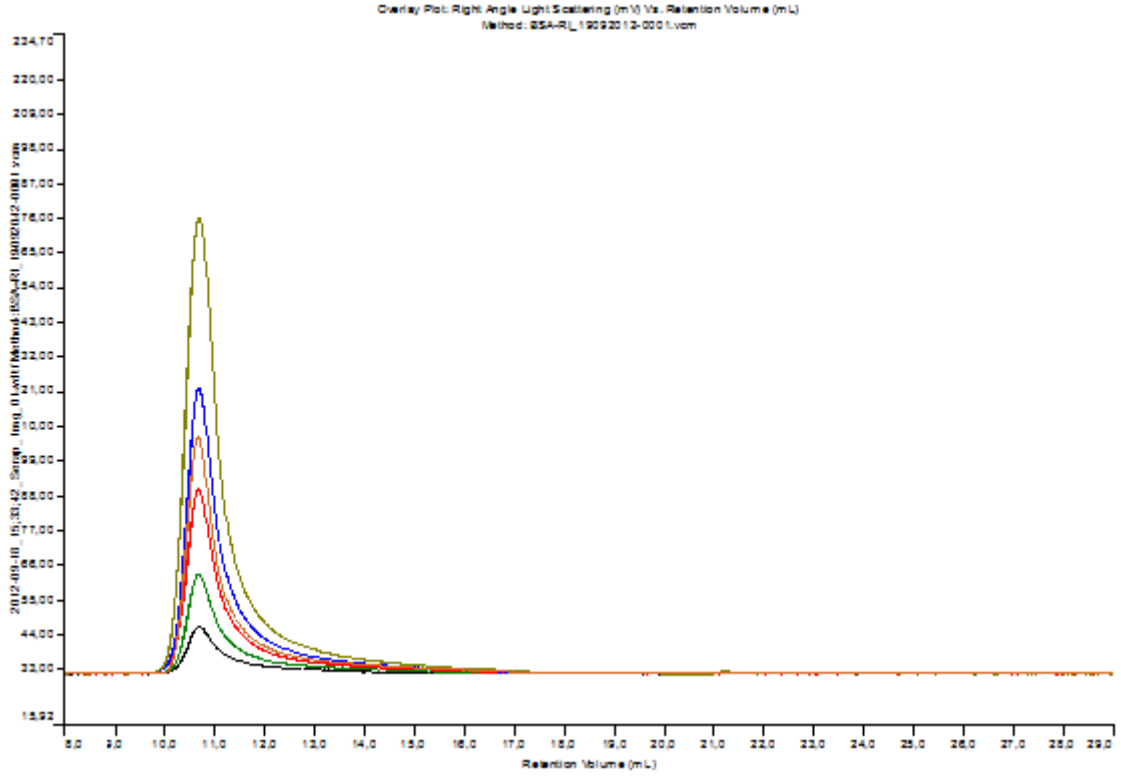
## 5.4 Canine Parvovirus W-7L20 Peptidinin PAA Polimeri ile Biyokonjugatlarının Analizi

### 5.4.1 GPC Analizi

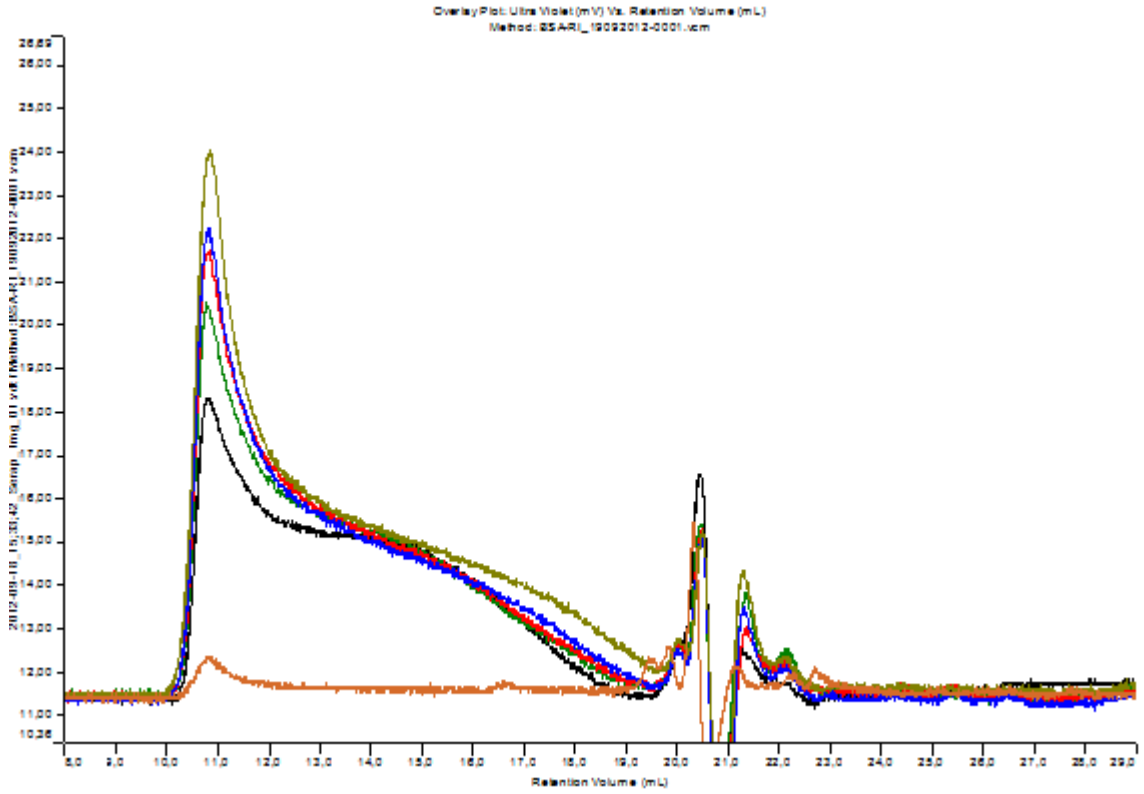
Karbodiimid yöntemi ile hazırlanan  $n_{PAA}/n_{pep}=0,025, 0,075, 0,15, 0,25, 0,375$  oranlarındaki konjugatlar GPC cihazı ile analiz edildi ve elde edilen GPC kromatogramları Şekil 5.24-5.26'de toplu olarak verildi.



Şekil 5. 24 PAA polimeri (♦) ve pH 7'de hazırlanmış  $n_{PAA}/n_{pep}=0,025$  (◆),  $0,075$  (◇),  $0,15$  (♦),  $0,25$  (◆),  $0,375$  (◇), konjugatlarına ait GPC Kırılma İndisi kromatogramı



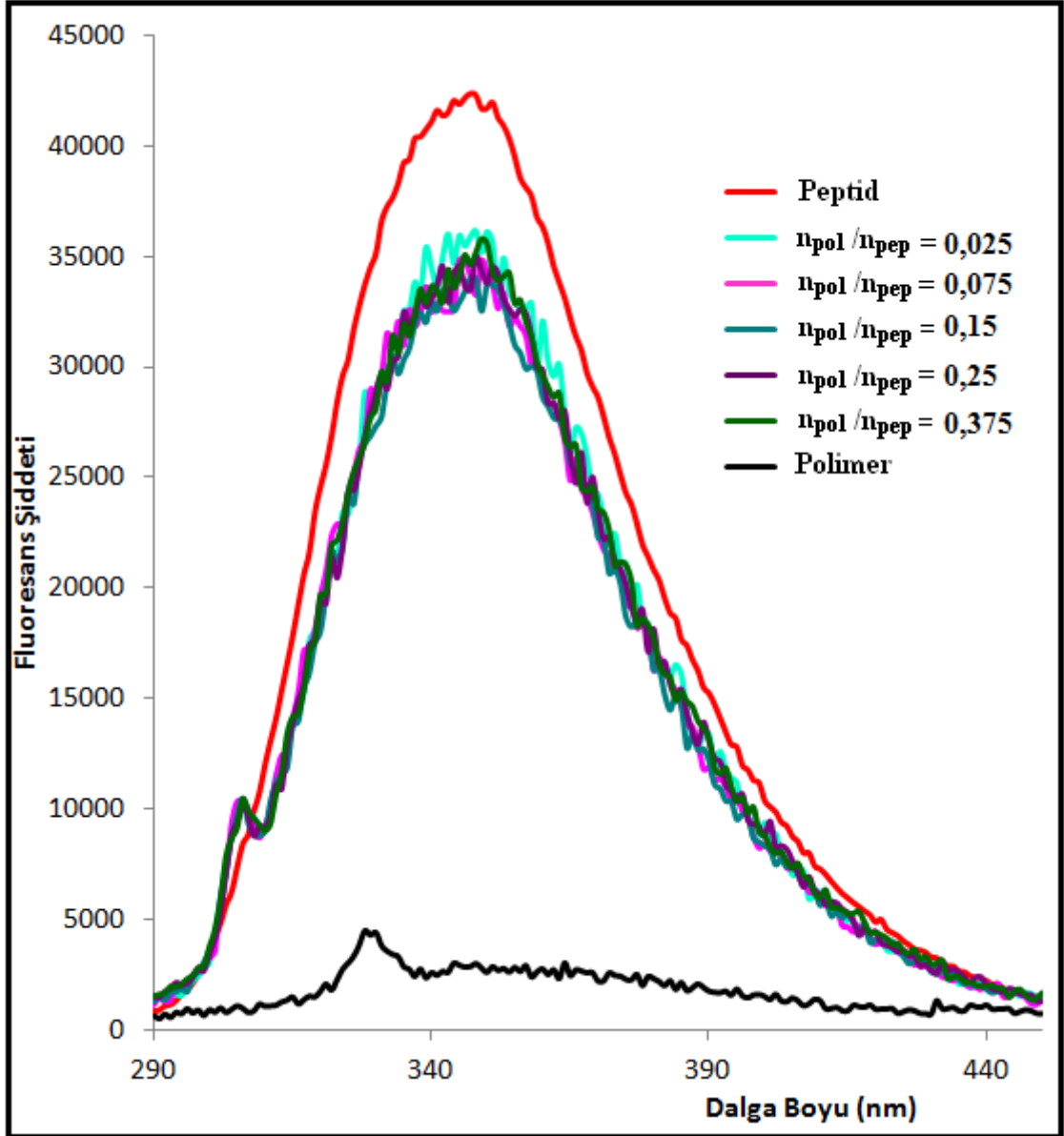
Şekil 5. 15 PAA polimeri (◊) ve pH 7'de hazırlanmış  $n_{PAA}/n_{pep}=0,025$  (◆), 0,075 (◆), 0,15 (◆), 0,25 (◆), 0,375 (◆), konjugatlarına ait GPC Kırılma Işık Saçılması kromatogramı



Şekil 5. 26 PAA polimeri (◊) ve pH 7'de hazırlanmış  $n_{PAA}/n_{pep}=0,025$  (◆), 0,075 (◆), 0,15 (◆), 0,25 (◆), 0,375 (◆), konjugatlarına ait GPC Kırılma UV kromatogramı

#### 5.4.2 Floresans Analizi

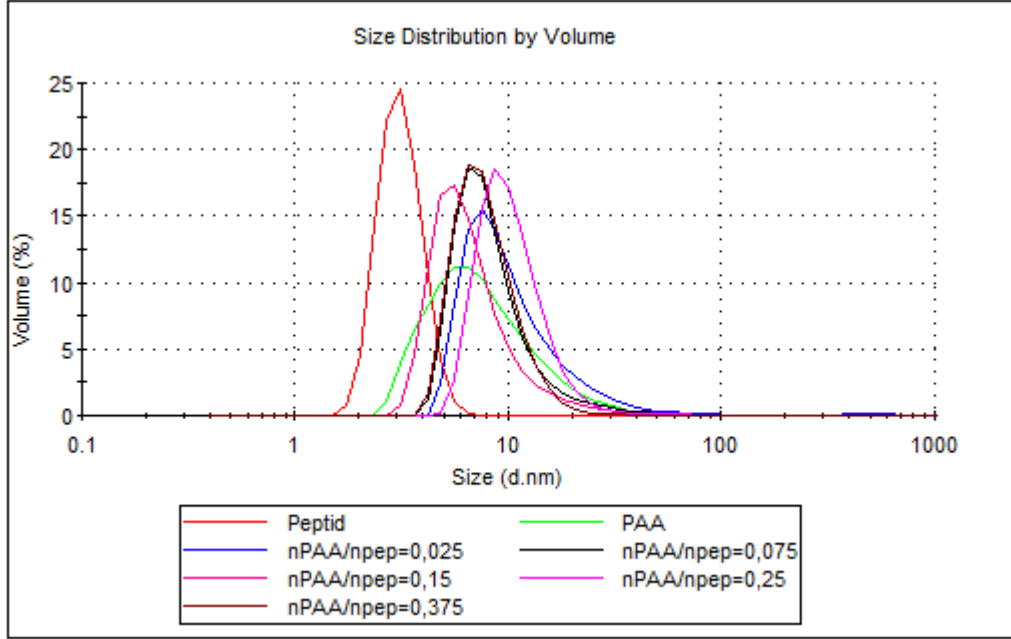
Karbodiimid yöntemi ile hazırlanan  $n_{PAA}/n_{pep}=0,025, 0,075, 0,15, 0,25, 0,375$  oranlarındaki konjugatların Floresans Spektrofotometre ile ölçümleri yapıldı ve elde edilen spektrumlar Şekil 5.27'de verildi.



Şekil 5. 27 Peptid (♦), PAA polimeri (♦) ve pH 7'de hazırlanmış  $n_{PAA}/n_{pep}=0,025$  (♦), 0,075 (♦), 0,15 (♦), 0,25 (♦), 0,375 (♦) konjugatlarına ait Floresans spektrumları

### 5.4.3 Zetasizer Analizi

Karbodiimid yöntemi ile hazırlanan  $n_{PAA}/n_{pep}=0,025, 0,075, 0,15, 0,25, 0,375$  oranlarındaki konjugatlar Zetasizer cihazı ile analiz edildi ve elde edilen sonuçlar Şekil 5.28-Şekil 5.29'da verildi.



Şekil 5. 28 Peptid (♦), PAA polimeri (♦) ve pH 7'de hazırlanmış  $n_{PAA}/n_{pep}=0,025$  (♦), 0,075 (♦), 0,15 (♦), 0,25 (♦), 0,375 (♦), konjugatlarına ait boyut analizi sonuçları

Sample Name	Z-Average d.nm	Pdl	ZP mV
Peptid	3,17	0,132	-5,9
PAA	25,56	0,396	-25,5
$n_{PAA}/n_{pep}=0,025$	83,73	0,593	-25,4
$n_{PAA}/n_{pep}=0,075$	47,10	0,826	-30,5
$n_{PAA}/n_{pep}=0,15$	34,70	0,788	-26,5
$n_{PAA}/n_{pep}=0,25$	39,15	0,950	-16,2
$n_{PAA}/n_{pep}=0,375$	21,47	0,633	-11,3

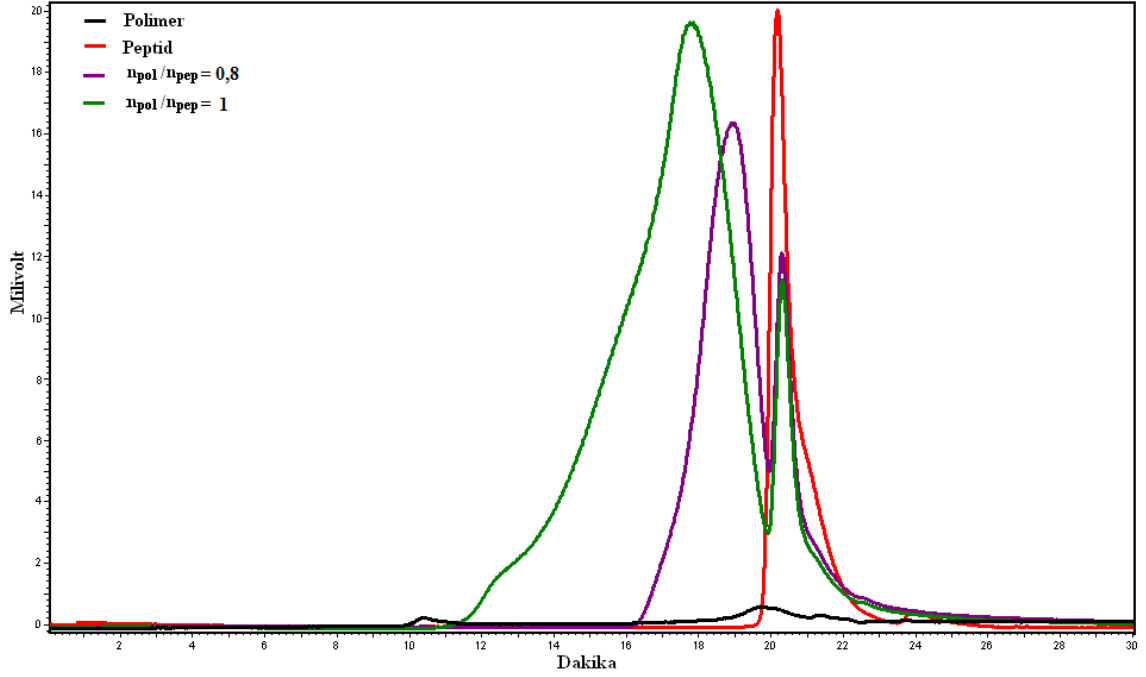
Şekil 5. 19 Peptid, PAA polimeri ve pH 7'de hazırlanmış  $n_{PAA}/n_{pep}=0,025, 0,075, 0,15, 0,25, 0,375$  konjugatlarına ait Z-Average, Pdl ve Zetapotansiyel değerleri



## 5.5 Canine Parvovirus W-1L19 Peptidinin PAA Polimeri ile Fiziksel Komplekslerinin Analizi

### 5.5.1 HPLC Analizi

pH 4’de hazırlanan  $n_{PAA}/n_{pep}=0,8$  ve 1 oranlarındaki fiziksel kompleksler HPLC cihazı ile analiz edildi ve elde edilen HPLC kromatogramı Şekil 5.30’da verildi.



Şekil 5. 30 Peptid (♦), PAA polimeri (◆) ve pH 4’de hazırlanmış  $n_{PAA}/n_{pep}=0,8$  (◆),  $n_{PAA}/n_{pep}=1$  (◆) fiziksel komplekslerine ait HPLC kromatogramı

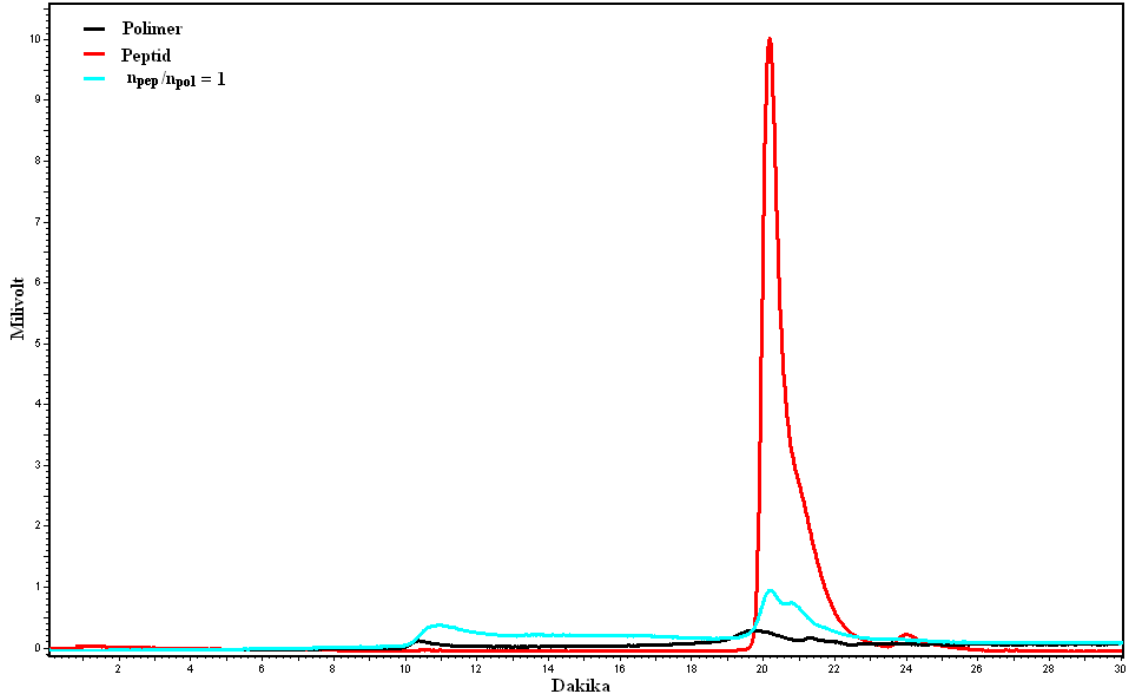
Şekil 5.30’da görüldüğü üzere kompleksteki polimer miktarının arttırılması ile Peptid- PAA kompleksinin pik alanı da artmıştır. pH=7 değerinde negatif yüklü olan peptid ve polimer molekülü kompleks oluşturmazken, pH’ın değiştirilmesi ile (pH=4 değerinde) elektrostatik etkileşimler sonucunda Peptid-PAA fiziksel kompleksinin oluşturulmasının mümkün olduğu görülmektedir. Çapraz bağlayıcılar aracılığı ile sentezlenen biyokonjugatların oluşumun mekanizmasında öncelikle kompleks oluşumunun gerçekleştiği ve sonrasında polimerin karboksil (-COOH) gruplarının protein yada peptid üzerindeki amino (-NH<sub>2</sub>) gruplarına kararlı kovalent bağlar ile bağlandığı bilinmektedir [6]. Daha önceki yapılan çalışmamızda da kovalent bağlanma sonucu elde edilen biyokonjugatların fiziksel komplekslere göre daha dayanıklı olduğu gösterilmiştir [7]. Bu nedenle tez kapsamında yapılan bundan sonraki çalışmalar biyokonjugasyon deneyleri ile devam ettirilmiştir.

## 5.6 Canine Parvovirus W-1L19 Peptidinin PAA Polimeri ile Biyokonjugatlarının Analizi

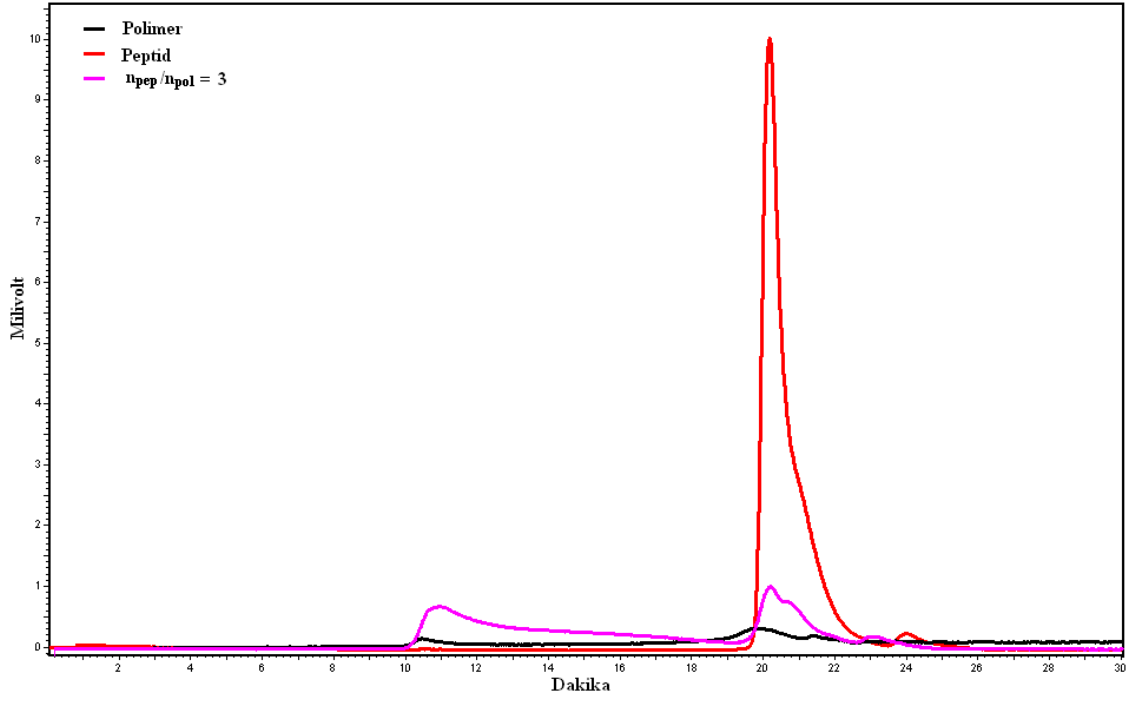
### 5.6.1 Peptidin Artan Oranlarında Konjugasyon

#### 5.6.1.1 HPLC Analizi

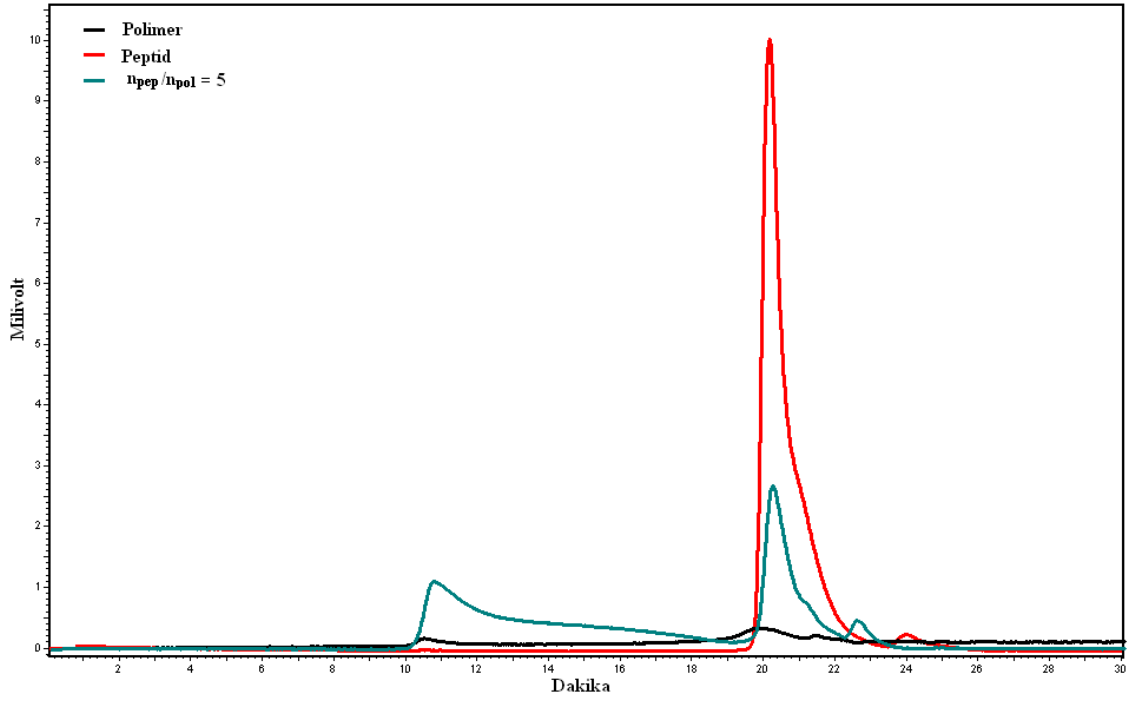
Karbodiimid yöntemi ile hazırlanan  $n_{\text{pep}}/n_{\text{PAA}}=1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30$  oranlarındaki konjugatlar HPLC cihazı ile analiz edildi ve elde edilen HPLC kromatogramları Şekil 5.31-5.38’de peptid ile karşılaştırmalı olarak, Şekil 5.39’da ise toplu olarak verildi.



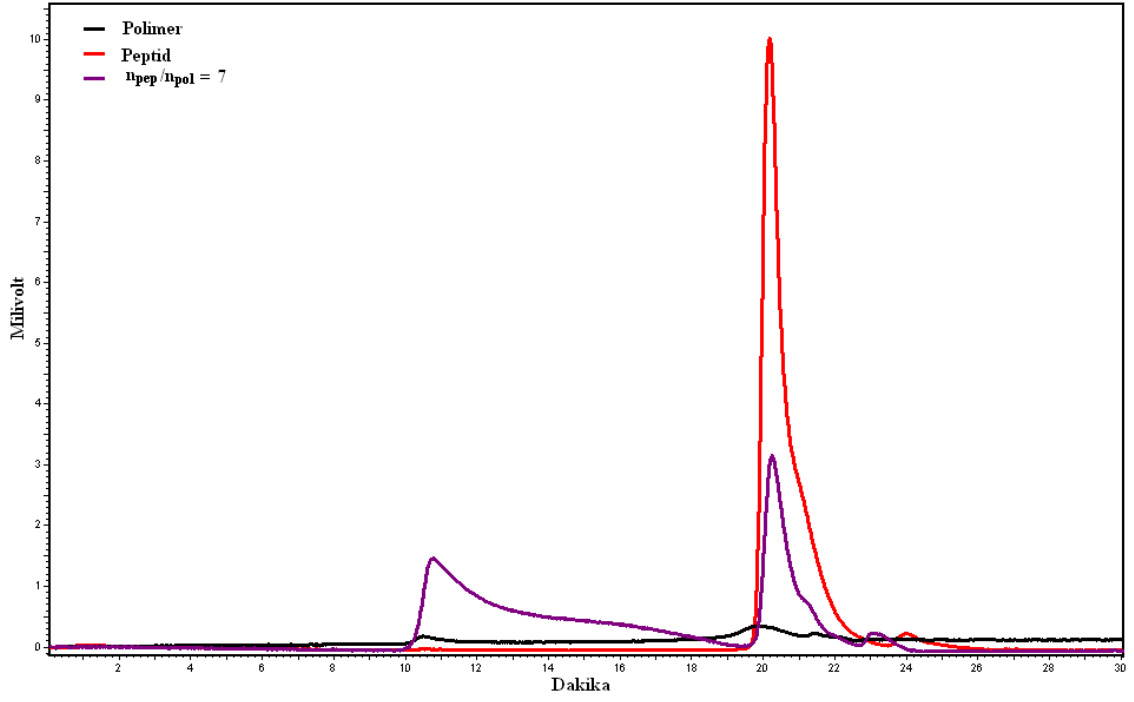
Şekil 5. 31 Peptid (◆), PAA polimeri (◆) ve pH 7’de hazırlanmış  $n_{\text{pep}}/n_{\text{PAA}}=1$  (◆) konjugatına ait HPLC kromatogramı



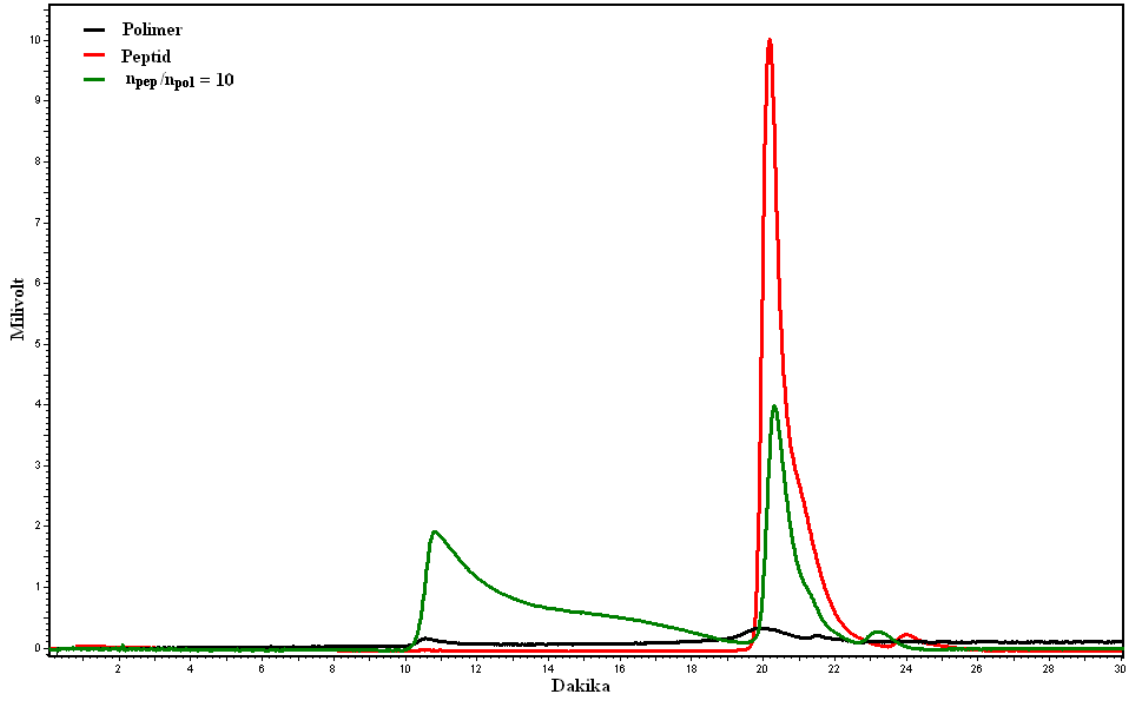
Şekil 5. 32 Peptid (♦), PAA polimeri (♦) ve pH 7'de hazırlanmış  $n_{pep}/n_{PAA}=3$  (♦) konjugatına ait HPLC kromatogramı



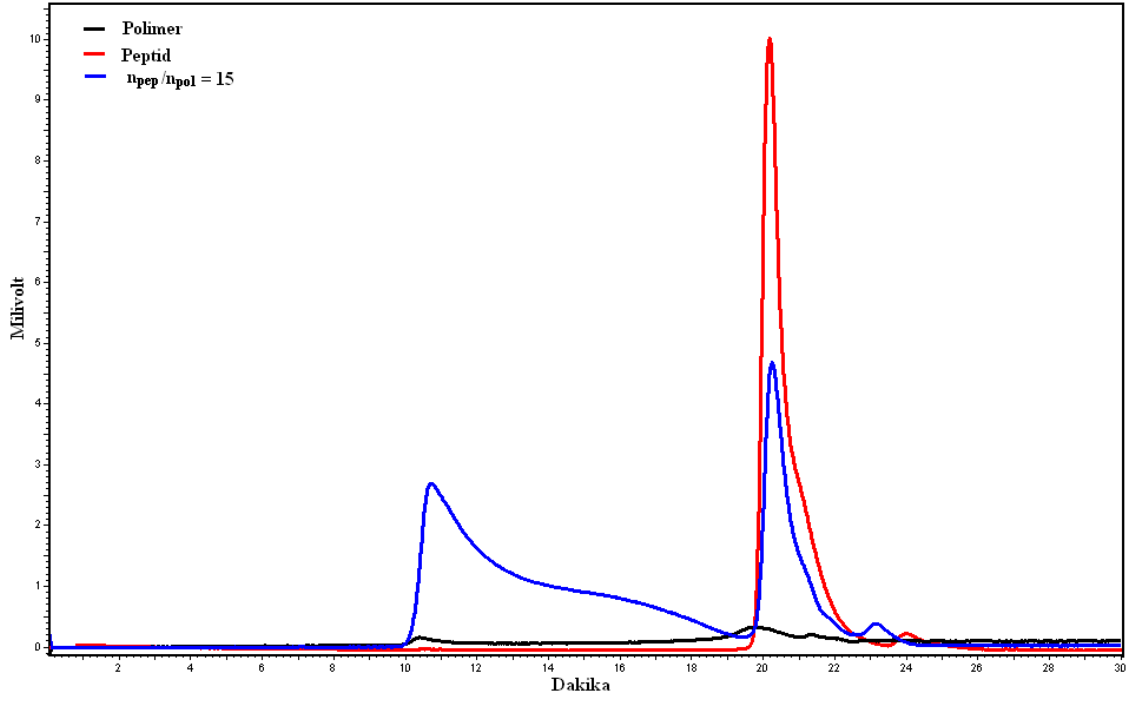
Şekil 5. 13 Peptid (♦), PAA polimeri (♦) ve pH 7'de hazırlanmış  $n_{pep}/n_{PAA}=5$  (♦) konjugatına ait HPLC kromatogramı



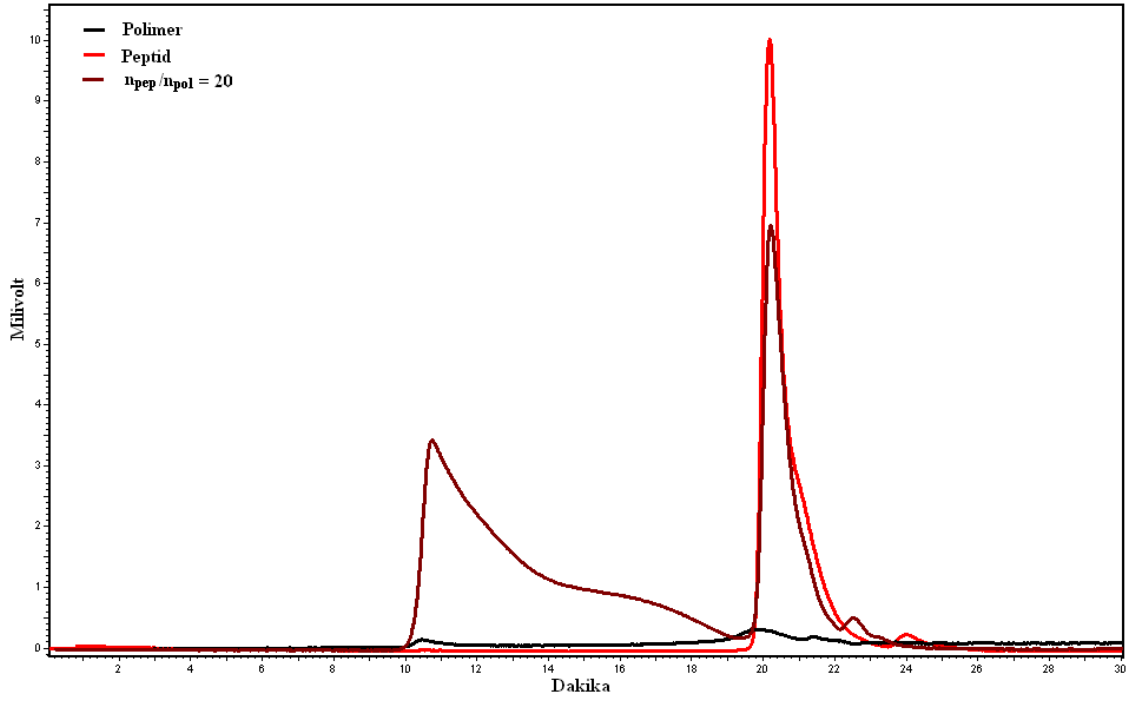
Şekil 5. 34 Peptid (◆), PAA polimeri (◆) ve pH 7'de hazırlanmış  $n_{pep}/n_{PAA}=7$  (◆) konjugatına ait HPLC kromatogramı



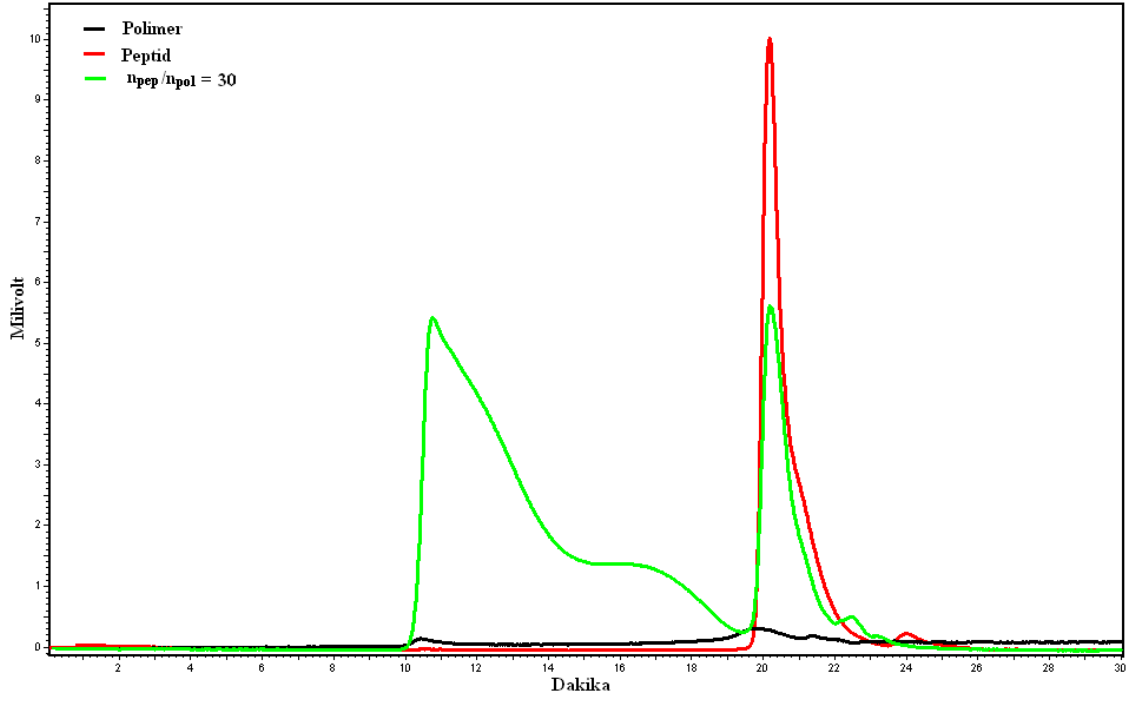
Şekil 5. 35 Peptid (◆), PAA polimeri (◆) ve pH 7'de hazırlanmış  $n_{pep}/n_{PAA}=10$  (◆) konjugatına ait HPLC kromatogramı



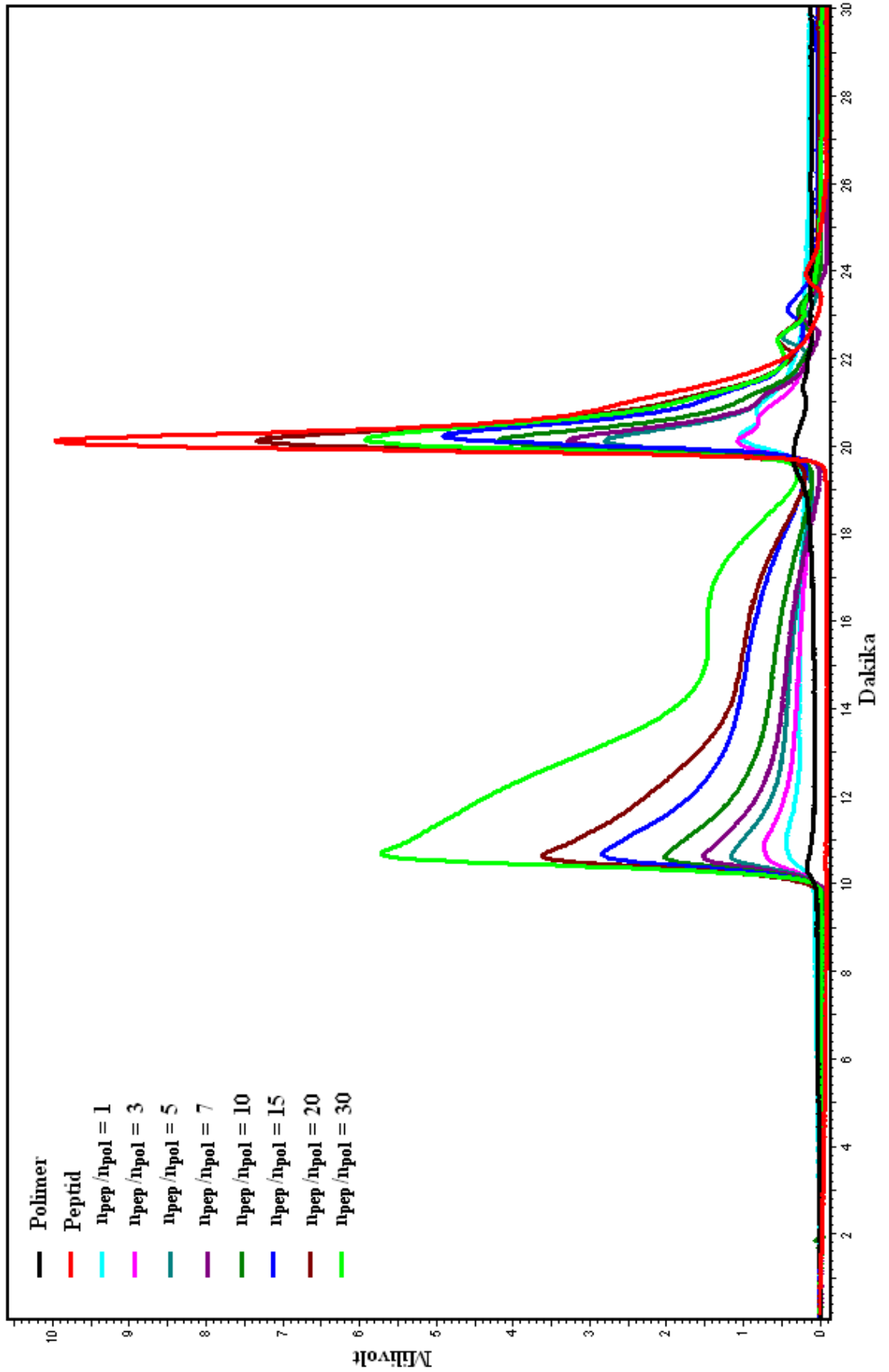
Şekil 5. 36 Peptid (◆), PAA polimeri (◆) ve pH 7'de hazırlanmış  $n_{\text{pep}}/n_{\text{PAA}}=15$  (◆) konjugatına ait HPLC kromatogramı



Şekil 5. 37 Peptid (◆), PAA polimeri (◆) ve pH 7'de hazırlanmış  $n_{\text{pep}}/n_{\text{PAA}}=20$  (◆) konjugatına ait HPLC kromatogramı



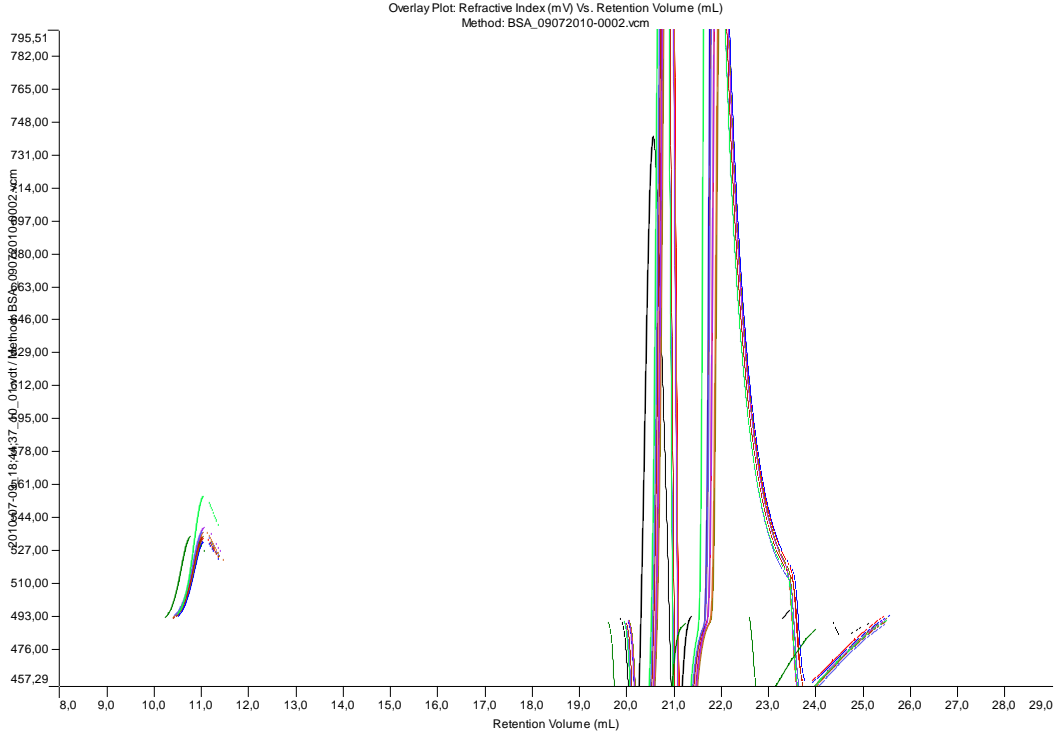
Şekil 5. 38 Peptid (◆), PAA polimeri (◆) ve pH 7'de hazırlanmış  $n_{pep}/n_{PAA}=30$  (◆) konjugatına ait HPLC kromatogramı



Şekil 5. 39 Peptid (♦), PAA polimeri (◆) ve pH 7’de hazırlanmış  $n_{pep}/n_{PAA}=1$  (◆), 3(◆), 5(◆), 7(◆), 10(◆), 15(◆), 20(◆), 30 (◆) konjugatlarına ait HPLC kromatogramı

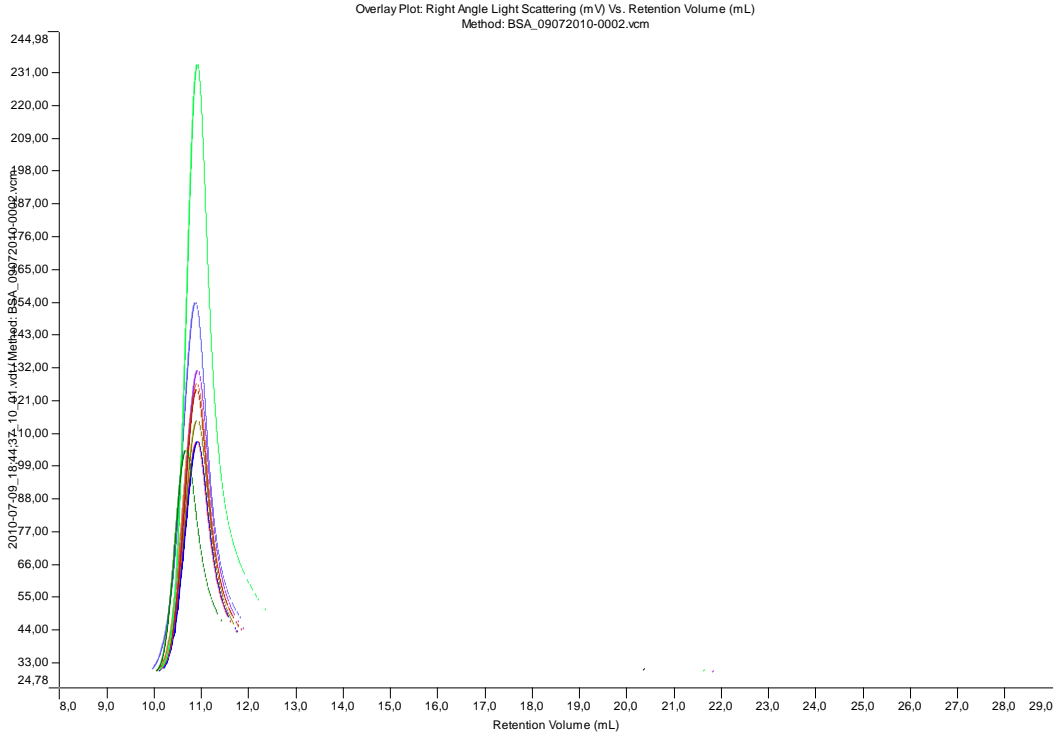
### 5.6.1.2 GPC Analizi

Karbodiimid yöntemi ile hazırlanan  $n_{\text{pep}}/n_{\text{PAA}}=1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30$  oranlarındaki konjugatlar GPC cihazı ile analiz edildi ve elde edilen GPC kromatogramları Şekil 5.40-5.42'de toplu olarak verildi.

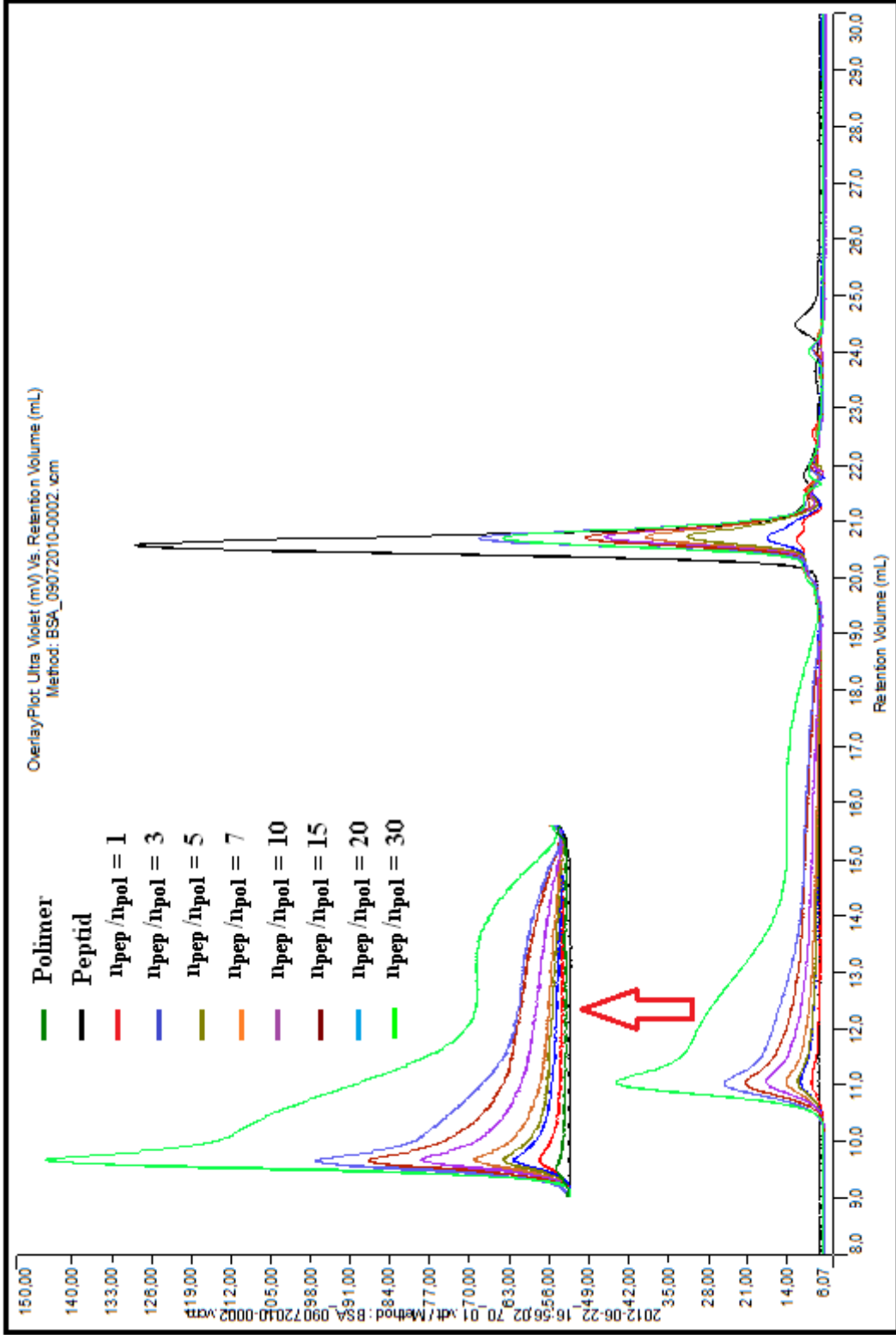


Şekil 5. 40 Peptid (◆), PAA polimeri (◆) ve pH 7'de hazırlanmış  $n_{\text{pep}}/n_{\text{PAA}}=1$  (◆), 3(◆), 5(◆), 7(◆), 10(◆), 15(◆), 20(◆), 30 (◆) konjugatlarına ait GPC Kırılma İndisi kromatogramı





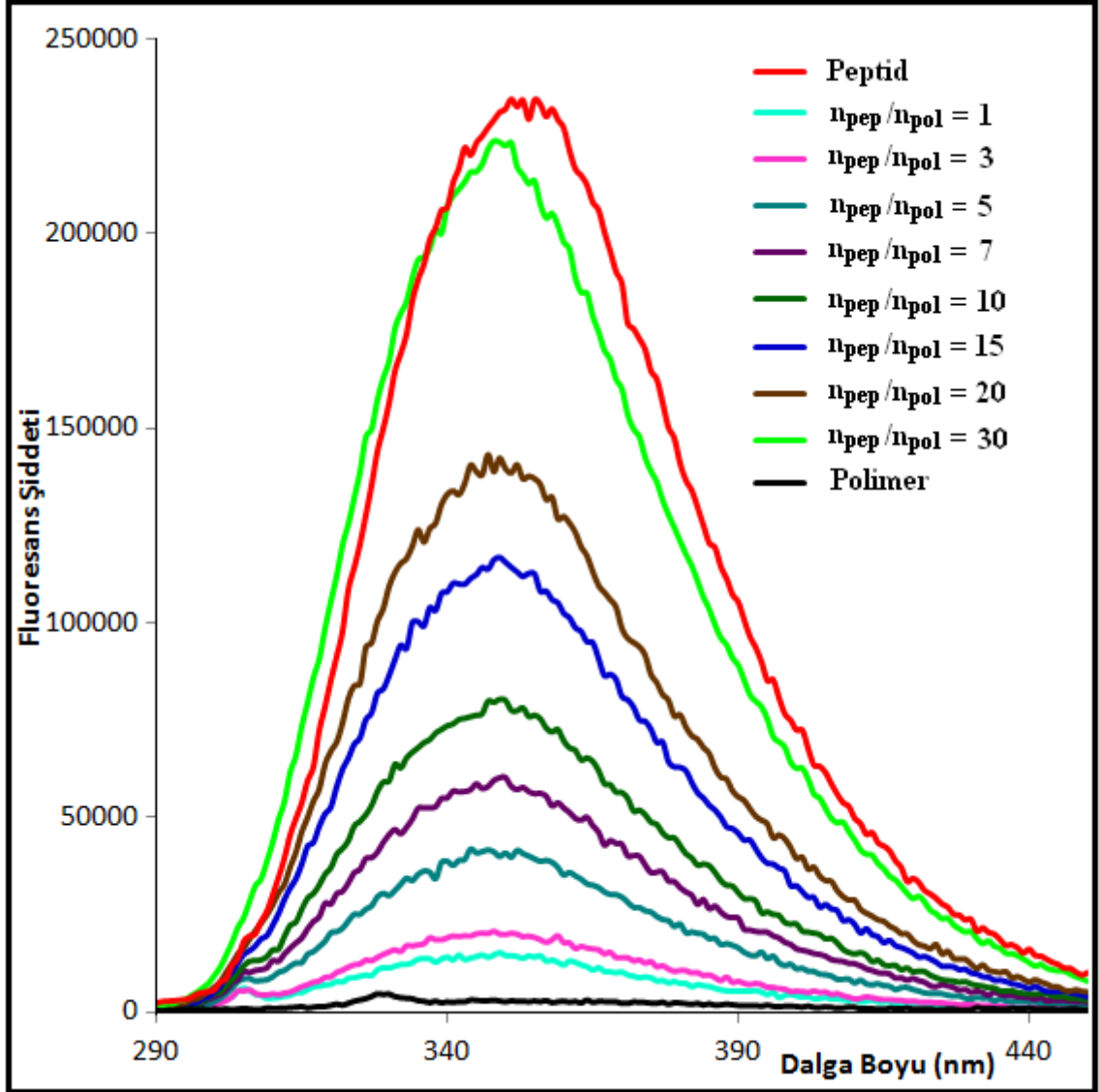
Şekil 5. 41 Peptid (◆), PAA polimeri (◆) ve pH 7’de hazırlanmış  $n_{\text{pep}}/n_{\text{PAA}}=1$  (◆), 3 (◆), 5 (◆), 7 (◆), 10 (◆), 15 (◆), 20 (◆), 30 (◆) konjugatlarına ait GPC Işık Saçılması kromatogramı



Şekil 5. 42 Peptid (◆), PAA polimeri (◆) ve pH 7'de hazırlanmış  $n_{pep}/n_{PAA}=1$  (◆), 3 (◆), 5 (◆), 7 (◆), 10 (◆), 15 (◆), 20 (◆), 30 (◆) konjugatlarına ait GPC UV kromatogramı

### 5.6.1.3 Floresans Analizi

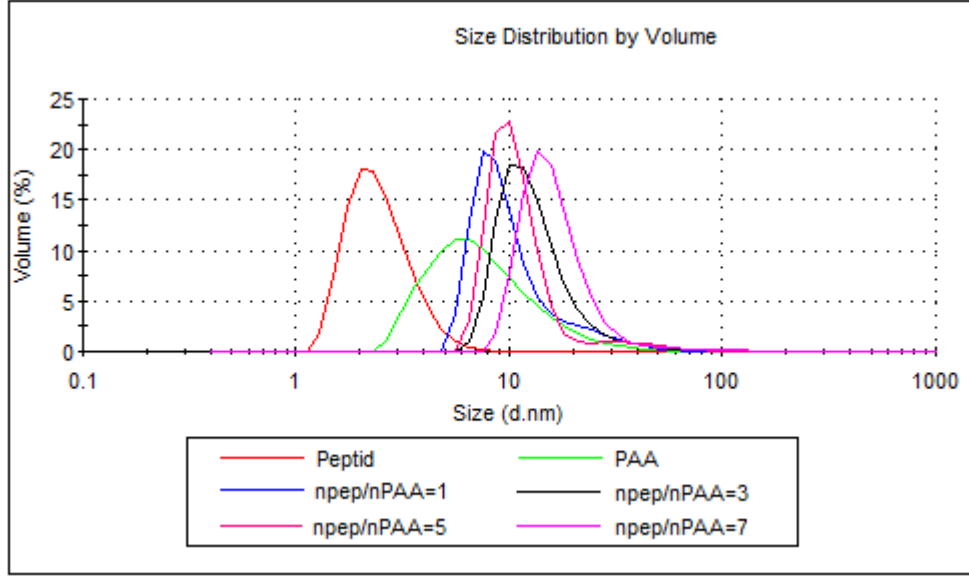
Karbodiimid yöntemi ile hazırlanan  $n_{pep}/n_{PAA}=1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30$  oranlarındaki konjugatların Floresans Spektrofotometre ile ölçümleri yapıldı ve elde edilen spektrumlar Şekil 5.43'te verildi.



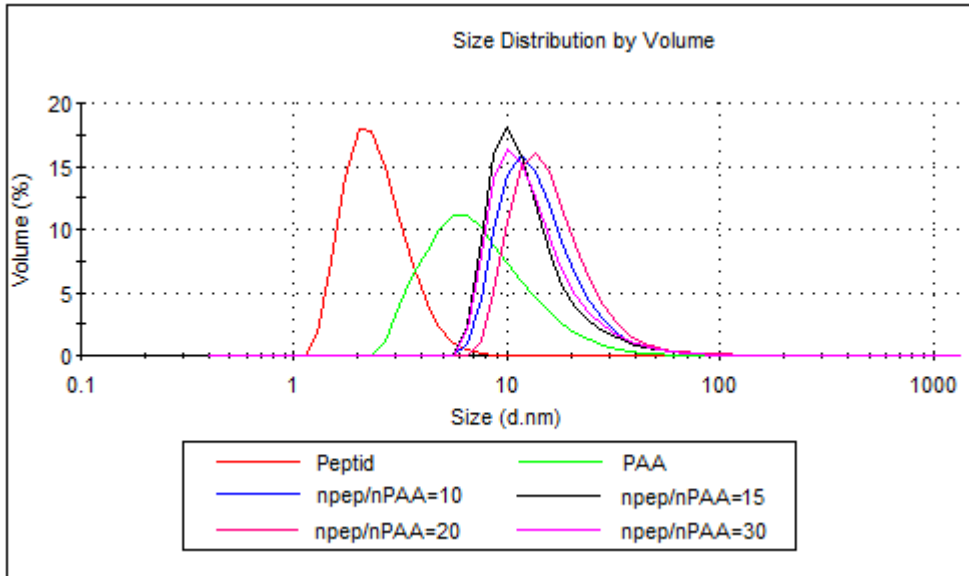
Şekil 5. 43 Peptid (♦), PAA polimeri (◆) ve pH 7'de hazırlanmış  $n_{pep}/n_{PAA}=1$  (◆), 3 (◆), 5 (◆), 7 (◆), 10 (◆), 15 (◆), 20 (◆), 30 (◆) konjugatlarına ait Floresans spektrumları

#### 5.6.1.4 Zetasizer Analizi

Karbodiimid yöntemi ile hazırlanan  $n_{\text{pep}}/n_{\text{PAA}}=1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30$  oranlarındaki konjugatlar Zetasizer cihazı ile analiz edildi ve elde edilen boyut ve zeta potansiyel sonuçları Şekil 5.44-5.46'da toplu olarak verildi.



Şekil 5. 44 Peptid (◆), PAA polimeri (◆) ve pH 7'de hazırlanmış  $n_{\text{pep}}/n_{\text{PAA}}=1$  (◆), 3 (◆), 5 (◆), 7 (◆), konjugatlarına ait boyut analizi sonuçları



Şekil 5. 45 Peptid (◆), PAA polimeri (◆) ve pH 7'de hazırlanmış  $n_{\text{pep}}/n_{\text{PAA}}=10$  (◆), 15 (◆), 20 (◆), 30 (◆) konjugatlarına ait boyut analizi sonuçları

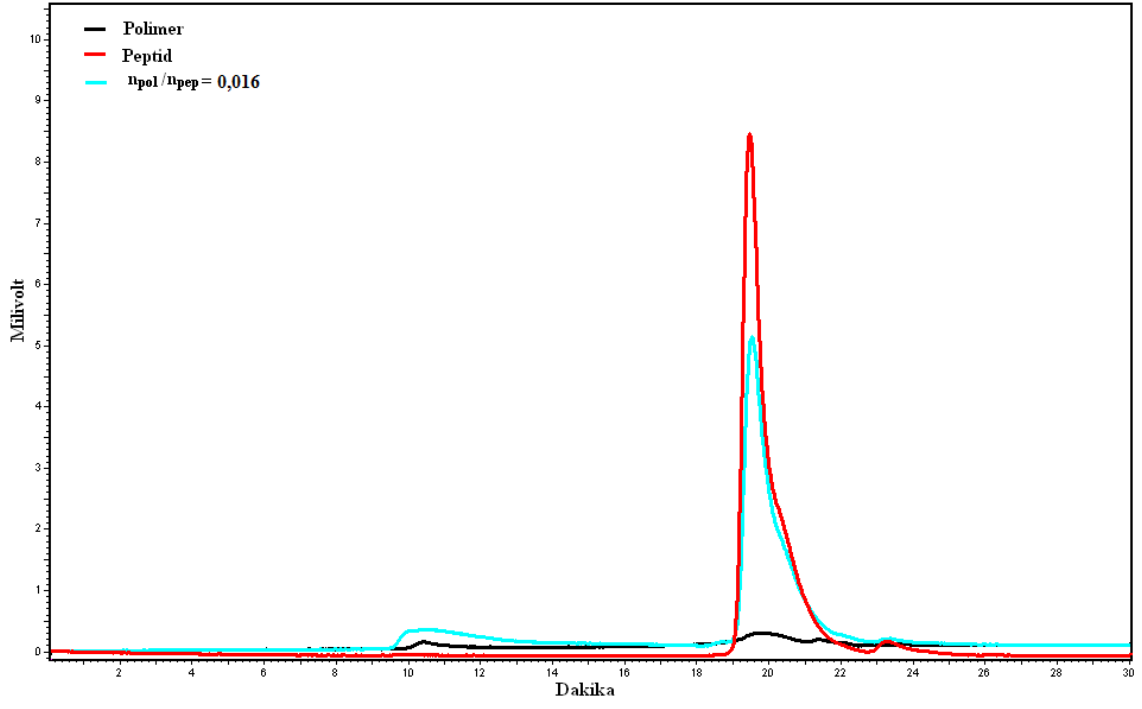
Sample Name	Z-Average d.nm	Pdl	ZP mV
Peptid	3,69	0,132	-3,4
PAA	25,56	0,396	-25,5
n <sub>pep</sub> /n <sub>PAA</sub> =1	46,56	0,515	-17,4
n <sub>pep</sub> /n <sub>PAA</sub> =3	47,80	0,502	-14,9
n <sub>pep</sub> /n <sub>PAA</sub> =5	58,17	0,533	-13,7
n <sub>pep</sub> /n <sub>PAA</sub> =7	54,69	0,483	-14,3
n <sub>pep</sub> /n <sub>PAA</sub> =10	44,63	0,612	-12,6
n <sub>pep</sub> /n <sub>PAA</sub> =15	45,15	0,472	-12,1
n <sub>pep</sub> /n <sub>PAA</sub> =20	49,90	0,460	-12,8
n <sub>pep</sub> /n <sub>PAA</sub> =30	44,93	0,480	-13,8

Şekil 5. 46 Peptid, PAA polimeri ve pH 7'de hazırlanmış  $n_{\text{pep}}/n_{\text{PAA}}=1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30$  konjugatlarına ait Z-Average, Pdl ve Zetapotansiyel değerleri

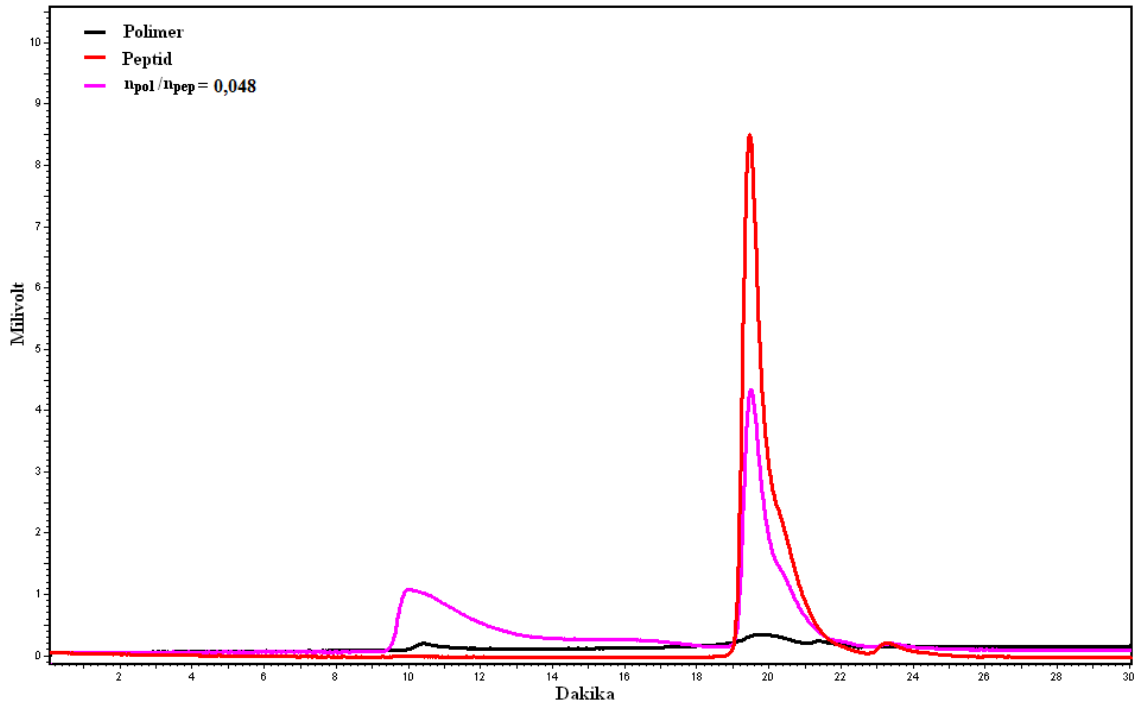
## 5.6.2 Polimerin Artan Oranlarında Konjugasyon

### 5.6.2.1 HPLC Analizi

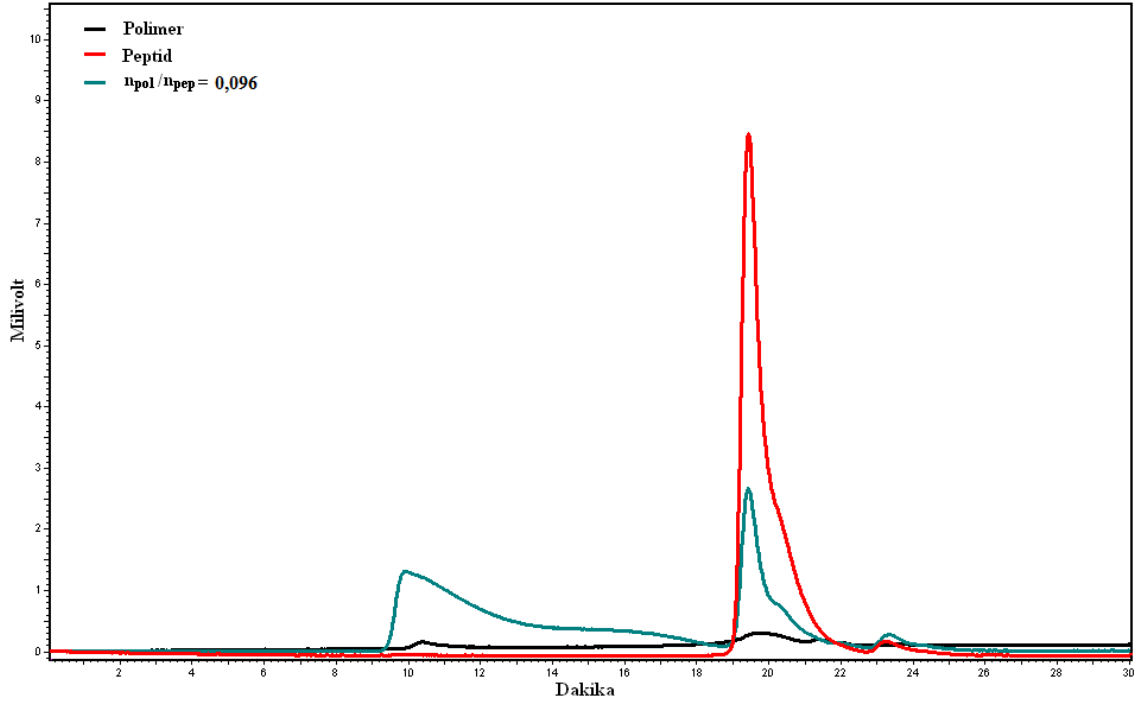
Karbodiimid yöntemi ile hazırlanan  $n_{\text{PAA}}/n_{\text{pep}}=0,016, 0,048, 0,096, 0,16, 0,24$  oranlarındaki konjugatlar HPLC cihazı ile analiz edildi ve elde edilen HPLC kromatogramları Şekil 5.47-5.51'de peptid ile karşılaştırmalı olarak Şekil 5.52'de ise toplu olarak verildi.



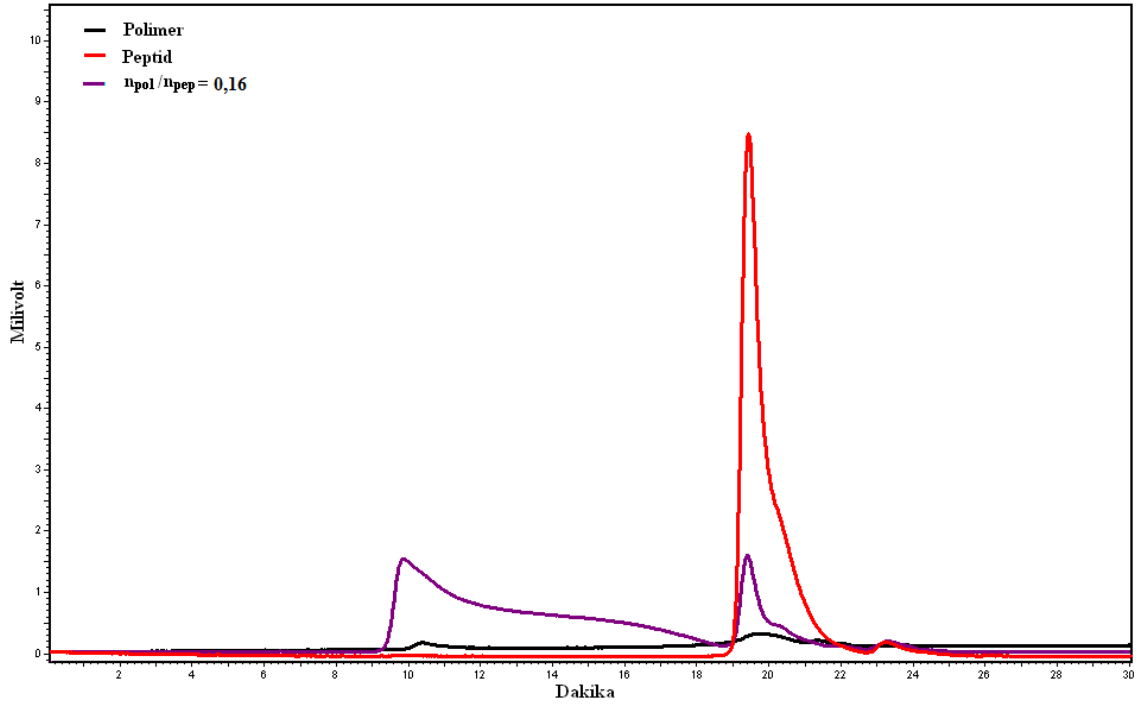
Şekil 5. 47 Peptid (♦), PAA polimeri (♦) ve pH 7'de hazırlanmış  $n_{PAA}/n_{pep}=0,016$  (♦) konjugatına ait HPLC kromatogramı



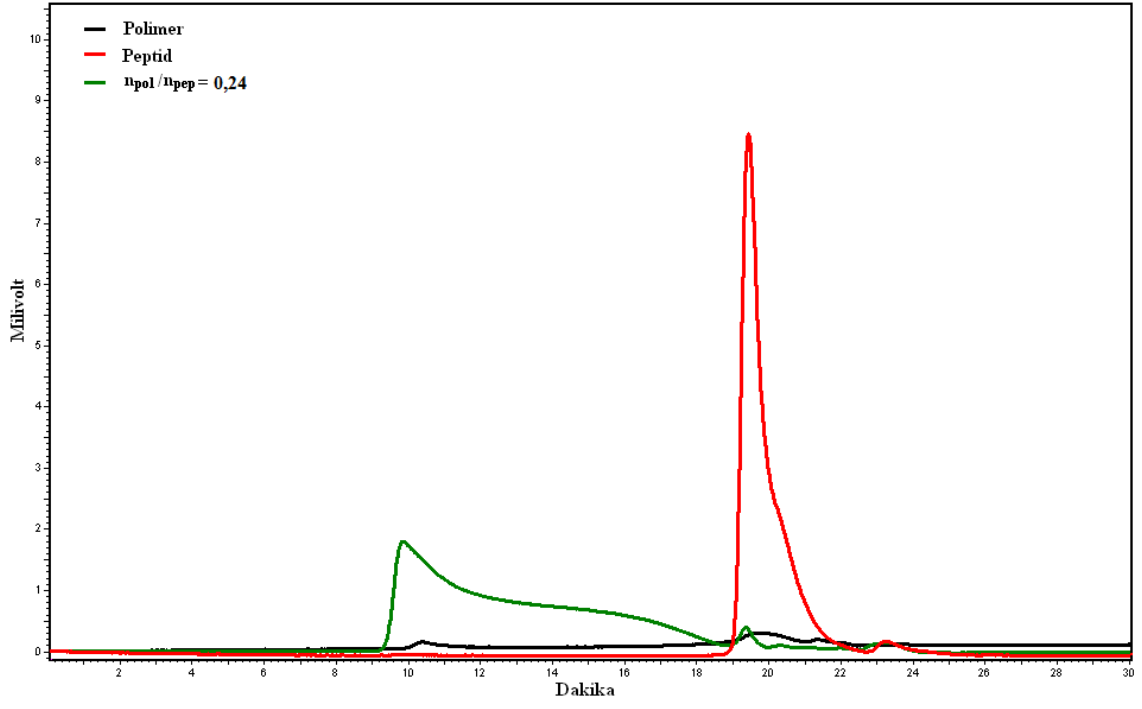
Şekil 5. 48 Peptid (♦), PAA polimeri (♦) ve pH 7'de hazırlanmış  $n_{PAA}/n_{pep}=0,048$  (♦) konjugatına ait HPLC kromatogramı



Şekil 5. 49 Peptid (◆), PAA polimeri (◆) ve pH 7’de hazırlanmış  $n_{PAA}/n_{pep}=0,096$  (◆) konjugatına ait HPLC kromatogramı

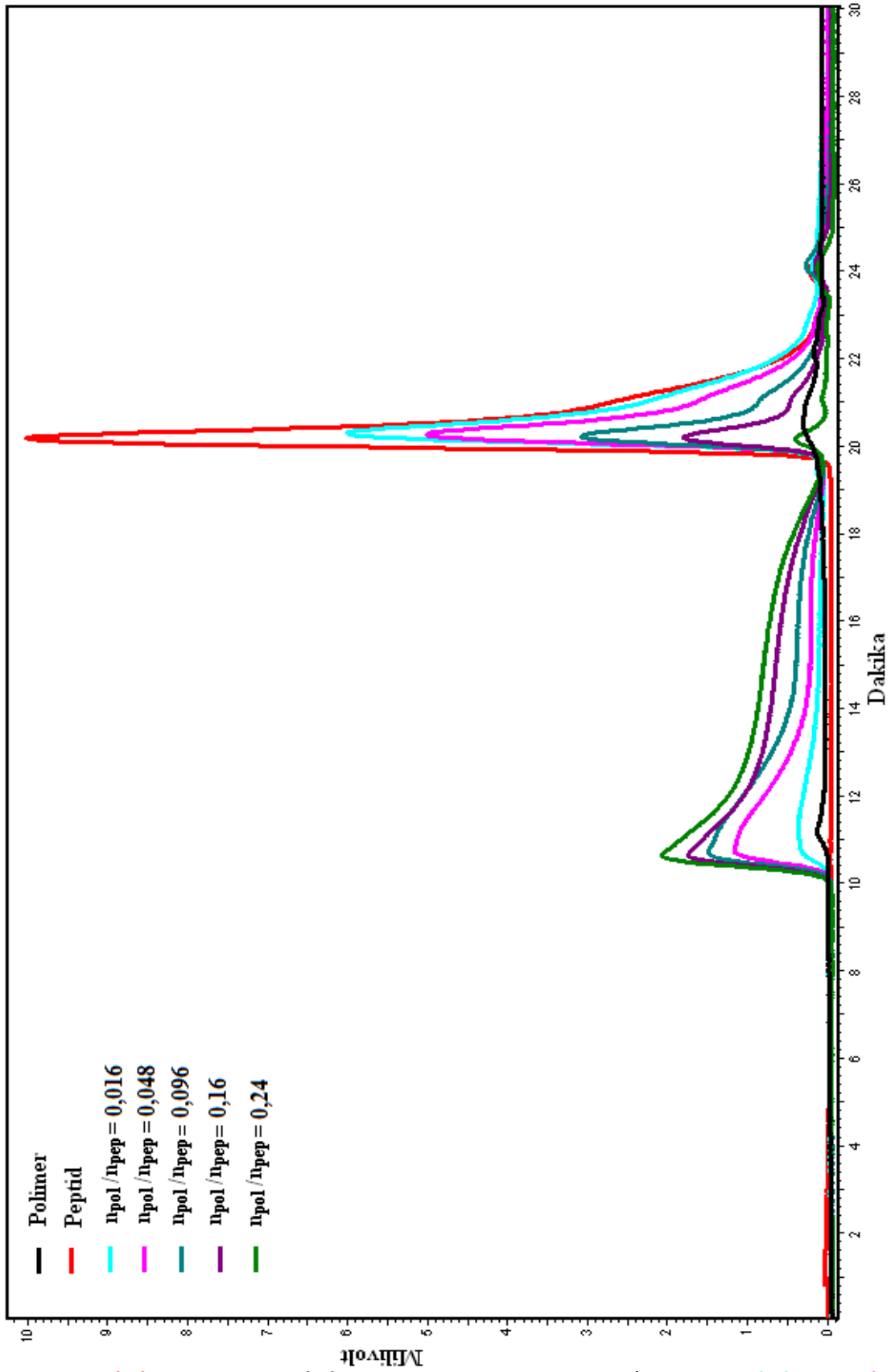


Şekil 5. 50 Peptid (◆), PAA polimeri (◆) ve pH 7’de hazırlanmış  $n_{PAA}/n_{pep}=0,16$  (◆) konjugatına ait HPLC kromatogramı



Şekil 5. 11 Peptid (◆), PAA polimeri (◆) ve pH 7'de hazırlanmış  $n_{PAA}/n_{pep}=0,24$  (◆) konjugatına ait HPLC kromatogramı

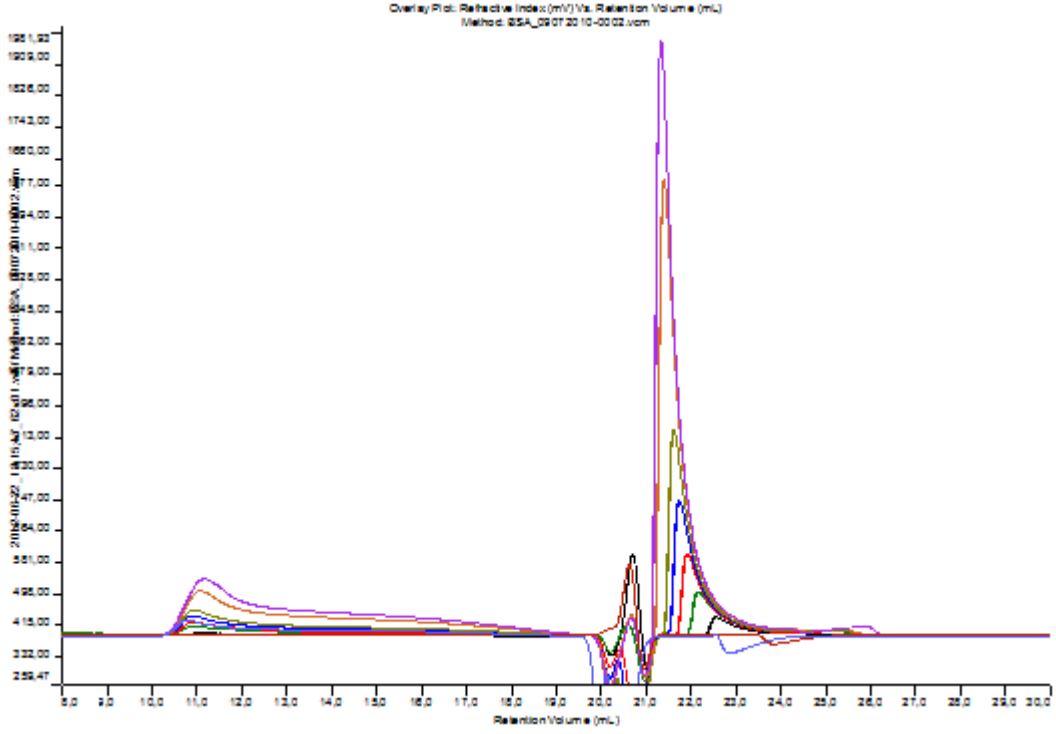




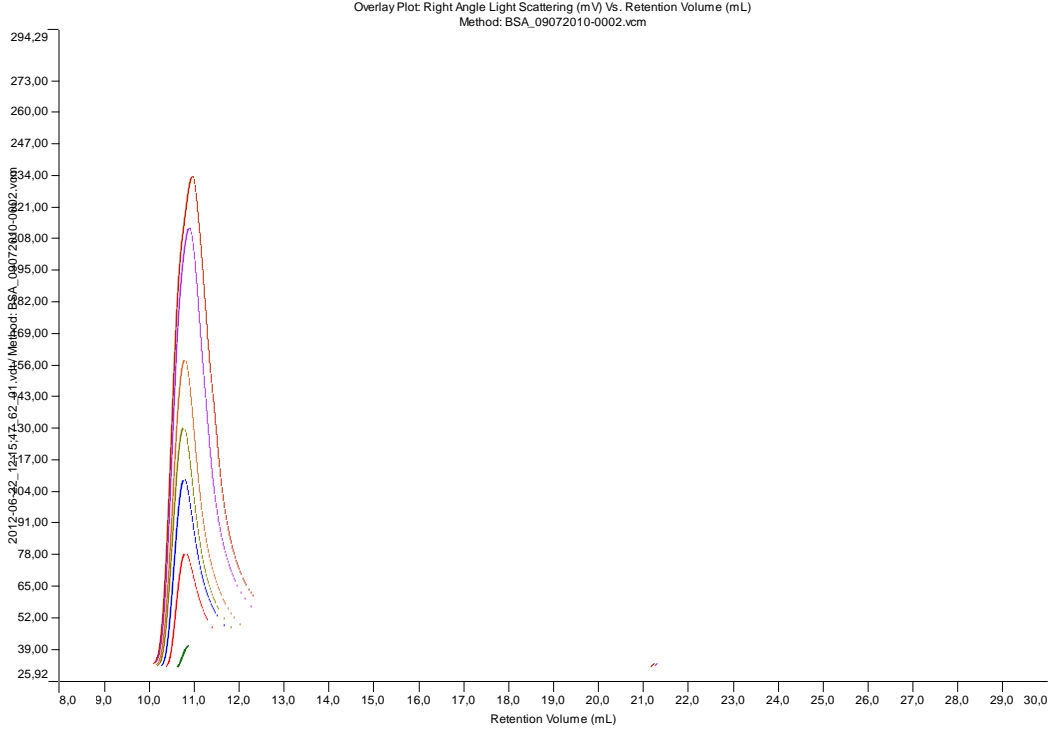
Şekil 5. 52 Peptid (♦), PAA polimeri (♦) ve pH 7'de hazırlanmış  $n_{PAA}/n_{pep}=0,016$  (♦), 0,048 (♦), 0,096 (♦), 0,16 (♦), 0,24 (♦) konjugatlarına ait HPLC kromatogramı

### 5.6.2.2 GPC Analizi

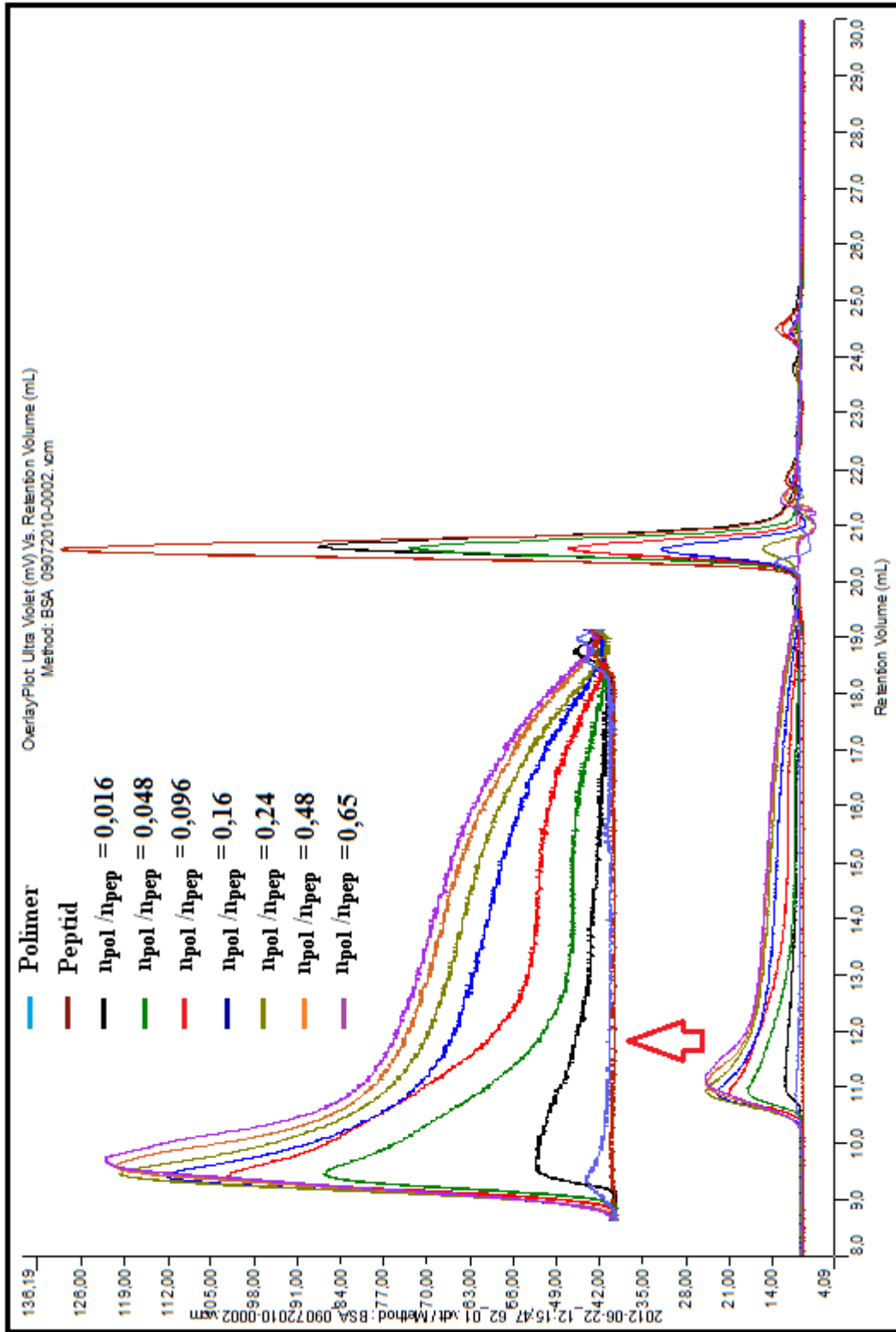
Karbodiimid yöntemi ile hazırlanan  $n_{PAA}/n_{pep}=0,016, 0,048, 0,096, 0,16, 0,24, 0,48, 0,65$  oranlarındaki konjugatlar GPC cihazı ile analiz edildi ve elde edilen GPC kromatogramları Şekil 5.53-5.55'te toplu olarak verildi.



Şekil 5. 53 Peptid (◆), PAA polimeri (◆) ve pH 7'de hazırlanmış  $n_{PAA}/n_{pep}=0,016$  (◆), 0,048 (◆), 0,096 (◆), 0,16 (◆), 0,24 (◆), 0,48 (◆), 0,65 (◆) konjugatlarına ait GPC Kırılma İndisi kromatogramı



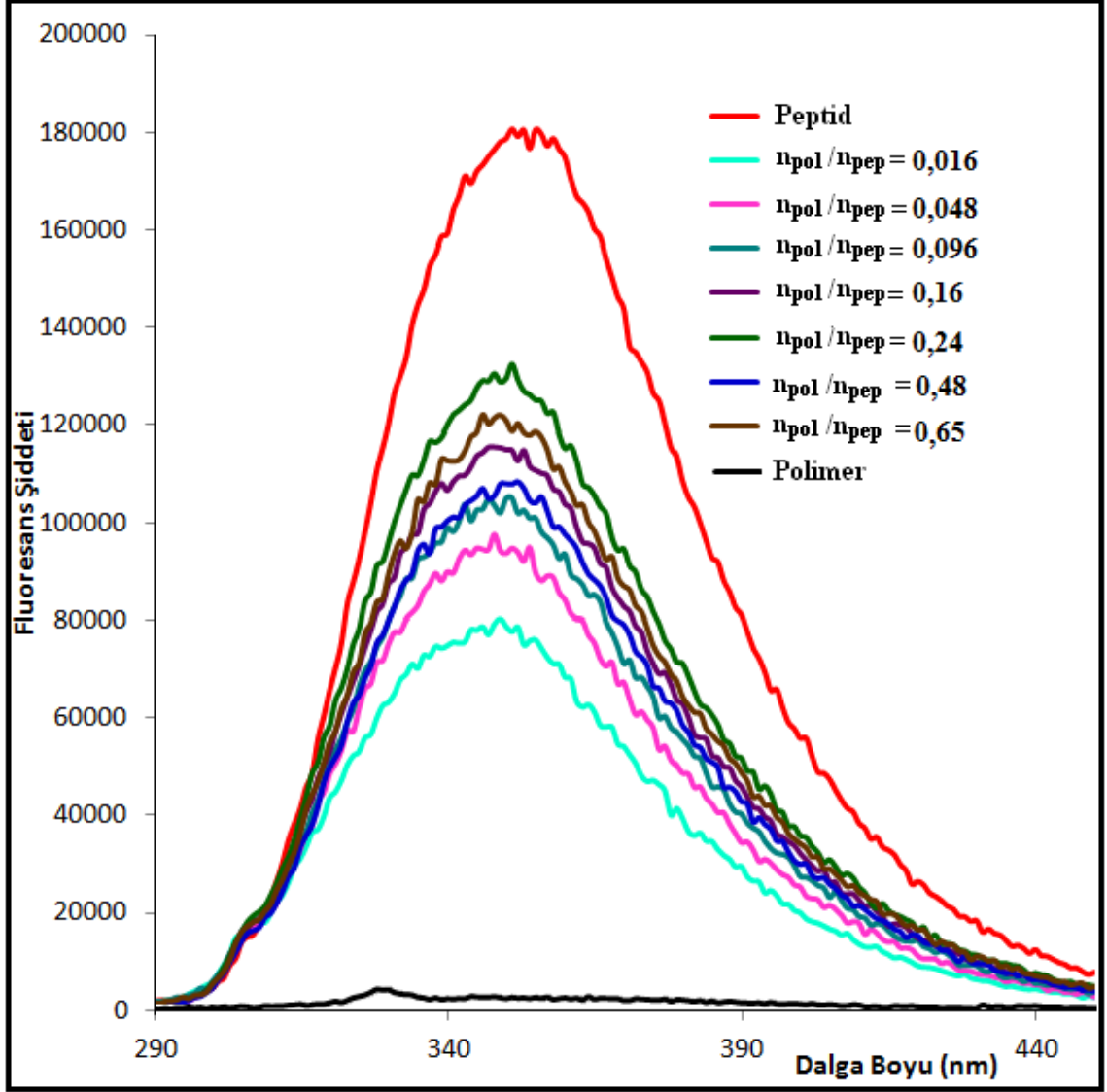
Şekil 5. 54 Peptid (◆), PAA polimeri (◆) ve pH 7’de hazırlanmış  $n_{PAA}/n_{pep}=0,016$  (◆), 0,048 (◆), 0,096 (◆), 0,16 (◆), 0,24 (◆), 0,48 (◆), 0,65 (◆) konugatlarına ait GPC Işık Saçılması kromatogramı



Şekil 5. 55 Peptid (◆), PAA polimeri (◆) ve pH 7’de hazırlanmış  $n_{PAA}/n_{pep}=0,016$  (◆), 0,048 (◆), 0,096 (◆), 0,16 (◆), 0,24 (◆), 0,48 (◆), 0,65 (◆) konjugatlarına ait GPC UV kromatogramı

### 5.6.2.3 Fluoresans Analizi

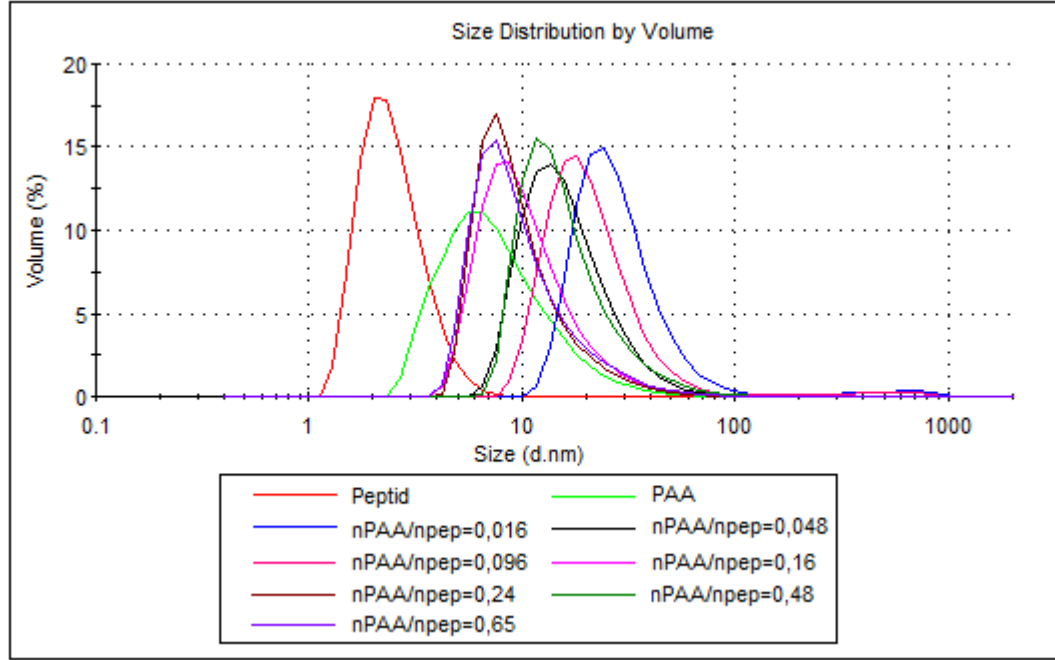
Karbodiimid yöntemi ile hazırlanan  $n_{PAA}/n_{pep}=0,016, 0,048, 0,096, 0,16, 0,24, 0,48, 0,65$  oranlarındaki konjugatların Fluoresans Spektrofotometre ile ölçümleri yapıldı ve elde edilen spektrumlar Şekil 5.56'da verildi.



Şekil 5. 56 Peptid (♦), PAA polimeri (◆) ve pH 7'de hazırlanmış  $n_{PAA}/n_{pep}=0,016$  (◆), 0,048 (◆), 0,096 (◆), 0,16 (◆), 0,24 (◆), 0,48 (◆), 0,65 (◆) konjugatlarına ait Fluoresans spektrumları

#### 5.6.2.4 Zetasizer Analizi

Karbodiimid yöntemi ile hazırlanan  $n_{PAA}/n_{pep}=0,016, 0,048, 0,096, 0,16, 0,24$  oranlarındaki konjugatlar Zetasizer cihazı ile analiz edildi ve elde edilen sonuçlar Şekil 5.57-Şekil 5.58'de verildi.



Şekil 5. 57 Peptid (♦), PAA polimeri (♦) ve pH 7'de hazırlanmış  $n_{PAA}/n_{pep}=0,016$  (♦), 0,048 (♦), 0,096 (♦), 0,16 (♦), 0,24 (♦), 0,48 (♦), 0,65 (♦) konjugatlarına ait boyut analizi sonuçları

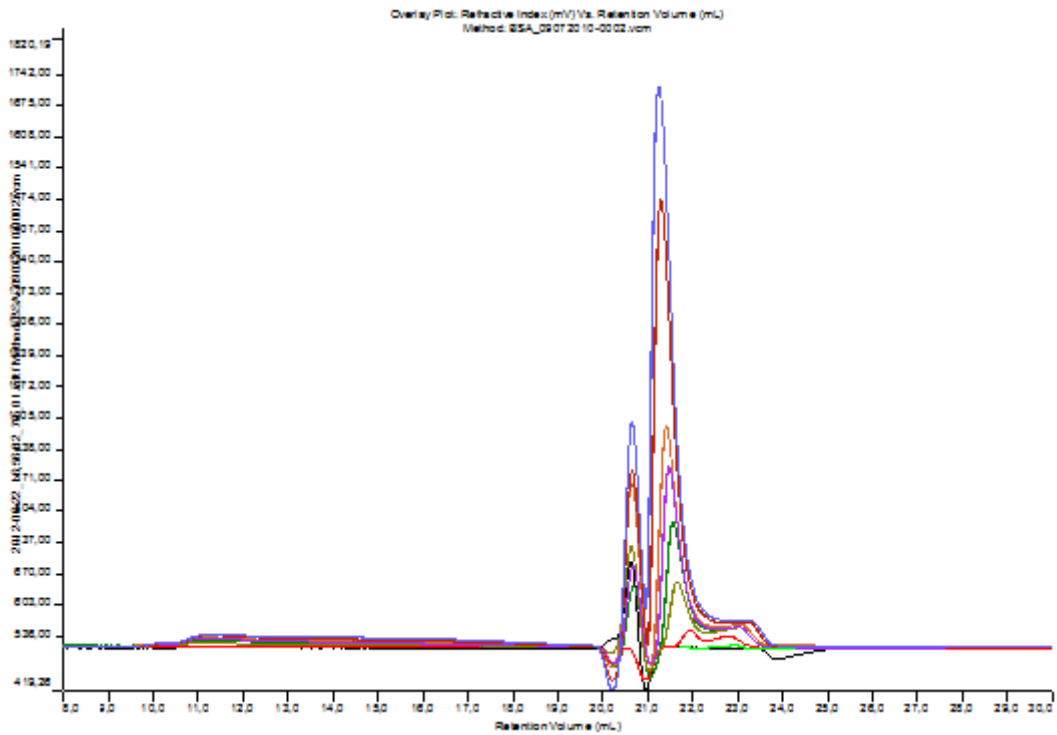
Sample Name	Z-Average d.nm	Pdl	ZP mV
Peptid	3,69	0,132	-3,4
PAA	25,56	0,396	-25,5
$n_{PAA}/n_{pep}=0,016$	37,75	0,559	-4,99
$n_{PAA}/n_{pep}=0,048$	40,40	0,444	-17,8
$n_{PAA}/n_{pep}=0,096$	61,00	0,657	-13,3
$n_{PAA}/n_{pep}=0,16$	33,86	0,679	-15,7
$n_{PAA}/n_{pep}=0,24$	41,77	0,719	-20,1
$n_{PAA}/n_{pep}=0,48$	78,23	0,206	-13,8
$n_{PAA}/n_{pep}=0,65$	35,83	0,520	-4,3

Şekil 5. 58 Peptid, PAA polimeri ve pH 7'de hazırlanmış  $n_{PAA}/n_{pep}=0,016, 0,048, 0,096, 0,16, 0,24, 0,48, 0,65$  konjugatlarına ait Z-Average, Pdl ve Zetapotansiyel değerleri

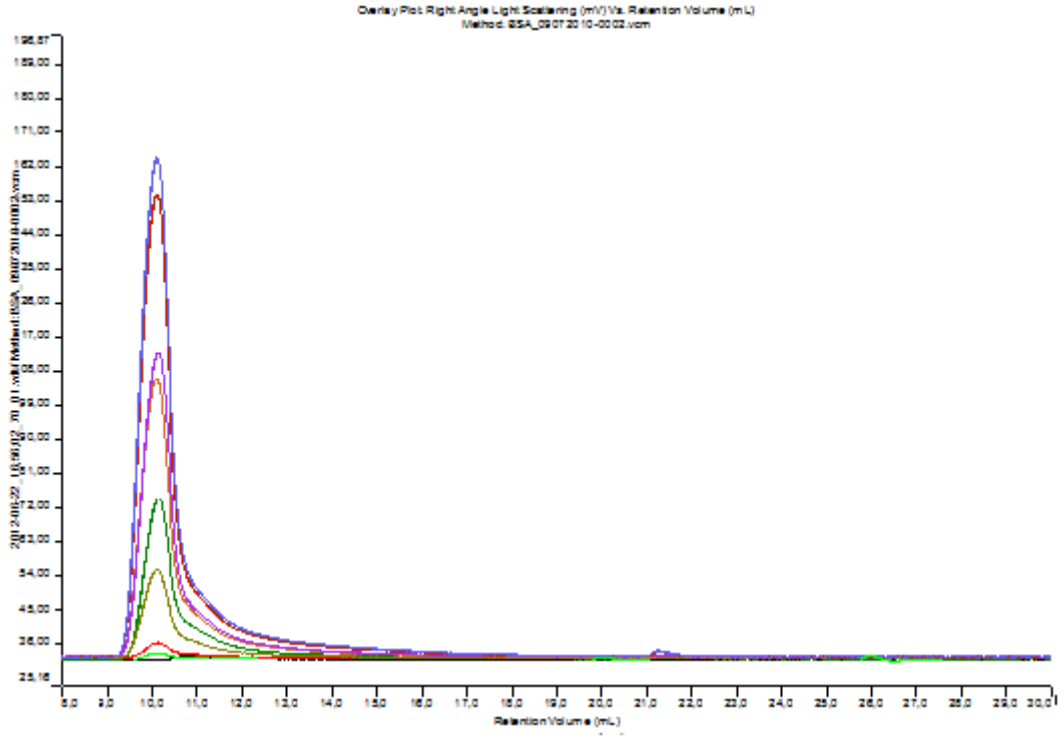
## 5.7 Canine Parvovirus W-1L19 Peptidinin Karboksimetilselülaz (CMC) Polimeri ile Biyokonjugatlarının Analizi

### 5.7.1 GPC Analizi

Karbodiimid yöntemi ile hazırlanan  $n_{\text{CMC}}/n_{\text{pep}}=0,018, 0,055, 0,11, 0,185, 0,287, 0,55, 0,74$  oranlarındaki konjugatlar GPC cihazı ile analiz edildi ve elde edilen GPC kromatogramları Şekil 5.59-5.61’de toplu olarak verildi.

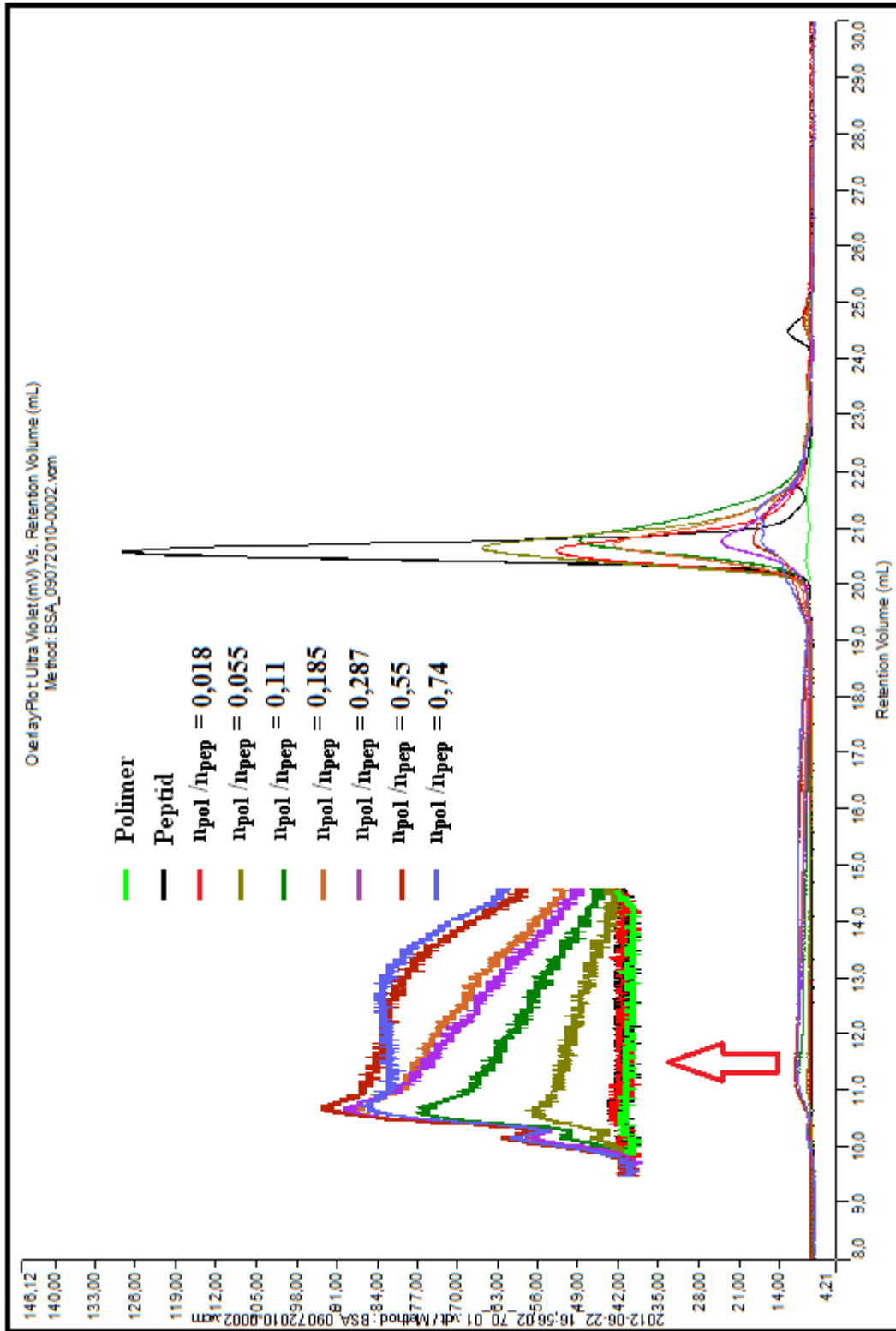


Şekil 5. 59 Peptid (◆), CMC polimeri (◆) ve pH 7’de hazırlanmış  $n_{\text{CMC}}/n_{\text{pep}}=0,018$  (◆), 0,055 (◆), 0,11 (◆), 0,185 (◆), 0,287 (◆), 0,55 (◆), 0,74 (◆) konjugatlarına ait GPC Kırılma İndisi kromatogramı



Şekil 5. 60 Peptid (◆), CMC polimeri (◆) ve pH 7’de hazırlanmış  $n_{CMC}/n_{pep}=0,018$  (◆), 0,055 (◆), 0,11 (◆), 0,185 (◆), 0,287 (◆), 0,55 (◆), 0,74 (◆) konjugatlarına ait GPC Işık Saçılması kromatogramı

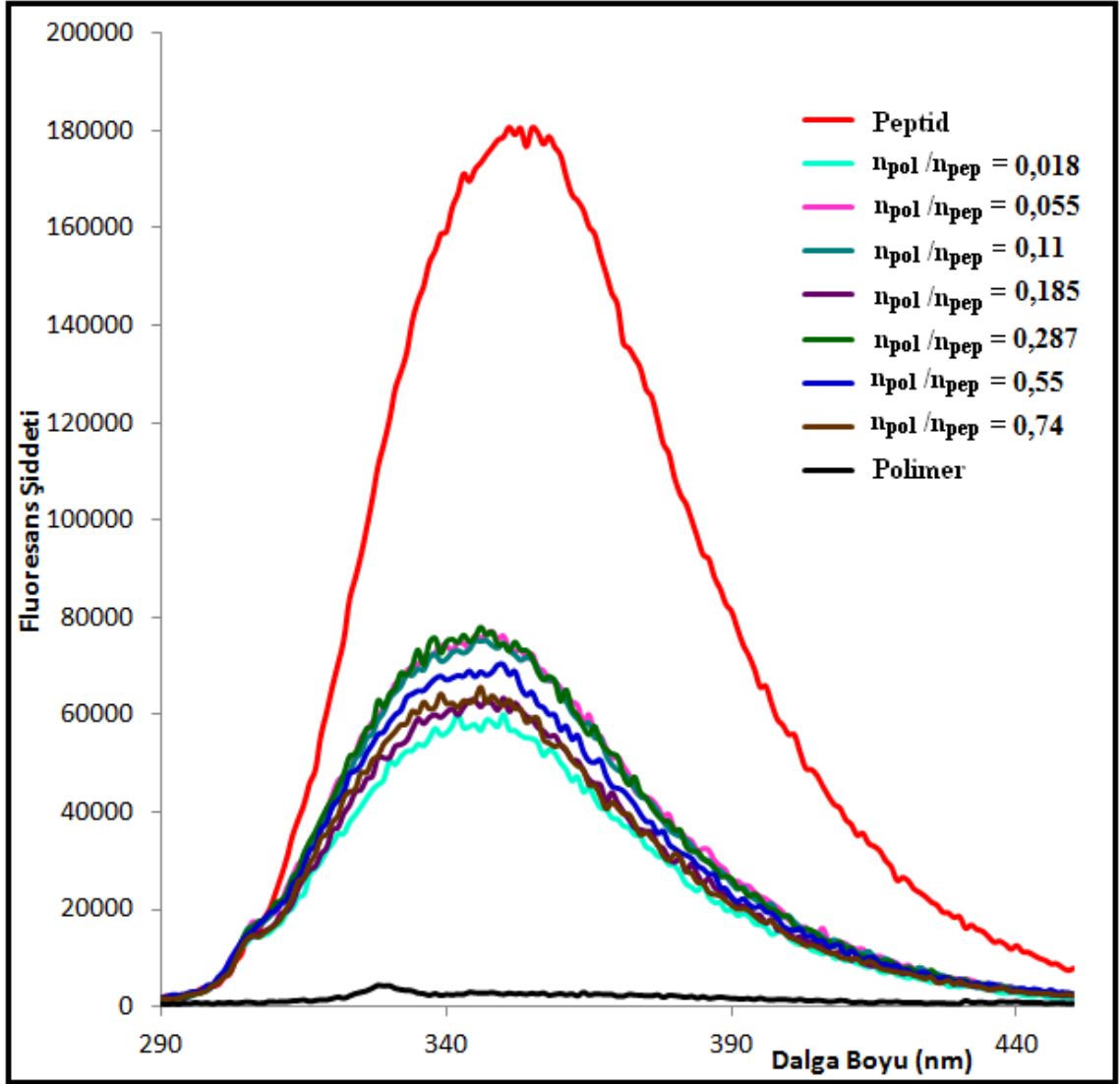




Şekil 5. 61 Peptid (◆), CMC polimeri (◆) ve pH 7'de hazırlanmış  $n_{\text{CMC}}/n_{\text{pep}}=0,018$  (◆), 0,055 (◆), 0,11 (◆), 0,185 (◆), 0,287 (◆), 0,55 (◆), 0,74 (◆) konjugatlarına ait GPC UV kromatogramı

### 5.7.2 Fluoresans Analizi

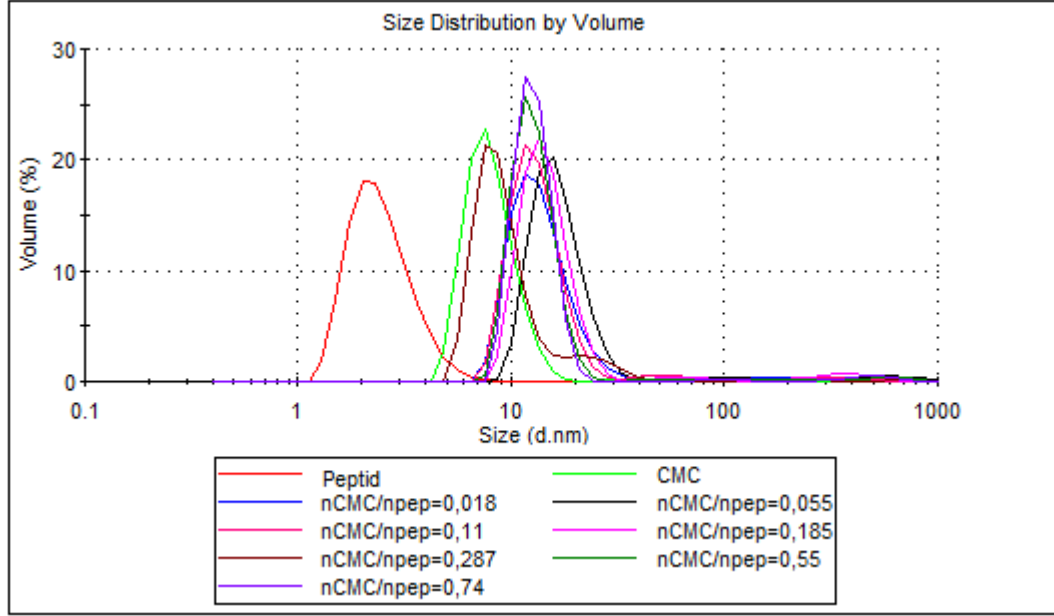
Karbodiimid yöntemi ile hazırlanan  $n_{CMC}/n_{pep}=0,018, 0,055, 0,11, 0,185, 0,287, 0,55, 0,74$  oranlarındaki konjugatların Fluoresans Spektrofotometre ile ölçümleri yapıldı ve elde edilen spektrumlar Şekil 5.62’de verildi.



Şekil 5. 62 Peptid (♦), CMC polimeri (◆) ve pH 7’de hazırlanmış  $n_{CMC}/n_{pep}=0,018$  (◆), 0,055 (◆), 0,11 (◆), 0,185 (◆), 0,287 (◆), 0,55 (◆), 0,74 (◆) konjugatlarına ait Fluoresans spektrumları

### 5.7.3 Zetasizer Analizi

Karbodiimid yöntemi ile hazırlanan  $n_{CMC}/n_{pep}=0,018, 0,055, 0,11, 0,185, 0,287, 0,55, 0,74$  oranlarındaki konjugatlar Zetasizer cihazı ile analiz edildi ve elde edilen sonuçlar Şekil 5.63-Şekil 5.64'te verildi.



Şekil 5. 63 Peptid (♦), CMC polimeri (♦) ve pH 7'de hazırlanmış  $n_{CMC}/n_{pep}=0,018$  (♦), 0,055 (♦), 0,11 (♦), 0,185 (♦), 0,287 (♦), 0,55 (♦), 0,74 (♦) konjugatlarına ait boyut analizi sonuçları

Sample Name	Z-Average d.nm	Pdl	ZP mV
Peptid	3,69	0,132	-3,4
CMC	9,75	0,411	-32,3
$n_{CMC}/n_{pep}=0,018$	18,70	0,403	-17,8
$n_{CMC}/n_{pep}=0,055$	20,00	0,439	-18,4
$n_{CMC}/n_{pep}=0,11$	15,79	0,488	-9,8
$n_{CMC}/n_{pep}=0,185$	17,09	0,469	-10,8
$n_{CMC}/n_{pep}=0,287$	9,83	0,551	-14,4
$n_{CMC}/n_{pep}=0,55$	14,33	0,494	-15,7
$n_{CMC}/n_{pep}=0,74$	13,87	0,534	-18,8

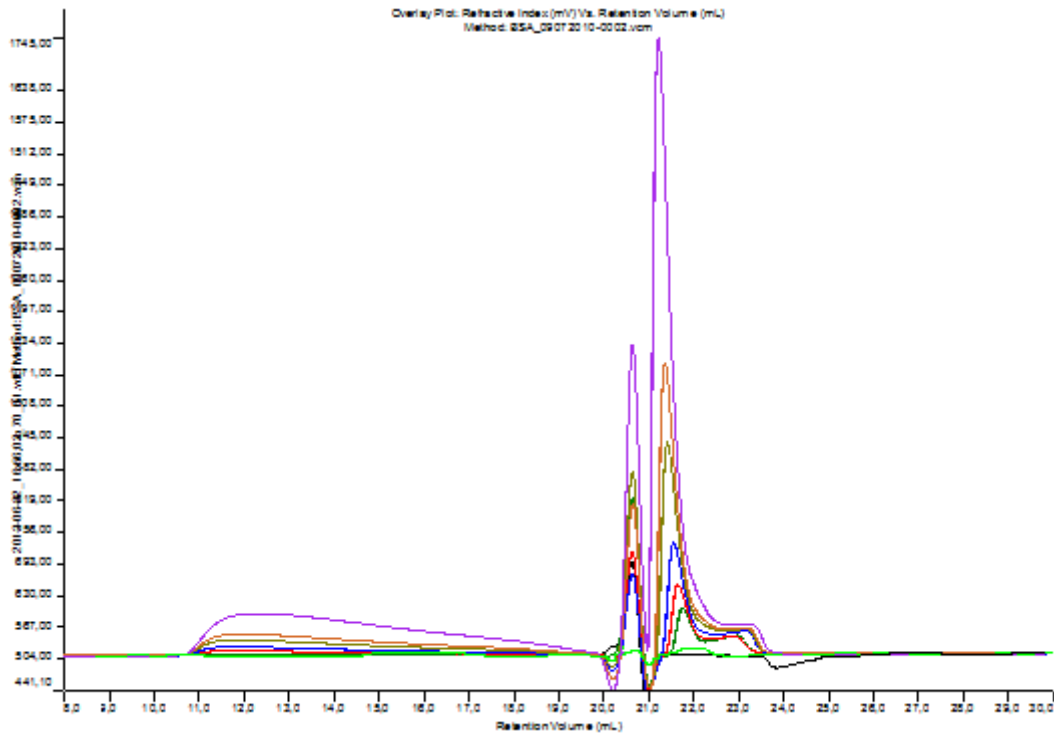
Şekil 5. 64 Peptid, CMC polimeri ve pH 7'de hazırlanmış  $n_{CMC}/n_{pep}=0,018, 0,055, 0,11, 0,185, 0,287, 0,55, 0,74$  konjugatlarına ait Z-Average, Pdl ve Zetapotansiyel değerleri

## 5.8 Canine Parvovirus W-1L19 Peptidinin Poli(N-Vinil-2-Pirolidon-*ko*-Akrilikasid) [P(VP-*co*-AA)] Polimeri ile Biyokonjugatlarının Analizi

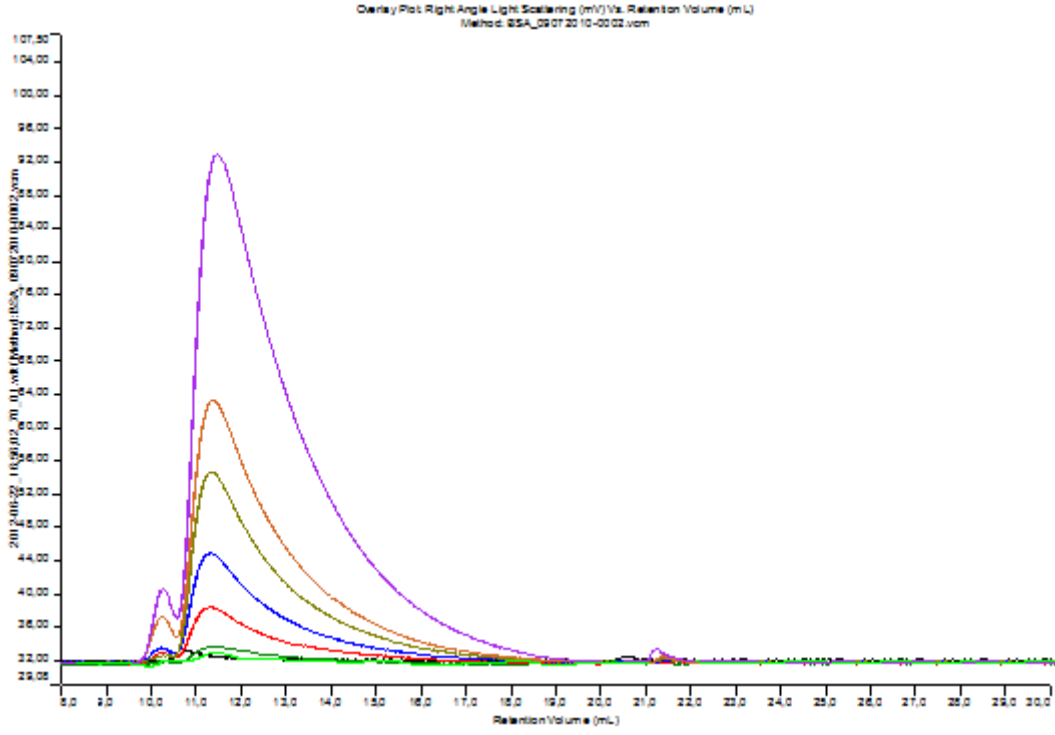
### 5.8.1 [P(VP-*ko*-AA)] (2:1, 120.000 Da) Polimerinin Artan Oranlarında Konjugasyon

#### 5.8.1.1 GPC Analizi

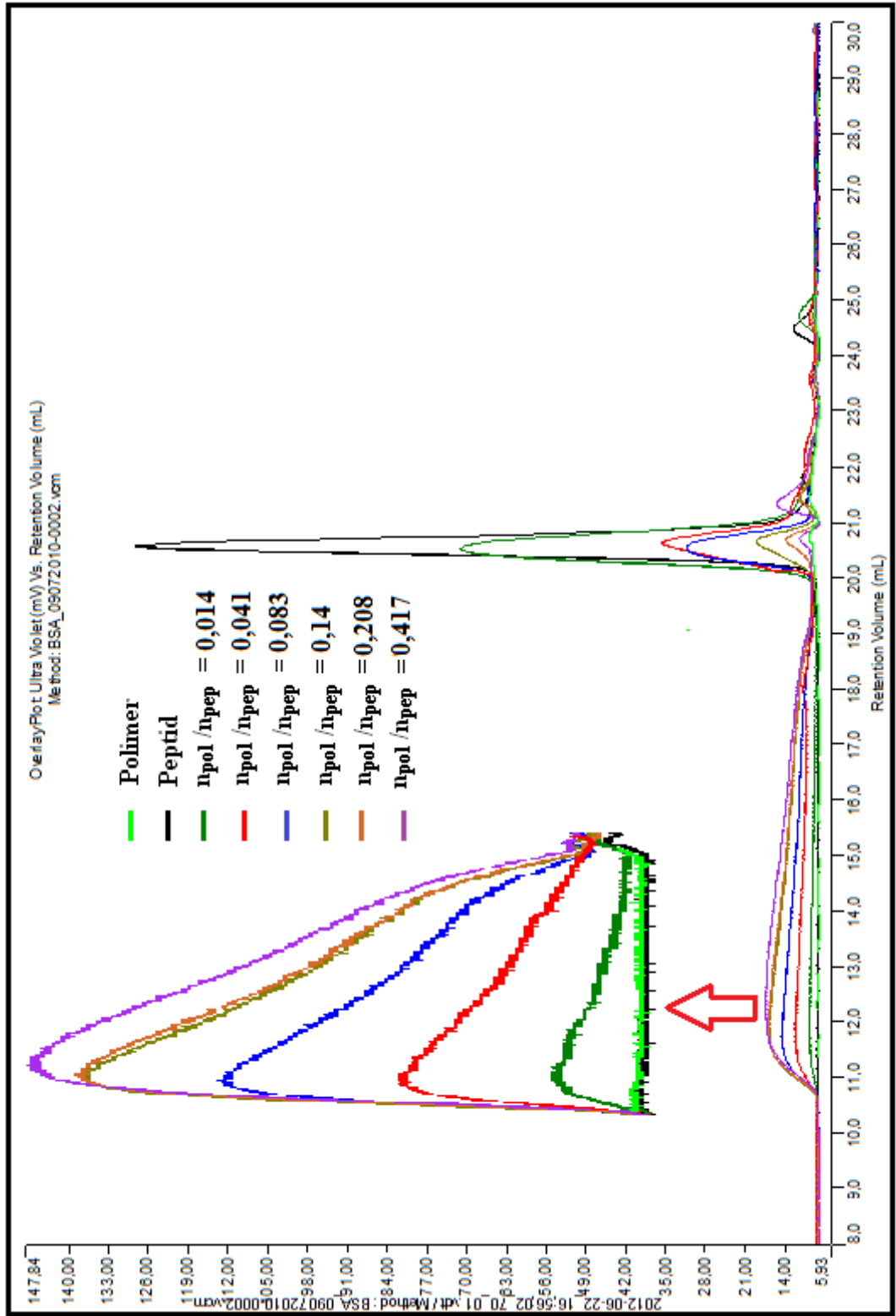
Karbodiimid yöntemi ile hazırlanan  $n_{(VP-ko-AA)120kDa}/n_{pep}=0,014, 0,041, 0,083, 0,14, 0,208, 0,417$  oranlarındaki konjugatlar GPC cihazı ile analiz edildi ve elde edilen GPC kromatogramları Şekil 5.65-5.67'de toplu olarak verildi.



Şekil 5. 65 Peptid (◆), P(VP-*ko*-AA)<sub>120kDa</sub> polimeri (◆) ve pH 7'de hazırlanmış  $n_{(VP-ko-AA)120kDa}/n_{pep}=0,014$  (◆), 0,041 (◆), 0,083 (◆), 0,14 (◆), 0,208 (◆), 0,417 (◆) konjugatlarına ait GPC Kırılma İndisi kromatogramı



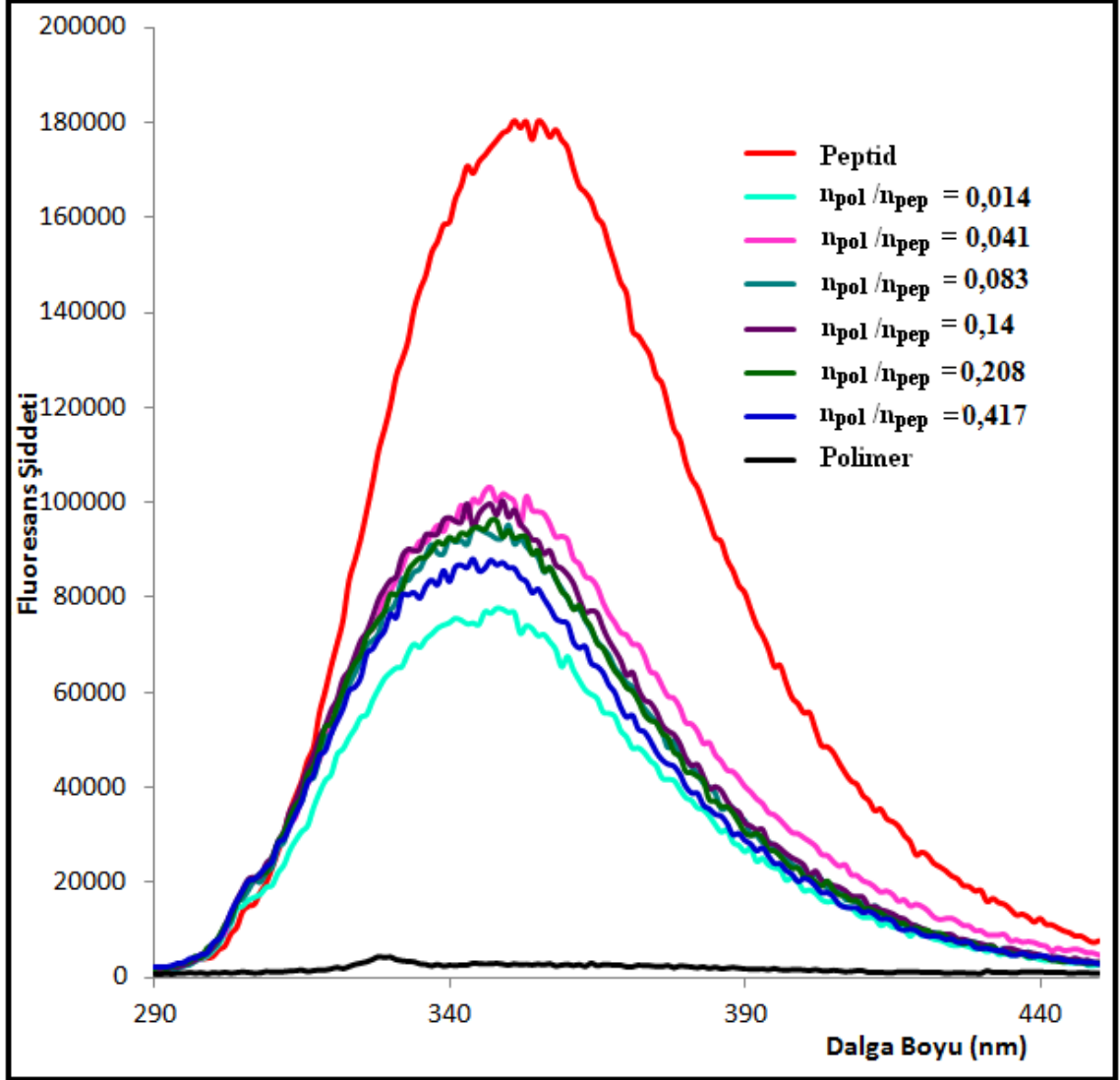
Şekil 5. 66 Peptid (◆), P(VP-ko-AA)<sub>120kDa</sub> polimeri (◆) ve pH 7'de hazırlanmış  $\eta_{P(VP-ko-AA)120kDa}/\eta_{pep}$ =0,014 (◆), 0,041 (◆), 0,083 (◆), 0,14 (◆), 0,208 (◆), 0,417 (◆) konjugatlarına ait GPC Işık Saçılması kromatogramı



Şekil 5. 67 Peptid (◆), P(VP-ko-AA)<sub>120kDa</sub> polimeri (◆) ve pH 7'de hazırlanmış  $n_{\text{P(VP-ko-AA)120kDa}}/n_{\text{pep}}=0,014$  (◆), 0,041 (◆), 0,083 (◆), 0,14 (◆), 0,208 (◆), 0,417 (◆) konjugatlarına ait GPC UV kromatogramı

### 5.8.1.2 Floresans Analizi

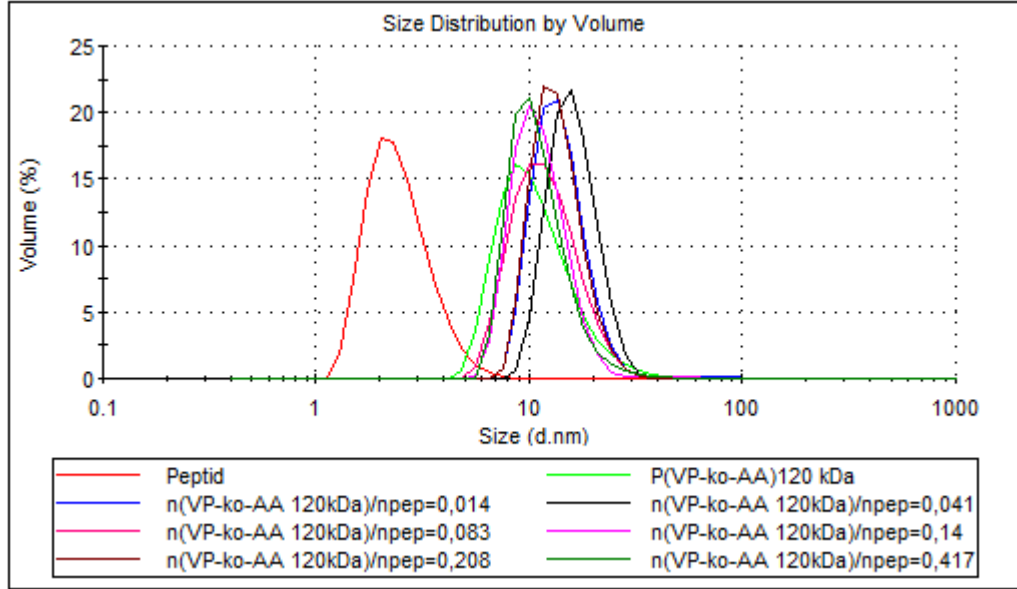
Karbodiimid yöntemi ile hazırlanan  $n_{P(VP-ko-AA)120kDa}/n_{pep}=0,014, 0,041, 0,083, 0,14, 0,208, 0,417$  oranlarındaki konjugatların Floresans Spektrofotometre ile ölçümleri yapıldı ve elde edilen spektrumlar Şekil 5.68’de verildi.



Şekil 5. 68 Peptid (♦),  $P(VP-ko-AA)_{120kDa}$  (♦) ve pH 7’de hazırlanmış  $n_{P(VP-ko-AA)120kDa}/n_{pep}=0,014$  (♦), 0,041 (♦), 0,083 (♦), 0,14 (♦), 0,208 (♦), 0,417 (♦) konjugatlarına ait Floresans spektrumları

### 5.8.1.3 Zetasizer Analizi

Karbodiimid yöntemi ile hazırlanan  $n_{P(VP-ko-AA)120kDa}/n_{pep}=0,014, 0,041, 0,083, 0,14, 0,208, 0,417$  oranlarındaki konjugatlar Zetasizer cihazı ile analiz edildi ve elde edilen sonuçlar Şekil 5.69-Şekil 5.70'te verildi.



Şekil 5. 69 Peptid (♦), P(VP-ko-AA)<sub>120kDa</sub> polimeri (♦) ve pH 7'de hazırlanmış  $n_{P(VP-ko-AA)120kDa}/n_{pep}=0,014$  (♦), 0,041 (♦), 0,083 (♦), 0,14 (♦), 0,208 (♦), 0,417 (♦) konjugatlarına ait boyut analizi sonuçları

Sample Name	Z-Average d.nm	Pdl	ZP mV
Peptid	3,69	0,132	-3,4
P(VP-ko-AA)120 kDa	11,36	0,308	-9,54
$n(VP-ko-AA 120kDa)/n_{pep}=0,014$	16,99	0,599	-8,21
$n(VP-ko-AA 120kDa)/n_{pep}=0,041$	18,92	0,630	-6,94
$n(VP-ko-AA 120kDa)/n_{pep}=0,083$	17,05	0,549	-7,81
$n(VP-ko-AA 120kDa)/n_{pep}=0,14$	14,06	0,579	-6,30
$n(VP-ko-AA 120kDa)/n_{pep}=0,208$	16,83	0,707	-6,79
$n(VP-ko-AA 120kDa)/n_{pep}=0,417$	19,36	0,300	-7,36

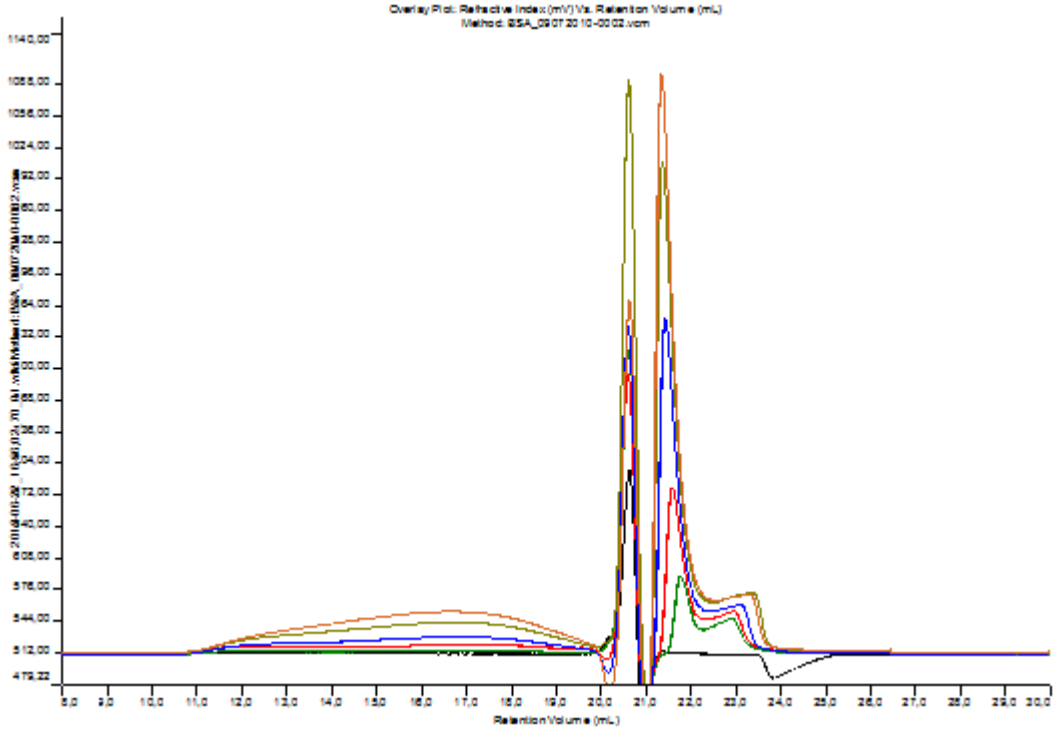
Şekil 5. 70 Peptid, P(VP-ko-AA)<sub>120kDa</sub> polimerive pH 7'de hazırlanmış  $n_{P(VP-ko-AA)120kDa}/n_{pep}=0,014, 0,041, 0,083, 0,14, 0,208, 0,417$  konjugatlarına ait Z-Average, Pdl ve Zetapotansiyel değerleri



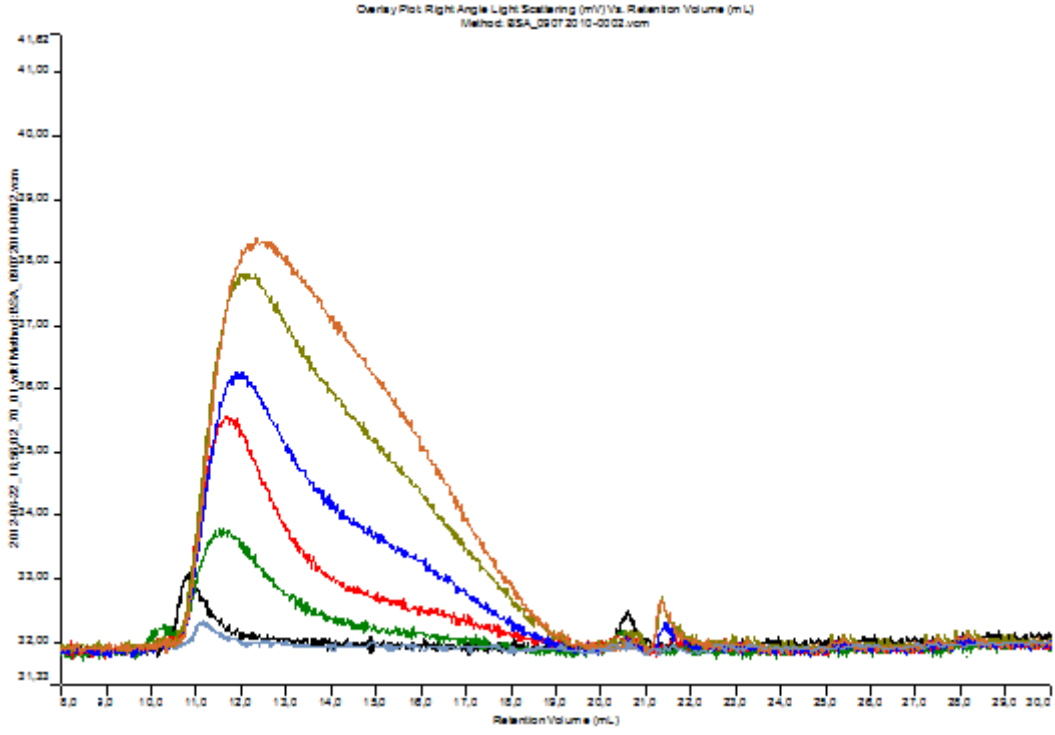
## 5.8.2 [P(VP-*ko*-AA)] (1:3, 80.000 Da) Polimerinin Artan Oranlarında Konjugasyon

### 5.8.2.1 GPC Analizi

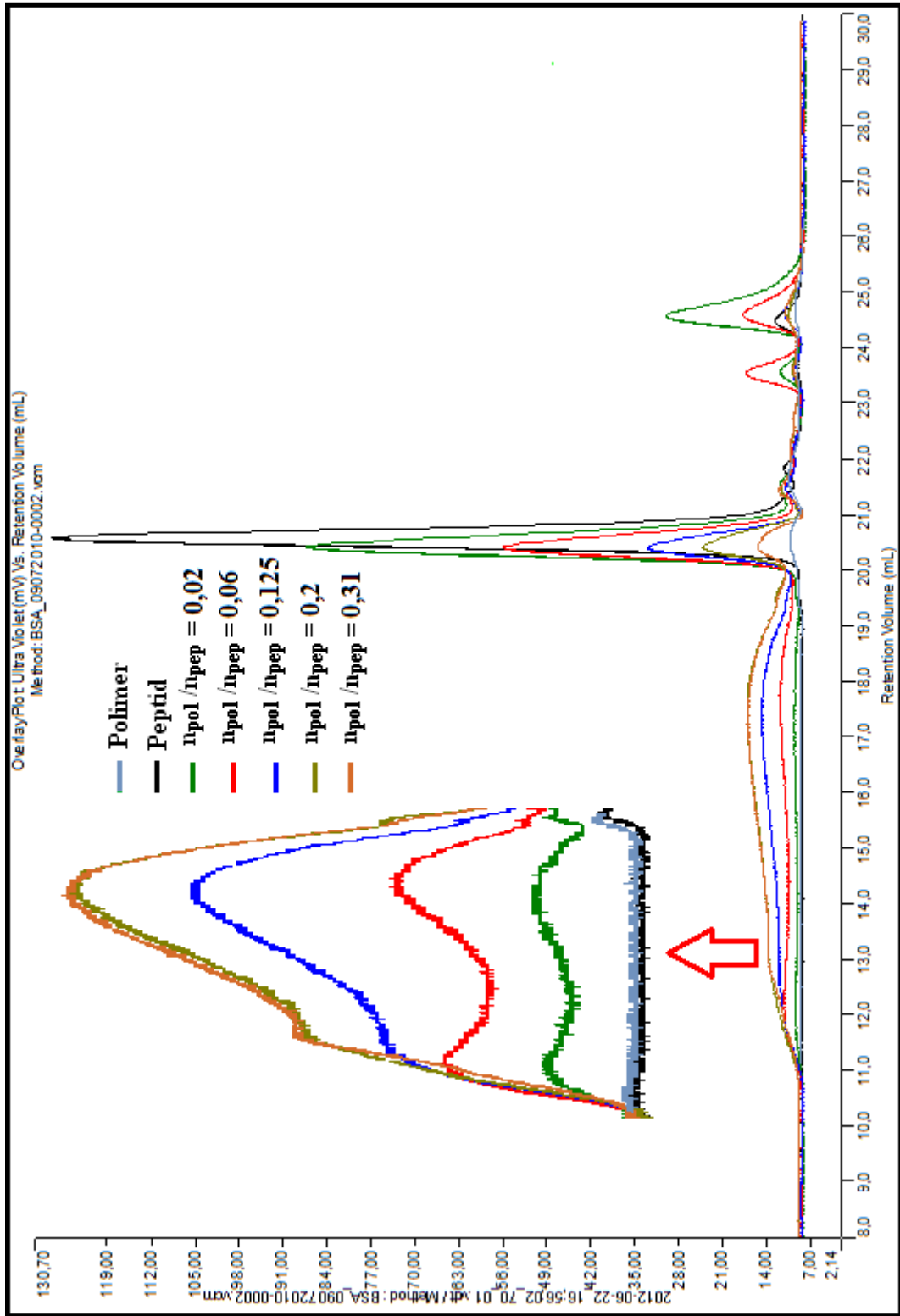
Karbodiimid yöntemi ile hazırlanan  $n_{P(VP-ko-AA)80kDa}/n_{pep}=0,02, 0,06, 0,125, 0,2, 0,31$  oranlarındaki konjugatlar GPC cihazı ile analiz edildi ve elde edilen GPC kromatogramları Şekil 5.71-5.73'te toplu olarak verildi.



Şekil 5. 71 Peptid (♦), P(VP-*ko*-AA)<sub>80kDa</sub> polimeri (♦) ve pH 7'de hazırlanmış  $n_{P(VP-ko-AA)80kDa}/n_{pep}=0,02$  (♦), 0,06 (♦), 0,125 (♦), 0,2 (♦), 0,31 (♦) konjugatlarına ait GPC Kırılma İndisi kromatogramı



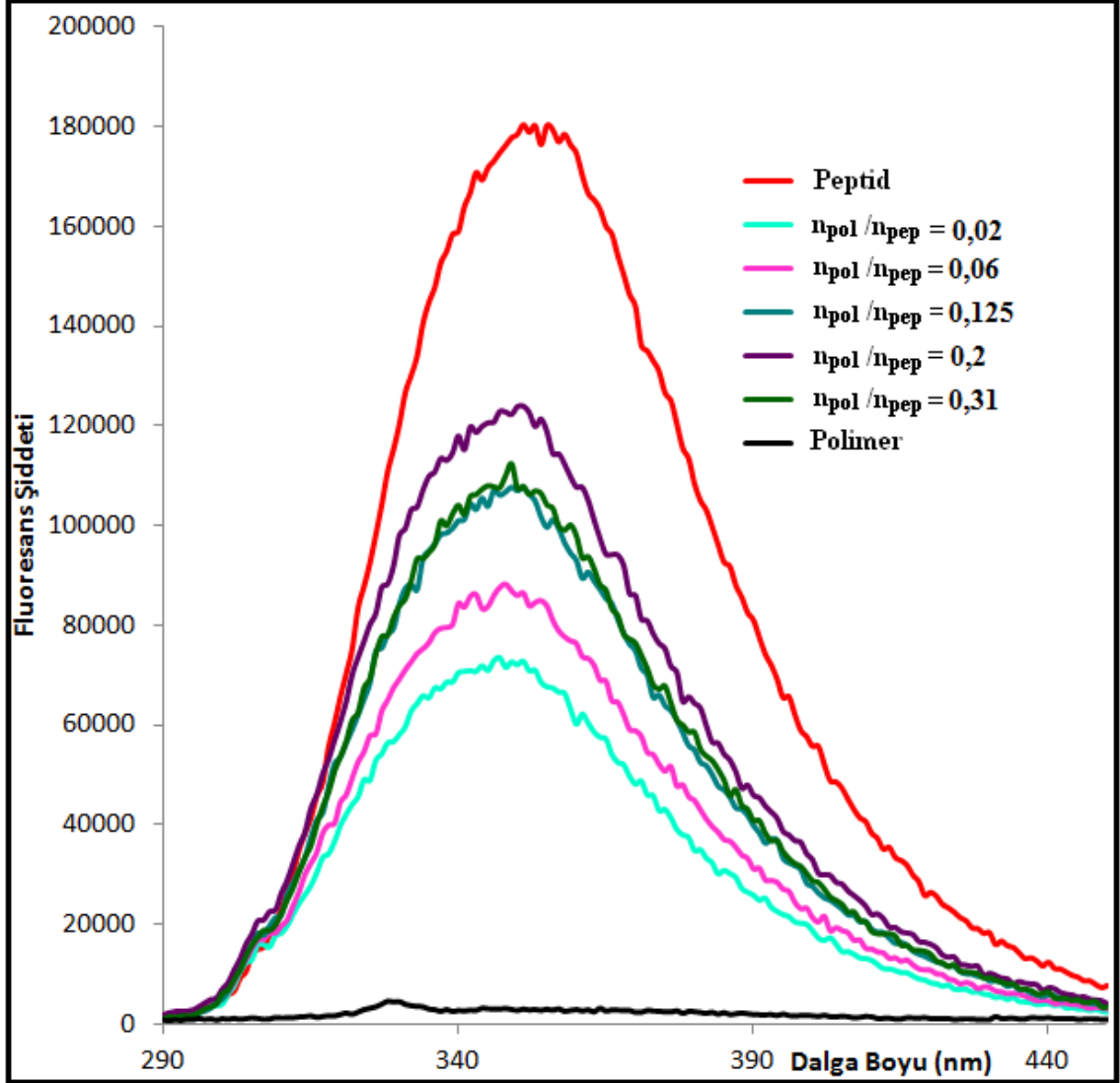
Şekil 5. 72 Peptid (◆), P(VP-ko-AA)<sub>80kDa</sub> polimeri (◆) ve pH 7'de hazırlanmış  $n_{P(VP-ko-AA)80kDa}/n_{pep}=0,02$  (◆), 0,06 (◆), 0,125 (◆), 0,2 (◆), 0,31 (◆) konjugatlarına ait GPC Işık Saçılması kromatogramı



Şekil 5. 73 Peptid (◆),  $P(VP-ko-AA)_{80kDa}$  polimeri (◆) ve pH 7'de hazırlanmış  $n_{P(VP-ko-AA)_{80kDa}}/n_{pep}=0,02$  (◆), 0,06 (◆), 0,125 (◆), 0,2 (◆), 0,31 (◆) konjugatlarına ait GPC UV kromatogramı

### 5.8.2.2 Floresans Analizi

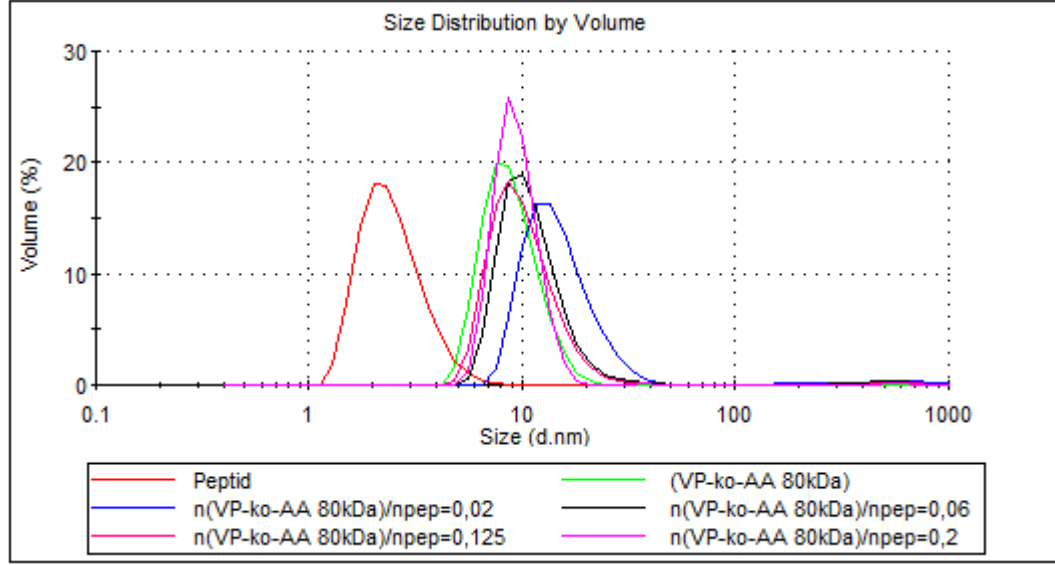
Karbodiimid yöntemi ile hazırlanan  $n_{(VP-ko-AA)80kDa}/n_{pep}=0,02, 0,06, 0,125, 0,2, 0,31$  oranlarındaki konjugatların Floresans Spektrofotometre ile ölçümleri yapıldı ve elde edilen spektrumlar Şekil 5.74'te verildi.



Şekil 5. 74 Peptid (♦), P(VP-ko-AA)<sub>80kDa</sub> (◆) ve pH 7'de hazırlanmış  $n_{P(VP-ko-AA)80kDa}/n_{pep}=0,02$  (◆), 0,06 (◆), 0,125 (◆), 0,2 (◆), 0,31 (◆) konjugatlarına ait Floresans spektrumları

### 5.8.2.3 Zetasizer Analizi

Karbodiimid yöntemi ile hazırlanan  $n_{P(VP-ko-AA)80kDa}/n_{pep}=0,02, 0,06, 0,125, 0,2$  oranlarındaki konjugatlar Zetasizer cihazı ile analiz edildi ve elde edilen sonuçlar Şekil 5.75-Şekil 5.76'da verildi.



Şekil 5. 75 Peptid (♦), P(VP-ko-AA)<sub>80kDa</sub> polimeri (♦) ve pH 7'de hazırlanmış  $n_{P(VP-ko-AA)80kDa}/n_{pep}=0,02$  (♦), 0,06 (♦), 0,125 (♦), 0,2 (♦) konjugatlarına ait boyut analizi sonuçları

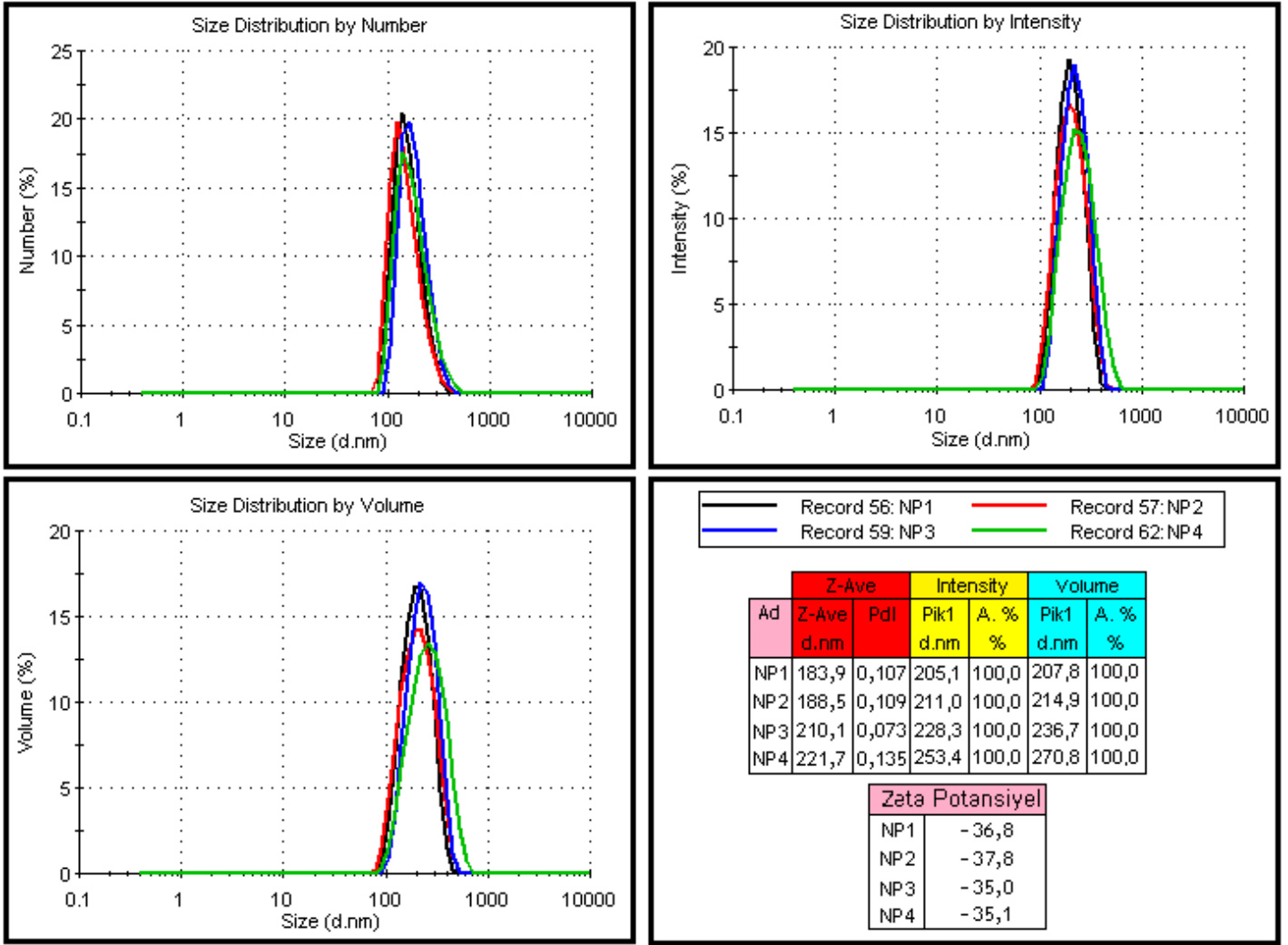
Sample Name	Z-Average d.nm	Pdl	ZP mV
Peptid	3,69	0,132	-3,4
P(VP-ko-AA 80kDa)	11,43	1,000	-18,4
$n(VP-ko-AA 80kDa)/n_{pep}=0,02$	21,67	1,000	-12,8
$n(VP-ko-AA 80kDa)/n_{pep}=0,06$	16,33	0,872	-14,3
$n(VP-ko-AA 80kDa)/n_{pep}=0,125$	17,33	0,723	-11,9
$n(VP-ko-AA 80kDa)/n_{pep}=0,2$	18,63	0,846	-17,3

Şekil 5. 76 Peptid, P(VP-ko-AA)<sub>80kDa</sub> polimerive pH 7'de hazırlanmış  $n_{P(VP-ko-AA)80kDa}/n_{pep}=0,02, 0,06, 0,125, 0,2$  konjugatlarına ait Z-Average, Pdl ve Zetapotansiyel değerleri

## 5.9 Poli(Laktik-ko-glikolik) Asid (PLGA) Nanopartiküllerinin Analizi

### 5.9.1 Zetasizer Analizi

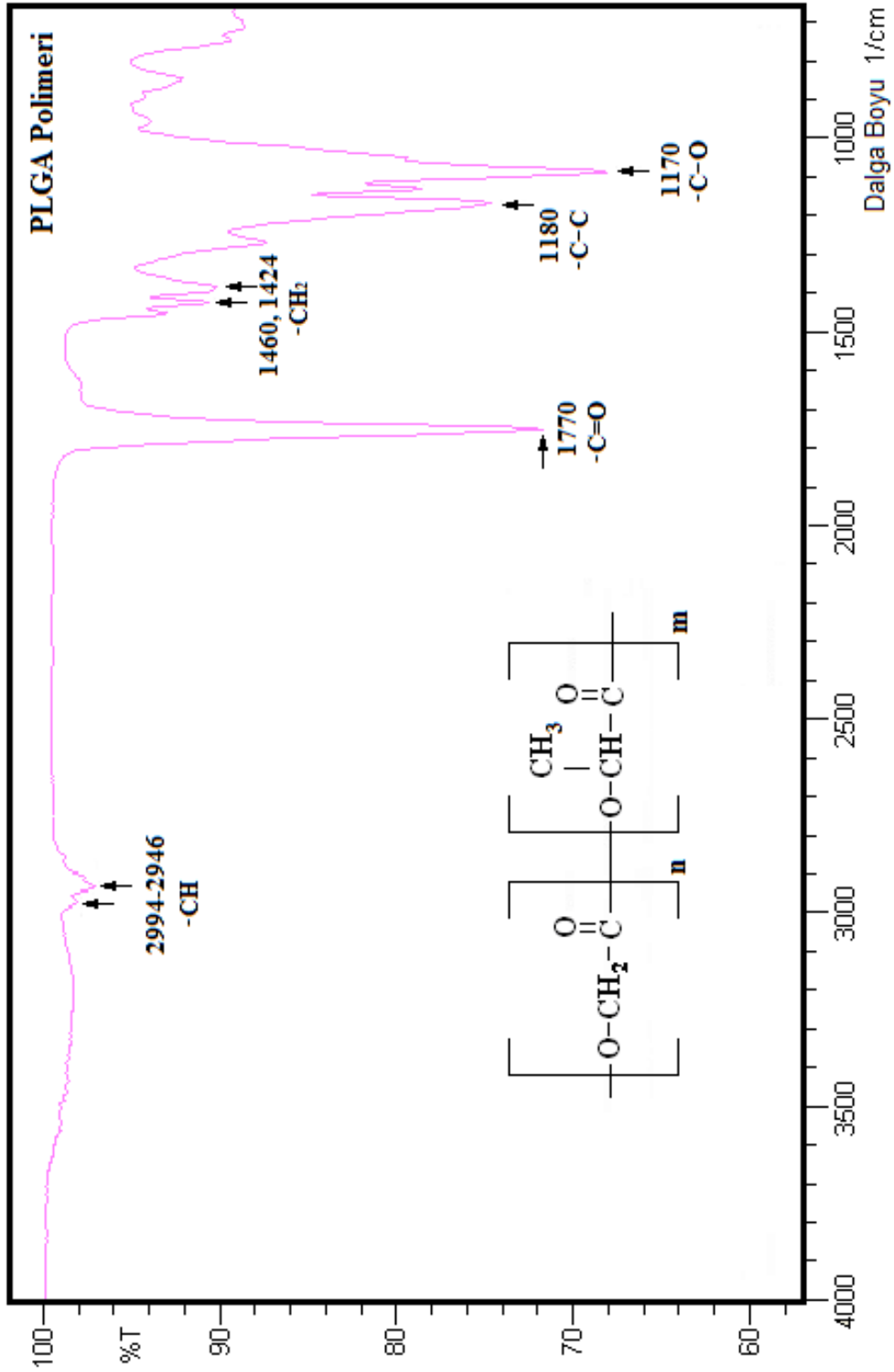
PLGA polimeri ve bu polimer kullanılarak ikili emülsiyon w/o/w çözücü buharlaştırma tekniği ile üretilen nanopartiküllere ait boyut ve zeta potansiyel ölçüm sonuçları Şekil 5.77'de verildi.



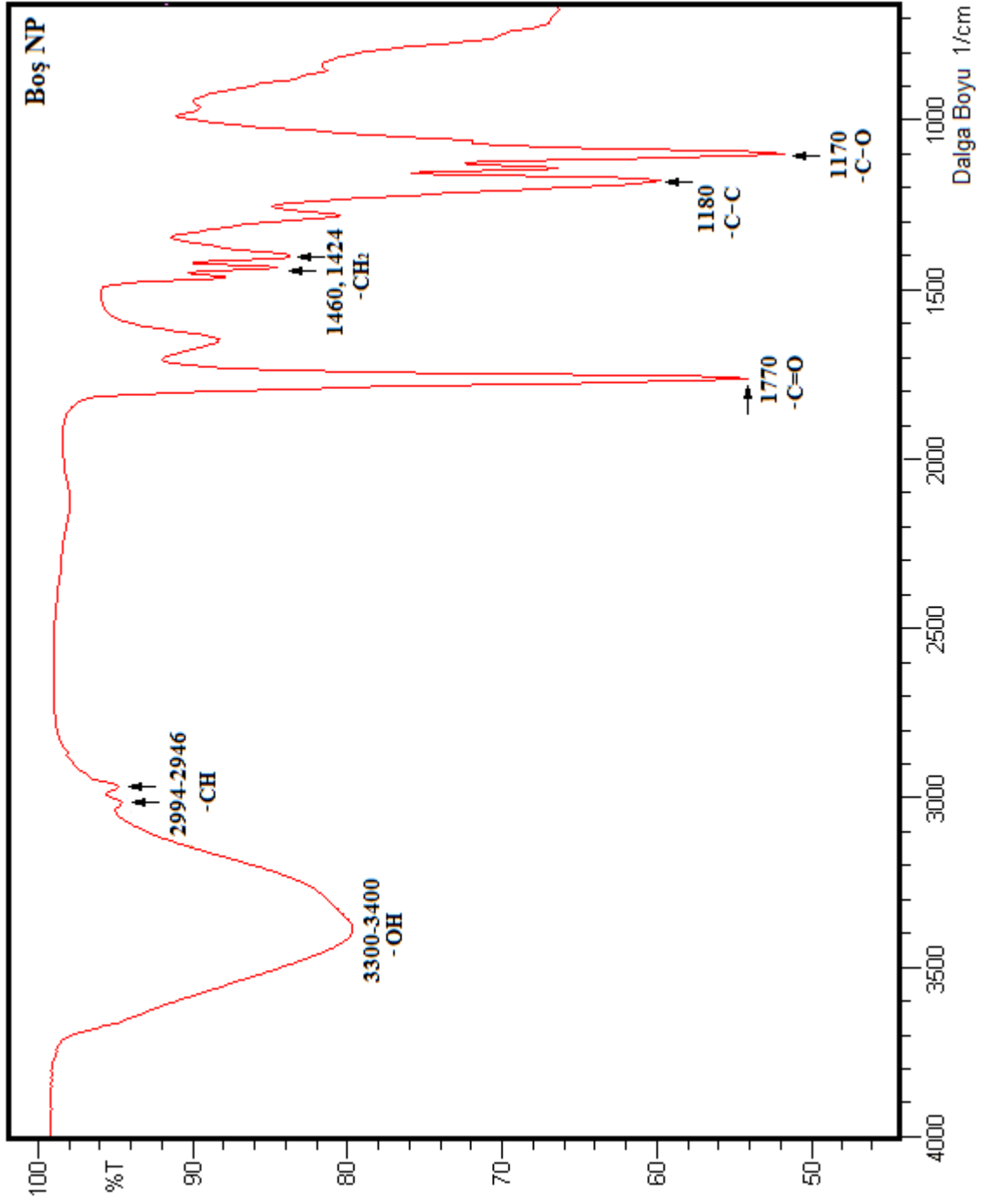
Şekil 5. 77 Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan (NP1→Boş, NP2→FITC yüklü, NP3→Peptid yüklü, NP4→FITC+Peptid yüklü) nanopartiküllere ait boyut, Z-Average, Pdl ve Zetapotansiyel değerleri

### 5.9.2 FT-IR Analizi

PLGA polimeri ve bu polimer kullanılarak su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan nanopartiküllere ait FT-IR spektrumları Şekil 5.78-Şekil 5.83'te verildi.

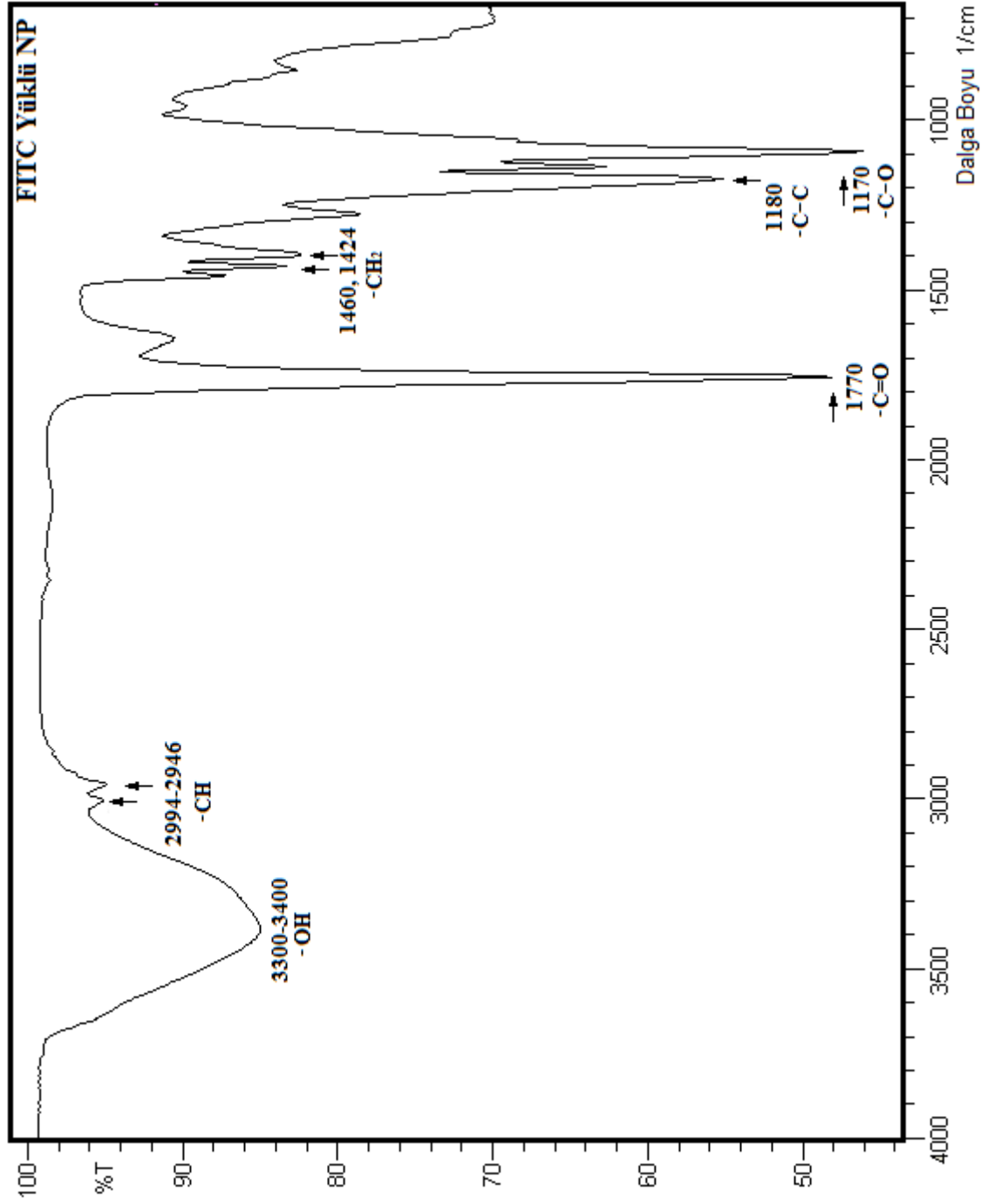


Şekil 5. 78 PLGA polimerine ait FT-IR spektrumu

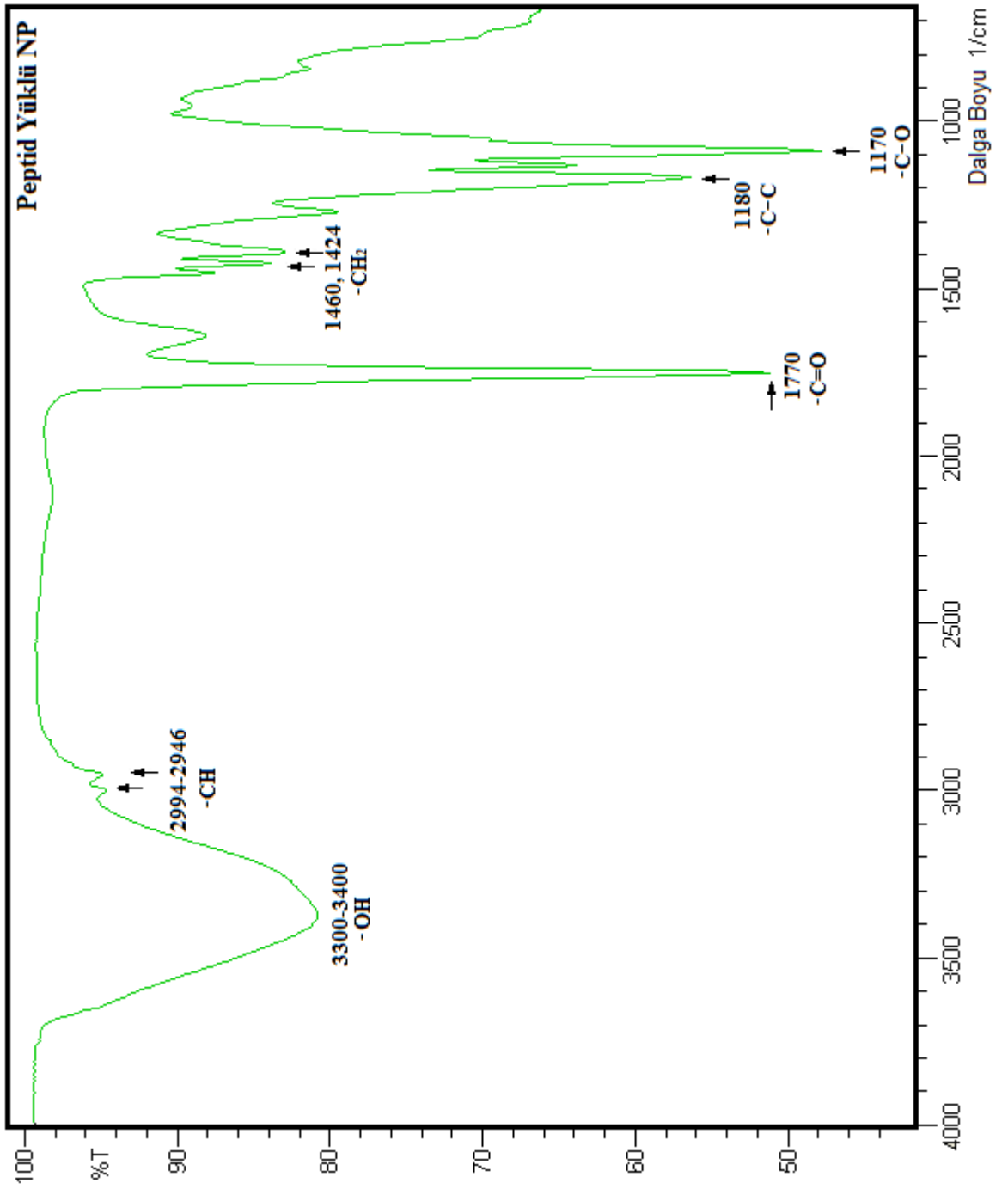


Şekil 5. 79 Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan boş nanopartiküllere ait FT-IR spektrumu (NP1)

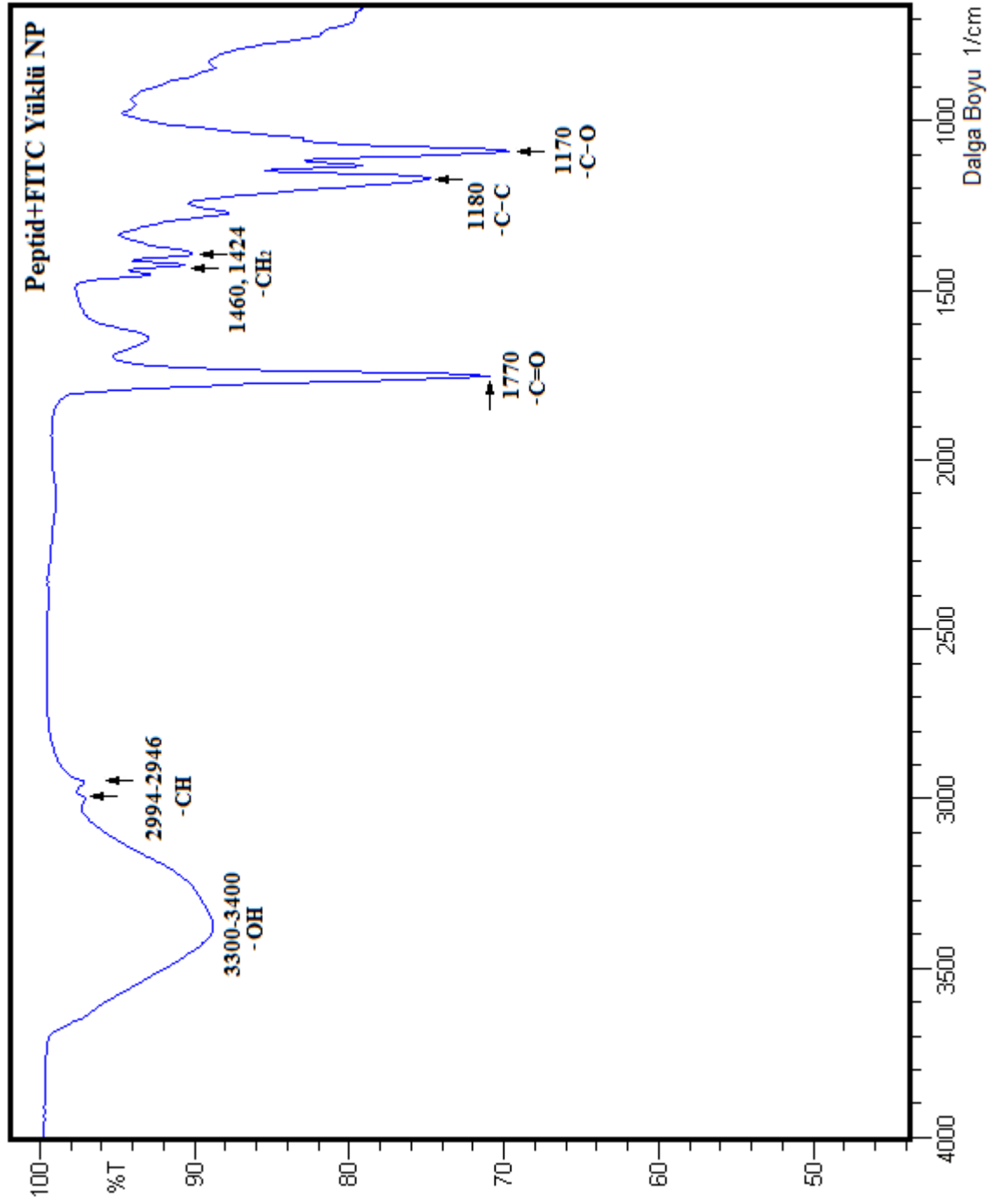




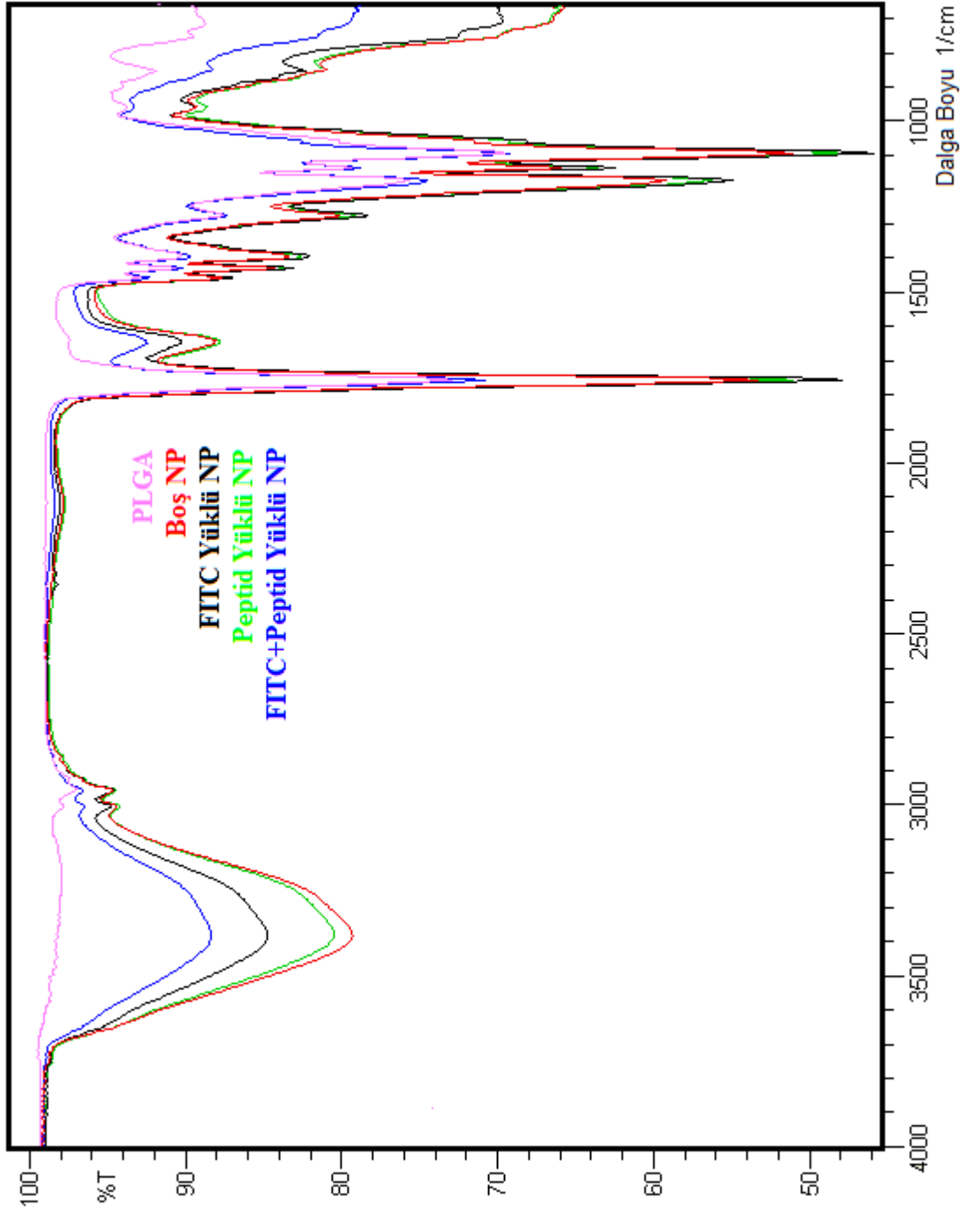
Şekil 5. 80 Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan Fluorescein isotiyosiyanat (FITC) yüklü nanopartiküllere ait FT-IR spektrumu (NP2)



Şekil 5. 81 Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan peptid yüklü nanopartiküllere ait FT-IR spektrumu (NP3)



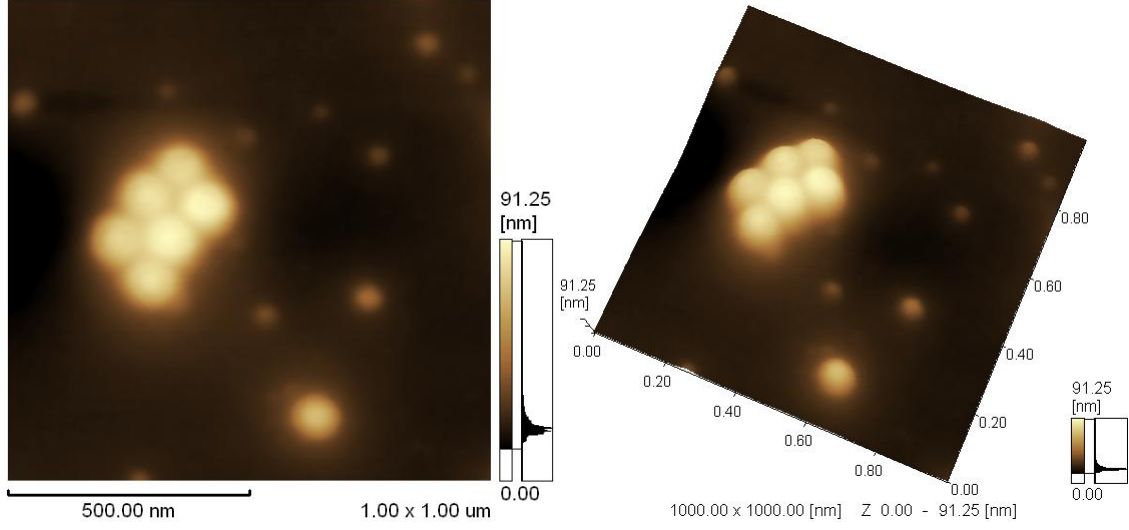
Şekil 5. 82 Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan FITC+peptid yüklü nanopartiküllere ait FT-IR spektrumu (NP4)



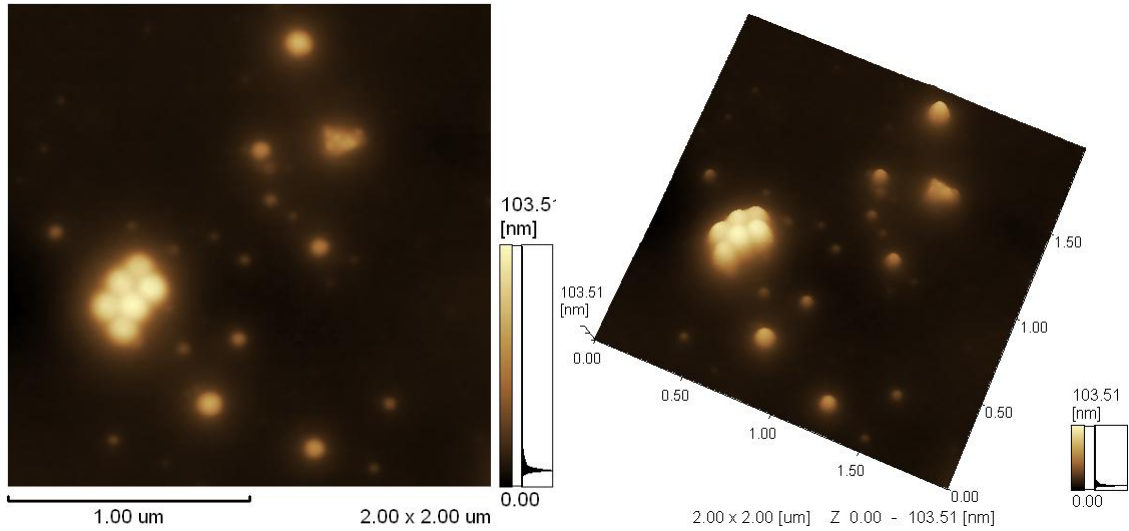
Şekil 5. 83 PLGA polimeri (◆), Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan boş (◆), FITC yüklü (◆), peptid yüklü (◆), FITC+peptid (◆) yüklü nanopartiküllerin karşılaştırmalı FT-IR spektrumu

### 5.9.3 AFM Analizi

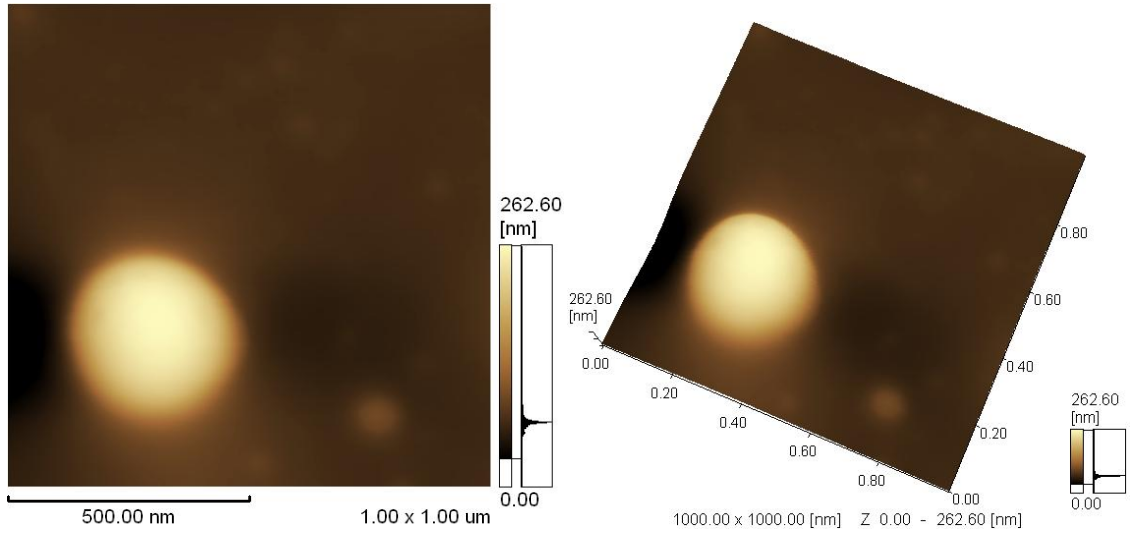
PLGA polimeri ve bu polimer kullanılarak su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan nanopartiküllere ait AFM görüntüleri Şekil 5.84-Şekil 5.91'de verildi.



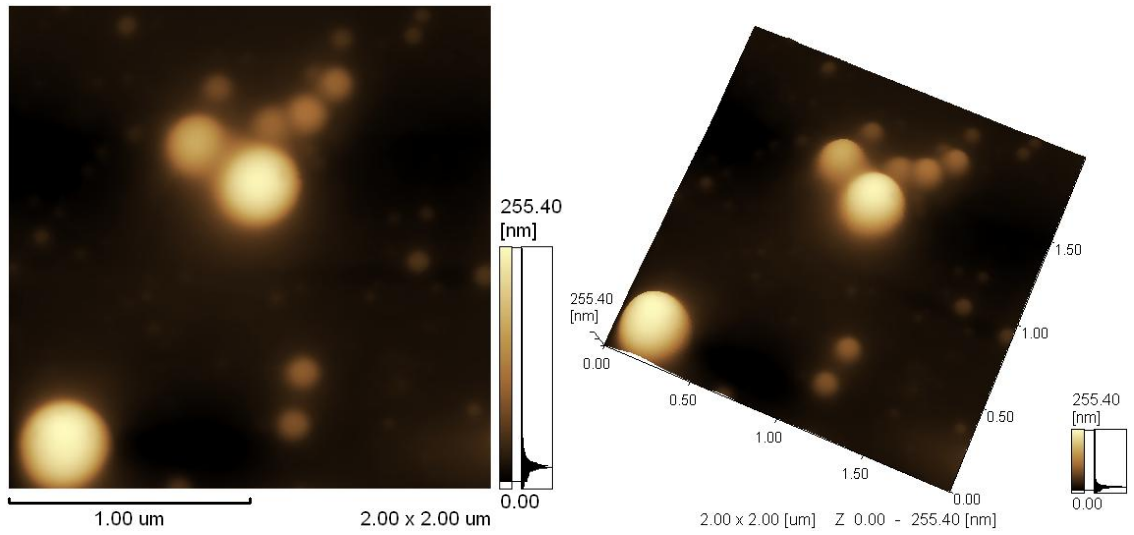
Şekil 5. 84 Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan boş nanopartiküllere (NP1) ait sırasıyla 2D ve 3D AFM görüntüsü (1x1  $\mu\text{m}^2$ 'lik alan)



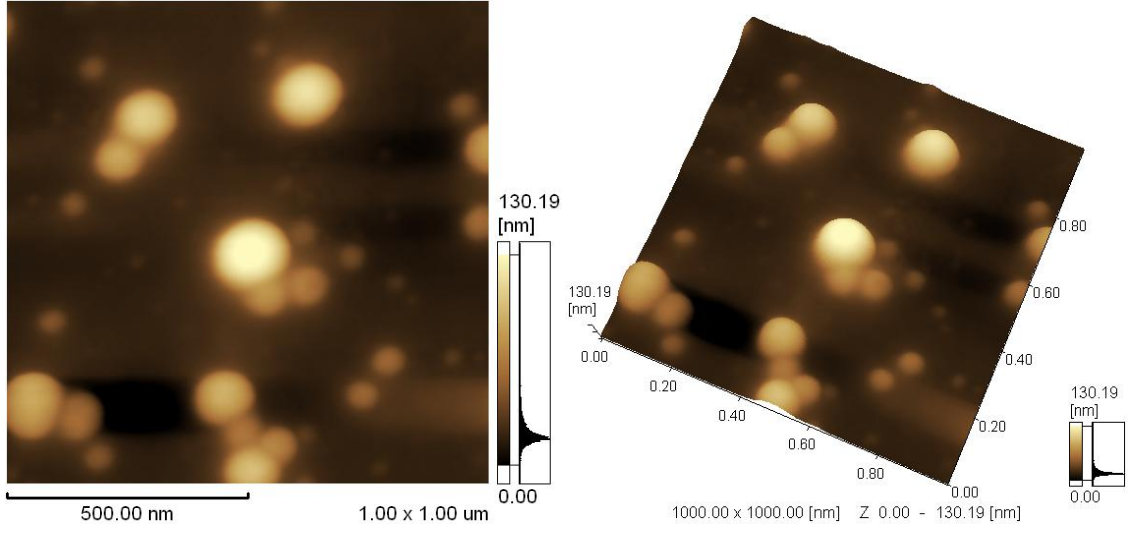
Şekil 5. 85 Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan boş nanopartiküllere (NP1) ait sırasıyla 2D ve 3D AFM görüntüsü (2x2  $\mu\text{m}^2$ 'lik alan)



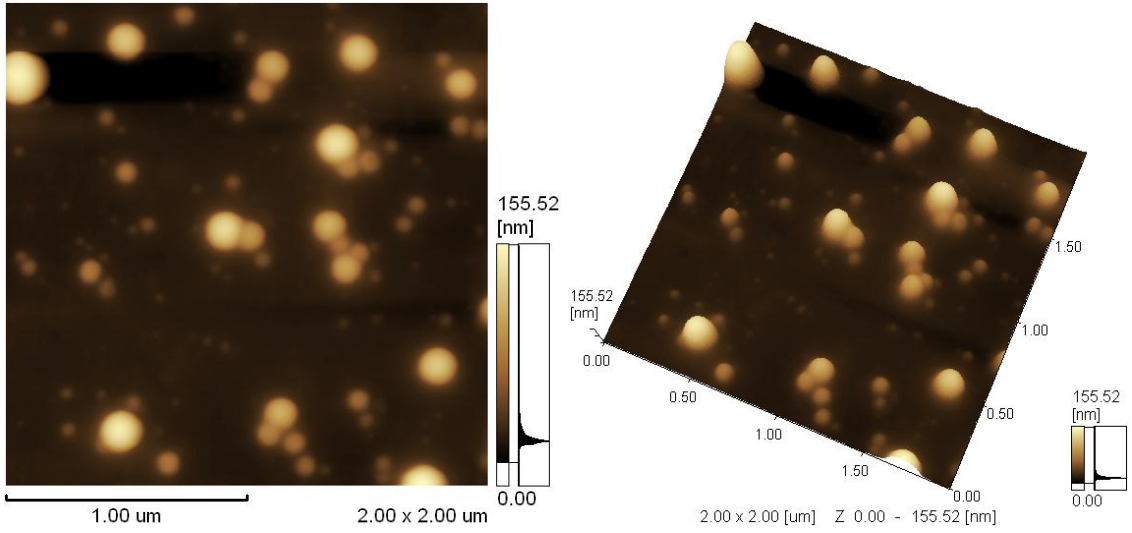
Şekil 5. 86 Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan FITC yüklü nanopartiküllere (NP2) ait sırasıyla 2D ve 3D AFM görüntüsü ( $1 \times 1 \mu\text{m}^2$  lik alan)



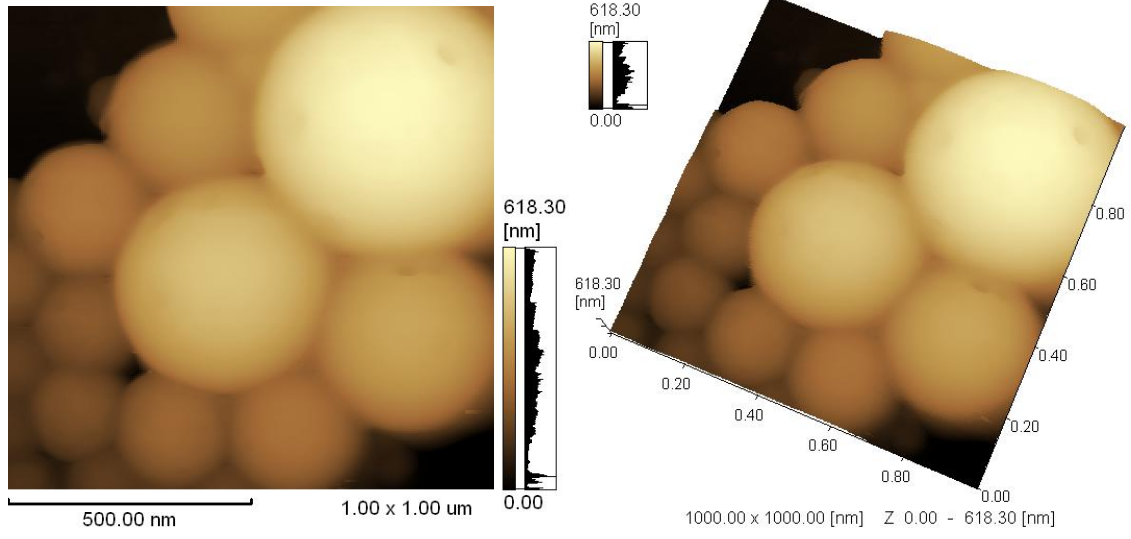
Şekil 5. 87 Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan FITC yüklü nanopartiküllere (NP2) ait sırasıyla 2D ve 3D AFM görüntüsü ( $2 \times 2 \mu\text{m}^2$  lik alan)



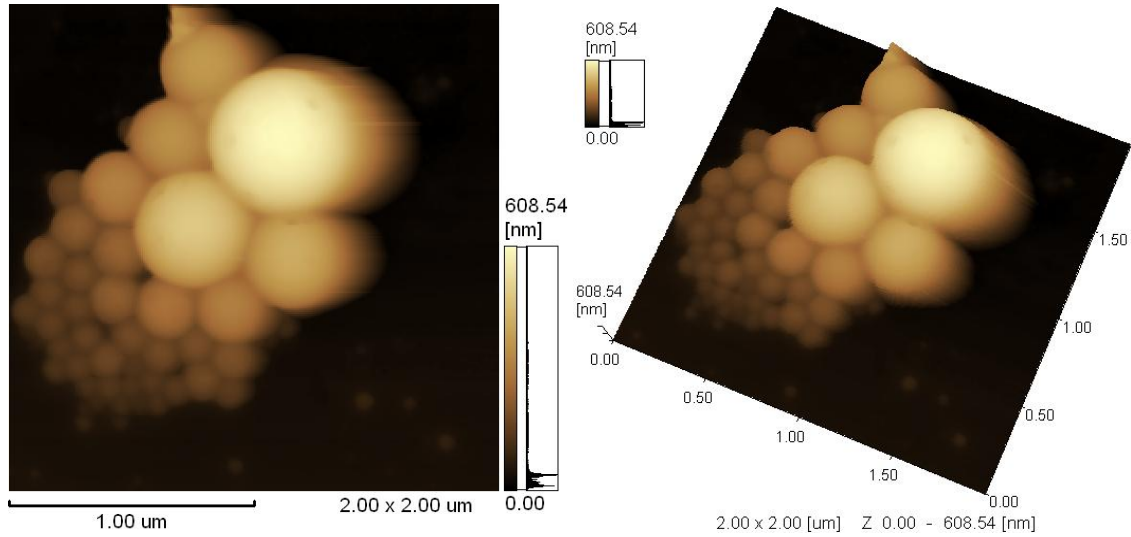
Şekil 5. 88 Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan peptid yüklü nanopartiküllere (NP3) ait sırasıyla 2D ve 3D AFM görüntüsü (1x1  $\mu\text{m}^2$  lik alan)



Şekil 5. 89 Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan peptid yüklü nanopartiküllere (NP3) ait sırasıyla 2D ve 3D AFM görüntüsü (2x2  $\mu\text{m}^2$  lik alan)



Şekil 5. 90 Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan FITC+peptid yüklü nanopartiküllere (NP4) ait sırasıyla 2D ve 3D AFM görüntüsü (1x1 μm<sup>2</sup>'lik alan)

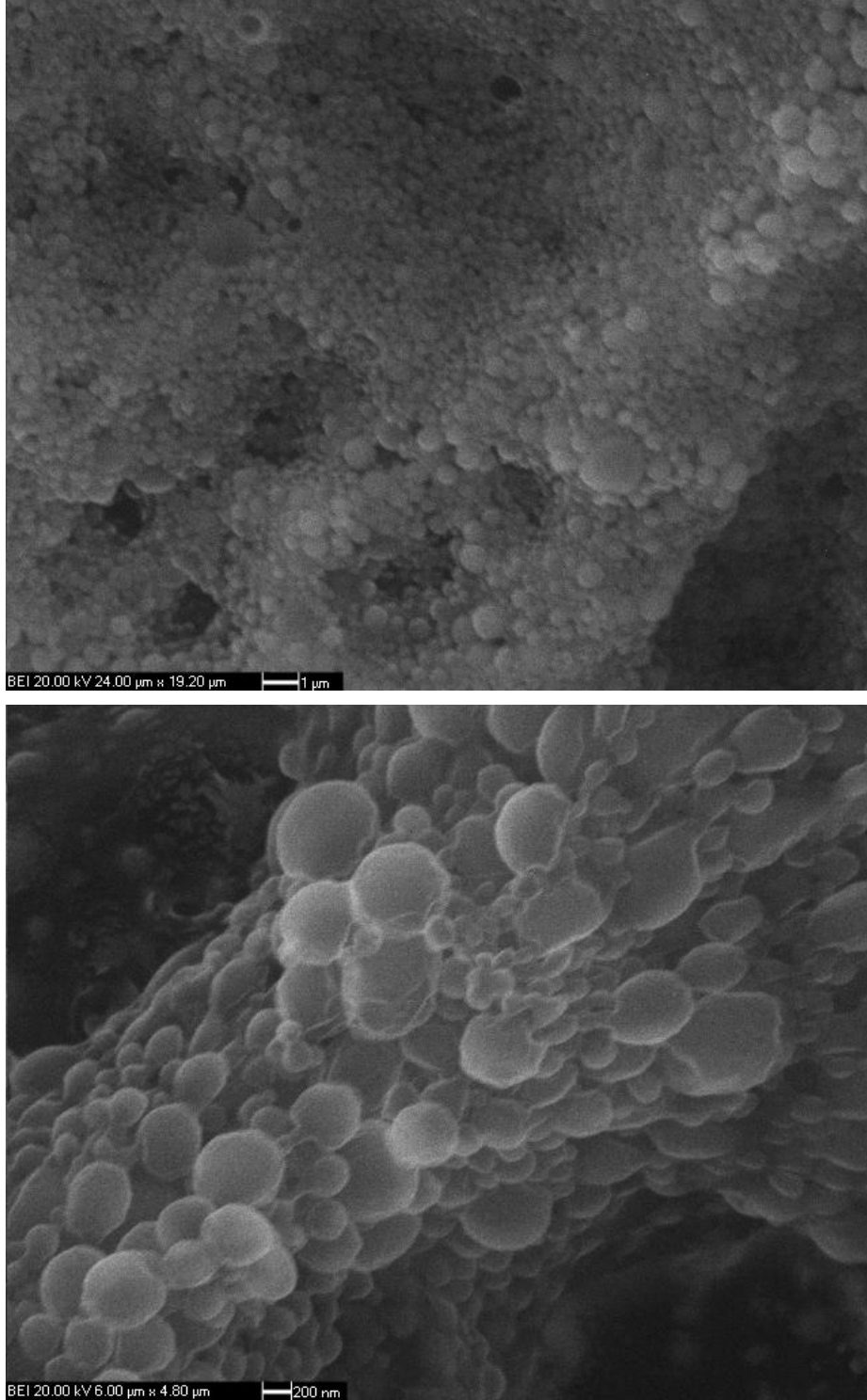


Şekil 5. 91 Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan FITC+peptid yüklü nanopartiküllere (NP4) ait sırasıyla 2D ve 3D AFM görüntüsü (2x2 μm<sup>2</sup>'lik alan)

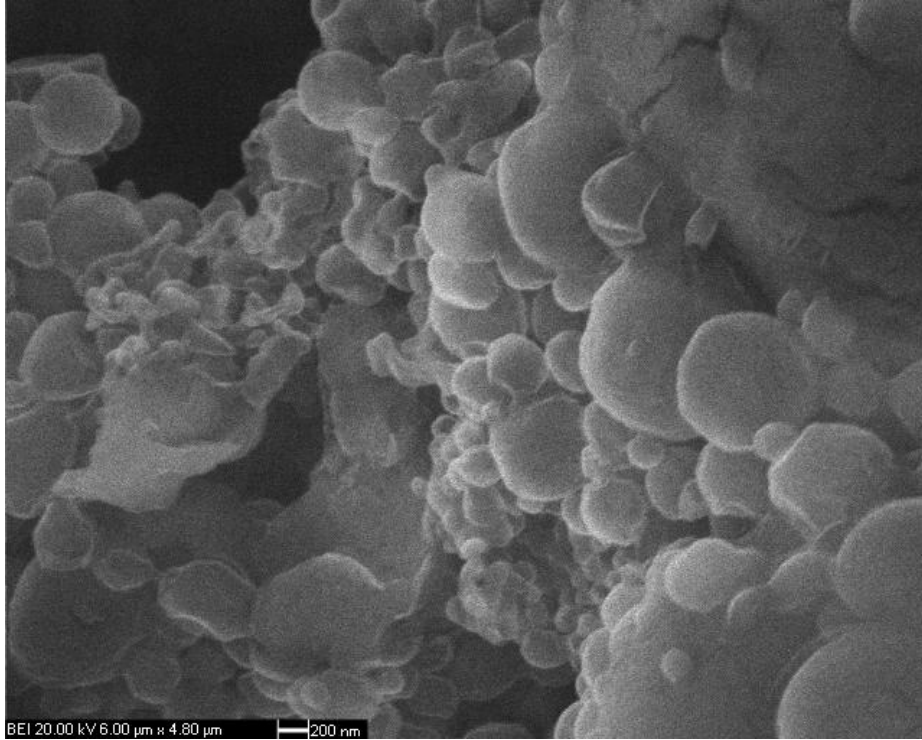
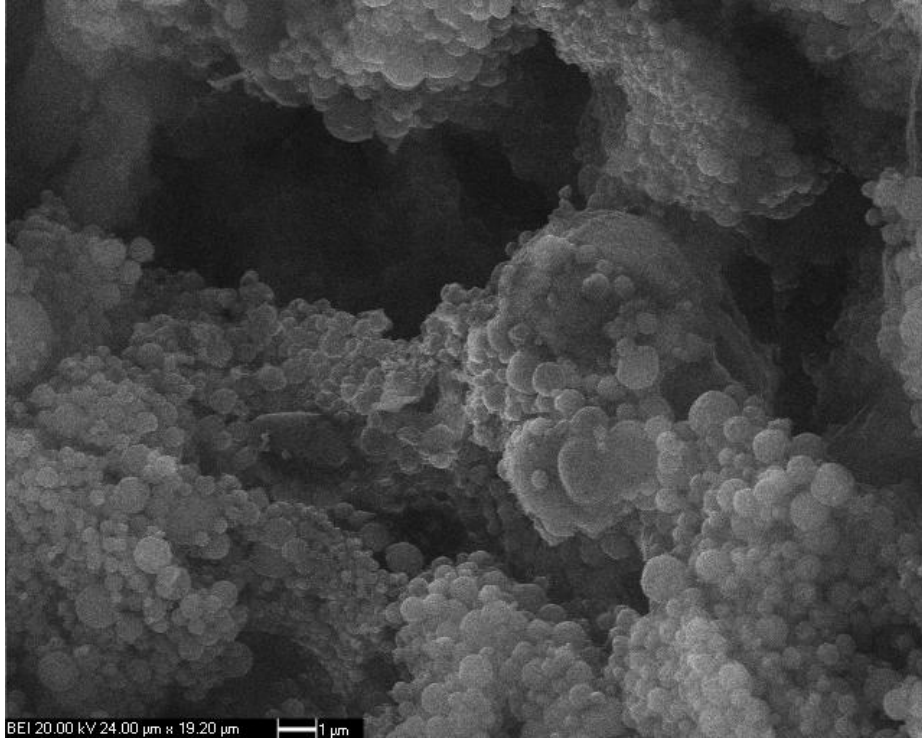


#### 5.9.4 SEM Analizi

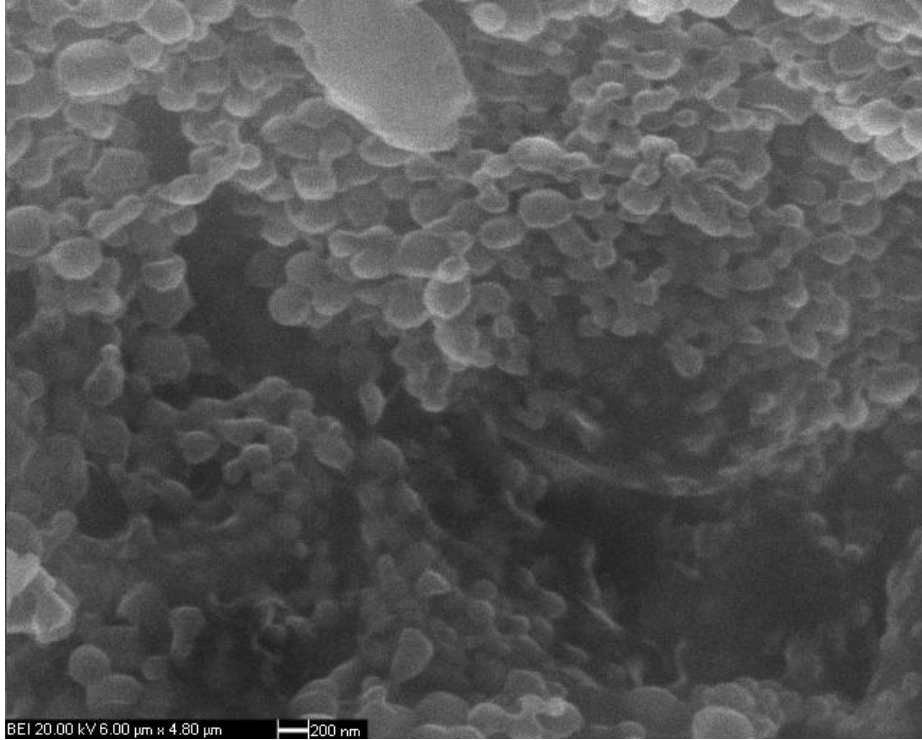
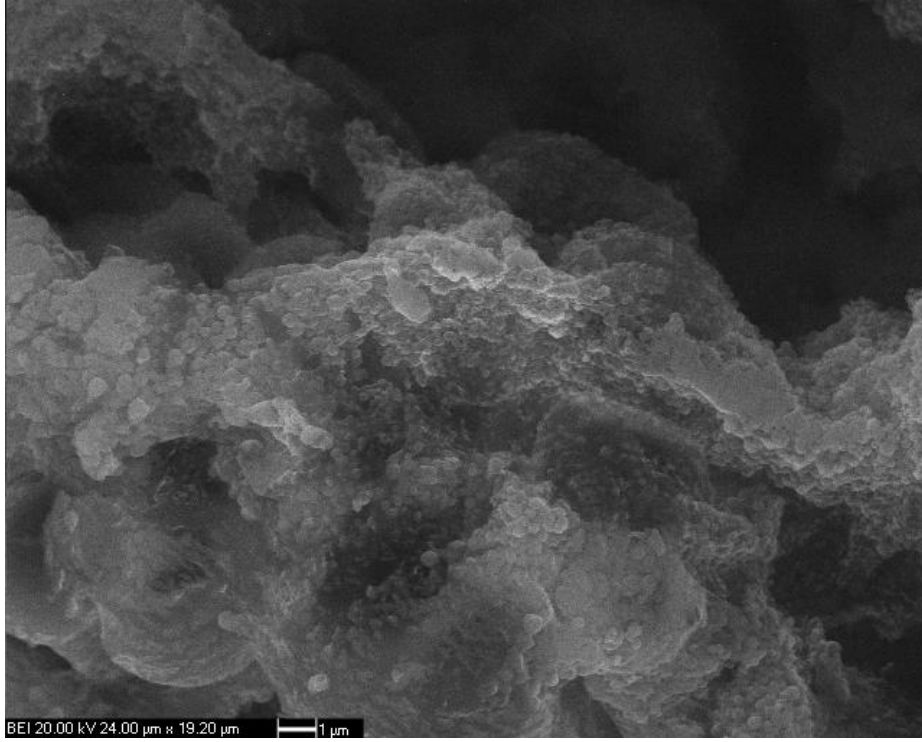
PLGA polimeri kullanılarak su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan nanopartiküllere ait SEM görüntüleri Şekil 5.92-Şekil 5.95'te verildi.



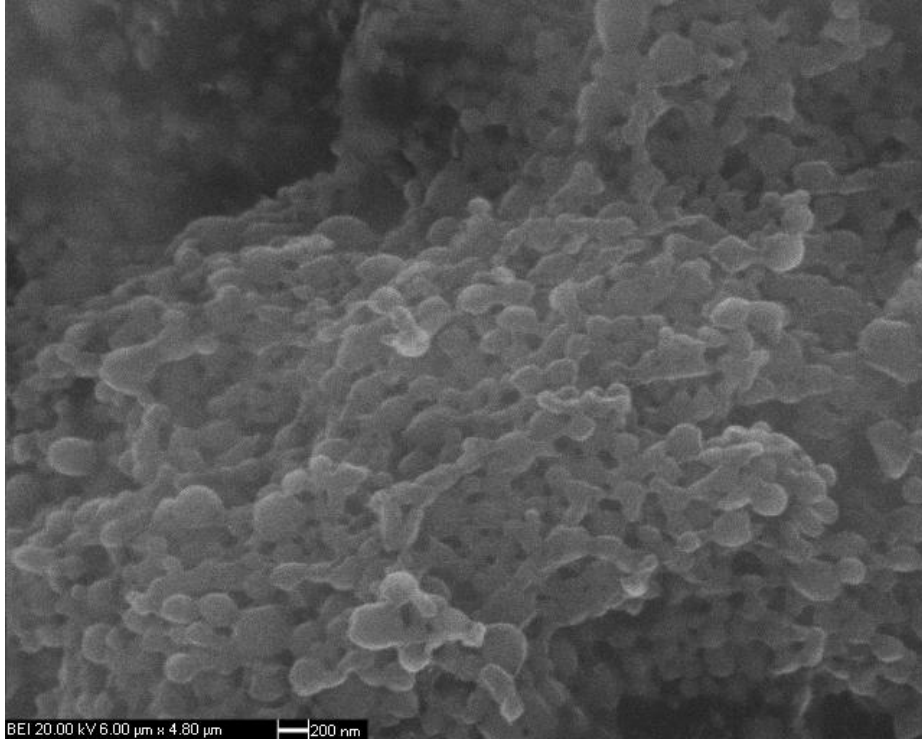
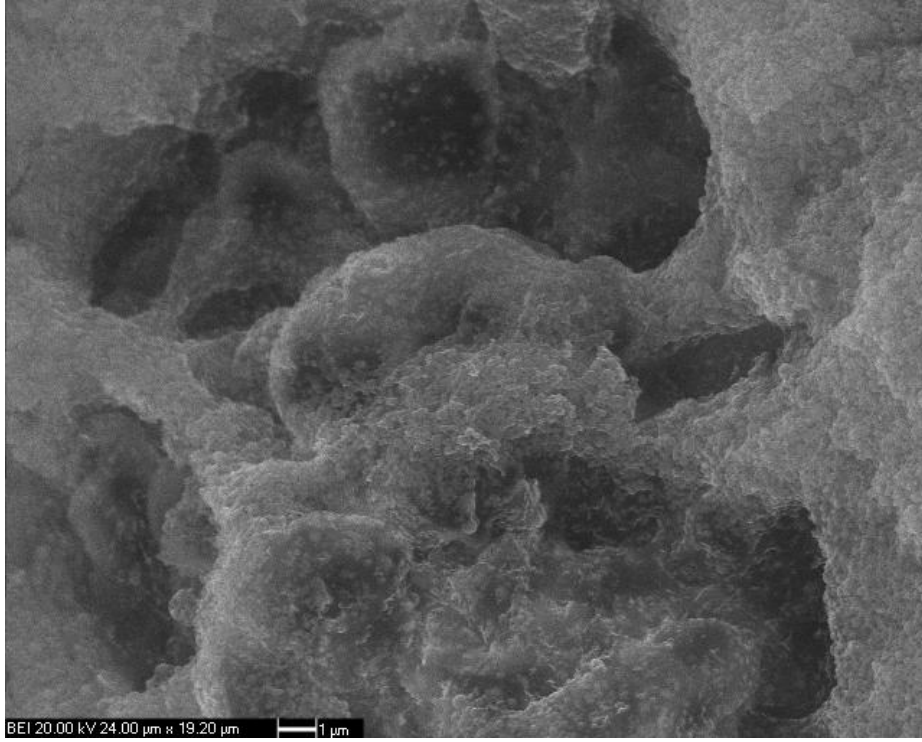
Şekil 5. 92 Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan boş nanopartiküllere (NP1) ait sırasıyla 5000x ve 20000x SEM görüntüleri



Şekil 5. 93 Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan FITC yüklü nanopartiküllere (NP2) ait sırasıyla 5000x ve 20000x SEM görüntüleri



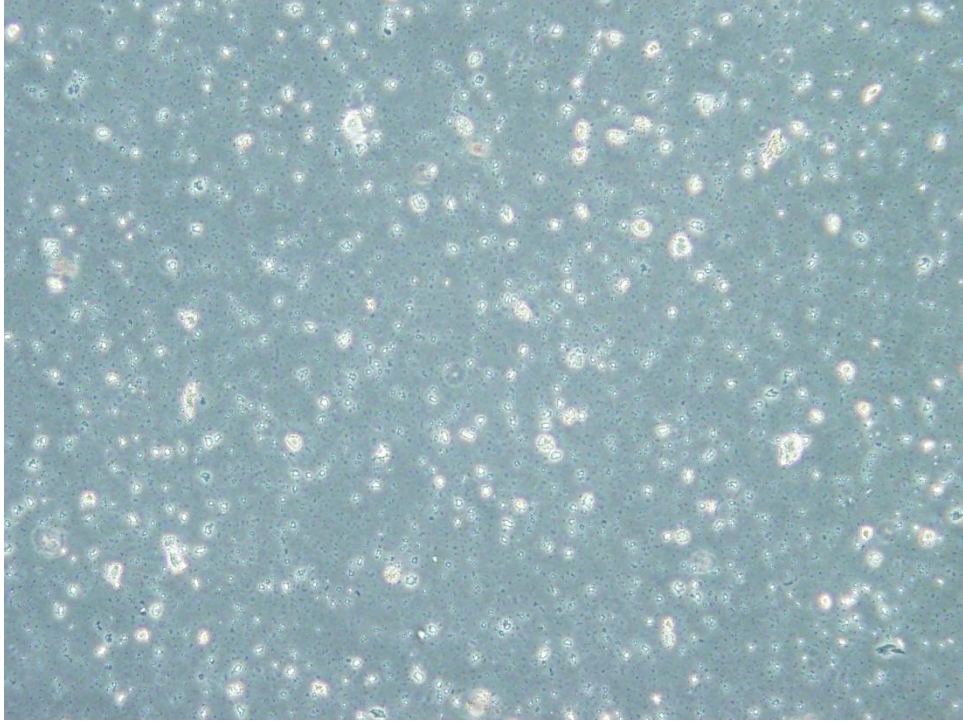
Şekil 5. 94 Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan peptid yüklü nanopartiküllere (NP3) ait sırasıyla 5000x ve 20000x SEM görüntüleri



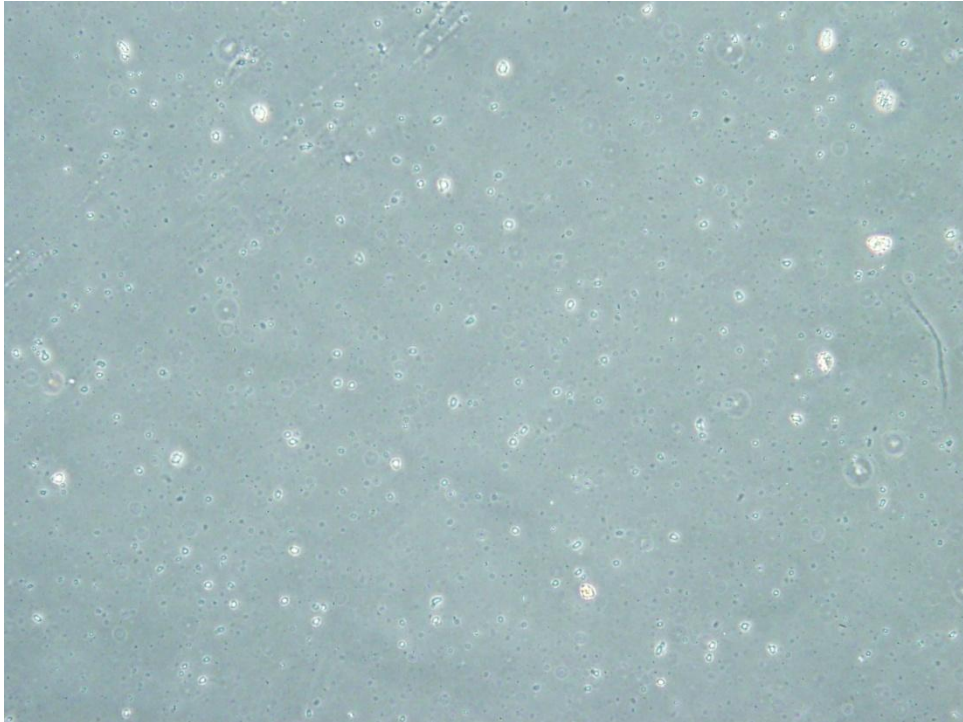
Şekil 5. 95 Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan FITC+peptid yüklü nanopartiküllere (NP4) ait sırasıyla 5000x ve 20000x SEM görüntüleri

### 5.9.5 Işık Mikroskop Analizi

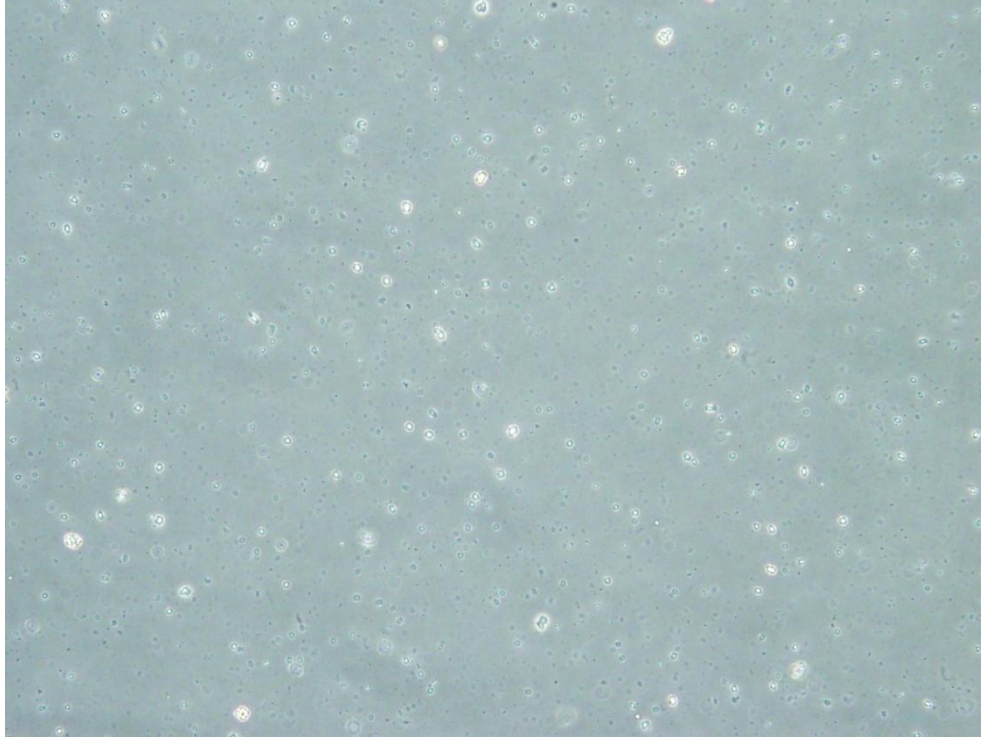
PLGA polimeri kullanılarak su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan nanopartiküllere ait Işık Mikroskobu görüntüleri Şekil 5.96-Şekil 5.99'da verildi.



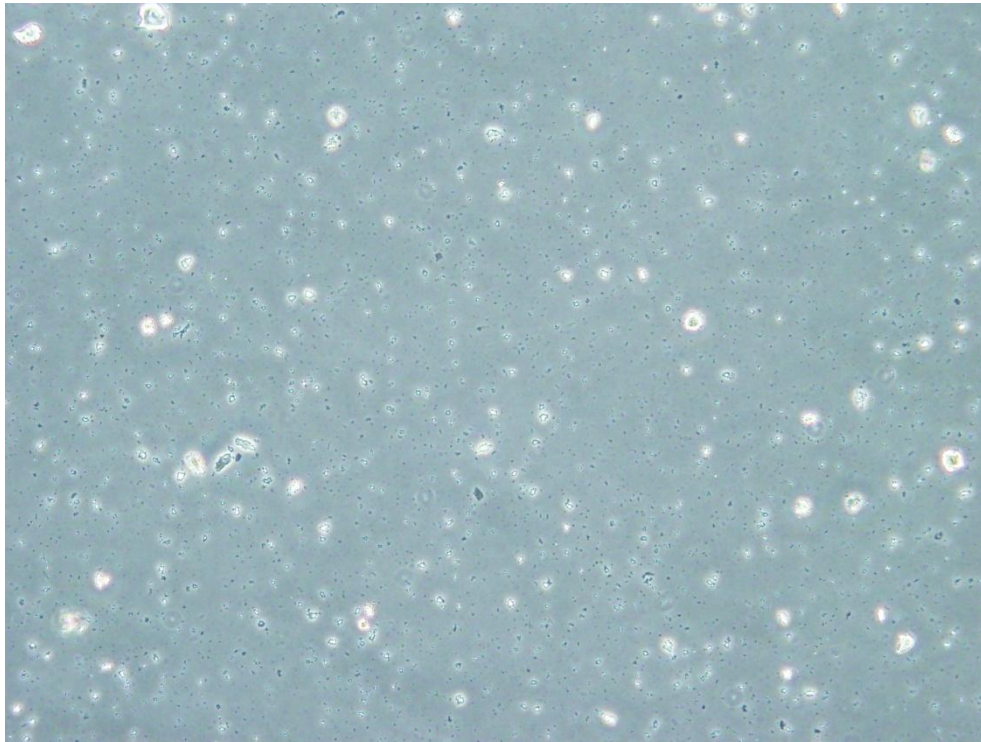
Şekil 5. 96 Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan boş nanopartiküllere (NP1) ait 20x Işık Mikroskobu görüntüsü



Şekil 5. 97 Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan FITC yüklü nanopartiküllere (NP2) ait 20x Işık Mikroskobu görüntüsü



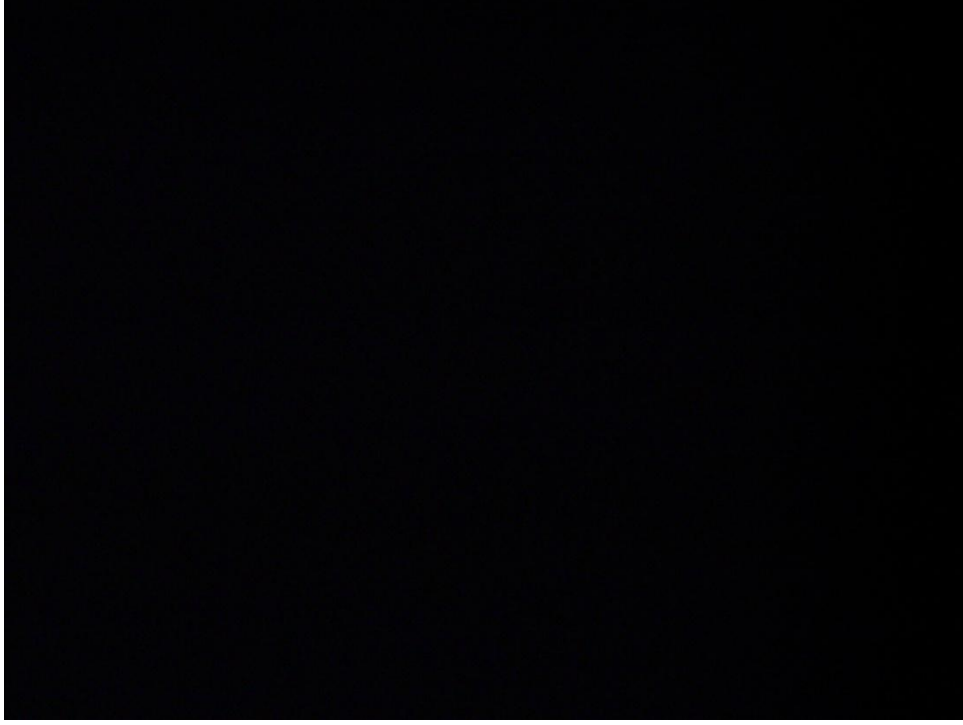
Şekil 5. 98 Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan peptid yüklü nanopartiküllere (NP3) ait 20x Işık Mikroskobu görüntüsü



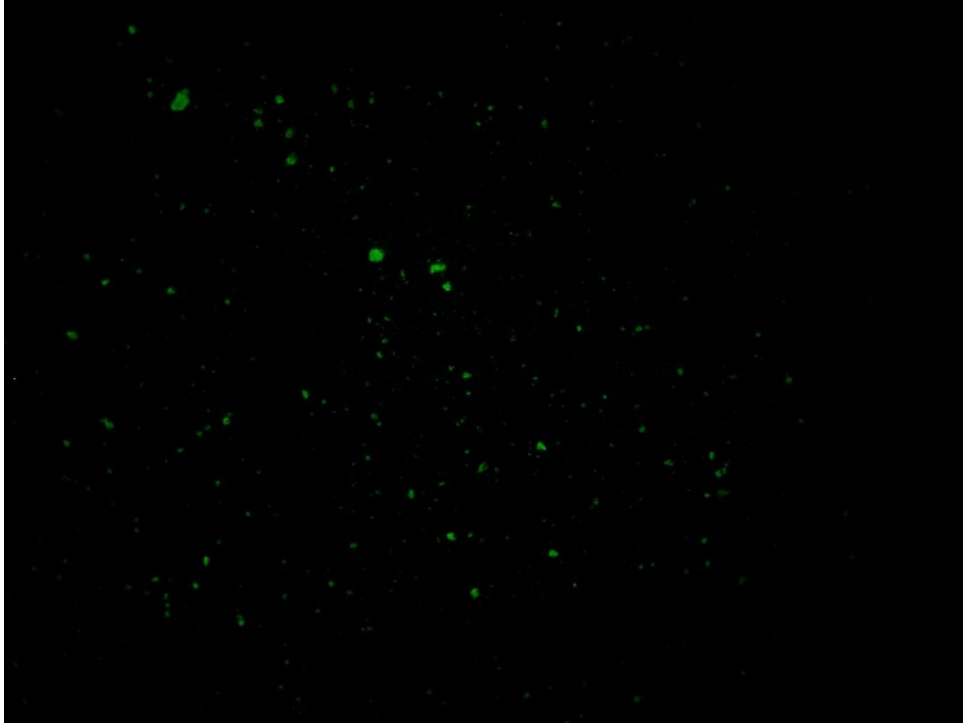
Şekil 5. 99 Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan FITC+peptid yüklü nanopartiküllere (NP4) ait 20x Işık Mikroskobu görüntüsü

### 5.9.6 Floresans Mikroskop Analizi

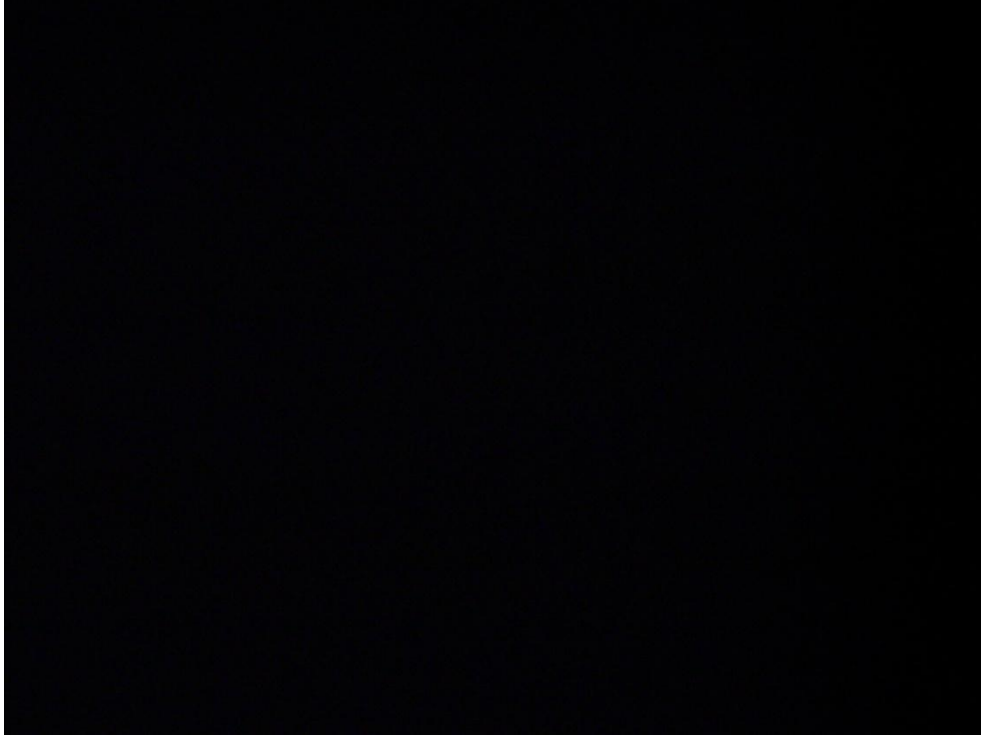
PLGA polimeri kullanılarak su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan nanopartiküllere ait Floresans Mikroskobu görüntüleri Şekil 5.100-Şekil 5.103'te verildi.



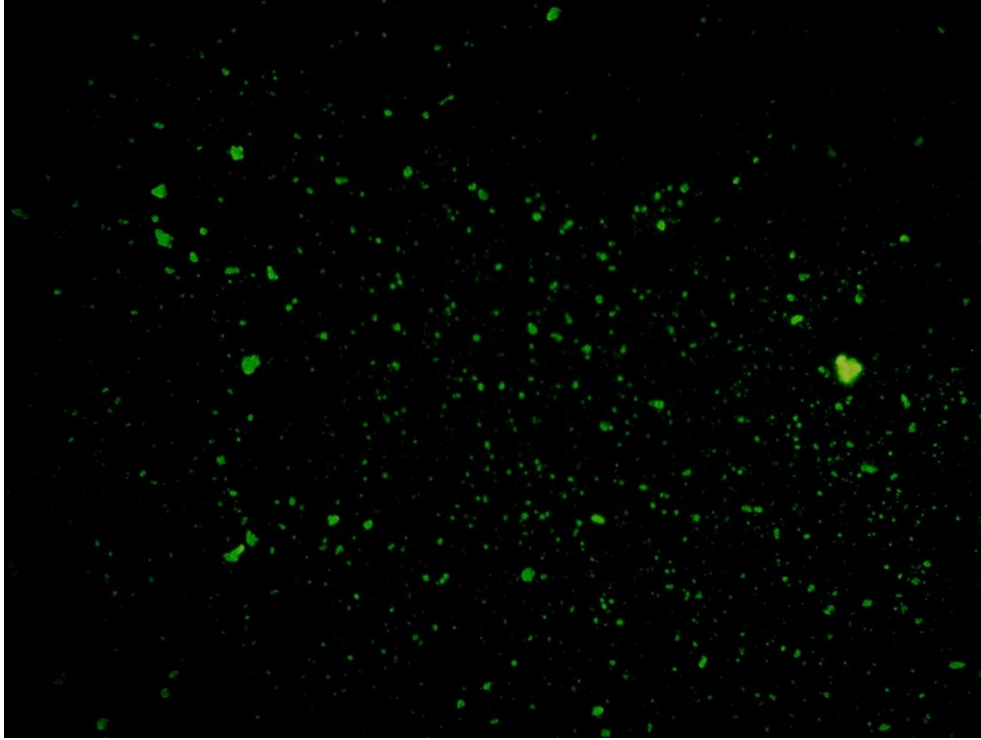
Şekil 5. 100 Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan boş nanopartiküllere (NP1) ait Floresans Mikroskop görüntüsü



Şekil 5. 101 Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan FITC yüklü nanopartiküllere (NP2) ait Floresans Mikroskop görüntüsü



Şekil 5. 102 Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan peptid yüklü nanopartiküllere (NP3) ait Floresans Mikroskop görüntüsü

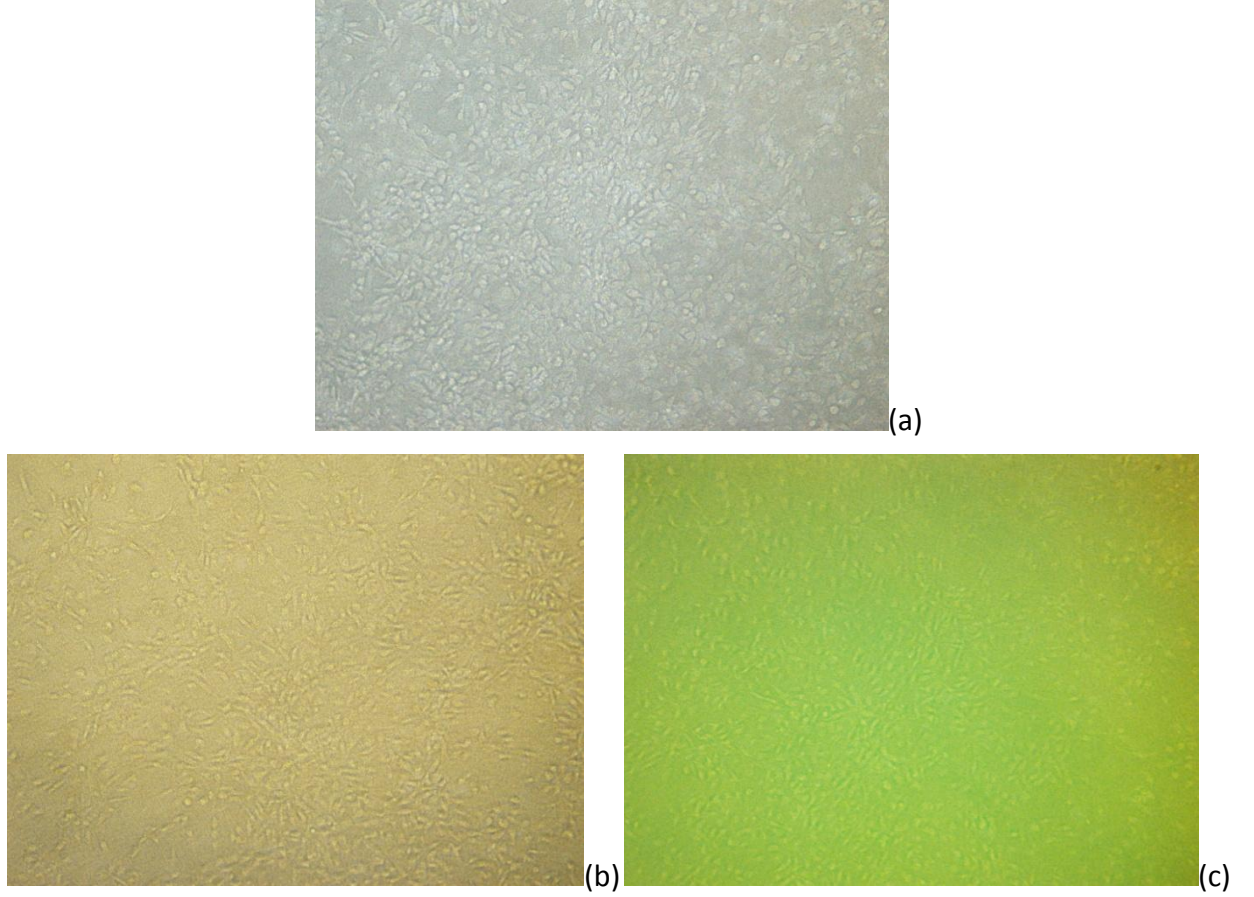


Şekil 5. 103 Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan FITC+peptid yüklü nanopartiküllere (NP4) ait Floresans Mikroskop görüntüsü

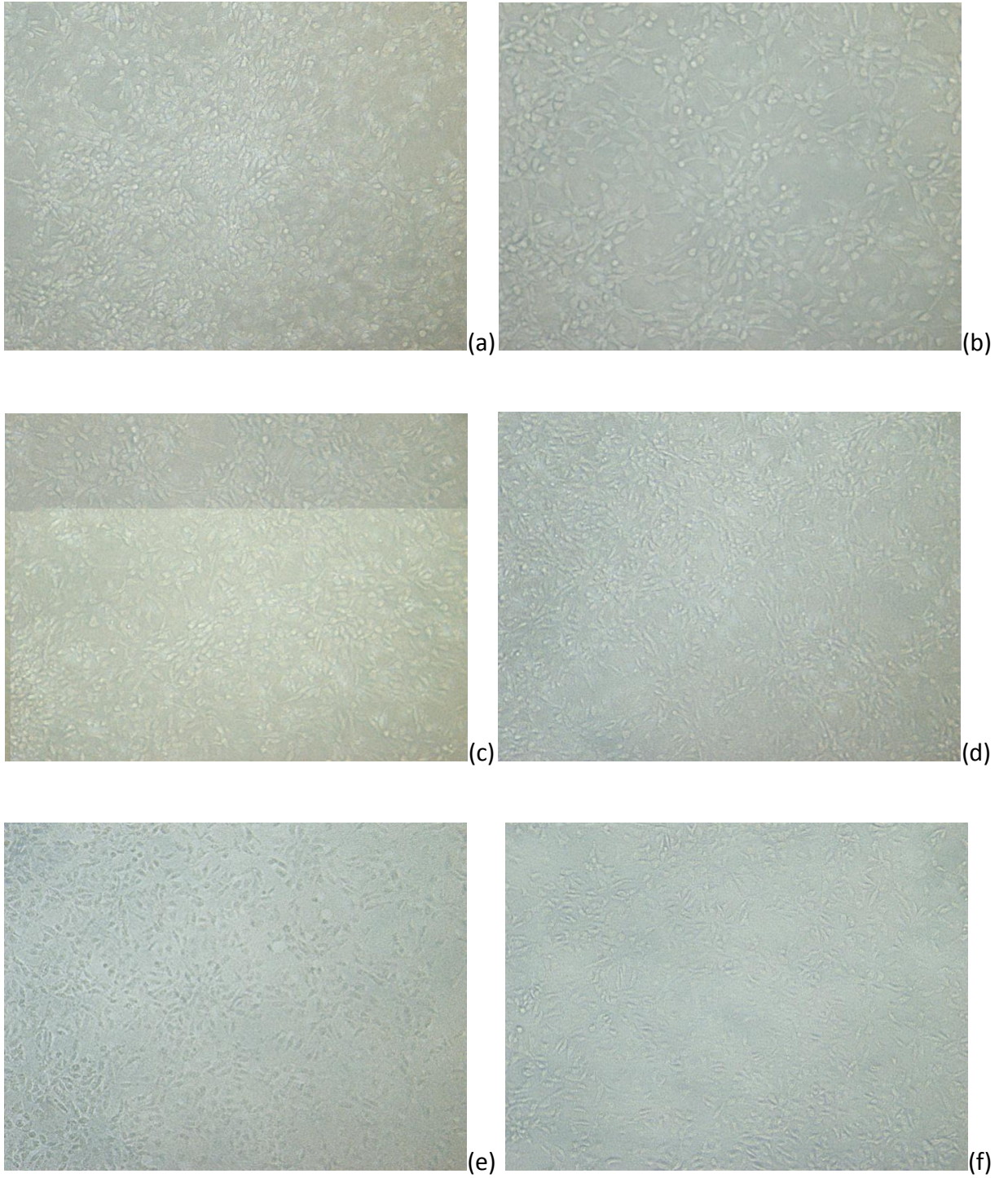


### 5.9.7 MTT Analizi

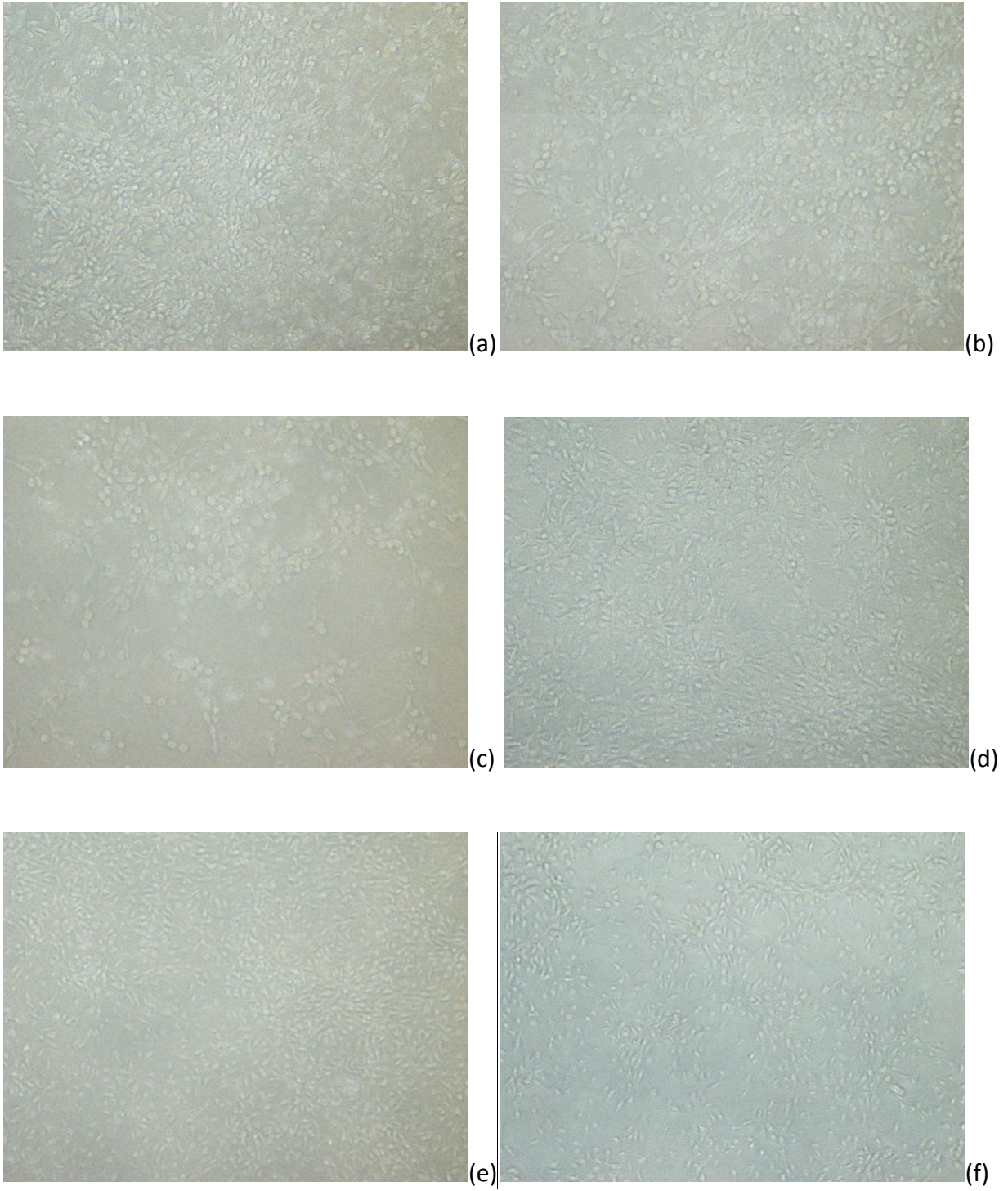
Peptid, FITC ve PLGA polimeri kullanılarak su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan nanopartiküllere (NP1, NP3, NP4) ait MTT analizi sonuçları Şekil 5.104-Şekil 5.108'de verildi.



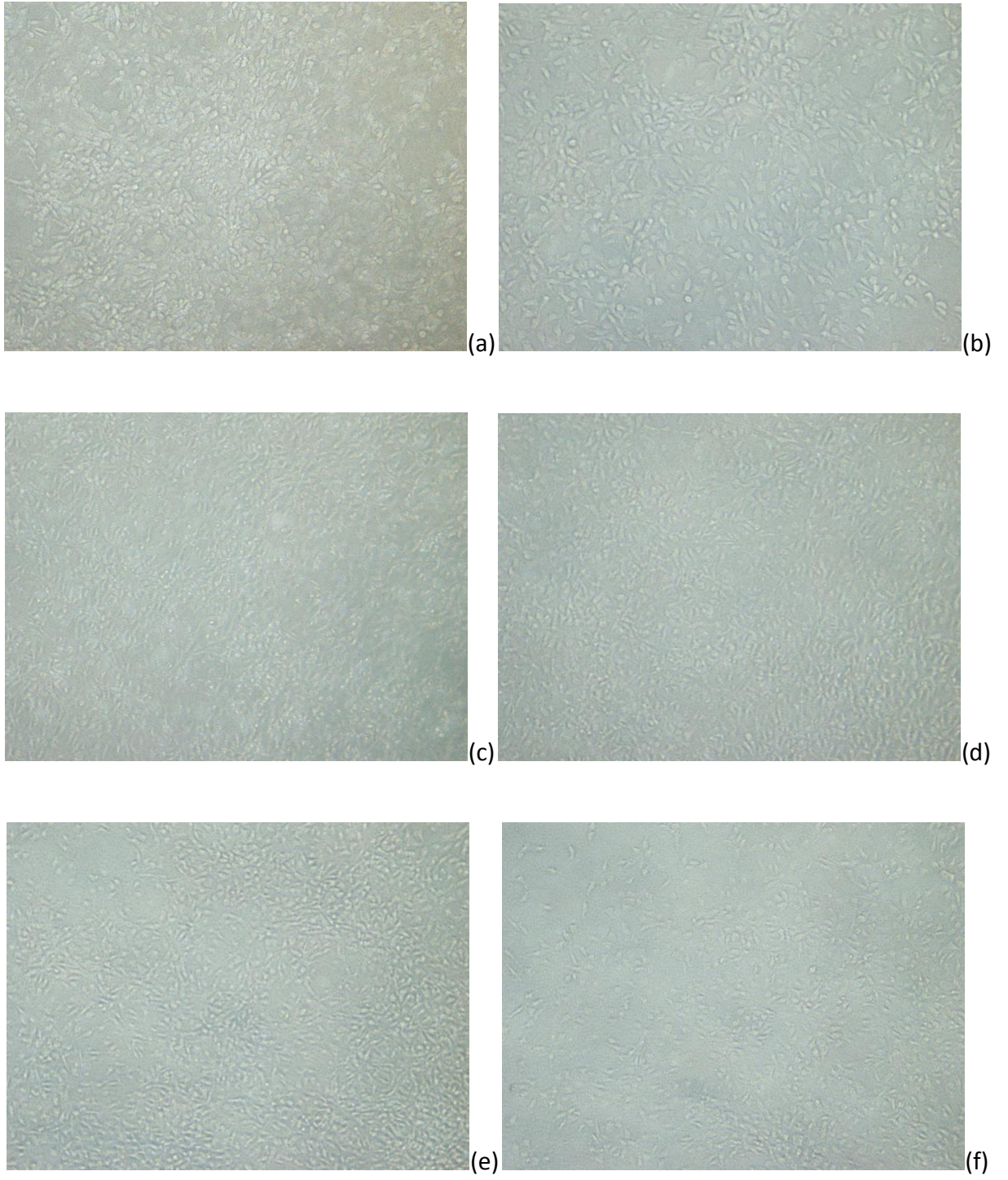
Şekil 5. 104 FITC'nin farklı konsantrasyonlarının 48 saatlik inkübasyon sonucu L-929 fare fibroblast hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskopik incelenmesi (20x); (a) Kontrol, (b) 0,025 mg/ml, (c) 0,05 mg/ml



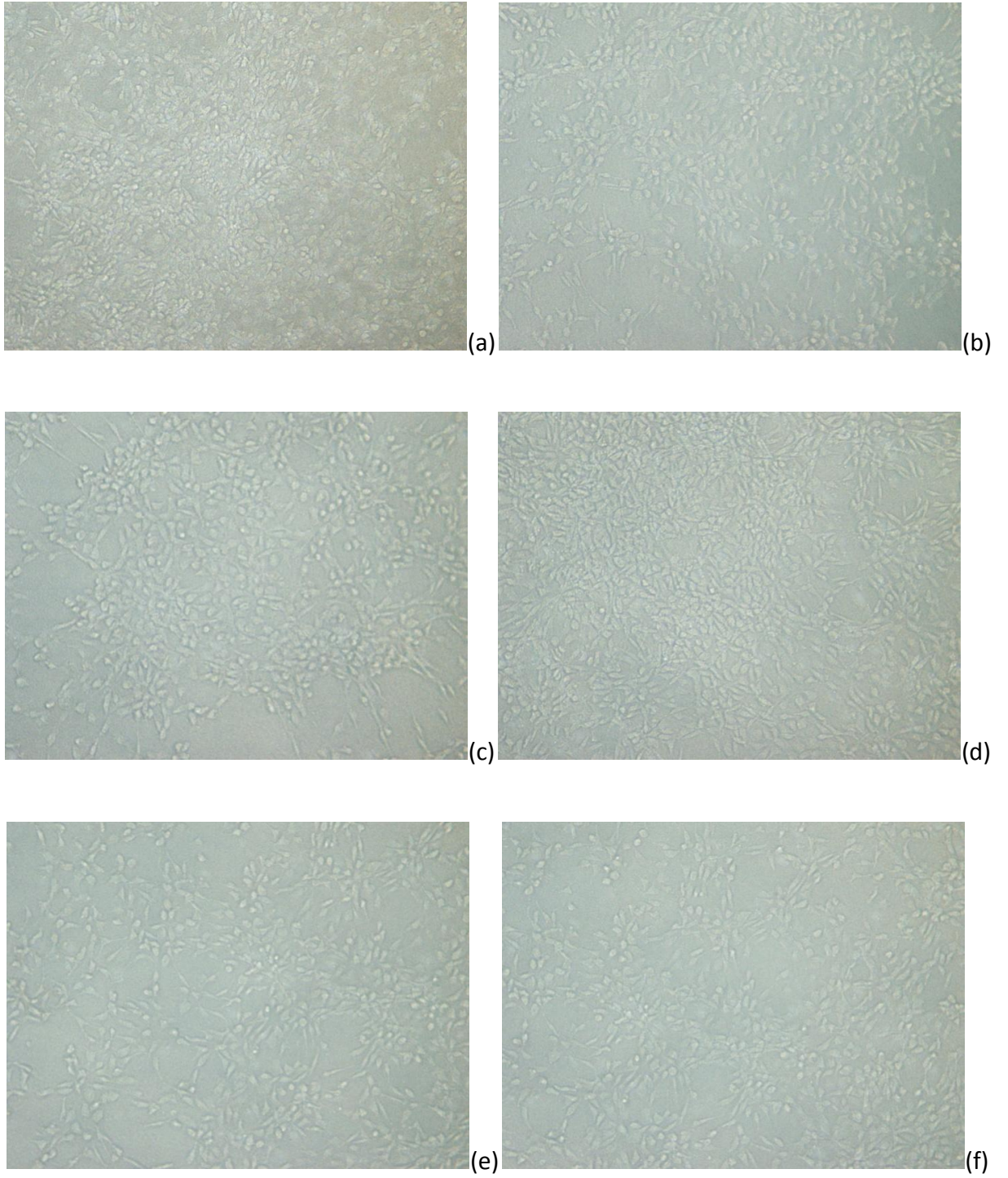
Şekil 5. 105 Canine Parvovirus W-1L19 sentetik peptidinin farklı konsantrasyonlarının 48 saatlik inkübasyon sonucu L-929 fare fibroblast hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskopik incelenmesi (20x); (a) Kontrol, (b) 0,05 mg/ml, (c) 0,1 mg/ml, (d) 0,2mg/ml, (e) 0,4 mg/ml, (f) 0,5 mg/ml



Şekil 5. 106 Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan boş nanopartiküllerin (NP1) farklı konsantrasyonlarının 48 saatlik inkübasyon sonucu L-929 fare fibroblast hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskopik incelenmesi (20x); (a) Kontrol, (b) 0,05 mg/ml, (c) 0,1 mg/ml, (d) 0,2mg/ml, (e) 0,4 mg/ml, (f) 0,5 mg/ml

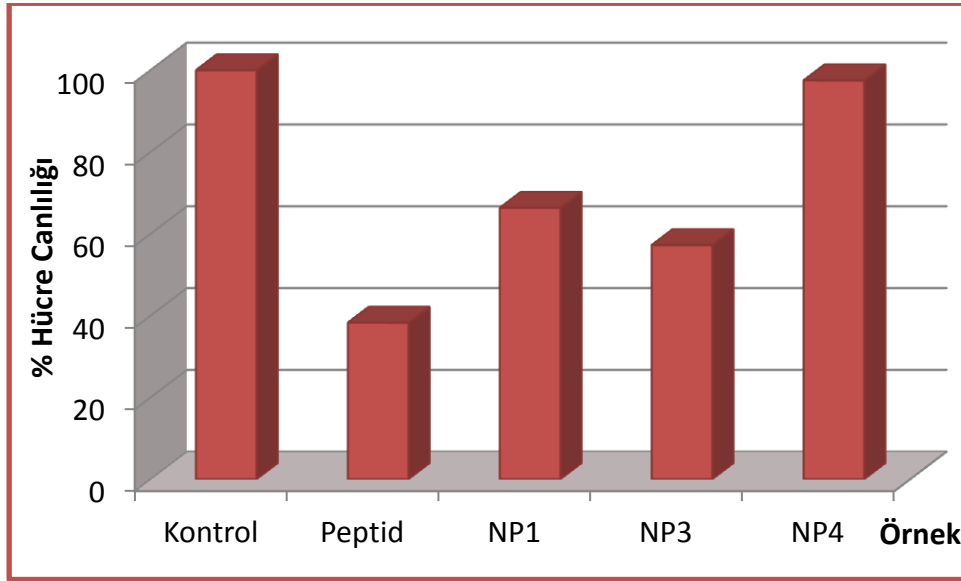


Şekil 5. 107 Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan peptid yüklü nanopartiküllerin (NP3) farklı konsantrasyonlarının 48 saatlik inkübasyon sonucu L-929 fare fibroblast hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskopik incelenmesi (20x); (a) Kontrol, (b) 0,05 mg/ml, (c) 0,1 mg/ml, (d) 0,2mg/ml, (e) 0,4 mg/ml, (f) 0,5 mg/ml

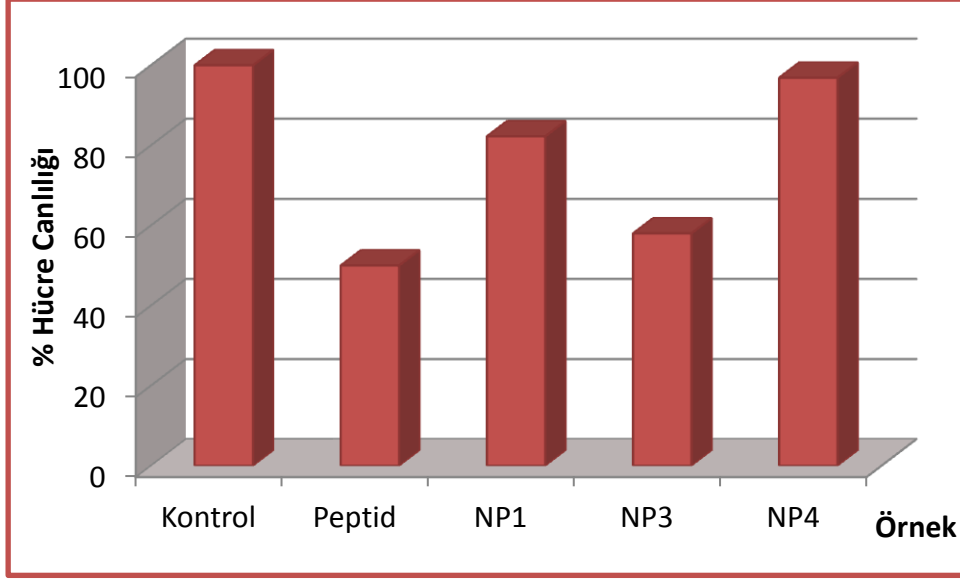


Şekil 5. 108 Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan FITC+peptid yüklü nanopartiküllerin (NP4) farklı konsantrasyonlarının 48 saatlik inkübasyon sonucu L-929 fare fibroblast hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskobik incelenmesi (20x); (a) Kontrol, (b) 0,05 mg/ml, (c) 0,1 mg/ml, (d) 0,2mg/ml, (e) 0,4 mg/ml, (f) 0,5 mg/ml

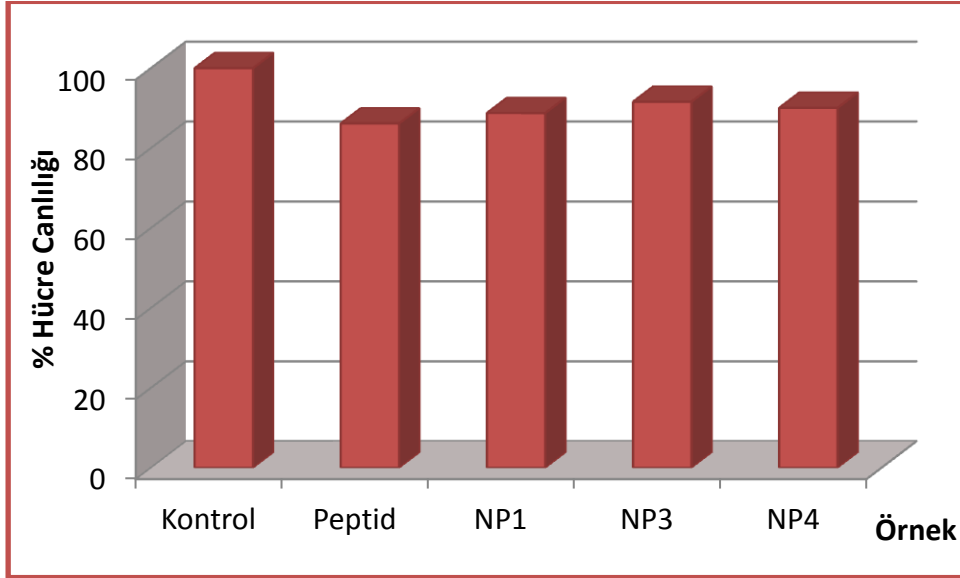
0,5 mg/ml; 0,4 mg/ml; 0,2 mg/ml; 0,1 mg/ml ve 0,05 mg/ml olmak üzere 5 farklı konsantrasyonda çalışılan peptid, boş nanopartikül (NP1), peptid yüklü nanopartikül (NP3) ve peptid+FITC yüklü nanopartikül (NP4) ile 0,05 mg/ml ve 0,025 mg/ml konsantrasyonlarda çalışılan FITC çözeltilerinin L-929 fare fibroblast hücrelerine karşı sitotoksitesini belirten % hücre canlılığı grafikleri her bir konsantrasyon için karşılaştırmalı olarak Şekil 5.109 - Şekil 5.113'de verildi.



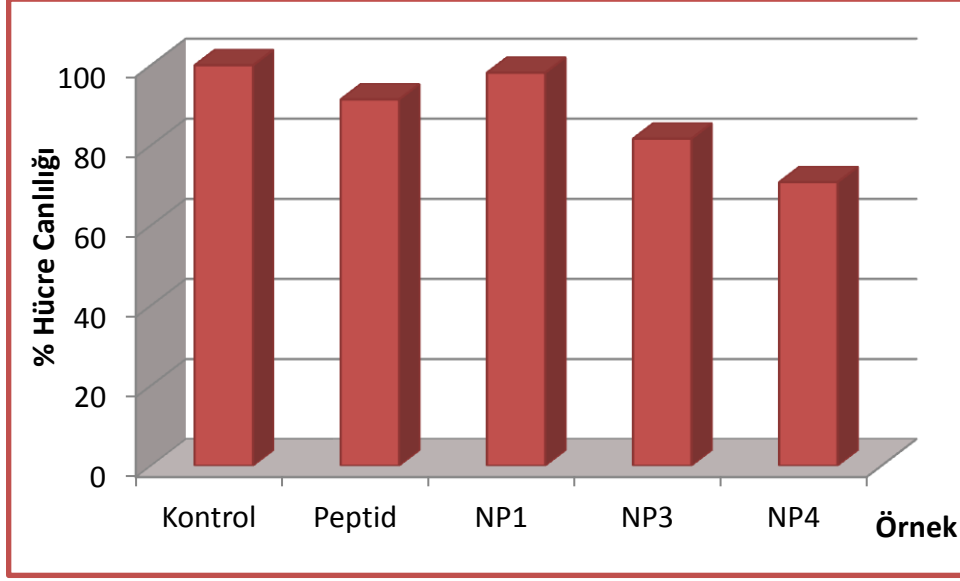
Şekil 5. 109 Aynı konsantrasyondaki (0,5 mg/ml) Peptid, boş nanopartikül (NP1), peptid yüklü nanopartikül (NP3) ve peptid+FITC yüklü nanopartikül (NP4) örneklerinin L-929 fare fibroblast hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi (n=3)



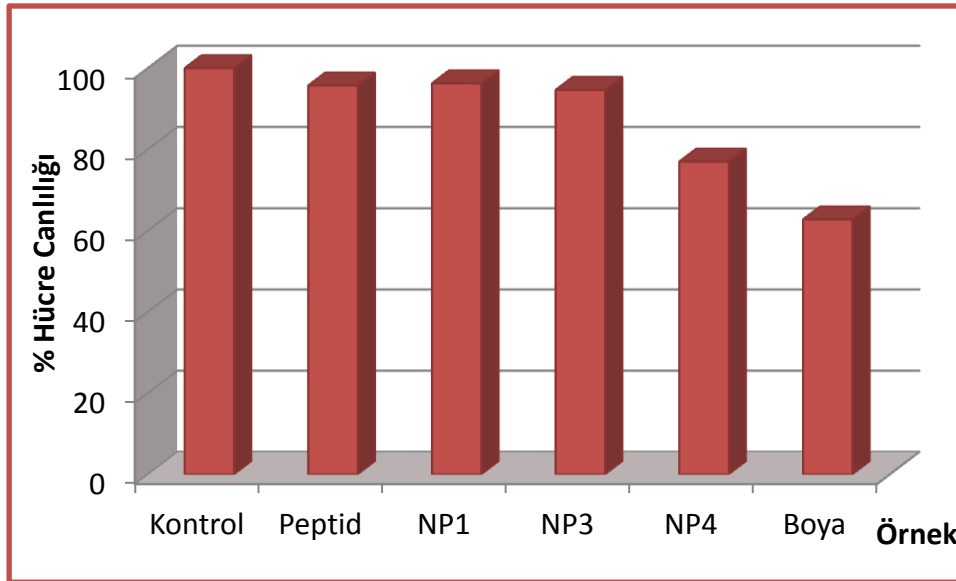
Şekil 5. 110 Aynı konsantrasyondaki (0,4 mg/ml) Peptid, boş nanopartikül (NP1), peptid yüklü nanopartikül (NP3) ve peptid+FITC yüklü nanopartikül (NP4) örneklerinin L-929 fibroblast hücreleri üzerinde gözlenen % hücre canlılığı (n=3)



Şekil 5. 111 Aynı konsantrasyondaki (0,2 mg/ml) Peptid, boş nanopartikül (NP1), peptid yüklü nanopartikül (NP3) ve peptid+FITC yüklü nanopartikül (NP4) örneklerinin L-929 fibroblast hücreleri üzerinde gözlenen % hücre canlılığı (n=3)



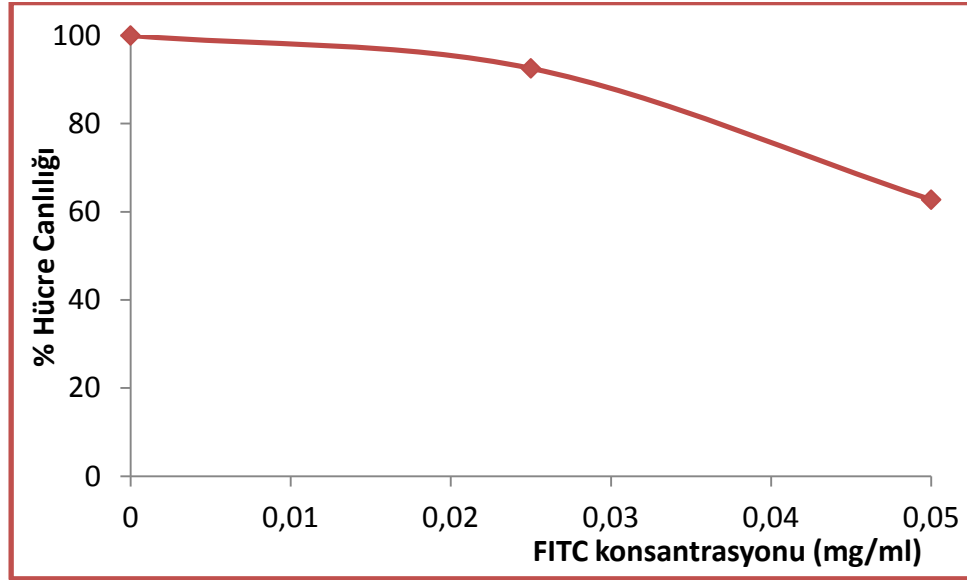
Şekil 5. 112 Aynı konsantrasyondaki (0,1 mg/ml) Peptid, boş nanopartikül (NP1), peptid yüklü nanopartikül (NP3) ve peptid+FITC yüklü nanopartikül (NP4) örneklerinin L-929 fibroblast hücreleri üzerinde gözlenen % hücre canlılığı (n=3)



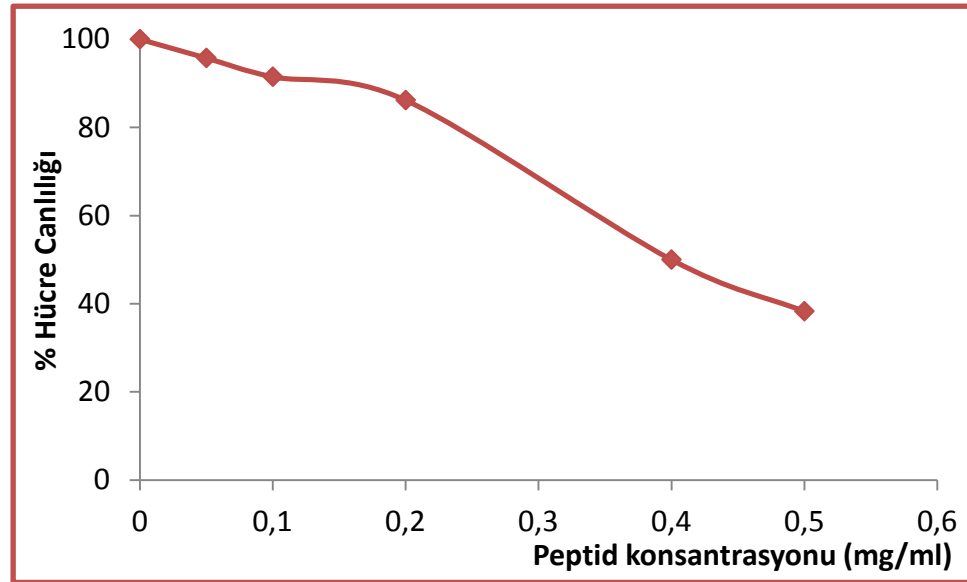
Şekil 5. 113 Aynı konsantrasyondaki (0,05 mg/ml) Peptid, boş nanopartikül (NP1), peptid yüklü nanopartikül (NP3), peptid+FITC yüklü nanopartikül (NP4) ve FITC örneklerinin L-929 fibroblast hücreleri üzerinde gözlenen % hücre canlılığı (n=3)



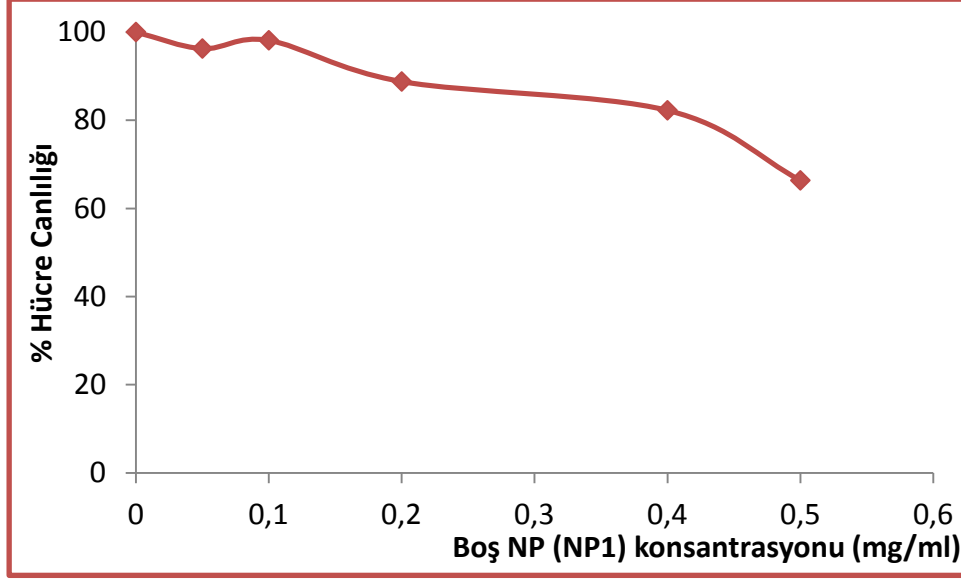
FITC, peptid, boş nanopartikül (NP1), peptid yüklü nanopartikül (NP3) ve peptid+FITC yüklü nanopartikül (NP4) örneklerinin farklı konsantrasyonlarının L-929 fare fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini belirten % hücre canlılığı grafikleri her bir örnek için Şekil 5.114-Şekil5.118’de verildi.



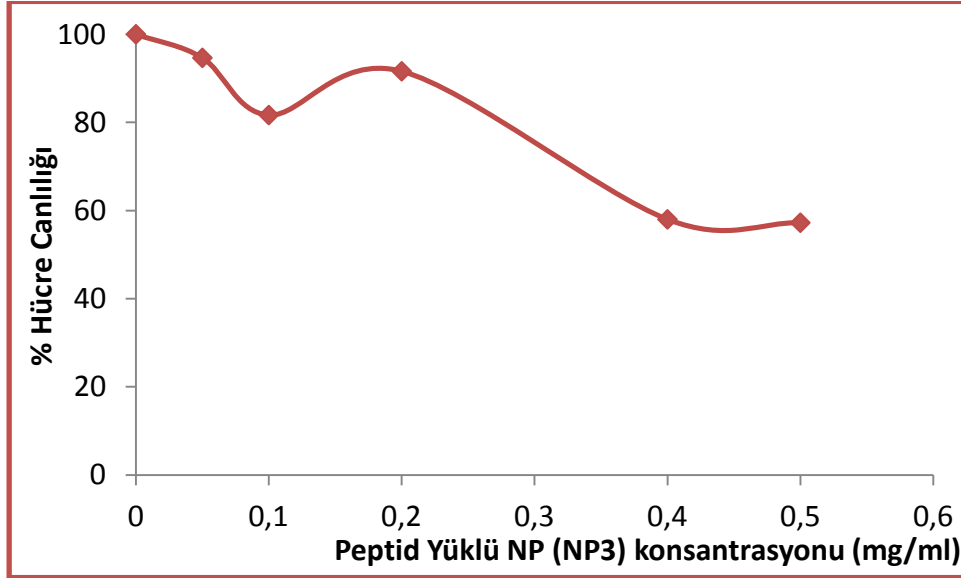
Şekil 5. 114 FITC'nin farklı konsantrasyonlarının (0,05 mg/ml, 0,025 mg/ml) fare fibroblast hücreleri (L-929) üzerine etkisi sonucu konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği



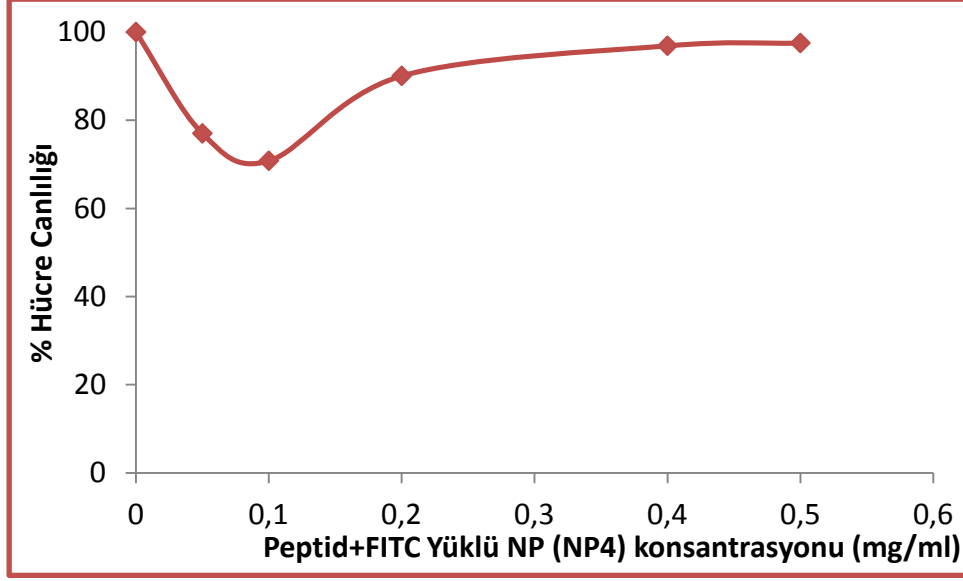
Şekil 5. 115 W-1L19 sentetik peptidinin farklı konsantrasyonlarının (0,5 mg/ml; 0,4 mg/ml; 0,2 mg/ml; 0,1 mg/ml; 0,05 mg/ml) fare fibroblast hücreleri (L-929) üzerine etkisi sonucu konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği



Şekil 5. 116 Boş nanopartiküllerin (NP1) farklı konsantrasyonlarının (0,5 mg/ml; 0,4 mg/ml; 0,2 mg/ml; 0,1 mg/ml; 0,05 mg/ml) fare fibroblast hücreleri (L-929) üzerine etkisi sonucu konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği



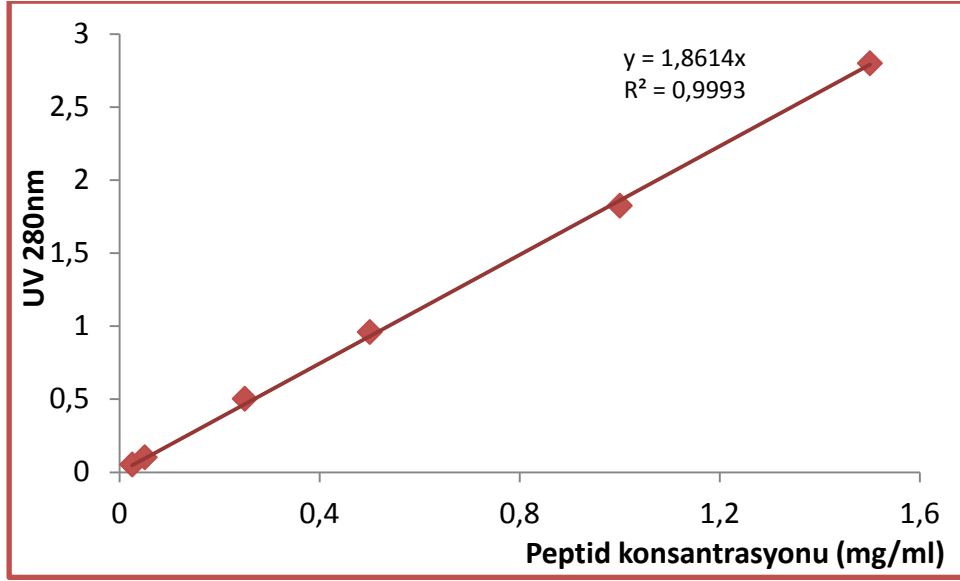
Şekil 5. 117 Peptid yüklü nanopartiküllerin (NP3) farklı konsantrasyonlarının (0,5 mg/ml; 0,4 mg/ml; 0,2 mg/ml; 0,1 mg/ml; 0,05 mg/ml) fare fibroblast hücreleri (L-929) üzerine etkisi sonucu konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği



Şekil 5. 118 Peptid+FITC yüklü nanopartiküllerin (NP4) farklı konsantrasyonlarının (0,5 mg/ml; 0,4 mg/ml; 0,2 mg/ml; 0,1 mg/ml; 0,05 mg/ml) fare fibroblast hücreleri (L-929) üzerine etkisi sonucu konsantrasyona bağlı % canlılık grafiği

#### 5.9.8 Yükleme veriminin hesaplanması

Hazırlanan nanopartiküller için yükleme verimi santrifüj sonrası elde edilen üst fazların UV spektrofotometre ile 280 nm dalga boyunda yapılan ölçümleri ile hesaplandı. Elde edilen değerlere ait peptid miktarları Şekil 5.119'daki peptid standart eğri grafiğinden yararlanılarak saptandı. Nanopartiküllerin yükleme verimleri de serbest peptid miktarlarından yola çıkılarak hesaplandı. Elde edilen yükleme oranları Çizelge 5.4'te verildi.



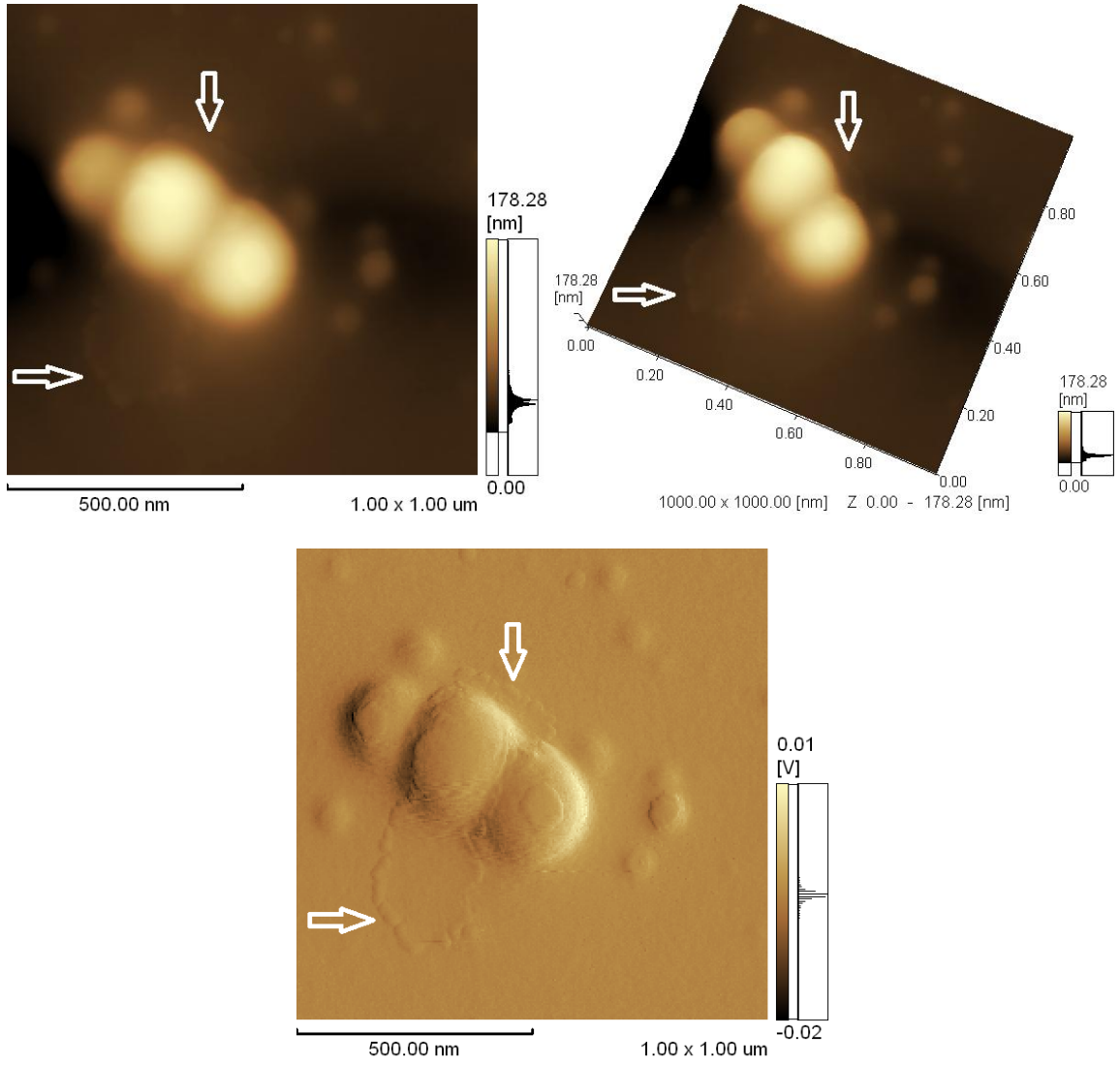
Şekil 5. 119 Canine Parvovirus W-1L19 sentetik peptidi UV standart eğrisi

Çizelge 5.4 Nanopartiküllere ait UV<sub>280nm</sub> değerleri ve % yükleme miktarları

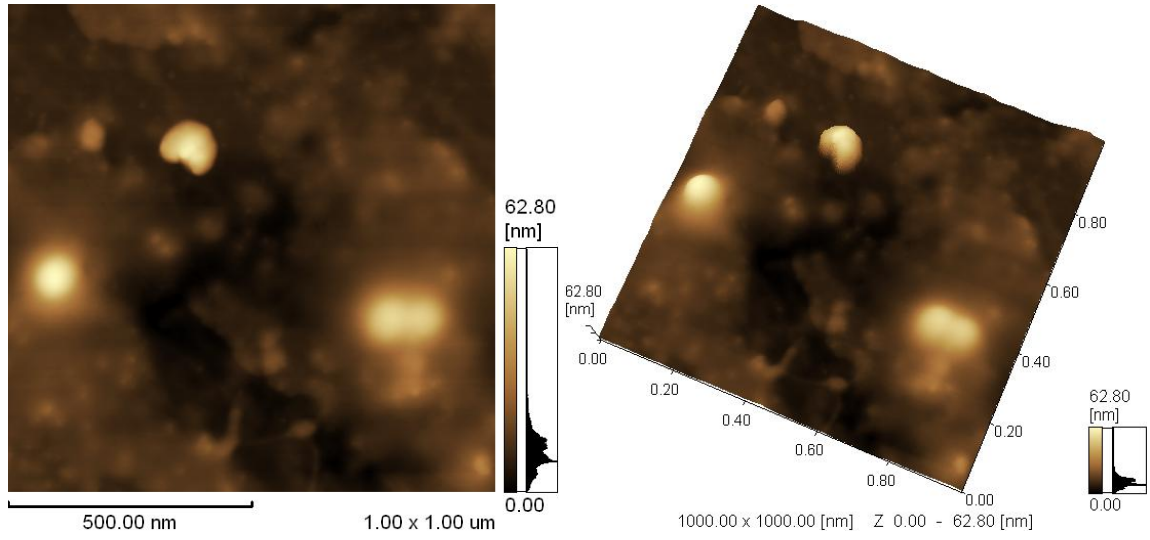
Örnek	UV <sub>280nm</sub>	Serbest Peptid (mg/ml)	% Yükleme
NP3	0,328	0,1762	85,31
NP4	0,395	0,2122	82,31

### 5.9.9 Nanopartiküllerin Salımlarının İncelenmesi

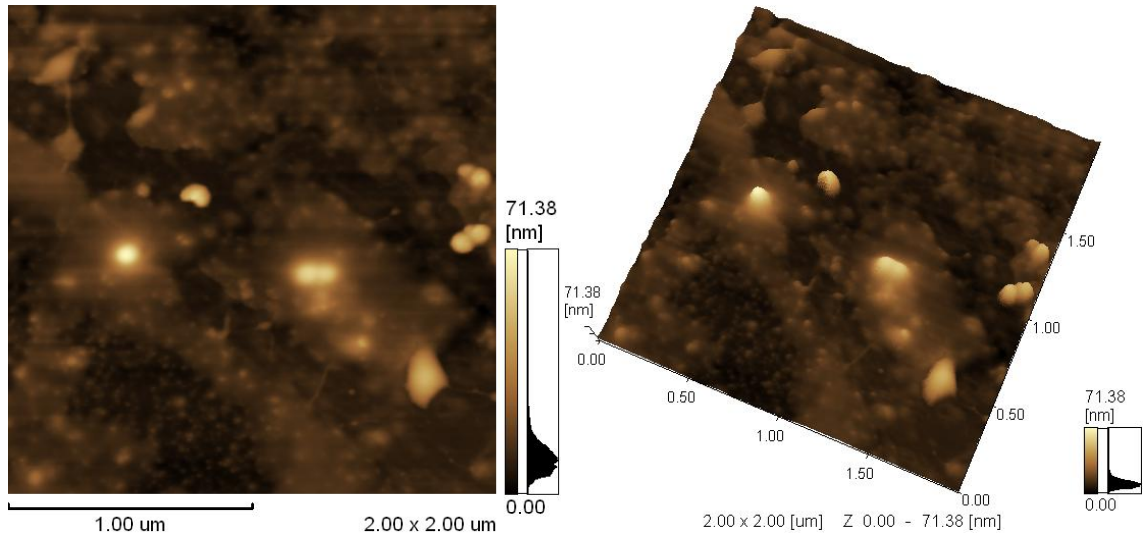
AFM görüntüsü alınan peptid+FITC yüklü nanopartikülün (NP4) 30 gün PBS tamponunda bekletilmesinin ardından elde edilen AFM görüntüsü Şekil 5.120'de, 60 gün PBS tamponunda bekletilmesinin ardından elde edilen AFM görüntüsü Şekil 5.121 – Şekil 5.122'de, 5 mg peptid yüklü nanopartikülün PBS tamponunda süspansiyon edilmesi ile yapılan salım çalışmasından elde edilen peptid salım profili ise Şekil 5.123'te verildi.



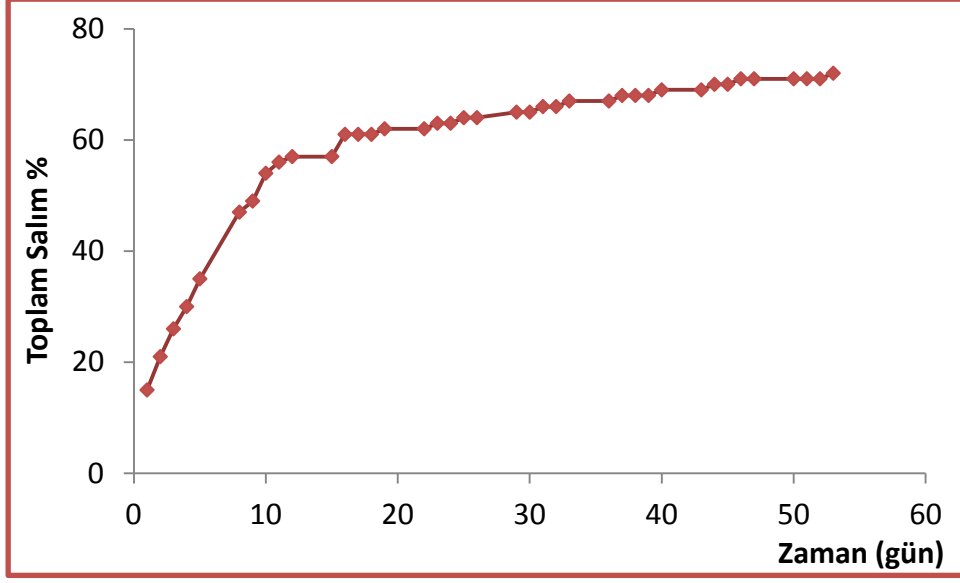
Şekil 5. 120 Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan FITC+peptid yüklü nanopartiküllerin (NP4) 30 gün PBS tamponunda bekletilmesinin ardından elde edilen sırasıyla 2D, 3D ve deflection AFM görüntüsü (1x1 μm<sup>2</sup>lik alan)



Şekil 5. 121 Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan FITC+peptid yüklü nanopartiküllerin (NP4) 60 gün PBS tamponunda bekletilmesinin ardından elde edilen sırasıyla 2D ve 3D AFM görüntüsü ( $1 \times 1 \mu\text{m}^2$  lik alan)



Şekil 5. 122 Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan FITC+peptid yüklü nanopartiküllerin (NP4) 60 gün PBS tamponunda bekletilmesinin ardından elde edilen sırasıyla 2D ve 3D AFM görüntüsü ( $2 \times 2 \mu\text{m}^2$  lik alan)



Şekil 5. 123 Peptid içeren PLGA nanopartikülden (NP3) peptid salım profili

### SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasının birinci aşamasında sırası ile Canine Parvovirus (CPV) W-7L20 sentetik peptidinin sentezlenmesi, saflaştırılması ve karakterizasyonu, bu peptidin Poliakrilik asid (PAA) ile biyokonjugatlarının sentezlenmesi ve karakterizasyonu, bunların yanı sıra ticari olarak satın alınan Canine Parvovirus (CPV) W-1L19 sentetik peptidinin Poliakrilik asid (PAA), Karboksimetilselülaz (CMC) ve farklı molekül ağırlıklarındaki (80 kDa, 120 kDa) Poli(N-Vinil-2-Pirolidon-ko-Akrilik asid) [P(VP-co-AA)] kopolimerleri ile biyokonjugatlarının sentezi ve karakterizasyonu çalışıldı. İkinci bölümde ise boş, Floresansizotiyosiyanat (FITC), Canine Parvovirus (CPV) W-1L19 peptidi ve FITC+W-1L19 peptidi içeren PLGA nanopartiküllerinin ikili emülsiyon w/o/w çözücü buharlaştırma tekniği ile üretilmesi, karakterizasyonu ve görüntülenmesi gerçekleştirildi, biyouyumluluğunun incelenmesi amacıyla da MTT analizi ile sitotoksik özellikleri incelendi.

Biyokonjugatlar; 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorid (EDC) varlığında sentezlendi. Biyokonjugasyon reaksiyonu polimer moleküllerinin sahip olduğu karboksil (-COOH) gruplarının aktivasyonu ve oluşan aktif O-açılısoüre ara ürününün peptidlerin yapısında bulunan amino (-NH<sub>2</sub>) grupları ile bağlanması sonucu Peptid-Polimer kovalent biyokonjugatlarının eldesi ile sonuçlandı. Sentezlenen biyokonjugatlar HPLC, GPC, Floresans Spektrofotometre ve Zetasizer cihazlarında analiz edilerek karakterize edildi ve fizikokimyasal analizleri gerçekleştirildi.

HPLC ve GPC analizi sonucu elde edilen UV kromatogramlarında; tek başına polimerler verildiğinde her bir polimerin (PAA, CMC, [P(VP-co-AA)]<sub>120kDa</sub>, [P(VP-co-AA)]<sub>80kDa</sub>) baseline'a yakın bir elüsyon profili sergilediği görüldü. Peptide ait kromatogramlar incelendiğinde ise



HPLC'de 19,6 ile 23. dakikalar arasında GPC'de ise 19 ile 20. dakikalar arasında tek bir pik gözlemlendi. Sentezlenen biyokonjugatların HPLC kromatogramlarında normalde pik görülmeyen alanda 10. dakikadan başlayan ve gerek peptidin artan molar oranı ile gerekse de polimerin artan molar oranı ile beraber şiddetleri de artan pik biyokonjugatların sentezlendiğini ve artan oranla beraber biyokonjugat miktarının da arttığını göstermektedir.

Bu biyokonjugatlara ait GPC kromatogramları incelendiğinde ise; UV detektörden elde edilen kromatogramların HPLC kromatogramları ile bire bir örtüştüğü görülmektedir. Işık saçılması ve kırılma indisi detektörlerinden elde edilen kromatogramlarda ise polimer ve peptidin birbirine bağlanması sonucu biyokonjugatların sentezlenmesi ile beraber molekül boyutunun da giderek büyüdüğü gözlenmektedir.

Polimerin artan oranlarında sentezlenen tüm biyokonjugatların kromatogramlarında polimerin artan molar oranı ile beraber serbest peptid pikinde orantılı bir azalma görülmektedir. Ortama daha fazla polimer eklenmesi ile reaksiyona girebilecek -COOH grubu sayısı arttırılmakta bunun sonucunda da daha fazla -NH<sub>2</sub> grubu konjugasyon reaksiyonuna girmekte ve serbest peptid miktarı giderek azalmaktadır. Böylelikle ortamda bulunan peptidin bazı polimer oranlarında neredeyse tamamının tükendiği gözlenmektedir. Reaksiyona giren serbest peptid miktarı her bir polimer için hesaplandı ve her bir polimerle gerçekleştirilen biyokonjugasyon reaksiyonu için reaksiyon verimi tayin edildi.

Biyokonjugatların Floresans Spektroskopisi analizlerinde de serbest peptid molekülünün spektrumundaki  $\lambda_{\text{maksimum}}$  değerlerinin (353 nm) biyokonjugatların  $\lambda_{\text{maksimum}}$  değerlerinden daha büyük olduğu gözlemlendi. Biyokonjugasyon reaksiyonu ile beraber peptid zincirinin ucunda bulunan ve 353 nm'de max. emisyon yapan Triptofan aminoasidinin, polimerin peptide bağlanması sonucu sudan uzaklaştırıldığını ve daha hidrofobik bölgede kaldığını göstermektedir.

Biyokonjugatların Zetasizer cihazı ile yapılan boyut analizlerinde ise konjugasyon sonrasında biyokonjugatların boyut değerlerinin tek başına peptide (peptid → 3,69 nm) ve tek başına polimere (PAA → 25,56 nm, CMC → 9,75 nm, P(VP-co-AA)]<sub>120kDa</sub> → 11,36 nm, [P(VP-co-AA)]<sub>80kDa</sub> → 11,43 nm) göre daha yüksek olduğu saptandı. Bu da konjugasyon işlemi ile beraber polimer ve peptid moleküllerinin birbirine bağlandığını ve bunun sonucunda molekül boyutunun arttığını göstermektedir.

Biyokonjugatların Zetasizer cihazı ile yapılan zeta potansiyel ölçümlerinde ise konjugasyon sonrasında biyokonjugatların zeta potansiyel değerlerinin tek başına polimere (PAA → -25,5 mV, CMC → -32,3 mV, P(VP-co-AA)]<sub>120kDa</sub> → -9,54 mV, [P(VP-co-AA)]<sub>80kDa</sub> → -18,4 mV) göre sıfıra daha fazla yakın olduğu saptandı. Tek başına peptidin zeta potansiyel değerinin -3,4 mV olduğu göz önüne alındığında iki negatif yüke sahip molekülün bir araya gelmesi sonucunda zeta potansiyel değerinin daha pozitif doğru gitmesi polimerler üzerindeki negatif yüklü karboksil gruplarının (-COOH) peptid üzerindeki amino grupları ile (-NH<sub>2</sub>) amid bağı oluşturmak üzere kovalent olarak bağlandığını göstermektedir.

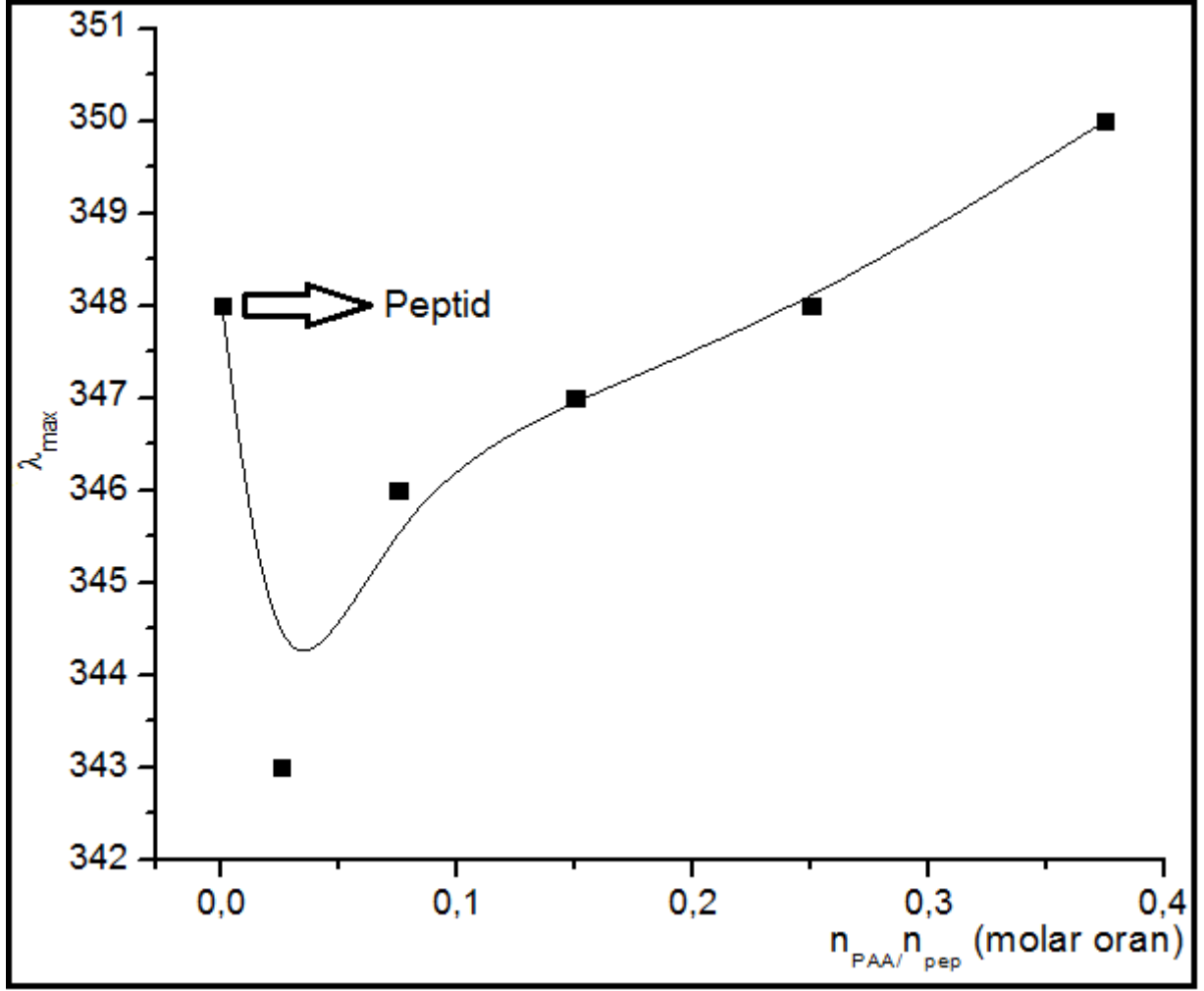
Bu tez çalışmasının tartışma kısmında ilk olarak gruplar halinde her bir polimer ile sentezlenen biyokonjugatların analiz sonuçları sonrasında ise Nanopartiküllere ait analiz sonuçları detaylı olarak tartışılacaktır.

### **6.1 Canine Parvovirus W-7L20 Peptidinin Poliakrilikasit (PAA) Polimeri ile Biyokonjugatlarına Ait Tartışma**

PAA polimeri ile W-7L20 peptidinin klasik konjugasyon yöntemi ile EDC varlığında  $n_{PAA}/n_{pep} = 0,025, 0,075, 0,15, 0,25, 0,375$  olmak üzere 5 farklı oranda biyokonjugat sentezlendi. Bu biyokonjugatların tamamı GPC cihazında, Zetasizer cihazında ve Floresans spektrofotometre’de analiz edildi.

Peptidin sabit konsantrasyonuna karşı polimerin artan konsantrasyonunda yapılan deneylerde polimerin tüm konsantrasyonlarında peptidin tümünün reaksiyona girdiği ve ortamda serbest peptid kalmadığı GPC kromatogramından görülmektedir (Şekil 5.26).

Bu biyokonjugat grubuna ait Floresans Spektrofotometre analizlerinde elde edilen spektrumlardaki  $\lambda_{maksimum}$  değerleri karşılaştırıldığında biyokonjugasyon reaksiyonu ile beraber biyokonjugatların  $\lambda_{maksimum}$  değerinin serbest peptide (348 nm) göre daha düşük dalga boyuna kaydığı (Blue Shift) görülmektedir. Biyokonjugasyon reaksiyonu ile beraber peptidin PAA polimerine bağlandığı, polimer moleküllerinin peptidin etrafını çevrelemesi sonucunda; peptid zincirinin ucunda bulunan ve 348 nm’de max. emisyon yapan Triptofan aminoasidinin daha içeride ve daha hidrofobik bölgede kaldığı, sudan uzaklaştığı böylece max. emisyon dalga boyunun daha küçük dalga boyuna kaydığı (en fazla kayma  $n_{PAA}/n_{pep}=0,025$  oranı için →  $\Delta\lambda_{max}$  5 nm) saptanmıştır (Şekil 6.1).

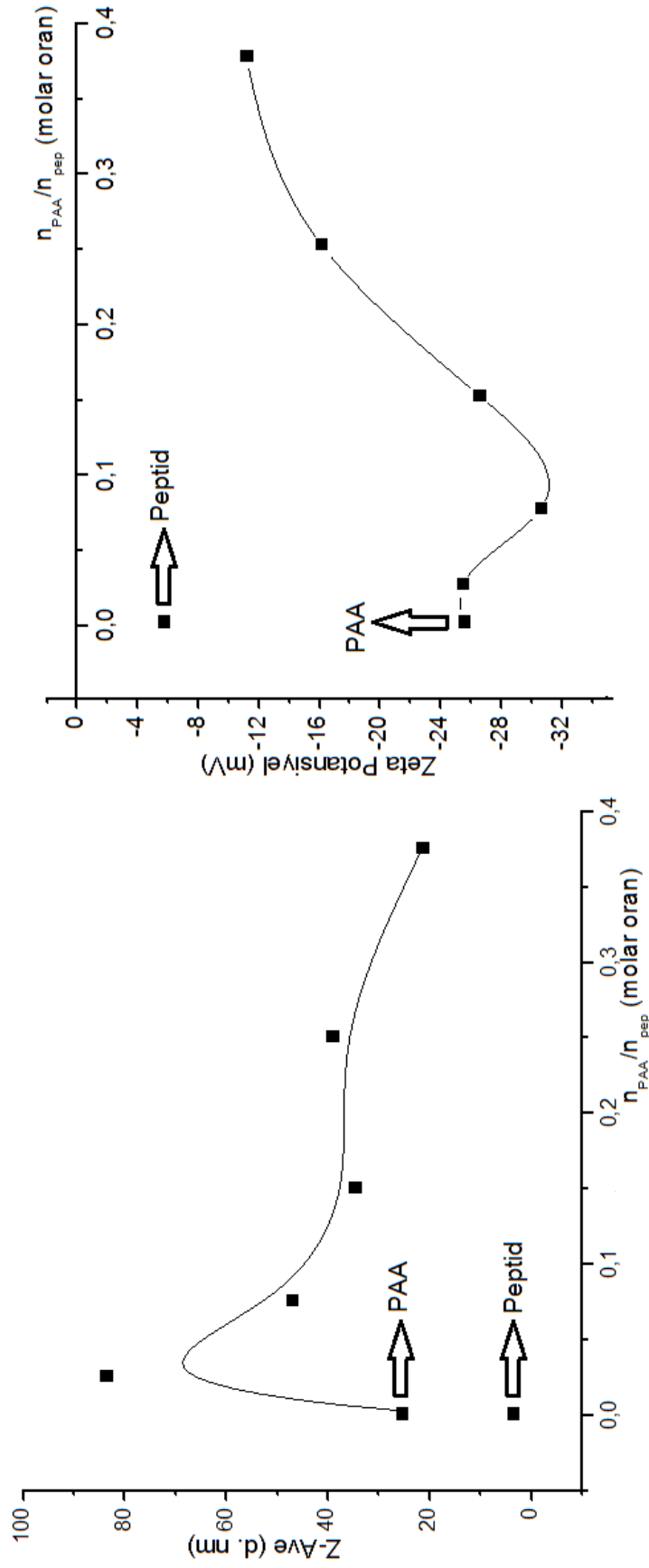


Şekil 6. 1  $n_{PAA}/n_{pep}=0,025, 0,075, 0,15, 0,25, 0,375$  biyokonjugatlarına ve serbest peptide ait Floresans spektrumlarındaki  $\lambda_{maksimum}$  değerlerinin karşılaştırılması

Yine aynı gruba ait biyokonjugatların boyut dağılımları serbest peptid ve polimer ile karşılaştırıldığında 3,17 nm boyuta sahip olan peptidin 25,56 nm boyuttaki PAA polimeri ile biyokonjugasyonu sonucunda sentezlenen biyokonjugatların boyutlarının artan polimer miktarına bağlı olarak değiştiği ve 83,73 nm'ye kadar çıktığı görülmektedir (Şekil 6.8). Bu da konjugasyon işlemi ile beraber polimer ve peptid moleküllerinin birbirine bağlandığını ve bunun sonucunda molekül boyutunun arttığını göstermektedir.

Biyokonjugatların zeta potansiyel değerleri peptidin (-5,9mV) ve PAA polimerinin (-25,5 mV) zetapotansiyel değerleri ile karşılaştırıldığında, biyokonjugatların zeta potansiyel değerlerinin PAA'ya göre sıfıra daha yakın olduğu görülmektedir (Şekil 6.2). İki negatif yüke sahip molekülün karıştırılması sonucunda zeta potansiyel değerinin daha pozitif doğru gitmesi PAA

üzerindeki negatif yüklü karboksil gruplarının (-COOH) peptid üzerindeki amino grupları ile (-NH<sub>2</sub>) bağlandığını göstermektedir. Amid bağı oluşumu sonucunda karboksil gruplarının nötürleşmesi sonucunda zetapotansiyel değerinin sıfıra yaklaşması biyokonjugasyon reaksiyonunun gerçekleştiğini kanıtlamaktadır.



Şekil 6. 2  $n_{PAA}/n_{pep}=0,025, 0,075, 0,15, 0,25, 0,375$  biyokonjugatlarına, serbest peptide ve polimere ait Boyut ve Zeta Potansiyel değerlerinin karşılaştırılması

## 6.2 Canine Parvovirus W-1L19 Peptidinin Poliakrilikasit (PAA) Polimeri ile Biyokonjugatlarına Ait Tartışma

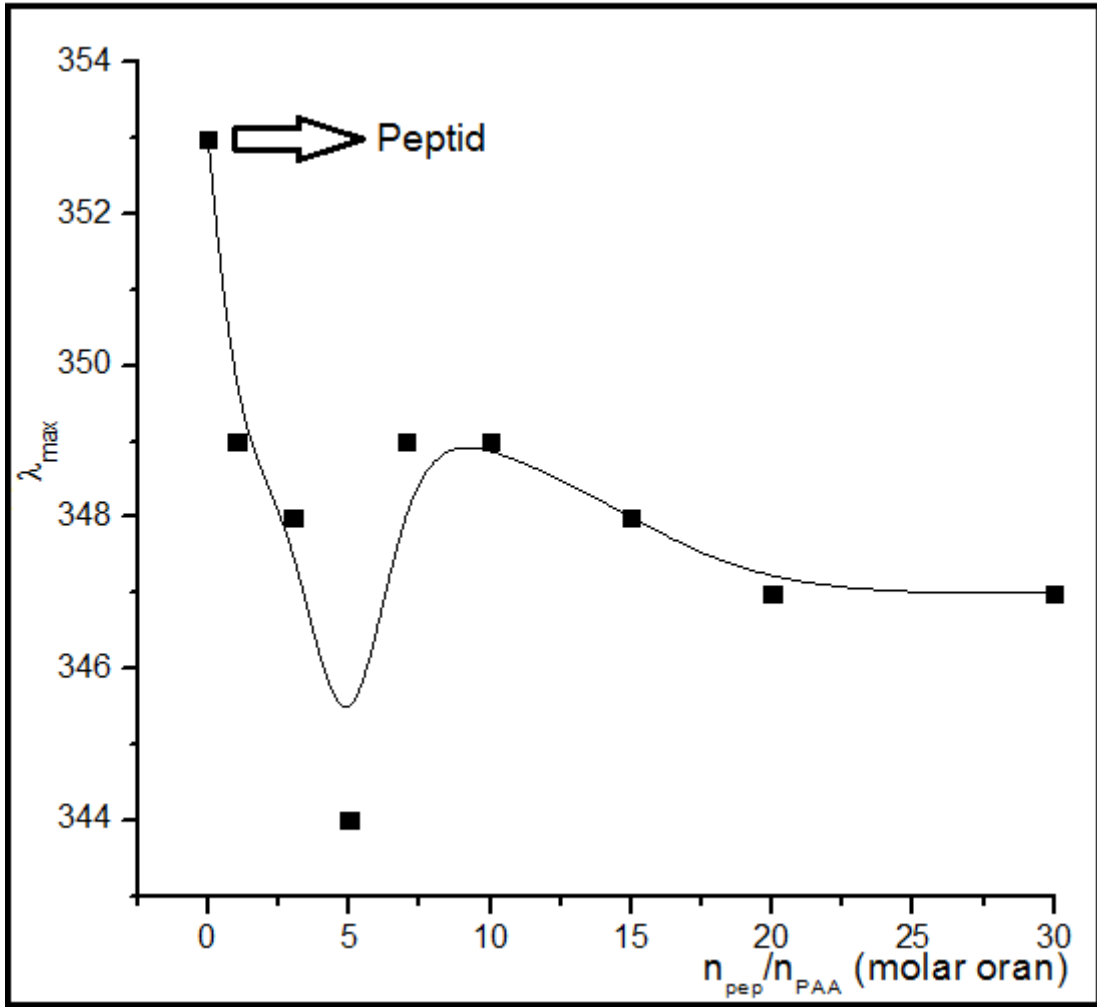
PAA polimeri ile konjugasyonda iki farklı konjugat serisi sentezlendi. Birinci seride peptidin artan oranı ile çalışılırken ikinci seride peptid konsantrasyonu sabit tutulup polimerin artan oranları ile çalışıldı.

### 6.2.1 Peptidin Artan Oranlarında Konjugasyon

Bu grupta klasik konjugasyon yöntemi ile EDC varlığında  $n_{\text{pep}}/n_{\text{PAA}} = 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20$  ve 30 olmak üzere 8 farklı oranda biyokonjugat sentezlendi. Bu biyokonjugatların tümü HPLC, GPC, Zetasizer cihazlarında ve Floresans spektrofotometre'de analiz edildi.

Polimerin sabit konsantrasyonuna karşı peptidin artan konsantrasyonunda yapılan deneylerde ortama eklenen peptid miktarının artması ile doğru orantılı olarak sentezlenen biyokonjugat pikinin de arttığı hem HPLC hem de GPC kromatogramlarından görülmektedir (Şekil 5.39 ve Şekil 5.42).

Bu biyokonjugat grubuna ait Floresans Spektrofotometre analizlerinde elde edilen spektrumlardaki  $\lambda_{\text{maksimum}}$  değerleri serbest peptid ile karşılaştırıldığında biyokonjugasyon reaksiyonu ile beraber biyokonjugatların  $\lambda_{\text{maksimum}}$  değerinin serbest peptide (353 nm) göre daha düşük dalga boyuna kaydığı (Blue Shift) görülmektedir. Biyokonjugasyon reaksiyonu ile beraber peptidin PAA polimerine bağlandığı, polimer moleküllerinin peptidin etrafını çevrelemesi sonucunda; peptid zincirinin ucunda bulunan ve 353 nm'de max. emisyon yapan Triptofan aminoasidinin daha içeride ve daha hidrofobik bölgede kaldığı, sudan uzaklaştığı böylece max. emisyon dalga boyunun daha küçük dalga boyuna kaydığı (en fazla kayma  $n_{\text{pep}}/n_{\text{PAA}}=5$  oranı için  $\rightarrow \Delta\lambda_{\text{max}} 9$  nm) saptanmıştır (Şekil 6.3).



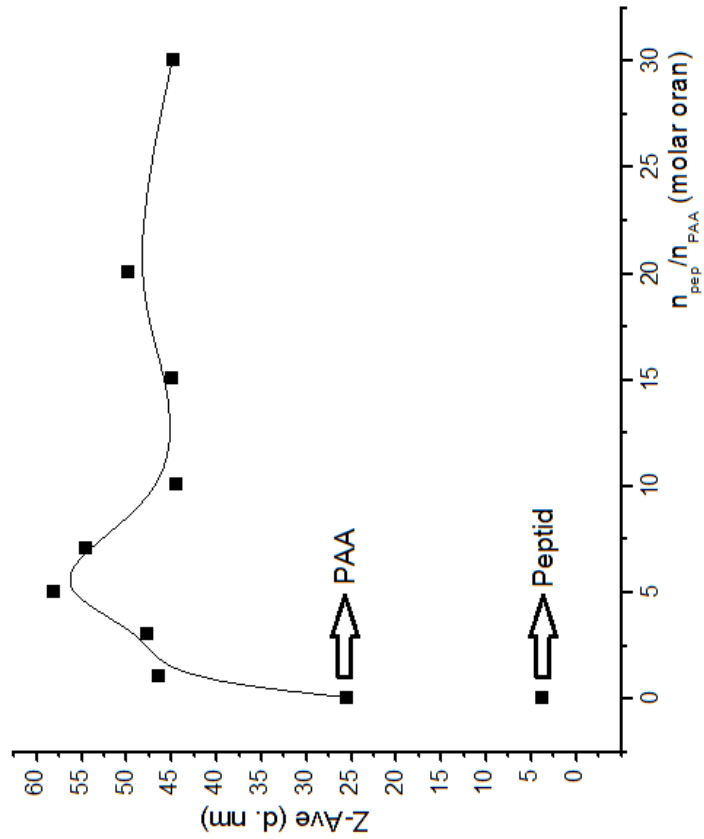
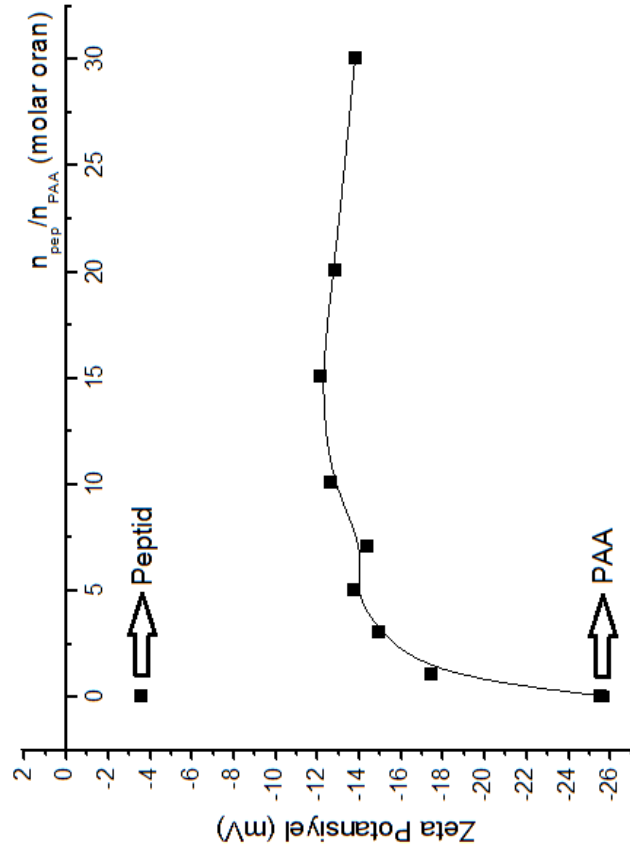
Şekil 6. 3  $n_{\text{pep}}/n_{\text{PAA}} = 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20$  ve 30 biyokonjugatlarına ve serbest peptide ait Floresans spektrumlarındaki  $\lambda_{\text{maksimum}}$  değerlerinin karşılaştırılması

Yine aynı gruba ait biyokonjugatların boyut dağılımları serbest peptid ve polimer ile karşılaştırıldığında 3,69 nm boyuta sahip olan peptidin 25,56 nm boyuttaki PAA polimeri ile biyokonjugasyonu sonucunda sentezlenen biyokonjugatların boyutlarının artan polimer miktarına bağlı olarak değiştiği ve 58,17 nm'ye kadar çıktığı görülmektedir (Şekil 6.4). Bu da konjugasyon işlemi ile beraber polimer ve peptid moleküllerinin birbirine bağlandığını ve bunun sonucunda molekül boyutunun arttığını göstermektedir.

Biyokonjugatların zeta potansiyel değerleri peptidin (-3,4 mV) ve PAA polimerinin (-25,5 mV) zetapotansiyel değerleri ile karşılaştırıldığında, biyokonjugatların zeta potansiyel değerlerinin PAA'ya göre sıfıra daha yakın olduğu görülmektedir (Şekil 6.4). İki negatif yüke sahip molekülün karıştırılması sonucunda zeta potansiyel değerinin daha pozitive doğru gitmesi PAA üzerindeki negatif yüklü karboksil gruplarının (-COOH) peptid üzerindeki amino grupları ile

(-NH<sub>2</sub>) bağlandığını göstermektedir. Amid bağı oluşumu sonucunda karboksil gruplarının nötürleşmesi sonucunda zetapotansiyel değerinin sıfıra yaklaşması biyokonjugasyon reaksiyonunun gerçekleştiğini kanıtlamaktadır.





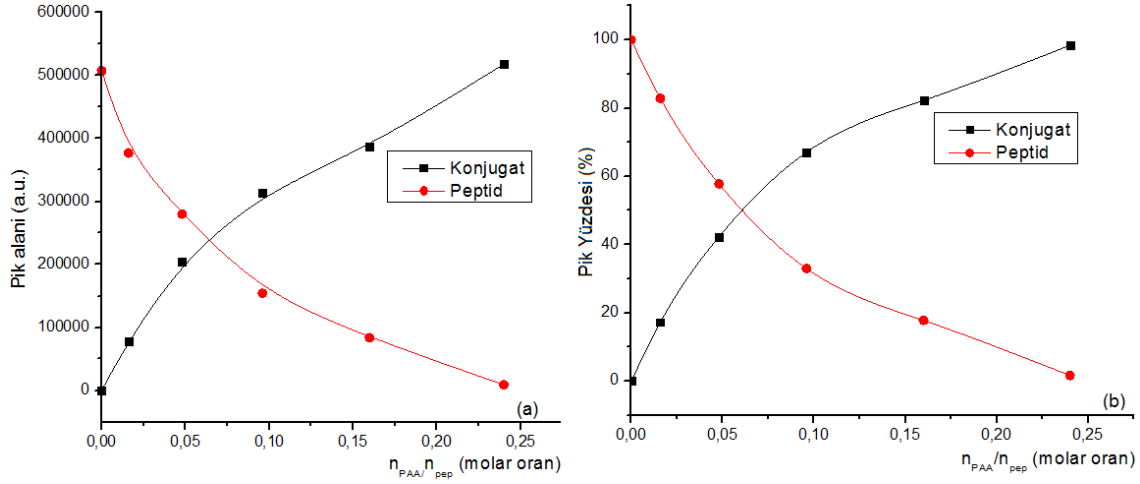
Şekil 6. 4  $n_{\text{pep}}/n_{\text{PAA}} = 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20$  ve 30 biyokonjugatlarına ve serbest peptid ve polimere ait Boyut ve Zeta Potansiyel değerlerinin karşılaştırılması

## 6.2.2 Polimerin Artan Oranlarında Konjugasyon

Bu grupta klasik konjugasyon yöntemi ile EDC varlığında  $n_{PAA}/n_{pep} = 0,016; 0,048; 0,096; 0,16; 0,24; 0,48;$  ve  $0,65$  olmak üzere 7 farklı oranda biyokonjugat sentezlendi. Bu biyokonjugatların ilk 5 oranı HPLC cihazında analiz edilirken 7 oranın tamamı GPC cihazında, Zetasizer cihazında ve Floresans spektrofotometre'de analiz edildi.

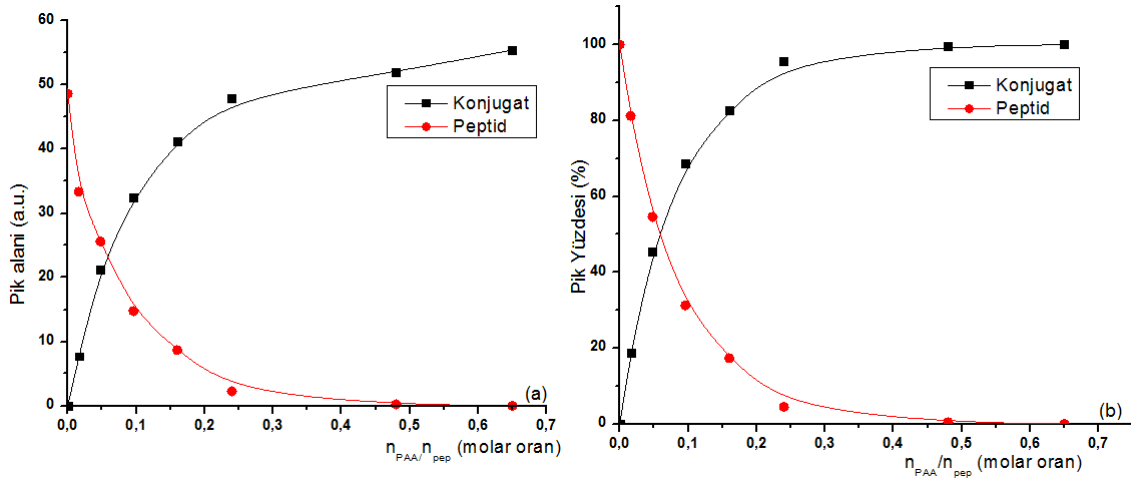
Peptidin sabit konsantrasyonuna karşı polimerin artan konsantrasyonunda yapılan deneylerde polimerin miktarının artması ile doğru orantılı olarak reaksiyona giren peptid miktarının da arttığı hem HPLC hem de GPC pik alanı grafiklerinden görülmektedir (Şekil 6.5 ve Şekil 6.6).

HPLC kromatogramlarından yararlanılarak yapılan alan hesaplamalarında biyokonjugatın alanının polimerin artan miktarı ile beraber arttığı serbest peptid pikinin ise ters orantılı olarak artan polimer miktarı bile beraber azaldığı gözlenmektedir. Ortamda hiç polimer yok iken  $0,217$  mg/ml olan peptidin  $n_{PAA}/n_{pep}=0,24$  oranında %  $98,4$ 'ünün tükendiği (Şekil 6.4) gösterilmiştir.



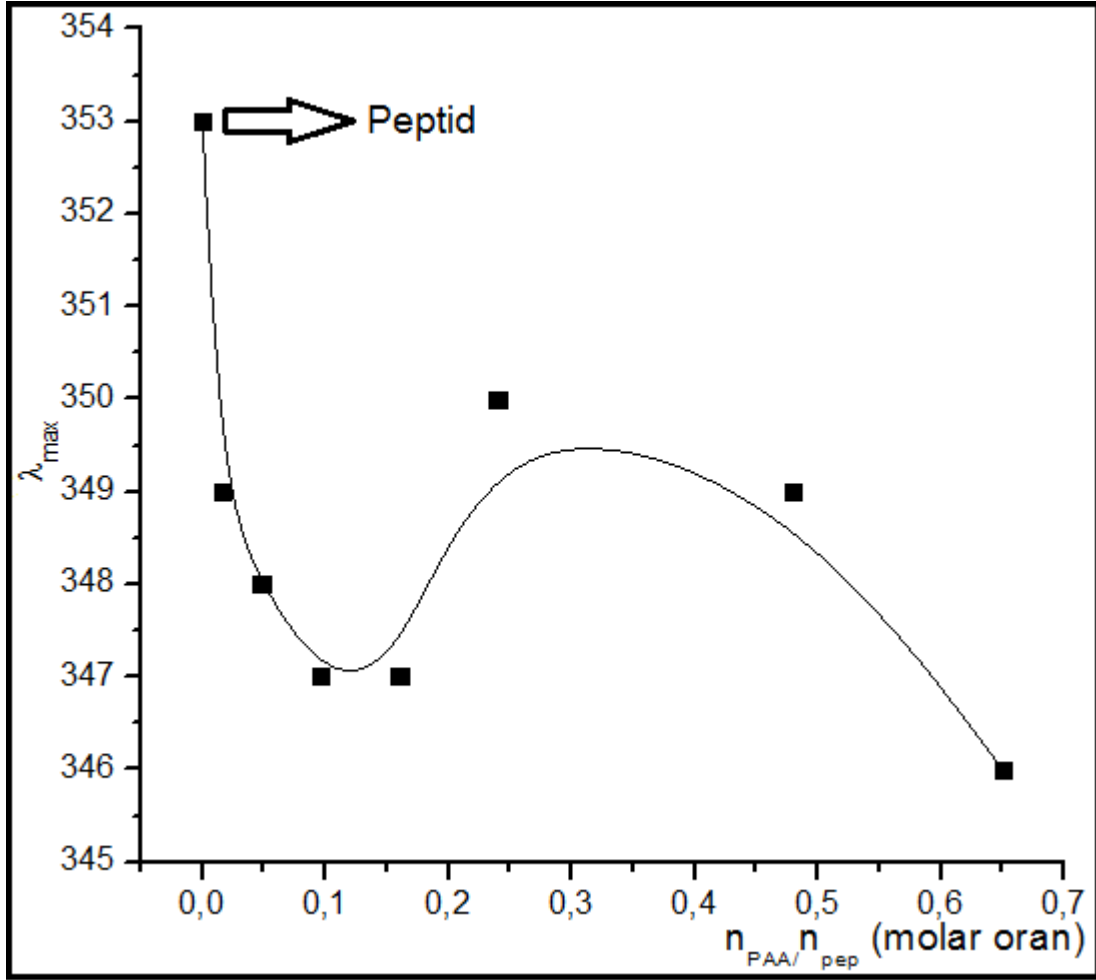
Şekil 6. 5  $n_{PAA}/n_{pep}=0,016, 0,048, 0,096, 0,16, 0,24$ , biyokonjugatlarına ve serbest peptide ait HPLC kromatogramı pik alanlarının (a) ve pik yüzdelерinin (b) karşılaştırılması

GPC kromatogramlarından yararlanılarak yapılan alan hesaplamalarında da biyokonjugatın alanının polimerin artan miktarı ile beraber arttığı serbest peptid pikinin ise ters orantılı olarak artan polimer miktarı bile beraber azaldığı gözlenmektedir. Ortamda hiç polimer yok iken 0,217 mg/ml olan peptidin  $n_{PAA}/n_{pep}=0,65$  oranında tamamının reaksiyona girdiği gösterilmiştir (Şekil 6.5).



Şekil 6. 6  $n_{PAA}/n_{pep}=0,016, 0,048, 0,096, 0,16, 0,24, 0,48, 0,65$  biyokonjugatlarına ve serbest peptide ait GPC kromatogramı pik alanlarının (a) ve pik yüzdelерinin (b) karşılaştırılması

Bu biyokonjugat grubuna ait Floresans Spektrofotometre analizlerinde elde edilen spektrumlardaki  $\lambda_{maksimum}$  değerleri karşılaştırıldığında biyokonjugasyon reaksiyonu ile beraber biyokonjugatların  $\lambda_{maksimum}$  değerinin serbest peptide (353 nm) göre daha düşük dalga boyuna kaydığı (Blue Shift) görülmektedir. Biyokonjugasyon reaksiyonu ile beraber peptidin PAA polimerine bağlandığı, polimer moleküllerinin peptidin etrafını çevrelemesi sonucunda; peptid zincirinin ucunda bulunan ve 353 nm'de max. emisyon yapan Triptofan aminoasidinin daha içeride ve daha hidrofobik bölgede kaldığı, sudan uzaklaştığı böylece max. emisyon dalga boyunun daha küçük dalga boyuna kaydığı (en fazla kayma  $n_{PAA}/n_{pep}=0,65$  oranı için  $\rightarrow \Delta\lambda_{max} 7$  nm) saptanmıştır (Şekil 6.7).

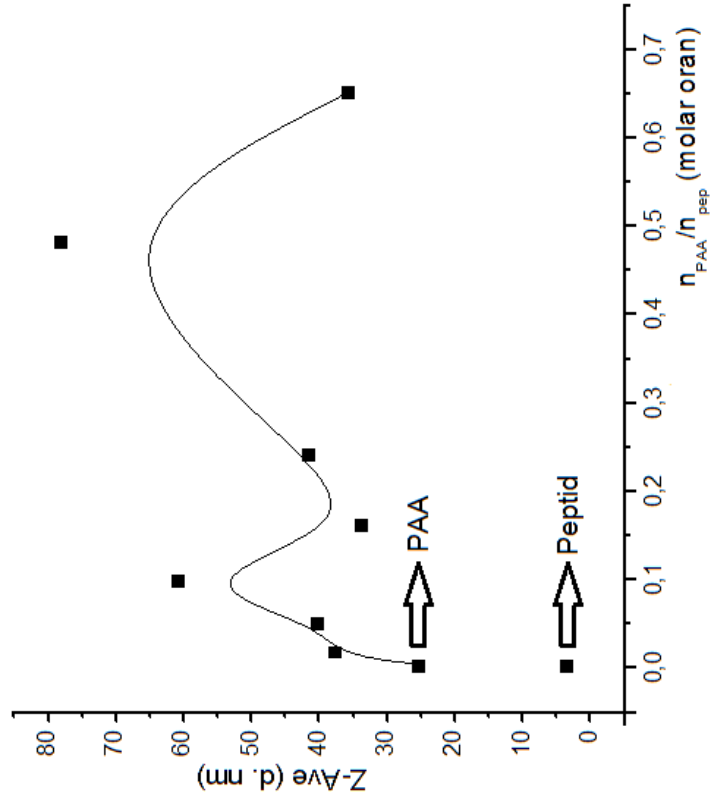
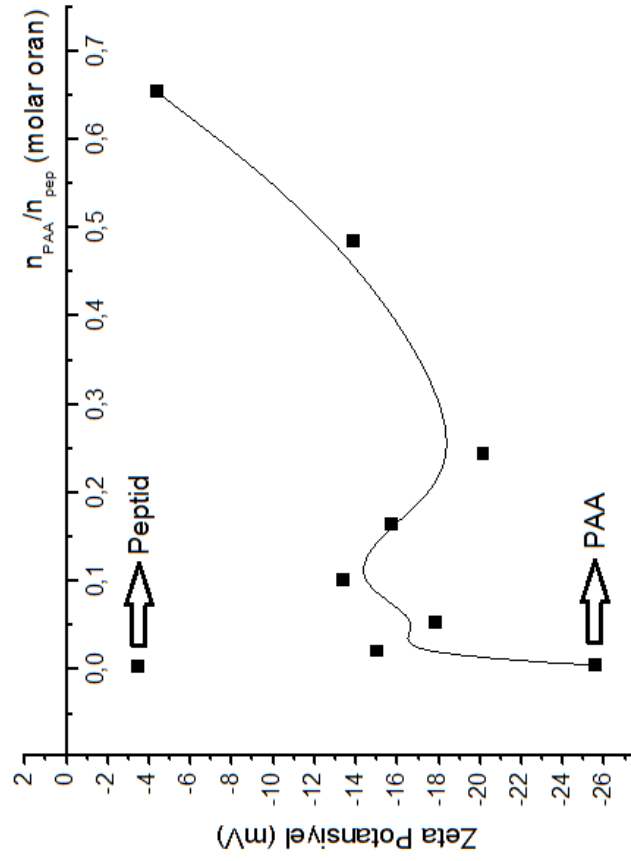


Şekil 6. 7  $n_{PAA}/n_{pep}=0,016, 0,048, 0,096, 0,16, 0,24, 0,48, 0,65$  biyokonjugatlarına ve serbest peptide ait Floresans spektrumlarındaki  $\lambda_{maksimum}$  değerlerinin karşılaştırılması

Yine aynı gruba ait biyokonjugatların boyut dağılımları serbest peptid ve polimer ile karşılaştırıldığında 3,69 nm boyuta sahip olan peptidin 25,56 nm boyuttaki PAA polimeri ile biyokonjugasyonu sonucunda sentezlenen biyokonjugatların boyutlarının artan polimer miktarına bağlı olarak değiştiği ve 78,23 nm'ye kadar çıktığı görülmektedir (Şekil 6.8). Bu da konjugasyon işlemi ile beraber polimer ve peptid moleküllerinin birbirine bağlandığını ve bunun sonucunda molekül boyutunun arttığını göstermektedir.

Biyokonjugatların zeta potansiyel değerleri peptidin (-3,4 mV) ve PAA polimerinin (-25,5 mV) zetapotansiyel değerleri ile karşılaştırıldığında, biyokonjugatların zeta potansiyel değerlerinin PAA'ya göre sifira daha yakın olduğu görülmektedir (Şekil 6.8). İki negatif yüke sahip molekülün karıştırılması sonucunda zeta potansiyel değerinin daha pozitif doğru gitmesi PAA

zerindeki negatif yüklü karboksil gruplarının (-COOH) peptid üzerindeki amino grupları ile (-NH<sub>2</sub>) bağlandığını göstermektedir. Amid bağı oluğunu sonucunda karboksil gruplarının ntrleğmesi sonucunda zetapotansiyel değerinin sifıra yaklağması biyokonjugasyon reaksiyonunun gerekleğtiğini kanıtlamaktadır.



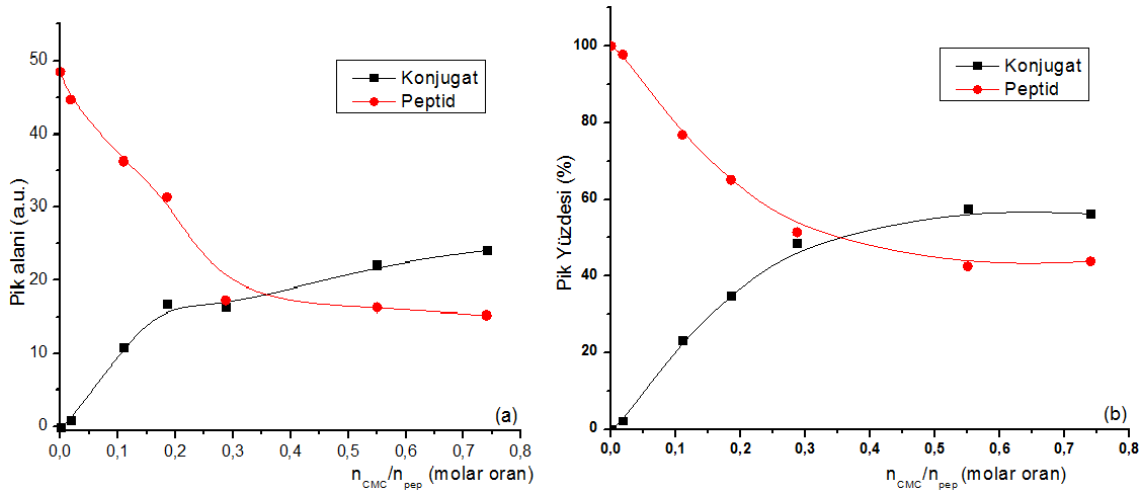
Şekil 6. 8  $n_{PAA}/n_{PEP}=0,016, 0,048, 0,096, 0,16, 0,24, 0,48, 0,65$  biyokonjugatlarına, serbest peptide ve polimere ait Boyut ve Zeta Potansiyel değerlerinin karşılaştırılması

### 6.3 Canine Parvovirus W-1L19 Peptidinin Karboksimetilselülaz (CMC) Polimeri ile Biyokonjugatlarına Ait Tartışma

Bu grupta klasik konjugasyon yöntemi ile EDC varlığında  $n_{CMC}/n_{pep} = 0,018, 0,055, 0,11, 0,185, 0,287, 0,55, 0,74$  olmak üzere 7 farklı oranda biyokonjugat sentezlendi. Bu biyokonjugatların tamamı GPC cihazında, Zetasizer cihazında ve Floresans spektrofotometre’de analiz edildi.

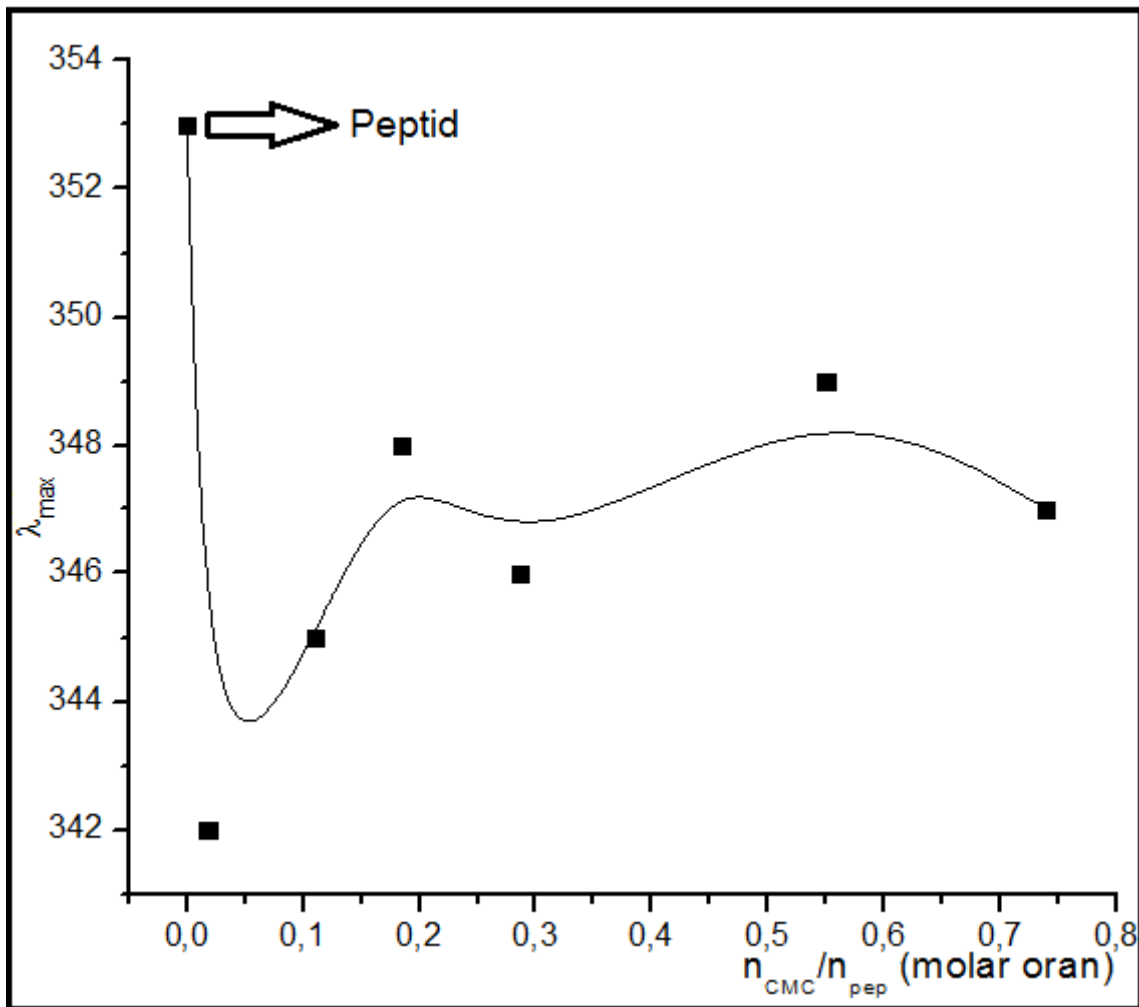
Peptidin sabit konsantrasyonuna karşı polimerin artan konsantrasyonunda yapılan deneylerde polimerin miktarının artması ile doğru orantılı olarak reaksiyona giren peptid miktarının da arttığı GPC pik alanı grafiğinden görülmektedir (Şekil 6.9).

GPC kromatogramlarından yararlanılarak yapılan alan hesaplamalarında biyokonjugatın alanının polimerin artan miktarı ile beraber arttığı serbest peptid pikinin ise ters orantılı olarak artan polimer miktarı bile beraber azaldığı gözlenmektedir. Ortamda hiç polimer yok iken 0,217 mg/ml olan peptidin  $n_{CMC}/n_{pep}=0,74$  oranında % 56,2’sinin tükendiği (Şekil 6.9) gösterilmiştir.



Şekil 6. 9  $n_{CMC}/n_{pep}=0,018, 0,055, 0,11, 0,185, 0,287, 0,55, 0,74$  biyokonjugatlarına ve serbest peptide ait GPC kromatogramı pik alanlarının (a) ve pik yüzdelerinin (b) karşılaştırılması

Bu biyokonjugat grubuna ait Floresans Spektrofotometre analizlerinde elde edilen spektrumlardaki  $\lambda_{\text{maksimum}}$  değerleri karşılaştırdığında biyokonjugasyon reaksiyonu ile beraber biyokonjugatların  $\lambda_{\text{maksimum}}$  değerinin serbest peptide (353 nm) göre daha düşük dalga boyuna kaydığı (Blue Shift) görülmektedir. Biyokonjugasyon reaksiyonu ile beraber peptidin CMC polimerine bağlandığı, polimer moleküllerinin peptidin etrafını çevrelemesi sonucunda; peptid zincirinin ucunda bulunan ve 353 nm'de max. emisyon yapan Triptofan aminoasidinin daha içeride ve daha hidrofobik bölgede kaldığı, sudan uzaklaştığı böylece max. emisyon dalga boyunun daha küçük dalga boyuna kaydığı (en fazla kayma  $n_{\text{CMC}}/n_{\text{pep}}=0,018$  oranı için  $\rightarrow \Delta\lambda_{\text{max}}$  11 nm) saptanmıştır (şekil 6.10).

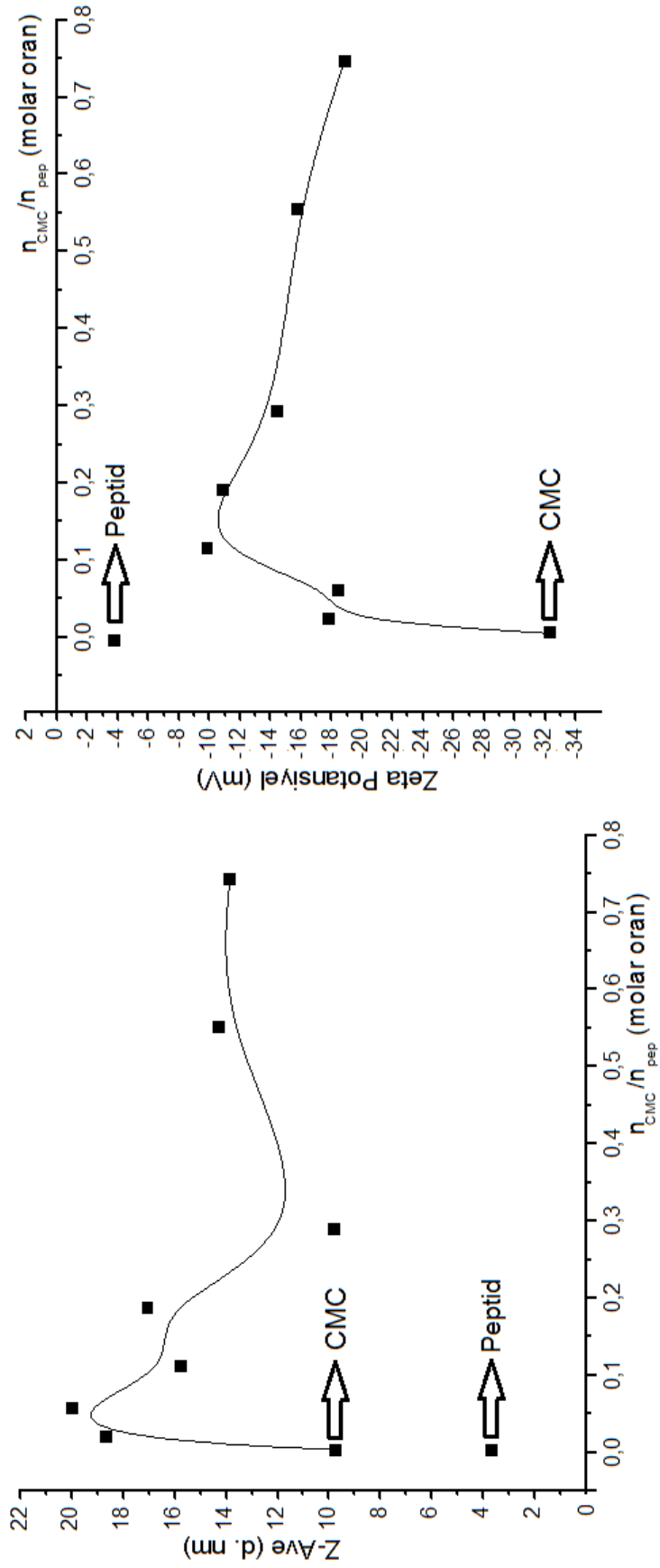


şekil 6. 10  $n_{\text{CMC}}/n_{\text{pep}}=0,018, 0,055, 0,11, 0,185, 0,287, 0,55, 0,74$  biyokonjugatlarına ve serbest peptide ait Floresans spektrumlarındaki  $\lambda_{\text{maksimum}}$  değerlerinin karşılaştırılması



Yine aynı gruba ait biyokonjugatların boyut dağılımları serbest peptid ve polimer ile karşılaştırıldığında 3,69 nm boyuta sahip olan peptidin 9,75 nm boyuttaki CMC polimeri ile biyokonjugasyonu sonucunda sentezlenen biyokonjugatların boyutlarının artan polimer miktarına bağlı olarak değiştiği ve 20,0 nm'ye kadar çıktığı görülmektedir (Şekil 6.11). Bu da konjugasyon işlemi ile beraber polimer ve peptid moleküllerinin birbirine bağlandığını ve bunun sonucunda molekül boyutunun arttığını göstermektedir.

Biyokonjugatların zeta potansiyel değerleri peptidin (-3,4 mV) ve CMC polimerinin (-32,3 mV) zetapotansiyel değerleri ile karşılaştırıldığında, biyokonjugatların zeta potansiyel değerlerinin CMC'ye göre sıfıra daha yakın olduğu görülmektedir (Şekil 6.11). İki negatif yüke sahip molekülün karıştırılması sonucunda zeta potansiyel değerinin daha pozitif yöne doğru gitmesi CMC üzerindeki negatif yüklü karboksil gruplarının (-COOH) peptid üzerindeki amino grupları ile (-NH<sub>2</sub>) bağlandığını göstermektedir. Amid bağı oluşumu sonucunda karboksil gruplarının nötürleşmesi sonucunda zetapotansiyel değerinin sıfıra yaklaşması biyokonjugasyon reaksiyonunun gerçekleştiğini kanıtlamaktadır.



Şekil 6. 11  $n_{CMC}/n_{pep}=0,018, 0,055, 0,11, 0,185, 0,287, 0,55, 0,74$  biyokonjugatlarına, serbest peptide ve polimere ait Boyut ve Zeta Potansiyel değerlerinin karşılaştırılması

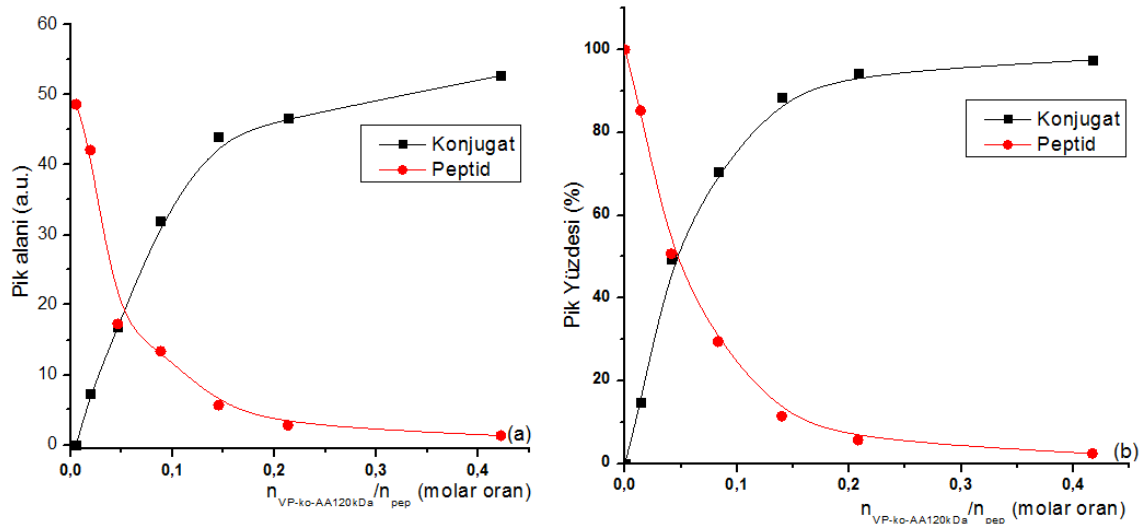
## 6.4 Canine Parvovirus W-1L19 Peptidinin Poli(N-Vinil-2-Pirolidon-ko-Akrilikasid) [P(VP-co-AA)] Polimeri ile Biyokonjugatlarına Ait Tartışma

### 6.4.1 [P(VP-ko-AA)] (2:1, 120.000 Da) Polimerinin Konjugatları

Bu grupta klasik konjugasyon yöntemi ile EDC varlığında  $n_{P(VP-ko-AA)120kDa}/n_{pep}=0,014, 0,041, 0,083, 0,14, 0,208, 0,417$  olmak üzere 6 farklı oranda biyokonjugat sentezlendi. Bu biyokonjugatların tamamı GPC cihazında, Zetasizer cihazında ve Floresans spektrofotometre’de analiz edildi.

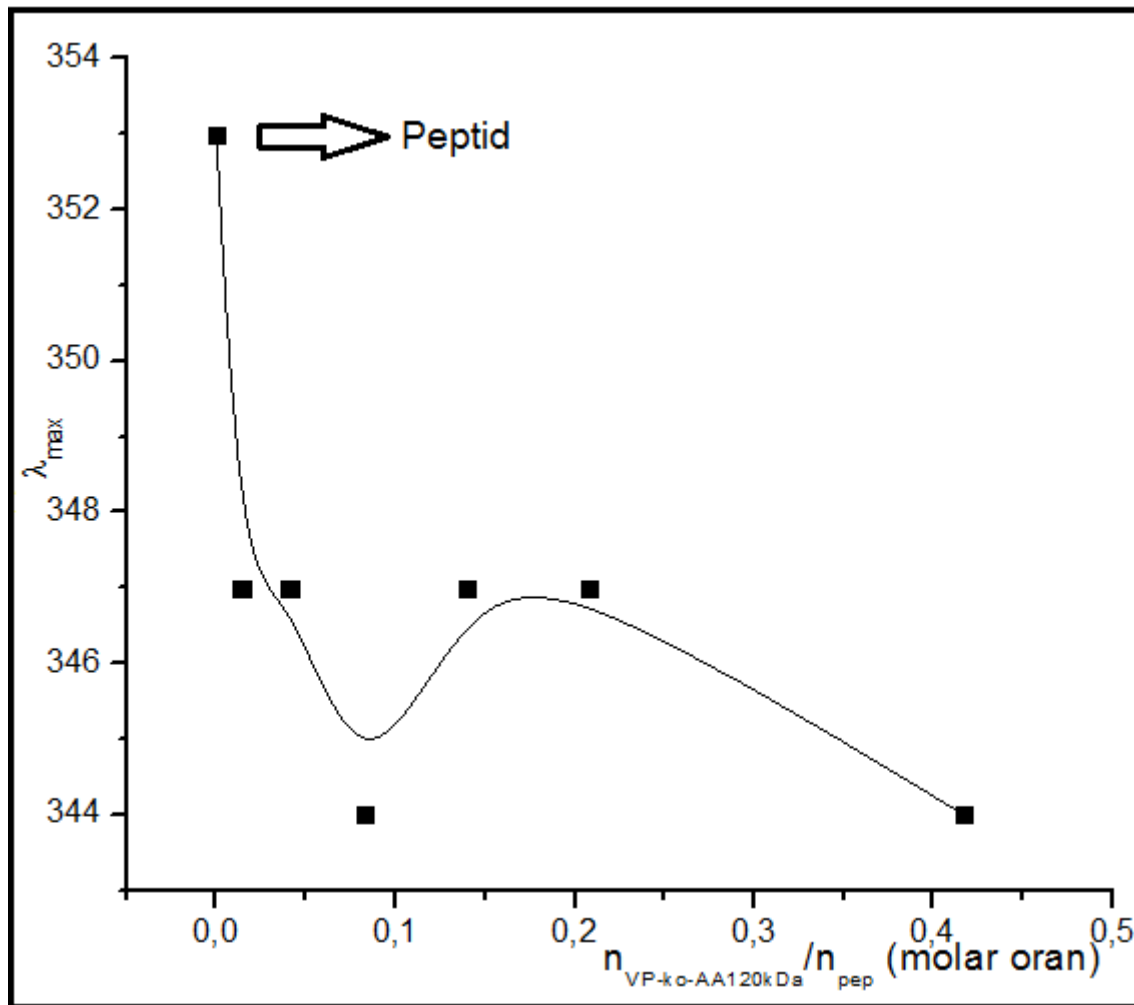
Peptidin sabit konsantrasyonuna karşı polimerin artan konsantrasyonunda yapılan deneylerde polimerin miktarının artması ile doğru orantılı olarak reaksiyona giren peptid miktarının da arttığı GPC pik alanı grafiğinden görülmektedir (Şekil 6.12).

GPC kromatogramlarından yararlanılarak yapılan alan hesaplamalarında biyokonjugatın alanının polimerin artan miktarı ile beraber arttığı serbest peptid pikinin ise ters orantılı olarak artan polimer miktarı bile beraber azaldığı gözlenmektedir. Ortamda hiç polimer yok iken 0,217 mg/ml olan peptidin  $n_{P(VP-ko-AA)120kDa}/n_{pep}=0,417$  oranında % 97,57’sinin tükendiği (Şekil 6.12) gösterilmiştir.



Şekil 6. 12  $n_{P(VP-ko-AA)120kDa}/n_{pep}=0,014, 0,041, 0,083, 0,14, 0,208, 0,417$  biyokonjugatlarına ve serbest peptide ait GPC kromatogramı pik alanlarının (a) ve pik yüzdelerinin (b) karşılaştırılması

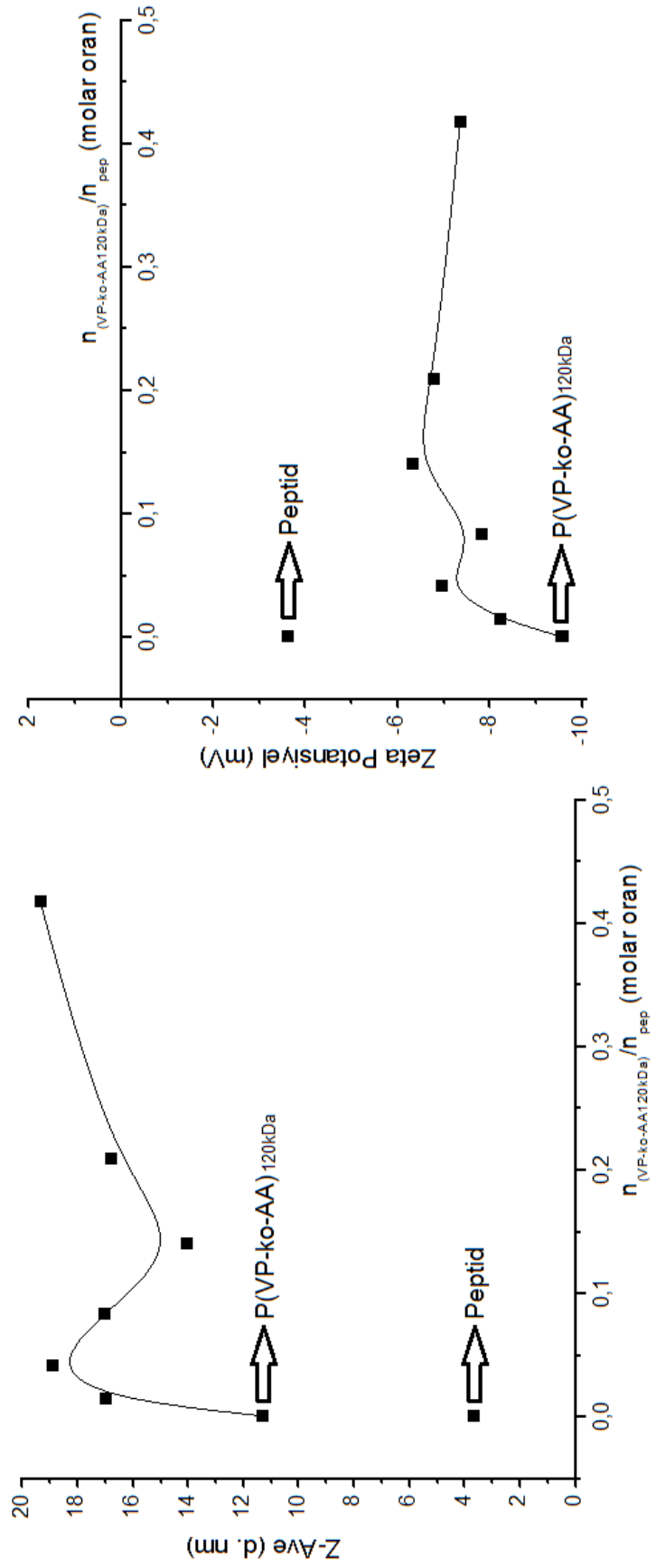
Bu biyokonjugat grubuna ait Floresans Spektrofotometre analizlerinde elde edilen spektrumlardaki  $\lambda_{\text{maksimum}}$  değerleri karşılaştırıldığında biyokonjugasyon reaksiyonu ile beraber biyokonjugatların  $\lambda_{\text{maksimum}}$  değerinin serbest peptide (353 nm) göre daha düşük dalga boyuna kaydığı (Blue Shift) görülmektedir. Biyokonjugasyon reaksiyonu ile beraber peptidin P(VP-ko-AA)<sub>120kDa</sub> polimerine bağlandığı, polimer moleküllerinin peptidin etrafını çevrelemesi sonucunda; peptid zincirinin ucunda bulunan ve 353 nm'de max. emisyon yapan Triptofan aminoasidinin daha içeride ve daha hidrofobik bölgede kaldığı, sudan uzaklaştığı böylece max. emisyon dalga boyunun daha küçük dalga boyuna kaydığı (en fazla kayma  $n_{\text{P(VP-ko-AA)120kDa}}/n_{\text{pep}}=0,083$  oranı için  $\rightarrow \Delta\lambda_{\text{max}} 9$  nm) saptanmıştır (şekil 6.13).



şekil 6. 13  $n_{\text{P(VP-ko-AA)120kDa}}/n_{\text{pep}}=0,014, 0,041, 0,083, 0,14, 0,208, 0,417$  biyokonjugatlarına ve serbest peptide ait Floresans spektrumlarındaki  $\lambda_{\text{maksimum}}$  değerlerinin karşılaştırılması

Yine aynı gruba ait biyokonjugatların boyut dağılımları serbest peptid ve polimer ile karşılaştırıldığında 3,69 nm boyuta sahip olan peptidin 11,36 nm boyuttaki P(VP-*ko*-AA)<sub>120kDa</sub> polimeri ile biyokonjugasyonu sonucunda sentezlenen biyokonjugatların boyutlarının artan polimer miktarına bağlı olarak değiştiği ve 19,36 nm'ye kadar çıktığı görülmektedir (Şekil 6.14). Bu da konjugasyon işlemi ile beraber polimer ve peptid moleküllerinin birbirine bağlandığını ve bunun sonucunda molekül boyutunun arttığını göstermektedir.

Biyokonjugatların zeta potansiyel değerleri peptidin (-3,4 mV) ve P(VP-*ko*-AA)<sub>120kDa</sub> polimerinin (-9,4 mV) zetapotansiyel değerleri ile karşılaştırıldığında, biyokonjugatların zeta potansiyel değerlerinin P(VP-*ko*-AA)<sub>120kDa</sub>'ya göre sifıra daha yakın olduğu görülmektedir (Şekil 6.14). İki negatif yüke sahip molekülün karıştırılması sonucunda zeta potansiyel değerinin daha pozitive doğru gitmesi P(VP-*ko*-AA)<sub>120kDa</sub> üzerindeki negatif yüklü karboksil gruplarının (-COOH) peptid üzerindeki amino grupları ile (-NH<sub>2</sub>) bağlandığını göstermektedir. Amid bağı oluşumu sonucunda karboksil gruplarının nötürleşmesi sonucunda zetapotansiyel değerinin sifıra yaklaşması biyokonjugasyon reaksiyonunun gerçekleştiğini kanıtlamaktadır.



Şekil 6. 14  $n_{P(VP-ko-AA)120kDa} / n_{pep} = 0,014, 0,041, 0,083, 0,14, 0,208, 0,417$  biyokonjugatlarına, serbest peptide ve polimere ait Boyut ve Zeta Potansiyel değerlerinin karşılaştırılması

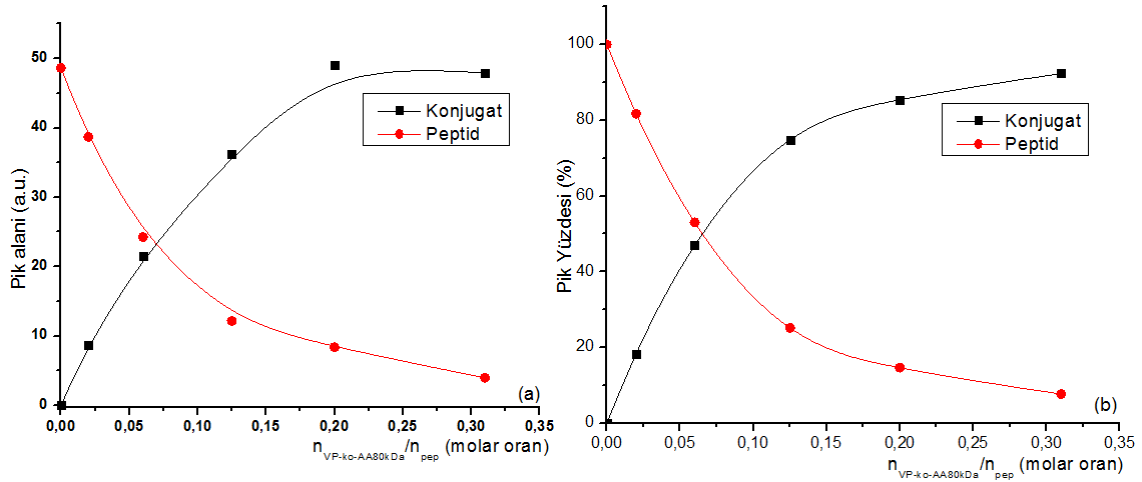
#### 6.4.2 [P(VP-ko-AA)] (1:3, 80.000 Da) Polimerinin Konjugatları

Bu grupta klasik konjugasyon yöntemi ile EDC varlığında  $n_{P(VP-ko-AA)80kDa}/n_{pep}=0,02, 0,06, 0,125, 0,2, 0,31$  olmak üzere 5 farklı oranda biyokonjugat sentezlendi. Bu biyokonjugatların tamamı GPC cihazında, Zetasizer cihazında ve Floresans spektrofotometre’de analiz edildi.

Peptidin sabit konsantrasyonuna karşı polimerin artan konsantrasyonunda yapılan deneylerde polimerin miktarının artması ile doğru orantılı olarak reaksiyona giren peptid miktarının da arttığı GPC pik alanı grafiğinden görülmektedir (Şekil 6.15).

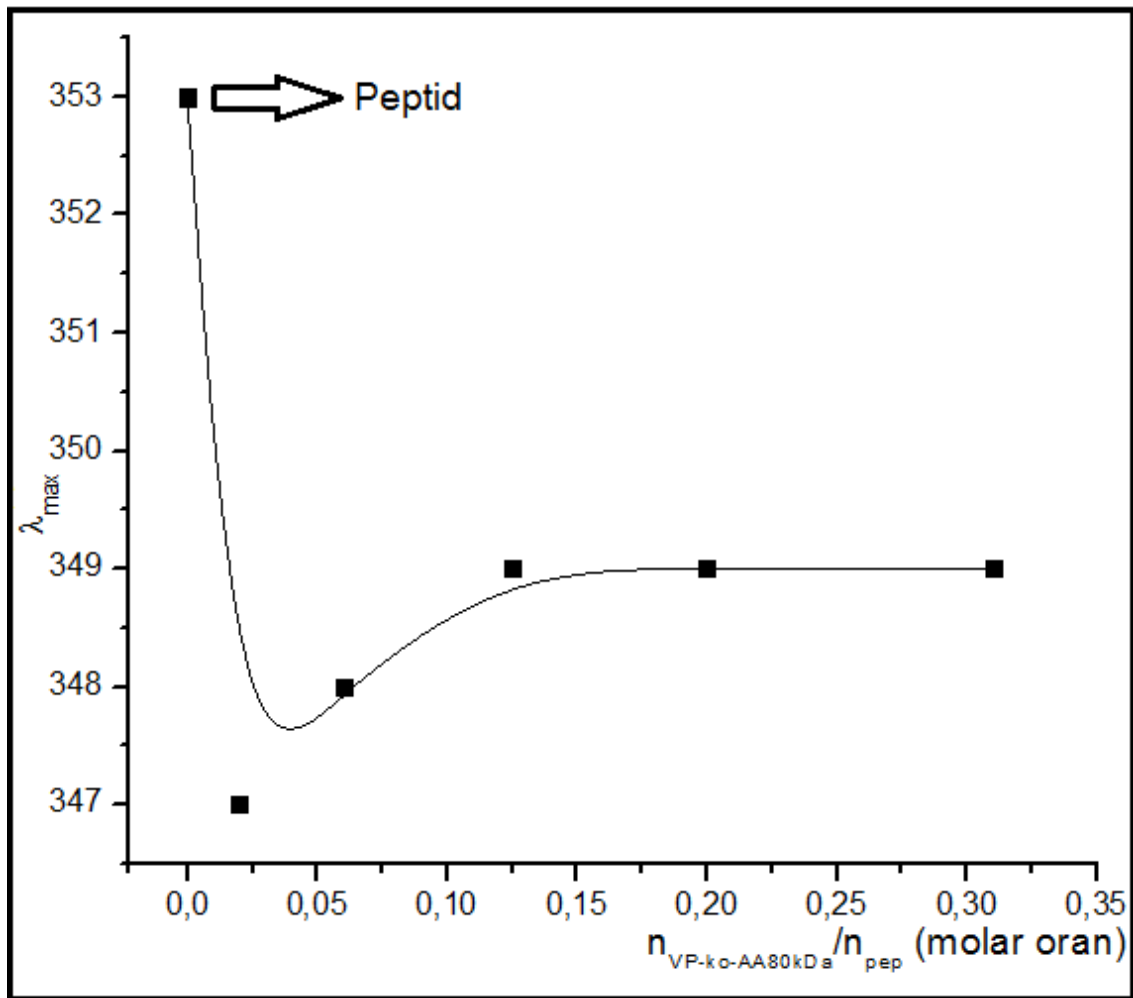
GPC kromatogramlarından yararlanılarak yapılan alan hesaplamalarında biyokonjugatın alanının polimerin artan miktarı ile beraber arttığı

serbest peptid pikinin ise ters orantılı olarak artan polimer miktarı bile beraber azaldığı gözlenmektedir. Ortamda hiç polimer yok iken 0,217 mg/ml olan peptidin  $n_{P(VP-ko-AA)80kDa}/n_{pep}=0,31$  oranında % 92,38’inin tükendiği (Şekil 6.12) gösterilmiştir.



Şekil 6. 15  $n_{P(VP-ko-AA)80kDa}/n_{pep}=0,02, 0,06, 0,125, 0,2, 0,31$  biyokonjugatlarına ve serbest peptide ait GPC kromatogramı pik alanlarının (a) ve pik yüzdelerinin (b) karşılaştırılması

Bu biyokonjugat grubuna ait Floresans Spektrofotometre analizlerinde elde edilen spektrumlardaki  $\lambda_{\text{maksimum}}$  değerleri karşılaştırıldığında biyokonjugasyon reaksiyonu ile beraber biyokonjugatların  $\lambda_{\text{maksimum}}$  değerinin serbest peptide (353 nm) göre daha düşük dalga boyuna kaydığı (Blue Shift) görülmektedir. Biyokonjugasyon reaksiyonu ile beraber peptidin P(VP-ko-AA)<sub>120kDa</sub> polimerine bağlandığı, polimer moleküllerinin peptidin etrafını çevrelemesi sonucunda; peptid zincirinin ucunda bulunan ve 353 nm'de max. emisyon yapan Triptofan aminoasidinin daha içeride ve daha hidrofobik bölgede kaldığı, sudan uzaklaştığı böylece max. emisyon dalga boyunun daha küçük dalga boyuna kaydığı (en fazla kayma  $n_{\text{P(VP-ko-AA)80kDa}}/n_{\text{pep}}=0,02$  oranı için  $\rightarrow \Delta\lambda_{\text{max}} 6 \text{ nm}$ ) saptanmıştır (şekil 6.16).

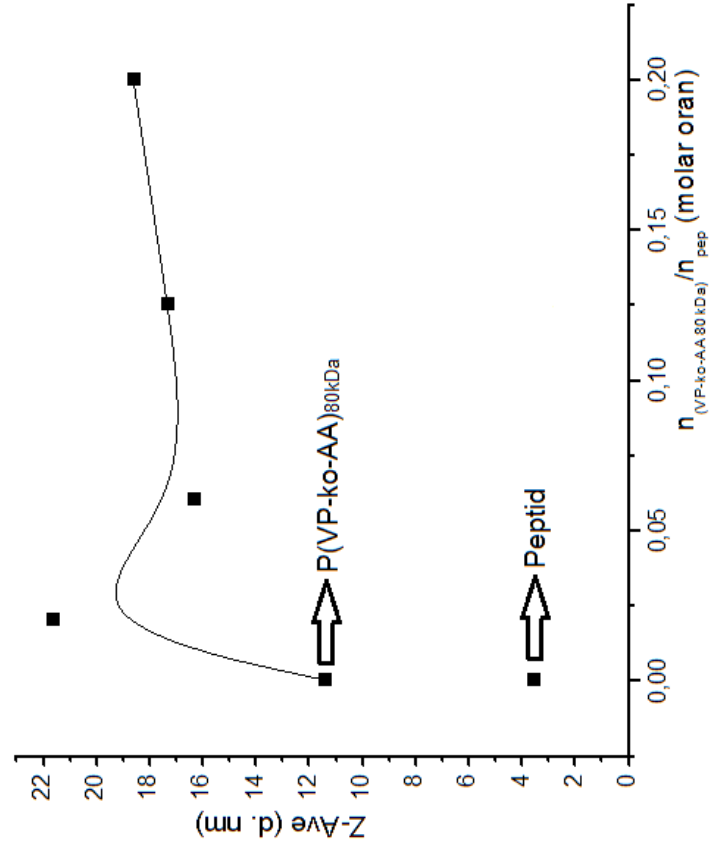
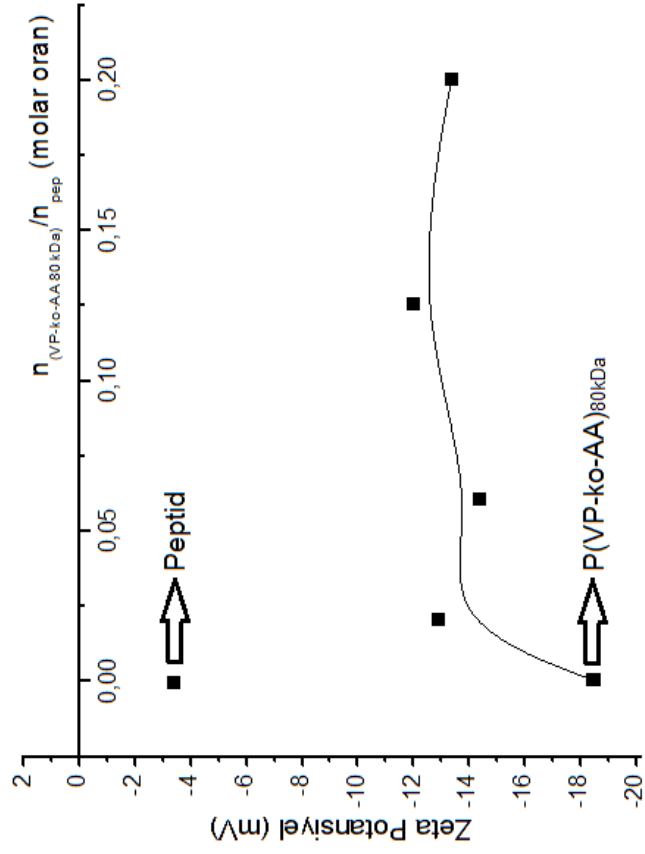


şekil 6. 16  $n_{\text{P(VP-ko-AA)80kDa}}/n_{\text{pep}}=0,02, 0,06, 0,125, 0,2, 0,31$  biyokonjugatlarına ve serbest peptide ait Floresans spektrumlarındaki  $\lambda_{\text{maksimum}}$  değerlerinin karşılaştırılması



Yine aynı gruba ait biyokonjugatların boyut dağılımları serbest peptid ve polimer ile karşılaştırıldığında 3,69 nm boyuta sahip olan peptidin 11,43 nm boyuttaki P(VP-*ko*-AA)<sub>120kDa</sub> polimeri ile biyokonjugasyonu sonucunda sentezlenen biyokonjugatların boyutlarının artan polimer miktarına bağlı olarak değiştiği ve 21,67 nm'ye kadar çıktığı görülmektedir (Şekil 6.17). Bu da konjugasyon işlemi ile beraber polimer ve peptid moleküllerinin birbirine bağlandığını ve bunun sonucunda molekül boyutunun arttığını göstermektedir.

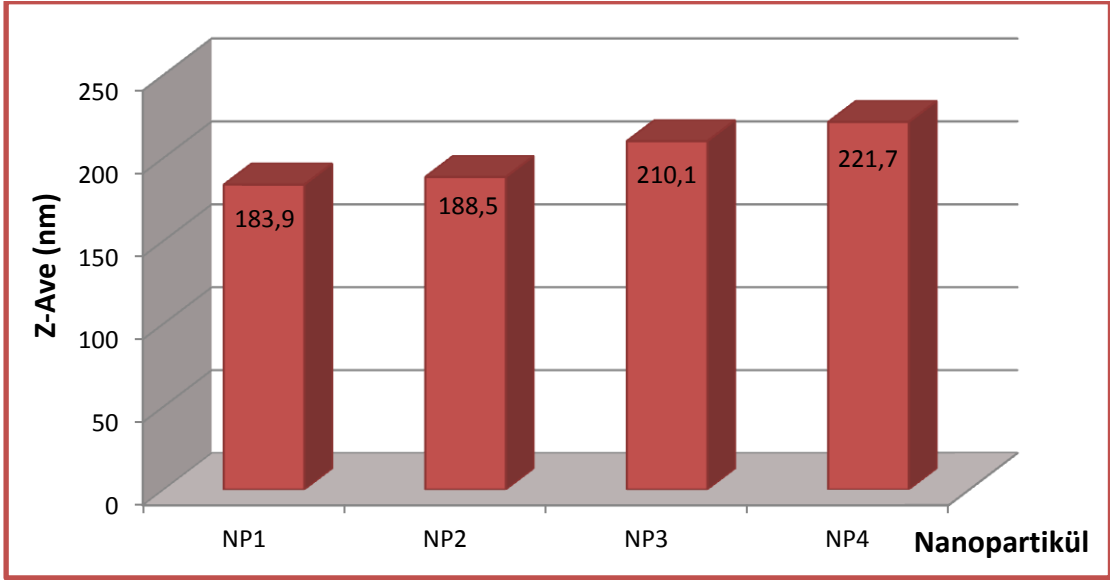
Biyokonjugatların zeta potansiyel değerleri peptidin (-3,4 mV) ve P(VP-*ko*-AA)<sub>120kDa</sub> polimerinin (-18,4 mV) zetapotansiyel değerleri ile karşılaştırıldığında, biyokonjugatların zeta potansiyel değerlerinin P(VP-*ko*-AA)<sub>120kDa</sub>'ya göre sıfıra daha yakın olduğu görülmektedir (Şekil 6.17). İki negatif yüke sahip molekülün karıştırılması sonucunda zeta potansiyel değerinin daha pozitive doğru gitmesi P(VP-*ko*-AA)<sub>120kDa</sub> üzerindeki negatif yüklü karboksil gruplarının (-COOH) peptid üzerindeki amino grupları ile (-NH<sub>2</sub>) bağlandığını göstermektedir. Amid bağı oluşumu sonucunda karboksil gruplarının nötürleşmesi sonucunda zetapotansiyel değerinin sıfıra yaklaşması biyokonjugasyon reaksiyonunun gerçekleştiğini kanıtlamaktadır.



Şekil 6. 17  $n_{P(VP-ko-AA)80kDa}/n_{pep}=0,02, 0,06, 0,125, 0,2$  biyokonjugatlarına, serbest peptide ve polimere ait Boyut ve Zeta Potansiyel değerlerinin karşılaştırılması

## 6.5 Poli(Laktik-ko-glikolik) Asid (PLGA) Nanopartiküllerine Ait Tartışma

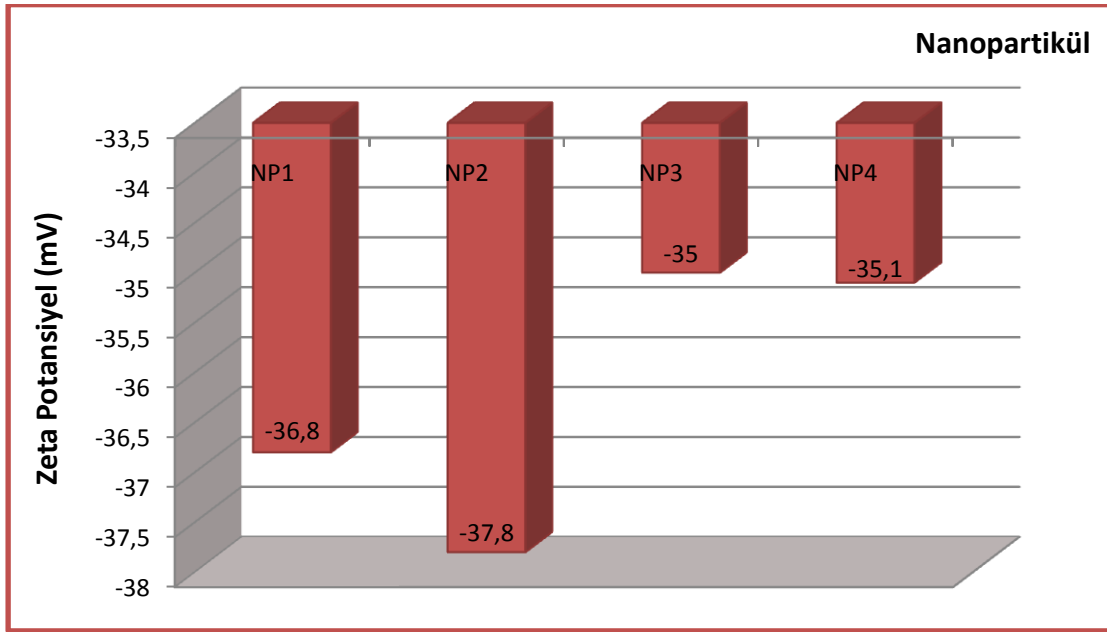
Su/yağ/su ikili emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan nanopartiküllere (NP1→Boş, NP2→FITC yüklü, NP3→Peptid yüklü, NP4→FITC+Peptid yüklü) ait Zetasizer cihazından elde edilen boyut değerleri incelendiğinde (Şekil 6.18) boş nanopartikülün boyut değerinin en düşük olduğu görüldü. Nanopartikül içerisine FITC boya yüklendiğinde ise boyutun 4,6 nm değerinde arttığı, peptid yüklü nanopartikülde ise bu değer 16,2 nm'ye ulaştığı gözlemlendi. NP 4 grubunda yani nanopartikül içerisine hem FITC boya hem de peptidin aynı anda yüklendiği durumda ise boyuttaki artışın 37,8 nm olduğu elde edilen Zetasizer sonuçlarından görüldü.



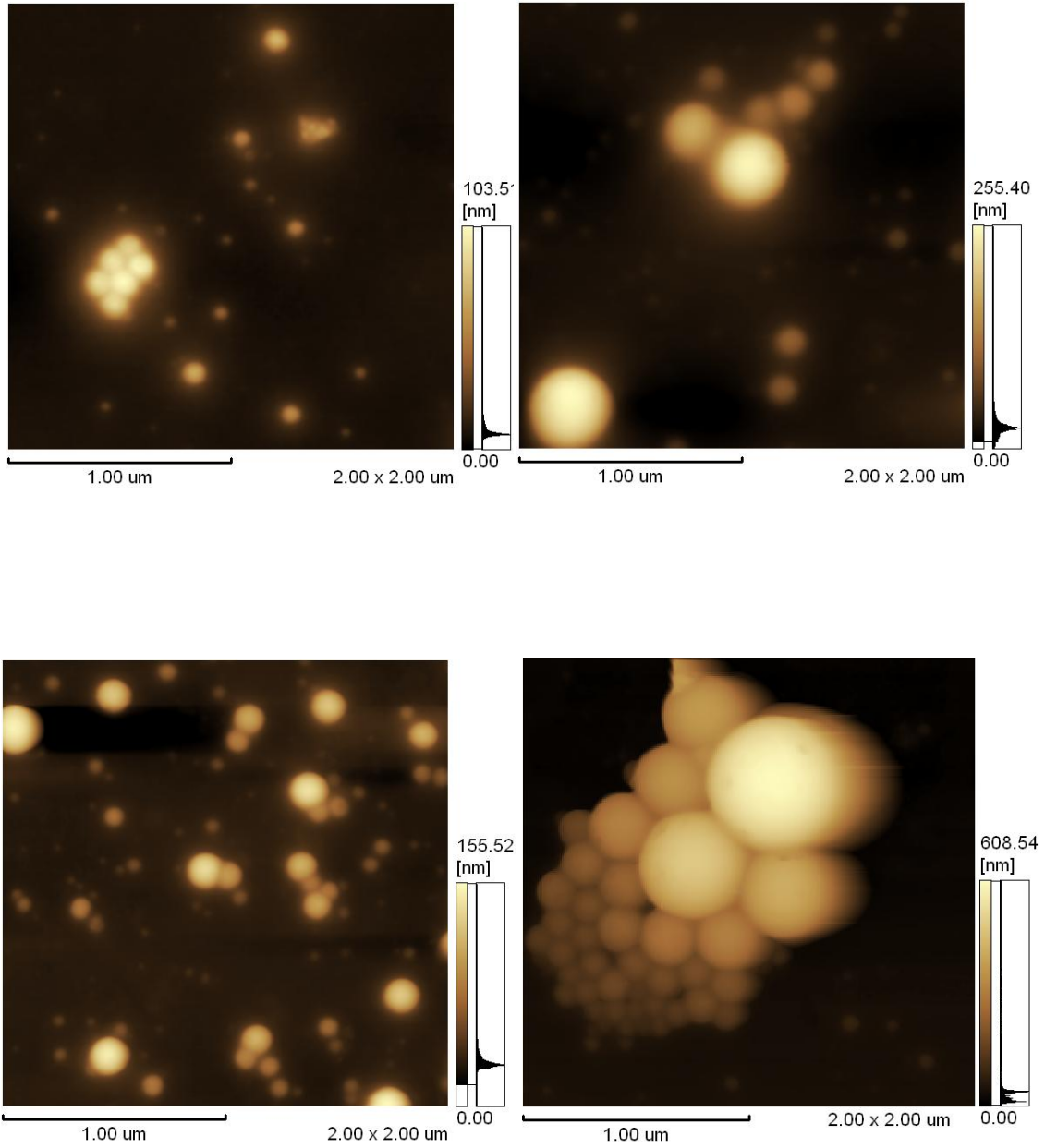
Şekil 6. 18 Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan (NP1→Boş, NP2→FITC yüklü, NP3→Peptid yüklü, NP4→FITC+Peptid yüklü) nanopartiküllere ait Z-Average değerlerinin karşılaştırılması

Stabilizatör olarak kullanılan PVA'nın nanopartikülün boyutuna, zetapotansiyeline ve yüzey özelliklerine etki ettiği Chung ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada gösterilmiştir [146]. Zeta potansiyel değeri nanopartiküllerin kararlılığı üzerinde etkisi olan çok önemli bir özelliktir. Çünkü PVA gibi stabilizatörler tarafından oluşturulan spesifik zetapotansiyel sonucu aynı yüklü partiküller birbirlerine itici olacağından bir araya toplanma ve agregat oluşturma eğilimleri azalacaktır. Üretilen nanopartiküllerin zetapotansiyel değerlerinin analizinden tüm partiküllerin -35,0 mV ile -37,8 mV arasında değişen değerlerde zetapotansiyele sahip olduğu

görüldü (Şekil 6.19). Bu negatif yük değerleri partiküllerin birbirleri ile bir araya gelerek agregat oluşturmasını minimize ettiği düşünülmektedir. Nanopartiküllerin AFM ve SEM görüntüleri de bunu desteklemektedir. Herbir nanopartikülün AFM görüntüsünde partiküllerin birbirlerinden ayrı olarak konumlandığı ve agregat oluşumunun meydana gelmediği görülmektedir (Şekil 6.20).

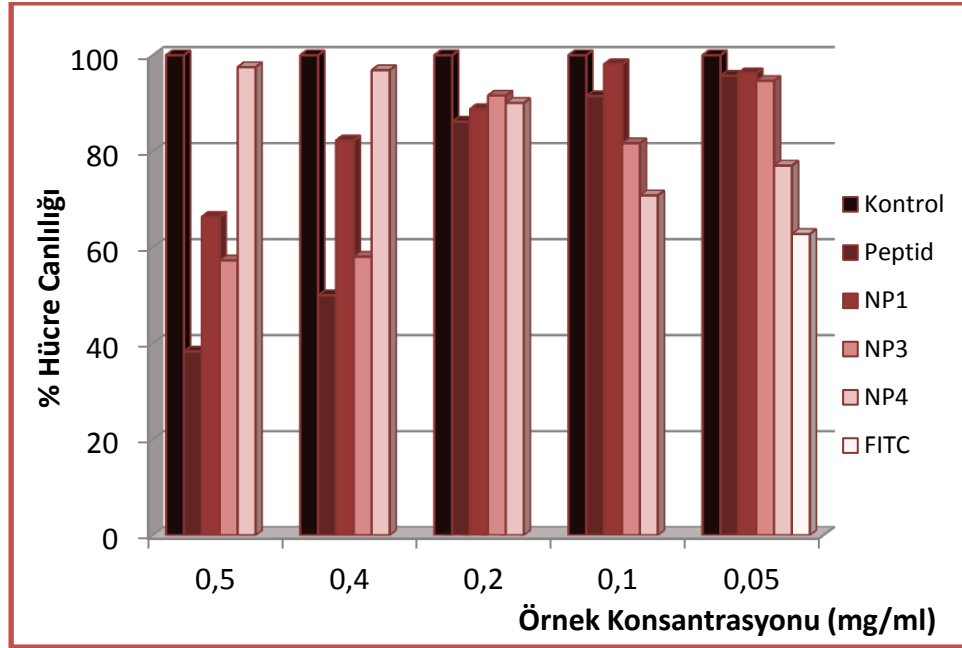


Şekil 6. 19 Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan (NP1 → Boş, NP2 → FITC yüklü, NP3 → Peptid yüklü, NP4 → FITC+Peptid yüklü) nanopartiküllere ait Zeta potansiyel değerlerinin karşılaştırılması



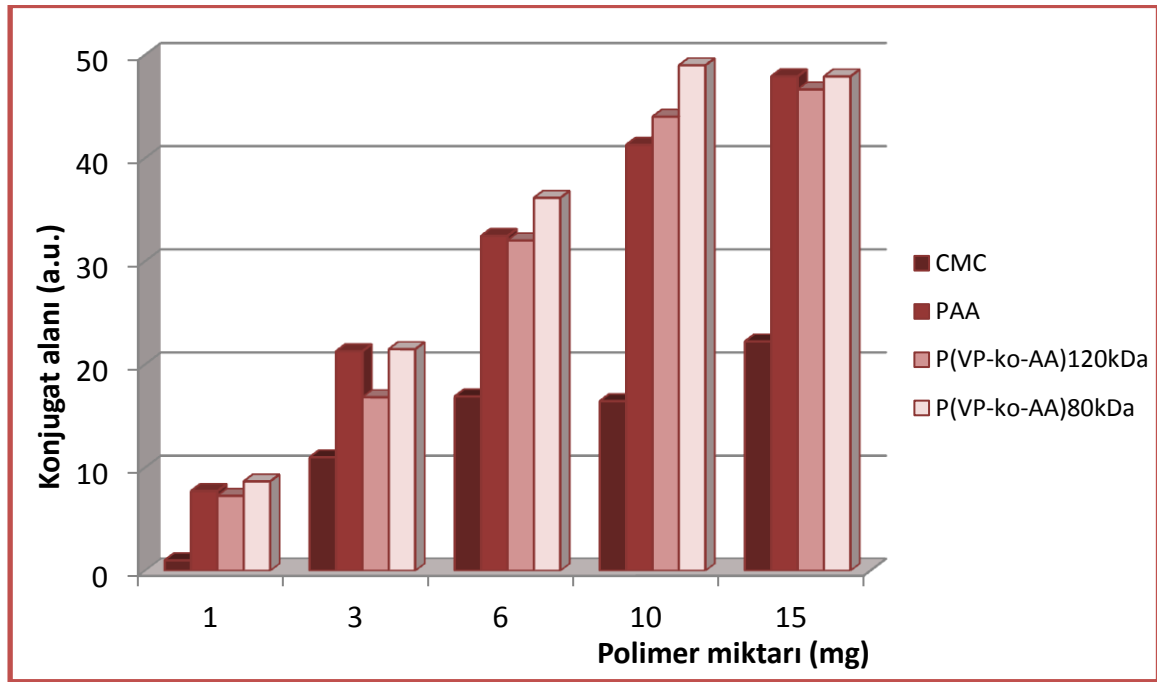
Şekil 6. 20 Su/yağ/su emülsiyon tekniği ile oluşturulan sırasıyla NP1 → Boş, NP2 → FITC yüklü, NP3 → Peptid yüklü, NP4 → FITC+Peptid yüklü nanopartiküllere ait 2D AFM görüntüsü (2x2  $\mu\text{m}^2$  lik alan)

FITC, peptid, boş nanopartikül (NP1), peptid yüklü nanopartikül (NP3) ve peptid+FITC yüklü nanopartikül (NP4) örneklerinin farklı konsantrasyonlarının L-929 fare fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini belirten % hücre canlılığı grafikleri her bir örneğin aynı konsantrasyonları için karşılaştırmalı olarak Şekil 6.21’de verildi. Yapılan sitotoksite deneylerinde W-1L19 sentetik peptidinin tek başına biyoyumluluğunun düşük olduğu, ancak nanopartikül içerisine peptidin hapsedilmesi ile biyoyumluluğunun arttığı saptandı.



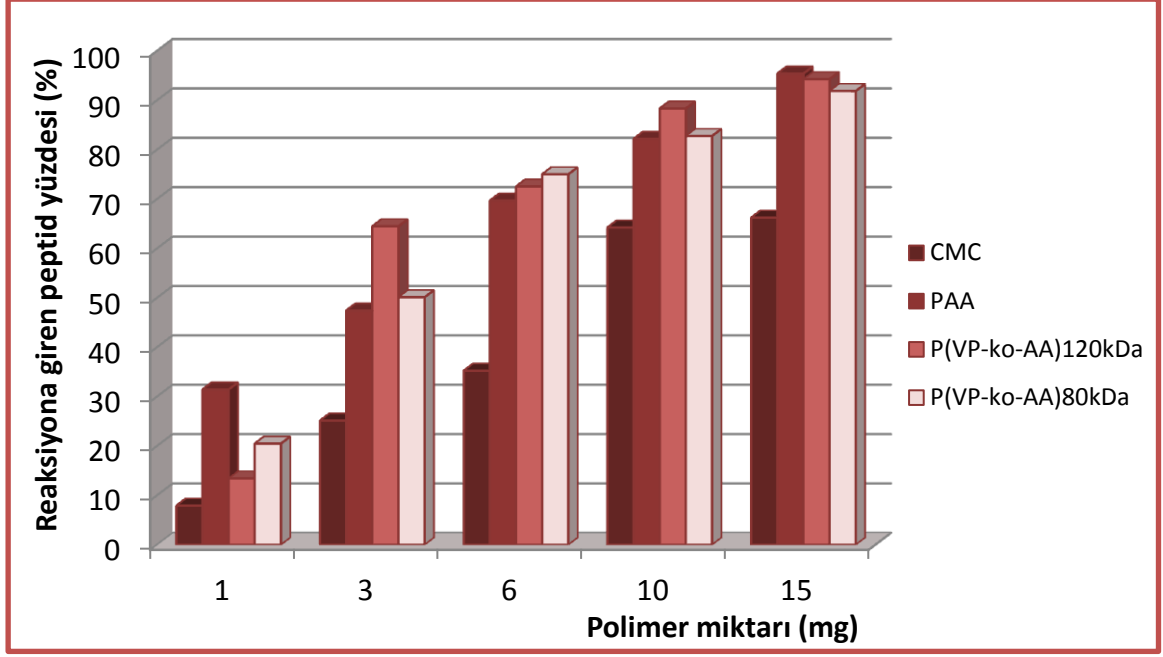
Şekil 6. 21 FITC, peptid, boş nanopartikül (NP1), peptid yüklü nanopartikül (NP3) ve peptid+FITC yüklü nanopartikül (NP4) örneklerinin farklı konsantrasyonlarının (0,5 mg/ml; 0,4 mg/ml; 0,2 mg/ml; 0,1 mg/ml; 0,05 mg/ml) fare fibroblast hücreleri (L-929) üzerine etkisi sonucu konsantrasyona bağlı karşılaştırmalı % canlılık grafiği

Son olarak sentezlenen biyokonjugatlarda kullanılan farklı polimerlerin aynı miktarlarının biyokonjugat oluşumu, reaksiyona giren peptid miktarı ve reaksiyon verimi üzerine etkileri incelendi. Şekil 6.22’de farklı polimerlerin aynı ağırlık miktarları kullanıldığında sentezlenen biyokonjugatlara ait GPC konjugat pik alanları karşılaştırmalı olarak verildi. Sentezlenen biyokonjugata ait en düşük alanın CMC polimerine ait olduğu görülmektedir. Diğer polimerlerde [PAA, P(VP-ko-AA)<sub>80kDa</sub>, P(VP-ko-AA)<sub>120kDa</sub>] ise farklı miktarlarda küçük değişimler görülmekle beraber konjugat alanlarının birbirlerine yakın olduğu gözlemlendi.



Şekil 6. 22 Farklı polimerlerin aynı miktarlarının sabit miktarda peptid ile reaksiyonu sonucu sentezlenen biyokonjugatların alan değerlerinin karşılaştırılması

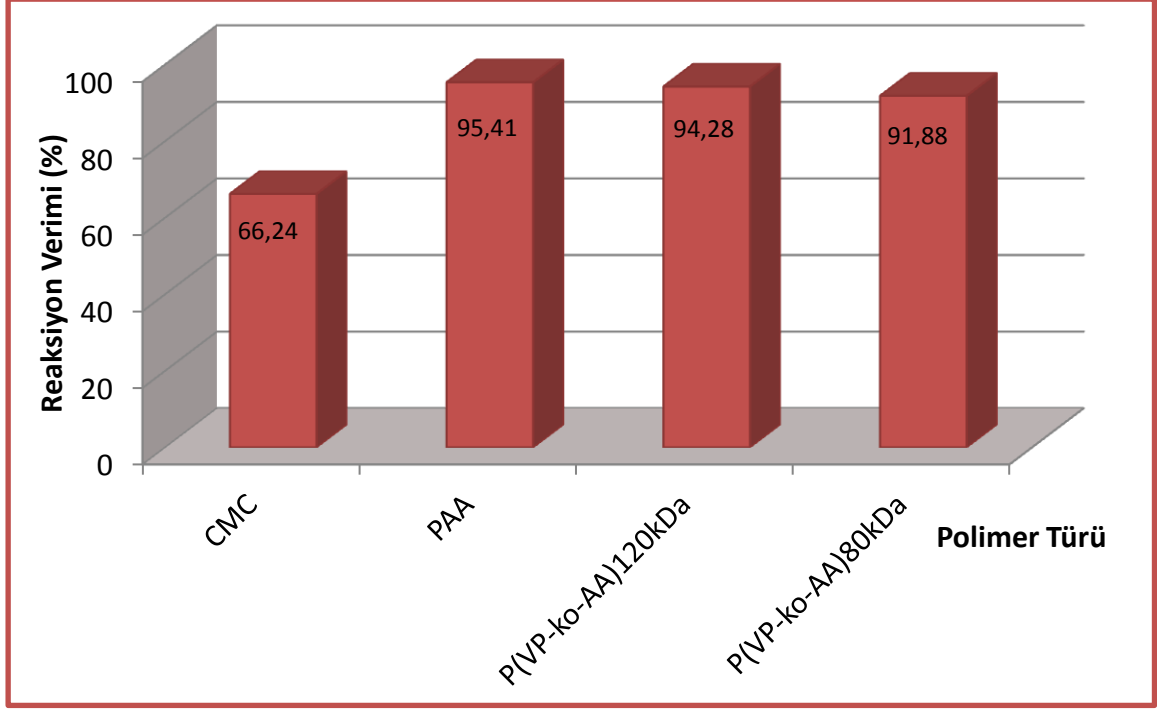
Şekil 6.23’te farklı polimerlerin aynı ağırlık miktarları kullanıldığında biyokonjugasyon reaksiyonu için reaksiyona giren peptid yüzdeleri (GPC kromatogramlarından elde edilen bilgiler) karşılaştırmalı olarak verildi. Sentezlenen biyokonjugatlar için reaksiyona giren en düşük peptid yüzdesi CMC polimerinin olduğu grupta görüldü. Polimerin düşük miktarlarında PAA ile daha fazla peptidin reaksiyona girdiği, polimer miktarının artması ile P(VP-ko-AA) polimeri için reaksiyona giren peptid miktarının keskin bir şekilde arttığı gözlemlendi.



Şekil 6. 23 Farklı polimerlerin aynı miktarlarının sabit miktarda peptid ile reaksiyonunda reaksiyona giren peptid miktarlarının karşılaştırılması

Şekil 6.24'te farklı polimerlerin aynı ağırlık miktarları kullanıldığında biyokonjugasyon reaksiyonu için reaksiyona verimleri (GPC kromatogramlarından elde edilen bilgiler) karşılaştırmalı olarak verildi. Sentezlenen biyokonjugatlar için reaksiyon verimi Şekil 6.22 ve Şekil 6.23'ten elde edilen sonuçları destekler şekilde elde edildi ve en düşük reaksiyon veriminin CMC polimeri ile sentezlenen biyokonjugatlarda, en yüksek reaksiyon veriminin ise PAA ile sentezlenen konjugatlarda olduğu saptandı.





Şekil 6. 24 Farklı polimerlerin aynı miktarlarının sabit miktarda peptid ile reaksiyonunda reaksiyon verimi yüzdelerinin karşılaştırılması

Bu tez kapsamında elde edilen bilgiler Canine Parvovirüsün oluşturduğu Kanlı İshal hastalığına karşı spesifik antikorların elde edilmesi, tanı kitlerinin ve biyosensörlerin oluşturulması ve sentetik aşılarda geliştirilmesi yönünde yapılacak çalışmalara ışık tutacak bir ön çalışmadır.

Ayrıca tez kapsamında üretilen nanopartiküller; ileriki çalışmalarda moleküllerin biyoyumluluğunun artırılması, antijenik peptidlerin kontrollü salımı ve buna dayalı biyoteknolojik aşılarda geliştirilmesi için ümit vadeden taşıyıcılardır.

## KAYNAKLAR

---

- [1] Langeveld, J.P., Casal, J.I., Osterhaus, A.D., Cortes, E., de Swart, R., Vela, C., Dalsgaard, K., Puijk, W.C., Schaaper, W.M., ve Meloen, R.H., (1994). "First peptide vaccine providing protection against viral infection in the target animal: studies of canine parvovirus in dogs", *Journal of Virology*, 68:4506-4513.
- [2] Langeveld, J.P., Kamstrup, S., Uttenthal, A., Strandbygaard, B., Vela, C., Dalsgaard, K., Beekman, N.J., Meloen, R.H., ve Casal, J.I., (1995). "Full protection in mink against mink enteritis virus with new generation canine parvovirus vaccines based on synthetic peptide or recombinant protein", *Vaccine*, 13:1033-1037.
- [3] Casal, J.I., Langeveld, J.P., Cortes, E., Schaaper, W.W., van Dijk, E., Vela, C., Kamstrup, S., ve Meloen, R.H., (1995). "Peptide vaccine against canine parvovirus: identification of two neutralization subsites in the N terminus of VP2 and optimization of the amino acid sequence", *Journal of Virology*, 69: 7274-7277.
- [4] Nicholas, B.L., Brennan, F.R., Martinez-Torrecuadrada, J.L., Casal, J.I., Hamilton, W.D., ve Wakelin, D., (2002). "Characterization of the immune response to canine parvovirus induced by vaccination with chimaeric plant viruses *Journal of Virology*, *Vaccine*, 20: 2727-2734.
- [5] Scranton, A., Rangarajan, B., ve Klier, J., (1995). "Biomedical applications of polyelectrolytes", *Advances in Polymer Science*, 122:1-54
- [6] Dilgimen, A.S., Mustafaeva, Z., Demchenko, M., Kaneko, T., Osada, Y., ve Mustafaev, M., (2001). "Water-soluble covalent conjugates of bovine serum albumin with anionic poly(N-isopropyl-acrylamide) and their immunogenicity", *Biomaterials*, 22: 2383-2392.
- [7] Kızılbey, K.A., (2012). *Melanoma Hastalığını Oluşturan Sentetik Peptidlerin Poliakrilikasit Ve Kopolimerleri İle Konjugasyonu*, Doktora Tezi, YTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [8] Decaro, N., ve Buonavoglia, C., (2011). "Canine parvovirus—a review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c", *Veterinary Microbiology*.
- [9] Binn, L.N., Lazar, E.C., Eddy, G.A., ve Kajima, M., (1970). "Recovery and characterization of a minute virus of canines", *Infection Immunity*, 1: 503-508.

- [10] SmithCarr, S., Macintire, D.K., ve Swango, L.J., (1997). "Canine parvovirus .1. Pathogenesis and vaccination", Compendium on continuing education for the practic 19: 125
- [11] Pollock, R.V.H., (1984). "The Parvoviruses .2. Canine Parvovirus", Compendium on continuing education for the practic, 6: 653-665.
- [12] Baştan, İ., (2011). Parvovirus Enfeksiyonlu Köpeklerde Yaşama Şansını Etkileyen Parametrelerin Araştırılması, Doktora Tezi, Ankara üniversitesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara.
- [13] Baker Institute: Animal Health: Canine Parvovirus, <http://bakerinstitute.vet.cornell.edu/animalhealth/page.php?id=1089>, 18 Ağustos 2012.
- [14] Parrish, C.R., Have, P., Foreyt, W.J., Evermann, J.F., Senda, M., ve Carmichael, L.E., (1988). "The global spread and replacement of canine parvovirus strains" Journal of General Virology, 69:( Pt 5), 1111-1116.
- [15] Davies, M., (2008). "Canine parvovirus strains identified from clinically ill dogs in the United Kingdom", Veterinary Record, 163: 543-545.
- [16] Hoelzer, K., ve Parrish, C.R., (2010). "The emergence of parvoviruses of carnivores", Veterinary Record, 41: 39.
- [17] Goddard, A., ve Leisewitz, A.L., (2010). "Canine Parvovirus" Veterinary Clinics of North Small Animal Practice, 40: 1041.
- [18] Siegl, G., Bates, R., Berns, K., Carter, B., Kelly, D., Kurstak, E., ve Tattersall, P., (1985). "Characteristics and taxonomy of Parvoviridae", Intervirology, 23: 61.
- [19] Kaufmann, B., Simpson, A.A., ve Rossmann, M.G., (2004). "The structure of human parvovirus B19", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101: 11628.
- [20] Langeveld, J., Casal, J., Vela, C., Dalsgaard, K., Smale, S., Puijk, W., ve Meloen, R.,(1993). "B-cell epitopes of canine parvovirus: distribution on the primary structure and exposure on the viral surface", Journal of virology 67: 765-772.
- [21] Langeveld, J.P.M., Martinez-Torrecedrada, J., Boshuizen, R.S., Meloen, R.H., ve Ignacio Casal, J., (2001). "Characterisation of a protective linear B cell epitope against feline parvoviruses", Vaccine 19: 2352-2360.
- [22] Martyn, J.C., Davidson, B.E., ve Studdert, M.J., (1990). "Nucleotide sequence of feline panleukopenia virus: comparison with canine parvovirus identifies host-specific differences", Journal of general virology, 71: 2747-2753.
- [23] Parrish, C.R., Aquadro, C.F., ve Carmichael, L.E., (1988). "Canine host range and a specific epitope map along with variant sequences in the capsid protein gene of canine parvovirus and related feline, mink, and raccoon parvoviruses", Virology 166: 293-307.
- [24] Reed, A.P., Jones, E.V., ve Miller, T.J., (1988). " Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus", Journal of virology, 62: 266-276.

- [25] Rhode, S., (1985). "Nucleotide sequence of the coat protein gene of canine parvovirus", *Journal of virology*, 54: 630-633.
- [26] Cotmore, S.F., ve Tattersall, P., (1987). "The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates", *Advances in virus research*, 33: 91-174.
- [27] Tsao, J., Chapman, M.S., Agbandje, M., Keller, W., Smith, K., Wu, H., Luo, M., Smith, T.J., Rossmann, M.G., ve Compans, R.W., (1991). "The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications", *Science*, 251: 1456-1464.
- [28] Gilbert, L., Toivola, J., Vålilehto, O., Saloniemi, T., Cunningham, C., White, D., Mäkelä, A., Korhonen, E., Vuento, M., ve Oker-Blom, C., (2006). "Truncated forms of viral VP2 proteins fused to EGFP assemble into fluorescent parvovirus-like particles", *Journal of nanobiotechnology*, 4: 13.
- [29] Agbandje, M., McKenna, R., Rossmann, M.G., Strassheim, M.L., ve Parrish, C.R., (1993). "Structure determination of feline panleukopenia virus empty particles", *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 16: 155-171.
- [30] Wu, H., ve Rossmann, M.G., (1993). "The canine parvovirus empty capsid structure", *Journal of molecular biology*, 233: 231-244.
- [31] Agbandje-McKenna, M., Llamas-Saiz, A.L., Wang, F., Tattersall, P., ve Rossmann, M.G., (1998). "Functional implications of the structure of the murine parvovirus, minute virus of mice", *Structure*, 6: 1369-1381.
- [32] Llamas-Saiz, A., Agbandje-McKenna, M., Wikoff, W., Bratton, J., Tattersall, P., ve Rossmann, M., (1997). "Structure determination of minute virus of mice", *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 53: 93-102.
- [33] Simpson, A.A., Hébert, B.I., Sullivan, G.M., Parrish, C.R., Zádori, Z., Tijssen, P., ve Rossmann, M.G., (2002). "The structure of porcine parvovirus: comparison with related viruses<sup>1</sup>", *Journal of molecular biology*, 315: 1189-1198.
- [34] Rueda, P., Fominaya, J., Langeveld, J.P.M., Brusckhe, C., Vela, C., ve Casal, J.I., (2000). "Effect of different baculovirus inactivation procedures on the integrity and immunogenicity of porcine parvovirus-like particles", *Vaccine*, 19: 726-734.
- [35] Chapman, M.S., ve Rossmann, M.G., (1993). "Structure, sequence, and function correlations among parvoviruses", *Virology*, 194: 491-508.
- [36] López, T.J.A., Cortés, E., Ranz, A., García, J., Sanz, A., Vela, C., ve Casal, J.I., (1991). "Fine mapping of canine parvovirus B cell epitopes", *The Journal of general virology*, 72: 2445.
- [37] The Big Picture Book of Viruses-Parvovirusus, [http://www.virology.net/Big\\_Virology/BVDNAparvo.html](http://www.virology.net/Big_Virology/BVDNAparvo.html), 20 Ağustos, 2012.
- [38] RCSB Protein Data Bank, RCSB PDB, [http://www.rcsb.org/pdb/education\\_discussion/molecule\\_of\\_the\\_month/download/Parvoviruses.pdf](http://www.rcsb.org/pdb/education_discussion/molecule_of_the_month/download/Parvoviruses.pdf), 10 Haziran 2011.
- [39] Rice, J.B., Winters, K.A., Krakowka, S., ve Olsen, R.G., (1982). "Comparison of Systemic and Local Immunity in Dogs with Canine Parvovirus Gastroenteritis", *Infection Immunity*, 38: 1003-1009.

- [40] Pollock, R.V.H., ve Coyne, M.J., (1993). "Canine Parvovirus", *Veterinary Clinics North of Small Animals*, 23: 555-568.
- [41] Prittie, J., (2004). "Canine parvoviral enteritis: a review of diagnosis, management, and prevention", *Journal of Veterinary Emergency Critical Care*, 14:, 167-176.
- [42] Schoeman, J.P., Goddard, A., ve Herrtage, M.E., (2007). "Serum cortisol and thyroxine concentrations as predictors of death in critically ill puppies with parvoviral diarrhea", *Journal of American Veterinary Medical Association*, 231: 1534-1539.
- [43] Manteufel, J., ve Truyen, U., (2008). "Animal bocaviruses: a brief review", *Intervirology*, 51: 328-334.
- [44] Arda, M., (1985). Genel Mikrobiyoloji. AÜ Veteriner Fakültesi Yayınları, Ankara.
- [45] Akan, E., (1992). Genel Mikrobiyoloji ve İmmünoloji. Güney Matbaası, Adana.
- [46] Bilgehan, H., (1993). Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi, (İzmir: Barış Yayınları, Fakülteler Kitapevi).
- [47] Langeveld, J.P.M., Ignacio Casal, J., Cortés, E., van de Wetering, G., Boshuizen, R.S., Schaaper, W.M.M., Dalsgaard, K., ve Meloen, R.H., (1994). "Effective induction of neutralizing antibodies with the amino terminus of VP2 of canine parvovirus as a synthetic peptide", *Vaccine*, 12: 1473-1480.
- [48] Deturiso, J.A.L., Cortes, E., Martinez, C., Deybanez, R.R., Simarro, I., Vela, C., ve Casal, I., (1992). "Recombinant Vaccine for Canine Parvovirus in Dogs", *Journal of Virology*, 66:2748-2753.
- [49] Deliloglu, İ., Akdeste, M.M., Akdetse, Z.M., Aynagöz, G., Unver, G., Unal, N., ve Celik, N., (2002). "Preparation of synthetic peptide FMDV vaccine with newly developed antigen-polymere conjugates be used as immunogen and vaccine in veterinary medicine", In In FAO, UN2002, 41:349-357.
- [50] Acar, S., (2006). Peptid Protein Kovalent Konjugasyonu, Yüksek Lisans Tezi, YTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [51] Mustafaev, M., Mustafaeva, Z., Ergen, E., Uraki, Y., ve Sano, Y., (2002). "Novel betulin-containing polyelectrolyte Conjugates. Journal of bioactive and compatible polymers", 17: 251-269.
- [52] Mustafaev, M.I. (1996). Biyopolimerler, Kocaeli: TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi (MAM) Matbaası.
- [53] Mustafaev, M. (2004). Functionally Biopolymer Systems. *Sigma Journal of Engineering and Natural Science* 4, 1-201.
- [54] Kabanov, V.A., (2004). "From synthetic polyelectrolytes to polymer-subunit vaccines", *Pure and applied chemistry*, 76: 1659-1678.
- [55] Mansuroğlu, B., ve Mustafaeva, Z., (2011). "Characterization of water-soluble conjugates of polyacrylic acid and antigenic peptide of FMDV by size exclusion chromatography with quadruple detection", *Materials Science and Engineering: C*.
- [56] Bajpai, J., Mishra, S., ve Bajpai, A.K., (2007). "Dynamics of controlled release of potassium nitrate from a highly swelling binary polymeric blend of alginate and carboxymethyl cellulose", *Journal of Applied Polymer Science*, 106: 961-972.

- [57] Miyamoto, T., Takahashi, S., Ito, H., Inagaki, H., ve Noishiki, Y., (1989). "Tissue Biocompatibility of Cellulose and Its Derivatives", *Journal of Biomedical Material Research*, 23: 125-133.
- [58] Barbucci, R., Leone, G., ve Vecchiullo, A., (2004). "Novel carboxymethylcellulose-based microporous hydrogels suitable for drug delivery", *Journal of Biomaterial Science Polymer Engineering*, 15: 607-619.
- [59] Pal, K., Banthia, A.K., ve Majumdar, D.K., (2006). "Development of carboxymethyl cellulose acrylate for various biomedical applications", *Biomedical Material*, 1: 85-91.
- [60] Rodriguez, R., Alvarez-Lorenzo, C., ve Concheiro, A., (2003). "Cationic cellulose hydrogels: kinetics of the cross-linking process and characterization as pH-/ion-sensitive drug delivery systems", *Journal of Controlled Release*, 86:253-265.
- [61] Tas, C., Ozkan, Y., Savaser, A., ve Baykara, T., (2003). "In vitro release studies of chlorpheniramine maleate from gels prepared by different cellulose derivatives", *Farmaco*, 58: 605-611.
- [62] Ito, T., Yeo, Y., Highley, C.B., Bellas, E., Benitez, C.A., ve Kohane, D.S., (2007). "The prevention of peritoneal adhesions by in situ cross-linking hydrogels of hyaluronic acid and cellulose derivatives", *Biomaterials*, 28: 975-983.
- [63] Leach, R.E., Burns, J.W., Dawe, E.J., SmithBarbour, M.D., ve Diamond, M.P., (1998). "Reduction of postsurgical adhesion formation in the rabbit uterine horn model with use of hyaluronate/carboxymethylcellulose gel", *Fertility and Sterility*, 69: 415-418.
- [64] Lee, J.H., Nho, Y.C., Lim, Y.M., ve Son, T.I., (2005). "Prevention of surgical adhesions with barriers of carboxymethylcellulose and poly(ethylene glycol) hydrogels synthesized by irradiation", *Journal Applied Polymer Science*, 96: 1138-1145.
- [65] Liu, L.S., ve Berg, R.A., (2002). "Adhesion barriers of carboxymethylcellulose and polyethylene oxide composite gels", *Journal of Biomedical Material Research*, 63:326-332.
- [66] Tate, M.C., Shear, D.A., Hoffman, S.W., Stein, D.G., ve LaPlaca, M.C., (2001). "Biocompatibility of methylcellulose-based constructs designed for intracerebral gelation following experimental traumatic brain injury", *Biomaterials*, 22: 1113-1123.
- [67] Reeves, R., Ribeiro, A., Lombardo, L., Boyer, R., ve Leach, J.B., (2010). "Synthesis and Characterization of Carboxymethylcellulose-Methacrylate Hydrogel Cell Scaffolds", *Polymers*, 2: 252-264.
- [68] Bajpai, A.K., ve Mishra, A., (2005). "Preparation and characterization of tetracycline-loaded interpenetrating polymer networks of carboxymethyl cellulose and poly(acrylic acid): water sorption and drug release study", *Polymer International*, 54: 1347-1356.
- [69] Bajpai, A.K., ve Mishra, A., (2008). "Carboxymethyl cellulose (CMC) based semi-IPNs as carriers for controlled release of ciprofloxacin: an in-vitro dynamic study", *Journal of Material Science-Mater Medicine*, 19:2121-2130.
- [70] Rafikov, R., Sakhilov, A., Akhmedzhanov, R., ve Aliev, K.U., (1986). "Pharmacokinetics of copolymers of n-vinylpyrrolidone with acrylic acid", *Article 1. Pharmaceutical Chemistry Journal*, 20: 157-159.

- [71] Mansuroğlu, B., Kızılbey, K., Derman, S., ve Mustafaeva, Z., (2011). "Protein-Polielektrolit Kompleks ve Konjugatlarının Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Yöntemi ile İncelenmesi", *Türk Biyokimya Dergisi*, 36:21.
- [72] Khalikov, S.K., Ismailov, M., Shakhmatov, A., Nekrasov, A., Borisova, V., ve Éivazova, É., (1990). "Preparation of conjugates of peptides imitating part of the antigen-determinant section of protein VP1 of foot-and-mouth disease virus A 12 with various supports", *Chemistry of Natural Compounds*, 26:436-440.
- [73] Bol'shakov, A., ve Kiryukhin, D., (2006). "Low-temperature radiation-initiated copolymerization of N-vinylpyrrolidone with acrylic acid in glass-forming ethanol or dimethylformamide solutions", *Russian journal of applied chemistry*, 79: 293-296.
- [74] Deliloglu Gürhan S.I, Mustafaeva Akdeste Z., G. Aynagöz, G. Unver,, ve N. Unal, N.C., (2002). "Peparation of synthetic peptide FMD vaccine with newly developed antigen-polymer conjugates be used as immonogen and vaccine in veterinary medicine", 349-357.
- [75] Mustafaev, M., ve Norimov, A.S., (1990). "Polymer-metal complexes of protein antigens--new highly effective immunogens", *Biomedical science*, 1: 274.
- [76] Brigger, I., Dubernet, C., ve Couvreur, P., (2002). "Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis", *Advance Drug Delivery Review*, 54: 631-651.
- [77] Panyam, J., ve Labhassetwar, V., (2003). "Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue", *Advance Drug Delivery Review*, 55: 329-347.
- [78] Lamprecht, A., Ubrich, N., Yamamoto, H., Schafer, U., Takeuchi, H., Maincent, P., Kawashima, Y., ve Lehr, C.M., (2001). "Biodegradable nanoparticles for targeted drug delivery in treatment of inflammatory bowel disease", *Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics*, 299:775-781.
- [79] Öztürk, K., (2010). Serbest Radikal Temizleyici Madde İçeren Nanopartiküler Taşıyıcı Sistemlerin Tasarımı Ve Değerlendirilmesi, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [80] Couvreur, P., ve Puisieux, F., (1993). "Nano-and microparticles for the delivery of polypeptides and proteins", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 10:141-162.
- [81] Singh, M., Chakrapani, A., ve OHagan, D., (2007). "Nanoparticles and microparticles as vaccine-delivery systems", *Expert Review of Vaccines*, 6:797-808.
- [82] Anderson, J.M., ve Shive, M.S., (1997). "Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 28: 5-24.
- [83] Şimşek, S., (2007). Büyüme Hormonu (Somatotropin) İçeren Biyolojik Olarak Parçalanabilen Mikrokürelerin Hazırlanması, Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı, İstanbul.
- [84] Özcan, İ., (2008). Kemiğe Hedeflemek İçin Sentezlenen Biyolojik Parçalanabilen Polimerler Kullanılarak Hazırlanan Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Tasarımı Ve In Vitro – In Vivo Değerlendirilmesi, Ege Üniversitesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, İzmir.

- [85] Kutlu, C., (2008). Beyin Tümörlerinin Tedavisi için Çift Etkili Doku İskelesi - Nanopartikül Sistemlerinin Geliştirilmesi, Hacettepe Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [86] Çırpanlı, Y., (2009). Kamptotesin İçeren Polimerik Ve Oligosakkarit Bazlı Nanopartiküler Formülasyonların Geliştirilmesi Ve İn Vitro-İn Vivo Değerlendirilmesi, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Farmasötik Teknoloji Programı, Ankara.
- [87] Kreuter, J., (2004). "Influence of the surface properties on nanoparticle-mediated transport of drugs to the brain", *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 4:484-488.
- [88] Govender, T., Riley, T., Ehtezazi, T., Garnett, M.C., Stolnik, S., Illum, L., ve Davis, S.S., (2000). "Defining the drug incorporation properties of PLA-PEG nanoparticles". *International Journal of Pharmaceutics*, 199:95-110.
- [89] Chen, Y., Mohanraj, V.J., ve Parkin, J.E., (2003). "Chitosan-dextran sulfate nanoparticles for delivery of an anti-angiogenesis peptide", *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 10:621-629.
- [90] Panyam, J., Williams, D., Dash, A., Leslie-Pelecky, D., ve Labhasetwar, V., (2004). "Solid-state solubility influences encapsulation and release of hydrophobic drugs from PLGA/PLA nanoparticles", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93:1804-1814.
- [91] Akagi, T., Baba, M., ve Akashi, M., (2011). "Biodegradable Nanoparticles as Vaccine Adjuvants and Delivery Systems: Regulation of Immune Responses by Nanoparticle-Based Vaccine", *Advances in Polymer Science*, 247:31-64,
- [92] Kumar, M., (2000). "Nano and microparticles as controlled drug delivery devices", *Journal of Pharmacy & Pharmacology*, 3:234-258.
- [93] Couvreur, P., Kante, B., Grislain, L., Roland, M., ve Speiser, P., (1982). "Toxicity of polyalkylcyanoacrylate nanoparticles II: Doxorubicin-loaded nanoparticles", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 71:790-792.
- [94] Beck, P., Kreuter, J., Reszka, R., ve Fichtner, I., (1993). "Influence of polybutylcyanoacrylate nanoparticles and liposomes on the efficacy and toxicity of the anticancer drug mitoxantrone in murine tumour models", *Journal of microencapsulation*, 10:101-114.
- [95] Conway, M.A., Madrigal-Estebas, L., McClean, S., Brayden, D.J., ve Mills, K.H.G., (2001). "Protection against Bordetella pertussis infection following parenteral or oral immunization with antigens entrapped in biodegradable particles: effect of formulation and route of immunization on induction of Th1 and Th2 cells". *Vaccine* 19:1940-1950.
- [96] Desai, M.P., Labhasetwar, V., Walter, E., Levy, R.J., ve Amidon, G.L., (1997). "The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent", *Pharmaceutical Research*, 14:1568-1573.
- [97] Kumari, A., Yadav, S.K., ve Yadav, S.C., (2010). "Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75:1-18.



- [98] Thomas, M., ve Klivanov, A.M., (2003). "Conjugation to gold nanoparticles enhances polyethylenimine's transfer of plasmid DNA into mammalian cells", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100:9138-9143.
- [99] Desai, M.P., Labhasetwar, V., Amidon, G.L., ve Levy, R.J., (1996). "Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size", *Pharmaceutical Research*, 13:1838-1845.
- [100] Panyam, J., Sahoo, S.K., Prabha, S., Bargar, T., ve Labhasetwar, V., (2003). "Fluorescence and electron microscopy probes for cellular and tissue uptake of poly (d, l-lactide- co-glycolide) nanoparticles", *International Journal of Pharmaceutics*, 262: 1-11.
- [101] Soppimath, K.S., Aminabhavi, T.M., Kulkarni, A.R., ve Rudzinski, W.E., (2001). "Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices", *Journal of Controlled Release*, 70:1-20.
- [102] Bozkir, A., ve Saka, O.M., (2005). "Formulation and investigation of 5-FU nanoparticles with factorial design-based studies" *Il Farmaco* 60:840-846.
- [103] Calvo, P., Remuñan-López, C., Vila-Jato, J.L., ve Alonso, M.J., (1997). "Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines", *Pharmaceutical Research*, 14:1431-1436.
- [104] Alonso, M.J., (1996). "Nanoparticulate Drug Carrier Technology", *Drugs and The Pharmaceutical Sciences*, 77:203-242.
- [105] Kaş, H., (2002). İlaç taşıyıcı partiküler sistemler:Kontrollü Salım Sistemleri, Ed's: Gürsoy A, 82-88.
- [106] Mohanraj, V., ve Chen, Y., (2007). "Nanoparticles-a review", *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5:561-573.
- [107] Şengel-Türk, C.T., Haşçıçek, C., ve Gönül, N., (2007). "Nanoparticulate Drug Delivery Systems For Targeting The Drugs To The Brain", *Journal of Neurological Sciences*, 24: 254-263.
- [108] Lemoine, D., Francois, C., Kedzierewicz, F., Preat, V., Hoffman, M., ve Maincent, P., (1996). "Stability study of nanoparticles of poly ( $\epsilon$ -caprolactone), poly (d, l-lactide) and poly (d, l-lactide-co-glycolide)", *Biomaterials*, 17:2191-2197.
- [109] Jiang, W., Gupta, R.K., Deshpande, M.C., ve Schwendeman, S.P., (2005). "Biodegradable poly (lactic-co-glycolic acid) microparticles for injectable delivery of vaccine antigens", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57:391-410.
- [110] Mohamed, F., ve Van Der Walle, C.F., (2008). "Engineering biodegradable polyester particles with specific drug targeting and drug release properties", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97:71-87.
- [111] Engineer, C., Parikh, J., ve Raval, A., (2011). "Review on Hydrolytic Degradation Behavior of Biodegradable Polymers from Controlled Drug Delivery System", *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*, 25:79-85.
- [112] Hermanson, G.T., (1996). *Bioconjugate techniques*, Academic press, Rockford.
- [113] Aslam, M., ve Dent, A., (1998). *Bioconjugation: protein coupling techniques for the biomedical sciences*, Macmillan Reference, London.

- [114] Sheehan, J., Cruickshank, P., ve Boshart, G., (1961). "Notes-A Convenient Synthesis of Water-Soluble Carbodiimides", *The Journal of Organic Chemistry*, 26:2525-2528.
- [115] Sheehan, J.C., Preston, J., ve Cruickshank, P.A., (1965). "A rapid synthesis of oligopeptide derivatives without isolation of intermediates", *Journal of the American Chemical Society*, 87:2492-2493.
- [116] Chase, J.W., Merrill, B.M., ve Williams, K.R., (1983). "F sex factor encodes a single-stranded DNA binding protein (SSB) with extensive sequence homology to *Escherichia coli* SSB", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80:5480-5484.
- [117] Chu, F.S., Chang, F.C., ve Hinsdill, R.D., (1976). "Production of antibody against ochratoxin A", *Applied and Environmental Microbiology*, 31:831-835.
- [118] Chu, F.S., ve Ueno, I. (1977). Production of antibody against aflatoxin B1. *Appl Environ Microbiol* 33, 1125-1128.
- [119] Yamada, H., Imoto, T., Fujita, K., Okazaki, K., ve Motomura, M., (1981). "Selective modification of aspartic acid-101 in lysozyme by carbodiimide reaction", *Biochemistry*, 20:4836-4842.
- [120] Williams, A., ve Ibrahim, I.T., (1981). "A new mechanism involving cyclic tautomers for the reaction with nucleophiles of the water-soluble peptide coupling reagent 1-ethyl-3-(3'-(dimethylamino) propyl) carbodiimide (EDC)", *Journal of the American Chemical Society*, 103:7090-7095.
- [121] Uelzmann, H., (1958). "Copolymers of acrylic acid and N-vinylpyrrolidone-2", *Journal of Polymer Science*, 33:377-379.
- [122] Macrogalleria Level 4, Making Polymer, <http://pslc.ws/macrog/level4.htm>, 5 Mayıs, 2012.
- [123] Microwave Chemistry: How it all Works-CEM Corporations, <http://www.cem.com/page130.html>, 8 Ağustos2012.
- [124] Kappe, C.O., (2004). "Controlled microwave heating in modern organic synthesis", *Angewandte Chemie International Edition*, 43:6250-6284.
- [125] Collins Jr, M.J., (2010). "Future trends in microwave synthesis", *Future* 2:151-155.
- [126] Hayes, B.L., (2002). "Microwave synthesis:chemistry at the speed of light", CEM publishing Matthews, NC.
- [127] Murray, J.K., ve Gellman, S.H., (2005). "Application of microwave irradiation to the synthesis of 14-helical  $\beta$ -peptides", *Organic letters*, 7:1517-1520.
- [128] Okada, Y., (2001). "Synthesis of peptides by solution methods", *Current Organic Chemistry*, 5:1-43.
- [129] Merrifield, R.B., (1963). "Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide", *Journal of the American Chemical Society*, 85:2149-2154.
- [130] Jakubkc, N.S.H.D. (2002). Peptides: chemistry and biology.
- [131] Jenobiotech.com, <http://www.jenobiotech.com/techsupport/AbDesign/ABI-Ch3.htm>, 16 Temmuz, 2012.

- [132] Aguilar, M.I. (2004). HPLC of peptides and proteins: basic theory and methodology. *Methods Mol Biol* 251, 3-8.
- [133] Howl, J., (2005). "Peptide synthesis and applications".
- [134] Kosarev, E., ve Muranov, K., (2001). "Superresolution chromatography", *Instruments and Experimental Techniques*, 44:638-643.
- [135] Malvern Zetasizer User Manual.
- [136] Çimen, N.S., (2006). Proteinlerin poliakrilik asit ile suda çözünmeyen kompleksleri, Yüksek Lisans Tezi, YTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [137] Kılıç, G., Karahan, A., ve Halkman, A., (2010). "Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy and its usage in identification of lactic acid bacteria", *Association of Food Technology*, 35:445-452.
- [138] Nieman, T.A., Skoog, D.A., ve Holler, F.J. (1998). *Principles of instrumental analysis*. Ch23.
- [139] Karahan, H.A., (2007). "Atmosferik Plazma Kullanılarak Doğal Liflerinin Yüzeysel Özelliklerinin Değiştirilmesi Üzerine Bir Araştırma", Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, İzmir.
- [140] Blue Morph Research, <http://artsci.ucla.edu/BlueMorph/research.html>, 10 Temmuz 2012.
- [141] Shimadzu SPM 9600 User Manual.
- [142] Poletti, G., Orsini, F., Raffaele-Addamo, A., Riccardi, C., ve Selli, E., (2003). "Cold plasma treatment of PET fabrics: AFM surface morphology characterisation", *Applied Surface Science*, 219:311-316.
- [143] Lemoine, D., ve Pr at, V., (1998). "Polymeric nanoparticles as delivery system for influenza virus glycoproteins", *Journal of Controlled Release*, 54:15-27.
- [144] Blanco, M., ve Alonso, M., (1997). "Development and characterization of protein-loaded poly (lactide-co-glycolide) nanospheres", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 43:287-294.
- [145] Mosmann, T., (1983). "Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assay", *Journal of Immunological Methods*, 65:55-63.
- [146] Alley, M.C., Scudiero, D.A., Monks, A., Hursey, M.L., Czerwinski, M.J., Fine, D.L., Abbott, B.J., Mayo, J.G., Shoemaker, R.H., Boyd, M.R., (1988). "Feasibility of Drug Screening with Panels of Human Tumor Cell Lines Using A Microculture Tetrazolium Assay", *Cancer Research*, 48: 589-601.
- [147] Abe, K., Matsude, N., (2000). "Measurement of Cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) Reduction Activity and Lactate Dehydrogenase Release Using MTT", *Neuroscience Research*, 38:325-329.
- [148] Ozdemir, Z.O., (2010). "Characterization of Foot-and-Mouth Disease Virus's Viral Peptides with LC-ESI-MS", *Journal of Chemical Society of Pakistan*, 32:531.

- [149] Chung, T.W., Tsai, Y.L., Hsieh, J.H., ve Tsai, W.J., (2006). "Different ratios of lactide and glycolide in PLGA affect the surface property and protein delivery characteristics of the PLGA microspheres with hydrophobic additives", *Journal of Microencapsulation*, 23:15-27.

## ÖZGEÇMİŞ

---

### KİŞİSEL BİLGİLER

**Adı Soyadı** : Serap ACAR DERMAN  
**Doğum Tarihi ve Yeri** : 15.05.1981  
**Yabancı Dili** : İngilizce  
**E-posta** : sacar@yildiz.edu.tr; [serapacar5@gmail.com](mailto:serapacar5@gmail.com)

### ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Biyomühendislik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2006
Lisans	Kimya Mühendisliği	Yıldız Teknik Üniversitesi	2008
Lisans	Kimya	Yıldız Teknik Üniversitesi	2003
Lise	Fen Bilimleri	Refhan Tümer Lisesi	1998

### İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
1998-1998	Evyap Sabun Gliserin ve Yağ A.Ş	
2000-2000	Abeş İplik ve Mensucat Sanayi A.Ş	Laborant
2004-	Yıldız Teknik Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

## YAYINLARI

- **Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler (SCI & SSCI & Arts and Humanities)**
  1. Mansuroglu B., Kızılbey K., **Derman S.**, Mustafaeva Z. "Protein Polielektrolit Kompleks ve Konjugatlarının Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Yöntemi ile İncelenmesi", Turkish Journal of Biochemistry, 36 (1); p:21–28, 2011.
  2. **Derman S.**, Kızılbey K., Mansuroğlu B., Mustafaeva Z. "Poly(N-Vinyl-2-Pyrrolidone- co- Acrylic Acid)- Bovine Serum Albumin Complex Formation Studied by HPLC and UV/Vis Spectroscopy", Romanian Biotechnological Letters, 17(4); p:7408-7417, 2012.
  
- **Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler**
  1. Mansuroglu B., Derman S., Kızılbey K., Mustafaeva Akdetse Z. "Investigation of Protein and Polymer as a Carrier on Immune System", International Journal of Natural and Engineering Sciences 3(2):32-35, 2009
  2. Kızılbey K., Mansuroglu B., Derman S., Budama Battal Y., Mustafaeva Akdeste Z. "Conjugation of BSA Protein and VP/AA Copolymers", International Journal of Natural and Engineering Sciences 3(2):36-40, 2009
  
- **Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri (*Proceedings*) kitabında "Tam Metni" basılan bildiriler**
  1. **Derman, S.**, Dalgakıran E., Mustafaeva Z., "Size and Zeta Potential Analysis of Synthetic Peptide-Carrier Protein Conjugates Depend on the Time" In:, Peptides 2008: Chemistry of Peptides in Life Science Technology and Medicine, 30th European Peptide Symposium (30EPS), Helsinki, Finlandiya, p:560-561, 2008
  2. Battal Y.B., Mansuroglu B., **Acar Derman, S.**, Mustafaeva Akdeste, Z., "Determination of binding ratio of hydrofobic peptidepolymer conjugates by using fluorescamine assay", In:, Peptides 2008: Chemistry of Peptides in Life Science Technology and Medicine, 30th European Peptide Symposium (30EPS), Helsinki, Finlandiya, p:520-521, 2008.
  
- **Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (*Proceedings*) basılan bildiriler**
  1. Acar S., Mansur B., Dalgakıran E., Topuzoğulları M., Akkılıç N., Budama Battal Y., Akdetse Z., AKDESTE M., "Covalent Conjugation of Synthetic Peptide antigen of Foot and-Mouth Disease Virus (FMDV) to Globular Macromolecules" 4<sup>th</sup> European Symposium on Biopolymers, 2-4 Ekim 2007, Kuşadası.
  2. Ozdemir Z.Ö., Topuzoğulları M., Mansur B., **Acar S.**, Budama Battal Y., Akdetse Z., AKDESTE M., "Synthesis and Characterization of Viral Peptides and Their Biopolymer Conjugates for Developing New Synthetic Vaccines" 4<sup>th</sup> European Symposium on Biopolymers, 2-4 Ekim 2007, Kuşadası.

3. **(SCI)** Mansuroglu B., **Derman SA.**, Battal YB., Kizilbey K., Mustafaeva Z., “The fluorescence study of covalent conjugation of peptide epitopes of foot-and-mouth disease virus (FMDV) with anionic polyelectrolytes and bovine serum albumin”, 33rd FEBS Congress, Atina, Yunanistan, 28 Haziran-3 Temmuz, 2008.
4. **(SCI)** Mansuroglu B., **Acar Derman, S.**, Mustafaeva Akdeste, Z., “Water-soluble covalent conjugates of peptide epitops of VP1 protein of foot-and-mouth disease virus (FMDV) with anionic N-vinylpyrrolidone copolymers and their immunogencity”, 30th European Peptide Symposium (30EPS), Helsinki, Finlandiya, 31 Ağustos – 5 Eylül, 2008.
5. **(SCI)** Battal Y.B., Mansuroglu B., **Acar Derman, S.**, Mustafaeva Akdeste, Z., “Determination of binding ratio of hydrofobic peptidepolymer conjugates by using fluorescamine assay”, 30th European Peptide Symposium (30EPS), Helsinki, Finlandiya, 31 Ağustos – 5 Eylül, 2008.
6. **(SCI)** **Derman, S.**, Budama Battal Y., Mansuroglu B., Mustafaeva Akdeste, Z., “Determination of Conjugation Degree of Synthetic Peptide-Polymer Conjugates”, 30th European Peptide Symposium (30EPS), Helsinki, Finlandiya, 31 Ağustos – 5 Eylül, 2008.
7. **(SCI)** **Derman, S.**, Dalgakıran E., Mustafaeva Z., “Size and Zeta Potential Analysis of Synthetic Peptide-Carrier Protein Conjugates Depend on the Time”, 30th European Peptide Symposium (30EPS), Helsinki, Finlandiya, 31 Ağustos – 5 Eylül, 2008.
8. **Derman S.**, Demirhan E., Akdetse Z. ve Özbek B., 2008, Covalent Conjugation of  $\beta$ -Galactosidase Enzyme with copolymers of Acrylic acid and N-Vinylpyrrolidone-2., International Enzyme Engineering Symposium (IEES'08), October, Kuşadası, Türkiye, AES03. pp76
9. **Derman S.**, Demirhan E., Akdetse Z. ve Özbek B., 2008, Covalent Conjugation of  $\beta$ -Galactosidase Enzyme with Polyacrylic acid., International Enzyme Engineering Symposium (IEES'08), October, Kuşadası, Türkiye, AES02. pp75
10. **(SCI)** **Derman S.**, Kizilbey K., Akdeste Z., “HPLC and UV Study of Water Soluble and Insoluble Complexes of Human Serum Albumin with Copolymer of VP/AA”, 34th FEBS Congress, 4-9 July 2009, Prague, Czech Republic.
11. **(SCI)** Mansuroglu B., **Derman S.**, Mustafaeva Akdeste Z., “Immunogenic Properties of VP1 Protein's Peptide Epitops of of Foot-and-Mouth Disease Virus (FMDV) Covalent Conjugates With Anionic N-Vinylpyrrolidone Copolymers”, 34th FEBS Congress, 4-9 July 2009, Prague, Czech Republic.
12. **(SCI)** **Derman S.**, Kizilbey K., Mansuroglu B., Akdeste Z., “Spectroscopic investigation of Protein-Anionic Polyelectrolyte Complexes and Conjugates”, 34th FEBS Congress, 4-9 July 2009, Prague, Czech Republic.
13. **(SCI)** **Derman S.**, Kizilbey K., Akdeste Z., “Covalent Conjugation of  $\beta$ -Estradiol with Polymers by using Thionyl Chloride Methods”, 34th FEBS Congress, 4-9 July 2009, Prague, Czech Republic.

14. **(SCI)** Kizilbey K., **Derman S.**, Mustafaeva Akdeste Z., “Progesterone-Containing Polyelectrolyte Complexes”, 34th FEBS Congress, 4-9 July 2009, Prague, Czech Republic.
15. **(SCI)** Kizilbey K., **Derman S.**, Mansuroglu B., Mustafaeva Akdeste Z., “HPLC Investigations of Bovine Serum Albumin-VP/AA Copolymer Complexes and Conjugates”, 34th FEBS Congress, 4-9 July 2009, Prague, Czech Republic.
16. **(SCI)** Mansuroglu B., **Derman S.**, Kizilbey K., Mansuroglu B., Akdeste Z., “Adjuvant Properties of Polyelectrolytes”, 34th FEBS Congress, 4-9 July 2009, Prague, Czech Republic.
17. **(SCI)** Mustafaeva Z., Budama Battal Y., **Derman S.**, “Fluorometric definition of primary amines based on their reactions with fluorescamine” 34th FEBS Congress, 4-9 July 2009, Prague, Czech Republic.
18. **Derman S.**, Kizilbey K., Akdeste Z., “Synthesis and Characterization of  $\beta$ -Estradiol-Polyelectrolyte Conjugates”, EPF’09 European Polymer Congress, 12-17 July 2009, Graz, Avusturya.
19. **Derman S.**, Kizilbey K., Mustafaeva Akdeste Z., “Synthesis and Characterization of Acrylic acid-N-Vinyl-2-Pyrrolidone Copolymers via Traditional Methods”, EPF’09 European Polymer Congress, 12-17 July 2009, Graz, Avusturya.
20. **Derman S.**, Kizilbey K., Akdeste Z., “Investigation of Water Soluble and Insoluble Complexes of Human Serum Albumin with Copolymer of VP/AA”, EPF’09 European Polymer Congress, 12-17 July 2009, Graz, Avusturya.
21. Kizilbey K., **Derman S.**, Akdeste Z., “Investigation of Water Soluble and Insoluble Complexes of Bovine Serum Albumin with VP/AA Copolymer ”, EPF’09 European Polymer Congress, 12-17 July 2009, Graz, Avusturya.
22. Kizilbey K., **Derman S.**, Mustafaeva Akdeste Z., “Ternary Polyelectrolyte Complexes Containing Progesterone”, EPF’09 European Polymer Congress, 12-17 July 2009, Graz, Avusturya.
23. Kizilbey K., **Derman S.**, Saricay Y., Mustafaeva Akdeste Z., “Synthesis of N-Vinyl-2-pyrrolidone/acrylic acid (VP/AA) Copolymers by Using Microwave Method”, EPF’09 European Polymer Congress, 12-17 July 2009, Graz, Avusturya.
24. **Derman S.**, Mustafaeva Z., “Synthesis And Characterization of Canine Parvovirus (CPV) VP2 7L-20 Synthetic Peptide” 16th International Biomedical Science & Technology Symposium, BIOMED 2010, 29 September-2 October 2010, İstanbul, Türkiye.
25. Kizilbey K., **Derman S.**, Mustafaeva Z., “Chromatographic Investigation of P(VP-co-AA)-Melanoma Peptide Conjugates” 16th International Biomedical Science & Technology Symposium, BIOMED 2010, 29 September-2 October 2010, İstanbul, Türkiye.



26. (SCI) Mansuroglu B., Kızılbey K., **Derman S.**, Akdeste ZM., "Synthesis and physicochemical characterisation of hemoglobin anionic polyelectrolyte conjugates" 35th FEBS Congress, 26 June-01 July 2010, Gothenburg, Sweden.

27. (SCI) **Derman S.**, Mustafaeva Z., "Canine Parvovirus (CPV) VP2 Synthetic Peptide-Polyacrylic Acid Conjugates: Synthesis and Characterization with Chromatographic Method" 36th FEBS Congress, 25-30 June 2011, Turin, Italy.

• **Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler**

1. Akdeste Z., **Acar S.**, Mustafaev M.. "Globular Makromoleküllerin Peptidler ile Bağlanma Mekanizması" XX. Ulusal Kimya Kongresi, 4-8 Eylül 2006 Kayseri.
2. **Acar S.**, Budama Battal Y., Akdeste Z., Mustafaev M., "Sentetik Peptidlerin Bovin Serum Albumin Proteinini İle Kovalent Konjugasyonunun Floresans Spektrofotometre ile İncelenmesi", X. Ulusal Spektroskopi Kongresi, 4-7 Temmuz 2007, İzmir.
3. **Acar S.**, Budama Battal Y., Akdeste Z., Mustafaev M., "Fluorescamin Yöntemi İle Peptid-Protein Ve Peptid-Polimer Konjugatlarının Konjugasyon Derecesinin Saptanması" 21. Ulusal Kimya Kongresi, 23-27 Ağustos 2007, Malatya.
4. **Acar S.**, Dalgakıran E., Akdeste Z., Mustafaev M., "Şap Hastalığı Virüsünün Peptid Epitoplarının Serum Proteinleri İle Kovalent Konjugasyonu Ve Konjugatların Zetapotansiyel Ve Boyut Analizi" 21. Ulusal Kimya Kongresi, 23-27 Ağustos 2007, Malatya.
5. Sarıçay Y., **Acar S.**, Özkan Ö., Kızılbey K., Budama Battal Y., Akdeste Z., Mustafaev M., "Nano Yapılı BSA-Dekstran Sülfat Komplekslerinin Oluşturulması ve Karakterizasyonu" 21. Ulusal Kimya Kongresi, 23-27 Ağustos 2007, Malatya.
6. **Derman Acar S.**, Kızılbey K., Budama Battal Y., Sarıçay Y., Dalgakıran E., Akdeste Z., "Polistriyen Sodyum Sülfonat-Bovine Serum Albumin Komplekslerinin Spektroskopik ve Kromatografik Yöntemlerle İncelenmesi", 2. Ulusal Polimer Bilim ve Teknolojisi Kongresi ve Sergisi, 30 Nisan-2 Mayıs 2008, Şanlıurfa.
7. **Derman Acar S.**, Kızılbey K., Budama Battal Y., Akdeste Z. "Suda Çözünür Polisakkarit-Protein Komplekslerinin Oluşturulması ve Karakterizasyonu", 2. Ulusal Polimer Bilim ve Teknolojisi Kongresi ve Sergisi, 30 Nisan-2 Mayıs 2008, Şanlıurfa.
8. Özdemir Z. Ö., Kızılbey K., **Acar S.**, Sarıçay Y., Akdeste Z. "Vinilpirilidon/Akrilik Asit Kopolimerinin Mikrodalga Destekli Sentezi", 2. Ulusal Polimer Bilim ve Teknolojisi Kongresi ve Sergisi, 30 Nisan-2 Mayıs 2008, Şanlıurfa.
9. Mansuroğlu B., Budama Battal Y., **Derman S.**, Mustafaeva Akdeste Z., "Vinil Prilidon Akrilik Asit Kopolimerinin Sentetik Peptidler İle Kovalent Konjugasyon Mekanizmasının Floresans Spektrofotometre İle İncelenmesi" XXII. Ulusal Kimya Kongresi, 06-10 Ekim 2008, Kıbrıs.

10. Kızılbey K., Mansuroğlu B., **Derman S.**, Budama Battal Y., Mustafaeva Akdetse Z., “Sığır Serum Albuminin Vinilpirolidon/Akrilik Asit Kopolimeri ile Konjugasyon Mekanizmasının İncelenmesi” XXII. Ulusal Kimya Kongresi, 06-10 Ekim 2008, Kıbrıs.
11. Kızılbey K., **Derman S.**, Özdemir Z. Ö., Sarıçay Y., Mustafaeva Akdetse Z., “Vinilpirolidon/Akrilik Asit Kopolimerinin Klasik Yöntemle ve Mikrodalga Destekli Sentezi” XXII. Ulusal Kimya Kongresi, 06-10 Ekim 2008, Kıbrıs.
12. **Derman S.**, Mansuroğlu B., Budama Battal Y., Akdetse Z., “Sentetik Peptid-Sığır Serum Albumin Proteini Kovalent Konjugasyonunun Floresans Spektrofotometre İle İncelenmesi” XXII. Ulusal Kimya Kongresi, 06-10 Ekim 2008, Kıbrıs.
13. **Derman S.**, Kızılbey K., Budama Battal Y., Sarıçay Y., Dalgakıran E., Akdetse Z., “Spektroskopik ve Kromatografik Yöntemlerle Polianyon-Protein Komplekslerinin İncelenmesi” XXII. Ulusal Kimya Kongresi, 06-10 Ekim 2008, Kıbrıs.
14. Derman S., **Kızılbey K.**, Mansuroğlu B., Budama Battal Y., Mustafaeva Akdetse Z., “BSA Proteini ile VP/AA Kopolimer Konjugatlarının Bağlanma Oranlarının Saptanması” IV. Ulusal Biyomühendislik Kongresi, 15-18 Ekim 2009, İzmir
15. **Kızılbey K.**, Mansuroğlu B., Derman S., Budama Battal Y., Akdetse Z. “BSA Proteininin VP/AA Kopolimeri ile Konjugasyonu” IV. Ulusal Biyomühendislik Kongresi, 15-18 Ekim 2009, İzmir
16. **Mustafaeva Akdetse Z.**, Mansuroğlu B., Budama Battal Y., Acar Derman S., Özdemir Z.Ö., “Şap Hastalığı Virüsünün VP1 Kapsid Proteininin Antijenik Özellikli 40-60, 170-188, 200-213, 135-161 Amino Asit Dizili Peptidlerinin Polianyonlara Konjugasyonu” IV. Ulusal Biyomühendislik Kongresi, 15-18 Ekim 2009, İzmir
17. **Mansuroğlu B.**, Derman S., Kızılbey K., Mustafaeva Akdetse Z. “Protein ve Polimerlerin İmmün Sistem Üzerinde Etkisinin İncelenmesi” IV. Ulusal Biyomühendislik Kongresi, 15-18 Ekim 2009, İzmir
18. **Derman S.**, Özkan Ö., Kızılbey K., Mansuroğlu B., Mustafaeva Z., “BSA-Dekstran Sülfat Komplekslerinin Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi Sistemi İle İncelenmesi”, Kromatografi 2010 Kongresi, 16-19 Haziran 2010, Erzurum
19. Mansuroğlu B., Kızılbey K., **Derman S.**, Mustafaeva Z., “Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi ile Sığır Serum Albumin-Vinil Prolidon/Akrilik Asit Kopolimerinin Kompleks ve Konjugatlarının İncelenmesi”, Kromatografi 2010 Kongresi, 16-19 Haziran 2010, Erzurum.

- **Projeler**

1. Canine Parvoviruse Ait Antijenik Özellikli Sentetik Peptidlerin Sentezi ve Biyokonjugatlarının Geliştirilmesi, Y.T.Ü. Araştırma Fonu DOP Projesi, 2011-07-04-DOP01
2. Streptozotocin (STZ) ile diyabet oluşturulan sıçanlarda kimyasal olarak modifiye edilmiş Süperoksit Dismutazın (SOD) antioksidatif özelliklerinin incelenmesi ve geliştirilmesi, Y.T.Ü. Araştırma Fonu GEP Projesi, 2010-07-04-GEP01

## **ÖDÜLLERİ**

1. Yıldız Teknik Üniversitesi Rektörlüğü, Bilimsel Yayın Teşvik Ödülü, 2011.
2. TÜBİTAK, Uluslararası Bilimsel Yayınları Teşvik Ödülü, 2011.
3. IUPAC, Kongre Katılım Bursu, 2009.
4. TÜBİTAK, Yurtiçi Bilimsel Etkinliklere Katılma Desteği, 2008.
5. TÜBİTAK, Yurtiçi Doktora Burs Programı, 2006-2012.